

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ

Александра В. Николић

УТИЦАЈ ПОЛИФЕНОЛА НА КВАЛИТЕТ,
БЕЗБЕДНОСТ И ОДРЖИВОСТ
ФЕРМЕНТИСАНИХ КОБАСИЦА

докторска дисертација

Београд, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Aleksandra V. Nikolić

**POLYPHENOLS IMPACT ON QUALITY,
SAFETY AND SHELF LIFE OF
FERMENTED SAUSAGES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Ментор 1:

Др Драган Василев, ванредни професор
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

Ментор 2:

Др Весна Ђорђевић, научни саветник, Институт за хигијену и технологију меса,
Београд

Чланови комисије:

Др Мирјана Димитријевић, редовни професор
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

Др Милорад Мириловић, редовни професор
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

Др Ненад Паруновић, виши научни сарадник, Институт за хигијену и
технологију меса, Београд

Датум одбране:

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација је круна мог професионалног и личног развоја. Том приликом желим да се захвалим изузетним људима који су били са мном на овом путу ка остварењу циља.

Велику захвалност дугујем ментору, др Драгану Василеву, ванредни професор, на изузетно корисним саветима, сугестијама и несебичној помоћи приликом израде докторске дисертације.

Такође желим да се захвалим менторки др Весни Ђорђевић, научни саветник, на залагању и неизмерној подршци који су ми били од великог значаја.

Изузетну захвалност дугујем мојим колегама са института за хигјену и технологију меса „ИНМЕС“, на помоћи и ангажовању током вршења експеримената, као и ИМ „Златиборац“ који су ми омогућили да у њиховој индустрији спроведем свој оглед.

Највећу захвалност дугујем својој породици, који су веровали и били уз мене док сам корачала степеницама успеха.

Докторску дисертацију с љубављу посвећујем својој дивној деци Лазару и Анђели.

Резултати истраживања ове докторске дисертације део су истраживања у оквиру пројекта „Унапређење и развој хигијенских и технолошких поступака у производњи намирница животињског порекла у циљу добијања квалитетних и безбедних производа конкурентних на светском тржишту” (Ев. Бр. ИИИ 46009), као и пројекта „Одабране биолошке опасности за безбедност/квалитет хране анималног порекла и контролне мере од фарме до потрошача“ (Ев. Бр. ТР 31034) које финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

УТИЦАЈ ПОЛИФЕНОЛА НА КВАЛИТЕТ, БЕЗБЕДНОСТ И ОДРЖИВОСТ ФЕРМЕНТИСАНИХ КОБАСИЦА

САЖЕТАК

У раду је испитивана могућност употребе полифенола као природног конзерванса код ферментисаних кобасица. Произведене су три групе производа, од којих је прва била кобасица уобичајеног састава са додатком нитрита, друга група је била истог састава као прва с тим што су јој додати и полифеноли, а трећа је произведена без додатка нитрита али са додатком полифенола. Резултати испитивања су показали да додаток полифенола није утицао на процесе ферментације и сушења, а производи су били стандардног хемијског састава. Кобасице произведене са нитритима и полифенолима садржале су више нитрата него контрола. Код кобасица обогаћених полифенолима утврђен је значајно мањи пероксидни и TBARS број него код контроле. Међутим, код кобасица произведених заједно са нитритима и полифенолима утврђен је јачи интензитет оксидације масти него код кобасице са полифенолима без нитрита. Микробиолошки процеси код свих група били су типични за ферментисане кобасице, у погледу броја бактерија млечне киселине и фамилије *Micrococcaceae*. Кобасице обогаћене полифенолима садржале су мањи број бактерија узрочника квара (*Pseudomonadaceae*) него контролне кобасице. Иако су инструменталним мерењем регистроване разлике у светлости, уделу црвене и жуте боје, сензорска својства свих група кобасица су високо оцењена током већег дела складиштења, а 280. дана биле су у оквиру лимита прихватљивости. Кобасице са полифенолима садржале су више биогених амина него контролне кобасице, при чему су кобасице без нитрита садржале више биогених амина него кобасице са нитритима. Садржај хистамина и тирамина био је у границама уобичајеним за ферментисане кобасице. Најдоминантнија фенолна једињења била су каемферол-3-О-глукозид, а затим и кверцетин, лутеолин-7-О-глукозид, катехин и сиригинска киселина. Кобасице са полифенолима без додатка нитрита достигле су исти период одрживости као конвенционалне кобасице са нитритима, што је обећавајући резултат у потенцијалној употреби полифенола као замене за нитрите, при чему је потребно пронаћи адекватно решење како би се смањило стварање биогених амина.

Кључне речи: ферментисане кобасице, полифеноли, квалитет, безбедност, одрживост

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Хигијена и технологија намирница анималног порекла

УДК број: 547.623:637.05:664.933

POLYPHENOLS IMPACT ON QUALITY, SAFETY AND SHELF LIFE OF FERMENTED SAUSAGES

SUMMARY

In this work, the possibility to use polyphenols as natural preservatives in fermented sausage was investigated. Three groups of sausages were produced, the first group were sausages of usual composition containing nitrite, the second group were sausages of the same composition as the first but with the addition of a polyphenols, and the third were sausages produced without the addition of nitrites in which were added polyphenols. The results showed that the addition of polyphenols did not affect the processes of fermentation and drying and the final products had the usual chemical composition. The sausages produced with nitrites and polyphenols contained higher nitrate levels than the control. By the polyphenols enriched sausages there was found a significantly lower peroxide number and TBARS value than by the control sausage. However, for sausages manufactured together with nitrites and polyphenols, a higher intensity of fat oxidation processes was found then by nitrite free sausages. Although the instrumental measurements registered differences in brightness, red and yellow color intensity, the sensory properties of all groups of sausages were rated high for most of the storage period and reached a day 280 with scores within the limits of acceptability. Polyphenols enriched sausages contained more biogenic amines compared to the control sausages, while the sausages without nitrites contained more biogenic amines then nitrite containing sausages. Content of histamine and tiramine was in range usual for fermented sausages. The dominant phenolic compounds in sausages were kaemferol-3-O-glucoside, quercetin, and then, luteolin-7-O-gukozid, catechin and syringic acid. Sausages with polyphenols produced without nitrites reached the same shelf life as the conventional nitrite containing sausages, which is a promising result in the potential use of polyphenols as a substitute for nitrite in fermented sausages, but it is necessary to find an adequate solution in order to reduce the biogenic amines formation in these sausages.

Key words: fermented sausages, polyphenols, quality, safety, shelf life

Scientific Field: Veterinary Medicine

Scientific Subfield: Hygiene and technology of food of animal origin

UDK number: 547.623:637.05:664.933

САДРЖАЈ

1.	УВОД.....	1
2.	ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	2
2.1.	Ферментисане кобасице.....	2
2.1.1.	Производња ферментисаних кобасица.....	2
2.2.	Квалитет ферментисаних кобасица.....	3
2.2.1.	Физичко хемијски и хемијски параметри квалитета.....	3
2.2.2.	Сензорски параметри квалитета.....	4
2.2.3.	Инструментални параметри боје.....	4
2.3.	Безбедност ферментисаних кобасица.....	5
2.3.1.	Микробиолошке опасности.....	5
2.3.2.	Хемијске опасности.....	6
2.3.2.1	Нитрати и нитрити.....	6
2.3.2.2	Биогени амини.....	6
2.4.	Одрживост ферментисаних кобасица.....	7
2.4.1.	Биохемијске промене на протеинима.....	7
2.4.2.	Биохемијске промене на мастима.....	8
2.5.	Полифеноли.....	8
3.	ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА.....	10
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	12
4.1.	Материјал.....	12
4.2.	Методe испитивања.....	13
4.2.1.	Физичко хемијски параметри.....	14
4.2.2.	Хемијски састав.....	14
4.2.3.	Хидролитичке и оксидативне промене на мастима.....	14
4.2.4.	Степен протеолизе.....	14
4.2.5.	Микробиолошка испитивања.....	14
4.2.6.	Садржај биогених амина.....	15
4.2.7.	Садржај полифенола.....	16
4.2.8.	Инструментално мерење боје.....	17
4.2.9.	Испитивање сензорских својстава.....	18
4.2.10.	Статистичка анализа.....	18
5.	РЕЗУЛТАТИ	19
5.1.	Хемијски састав.....	19
5.2.	Физичко хемијски параметри.....	20
5.3.	Биохемијске промене на протеинима и мастима.....	22
5.4.	Микробиолошке промене.....	26
5.5.	Параметри боје и сензорска својства.....	32
5.6.	Садржај биогених амина.....	40
5.7.	Садржај полифенола.....	50

6.	ДИСКУСИЈА.....	51
6.1.	Хемијски састав.....	51
6.2.	Физичко хемијски параметри и степен протеоллизе.....	51
6.3.	Параметри оксидације масти.....	52
6.4.	Промене у микрофлори.....	52
6.5.	Параметри боје и сензорски параметри квалитета.....	53
6.6.	Садржај биогених амина.....	55
6.7.	Садржај полифенола.....	56
7.	ЗАКЉУЧЦИ.....	58
8.	СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ.....	60

1. УВОД

Ферментисане суве кобасице представљају веома цењене производе од меса захваљујући карактеристичним сензорским особинама, као и хранљивој вредности јер се ови производи не обрађују топлотом, тако да хранљиве материје пореком из меса остају битније непромењене. Ови производи се конзервишу поступцима димљења, ферментације и сушења, а ради постизања карактеристичне ароме, боје и текстуре подвргавају се вишенедељеном зрењу. Ферментисане суве кобасице, захваљујући ниским вредностима активности воде које се постижу у току сушења, поседују добру одрживост и складиште се при релативно високим температурама (15 °C). Међутим, у току ферментације, сушења и зрења, одвијају се процеси протеолизе и липолизе који доприносе формирању ароме производа, али даљим разлагањем аминокиселина и масних киселина настају продукти који утичу неповољно на сензорска својства производа, али могу да утичу и неповољно на здравље потрошача. Декарбоксилацијом аминокиселина, која се пре свега одвија под утицајем активности микроорганизама, настају биогени амини, од којих хистамин и тирамин делују вазоактивно тако што шире крвне судове и повећавају њихову пропустљивост. С друге стране, продукти оксидације нарушавају сензорска својства производа, пре свега боју, услед оксидације миоглобина до метмиоглобина који је сиво смеђе боје, а доводе и до промена ароме у виду појаве ужеглости. Поред тога, продукти оксидације нарушавају и безбедност производа због потенцијално штетног утицаја на здравље конзумента.

У циљу постизања боље одрживости и безбедности ферментисаних кобасица, широку примену имају нитрити који у производима остварују антимикуробно и антиоксидативно дејство, при чему учествују и у формирању стабилне ружичасто црвене боје производа и карактеристичне ароме. Међутим, нитрити са аминима меса могу да награде Н-нитрозамине који поседују карциногени потенцијал, због чега је велики број истраживања усмерен ка смањењу употребе нитрита, као и проналажењу одговарајућих земена за нитрите у производима од меса.

