Utjecaj autohtonih sojeva Lactobacillus sakei na mikrobiotu kobasica od mesa divlje svinje

Senko, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:105021

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

UTJECAJ AUTOHTONIH SOJEVA *LACTOBACILLUS SAKEI* NA MIKROBIOTU KOBASICA OD MESA DIVLJE SVINJE

DIPLOMSKI RAD

Helena Senko

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Agroekologija usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

UTJECAJ AUTOHTONIH SOJEVA *LACTOBACILLUS SAKEI* NA MIKROBIOTU KOBASICA OD MESA DIVLJE SVINJE

DIPLOMSKI RAD

Helena Senko

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Neposredni voditelj: Ana Žgomba Maksimović, mag. ing. agr.

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Helena Senko**, JMBAG 0178093865, rođen/a dana 13.6.1993. u Varaždinu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ AUTOHTONIH SOJEVA *LACTOBACILLUS SAKEI* NA MIKROBIOTU KOBASICA OD MESA DIVLJE SVINJE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor 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/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Helene Senko**, JMBAG 0178093865, naslova

UTJECAJ AUTOHTONIH SOJEVA *LACTOBACILLUS SAKEI* NA MIKROBIOTU KOBASICA OD MESA DIVLJE SVINJE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1. Mentor	Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka	_____
Neposredni voditelj	Ana Žgomba Maksimović, mag. ing. agr.	_____
2. Član	Izv. prof. dr. sc. Danijel Karolyi	_____
3. Član	Doc. dr. sc. Ivica Kos	_____

Zahvala

Zahvaljujem se svima koji su me podržavali i bodrili tijekom mog studiranja, svim prijateljima i profesorima, a posebno mojoj sestri i tati.

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc Mirni Mrkonjić Fuka na ukazanom povjerenju, strpljenju, stečenim vještinama i znanju.

Posebno hvala neposrednoj voditeljici Ani Žgomba Maksimović, mag. ing. agr. na strpljenju, pomoći i odgovorima na sva moja pitanja.

Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja 3

2. Pregled literature 4

2.1. Mikrobiološka i nutritivna kvaliteta mesa divljači 4

2.2. Proizvodnja tradicionalnih, trajnih fermentiranih kobasica 5

2.3. Bakterije mliječne kiseline (BMK) kao starter kulture 7

2.3.1. Primjena laktobacila u proizvodnji kobasica 8

3. Materijali i metode 10

3.1. Priprema korištenih otopina 10

3.1.1. Fiziološka otopina (0,85 %) 10

3.1.2. Peptonska voda 10

3.2. Priprema hranjivih podloga 10

3.2.1. BP čvrsta podloga (Baird Parker Agar) 10

3.2.2. CCA čvrsta podloga (Chromogenic Coliform Agar) 10

3.2.3. DRBC čvrsta podloga (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar) 11

3.2.4. KAA čvrsta podloga (Kanamycin Aesculin Azide Agar) 11

3.2.5. LamVab čvrsta podloga 11

3.2.6. MRS čvrsta podloga 12

3.2.7. MRS tekuća hranjiva podloga 12

3.2.8. Otopina obranog mlijeka (10 %) 12

3.2.9. VRBG čvrsta podloga (Red Bile Glucose Agar) 12

3.3. Priprema sojeva MRS_296 i C_7d_13 za inokulaciju 13

3.4. Uzorkovanje 13

3.5. Mjerenje pH vrijednosti i aktiviteta vode (a_w) 14

3.6. Homogenizacija uzoraka kobasica, prikupljanje laktobacila i mikrobiološka analiza 14
3.6.1. Homogenizacija uzoraka i priprema serije razrjeđenja 14
3.6.2. Izolacija i prikupljanje laktobacila 15
3.6.3. Mikrobiološka analiza 16
3.7. Izolacija DNA iz čistih kultura laktobacila 17
3.8. Praćenje preživljavanja dodanih startera rep – PCR metodom 18
4. Rezultati i rasprava 19
4.1. Umnažanje biomase sojeva laktobacila MRS_296 i C_7d_13 19
4.2. pH vrijednost i aktivitet vode (a_w) 20
4.3. Prikupljanje izolata laktobacila i određivanje CFU vrijednosti 23
4.4. Mikrobiološka analiza uzoraka kobasica 25
4.5. Praćenje preživljavanja inokuliranih starter sojeva rep-PCR metodom 29
5. Zaključci 36
Literatura 37
Prilog 1. 44
Popis slika 44
Prilog 2. 45
Popis grafova 45
Prilog 3. 46
Popis tablica 46

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Helene Senko**, naslova

UTJECAJ AUTOHTONIH SOJEVA *LACTOBACILLUS SAKEI* NA MIKROBIOTU KOBASICA OD MESA DIVLJE SVINJE

Priprema domaćih trajnih fermentiranih kobasica je dio gastronomske tradicije u Hrvatskoj. Međutim, budući da se proizvode bez dodatka starter kultura, mikrobiološka sigurnost gotovih proizvoda može biti upitna. Jedan od načina osiguranja mikrobiološke stabilnosti trajnih kobasica je aplikacija starter i/ili bioprotektivnih kultura. *Lactobacillus sakei* predstavlja jednu od najkompetitivnijih bakterija mliječne kiseline (BMK) sa prirodnom mikrobiotom mesa. U ovom istraživanju, u smjesu za proizvodnju kobasica, dodana su 2 soja *Lb. sakei* (MRS_296 i C_7d_13), koja su prethodno izolirana iz kobasica ovog tipa i detaljno tehnološki i molekularno-biološki karakterizirana. Praćeno je preživljavanje dodanih starter kultura tijekom fermentacije i zrenja kobasica, kao i njihov utjecaj na fizikalno-kemijske karakteristike i prirodno prisutnu mikrobiotu. Zabilježen je signifikantno niži pH kod inokulirane kobasice nakon 7 dana (p<0,001) i 40 dana (p<0,001), u odnosu na kontrolnu kobasicu. Dodatno je potvrđena korelacija između broja detektiranih laktobacila i pada pH kod inokulirane (r=-0,97, p<0,001) i kontrolne kobasice (r= -0,81, p<0,05). Analizom rep-PCR obrazaca utvrđeno je da inokulirani starter soj *Lb. sakei* C_7d_13 ne preživljava, dok je soj MRS_296 pokazao dobru kompetitivnosti sa prirodno prisutnom mikrobiotom budući da je izoliran kao dominantan soj tijekom svih vremenskih intervala, uključujući i gotove proizvode (kraj zrenja) te je u inokuliranoj kobasici broj *E.coli*, koliformnih bakterija i *S. aureus* je pao ispod razine detekcije. Međutim, dopušteni broj enterobakterija prelazi granice u inokuliranoj i kontrolnoj kobasici.

Ključne riječi: starter, *Lactobacillus sakei*, fermentirane kobasice, rep-PCR, sigurnost hrane

Summary

Of the master's thesis – student **Helena Senko,** entitled

INFLUENCE OF DOMESTIC *LACTOBACILLUS SAKEI* STRAINS ON MICROBIOTA OF FERMENTED SAUSAGES PRODUCED FROM WILD BOAR MEAT

The production of spontaneously fermented game meat sausages represents a part of the gastronomic tradition in Croatia. However, since they are manufactured without the addition of starter cultures, the microbiological safety of ready-to-eat sausages can be compromised. One of the posibillities of product standardisation is by appliying lactic acid bacteria (LAB) strains as starter cultures. *Lactobacillus sakei* is one of the most competitive LAB with natural microbiota of the meat. During this study, two strains of *Lb sakei* (MRS_296 and C_7d_13), previously isolated from sausages of this type and characterised in detail, were added to the sausage mixture.The survival of added starter cultures during fermentation and ripening of sausages was monitored, as well as their influence on the physico-chemical characteristics of sausages and the naturally present microbiota. Significantly lower pH was observed in inoculated sausages after 7 days (p <0.001) and 40 days (p <0.001) compared to the control (non inoculated) sausage. Correlation between the number of detected lactobacilli and the pH decrease in inoculated (r= -0.97, p<0.001) and control sausage (r= -0,81, p<0,05) was confirmed. Analysis of rep-PCR patterns showed that starter C_7d_13 did not survive and strain MRS_296 did survive during the processes of production, fermentation and ripening. That´s why in inoculated sausage number of *E. coli*, coliform bacteria and *S. aureus* had fallen underneath the detection level. However, permitted number of enterobacteria is crossing the lines in inoculated and control sausage.

Keywords: starter culture, *Lactobacillus sakei*, fermented sausages, rep-PCR, food safety

Popis kratica

a_w	aktivitet vode
BMK	bakterije mliječne kiseline
°C	stupanj celzijusa
CFU	broj formiranih kolonija (engl. *colony forming units*)
cca	oko, približno
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
g	gram
g	broj okretaja rotora centrifuge u minuti
GI	gastrointestinalni trakt
h	sat
L	litra
M	mol, množina tvari
µL	mikrolitar
µm	mikrometar
mg	miligram

min	minuta
mL	mililitar
mM	milimol
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe medij
PCB	poliklorirani bifenili
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
pH	negativan logaritam koncentracije H^+ iona
rep-PCR	lančana reakcija polimerazom repetitivnih ekstragenskih palindromskih elemenata (engl. *repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction*)

1. Uvod

Trajne fermentirane kobasice od mesa divljači se proizvode na obiteljsko-poljopivrednim gospodarstvima i domaćinstvima diljem Hrvatske, prateći tradicionalne recepture i postupke. Kobasice se najčešće proizvode od smjese mesa divlje i domaće svinje u različitim omjerima i sa dodatkom različitih začina. U posljednjih nekoliko godina se povećala potražnja za ovakvim proizvodima budući da su specifičnih organoleptičkih svojstava, te kupci sve češće cijene nešto što nije proizvedeno industrijski i ima oznaku tradicionalno.

Za razliku od industrijske proizvodnje u kojoj se dodaju selektirane starter kulture, fermentacija tradicionalnih kobasica nije kontrolirana i oslanja se na prirodnu prisutnu mikrobiotu porijeklom od postupaka tijekom klanja životinja, čuvanja mesa i proizvodnje kobasica. Svako gospodarstvo ima specifičnu mikrobiotu sastavljenu od korisnih mikroorganizama za fermentaciju i okus kobasica, ali i patogenu mikrobiotu i onu odgovornu za kvarenje (Ammor i sur., 2005). Upravo zbog toga, mikrobiološka kvaliteta ovakvih proizvoda može biti upitna jer spontane fermentacije mogu otići i u negativnom smjeru te pri tome pogodovati razvoju patogenih vrsta i bakterija kvarenja. Inokulacijom smjese za proizvodnju kobasica sa selektiranim starterom može se poboljšati kvaliteta i sigurnost finalnog proizvoda kao i standardizirati proces proizvodnje (Lizaso i sur, 1999; Villani i sur., 2007). Dodavanje komercijalnih startera predstavlja oblik biološke zaštite mesa, ali se često mogu izgubiti specifična organoleptička svojstva, iako su proizvodi standardizirani i sigurni za upotrebu. Također, nisu svi komercijalni starteri jednako uspješni u svim tipovima proizvoda. Stoga je tendencija na primjeni autohtonih sojeva, koji u odnosu na komercijalne startere uglavnom pokazuju bolju sposobnost preživljavanja kao i veću metaboličku aktivnost, u smislu očuvanja aroma i mikrobiološke stabilnosti krajnjeg proizvoda (Leroy i sur., 2006; Frece i sur., 2014). Kao starter kulture, često se koriste bakterije mliječne kiseline (BMK), među kojima *Lactobacillus sakei* predstavlja jednu od najkompetitivnijih BMK sa prirodnom mikrobiotom mesa te je često dominantna vrsta izolirana iz spontano fermentiranih kobasica (Hugas i sur., 1993; Rebecchi i sur., 1998; Aymerich i sur., 2003; Papamanoli i sur., 2003). Dodavanje BMK originalno izoliranih iz tradicionalnih kobasica je najbolje rješenje za poboljšanje mikrobiološke sigurnosti ovakvih proizvoda jer su dobro prilagođene uvjetima tijekom sazrijevanja kobasica i kompetitivnije su nego BMK izolirane iz drugih izvora (Ammor i sur., 2005).

Tijekom ovog istraživanja, u smjesu za proizvodnju kobasica dodana su 2 soja *Lb. sakei* (MRS_296 i C_7d_13), koja su prethodno izolirana iz kobasica ovog tipa te detaljno tehnološki i molekularno-biološki karakterizirana na Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Praćeno je preživljavanje dodanih starter kultura tijekom fermentacije i zrenja kobasica, kao i njihov utjecaj na fizikalno-kemijske karakteristike i prirodno prisutnu mikrobiotu.

1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Za osiguranje mikrobiološke stabilnosti i standardizaciju proizvodnje tradicionalnih kobasica nužno je kontrolirati čitav proizvodni proces, a jedan od načina je primjenom starter kultura. Pretpostavka ovog istraživanja je da će nakon inokulacije smjese za proizvodnju kobasica sa dva autohtona soja *Lb. sakei* (MRS_296 i C_7d_13), sojevi pokazati dobru kompetitivnost sa prirodno prisutnim mikroorganizmima, što će u krajnosti rezultirati smanjenjem broja neželjenih mikroorganizama i mikrobiološki stabilnim proizvodom.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- utvrditi sposobnost preživljavanja inokuliranih sojeva tijekom fermentacije i zrenja istraživanih kobasica
- odrediti utjecaj inokuliranih sojeva na fizikalno kemijske-karakteristike (pH, a_w) istraživanih kobasica
- utvrditi efikasnost inokuliranih sojeva da kontroliraju proliferaciju patogena i bakterija kvarenja u odnosu na neinokuliranu kontrolu

2. Pregled literature

2.1. Mikrobiološka i nutritivna kvaliteta mesa divljači

Meso dobiveno od životinja iz uzgoja ujednačene je kvalitete i izgleda, a životinje su ishranjivane su na jednak način te imaju meso dobrih ukupnih senzornih karakteristika (Troy i Kerry, 2010). Zbog toga je puno lakše standardizirati i kontrolirati kvalitetu proizvoda dobivenih od mesa takvih životinja. Međutim, to nije lako postići preradom proizvoda od mesa divljači (Kritzinger i sur., 2003), budući da postoji vrlo malo mogućnosti kontrole *ante-mortem* čimbenika i načina odstrela divljih životinja. Mikrobiološka kvaliteta mesa divljači ovisi o: (1) vrstama mikroorganizama na koži, probavnom traktu i mišićima životinja; (2) okolnostima u kojima su životinje ubijene; i (3) uvjetima obrade i skladištenja mesa (Gill, 2007).