Полифеноли представљају секундарне метаболите биљака који показују антимикуробна и антиоксидативна својства, као и способност редукције стварања биогених амина у производима од меса. Поред тога, полифеноли могу да испољавају антиалергијско, антиинфламаторно, антиоксидативно и антимикуробно деловање код конзументата, тако да могу да имају посебан значај као додатак у креирању производа од меса као функционалне хране. На основу тога, полифеноли као додатак у производњи ферментисаних сувих кобасица могли би да допринесу бољој одрживости и безбедности производа, а уједно кобасице би поседовале и потенцијал као функционална храна.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Ферментисане кобасице

Ферментисане кобасице се производе од уситњеног меса и масног ткива са додатком кухињске соли, адитива, шећера, зачина и других додатака. Технолошки поступак производње ових производа од меса подразумева припрему надева, пуњење у одговарајуће омотаче, димљење и сушење, после чега се кобасице подвргавају зрењу које представља скуп физичких, хемијских и ензимских процеса, путем којих се постижу одрживост и жељена сензорна својства производа. (Leistner, 1986; Radetić, 1997; Vuković, 2012). Ферментисане кобасице представљају производе високог квалитета и веома су цењене међу потрошачима. Према пропису који дефинише квалитет производа од меса (Аноп. 2019) деле се на ферментисане суве (садрже мање од 35% влаге) и ферментисане полусуве кобасице (садрже више од 35% влаге). Ферментисане суве кобасице садрже најмање 20% протеина меса, при чему неки производи попут домаћег кулена и зимске саламе садрже више од 24% протеина меса. Иако се ови производи не обрађују топлотом, они су добро одрживи и могу да се складиште при релативно високим температурама (15°C) пре свега захваљујући снижавању рН вредности надева у току ферментације под утицајем бактерија млечне киселине (Fontana и сар., 2016), а потом и снижавањем активности воде у току сушења која опада испод 0,90, чиме је практично онемогућен раст патогених микроорганизама и узрочника квара (Vignolo и сар., 2010; Laranjo и сар., 2015).

2.1.1. Производња ферментисаних кобасица

Ферментисане кобасице се обично производе од 2/3 меса, најчешће меса свиња и говеда и 1/3 масног ткива. Месо и масно ткиво се уситњавају и мешају са зачинима, кухињском соли или солима за саламурење и шећерима. У индустријској производњи се додају стартер културе, док се у традиционалној производњи ферментација одиграва под утицајем природне микрофлоре која потиче из околине (Toldra и сар, 2014). Стартер културе обично садрже бактерије млечне киселине (припадници родова *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и др.) или комбинацију бактерија млечне киселине и стафилокока (*Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* и др.) (Lücke, 1998). Надев се пуни у природне омотаче (танко црево, слепо црево, задње црево) или вештачке омотаче од природних материјала (најчешће колагенска црева) који су пропустљиви за дим, водену пару и гасове. Након пуњења, кобасице се подвргавају ферментацији у току које бактерије млечне киселине разлажу шећере до млечне киселине, што доводи до снижавања рН вредности. Надев кобасица обично има рН вредност око 5,8 који у току ферментације опада на 4,6 до 5,4 у зависности од количине датих шећера и услова ферментације, пре свега температуре. Снижавање рН вредности и органске киселине доводе до инхибиције раста патогених бактерија и узрочника квара, што доприноси безбедности и одрживости кобасица. Поред тога, снижавање рН вредности игра значајну улогу и у повезивању надева услед гелирања растворених протеина миофибрила, што је значајно за текстуру производа. Активност микрофлоре доприноси редукцији нитрита до азот монооксида који реагује са миоглобином градећи ниотрозил-миоглобин, ружичасто црвени пигмент који даје стабилну боју производа (Hammes и сар, 1990). Стафилококе имају улогу у редукцији нитрата до нитрита, и у формирању ароме производа. Микрококе имају антиоксидативну улогу, стварајући ензим пероксидазу који разлаже пероксиде који се ослобађају у току ферментације од стране бактерија млечне киселине. Паралелно са ферментацијом, кобасице се суше до постизања жељене a_w вредности, која је мања од 0,90 код ферментисаних сувих кобасица, док код ферментисаних полусувих кобасица она износи између 0,90 и 0,95. Сушење и зрење ферментисаних сувих кобасица траје од неколико недеља до неколико месеци у зависности од дијаметра и врсте

кобасице (Demeuer 2000). Приликом сушења морају да буду обезбеђени оптимални услови у погледу релативне влажности, температуре и циркулације ваздуха. Релативна влажност ваздуха треба да прати снижавање активности воде у надеву, односно треба да буде 2-4 јединице нижа од a_w вредности, јер би у супротном дошло до наглог сушења површине кобасице и формирања „сувог руба“. У току зрења кобасица долази до формирања карактеристичних сензорских својстава, пре свега боје, ароме и конзистенције. Карактеристична тамно црвена боја настаје редукијом миоглобина и формирањем нитрозил-миоглобина код производа са додатком нитрита (Vuković, 2012; Teodorović и сар., 2015). Протеолиза је једна од важнијих биохемијских промена које се одигравају за време зрења ферментисаних кобасица јер се ослобађају пептиди, аминокиселине, алдехиди, органске киселине и амини, који су битне компоненте ароме зрелог производа (Hughes, 2002; Ferreira и сар., 2007).

2.2. Квалитет ферментисаних кобасица

Квалитет ферментисаних кобасица одређен је њиховим хемијским саставом и сензорским карактеристикама, које зависе од квалитета сировине, односа састојака у рецептури, као и од услова производње (Leistner, 1986). Да би производи од меса могли да буду стављени у промет, што важи и за ферментисане кобасице, морају да испуњавају захтеве прописа у погледу хемијских и сензорских параметара квалитета (Anon, 2019).

2.2.1. Физичко-хемијски и хемијски параметри квалитета

Хемијски параметри квалитета за ферментисане кобасице обухватају саржај влаге, садржај протеина меса и садржај колагена у протеинима меса. Садржај влаге код ферментисаних сувих кобасица мора да буде највише до 35%. За производе са прописаним називом као што је домаћи кулен, садржај протеина меса мора да буде најмање 24%, а удео колагена у протеинима меса највише 10%. За кулен и зимску саламу, садржај протеина меса мора да буде најмање 22%, а удео колагена у протеинима меса највише 15%. За сремску кобасицу, суцук и чајну кобасицу садржај протеина меса мора да буде најмање 20%, а удео колагена у протеинима меса највише до 15%. Поред хемијских параметара, прописана је и најмања рН вредност, као физичко-хемијски параметар који је у овом случају показатељ степена зрења. Вредност рН мора бити најмање 5,3 код домаћег кулена и зимске саламе, производа који се пуне у омотаче ширег дијаметра и дуже сазревају, а код осталих производа најмање 5,0 (Anon, 2019). Хемијске параметаре квалитета ферментисаних кобасица на домаћем тржишту испитивали су различити аутори. Вукашиновић и сар., (2012) наводе да чајна кобасица садржи од 17,22% до 36,12% влаге и од 17,17% до 31,69% протеина меса. Џинић и сар. (2016) наводе да овај производ садржи од 20,22 до 30,87 % влаге, од 21,42 до 26,12% протеина меса, од 10,09 до 18,11% колагена у протеинима меса, од 36,77 до 48,31% масти, од 3,0 до 3,85% кухињске соли, од 5,75 до 13,84 mg/kg нитрита, а рН вредност од 4,67 до 5,06. Сувајџић и сар. (2018) наводе да Сремски кулен садржи од 27,7 до 30,26 % влаге, од 26,21 до 29,0% масти, од 36,1 до 36,5% протеина меса, од 5,27 до 6,18 % колагена у протеинима меса, од 4,95 до 4,99% кухињске соли 20,0 до 21,5 mg/kg нитрата и од 1,09 до 4,61 mg/kg нитрита, а рН вредност од 5,67 до 5,84.

2.2.2. Сензорски параметри квалитета

У погледу сензорских својстава ферментисаних кобасица која су прописана Правилником о квалитету уситњеног меса, полупроизвода од меса и производа од меса (Аноп, 2019), површина кобасица не сме да буде деформисана, омотач треба добро да прилеже уз надев, конзистенција треба да буде чврста, пресек има изглед мозаика састављеног од комадића меса и масног ткива који су равномерно распоређени и повезани, на пресеку није дозвољено присуство шупљина, боја треба да буде стабилна, а мирис и укус пријатан и карактеристичан. Боја представља веома битну особину производа од меса и често је одлучујући фактор за избор при избору од стране потрошача (Hunt и сар., 1991). Боја меса зависи у највећој мери од садржаја миоглобина (Millar и сар., 1996), а код производа од меса који су обрађени солима за саламурење које у себи садрже нитрате, односно нитрите, од пигмента који настаје у реакцији између азот монооксида пореклом од нитрита и миоглобина, градећи пигмент нитрозил миоглобин (Møler и сар., 2003). Интензитет црвене боје код производа од меса зависи и од садржаја масног ткива у производу, тако да што је већи садржај масног ткива интензитет црвене боје је мањи и производи су светлији (Ordóñez и сар., 2001). Кобасице које садрже мање масног ткива имају чвршћу конзистенцију и мање су сочне од кобасица са већим уделом масног ткива, при чему њихова површина може бити и неравна и наборана (Mendoza и сар., 2001). Степен сушења такође утиче на особине производа тако да су кобасице светлије и уколико садрже више воде (Bozkurt и Bayram, 2006). Арома ферментисаних кобасица настаје у току зрења под утицајем ендогених ткивних ензима, као и ензима микроорганизама. Од микроорганизама посебан значај за формирање ароме имају бактерије млечне киселине, микрококе и ентерококе (Ordóñez и сар., 1999). Типична арома ферментисаних сувих кобасица је резултат накупљања испарљивих материја, као што су алкохоли, кетони, алдехиди, естри, терпени, алифатични угљоводоници и фурани, као и неиспарљивих материја попут аминокиселина, пептида, шећера и нуклеотида, који потичу од основних састојака кобасица (месо, зачини, адитиви) или настају њиховом ензимском разградњом у току зрења (Kaban и сар., 2012). На боју и арому ферментисаних кобасица утичу и температура и дужина складиштења, тако да кобасице које су складиштене при 5°C имају бољу боју и арому него кобасице које су складиштене при 15°C, што се запажа већ после 90 дана, а после 120 дана складиштења код свих производа арома и боја су слабије оцењени, при чему конзистенција и текстура нису биле битније промењене (Kamenik и сар., 2012).

2.2.3. Инструментални параметри боје

Код ферментисаних сувих кобасица, инструментални параметри боје зависе од врсте производа, односно од њиховог састава. Код чајне кобасице просечне вредности за светлоћу (L^* вредност) износе од 44,33 до 53,64, за интензитет црвене боје (a^* вредност) од 13,08 до 18,59 и за интензитет жуте боје (b^* вредност) од 7,84 до 10,23 (Džinić и сар. 2016). С друге стране, Чоризо (*Chorizo de Pamplona*) ферментисана сува кобасица из Шпаније која се израђује са додатком паприке има сличну L^* вредност (46,87 -54,29), али израженију црвену ($a^*=20,44-26,12$) и жуту боју ($b^*=10,99-17,70$) које потичу од паприке (Gimeno и сар., 2000). Такође, према наводима Kamenik и сар., (2012) на параметре боје ферментисаних кобасица утиче и дужина складиштења, тако да на почетку складиштења L^* вредност износи 50,25, a^* вредност износи 16,66 и b^* вредност 8,55, а после 120 дана кобасице постају тамније ($L^*=47,92$), слабији је интензитет црвене боје ($a^*=15,45$), док се интензитет жуте боје се битније не мења ($b^*=8,45$).

2.3. Безбедност ферментисаних кобасица

Опасности од значаја за безбедност хране могу се уопштено поделити на биолошке, хемијске и физичке, при чему су из угла ове дисертације од значаја одређене микробиолошке и хемијске опасности о којима ће бити речи у наредним подпоглављима.

2.3.1. Микробиолошке опасности

Иако се ферментисане кобасице генерално сматрају безбедним, у одређеним условима неке патогене бактерије могу представљати потенцијлну опасност по здравље потрошача, као што су патогени сојеви *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*. Ове бактерије могу доспети у надев путем контаминиране сировине, опреме или радника, а да ли ће преживети и умножити се у производу зависи од услова у току производње (Holck и сар, 2017).