Meso divljači mora proći proces evisceracije nakon lova, tijekom čega postoji velika mogućnost mikrobne kontaminacije površine mišićnog tkiva. Visoka razina mikrobiološke kontaminacije često je povezana s vidljivom kontaminacijom trupova crijevnim sadržajem ili tlom. Razdoblje između odstrjela i evisceracije životinje, naknadnog tretmana i hlađenja također je važno. Ukupni broj mikroogranizama koji kontaminiraju mišićno tkivo povećava se ako su životinje eviscerirane nakon više od 180 minuta od odstrjela (Avagnina i sur., 2012).

Kvaliteta mesa divlje svinje obilježena je različitom distribucijom mišićnih vlakana, koja se odražava na fizički, kemijski i morfološki sastav mesa (Żochowska-Kujawska i sur., 2007). U usporedbi s mesom domaće svinje meso divlje svinje karakterizira visoki inicijalni pH nakon 45 min od trenutka smrti, tamna boja i mala provodljivost (Kasprzyk i sur., 2010). Potrošači često percipiraju da je tamnije meso i kvalitetnije, ali tamnija boja mesa može biti povezana s visokom *ante-mortem* mišićnom aktivnošću i *ante-mortem* stresom što rezultira većom konačnom pH vrijednošću mesa (pH > 6) koje se opisuje i kao tamno, čvrsto i suho (Daszkiewicz i sur., 2012; Hoffman i sur., 2005). Prirodna prisutnost mioglobina je od osnovne važnosti za tamnu boju mesa divljači te on nakon klanja i evisceracije postaje predominantni pigment mišićnog tkiva. Sadržaj mioglobina ovisi o vrsti divljači, dobi i specifičnom mišiću. U pravilu što je meso tamnije sadrži više mioglobina. Tijekom skladištenja mesa na zraku mioglobin se oksidira postepeno preko crvenog oksimioglobina do crveno-smeđeg metmioglobina neatraktivne boje (Hofbauer i Smulders, 2011).

2.2. Proizvodnja tradicionalnih, trajnih fermentiranih kobasica

Tradicionalne trajne fermentirane kobasice se pripremaju miješanjem mesa sa začinima, nakon čega se smjesa puni u ovitke koji dozvoljavaju fermentaciju i zrenje (Campbell - Platt i Cook, 1995; Lücke, 1998). U svom preglednom radu, Pavičić i Ostović (2008) su opisali procese proizvodnje tradicionalnih kobasica u Hrvatskoj. Autori navode kako je jedan od preduvjeta za proizvodnju kvalitetnih kobasica hlađenje mesa najmanje 18-24 h na temperaturi od -1 °C do 0 °C, čime se postiže da temperatura u samom mesu bude 3-4 °C (Pavičić i Ostović, 2008), nakon čega se meso dalje otkoštava, usitnjava i dodaju se začini. Začini utječu na specifičan okus i miris te na boju kobasice, a neki od njih mogu djelovati bakteriostatično ili bakteriocidno. Autori navode kako se za proizvodnju tradicionalnih kobasica najčešće koriste sol, crni papar, češnjak i mljevena crvena paprika, dok se nešto rjeđe koriste kadulja, timijan, mažuran, ružmarin, lovor, peršin, muškatni oraščić, đumbir i piment iako korišteni začini kao i njihovi omjeri mogu uvelike varirati ovisno o regiji proizvodnje i recepturama proizvođača. Ističu kako je nakon dodavanja začina preporučeno miješati smjesu oko 30 min kako bi se začini ravnomjerno rasporedili, a zatim ostaviti smjesu 1-2 h u hladnom i prozračnom prostoru da meso upije začine. U tradicionalnoj proizvodnji često se koriste prirodni ovici (najčešće tanko crijevo) koji su dovoljno jaki da podnesu pritisak prilikom punjenja, propusni su za prolazak vode, plinova i dima, te su elastični, čvrsto prianjaju uz punjenje i mogu biti vezani ili pričvršćeni na krajevima kobasica. Kao prirodni ovici najčešće se koriste tanko crijevo koza, ovaca i svinja koje se jede s kobasicama i može probaviti, za razliku od tankog crijeva krava i konja koje je potrebno skinuti nakon zrenja kobasica jer je pretvrdo i nepogodno za žvakanje (Heinz i Hautzinger, 2007). Proces pripreme crijeva za ovitke treba početi čim prije nakon klanja, kad je tkivo još toplo, da se izbjegne bakterijsko kvarenje (Djordjevic i sur., 2015). Da se postignu specifične senzorne karakteristike, pripremljene kobasice se mogu dimiti, najčešće svakodnevno tijekom 5-10 dana na temperaturi od 16-25 °C (Pavičić i Ostović, 2008). Izgled gotovih tradicionalnih trajnih kobasica proizvedenih od mješavine mesa domaćih i divljih životinja je prikazan na Slici 1B, dok je začinjena smjesa mesa za proizvodnju kobasica prikazana na Slici 1A.

Slika 1. Smjesa za proizvodnju kobasica sa začinima (A) i tradicionalno proizvedene kobasice od mesa divljači na kraju zrenja (B)

Tijekom procesa fermentacije događaju se različite fiziološke, biokemijske i mikrobiološke promjene (Lizaso i sur, 1999; Villani i sur., 2007). Za senzorne karakteristike kobasica odgovorni su bakterijski enzimi i enzimi mesa koji dovode do razgradnje masti, ugljikohidrata i proteina (Dainty i Blom, 1995; Ordóñez i sur., 1999). Općenito, endogeni enzimi mišića odgovorni su za ove reakcije, posebno na početku procesa zrenja. Mikrobiološki enzimi igraju važnu ulogu u stvaranju slobodnih aminokiselina i masnih kiselina (Flores i Toldrá, 2011). Daljnja degradacija ovih prekursora na spojeve koji doprinose aromi posredovana je kemijskim i mikrobnim reakcijama, a sam okus gotovih trajnih fermentiranih kobasica potječe od kombinacije sastojaka (meso, začini i dim) (Flores i Olivares, 2015, Vignolo i sur., 2010). Fermentaciju ugljikohidrata uglavnom provode BMK koje dominiraju fermentacijskim procesom i proizvode mliječnu kiselinu i druge spojeve odgovorne za aromu kao što su diacetil, acetaldehid, etanol, octena kiselina i propionska kiseline (Ravyts i sur., 2012).

2.3. Bakterije mliječne kiseline (BMK) kao starter kulture

Kao starter kulture najčešće se koriste BMK (homofermentativni laktobacili i pediokoki), koagulaza-negativni stafilokoki, plijesni i kvasci (Hugas i Monfort, 1997). Glavna uloga BMK kao starter kultura je da svojom metaboličkom aktivnošću produciraju mliječnu kiselinu koja dovodi do acidifikacije mesne smjese što djeluje inhibitorno na prirodno prisutnu mikrobiotu i osigurava mikrobiološku stabilnost gotovog proizvoda. Snižavanjem pH vrijednosti je također omogućeno odvijanje složenih biokemijskih procesa koji doprinose senzornim svojstvima trajnih kobasica (Hammes i sur, 1990; Acton i sur., 1997; Liestner 2000). Osim toga, određeni sojevi BMK mogu imati bioprotektivnu ulogu na način da produciraju bakteriocine, odnosno antimikrobne polipeptide koji najčešće djeluju inhibitorno na srodne vrste. Smatra se da ih bakterije proizvode da osiguraju selektivnu prednost (Le Marrec i sur, 2000). Različita istraživanja su potvrdila inhibitorni učinak bakteriocina produciranih od strane BMK, kao što su pediocin korišten u svježem mesu (Nielson i sur., 1990) i trajnim fermentiranim kobasicama (Foegeding i sur., 1992), lactocin 705, enterocin CRL35, i nizin korišteni u svježem mesu (Vignolo i sur., 2000).

Neki sojevi BMK također mogu posjedovati enzim nitrit-reduktazu koja reducira nitrite u anaerobnim uvjetima i na taj način smanjuju njihovu količinu u hrani (Yang i sur., 2004). Nitriti su česti aditiv u proizvodnji fermentiranih kobasica jer popravljaju boju, poboljšavaju teksturu, potencijalni su antioksidant i inhibiraju rast patogena (Gill i Holley, 2003; Honikel 2008), a mogu reagirati s aminima i amidima i producirati komponente koje su povezane s povećanim rizikom od raka želuca, jednjaka, nazofarinksa i mokraćnog mjehura. Nitriti mogu oksidirati reducirano željezo (Fe^{2+}) u hemoglobinu do maksimalno oksidiranog stanja (Fe^{3+}) što uzrokuje reducirani kapacitet prijenosa kisika u krvi (Majumdar, 2003).

Također, prema istraživanjima Lušnic Polak i sur. (2016.) upotreba komercijalnih startera (BMK + stafilokoki) u mesnoj industriji može utjecati na degradaciju polikloriranih bifenila (PCB) u trajnim kobasicama. PCB predstavljaju rizik za zdravlje životinja i ljudi jer djeluju kancerogeno, neurotoksično, izazivaju oštećenja genetskog materijala i reproduktivnog sustava (Elnar i sur., 2015), a topljivi su u mastima, vežu se za lipidne komponente u tkivima životinja i akumuliraju se u hranidbenom lancu. U svom istraživanju, Lušnic Polak i sur. (2016) navode kako je od ukupno 4 istraživana komercijalna proizvoda, najveću uspješnost u degradaciji PCB spojeva pokazao Biostar Sprint koji se sastoji od mješavine *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus*. Autori temeljem dosadašnjih spoznaja

najveću ulogu u razdradnji PCB pripisuju *S. xylosus*, međutim navode kako su razgradnji pridonijela i ostala dva soja (*S. carnosus* i *Lb. sakei*).

2.3.1. Primjena laktobacila u proizvodnji kobasica

Rod *Lactobacillus* ima veliko značenje za prehrambenu industriju kao starter kultura i za ljudsko zdravlje kao probiotička kultura. Laktobacili čine najznačajniji rod BMK s preko 150 vrsta (http://www.bacterio.cict.fr). Oni su gram pozitivne, nesporulirajuće, katalaza negativne, aero-tolerantne ili anaerobne i većinom nepokretne bakterije koje se pojavljuju u obliku bacila ili kokobacila. Mogu se podijeliti u tri skupine prema fermentacijskim svojstvima: obligatni homofermentativni producirajući više od 85 % mliječne kiseline iz glukoze, fakultativno heterofermentativni i oligatno heterofermentativni producirajući mliječnu kiselinu, CO_2, etanol i/ili octenu kiselinu iz glukoze. Zastupljen je u različitim sredinama od hrane, biljaka i kanalizacije do oralnog, genitalnog i gastrointestinalnog (GI) trakta ljudi i životinja (Pot i sur., 1994; Hammes i Vogel, 1995, Hammes i Hertel, 2006).

Jedna od najčešće korištenih vrsta kao starter kultura u industrijskoj proizvodnji različitih fermentiranih proizvoda je *Lb. sakei*. Pripada skupini fakultativno heterofermentativnih laktobacila i predstavlja jednu od najkompetitivnijih BMK s prirodnom mikrobiotom mesa te često dominira u fermentiranim kobasicama, dok su ostali laktobacili poput *Lb. curvatus, Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. paracasei* zastupljeni u manjoj mjeri (Hugas i sur., 1993; Rebecchi i sur., 1998; Aymerich i sur., 2003; Papamanoli i sur., 2003). *Lb. sakei* je obično dobro prilagođen na uvjete tijekom fermentacije kobasica, kao što su tolerantnost na niske temperature, visoke koncentracije soli i različite količine kisika (Chaillou i sur., 2005; Champomier-Verges i sur., 2002).

Osim kao starter kultura, neki sojevi ove vrste imaju potencijal za aplikaciju u proizvodnji i zbog svoje bioprotektivne uloge. Naime, određeni sojevi *Lb. sakei* imaju sposobnost produkcije više različitih bakteriocina, među kojima je najpoznatiji sakacin, i to sakacin-A. Sakacin-A, kojeg proizvodi *Lb. sakei*, je *Listeria*-ciljani peptid molarne mase od 4308 Da (Holck i sur., 1992) i pripada bakteriocinima klase IIa. Proizvodnja bakteriocina ovisi o soju i najčešće su aktivni prema srodnim vstama. U svom istraživanju, Ammor i sur. (2005) su dokazali antibakterijsku aktivnost samo jednog izolata *Lb. sakei* prema *L. innocua* ATCC 33090, dok ni jedan izolat nije bio sposoban inhibirati rast *S. aureus* E1S-5. Međutim, Papamanoli i sur. (2003) su dokazali antimikrobnu aktivnost svih 49 ispitivanih izolata *Lb. sakei* prema *L.*

monocytogenes i 75 % izolata prema *S. aureus*. Osjetljivost mikroorganizama na bakteriocine je ovisna o pH (Mørtvedt - Abilgaard i sur., 1995) i temperaturi, odnosno nakon izlaganja temperaturnom stresu rezistentne populacije mogu postati osjetljive (Kalchayanad i sur., 1992). Prema novijim istraživanjima, trajni fermentirani proizvodi od mesa pogodni su za prijenos probiotičkih bakterija, budući da ne dolazi do razvoja visokih temperatura (Ammor i Mayo, 2007; Arihara, 2006). Osim toga, kobasice s dodanim probioticima su prikladan način za unos probiotičkih bakterija, budući da se smatra kako matriks kobasica pogoduje njihovom preživljavanju u GI traktu (Klingberg i Budde, 2006). Prema rezultatima istraživanja Radulović i sur. (2011), probiotičke bakterije *Lactobacillus helveticus* RO52 i *Bifidobacterium longum* RO175 (Lallemand, Francuska) su prikladne za primjenu u proizvodnji trajnih kobasica, budući da je njihov broj na kraju perioda skladištenja iznosio oko 8 log CFU/g. Kemijski sastav i pH vrijednosti su bile slične u kontrolnoj i kobasici s dodanim probioticima. Senzorna kvaliteta svih kobasica je bila prihvatljiva, ali bolja aroma, okus i tekstura su detektirane u kobasicama produciranim sa *Lb. helveticus* RO52. Također, u istraživanju Jofré i sur. (2015) ispitanici su tijekom 21 dana unosili 25 g fermentirane kobasice s probiotičkom kulturom *Lb. rhamnosus* CTC1679 u GI trakt. *L. rhamnosus* CTC1679 je tijekom perioda konzumacije kobasica pokazala dobru sposobnost kolonizicije GI trakta i preživljavanja te je CFU iznosio *cca*. 8 log CFU/g.

3. Materijali i metode

3.1. Priprema korištenih otopina

3.1.1. Fiziološka otopina (0,85 %)

Fiziološka otopina je pripremljena otapanjem 8,5 g NaCl u 1 L destilirane vode. Otopina je sterilizirana u autoklavu 15 minuta na 121 ºC.