Од *Salmonella* врста, издвајају се два сероваријетета као узрочници тровања храном, и то *S. Typhimurium* која се доводи у везу са месом свиња и говеда, и *S. Epidemidis* која се доводи у везу са јајима и месом живине, а трансмисија се одиграва преко инфицираних животиња, фекалном и унакрсном контаминацијом (EFSA, 2015). Ферментисане кобасице се спомињу у неколико случајева као извор тровања салмонелама (Pierre, 2015), међутим научна истраживања показују да су салмонеле осетљивије на антимикуробне параметре који владају у ферментисаним кобасицама него *Escherichia coli* O157:H7 и *Listeria monocytogenes* (Chikthimma и Knabel, 2001, Rhoades и сар., 2009).

Патогени сојеви *Escherichia coli* припадају вероцитотооксогеним, односно шигатоксогеним типовима, а изоловано је више од 150 различитих серотипова који узоркују ентерохеморагични колитис и хемолитични уремичи синдром код људи. Најчешће спомињани серотип је O157:H7, који се доводи у везу са месом говеда, а од осталих серотипова се наводе и O26, O45, O103, O111, O121 и O145 (FSIS, 2011). Серотип O157:H7 поседује већу толеранцију на снижавање рН вредности од осталих, тако да постоје подаци о њиховом присуству у ферментисаним кобасицама. Иако комбинација ниске рН и a_w вредности значајно смањује могућност умножавања *E.coli* (Incze, 1998), због могућности да мали број вероцитотоксичних сојева може да доведе до обољења човека, контрола овог патогена се спроводи кроз свеобухватне интегрисане системе контроле по систему „од фарме до трпезе“ (Holck и сар, 2017).

Listeria monocytogenes изазива обољење листериозу, која може да се манифестује од благих до тешких симптома код осетљивих полупација, а храна која може бити извор инфекције сврстава се у групу *хране спремне за конзумирање* (Ready-to-eat, енгл.) која се користи без претходне топлотне обраде. Ферментисане кобасице се оцењују као производи ниског или средњег ризика по питању листериозе, јер се листерије могу наћи у овим производима у малом броју, а да би дошло до обољења потребно је најмања инфективна доза од 10.000 бактеријских ћелија (Chikthimma и Knabel, 2001). Иако у иницијалној фази производње могу да постоје услови за раст листерија, комбинација ниске рН вредности (4,6-5,3) и активности воде ($\leq 0,90$) спречава умножавање ових бактерија у ферментисаним кобасицама тако да ови производи не подржавају раст *Listeria monocytogenes* (Chikthimma и Knabel, 2001, Rhoades и сар., 2009).

Staphylococcus aureus је бактерија која је уобичајено присутна на кожи и мукозама човека, као и животиња, а до тровања храном долази након конзумирања намирница у којима су се ове бактерије умножиле и створиле ентеротоксин. *Staphylococcus aureus* може да се умножава при релативно већем садржају соли, односно нижим вредностима активности воде

($\leq 0,86$) тако да постоји могућност да се нађу у ферментисаним кобасицама (Hennekinne и сар., 2012). Међутим, у овим производима од меса *Staphylococcus aureus* је изолован у релативно малом броју, који није довољан да продукује токсин у концентрацији која би угрожавала здравље потрошача. Lücke (1989) наводи да уколико се ферментација одвија на температурама нижим од 25° C у току 2 – 3 дана, при чему је иницијалан број *Staphylococcus aureus* мањи од 10⁴ cfu/g, не постоји опасност да дође до стварања токсина.

2.3.2. Хемијске опасности

Од хемијских опасности, у случају употребе соли за саламурење код ферментисаних кобасица спомињу се нитрати и нитрити као прекурсори карциногених једињења *N*-нитрозамина, а пошто се ради о производима код којих у току зрења долази и до протеолизе, ту се убрајају и биогени амини као продукти разлагања аминокиселина.

2.3.2.1. Нитрати и нитрити

У индустријској производњи ферментисаних кобасица незаобилазну улогу има употреба нитрита, који су значајни за микробиолошку стабилност кобасица, нарочито на почетку зрења, када остали инхибиторни фактори (pH- и a_w-вредност) још увек не делују (Radetić, 1997). Поред тога, утицај нитрита на одрживост ферментисаних кобасица испољава се и кроз стабилизацију масти и успоравање њихове оксидације у процесу зрења (Heinz и Hautzinger, 2007). Међутим, нитрити представљају прекурзор у стварању штетних једињења *N*-нитрозамина, који поседују карциногени потенцијал (Marco и сар., 2006; Della Valle и сар., 2014). Они се формирају у реакцијама између нитрита и амина који настају декарбоксилацијом аминокиселина ослобођених протеолизом меса (De Mey и сар., 2014). Иако је употреба нитрита карактеристика индустријске производње, њихово присуство је детектовано и у традиционалним производима који се израђују без употребе адитива, при чему они потичу из зачина попут паприке и белог лука (Vuković и сар., 2011). *N*-нитрозамини у највећој мери настају у току топлотне обраде саламурених производа, нарочито печења и пржења, али присуство ових једињења је детектовано и у ферментисаним кобасицама, које се иначе не обрађују топлотом. Yurchenko и Mölder, 2007 су у салами утврдили присуство *N*-нитрозамина у количини од 3,92 µg/kg и сувој шунки 7,33 µg/kg. Појава нитрозамина код ферментисаних кобасица и сувомеснатих производа објашњава се дуготрајним процесом зрења у току кога се декарбоксилацијом слободних аминокиселина ослобођених протеолизом у току зрења производа ослобађају амини који реагују са нитритима (De Mey и сар., 2014). Из тог разлога све више на значају добијају истраживања у правцу смањења употребе нитрита у производима од меса, или проналажењу одговарајућих замена. Међутим, то није једноставан задатак имајући у виду њихов вишеструки значај, поготово за безбедност, као и за сензорска својства производа од меса, односно замене за нитрите морају да делују како антимикуробно, тако и антиоксидативно (Vasilev и сар., 2017).

2.3.2.2. Биогени амини

Биогени амини представљају нискомолекуларна азотна једињења која у организму могу деловати на нервни, гастроинтестинални и кардиоваскуларни систем, при чему посебан значај имају хистамин и тирамин који могу да доведу до алиментарне интоксикације (Teodorović и сар., 2000), док остали попут путресцина, кадаверина, триптамина, спермина и спермидина, могу да потенцирају ефекат хистамина и тирамина (Shalaby, 1996). Није лако

дефинисати дефинитивну токсичну дозу биогених амина јер постоји низ фактора који утичу на то у којој мери ће доћи до појаве симптома тровања, као што су индивидуална осетљивост, подложност оксидације амина помоћу моноамино и диамино оксидаза, употреба лекова који делују као моноаминоксидаза инхибитори, као и генетска предиспозиција конзумента (Srapo и сар., 2010). Висок садржај биогених амина у храни се сматра индикатором квара и лоше хигијене у производњи (Latorre-Moratalla и сар., 2012). Добра хигијена у производњи, као и брз пад рН вредности у току ферментације, сматрају се кључним за смањење садржаја биогених амина у ферментисаним кобасицама. Бактерије које толеришу присуство соли и нитрита, као што су бактерије млечне киселине и коагулаза негативне стафилококе и ентерококе представљају доминантну микрофлору током ферментације, а биогене аminer стварају пре свега грам негативне бактерије узрочници квара (Carmen и сар., 2014). Suzzi и сар. (2003) наводе да ентеробактерије, псевдомонас, ентерококе и лактобацили представљају микроорганизме који доприносе стварању биогених амина, а поготово хистамина, кадаверина и путресцина у ферментисаним кобасицама. Поред тога, Gençsefer и сар (2007) наводе да кобасице произведене са додатком нитрита садрже мање биогених амина него кобасице без нитрита, нарочито путресцина, кадаверина и хистамина, док нитрити нису утицали на садржај спермина и спермидина. Исто тако, Kurt и Zorba (2009) закључују да се са повећањем садржаја нитрита у ферментисаним кобасицама значајно смањује садржај тирамина и кадаверина. Пошто спермин и спермидин нису само продукти активности микроорганизама, већ природно постоје у мишићима, ови биогени амини не зависе од броја бактерија и додатих нитрита, али њихов садржај може да се повећа у току зрења ферментисаних кобасица (Hernández-Jover и сар., 1997). На стварање биогених амина утиче и температура складиштења, тако да је при 0°C након 9 дана садржај хистамина у туњевини свега 18 mg/kg, а при 10°C након истог периода садржај хистамина износи чак 564 mg/kg (Chong и сар., 2011). У ферментисаним кобасицама садржај хистамина веома варира али је углавном низак и износи од <0,2 до 133 mg/kg, садржај тирамина износи од 5,0 до 246 mg/kg, док највише има путресцина који варира од 7,2 до 401 mg/kg (Alves и сар., 2017).

2.4. Одрживост ферментисаних кобасица

Одрживост ферментисаних кобасица зависи од низа фактора, почев од правилног избора сировине, степена контаминације узрочницима квара, процеса ферментације и сушења кроз постизање одговарајуће рН и a_w вредности, степена промена на протеинима и мастима, и формирања и очувања жељених сензорских својстава производа (Kumar и сар., 2015). У овом подпоглављу ће бити описане промене на протеинима и мастима, док су остали фактори описани у претходним подпоглављима.

2.4.1. Биохемијске промене на протеинима

У току зрења ферментисаних кобасица, долази до хидролизе протеина која се одвија како под утицајем ензима микроорганизама, тако и под утицајем ткивних протеаза. Протеолитичка активност се приписује у највећој мери лактобацилима и микрококама, међутим они су свакако слабији протеолити у поређењу са узрочницима квара као што су колиформи и бактерије из родова *Proteus* и *Pseudomonas* (Kröckel, 1995). Активност бактеријских протеаза се значајно смањује у присуству соли, тако да при концентрацији соли од 3-5% долази до редукције протеолитичке активности за чак 80 % (Vignolo и сар., 1988). Од ткивних протеолитичких ензима, у почетним фазама производње су активни калпаини али се са опадањем рН вредности и активности воде у току ферментације и сушења њихова активност смањује, а у току сушења и зрења активни су катепсини (Toldrá и сар., 1992). Индекс протеолитике, који представља однос непротеинског и протеинског азота зависи од фазе

производње ферментисаних кобасица, тако да првог дана производње износи 2,9-3,0 %, након 7 дана износи 4,6-5,9%, а после тога почиње да опада због неповољнијих услова за активност протеолитичких ензима (Safa и сар., 2015). Међутим, код Сремског кулена, традиционалне ферментисане кобасице широког дијаметра, која сазрева неколико месеци, индекс протеолизе на почетку зрења износи око 10% док након 150 дана зрења на достиже 17,9 до 18,4% (Сувајдић и сар., 2019).