3.1.2. Peptonska voda

Peptonska voda je pripremljena otapanjem 9 g peptona (Biolife, Italija) i 4.5 g NaCl u 900 mL destilirane vode. Otopina je sterilizirana u autoklavu 15 minuta na 121 ºC.

3.2. Priprema hranjivih podloga

3.2.1. BP čvrsta podloga (Baird Parker Agar)

BP selektivna podloga je pripremljena otapanjem 58 g podloge (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga je zagrijana do vrenja, autoklavirana 15 min na 121 ºC, ohlađena na 50 ºC te je dodana Egg Yolk Telurite emulzija (Biolife, Italija).

3.2.2. CCA čvrsta podloga (Chromogenic Coliform Agar)

CCA čvrsta selektivna podloga je pripremljena otapanjem 37,9 g podloge (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga je sterilizirana u autoklavu 15 minuta na 121 ºC.

3.2.3. DRBC čvrsta podloga (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar)

DRBC čvrsta selektivna podloga pripremljena je otapanjem 15,5 g podloge (Biolife, Italija) u 500 mL destilirane vode. Podlozi je dodano 50 mg Chloramphenicol Antimicrobic Supplement (Biolife, Italija), te je sterilizirana u autoklavu 15 minuta na 121 ºC.

3.2.4. KAA čvrsta podloga (Kanamycin Aesculin Azide Agar)

KAA čvrsta selektivna podloga je pripremljena otapanjem 47,5 g podloge (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga je autoklavirana 15 minuta na 121 ºC. pH reakcija podloge je 7.1±0.2.

3.2.5. LamVab čvrsta podloga

LamVab selektivna čvrsta podloga je pripremljena na način kako je opisano u Hartemink i sur. (1997). Medij je pripremljen miješanjem triju komponenata (A, B, C). Otopina A je pripremljena u volumenu od 1L i sadržavala je 110,4 g MRS tekućeg medija (Biolife, Italija), 0,5 g cistein-HCl i 0,05 g bromkrezol-zelenog. Nakon otapanja, namješten je pH=5,00±0,1 pomoću 4M HCl, te je autoklavirana na 121 ºC tijekom 15 min, nakon čega je ohlađena na sobnu temperaturu. Otopina B je pripremljena otapanjem 40 g agara u 1 L destilirane vode te je također autoklavirana na 121 ºC tijekom 15 min i ohlađena u vodenoj kupelji na 50 ºC. Otopina C je pripremljena otapanjem vankomicin hidroksiklorida u koncentraciji od 2 mg/mL u sterilnoj destiliranoj vodi te je filtrirana pomoću membranskog filtera veličine pora od 0,2 µm (Millipore). Na 1L otopine A aseptično je dodano 20 mL otopine C, nakon čega je dodana 1L otopine B, te je medij dobro promiješan i izliven u sterilne petrijevke. U ovako pripremljenom mediju, završna koncentracija vankomicina iznosi 20 mg/L.

3.2.6. MRS čvrsta podloga

MRS čvrsta hranjiva podloga je pripremljena suspendiranjem 55,2 g MRS podloge (Biolife, Italija) i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1000 mL hladne destilirane vode. Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 ºC kroz 15 minuta.

3.2.7. MRS tekuća hranjiva podloga

MRS tekuća hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 55,2 g MRS podloge (Biolife, Italija) u 1000 mL hladne destilirane vode. Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 ºC kroz 15 minuta.

3.2.8. Otopina obranog mlijeka (10 %)

Obrano mlijeko (10 %) pripremljeno je otapanjem 100 g obranog mlijeka u prahu (Biolife, Italija) u 1L destilirane vode te sterilizirano autoklaviranjem na 110 ºC kroz 15 minuta.

3.2.9. VRBG čvrsta podloga (Red Bile Glucose Agar)

VRBG čvrsta selektivna podloga je pripremljena otapanjem 41,5 g podloge (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga je zagrijana do vrenja uz miješanje, nije autoklavirana.

3.3. Priprema sojeva MRS_296 i C_7d_13 za inokulaciju

Kako bi se uzgojila dovoljna biomasa sojeva MRS_296 i C_7d_13, ovi su laktobacili uzgojeni na MRS krutim selektivnim podlogama. Sterilnom mikrobiološkom ezom je po jedna kolonija svakog soja precijepljena u zasebne staklene bočice koje su sadržavale po 100 mL sterilne MRS tekuće podloge, nakon čega su sojevi inkubirani tijekom 12 sati. Nakon inkubacije, bojanjem po gramu i mikroskopskim pregledom kultura naraslih u tekućoj podlozi potvrđene su morfološke karakteristike laktobacila uzgojenih u čistoj kulturi. Zatim su stanice odvojene od podloge centrifugiranjem (8000 x *g* tijekom 5 min), peleti su 2 puta isprani sterilnom fiziološkom otopinom i resuspendirani u 100 mL otopine obranog mlijeka (10 %). Ovako pripremljene suspenzije su čuvane i transportirane na 4 ºC do inokulacije u smjesu za pripremu kobasica. Prije same inokulacije, odvojen je po 1 mL pripremljenih suspenzija i napravljena je serija razrjeđenja, nakon čega je po 100 µL odgovarajućih razrjeđenja nacijepljeno na krute MRS podloge u 2 ponavljanja. Podloge su inkubirane na 30 ºC tijekom 72 h u anaerobnim uvjetima nakon čega su izbrojane narasle kolonije i određena je CFU vrijednost prema formuli CFU = broj kolonija / faktor razrjeđenja.

3.4. Uzorkovanje

Kobasice su proizvedene u istočnoj Hrvatskoj (okolica Požege) prateći tradicionalnu recepturu i postupke u 2017. godini. Smjesa za proizvodnju kobasica je sadržavala meso domaće svinje (*Sus scrofa domestica*) i divlje svinje (*Sus scrofa*) u omjeru 3:2. Smjesa je sadržavala 1,90 % soli, 0,51 % ljute paprike, 0,20 % slatke paprike, 0,31 % bijelog luka, 0,20 % šećera i 0,10 % papra. Začinjena mesna smjesa je zatim razdijeljena te su u jedan dio smjese inokulirani sojevi MRS_296 i C_7d_13, dok je drugi dio smjese korišten kao neinokulirana kontrola. Mesne smjese se punjene u prirodne ovitke, a kobasice su sazrile u zrionici uz povremeno dimljenje. Uzorkovanje je provedeno u triplikatima nakon 0, 7 i 40 dana od dana proizvodnje.

3.5. Mjerenje pH vrijednosti i aktiviteta vode (a_w)

Mjerenje pH vrijednosti izvršeno je pomoću prijenosnog pH-metra IQ 150 (IQ Scientific Instruments, SAD) opremljenog ubodnom elektrodom BlueLine 21pH (Schott AG, Njemačka) koja je umetnuta direktno u uzorak. Mjerenje vrijednosti aktiviteta vode izvršeno je pomoću digitalnog seta za mjerenje aktiviteta vode HP23 AW-A-set (Rotronic, SAD). Za svaki od uzoraka, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija triju nezavisnih mjerenja.

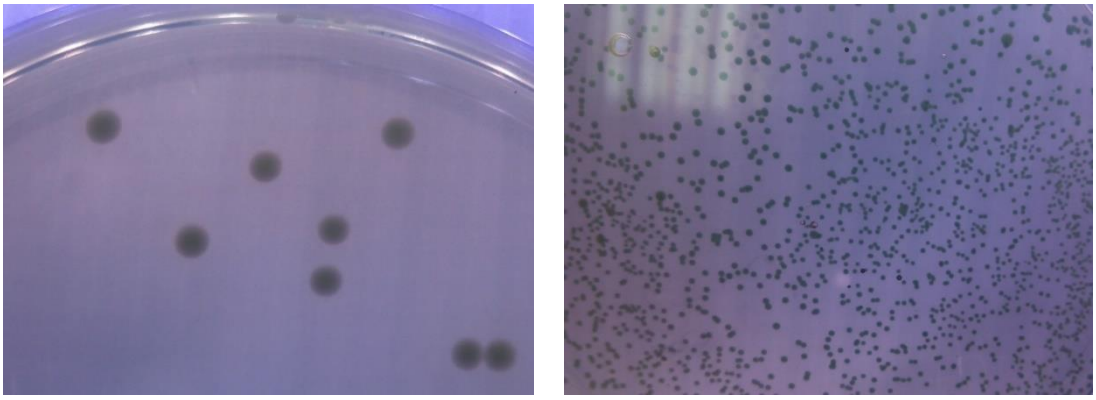
3.6. Homogenizacija uzoraka kobasica, prikupljanje laktobacila i mikrobiološka analiza

3.6.1. Homogenizacija uzoraka i priprema serije razrjeđenja

Po 25 g svakog uzorka je odvagano i prebačeno u sterilne Stomacher vrećice i dodano je 225 mL sterilne peptonske vode, nakon čega je provedena homogenizacija tijekom 90 sekundi u Seward stomacher 400 homogenizatoru. Ovako homogenizirani uzorci su korišteni za pripremu serije razrjeđenja u sterilnoj peptonskoj vodi u omjeru 1:10.

3.6.2. Izolacija i prikupljanje laktobacila

Laktobacili su izolirani i prikupljeni na LamVab selektivnoj podlozi. Na LamVab podloge je inokulirano po 100 µL odgovarajućeg razrjeđenja u dva ponavljanja, nakon čega su ploče inkubirane u anaerobnim uvjetima na 30 ºC tijekom 72 sata. Ukupan broj naraslih laktobacila je određen brojanjem pojedinačnih kolonija naraslih na razrjeđenjima na kojima se broj kolonija kretao između 30-300 (Slika 2). Za svaku od kobasica je prikupljeno po 5 izolata sa svakog ponavljanja (A, B, C), odnosno po 15 izolata u svakom vremenskom intervalu (0, 7 i 40 dana). Svi prikupljeni izolati su dalje na MRS krutoj podlozi pročišćeni do monokultura, što je potvrđeno bojanjem po Gramu i mikroskopiranjem. Izabrana je po 1 narasla monokultura sa svake ploče i sterilno precijepljena u 2 mL tekuće MRS podloge, te je ostavljena na inkubaciji na 37 ºC tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, odvojen je po 1 mL podloge s naraslim monokulturama kojima je dodano po 1 mL glicerola (20 %) te su tako pripremljeni izolati pohranjeni -40 ºC, a preostali 1 mL podloge s naraslim izolatima iskorišten je za izolaciju DNA.



Slika 2. Morfološki izgled *Lactobacillus* kolonija poraslih na LamVab selektivnoj podlozi

3.6.3. Mikrobiološka analiza

Za izolaciju i određivanje broja različitih mikroorganizama, odgovarajuća razrjeđenja homogeniziranih uzoraka pripremljena su u peptonskoj vodi i inokulirana u duplikatima na različitim selektivnim medijima. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* te kvasci i plijesni su detektirani na način da je po 100 µL odgovarajućih razrjeđenja prebačeno na selektivne medije u duplikatima i razmazano L-štapićem. Enterokoki su izolirani i prebrojani na KAA podlozi inkubiranoj na 37 ºC tijekom 48 h, a na BP podlozi izolirani su koagulaza pozitivni stafilokoki (*Staphylococcus aureus*) nakon inkubacije podloge na 37 ºC tijekom 48h. Kvasci i plijesni su izolirani na DRBC podlozi nakon inkubacije na 25 ºC tijekom 5 dana u aerobnim uvjetima.

VRBG podloga je korištena za izolaciju vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*, dok su na CCA podlozi izolirani *Escherichia coli* i koliformne bakterije, a obje podloge su inkubirane na 37 ºC tijekom 24 h. Podloge su pripremljene na način da je 1 mL odgovarajućeg razrjeđenja u dva ponavljanja dodan u praznu petrijevu zdjelicu, nakon čega je dodano oko 25 mL sterilne podloge ohlađene na 50 °C. Podloge su miješane kružnim okretanjem u obje strane kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile. Nakon polimerizacije inokuliranih VRBG podloga, dodan je još jedan sloj sterilne podloge ohlađene na 50 ºC.

3.7. Izolacija DNA iz čistih kultura laktobacila

DNA je iz prikupljenih čistih kultura laktobacila izolirana pomoću Wizard® Genomic DNA Purification Kita, prema uputama proizvođača (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Ukratko, čiste prekonoćne kulture koje su uzgojene u tekućoj MRS hranjivoj podlozi su centrifugirane 2 minute na 13 000 x *g* kako bi se izdvojio pelet. Stanice su resuspendirane u 480 µL 50 mM EDTA pufera te je dodano 120 µL lizozima nakon čega su inkubirane na 37 ºC tijekom 30 minuta i centrifugirane na 13 000 x *g* kako bi se uklonio supenatant. Ovaj korak omogućava hidrolizu β-1-4 glikozidnih veza u staničnoj stijenci bakterijskih stanica pa dolazi do lize stanica. Zatim je dodano 600 µL Nuclei Lysis Solution, nakon čega je uslijedila inkubacija na 80 ºC tijekom 5 min. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu dodano je 3 µL RNaze otopine, i ponovno je uslijedila inkubacija na 37 ºC tijekom 60 minuta. Kako bi se istaložili proteini dodano je 200 µL Protein Precipitation Solution, vorteksirano, inkubirano na ledu 5 min te nakon toga centrifugirano na 13 000 x *g* 3 minute. Supernatant je prebačen u novu čistu tubicu, dodano je 600 µL izopropanola, centrifugirano (16 000 x *g*, 1 min), dodano je 600 µL etanola te ponovno centrifugirano (16 000 x *g*, 1 min). Nakon uklanjanja etanola uslijedilo je sušenje istaložene DNA na zraku u otvorenim tubicama 10 do 15 minuta nakon čega je dodana otopina za rehidrataciju DNA. Dobivena DNA korištena je u daljnjim molekularno-biološkim analizama te je pohranjena na -20 ºC.

3.8. Praćenje preživljavanja dodanih startera rep – PCR metodom

Preživljavanje inokuliranih startera je praćeno rep-PCR metodom (eng. *repetitive element sequence-based*), na način da je amplificirana DNA svakog od izolata laktobacila prikupljenih sa LamVab medija. Pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL, a korišteni reagensi i njihovi volumeni i koncentracije su navedeni u Tablici 1. Reakcija je provedena u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied biosystems, SAD) pri uvjetima navedenima u Tablici 2. Korištena je početnica GTG5 (3' GTGGTGGTGGTGGTG 5').

Dobiveni rep-PCR produkti su razdvojeni na 2 % agaroznom gelu, a dobiveni obrasci analizirani pomoću BioNumerics 7.6.1. programa (Applied Maths, Belgium). Dice koeficijent je korišten za računanje genetske sličnosti izolata, a UPGMA (engl. *Unweight Paired Group Arithmetic Average*) metoda je korištena za klasteriranje. Izabrana je toleranca od 1,0 % i optimizacija od 0,5 % za kreiranje dendrograma.

Tablica 1. Reagensi korišteni za pripremanje reakcijske smjese za rep-PCR.

Reagens	**Početni volumen (µL)**	**Početna Koncentracija**	**Završna koncentracija**
Pufer	2,5	10x	1x
dNTP	1	10 mM	0,1 mM
GTG5 početnica	1	50 pmol	2 pmol
DyNAzyme polimeraza	1	2 U/µL	1 U
Voda	18,5		
DNA	1		

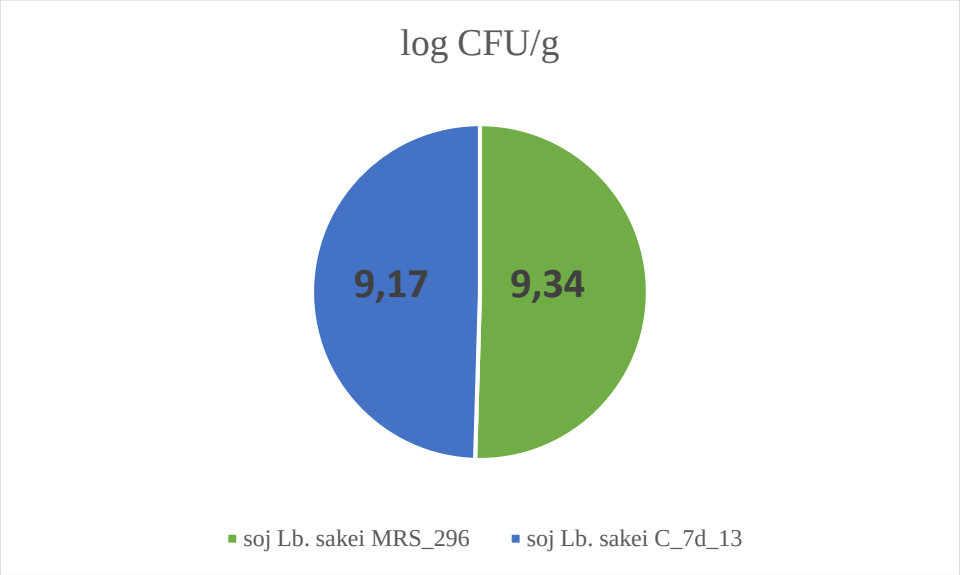
Tablica 2. Temperaturni profil rep-PCR reakcije.

Dijelovi PCR reakcije	**Temperatura (°C)**	**Trajanje (min)**
Početna denaturacija	95	7
30 ciklusa amplifikacije: • denaturacija • sparivanje klice s kalupom • sinteza komplementarnih lanaca DNA	 90 40 72	 0,5 1 8
Završno produljivanje lanaca	65	16

4. Rezultati i rasprava

4.1. Umnažanje biomase sojeva laktobacila MRS_296 i C_7d_13

U smjesu za proizvodnju kobasica dodana su dva *Lb. sakei* soja (MRS_296 i C_7d_13). Početni broj inokuliranih stanica je bio sličan za oba soja (Graf 1), odnosno, iznosio je 9,34 log CFU/g za soj MRS_296 i 9,17 log CFU/g za soj C_7d_13.

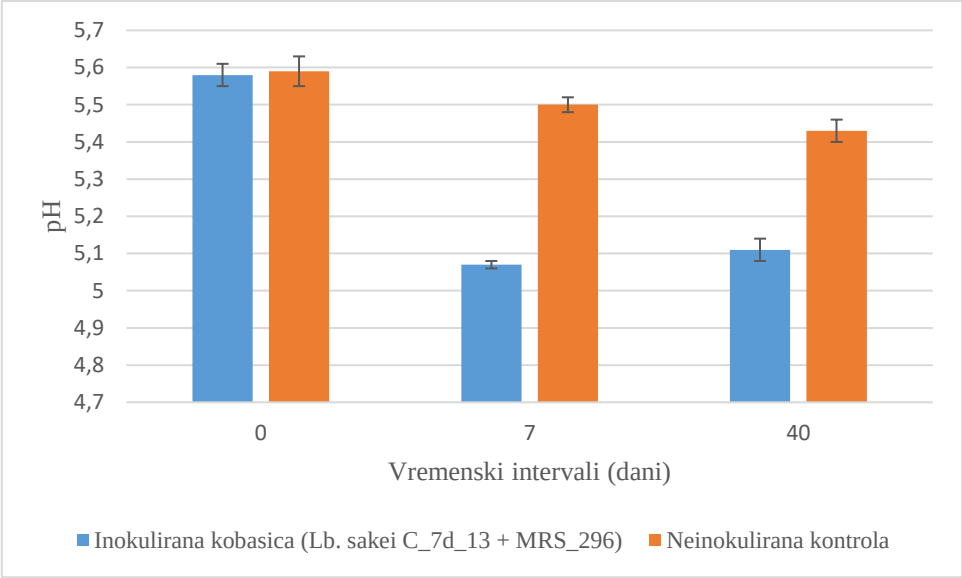


Graf 1. Početni broj inokuliranih stanica za sojeve *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13

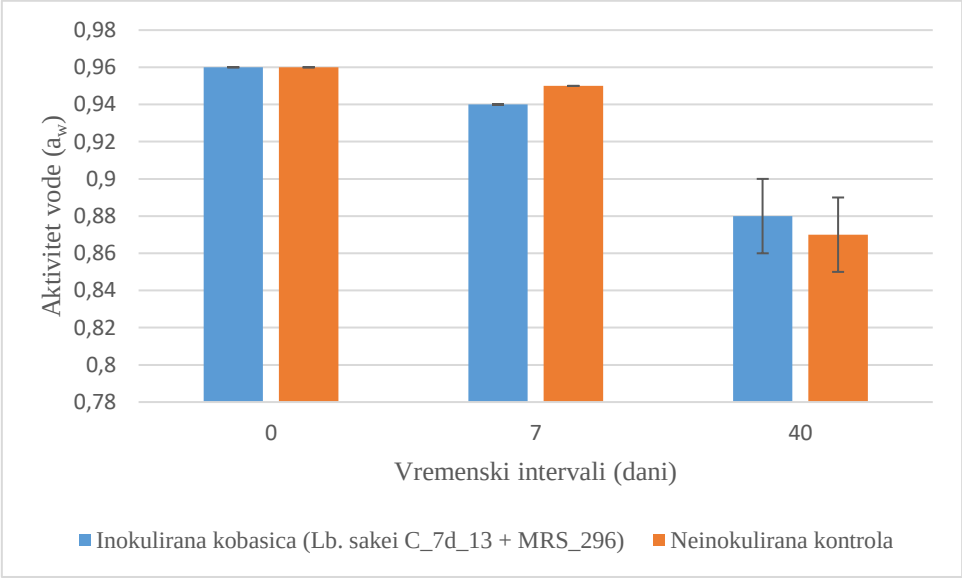
4.2. pH vrijednost i aktivitet vode (a_w)

Promjene pH vrijednosti tijekom različitih vremenskih intervala proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasica su prikazane na Grafu 2. Na početku proizvodnje (0 dana) nisu zabilježene signifikantne razlike u izmjerenom pH između inokulirane i kontrolne kobasice, dok je signifikantno niži pH zabilježen kod inokulirane kobasice nakon 7 dana (p<0,001) i 40 dana (p<0,001), u odnosu na kontrolnu kobasicu. Budući da je broj detektiranih laktobacila bio signifikantno veći (p<0,05) u inokuliranoj kobasici tijekom svih vremenskih intervala, u odnosu na kontrolu, najvjerojatnije je ovakav pad pH vrijednosti kod inokulirane kobasice rezultat produkcije mliječne kiseline uslijed metabolizma dodanih startera. Dodatno je u ovom istraživanju potvrđena korelacija između broja detektiranih laktobacila i pada pH kod inokulirane (r=-0,97, p<0,001) (Graf 4) i kontrolne kobasice (r= -0,81, p<0,05) (Graf 5), što potvrđuje vodeću ulogu laktobacila u procesu zakiseljavanja kobasica. U sličnom istraživanju, Wang i sur. (2013) su također zabilježili niži pH kod kobasica inokuliranih sa *Lb. sakei* u odnosu na neinokuliranu kontrolu.

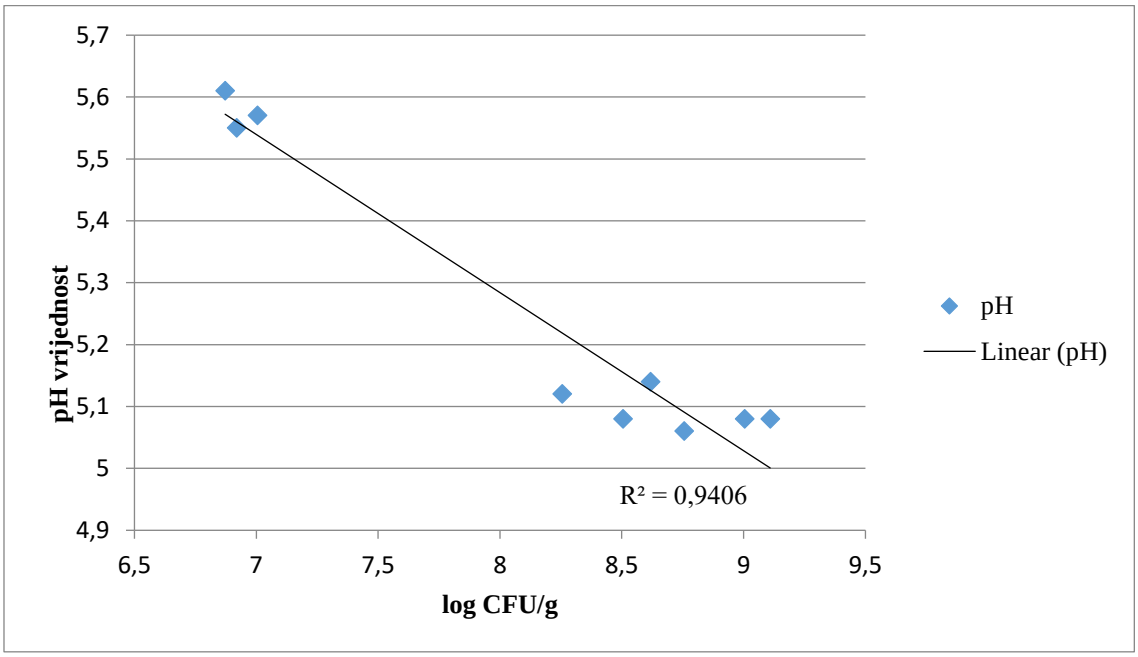
Industrijski proizvedene kobasice karakterizira upotreba starter kulture i brzi fermentacijski proces te kobasice dostižu pH vrijednosti niže od 5, koji utječe na boju i okus te gdje se mogu i pretjerano osjećati kiseline (Flores, 2011). Spontano fermentirane trajne kobasice (proizvedene bez dodatka starter kulture) karakterizirane su pH vrijednostima većima od 5 (najčešće između 5,2 i 5,8) te a_w vrijednostima između 0,85-0,91 te se smatraju kobasicama s niskim udjelom kiselina (Montel i sur., 1998; Talon i sur., 2007, Vignolo i sur., 2010). U ovom istraživanju je kod gotovih proizvoda detektiran pH=5,11 kod inokulirane kobasice, odnosno 5,43 kod kontrolne kobasice. Aktivitet vode (a_w) je na početku proizvodnje (0 dana) iznosio 0,96 za obje kobasice, a nakon 40 dana je izmjeren 0,88 kod inokulirane, odnosno 0,87 kod kontrolne kobasice (Graf 3). U niti jednom vremenskom intervalu aktivitet vode nije bio signifikantno različit između kobasica. Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da istraživane kobasice prema a_w i pH vrijednostima pripadaju tipičnim trajnim fermentiranim kobasicama. U skladu s našim rezultatima, Ciuciu Simion i sur. (2014) su zabilježili postepeno smanjenje a_w vrijednosti u inokuliranoj i neinokuliranoj kobasici tijekom proizvodnje, konačnu a_w vrijednost od 0,85 u svim šaržama te nije bilo signifikantne razlike u a_w između inokulirane i neinokulirane kobasice ni u jednoj šarži.



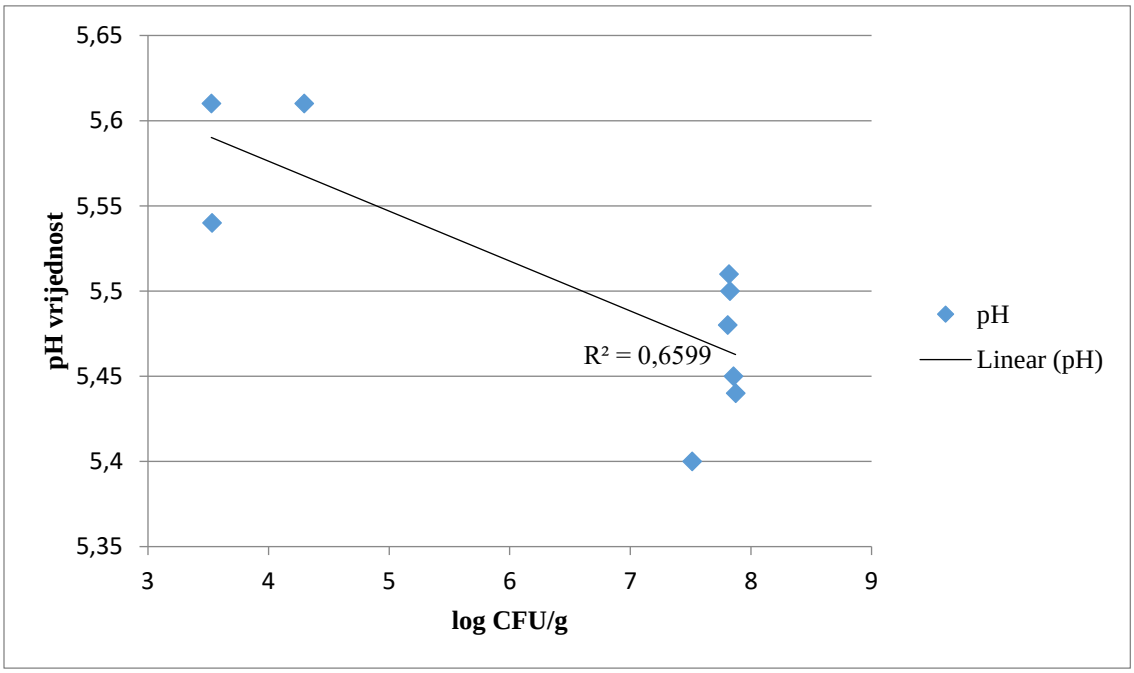
Graf 2. Izmjerene pH vrijednosti tijekom fermentacije i zrenja kobasica