2.4.2. Биохемијске промене на мастима

Масти су присутне у високом проценту у ферментисаним кобасицама (од 25 до 55%), а њихово разлагање у току ферментације игра значајну улогу у формирању ароме готовог производа (Kumar и сар., 2015). Липолиза у ферментисаним кобасицама настаје како под утицајем липаза микроорганизама, тако и ткивних липаза. Међу микроорганизмима који учесвују у хидролизацији масти издвајају се најпре *Micrococcaceae*, а потом и врсте из родова *Lactobacillus* и *Staphylococcus*. Ткивне липазе показују највећу активност на почетку ферментације, а са снижавањем рН вредности и повећањем концентрације соли, њихова активност опада (Ordóñez и сар., 1999). У току липолизе ослобађају се масне киселине које даље подлежу оксидацији, при чему настају пероксиди, алкани, алкени, алкохоли, алдехиди и кетони (Leroу и сар., 2006). Пероксиди су веома реактивни и доводе до оксидације миоглобина и нитрозил-миоглобина што резултира појавом сиво зелених дисколорација, а алдехиди и кетони до појаве ужегले ароме производа. TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) вредност, којом се изражава степен оксидационих промена, почиње да расте на почетку производње кобасица и повећава се за време зрења, тако да износи од 0,13, па чак до 8,0 mg MAL/kg (Marco и сар., 2006). У току зрења кулена, ферментисане суве кобасице, након два месеца зрења киселински број је износио 7,52 mg KOH/g, а TBARS вредност 0,21 mg MDA/kg, након 5 месеци зрења киселински број је износио 13,86 mg KOH/g а TBARS вредност 0,33 mg MDA/kg, док је након 7 месеци зрења киселински број је износио 9,50 mg KOH/g, пероксидни број 0,77 mmol/kg и TBARS вредност 0,07 mg MDA/kg. Код узорка који је показивао знаке ужеглости, киселински број је износио 26,59 mg KOH/g, пероксидни број 43,47 mmol/kg и TBARS вредност 1,88 mg MDA/kg (Saičić и сар., 2011). Према наводима Salgado и сар. (2005) код ферментисаних кобасица не може се детектовати ужеглост ферментисаних кобасица сензорском анализом уколико је TBARS вредност мања од 2,21 mg MAL kg.

2.5. Полифеноли

Полифеноли представљају секундарне метаболите биљака, који у лишћу играју значајну физиолошку улогу штитећи их од микроорганизама и ултраљубичстог зрачења. У ова једињења се убрајају флавоноиди (антоцијанидини, флавоноли, флаваноли, изофлавоноиди, флавони и флаванони) и фенолне киселине. За полифеноле је доказано да могу да остварују низ биолошких ефеката укључујући антиоксидативно, антикарциногено, антиинфламаторно и антимикробно деловање, а новија истраживања указују на могућност примене као природних конзерванаса код производа од меса (Nowak и сар., 2016). Захваљујући овим особинама, употреба полифенола код производа од меса има двојаки значај. С једне стране они представљају значајан функционални додатак са циљем да се производ обогати састојцима који могу повољно да делују на здравље конзумента, а с друге стране да продуже одрживост и квалитет самог производа (Ribas-Agustí и сар., 2014). Низ научних студија описује позитивне ефекте полифенола код различитих обољења људи, као што су дијабетес (Pandey и Rizvi, 2014), остеопороза (Ђударић и сар., 2015), хипертензија (Hügel и

сар., 2016), деменција (Molino и сар., 2016), болести ока (Ху и сар., 2017), карцинома и др. (Costa и сар., 2017). Најзначајнији полифеноли пореклом из грозђа су антоцијанини, флаваноли, флавоноли и ресвератрол, при чему је потврђено да они поседују многа биолошки активна својства, као што су антиоксидативно, кардиопротективно, антикарциногено, антиинфламаторно и антимикуробно (Хиа и сар., 2010). Код ферментисаних кобасица је запажено да се садржај додатих полифенола битније не смањује током складиштења, што отвара могућност њихове употребе као функционалног додатка код ове групе производа од меса (Ribas-Augusti и сар., 2014). Конзервишући ефекат полифенола код ферментисаних кобасица огледа се пре свега у антимикуробном (Chaves-Lopez и сар., 2015) и антиоксидативном деловању (Zhang и сар., 2017). Антиоксидативно деловање полифенола заснива се на неколико различитих механизма, односно они делују као ловци на слободне радикале, хелатори јона метала, инхибитори липооксигеназе и као редуцијско средство (Рарис и сар., 2017). Kurt и сар. (2016) су испитивали утицај додатка праха од семенки грозђа као извора полифенола код Суцука, традиционалне ферментисане кобасице, при чему су запазили да ове кобасице имају мањи садржај влаге и TBARS вредност, као и мањи број бактерија млечне киселине и укупан број бактерија од кобасице уобичајеног састава. Међутим, неки екстракти биљака који садрже полифеноле (екстракт семена грозђа) могу неповољно да утичу на сензорска својства ферментисаних кобасица, нарочито на изглед и арому (Ribas-Augusti и сар., 2014).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Циљ истраживања је да се испита могућност употребе полифенола као природног конзерванса и функционалног додатка код ферментисаних кобасица. С обзиром на антиоксидатвно и антимикуробно деловање полифенола, може се очекивати да њихова употреба у производњи ферментисаних кобасица доведе до смањеног обима оксидације аминокиселина и масних киселина, те самим тим мањег садржаја непожељних једињења која настају у току зрења и складиштења, као и постизање дуже одрживости производа. Пошто би производ био обogaћен полифенолима који уједно поседују и функционална својства у смислу позитивног деловања на здравље људи, овакве ферментисане кобасице би поседовале и особине функционалне хране.

У складу са наведеним циљевима, постављени су следећи задаци:

1. Испитати физичко хемијске параметре експерименталних ферментисаних кобасица:
 - рН-вредност
 - активност воде (a_w -вредност)
2. Испитати хемијски састав експерименталних ферментисаних кобасица, укључујући:
 - садржај воде,
 - садржај масти,
 - садржај протеина меса,
 - садржај хидроксипролина и на основу њега израчунати удео колагена у протеинима меса,
 - садржај пепела,
 - садржај хлорида (кухињске соли),
 - садржај нитрита,
 - садржај нитрата.
3. Испитати хидролитичке и оксидативне промене на мастима код експерименталних ферментисаних кобасица:
 - садржај слободних масних киселина (киселински број)
 - пероксидни број,
 - ТБАРС вредност (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)
4. Испитати промене на протеинима (протеолиза) током зрења експерименталних ферментисаних кобасица:
 - Индекс протеолизе (IP – proteolysis index),
5. Извршити микробиолошка испитивања:
 - број бактерија млечне киселине,
 - број бактерија из рода *Enterococcus*,
 - број бактерија из фамилије *Micrococcaceae*,
 - број бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae*,
 - број бактерија из фамилије *Pseudomonadaceae*,
 - испитати присуство *Salmonella* spp.,
 - испитати присуство *Listeria monocytogenes*.
6. Испитати садржај биогених амина од значаја за безбедност и квалитет ферментисаних кобасица: кадаверин (CAD), путресцин (PUT), спермин (SPE), спермидин (SPD), хистамин (HIS), тирамин (TYR) и триптамин (TRY).
7. Испитати садржај полифенола (фенола, флавоноида и мономерних антоцијана) у екстракту експерименталних ферментисаних кобасица: гална киселина, лутеолин,

каемферол, катехин, епикатехин, кверцетин, изорхамнетин, каемферол-3-О-глц., изокверцетин/хиперозид, лутеолин-7-О-глц., ферулинска киселина, сиригинска киселина, нарингенин, протокатехуинска киселина, П-кумаринска киселина, ванилинска киселина.

8. Испитати боју експериманталних ферментисаних кобасица инструменталним методама, према CIE L*a*b* систему.

9. Испитати сензорска својства експерименталних ферментисаних кобасица квантитативном дескриптивном анализом: боју, изглед пресека, конзистенција, мирис и укус.

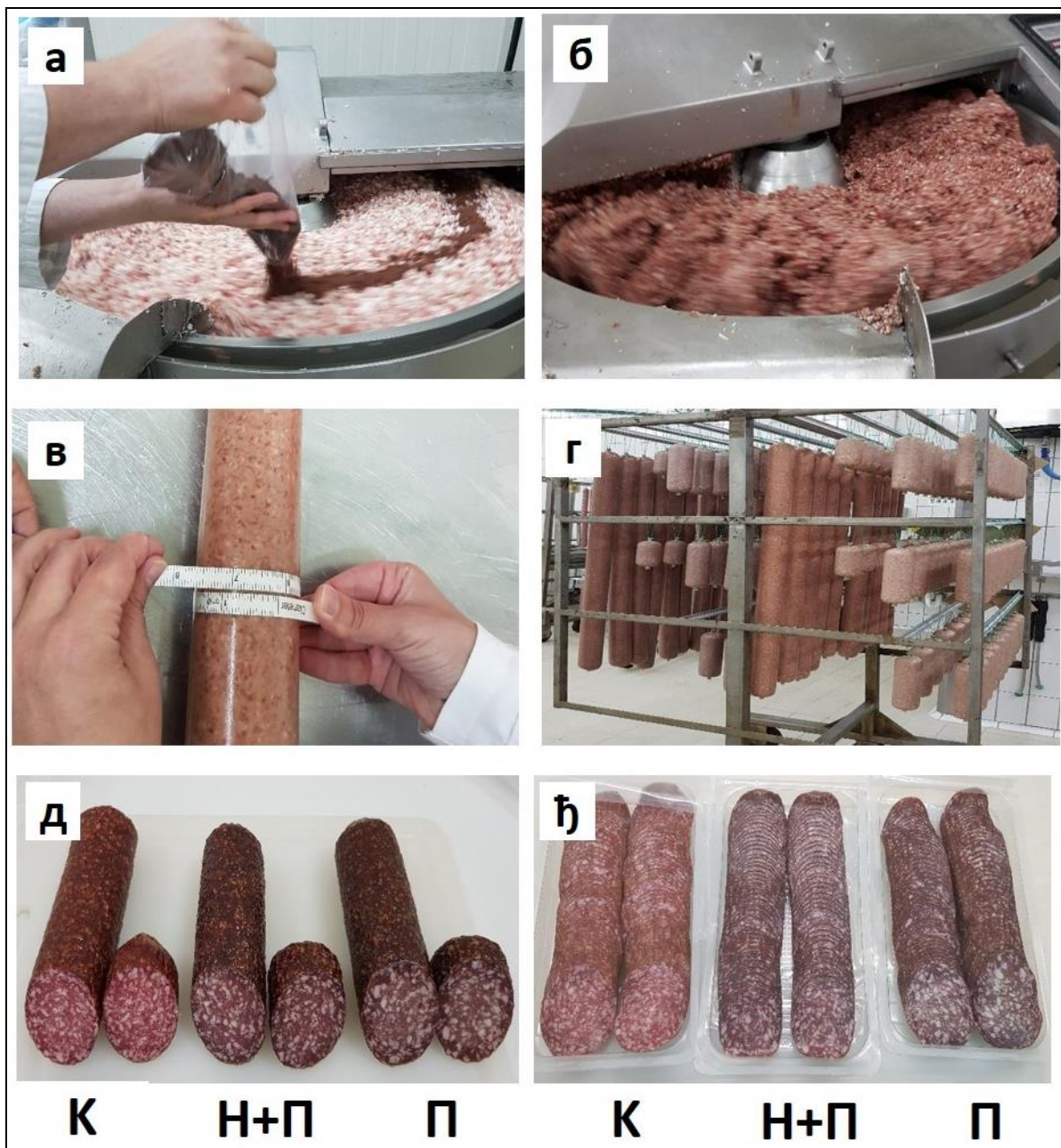
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

У циљу испитивања утицаја додатка полифенола на квалитет, безбедност и одрживост ферментисаних кобасица, произведене су три групе производа, од којих је прва била кобасица уобичајеног састава (контрола) код које је као конзерванс додата нитритна со за саламурење, друга група кобасица је била уобичајеног састава (садржала је нитритну со за саламурење) са додатком полифенола, а трећа је произведена без додатка нитрита код којих су као природни конзерванс додати полифеноли. Кобасице су биле следећег састава:

1. **Контрола (К):** 35% говеђе месо I категорије, 35% свињско месо I категорије, 27 % чврсто масно ткиво, 2,2 % нитритна со за саламурење, 0,2 % шећер, 0,2 % зачинска смеша, starter култура.
2. **Кобасица са нитритима и полифенолима (Н+П):** 35% говеђе месо I категорије, 35% свињско месо I категорије, 27 % чврсто масно ткиво, 2,2 % нитритна со за саламурење, 0,17 % препарат полифенола (семенке и кожице грожђа у праху) (слика 1 а), 0,2 % шећер, 0,2 % зачинска смеша. starter култура .
3. **Кобасица са полифенолима без нитрита (П):** 35% говеђе месо I категорије, 35% свињско месо I категорије, 27 % чврсто масно ткиво, 2,2 % кухињска со, 0,17 % препарат полифенола (семенке и кожице грожђа у праху) (слика 1 б), 0,2 % шећер, 0,2 % зачинска смеша. starter култура.