Graf 3. Izmjerene vrijednosti aktiviteta vode (a_w) tijekom fermentacije i zrenja kobasica



Graf 4. Korelacija pH i CFU vrijednosti laktobacila u inokuliranoj kobasici

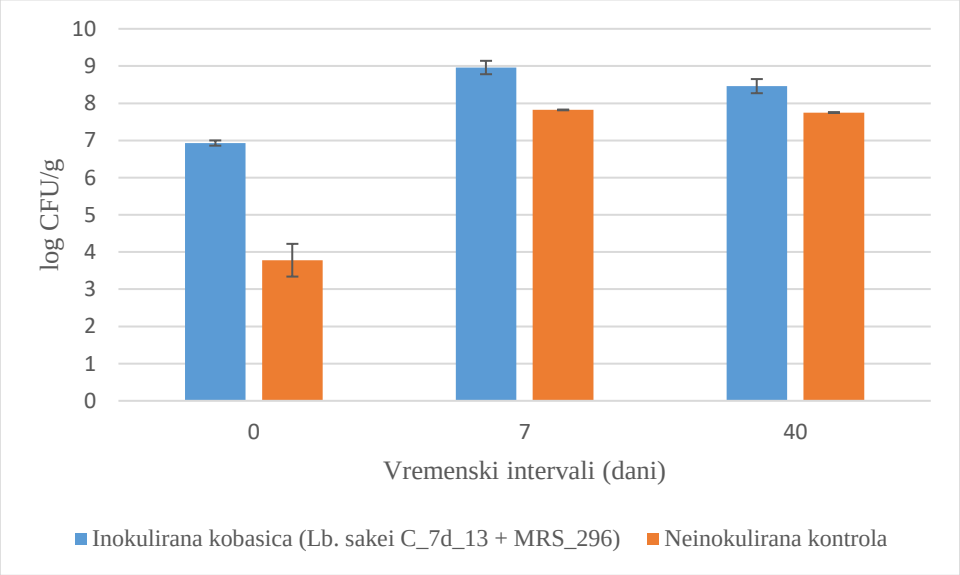


Graf 5. Korelacija pH i CFU vrijednosti laktobacila za kontrolnu kobasicu

4.3. Prikupljanje izolata laktobacila i određivanje CFU vrijednosti

S LamVab selektivnih podloga je prikupljeno 38 izolata iz kobasice inokulirane sa sojevima C_7d_13 i MRS_296 te 43 izolata iz neinokulirane kobasice (kontrole). Izolati su prikupljeni nakon 0, 7 i 40 dana. Iz svih prikupljenih izolata je ekstrahirana DNA, koja je korištena u rep-PCR reakcijama za njihovu genotipizaciju.

Na Grafu 6. je prikazan broj laktobacila detektiranih u različitim vremenskim intervalima. Generalno je kod obje kobasice broj laktobacila bio niži u početku (0. dan), nakon čega je rastao (7. dan) i stabilizirao se na kraju zrenja. Na samom početku proizvodnje kobasica (0. dan), broj laktobacila u kontrolnoj kobasici je bio 3,78 log CFU/g, dok je u inokuliranoj kobasici iznosio 6,93 log CFU/g. Kao i u istraživanju Ciuciu Simion i sur. (2014) početni broj BMK u inokuliranoj kobasici bio je za oko 3 log CFU/g veći nego u kontrolnoj kobasici. Kod gotovih proizvoda je u inokuliranoj kobasici broj laktobacila bio 8,46 log CFU/g dok je u neinokuliranoj bio 7,75 log CFU/g. Broj laktobacila detektiranih u inokuliranoj kobasici je tijekom svih vremenskih intervala bio signifikantno veći (p<0,05) u odnosu na neinokuliranu kontrolu.



Graf 6. Broj laktobacila detektiranih tijekom fermentacije i zrenja kobasica

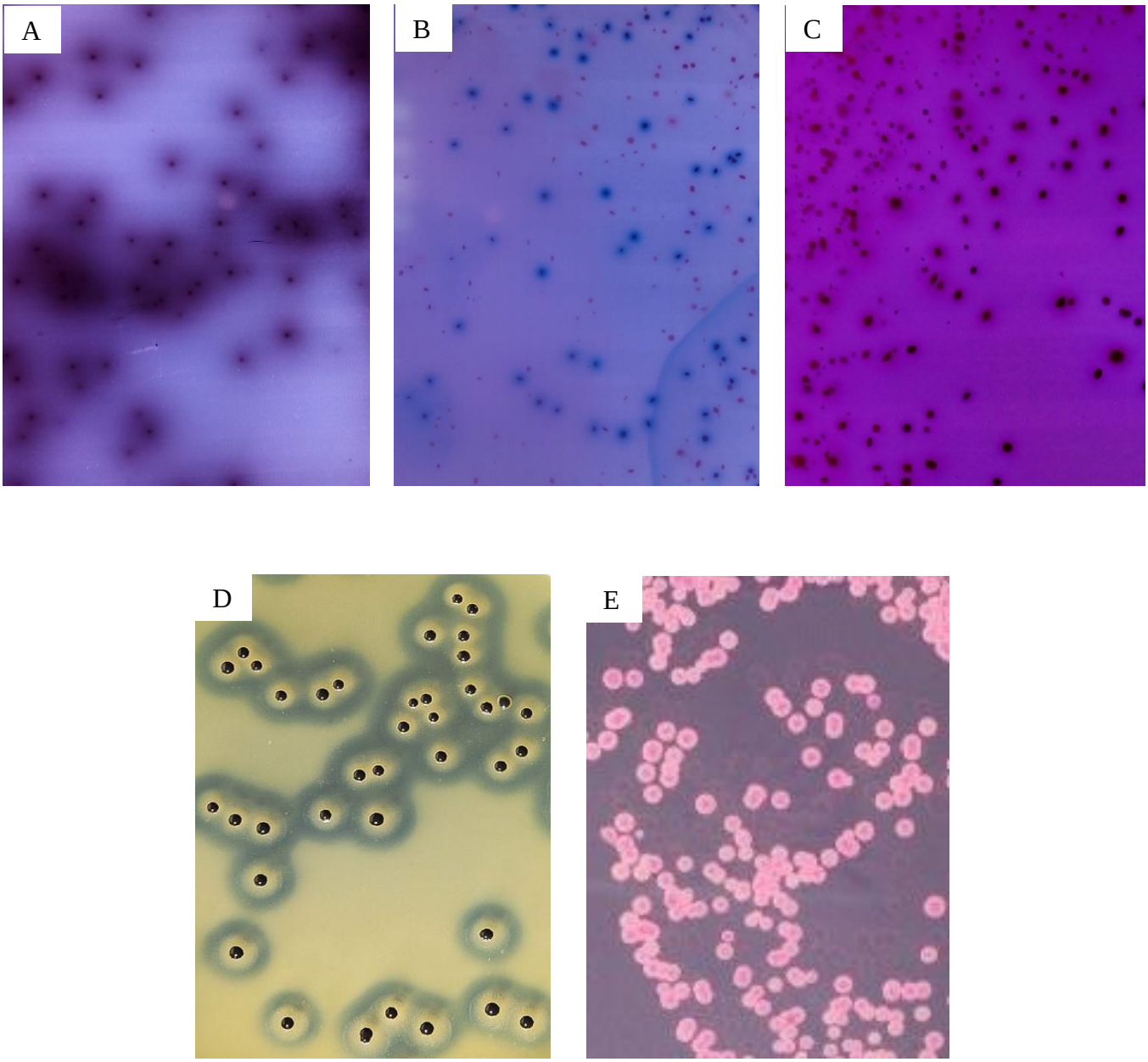
Kao i u našem istraživanju Wang i sur. (2013) su zabilježili da se broj BMK u inokuliranoj kobasici brzo povećao sa početnog broja od 5,32 log CFU/g na 8,79 log CFU/g 15. dan zrenja te smanjio na 6,73 log CFU/g 30. dan zrenja. Kao što su zabilježili Fonseca i sur. (2013) na kraju fermentacije prirodno se smanjuje broj BMK, a uslijed njihovog pada raste broj nekih drugih mikroorganizama (npr. kvasaca). Tako je u našem istraživanju nakon 40 dana zrenja vidljiv lagan pad u broju laktobacila u odnosu na 7. dan, dok je broj kvasaca porastao 40. dan zrenja na *cca* 5 log CFU/g.

4.4. Mikrobiološka analiza uzoraka kobasica

Kombinacijom različitih antimikrobnih faktora koji djeluju u fermentiranim kobasicama (npr. niski pH, antagonistička mikrobiota koja proizvodi mliječnu kiselinu, niska aktivnost vode) može se suzbiti rast, odnosno reducirati broj patogena. Tradicionalni proces proizvodnje fermentiranih kobasica vodi do značajne redukcije neželjenih mikroorganizama (Adams i Mitchell, 2002; Noghtingale i sur., 2006). Rezultati mikrobiološke analize provedene u ovom istraživanju su prikazani u Tablici 3. Na Slici 3. su prikazani korišteni mikrobiološki mediji s naraslim kolonijama tipičnim za određenu mikrobiološku skupinu.

Broj enterokoka na KAA podlozi je u 0. danu veći u inokuliranoj kobasici (4,33 log CFU/g) od kontrolne (4,17 log CFU/g), dok na kraju zrenja pada na 3,22 log CFU/g u inokuliranoj, odnosno 3,68 log CFU/g u kontrolnoj. Santos i sur. (2017) su istraživali enterokoke izolirane iz tradicionalno proizvedenih trajnih kobasica u Portugalu te se njihov broj kretao između 2 i 4 log CFU/g kod gotovih proizvoda, što je u skladu s našim rezultatima. Iako se prisustvo enterokoka u velikom broju uglavnom smatra nepoželjnim i može indicirati fekalnu kontaminaciju, istodobno, enterokoki zbog svoje proteolitičke i lipolitičke aktivnosti mogu pridonijeti poboljšanju karakteristika fermentiranih proizvoda (Hugas i sur., 2003).

Plijesni nisu detektirane ni na jednoj DRBC podlozi, već samo kvasci. Na samom početku proizvodnje je broj kvasaca u inokuliranoj kobasici i neinokuliranoj kontroli bio 3,12 log CFU/g, odnosno 4,22 log CFU/g. Njihov je broj pao nakon 7 dana, a na kraju zrenja se povećao u obje kobasice na nešto više od 5 log CFU/g. Sličan početni broj kvasaca u tradicionalno fermentiranim kobasicama imali su i Mendonça i sur. (2013) te je on iznosio 3,5 log CFU/g, ali za razliku od našeg istraživanja na kraju perioda zrenja broj kvasaca se smanjio na 2,5 log CFU/g. Kvasci se obično nalaze u visokom broju u trajnim proizvodima, osobito fermentiranim kobasicama. Njihov velik broj sugerira da mogu igrati važnu ulogu u procesu zrenja (Andrade i sur., 2010). Doprinos kvasaca okusu i aromi u različitim proizvodima povezan je sa sposobnošću nekih vrsta da fermentiraju različite šećere i kao rezultat proizvode etanol, acetaldehid, etilacetat i druge komponente (Durá i sur., 2004).



Slika 3. Karakteristični morfološki izgled pojedinih kolonija naraslih na selektivnim podlogama : sive kolonije enterokoka na KAA podlozi (A), tamno plave do ljubičaste kolonije *E.coli* i ljubičasto-ružičasto kolonije koliformnih bakterija na CCA podlozi (B)VRBG podloga sa specifičnim ružičastim do ljubičasto-crvenim kolonijama *Enterobacteriaceae* (C), *S.aureus* kolonije crne boje na BP podlozi (Izvor http://foodmicrobiologee.blogspot.hr (D), DRBC podloga sa ružičastim kolonijama kvasaca i plijesni (E)

Na VRBG podlozi izbrojane su enterobakterije, te je njihov broj u svim fazama (0., 7. i 40. dan) bio veći u neinokuliranoj kobasici. Njihov je broj padao tijekom fermentacije te na kraju zrenja je iznosio 2,06 log CFU/g u inokuliranoj i 2,68 log CFU/g u neinokuliranoj kobasici. Suprotno našim rezultatima, u istraživanju Palavecino Prpich i sur., (2016) inokulirane starter kulture (autohtoni soj *Lactobacillus sakei* ACU-2 i *Staphylococcus vitulinus* ACU-10) su brzo kolonizirale materijal za proizvodnju kobasica, smanjile pH vrijednost te je broj *Enterobacteriaceae* reduciran na razinu ispod 1 log CFU/g. Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (Ožujak, 2011) dopušteni broj *Enterobacteriaceae* je <1 log CFU/g, a vidljivo je da broj detektiranih bakterija u našim kobasicama prelazi dopuštenu granicu. U navedenom Vodiču, broj *S. aureus* u gotovom proizvodu mora biti <1 log CFU/g, a u ovom istraživanju je u svim fazama bio ispod razine detekcije u obje kobasice(<1,00 log CFU/g). Broj *E. coli* se smanjivao tijekom zrenja te je pao ispod granice detekcije (<1,00 log CFU/g) u obje kobasice na kraju zrenja.

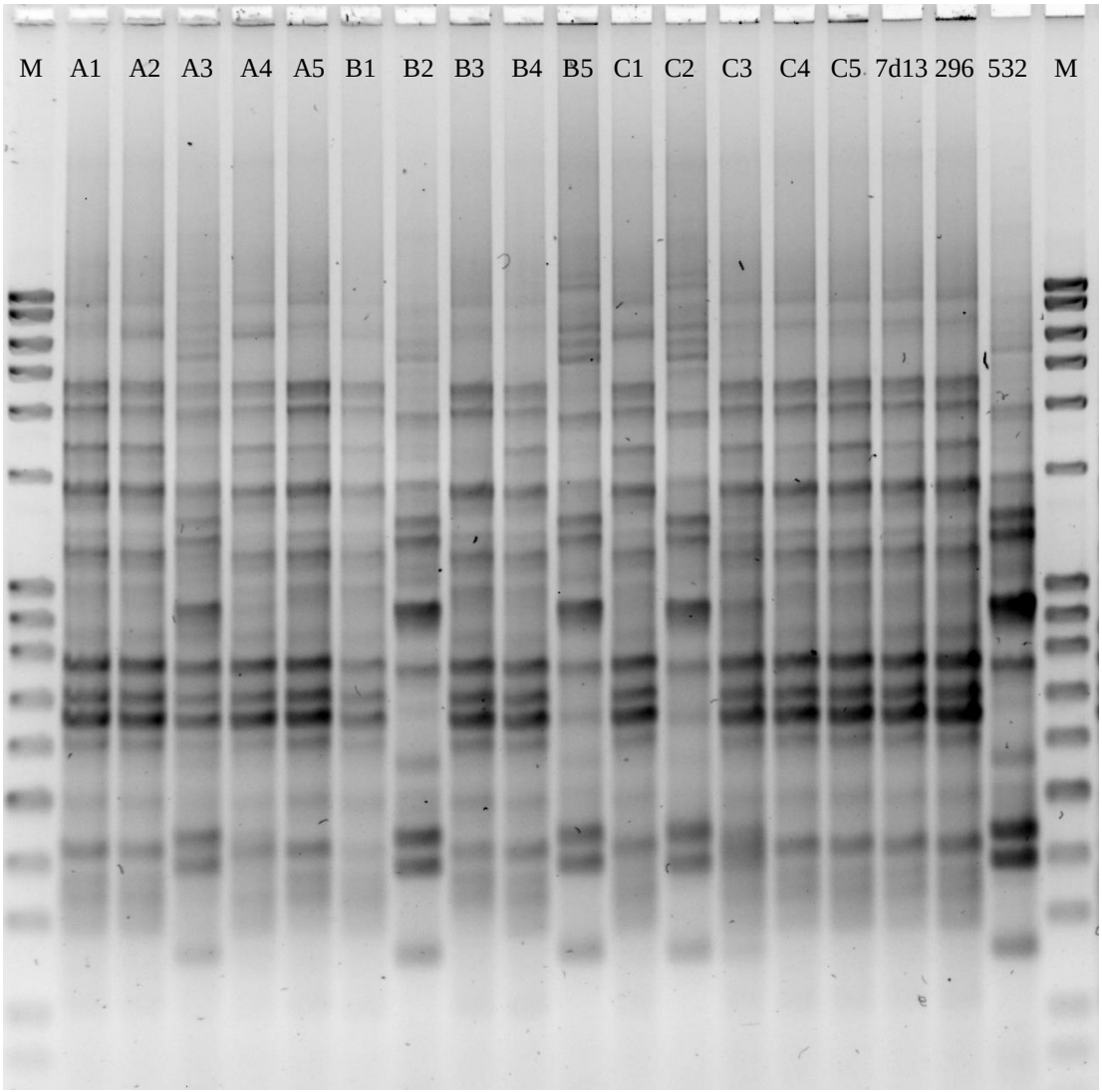
Broj koliformnih bakterija smanjio se tijekom zrenja sa 4,15 log CFU/g (0.dan) do ispod granice detekcije (<1,00 log CFU/g) (40. dan) u inokuliranoj kobasici dok se početni broj koliformnih bakterija smanjio sa 3,9 log CFU/g (0.dan) na 2,42 log CFU/g (40.dan) u neinokuliranoj kobasici. Prema kanadskom Vodiču za hranu spremnu za konzumaciju (Health Canada, 2013) dopušten je broj koliformnih bakterija < 2 log CFU/g. U inokuliranoj kobasici detektirani broj koliformnih bakterija na kraju zrenja je zadovoljavajući, najvjerojatnije kao rezultat proliferacije i aktivnosti inokuliranog startera, dok kod neinokulirane kontrole njihov broj prelazi dopuštene granice.

Tablica 3. Rezultati mikrobiološke analize provedene na LamVab, KAA,VRBG; CCA, DRBC i BP podlozi za inokliranu kobasicu i neinokliranu kontrolu tijekom različitih vremenskih intervala proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasica (0., 7. i 40. dan)

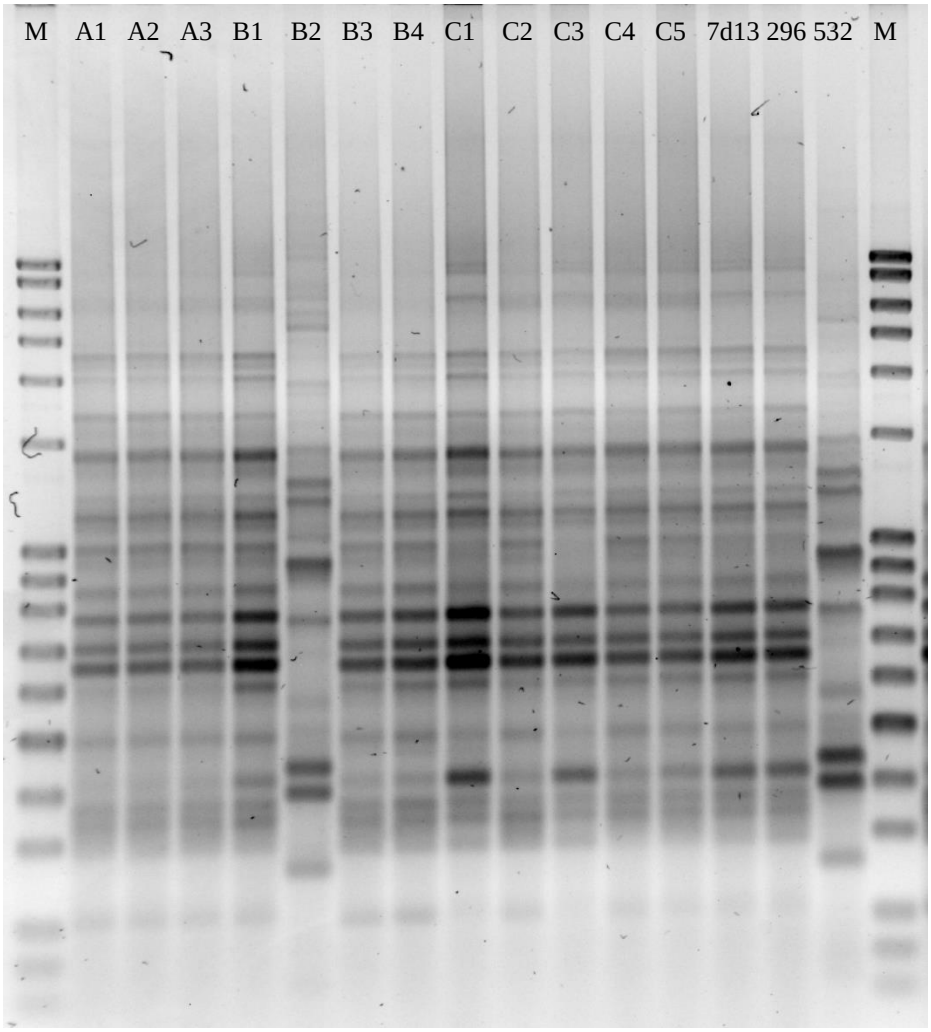
Vremenski intervali (dani)	**Tip kobasice**	**Broj određenih mikrobnih skupina (log CFU/g) detektiranih na različitih selektivnim podlogama**					
		KAA (ekterokoki)	**VRBG (*Enterobacteriaceae*)**	**CCA (*E.coli*)**	**CCA (koliformni)**	**DRBC (kvasci)**	**BP (*S.aureus*)**
0	Inokulirana	4,33 ± 0,08	3,95 ± 0,12	3,76 ± 0,08	4,15 ± 0,12	3,12 ± 0,04	< 1,00
	Neinokulirana	4,17 ± 0,07	4,77 ± 0,20	3,59 ± 0,21	3,9 ± 0,01	4,22 ± 0,09	< 1,00
7	Inokulirana	4,19 ± 0,07	3,39 ± 0,10	< 1,00	2,19 ± 0,02	< 1,00	< 1,00
	Neinokulirana	4,26 ± 0,05	3,97 ± 0,03	2,04 ± 0,06	2,91 ± 0,05	3,28 ± 0,03	< 1,00
40	Inokulirana	3,22 ± 0,02	2,06 ± 0,09	< 1,00	< 1,00	5,31 ± 0,05	< 1,00
	Neinokulirana	3,68 ± 0,03	2,68 ± 0,03	< 1,00	2,42 ± 0,02	5,25 ± 0,08	< 1,00

4.5. Praćenje preživljavanja inokuliranih starter sojeva rep-PCR metodom

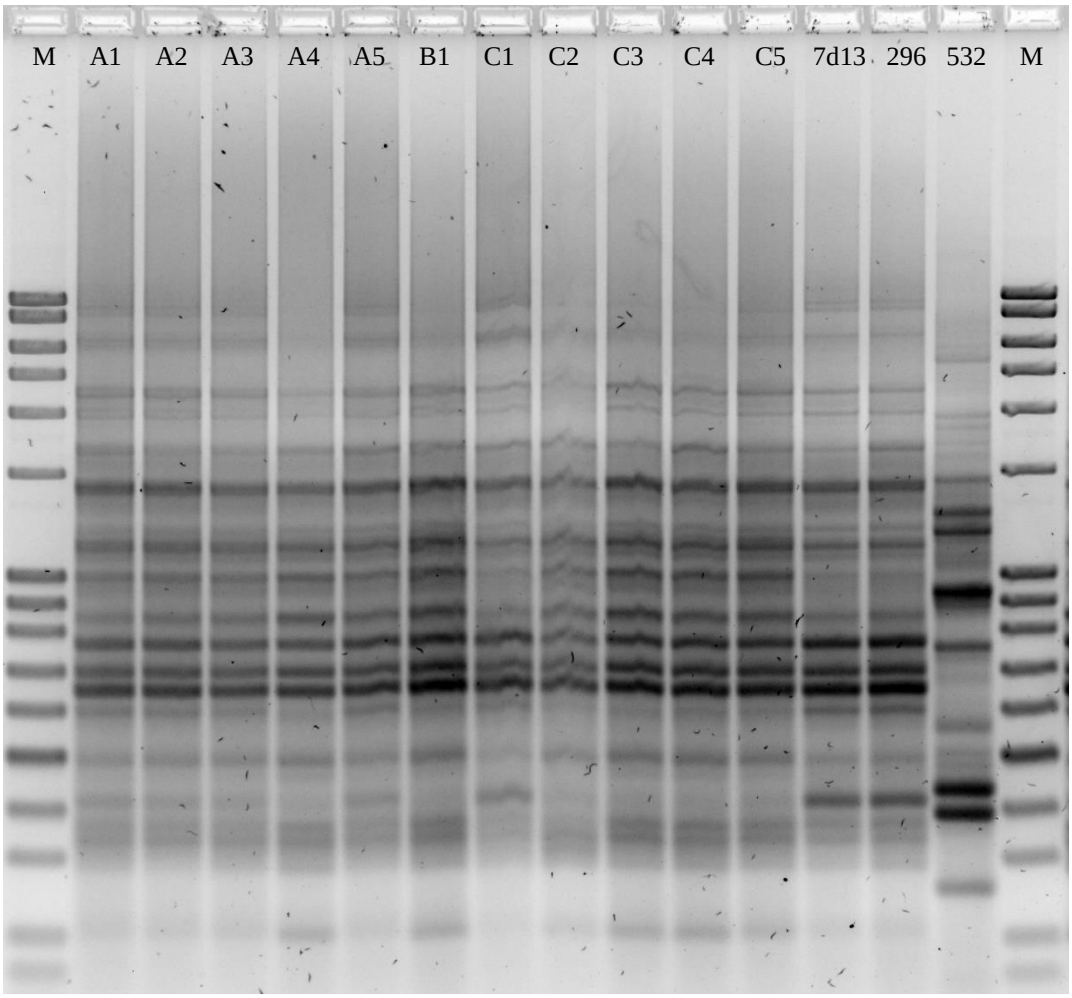
Pomoću GTG5 početnice rep-PCR metodom amplificirana je DNA izolata prikupljenih sa LamVab selektivne podloge tijekom različitih perioda zrenja (0,7 i 40 dana) iz kobasice koja je inokulirana sa 2 autohtona soja *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13 (*n*=38) i neinokulirane kontrolne kobasice (*n*=43). Rep-PCR obrasci izolata prikupljenih iz inokulirane kobasice su prikazani na Slikama 4., 5. i 6.



Slika 4. Rep-PCR produkti nakon 0 dana proizvodnje dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa 2 soja *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13. Oznake redaka: M=marker (1 kb, ext, Roth, Njemačka); A1-5=izolati prikupljeni sa ponavljanja A, B1-5=izolati prikupljeni sa ponavljanja B, C1-5= izolati prikupljeni sa ponavljanja C, 7d13=soj *Lb. sakei* C_7d_13, 296= soj *Lb. sakei* MRS 296, 532=soj *Lb. curvatus* MRS 532, M=marker (1 kb, ext, Roth, Njemačka)



Slika 5. Rep-PCR produkti nakon 7. dana proizvodnje dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa 2 soja *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13. Oznake redaka: M=marker (1 kb, ext, Roth, Njemačka); A1-3=izolati prikupljeni sa ponavljanja A, B1-4=izolati prikupljeni sa ponavljanja B, C1-5= izolati prikupljeni sa ponavljanja C, 7d_13=soj *Lb. sakei* C_7d_13, 296= soj *Lb. sakei* MRS 296, 532=soj *Lb. curvatus* MRS 532, M=marker (1 kb, ext, Roth, Njemačka)

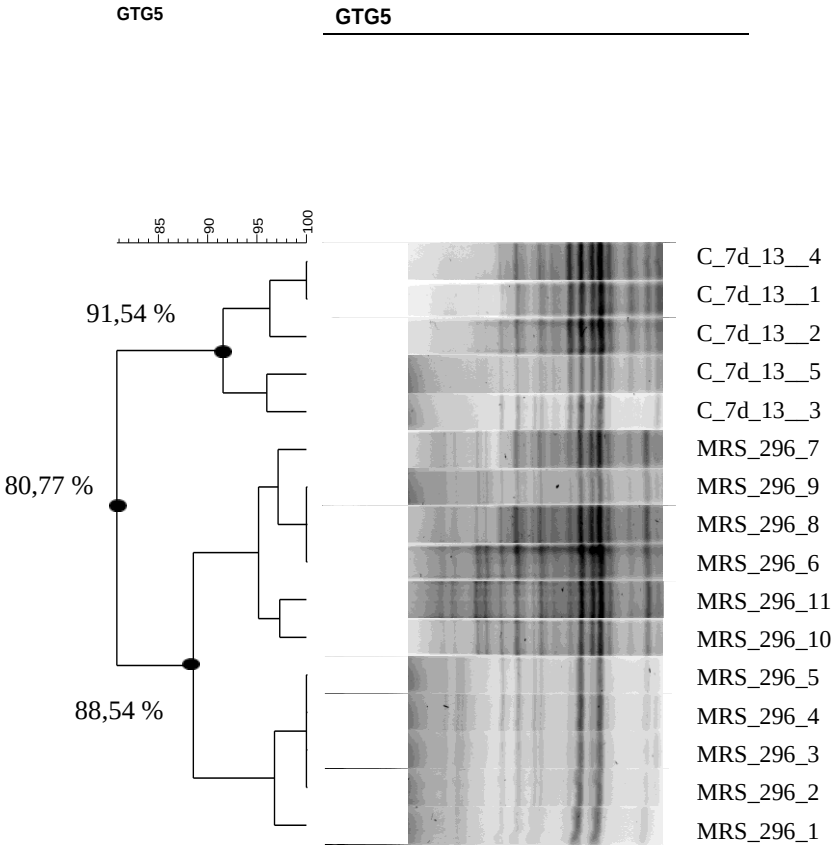


Slika 6. Rep-PCR produkti nakon 40. dana proizvodnje dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa 2 soja *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13. Oznake redaka: M=marker (1 kb, ext, Roth, Njemačka); A1-5=izolati prikupljeni sa ponavljanja A, B1=izolat prikupljen sa ponavljanja B, C1-5= izolati prikupljeni sa ponavljanja C, 7d_13=soj *Lb. sakei* C_7d_13, 296= soj *Lb. sakei* MRS 296, 532=soj *Lb. curvatus* MRS 532, M=marker (1 kb, ext, Roth, Njemačka)