Надев кобасица је пуњен у колагенске омотаче дијаметра 55mm (слика 1 в), и подвргнут процесима димљења, сушења и зрења (слика 1 г), при следећим условима: темперирање (цеђење) при собној температури 12 сати; ферментација - 2 дана при температури од 26 °С и релативној влажности ваздуха (РВВ) 90%; димљење - повремено у току 3 дана при 22 до 24 °С; сушење и зрење при 15 °С и РВВ која се постепено смањује са 90% на 75 % током 35 дана. Након завршетка зрења, производи су складиштени на два начина: као целе кобасице, складиштене при 15°С (слика 1 д), и као наресци кобасица паковани у атмосфери заштитних гасова (30% CO₂) при температури до +7 °С (слика 1 ђ).



Слика 1. Производња експерименталних ферментисаних кобасица

а.) додавање препарата полифенола; б.) надев за кобасице са полифенолима;

в.) дијаметар кобасица; г.) кобасице припремљене за димљење и сушење;

д.) кобасице након завршене производње; ђ.) наресци кобасица.

К = контрола – кобасице уобичајеног састава која садржи нитрите

Н+П = кобасице са нитритима и полифенолима

П = кобасице са полифенолима без нитрита

4.2. Методе испитивања

Из сваке експерименталне групе узимано је по шест насумично одабраних кобасица, а испитивања су рађена у дупликату. Испитивања су спроведена у току производње (надев и готов производ) као и у току складиштења, при чему су узроци узимани 0. дана (почетак складиштења) и 30., 70., 100., 130., 190., 220., 250. и 280. –ог дана.

4.2.1. Физичко хемијски параметри

- рН-вредност је одређивана помоћу рН-метра *Testo 205* (Testo AG, Lenzkirch, Germany) у складу са стандардном методом SRPS ISO 2917:2004.
- активност воде (a_w -вредност) је одређивана помоћу a_w -метра (FAst/1, GBX Scientific Instruments, Cédex, France) у складу са стандардном методом ISO 21807:2004E.

4.2.2. Хемијски састав

Хемијски састав експерименталних ферментисаних кобасица испитан је на почетку (надев) и на крају производње. Садржаја воде је одређиван према стандардној методи SRPS ISO 1442:1998, садржај масти према стандардној методи SRPS ISO 1444:1998, садржај протеина према стандардној методи SRPS ISO 937:1992), садржај хидроксипролина према стандардној методи SRPS ISO 3496:2002, након чега је добијена вредност помножена са фактором 8 чиме је добијен садржај колагена, а потом је израчунат удео колагена у протеинима мяса према формули: $sadržaj\ kolagena / sadržaj\ protein\ mesa \times 100\%$; садржај пепела је одређен према стандардној методи SRPS ISO 936:1999, садржај хлорида према модификованом поступку по Волхарду у складу са стандардном методом SRPS ISO 1841-1:199, садржај нитрата према методи SRPS ISO 3091:1999, и садржај нитрита према методи SRPS ISO 2918:1999.

4.2.3. Хидролитичке и оксидативне промене на мастима

Хидролитичке и оксидативне промене на мастима праћене су током производње и складиштења, а испитиване су помоћу следећих метода:

- садржај слободних масних киселина (киселински број) стандардном методом SRPS EN ISO 660:2015,
- пероксидни број је испитиван стандардном методом SRPS EN ISO 3960:2011,
- ТБАРС вредност (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) је одређивана комбинованом методом по Tarladgis-у и сар. (1964) и Holland-у (1971).

4.2.4. Степен протеолитике

Степен протеолитике током зрења експерименталних ферментисаних кобасица праћен је одређивањем индекса протеолитике методом по Careri и сар., (1993) која се изводи на следећи начин:

- Индекс протеолитике (IP – proteolysisi index) представља количник садржаја непротеинског (NPN – non protein nitrogen) и укупног азота (N - nitrogen) помножен са 100. NPN се одређује тако што се 10g кобасице хомогенизује са 20 ml 10% (w/v) трихлорсирћетне киселине, потом се хомогенат оставља да одстоји 2 h при температури +4°C, након чега се профилирају, и 10 ml добијеног филтрата испита методом по Кјелдалу SRPS ISO 937:1992. Садржај укупног азота се одређује из узорка кобасице методом по Кјелдалу SRPS ISO 937:1992.

4.2.5. Микробиолошка испитивања

Микробиолошка испитивања су рађена у току производње (0 - надев, 7., 14., 21. и 28. дана) и током складиштења (0., 30., 70., 100., 130., 190., 220., 250., и 280. дана), а укључивала су одређивање броја, односно испитивање присуства следећих микроорганизама:

- број бактерија млечне киселине на MRS агару, при 32°C/72h, анаеробно,
- број бактерија из рода *Enterococcus* на Kanamycin–Esculin–Azide–агару, 37°C/24–48h, аеробно,
- број бактерија из фамилије *Micrococcaceae* на Manitol salt агару, при 37°C/24h,
- број бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* стандардном методом SRPS ISO 21528-2:2009,
- број бактерија из фамилије *Pseudomonadaceae* на Pseudomonas агару 30°C /48h, аеробно,

- присуство *Salmonella* spp. помоћу стандардне хоризонталне методе за детекцију *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002),
- присуство *Listeria monocytogenes* помоћу хоризонталне метода за детекцију и бројање *Listeria monocytogenes* – Део 1: Метода детекције (ISO 11290-1:1996).

Резултати микробиолошких испитивања приказани су као log cfu/g узорка.

4.2.6. Садржај биогених амина

Садржај биогених амина у експерименталним ферментисаним кобасицама испитан је техником течне хроматографије купловане са масеном спектрометријом (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry: LC-MS/MS). Одређивани су следећи биогени амини: кадаверин (CAD), путресцин (PUT), спермин (SPE), спермидин (SPD), хистамин (HIS), тирамин (TYR) и триптамин (TRY).

Метода за одређивање биогених амина је модификована метода приказана у раду Sagratini и сар. (2012). Све хемикалије коришћене при извођењу методе биле су п.а. (pro analysi) чистоће. Сви растварачи су били HPLC (High-performance liquid chromatography) чистоће. Стандарди биогених амина су набављени од компаније Sigma-Aldrich.

Поступак: на техничкој ваги одмерено је 1 g претходно хомогенизованог узорка са тачношћу од $\pm 0,01$ g у полипропиленску кивету за центрифугу од 50 ml. Узорци су преливени са 10 ml 6% воденог раствора трихлорсирћетне киселине и смеша је хомогенизована на ултратураксу 1 min на 6000 o/min. Кивете су затим центрифугиране 5 min на 4000 o/min. Пастеровом пипетом је пажљиво узето око 5 ml супернатанта и пренето у шприц са најлонским филтером пречника пора 0,45 μ m. Супернатант је профилтриран у кивете од 15 ml и сваком узорку је додат 25% амонијак до постизања рН вредности од 11 (између 160 и 200 ml).

На вакуум манифолд постављене су SPE колонице Phenomenex Strata H, 200 mg, 3 ml. Колонице су кондициониране са по 3 ml метанола и 3 ml воде. Аутоматском пипетом је на колонице наливено 2 ml узорка. Вакуум је подешен тако да пролазак узорка буде 1 кап у секунди. Након проласка екстракта узорка, колонице су испиране са по 3 ml 5% воденог раствора метанола. Затим је примењен снажан вакуум да се колонице потпуно осуше, постављене су чисте кивете од 15 ml и елуирање биогених амина је изведено са 3 ml 0,1% сирћетне киселине у метанолу. Елуат је упарен до сува у благој струји азота на 45°C, суви остатак је реконституисан у 1 ml 0,1M хлороводоничне киселине и пренет у виале за HPLC.

Одређивање масених концентрација биогених амина изведено је на течном хроматографу ултра-високих перформанси (UPLC) Shimadzu (Кјото, Јапан) LC-30AD са аутосамплером SIL-30AC и грејачем колоне CTO-20AC. Масени спектрометар Shimadzu LCMS8040 је куплован са наведеним системом. Раздвајање биогених амина је изведено на колони MERCK (Дармштат, Немачка) Purospher Star, 100x2,1mm, 1,6 μ m уз употребу мобилне фазе која се састојала од 10 mM амонијум ацетата (А) и 0,1% мравље киселине у ацетонитрилу (Б). Проток је био 0,4 ml/min а раздвајање биогених амина је изведено по следећем градијенту: 0 min – 20% В; 4,0 min – 80%В; 4,01 min - 20%В. Укупно време анализе је било 5,5 min. Ињектовано је 5 μ l узорка. Свака партија узорака састојала се од калибрационих узорака, слепе пробе и испитиваних узорака.

Јонизација је изведена у ESI+ јонском извору, температуре термо-блока и десолвационе линије су биле 400°C и 250°C респективно. Проток азота у небулајзеру био је 3 l/min а гаса за сушење 15 l/min. Масени спектрометар је радио у MRM начину рада, праћена је једна транзиција молекулског јона за свако једињење и то:

CAD – 101,3>86,1; PUT 89,1>72,1; SPE – 203>112; SPD 146,1>112,1; HIS – 112>95,1; TYR – 137,9>121,1; TRY – 161>144,1

Калибрација инструмента изведена је пре анализирања сваке серије узорка у 5 тачака укључујући и нулу, и то у концентрационом опсегу 1-10 mg/kg. Калибрациони узорци су (због матрикс-ефеката) били узорци сировог меса са додатком 20% масног ткива (псеудо-слепе пробе) обogaћени биогеним аминима тако да њихове финалне концентрације одговарају обogaћењу од 1, 2, 5 и 10 mg/kg.

Метода је валидована према захтевима АОАС водича за валидацију аналитичких метода. За сва једињења, принос (recovery) је износио од 92% до 106%, поновљивост у условима репродукцибилности (CV) од 7% до 12% а линеарност (коэффициент детерминације, R²) од 0,997 до 0,999.

Лимит квантификације методе је: кадаверин (CAD) – 0,2 mg/kg, путресцин (PUT)– 0,2 mg/kg, спермин (SPE)– 0,8 mg/kg, спермидин (SPD)– 0,6 mg/kg, хистамин (HIS)– 0,5 mg/kg, тирамин (TYR)– 0,9 mg/kg, триптамин (TRY)– 0,3 mg/kg.

4.2.7. Садржај полифенола

Садржај полифенола (фенола, флавоноида и мономерних антоцијана) у екстракту експериманталних ферментисаних кобасица укључио је испитивање следећих једињења: гална киселина, лутеолин, каемферол, катехин, епикатехин, кверцетин, изорхамнетин, каемферол-3-О-глц., изокверцетин/хиперозид, лутеолин-7-О-глц., ферулинска киселина, синрингинска киселина, нарингенин, протокатехуинска киселина, П-кумаринска киселина, ванилинска киселина.

Метода одређивања садржаја полифенола је базирана на методи коју описује Balzan и сар. (2017). У ферментисаним кобасицама је укључивала два корака: екстракцију фенолних састојака и HPLC–MS–MS анализу.

Екстракција фенолних састојака је изведена на следећи начин: 30 g узорка кобасице је хомогенизовано са 120 mL метанола и воде (80/20, v/v) која садржи 20mg/L бутилованог хидрокситолуена (BHT). Овај систем је хомогенизован помоћу диспензера (T18 Digital Ultra-Turrax, IKA®-Werke GmbH & Co, Germany) у току 1min при 6,000 rpm, центрифугиран при 4,000 rpm у току 10 min и супернатант је издвојен. Поступак је поновљен два пута, а сакупљен екстракт је концентрован у евапоратору (Heildolph, Germany) до добијања 50mL, који су коришћени за екстракцију фенола помоћу solid-phase extraction (SPE) методе. ODS-C18 SPE картриџ (AccuBOND II ODS-C18, Agilent Technologies, 500mg) који је претходно активиран са 10mL метанола 10mL воде је допуњен добијеним воденим екстрактом. Елуат фенолних састојака је изведен са 10mL метанола. Након уклањања растварача под вакуумом, фенолни састојци су растворени у 1mL метанола и пропуштени кроз 0.2-µm-pore-size RC филтер (Merck KGaA, Germany). Екстракт је подвргнут HPLC-MS/MS анализи.

HPLC–MS–MS анализа је изведена на следећи начин: 15 радних стандарда у опсегу од 1.53 ng/mL до 25,0·10³ ng/mL, припремљени су у серијама 1:1 раствора мешавине стандарда са мешавином дестиловане воде и метанола (1:1). Припремљени екстракти и стандарди су анализирани помоћу течног хроматографа високе перформансе Agilent Technologies 1200 Series high-performance liquid chromatograph заједно са Agilent Technologies 6410A Triple Quad tandem масеним спектрометром са елетроспреј јонским извором, и управљан помоћу Agilent Technologies Mass Hunter Workstation софтвера – Data Acquisition (ver. B.03.01). Пет микролитара је инјектовано у систем и састојци су раздвајани на Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm × 4.6 mm, 1.8 µm) колони брзе резолуције при 50°C. Мобилна фаза која се састојала од 0.05% воденог раствора мравље киселина (A) и метанола (B) је додавана при протоку од 1 mL/min на градијент моду (0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, време

ре-еквилибрације 3 min). Елуиране компоненте су детектоване помоћу MS, коришћењем параметарајонског извора при следећим параметрима: притисак гаса (N₂) у небулајзеру 50 psi, сушење при протоку гаса (N₂) 10 L/min и температури 350°C, напона капиларе 4 kV, негативни поларитет. Подаци који су добијени у динамичком в моду, коришћењем оптимизованих специфичних параметара (време задржавања, јони прекурсори, напон фрагмента и колизиони напон) дат је у табели 1. За све састојке, пикови су детерминисани коришћењем Agilent Mass Hunter Workstation Software – Qualitative Analysis (ver. B.03.01). Калибрационе криве су добијене и концентрације узорака израчунате помоћу Microsoft Excel софтвера.

Табела 1. Оптимизовани SRM параметри

	Састојак	Mw	t _R [min]	V _f	m/z прекурсор	m/z продукт	V _{col}
1.	катехин	290	0.74	150	289	245	10
2.	протокатехуинска киселина	154	0.79	105	153	109	9
3.	епикатехин	290	0.95	150	289	245	10
4.	ванилинска киселина	168	1.24	100	167	108	15
5.	П-коумаринска киселина	164	1.69	90	163	119	9
6.	ферулинска киселина	194	1.9	90	193	134	11
7.	лутеолин 7-О-глукозид	448	2.13	230	447	285	30
8.	хиперозид	464	2.16	200	463	300	30
9.	каемферол3-О-глукозид	448	2.8	190	447	284	30
10.	кверцетин	302	3.74	130	301	151	15
11.	лутеолин	286	4.03	135	285	133	25
12.	каемпферол	286	4.55	130	285	285	0
13.	изорхамнетин	316	4.79	160	315	300	21
14.	изокверцетин	464	2.25	210	463	300	21
15.	гална киселина	170	0.58	90	169	125	10
16.	сирингинска киселина	198	1.31	90	197	182	7
17.	нарингенин	272	3.87	130	271	151	16

4.2.8.Инструментално мерење боје

Боја експерименталних ферментисаних кобасица испитана је инструменталним методама, према CIE L*a*b* систему (L* – светлоћа, a* – интензитет црвене боје, b* – интензитет жуте боје), помоћу апарата Minolta Co. Ltd. Chromameter CR-400, према следећим параметрима: извор светлости D65, систем осветљења 45/0, поље 8D/8, угао мерења 2°. Мерење је

извршено на пресеку кобасица, у три понављања по једном узорку, а као вредност мерења је узимана средња вредност израчуната из наведене три вредности.

4.2.9. Испитивање сензорских својстава

Сензорска својства експерименталних ферментисаних кобасица испитивана су квантитативном дескриптивном анализом, у складу са стандардима ISO 8586-2:2008 и ISO 6564:1985 при чему су оцењивани следећи параметри: боја, изглед пресека, конзистенција, мирис и укус. Наведени параметри су оцењивани према петобалном бод систему од 5 (одличан) до 1 (неприхватљив). Кобасице са оценама 2,0 и већим за свако испитивано својство сматране су прихватљивим.

4.2.10. Статистичка анализа

У првом делу статистичке анализе добијених резултата изведеног експеримента приказани су дескриптивни статистички показатељи. Ови показатељи су омогућили описивање добијених експерименталних резултата и њихово тумачење. Даља статистичка анализа одвијала се у зависности да ли су анализирани подаци нормално дистрибуирани или не. Тестирање на нормалност изведено помоћу Колмогоров-Смирнов (*Kolmogorov-Smirnov*) теста. У случају нормалне дистрибуције података за поређење сигнификантних разлика између експерименталних група употребљавана је једнофакторска анализа варијансе (*One way analysis of variances*). У случају када подаци нису нормално дистрибуирани употребљавана је Крускал - Валисова анализа варијансе (*Kruskal-Wallis Analysis of Variance on Ranks*). У случајевима када су установљене статистички сигнификантне разлике између група, парови група су поређени између себе на основу параметарског *Tukey multiple comparison* теста, односно не-параметријског *Dunn's Multiple Comparison* теста. Статистички значајном разликом сматран је ниво $p < 0,05$. Статистичка анализа изведеног експеримента је урађена помоћу *Statistical analysis GraphPad Prism* софтвера 5.00, *GraphPad Software, San Diego, California USA*, www.graphpad.com и *MS Excel*-у.

5. РЕЗУЛТАТИ

У овом поглављу биће приказани резултати испитивања хемијског састава, физичко хемијских параметара, биохемијских промена на протеинима и мастима, микробиолошких промена, инструменталних параметара боје и сензорских својстава, садржаја биогених амина и садржаја полифенола у експерименталним ферментисаним кобасицама.

5.1. Хемијски састав

Резултати испитивања хемијског састава експерименталних кобасица приказани су у табели 2. На крају производње је садржај воде (29,4 – 33,0 %), масти (40,0 – 42,3 %) и протеина меса (21,6 – 23,2 %), као и удео колагена у протеинима меса (5,9 – 7,7 %) био веома приближан код свих експерименталних група. Статистички значајне разлике су утврђене у садржају нитрита и нитрата. Кобасице са полифенолима без нитрита (П) садржале су у надеву нитрите у траговима (0,3 mg/kg), што је значајно ниже од контролне (К) кобасице (54,8 mg/kg, $p < 0,0001$) и кобасице са нитритима и полифенолима (Н+П) које су садржале 52,2 mg/kg нитрита ($p < 0,0001$). Нитрати су били присутни у надеву П кобасица у количини од 8,7 mg/kg, док је код К и Н+П кобасица садржај нитрата износио 38,2 односно 34,4 mg/kg. У готовим производима, садржај нитрита и нитрата се смањило у поређењу са садржајем у надеву, тако да су П кобасице садржале 0,2 mg/kg нитрита и 0,3 mg/kg нитрата. Није било значајне разлике ($p = 0,63$) у погледу садржаја нитрита између К (11,4 mg/kg) и Н+П кобасица (12,1 mg/kg), али су Н+П кобасице садржале скоро двоструко више нитрата (22,02 mg/kg) него К кобасице (13,78 mg/kg) ($p < 0,0001$).

Табела 2. Хемијски састав надева и кобасица на крају производње ($\bar{X} \pm SD$)

Параметар	Надев			Готов производ		
	К	Н+П	П	К	Н+П	П
Влага (%)	54,3 ± 0,7	54,5 ± 0,4	53,6 ± 0,3	33,0 ± 0,3	30,3 ± 0,3	29,4 ± 0,2
Масти (%)	26,1 ± 0,2	26,3 ± 0,3	26,7 ± 0,3	40,4 ± 0,3	42,1 ± 0,2	42,3 ± 0,3
Протеини (%)	15,7 ± 0,3	15,6 ± 0,2	15,6 ± 0,2	22,2 ± 0,2	23,2 ± 0,2	21,6 ± 0,3
Кол / прот* (%)	7,3 ± 0,4	7,9 ± 0,5	8,5 ± 0,2	5,9 ± 0,1	6,4 ± 0,1	7,7 ± 0,1
Со (%)	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,5 ± 0,02	3,6 ± 0,03	3,6 ± 0,03
Пепео (%)	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1	4,5 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1
Нитрити (mg/kg)	54,8 ± 1,5 ^a	52,2 ± 1,3 ^a	0,3 ± 0,03 ^b	11,4 ± 2,4 ^a	12,1 ± 4,7 ^a	0,2 ± 0,1 ^b
Нитрати (mg/kg)	38,2 ± 4,7 ^a	34,4 ± 1,5 ^a	8,7 ± 0,5 ^b	13,78 ± 1,6 ^a	22,02 ± 3,3 ^b	0,3 ± 0,2 ^c

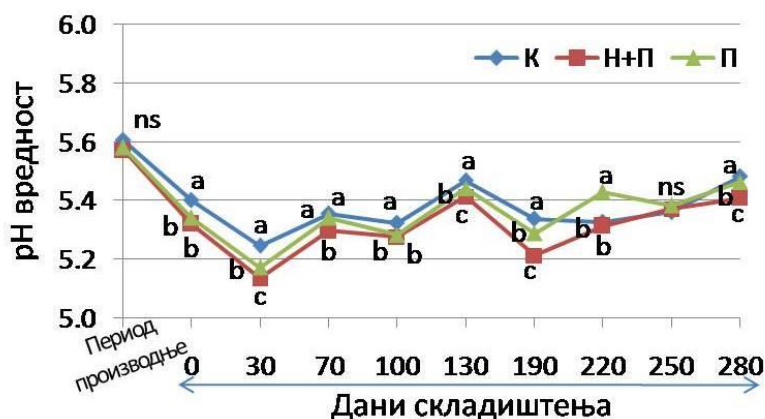
a,b,c = различита слова показују статистички значајну разлику ($p < 0,05$) за одређене параметре у надеву и у готовом производу између експерименталних група

* удео колагена у протеинима меса

5.2. Физичко хемијски параметри

Промена рН вредности експерименталних кобасица у току производње и складиштења целих кобасица приказани су на графикону 1, а код нарезака на графикону 2.