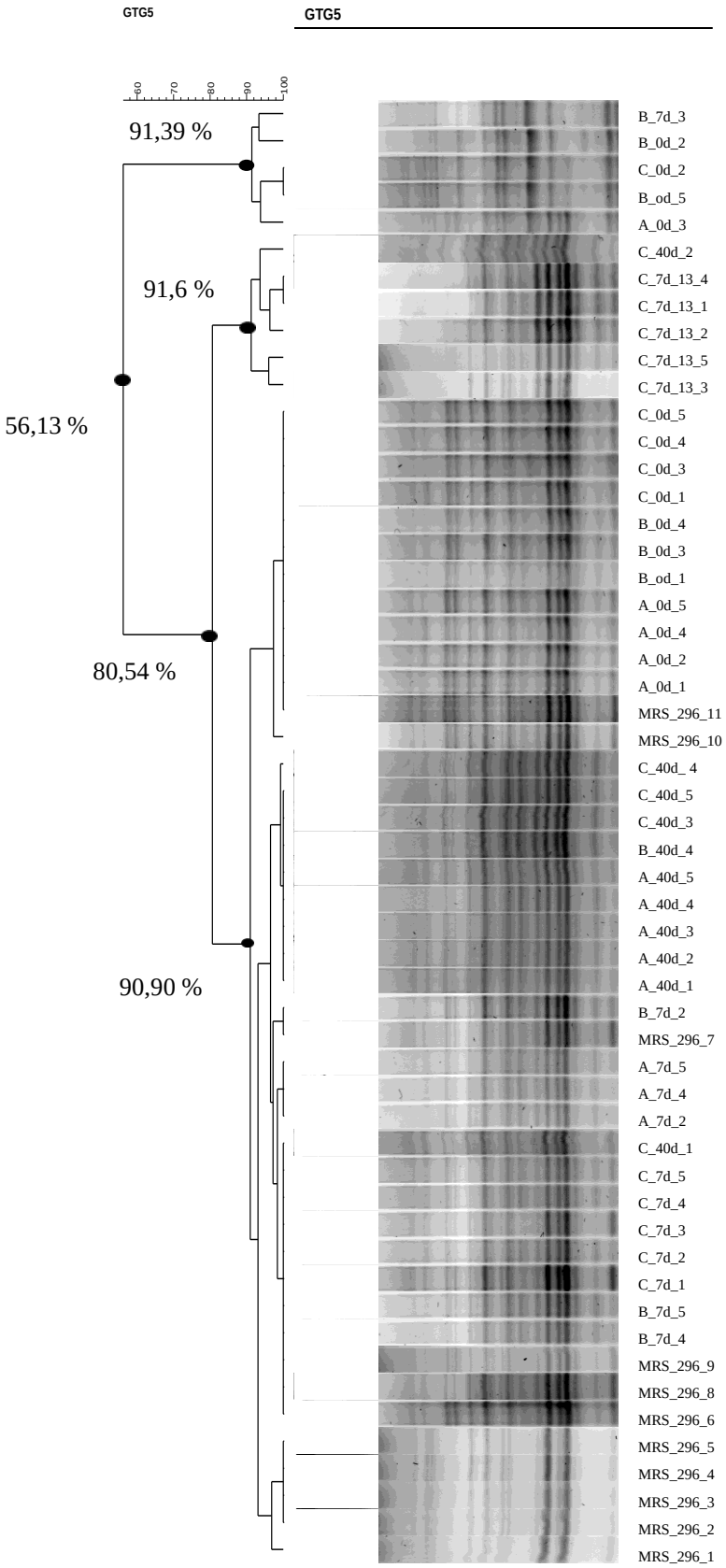
DNA soja *Lb. sakei* C_7d_13 je izolirana, amplificirana i razdvojena u horizontalnoj gel elektroforezi u 5 neovisnih ponavljanja, a soja MRS_296 u 11 ponavljanja. Temeljem dobivenih rep-PCR obrazaca svih ponavljanja, kreiran je dendrogram (Slika 7) na kojem se vidi odvajanje na dva velika klastera. U prvi klaster su grupirana sva ponavljanja soja C_7d_13, u drugi klaster sva ponavljanja soja MRS_296, a klasteri su međusobno slični 80,77 %. Sva prikupljena ponavljanja soja C_7d_13 su međusobno slična 91,54 %, a soja MRS_296 88,54 %, stoga su svi sojevi slični više od navedenih postotka tretirani kao isti sojevi.

Dendrogram sojeva prikupljenih iz inokulirane kobasice je prikazan na Slici 8. Vidljivo je grananje na 2 velika klastera na razini od 56,13 % sličnosti. Prvi klaster čini 5 sojeva (koji su slični 91,39 %), a u drugi klaster pripadaju svi ostali sojevi (80,54 % sličnosti). Sojevi iz prvog velikog klastera su slični dodanim starterima na razini od 56,13 %, odnosno, to su divlji sojevi (različiti od startera). Sojevi iz drugog velikog klastera (80,54 %) se dalje granaju na manji klaster sa 6 sojeva (čija je sličnost 91,60 %) i na veći klaster s ostalim sojevima (čija je sličnost 90,90 %). U manji klaster sa sličnošću 91,60 % su grupirani svi sojevi C_7d_13 (ponavljanja) i jedan soj izolirani iz inokulirane kobasice (S1_40d_C_2). Stoga je vidljivo da starter C_7d_13 ne preživljava procese proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasice, budući da je iz inokulirane kobasice izoliran sporadično. U veći klaster sa sličnošću od 90,90 % su grupirana sva ponavljanja soja MRS 296 , kao i svi preostali sojevi izolirani iz inokulirane kobasice. Budući da je prethodno utvrđeno kako se sojevi MRS 296 slični više od 88,54 % smatraju istim sojevima, svi sojevi iz ovog klastera sa sličnošću od 90,90 % su isti sojevi. Stoga se može zaključiti da je soj MRS 296 pokazao dobru kompetitivnosti sa prirodno prisutnom mikrobiotom i da dobro preživljava kao starter kultura jer smo ga izolirali iz svih faza proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasica (0, 7 i 40 dana).

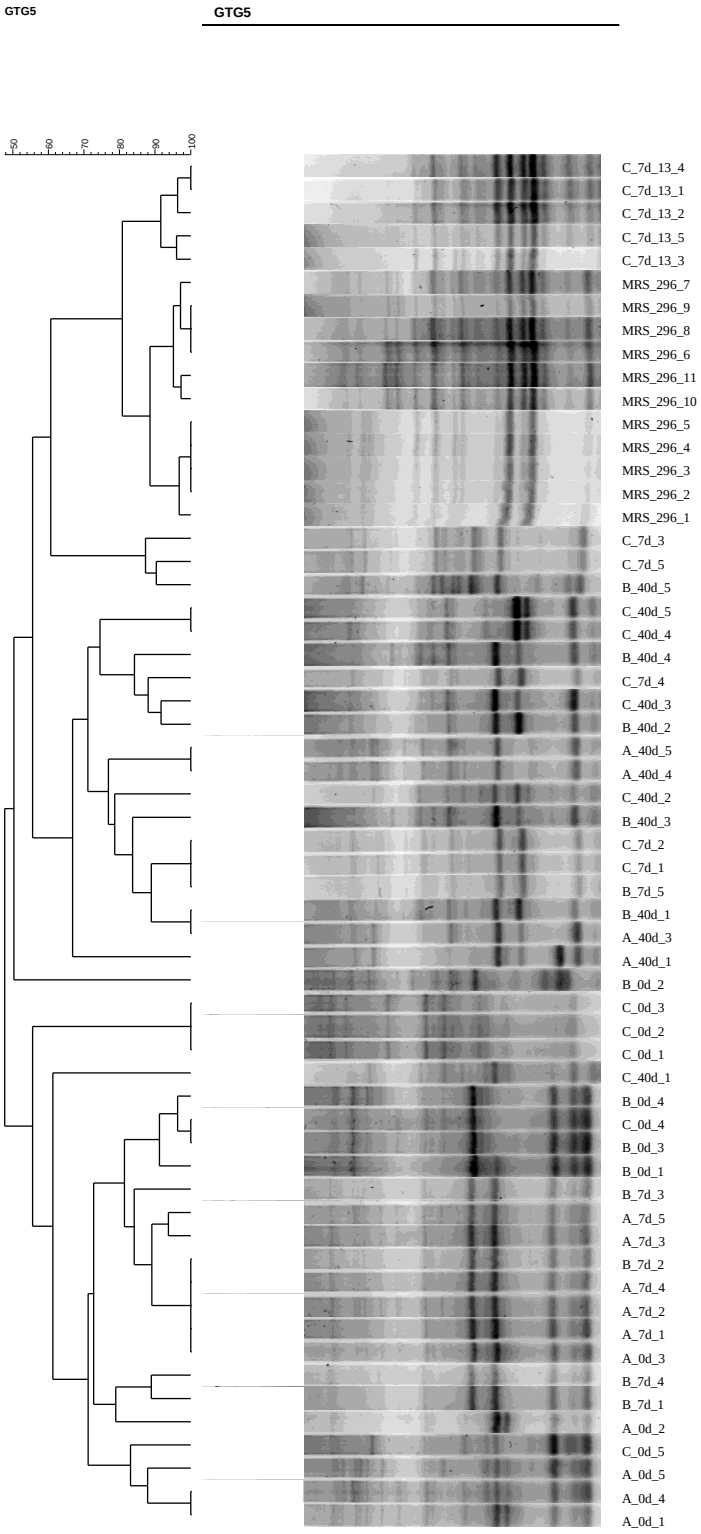
Na Slici 9. prikazan je dendrogram izolata prikupljenih iz neinokulirane kobasice. Sva ponavljanja soja *Lb. sakei* C_7d_13 su grupirana u jedan klaster (91,54 %), sva ponavljanja soja MRS 296 su grupirana u drugi klaster (88,54 %), a međusobno su slični 80,77 %. Sa sljedećim najsličnijim klasterom (izolatima prikupljenima iz neinokulirane kobasice) su slični tek 60,65 %. Odnosno, iz neinokulirane kontrolne kobasice su prikupljeni sojevi različiti od inokuliranih startera. Dok u inokuliranoj kobasici dominira MRS_296, u neinokuliranoj kontrolnoj kobasici postoji veća raznolikost prisutnih sojeva (više manjih klastera).



Slika 7. Dendrogram kreiran temeljem rep-PCR obrazaca sojeva C_7d_13 i sojeva MRS_296. Replike soja C_7d_13 su međusobno slične 91.54 %, dok su replike soja MRS_296 slične 88,54 %.



Slika 8. Dendogram kreiran temeljem GTG5 obrazaca amplificirane DNA izolata prikupljenih iz inokulirane kobasice, sa LamVab medija. Izolati su prikupljeni tijekom fermentacije i zrenja kobasica (0, 7 i 40 dan).



Slika 9. Dendogram kreiran temeljem GTG5 obrazaca amplificirane DNA izolata prikupljenih iz neinokulirane kobasice, sa LamVab medija. Izolati su prikupljeni tijekom fermentacije i zrenja kobasica (0, 7 i 40 dan).

5. Zaključci

- Soj *Lb. sakei* MRS 296 je pokazao dobro preživljavanje u inokuliranim kobasicama tijekom čitavog perioda fermentacije i zrenja (0.,7. i 40. dan) za razliku od soja *Lb. sakei* C_7d_13
- U inokuliranoj kobasici je zabilježen signifikantan pad ($p< 0,001$) pH vrijednosti u 7. i 40. danu u odnosu na kontrolnu neinokuliranu kobasicu
- Utvrđena je korelacija između broja detektiranih laktobacila i pada pH kod inokulirane (r=-0,97, p<0,001) i kontrolne kobasice (r= -0,81, p<0,05)
- Nema signifikantne razlike u padu a_w vrijednosti između inokulirane i neinokulirane kobasice
- U inokuliranoj i neinokuliranoj kobasici broj *E.coli* i *S. aureus* je pao ispod razine detekcije
- U kobasici s inokuliranim starterima je broj detektiranih koliformnih bakterija na kraju proizvodnje bio unutar propisanih granica, dok je kod neinokulirane kontrole njihov broj prelazio dopuštene granice.
- Broj detektiranih enterobakterija u inokuliranoj i neinokuliranoj kobasici prelazi dopuštenu granicu.