Вредност рН је у току производње опала са $5,61 \pm 0,01$ колико је измерено у надеву свих кобасица, на $5,31 \pm 0,01$ (Н+П и П кобасице) односно $5,40 \pm 0,01$ код контроле. У току складиштења целих кобасица (графикон 1.), рН-вредност се постепено повећавала код свих кобасица, али је била статистички значајно мања ($p =$ од 0,017 до 0,0001) код кобасица које су садржале полифеноле у поређењу са контролном групом, тако да је после 280 дана најнижа била код Н+П кобасица ($5,41 \pm 0,01$), нешто већа код П кобасица ($5,45 \pm 0,01$) и највећа код контролне групе ($5,48 \pm 0,01$).

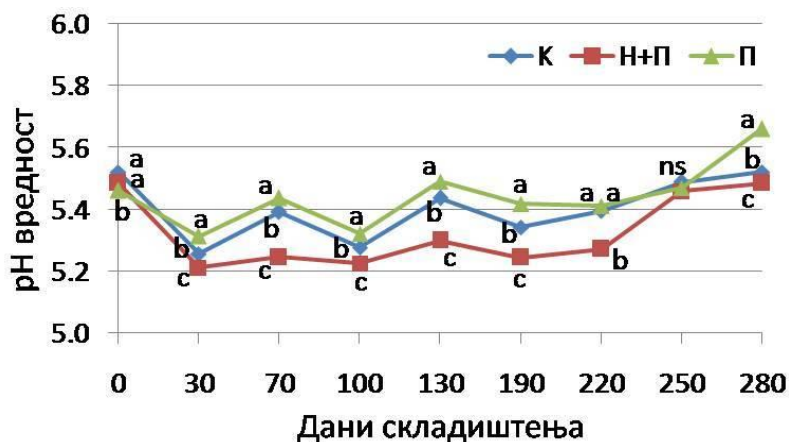


Графикон 1. Промена рН вредности код целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Код нарезака кобасица (графикон 2.), током целог периода складиштења рН вредност Н+П кобасица (од $5,21 \pm 0,01$ до $5,48 \pm 0,02$) била је значајно мања ($p =$ од 0,01 до 0,0001) од контролне групе (од $5,26 \pm 0,01$ до $5,52 \pm 0,02$). Насупрот томе, код П кобасица је утврђена већа рН вредност од контролних и износила је од $5,31 \pm 0,01$ до $5,66 \pm 0,01$ ($p =$ од 0,02 до 0,0001).

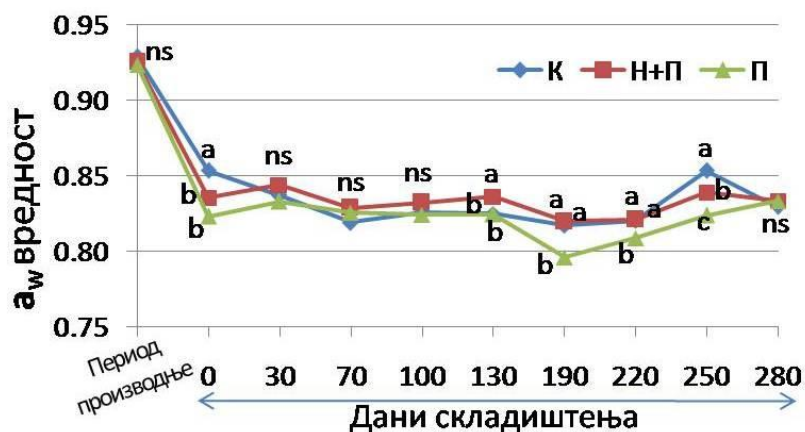


Графикон 2. Промена рН вредности код нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

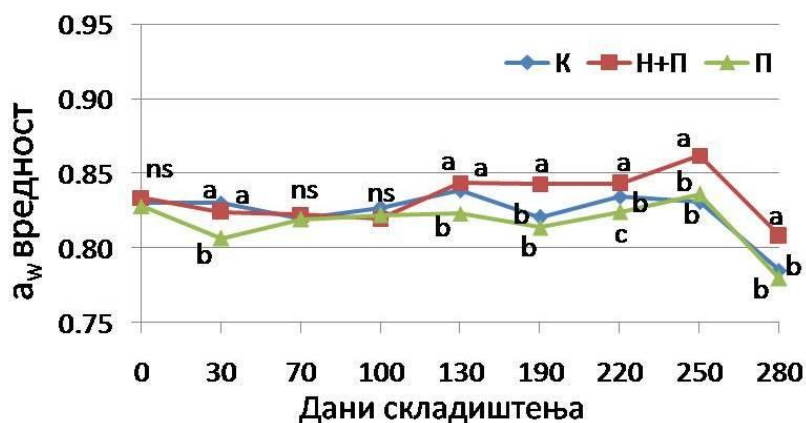
За време производње која је трајала 35 дана, активност воде је опала са $0,93 \pm 0,01$ у надеву до вредности које су биле у опсегу од $0,82 \pm 0,01$ код П кобасица и $0,83 \pm 0,01$ код Н+П кобасица, до $0,85 \pm 0,02$ код контролне групе и остала битније не промењена у току складиштења (графикон 3.). Интензивнији пад a_w вредности запажен је код обе групе кобасица које су садржале полифеноле (Н+П и П кобасице) при чему су најниже вредности утврђене код П кобасица после 190 дана складиштења ($0,79 \pm 0,004$), што је било статистички значајно ниже од К и Н+П кобасица ($p < 0,0001$) али после 280 дана није било разлике ($p =$ од $0,48$ до $0,93$) између експерименталних група ($a_w = 0,83 \pm 0,001$).



Графикон 3. Промена a_w вредности код целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

Код нарезака кобасица (графикон 4.), није било разлика у активности воде до 130. дана, од када је била већа код Н+П кобасица ($0,84 \pm 0,002$) у поређењу осталим експерименталним групама (К= $0,83 \pm 0,003$ и П= $0,82 \pm 0,003$), при чему је достигла максимум 250. дана ($0,86 \pm 0,002$) што је било значајно веће од К ($0,83 \pm 0,005$; $p < 0,0001$) и П кобасица ($0,84 \pm 0,004$; $p < 0,0001$).



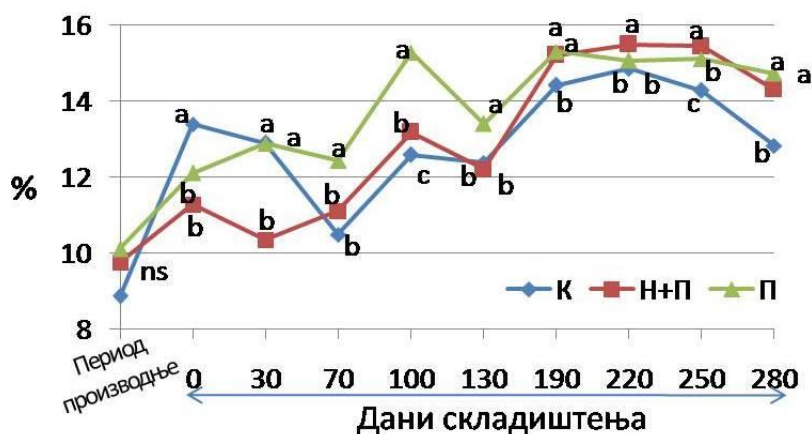
Графикон 4. Промена a_w вредности код нарезака феерментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

5.3. Биохемијске промене на протеинима и мастима

Биохемијске промене на протеинима су праћене одређивањем индекса протеолизе, који представља однос непротеинског и протеинског азота и изражава се у процентима.

Индекс протеолизе се повећао са 8,87 - 10,11 % у надеву до 12,83 – 14,73 % после 280 дана сакладиштења целих кобасица (графикон 5.). После 30 дана производње, највећи индекс протеолизе је утврђен код контролних кобасица ($13,4 \pm 1,0$ %) што је значајно више ($p < 0,0001$) у поређењу са П ($12,1 \pm 0,7$ %) и Н+П ($12,1 \pm 0,7$ %) кобасицама. Међутим, за време складиштења, већи индекс протеолизе у поређењу са контролном групом утврђен је код обе групе кобасица обogaћених полифенолима, при чему су максималне вредности измерене после 100 дана ($15,28 \pm 0,1$ %) код П кобасица и после 220 дана ($15,49 \pm 0,2$ %) код Н+П кобасица, када је код К производа РИ вредност била значајно мања и износила $12,59 \pm 0,05$ ($p < 0,0001$), односно $14,42 \pm 0,87$ ($p < 0,0001$).

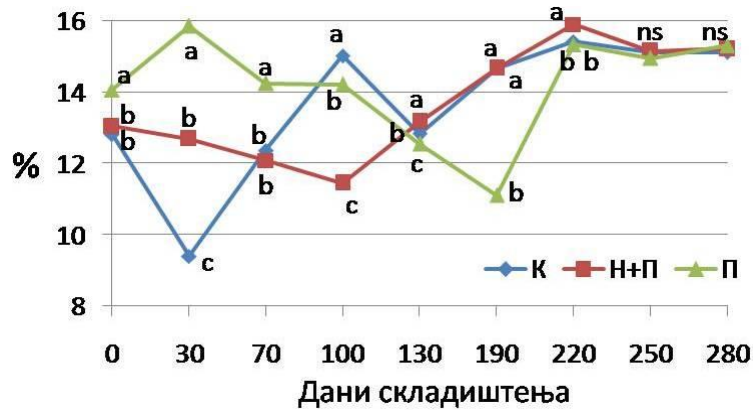


Графикон 5. Промена индекса протеолизе код целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

У току складиштења нарезака (графикон 6.), веће вредности индекса протеолизе утврђене су 30. дана код кобасица са полифенолима ($H+P=15,84 \pm 0,2$ %; $P=12,68 \pm 0,3$) у поређењу са контролном групом ($K=9,4 \pm 0,2$; $p < 0,0001$). После 280 дана складиштења, индекс протеолизе је био приближан код свих експерименталних група и износио је од $15,11 \pm 0,3$ % код контролне групе до $15,29 \pm 0,5$ % код П кобасица ($p=0,74$).



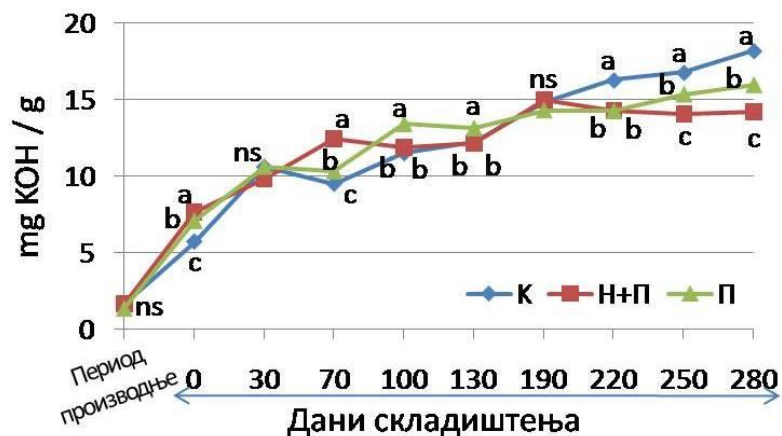
Графикон 6. Промена индекса протеолизе код нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Резултати испитивања параметара оксидације липида укључивали су одређивање киселинског броја, пероксидног броја и TBARS вредности.