Literatura

1. Acton C., R. L., Dick, E. L., Norris (1997). Utilization of various carbohydrates in fermented sausages, J. Food Sci. 42, 174–178
2. Adams, M., i R., Mitchell (2002). Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. Int. J. Food Microbiol., 79, 75e83.
3. Ammor S., E., Dufour, M., Zagorec, S., Chaillou, I., Chevallier (2005). Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures, Food Microbiol., 22, 529–538
4. Ammor, M. S. i B., Mayo (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Sci., 76, 138–146
5. Andrade, M. J., J. J., Córdoba, E. M., Casado, M. G., Córdoba, M., Rodríguez (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage ‘‘salchichón”. Meat Sci., 85, 256e264
6. Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. Meat Sci., 74, 219–229.
7. Avagnina, A., D., Nucera, M. A., Grassi, E., Ferroglio, A., Dalmasso, T., Vicera (2012). The microbiological conditions of carcasses from large animals in Italy. Meat Sci., 91, 266–271.
8. Aymerich, T., B., Martin, M., Garriga, M., Hugas (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. Appl. Environ. Microbiol., 69, 4583– 4594.
9. Campbell-Platt, G. i P. E., Cook (1995). Fermented Meats. Blackie Academic and Professional, London.
10. Chaillou S., M. C., Champomier-Verges, M., Cornet, A. M., Crutz-Le Coq, A. M., Dudez, V., Martin, S., Beaufils, E., Darbon-Rongere, R., Bossy, V., Loux, M., Zagorec (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K, Nat. Biotechnol. 23, 1527–1533.
11. Champomier-Verges M. C., S., Chaillou, M., Cornet, M., Zagorec (2002) Erratum to ‘‘*Lactobacillus sakei*: decent developments and future prospects,’’ Res. Microbiol. 153,115–123 (Research in Microbiology 152 (2001)839

12. Ciuciu Simion A.M., C., Vizireanu, P., Alexe, I., Franco, J., Carballo (2014) Effect of the use of selected starter cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety, Food Control 35,123e131
13. Dainty, R. i H., Blom (1995). Flavour chemistry of fermented sausages. In: Campbell Platt, G., Cook, P.E. (Eds.), Fermented Meats. Blackie Academic and Professional, London, pp. 176e193.
14. Daszkiewicz, T., D., Kubiak, R., Winarski, M., Koba-Kowalczyk (2012). The effect of gender on the quality of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) meat. Small Ruminant Research, 103, 169–175
15. Djordjevic J., B., Pecanac, M., Todorovic, M., Dukmanovic, N., Glamoclija, V., Tadic, M. Z., Baltic (2015) Fermented sausage casings. Food Sci. 5, 69 – 72
16. Durá, M. A., M., Flores, F., Toldrá (2004). Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. Food Chem., 86, 391e399
17. Elnar, A. A., F., Desor, F., Marin, R., Soulimani (2015). Lactational exposure to low levels of the six indicator non-dioxin-like polychlorinated biphenyls induces DNA damage and repression of neuronal activity, in juvenile male mice. Toxicology, 328, 57–65.
18. Flores, M. (2011). Flavor of meat products (chap. 9). In: Nollet, M.L.L., Toldrá, F. (Eds.), Sensory Analysis of Foods of Animal Origin. CRC Press, USA, pp. 131–145
19. Flores, M. i A., Olivares (2015). Flavor (chap. 25). In: Toldrá, F. (Ed.), Handbook of Fermented Meat and Poultry, 2nd ed. John Wiley and Sons, Ltd, pp. 217–225.
20. Flores, M. i F., Toldrá (2011). Microbial enzymes for improved fermented meats. Trends Food Sci. Technol. 22, 81–90
21. Foegeding, P. M., A. B., Thomas, D. H., Pilkington, T. R., Klaenhammer (1992). Enhanced control of Listeria monocytogenes by in situ produced pediocin during dry fermented sausage production. Appl. Environ. Microbiol., 58, 884e890
22. Fonseca S, A., Cachaldora, M., Gómez, I., Franco, J., Carballo (2013) Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage, Food Microbiol. 33, 77e84
23. Frece, J., D., Kovačević, S., Kazazić, J., Mrvčić, N., Vahčić, D., Ježek, M., Hruškar, I., Babić, K., Markov (2014). Comparison of Sensory Properties, Shelf-Life and Microbiological Safety of Industrial Sausages Produced with Autochthonous and Commercial Starter Cultures. Food Technol. Biotechnol., 52, 307 – 316.

24. Gill, A. O. i R. A., Holley (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24C. Int. J. Food Microbiol., 80(3), 251e259
25. Gill, C. O. (2007). Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. Meat Sci., 77, 149–160
26. Hammes W.P. i R. F., Vogel (1995) The genus *Lactobacillu*s. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol. 2. (WoodBJB & HolzapfelWH, eds), pp. 19–54. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
27. Hammes, W. P. i C., Hertel (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, Prokaryotes, 4:320-403
28. Hammes, W.P., A., Bantleon, S., Min (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiol. Rev. 87, 165^174.
29. Hartemink R., V. R., Domenech, F. M., Rombouts (1997) LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces, J. Microbiol. Meth. 29, 77–84
30. Health Canada (2013). Microbial Guidelines for Ready-to-Eat Foods - A Guide for the Conveyance Industry and Environmental Health Officers (EHO)
31. Heinz G. i P., Hautzinger (2007) Meat processing technology for small to medium scale producers. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional office for Asia and Pacific, RAP Publication - 2007/20, Bangkok
32. Hofbauer, P. i F. J. M., Smulders (2011). The muscle biological background of meat quality including that of game species. In P. Paulsen, A. Bauer, M. Vodnansky, R. Winkelmayer, & F. J. M. Smulders (Eds.), Game meat hygiene in focus: Microbiology, epidemiology, risk analysis and quality assurance (pp. 273–295). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
33. Hoffman, L. C., B., Kritzinger, A. V., Ferreira (2005). The effects of region and gender on the fatty acid, amino acid, mineral, myoglobin and collagen contents of impala (*Aepyceros melampus*) meat. Meat Sci., 69, 551–558
34. Holck A., L., Axelsson, S.E., Birkeland, T., Aukrust, H., Blom (1992) Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin produced from *Lactobacillus sakei* Lb706. J. Gen. Microbiol.138:2715–2720
35. Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Sci., 78(2), 68e76
36. Hugas, M. i J. M., Monfort (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chem., 59, 547–554

37. Hugas, M., M., Garriga, M. T., Aymerich (2003). Functionality of enterococci in meat products. Int. J. Food Microbiol., 88, 223e233.
38. Hugas, M., M., Garriga, T., Aymerich, J. M., Monfort (1993). Biochemical characterization of lactobacilli isolated from dry sausages. Int. J. Food Microbiol., 18, 107–113
39. Jofré A, T., Aymerich, M., Garriga (2015) Probiotic fermented sausages: Myth or reality?, Procedia Food Sci., 5,133 – 136
40. Kalchayanand, N., M.B., Hanlin, B., Ray (1992). Sublethal injury makes gram- negative and resistant gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. Lett. Appl. Microbiol. 15:239-243.
41. Kasprzyk, A., A., Stasiak, M., Babicz (2010). Meat quality and ultrastructure of muscle tissue from fatteners of Wild Boar, Pulawska and its crossbreed Pulawska×(Hamshire×Wild Boar). Archiv Tierzucht, 53, 184–193.
42. Klingberg, T. D. i B. B., Budde (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freezedried cultures or as probiotic sausage. Int. J. Food Microbiol., 109, 157–159
43. Kritzinger, B., L. C., Hoffman, A. V., Ferreira (2003). A comparison between the effects of two cropping methods on the meat quality of impala (*Aepyceros melampus*). South African J. Animal Sci., 33, 233–241.
44. Le Marrec, C., B., Hydronimus, P., Bressollier, B., Verneuil, M. C., Urdaci (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5213-5220
45. Leistner L. (2000), Basic aspects of food preservation by hurdle technology, Int. J. Food Microbiol., 55,181–186
46. Leroy, F., J., Verluyten, L., De Vuyst (2006): Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Int. J. Food Microbiol. 106, 270 – 285.
47. Lizaso, G., J., Chasco, J., Beriain (1999). Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichon, a Spanish dry cured sausages. Food Microbiol., 6, 219–228.
48. Lücke, F.-K. (1998). Fermented sausages. In: Wood, B.J.B. (Ed.), Microbiology of Fermented Foods. Blackie Academic and Professional, London, pp. 441 – 483
49. Lušnic Polak M., E., Zlatic, L., Demšar, B., Žlender, T. Polak (2016) Degradation of PCBs in dry fermented sausages during drying/ripening, Food Chem. 213, 246–250

50. Majumdar, D. (2003). The Blue Baby Syndrome: nitrite poisoning in humans. Resonance, 10, 20e30
51. Mendonça R.C.S., D. M., Gouvêa , H. M. Hungaro, A., de F. Sodré , A., Querol-Simon (2013) Dynamics of the yeast flora in artisanal country style and industrial dry cured sausage (yeast in fermented sausage), Food Control., 29,143e148
52. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011). Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmjenjeno izdanje, ožujak 2011)
53. Montel, M. C., F., Masson, R., Talon (1998). Bacterial role in flavour development. Meat Sci. 49, 111e123
54. Mørtvedt-Abildgaard, C.I., J., Nissen-Meyer, B., Jelle, B., Grenov, M., Skaugen, I. F., Nes (1995). Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol., 61:175-179.
55. Nielson, J. W., J. S., Dickson, J. D., Crouse (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl. Environ. Microbiol., 56, 2142e2145
56. Nightingale, K. K., H., Thippareddi, R. K., Phebus, J. L., Marsden, A. L., Nutsch (2006). Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect., 69, 794e800.
57. Ordóñez, J.A., E. M., Hierro, J. M., Bruna, L., de la Hoz (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 39, 329e367.
58. Palavecino Prpich, N.Z., O.A., Garro, M., Romero, M.A., Judis, M. E. Cayré, M. P. Castro (2016). Evaluation of an autochthonous starter culture on the production of traditional dry fermented sausage from Chaco (Argentina) at a small-scale facility Meat Sci., 115, 41–44.
59. Papamanoli, E., N., Tzanetakis, E., Litopoulou-Tzanetaki, P., Kotzekidou (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dryfermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Sci., 65, 859 – 867
60. Pavičić Ž. i M., Ostović (2008) Producing home - made sausages for one's own needs Meso, Vol. X rujan - listopad br. 5
61. Pot, B., W., Ludwig, K., Kersters, K. H., Schleifer (1994) Taxonomy of lactic acid bacteria. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Genetics and Applications (De VuystL & VandammeEJ, eds), pp. 13–89. Chapman & Hall, Glasgow, UK.

62. Radulović Z., D., Živković, N., Mirković, M., Petušić, S., Stajić, M., Perunović D., Paunović (2011) Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages, Procedia Food Sci., 1, 1516 – 1522
63. Ravyts, F., L., De Vuyst, F., Leroy (2012). Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. Engineering in Life Sciences, 12, 356–367
64. Rebecchi, A., S., Crivori, P. G., Sarra, P. S., Cocconcelli (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. J. Appl. Microbiol., 84, 1043–1049
65. Santos S.C., M. J., Fraqueza, M., Elias, A. S., Barreto, T. (2017). Semedo-Lemsaddek, Traditional dry smoked fermented meat sausages: Characterization of autochthonous enterococci, LWT - Food Sci. Technol., 79, 410e415
66. Talon, R., S., Leroy, I., Lebert (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. Meat Sci. 77, 55–62.
67. Troy, D. J. i J. P., Kerry (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. Meat Sci., 86, 214–226.
68. Vignolo, G., C., Fontana, S., Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In F. Toldrá (Ed.), Handbook of Meat Processing (pp. 379-398). Oxford: Wiley-Blackwell
69. Vignolo, G., G., Palacios, M. E., Farías, F., Sesma, U., Schillinger, W., Holzapfel (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various Listeria species in broth and meat system. Current Microbiol., 41, 410e416
70. Villani, F., A., Casaburi, C., Pennacchia, L., Filos, F., Russo, D., Ercolini (2007). The microbial ecology of the Soppressata of Vallo di Diano, a traditional dry fermented from Southern Italy, and in vitro and in situ selection of autochthonous starter cultures. Appl. Environ. Microbiol., 73, 5453–5463.
71. Wang X. H., H.Y., Ren, D. Y. Liu, W. Y., Zhu, W. Wang (2013) Effects of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages, Food Control 32, 591e596, Health Canada, 2013
72. Yang, X. M., Q. M., Liu, L. F., Xi, A. Z., Tang (2004). Study on the control of nitrite content in the pickled of potherb mustard. Journal of Chinese Institute of Food Sci.Technol., 4(1), 48e51.
73. Żochowska-Kujawska, J., K., Lachowicz, M., Sobczak, L., Gajowiecki, M., Kotowicz, A., Żych, D., Mędrala (2007). Effects of massaging on hardness, rheological properties, and structure of four wild boar muscles of different fibre type content and age. Meat Sci., 75, 595–602.

74. List of prokariotyic names with standing in nomenclature (LPSN): http://www.bacterio.cict.fr (Datum pristupa: 07.07.2017.)
75. http://foodmicrobiologee.blogspot.hr/ (Datum pristupa: 15.8.2017.)

Prilog 1.

Popis slika

Slika 1. Smjesa za proizvodnju kobasica sa začinima (A) i tradicionalno proizvedene kobasice od mesa divljači na kraju zrenja (B)..... 6
Slika 2. Morfološki izgled *Lactobacillus* kolonija poraslih na LamVab selektivnoj podlozi.. 15
Slika 3. Karakteristični morfološki izgled pojedinih kolonija naraslih na selektivnim podlogama : sive kolonije enterokoka na KAA podlozi (A), tamno plave do ljubičaste kolonije *E.coli* i ljubičasto-ružičasto kolonije koliformnih bakterija na CCA podlozi (B) VRBG podloga sa specifičnim ružičastim do ljubičasto-crvenim kolonijama *Enterobacteriaceae* (C), *S.aureus* kolonije crne boje na BP podlozi (Izvor http://foodmicrobiologee.blogspot.hr (D), DRBC podloga sa ružičastim kolonijama kvasaca i plijesni (E) 26
Slika 4. Rep-PCR produkti nakon 0. dana proizvodnje dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa 2 soja *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13. 29
Slika 5. Rep-PCR produkti nakon 7. dana proizvodnje dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa 2 soja *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13. 30
Slika 6. Rep-PCR produkti nakon 40. dana proizvodnje dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa 2 soja *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13. 31
Slika 7. Dendrogram kreiran temeljem rep-PCR obrazaca sojeva C_7d_13 i sojeva MRS_296. Replike soja C_7d_13 su međusobno slične 91.54 %, dok su replike soja MRS_296 slične 88,54 %..... 33
Slika 8. Dendogram kreiran temeljem GTG5 obrazaca amplificirane DNA izolata prikupljenih iz inokulirane kobasice, sa LamVab medija. Izolati su prikupljeni tijekom fermentacije i zrenja kobasica (0, 7 i 40 dan). 34
Slika 9. Dendogram kreiran temeljem GTG5 obrazaca amplificirane DNA izolata prikupljenih iz neinokulirane kobasice, sa LamVab medija. Izolati su prikupljeni tijekom fermentacije i zrenja kobasica (0, 7 i 40 dan)..... 35

Prilog 2.

Popis grafova

Graf 1. Početni broj inokuliranih stanica za sojeve *Lb. sakei* MRS_296 i C_7d_13 19
Graf 2. Izmjerene pH vrijednosti tijekom fermentacije i zrenja kobasica..... 21
Graf 3. Izmjerene vrijednosti aktiviteta vode (a_w) tijekom fermentacije i zrenja kobasica 21
Graf 4. Korelacija pH i CFU vrijednosti laktobacila u inokuliranoj kobasici..... 22
Graf 5. Korelacija pH i CFU vrijednosti laktobacila za kontrolnu kobasicu 22
Graf 6. Broj laktobacila detektiranih tijekom fermentacije i zrenja kobasica..... 23

Prilog 3.

Popis tablica

Tablica 1. Reagensi korišteni za pripremanje reakcijske smjese za rep-PCR. 18
Tablica 2. Temperaturni profil rep-PCR reakcije. 18
Tablica 3. Rezultati mikrobiološke analize provedene na LamVab, KAA,VRBG; CCA, DRBC i BP podlozi za inokliranu kobasicu i neinokliranu kontrolu tijekom različitih vremenskih intervala proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasica (0., 7. i 40. dan) 28