Након производње (графикон 7.), у поређењу са контролном групом ($5.7 \pm 0,07$ mg KOH/g) киселински број је био већи ($p < 0,0001$) код кобасица које су биле обогаћене полифенолима ($7,1 \pm 0,04$ mg KOH/g код П кобасица и $7,6 \pm 0,03$ mg KOH/g код H+П кобасица), и такав тренд остаје не промењен до 190 дана складиштења. После тог периода, значајно веће вредности киселинског броја ($p < 0,0001$) утврђене су код контролне групе достижући $18,2 \pm 0,2$ mg KOH/g после 280 дана, док је код обе групе кобасица обогаћених полифенолима износила од $14,2 \pm 0,3$ (H+П) до $15,9 \pm 0,1$ mg KOH/g (П).

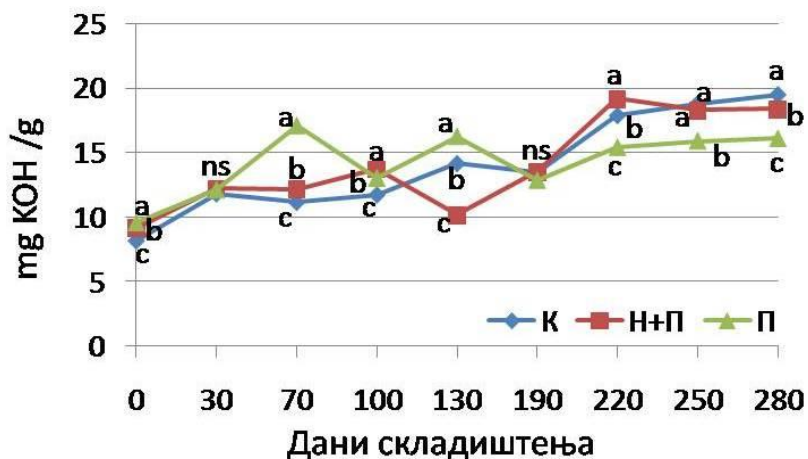


Графикон 7. Промена киселинског броја код целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

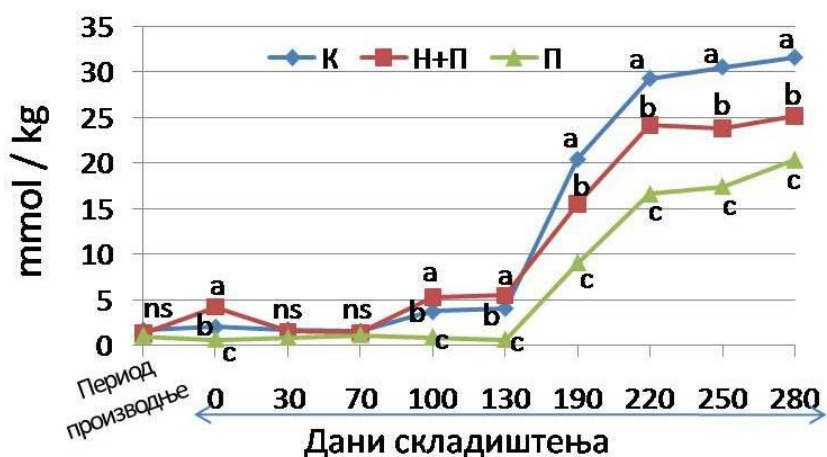
У току складиштења нарезака (графикон 8.), код кобасица са полифенолима без нитрита (П) утврђен је значајно већи ($p < 0,0001$) киселински број 70. и 130. дана ($17,1 \pm 0,3$ mg KOH/g и $16,2 \pm 0,1$ mg KOH/g, појединачно) него код контролних ($6,1 \pm 0,1$ mg KOH/g и $14,1 \pm 0,1$ mg KOH/g, појединачно) и Н+П кобасица ($12,2 \pm 0,4$ mg KOH/g и $10,1 \pm 0,1$ mg KOH/g, појединачно). Међутим, од 220. дана до краја складиштења П кобасице су имале значајно мањи ($p < 0,0001$) киселински број него К и Н+П производи, тако да је 280. дана ова вредност износила $16,1 \pm 0,3$ mg KOH/g (П кобасице), $18,3 \pm 0,2$ mg KOH/g (Н+П кобасице) и $19,5 \pm 0,2$ mg KOH/g (К кобасице).



Графикон 8. Промена киселинског броја код нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

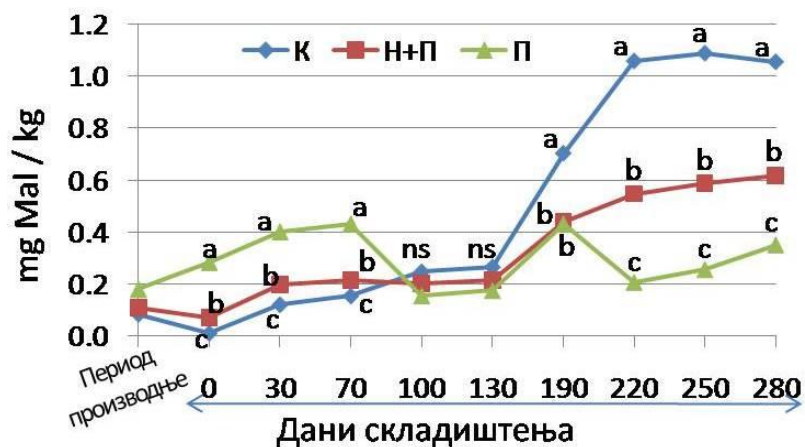


Графикон 9. Промена пероксидног броја код целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

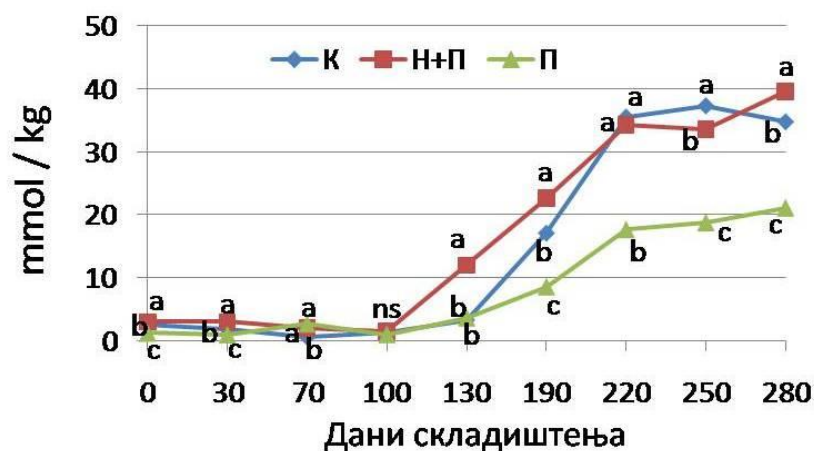
Код пероксидног броја и TBARS вредности утврђен је другачији тренд у првом (до 130. дана) и другом делу складиштења (од 130. до 280. дана). У првом периоду складиштења целих кобасица (графикон 9.), најнижи пероксидни број (од $0,68 \pm 0,03$ до $1,2 \pm 0,05$ mmol/kg) и највећа TBARS вредност (од $0,18 \pm 0,01$ до $0,43 \pm 0,01$ mg MAL/kg) (графикон 10.) утврђени су код П кобасица. Али, после 130. дана складиштења, обе групе кобасица које су биле обогаћене полифенолима имале су статистички значајно мањи пероксидни број (од $9,1 \pm 0,2$ до $20,4 \pm 0,1$ mmol/kg код П кобасица и од $15,5 \pm 0,2$ до $25,1 \pm 0,2$ mmol/kg код Н+П кобасица) и TBARS вредност (од $0,21 \pm 0,01$ до $0,43 \pm 0,03$ mg MAL/kg код П кобасица и од $0,44 \pm 0,01$ до $0,62 \pm 0,02$ mg MAL/kg код Н+П кобасица) него контролне кобасице (од $20,4 \pm 0,3$ до $31,5 \pm 0,1$ mmol/kg и $0,70 \pm 0,01$ до $1,06 \pm 0,02$ mg MAL/kg). У овом периоду, П кобасице су имале у исто време и статистички значајно мањи ($p < 0,0001$) пероксидни број и TBARS вредност него Н+П кобасице.



Графикон 10. Промена TBARS вредности код целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

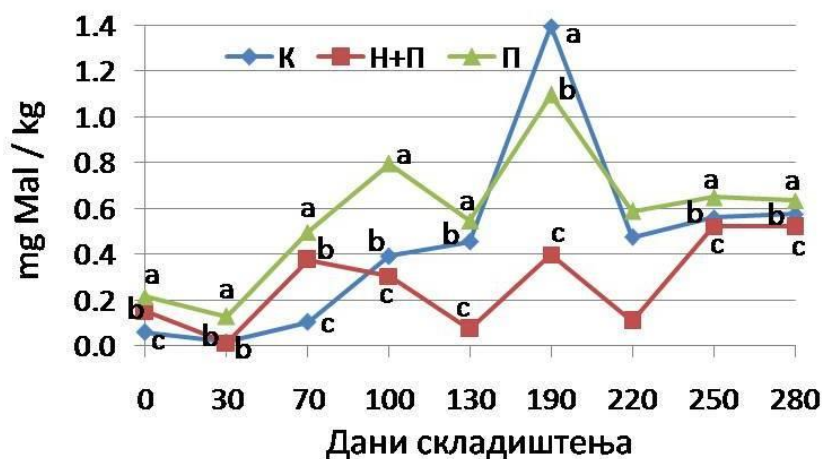
ns= разлика није статистички значајна



Графикон 11. Промена пероксидног броја код нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна



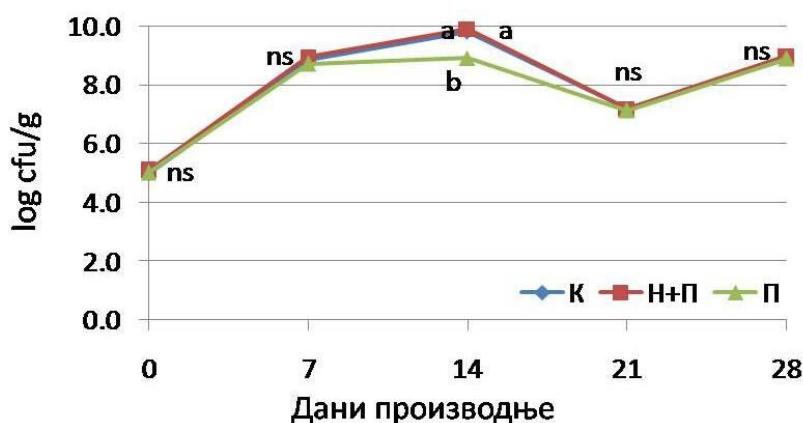
Графикон 12. Промена TBARS вредности код нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

У току складиштења нарезака кобасица (графикони 11. и 12.), током целокупног периода складиштења најнижи пероксидни број (од $0,91 \pm 0,04$ на почетку складиштења до $21,0 \pm 0,4$ mmol/kg 280. дана) и највећа TBARS вредност (од $0,21 \pm 0,01$ на почетку складиштења до $0,64 \pm 0,02$ mg MAL/kg 280. дана) утврђени су код П кобасица. Кобасице са нитритима и полифенолима (Н+П) су на крају складиштења имале највећи пероксидни број ($39,6 \pm 0,4$ mmol/kg) али најмању TBARS вредност $0,52 \pm 0,01$ mg MAL/kg). Код контролне групе кобасица је 190. дана складиштења утврђена највећа TBARS вредност ($1,40 \pm 0,02$ mg MAL/kg), али је до 280. дана ова вредност опала на $0,58 \pm 0,02$ mg MAL/kg, што је било значајно мање од вредности код П кобасица ($p < 0,0001$), а веће од вредности код Н+П кобасица ($p < 0,0001$).

5.4. Микробиолошке промене

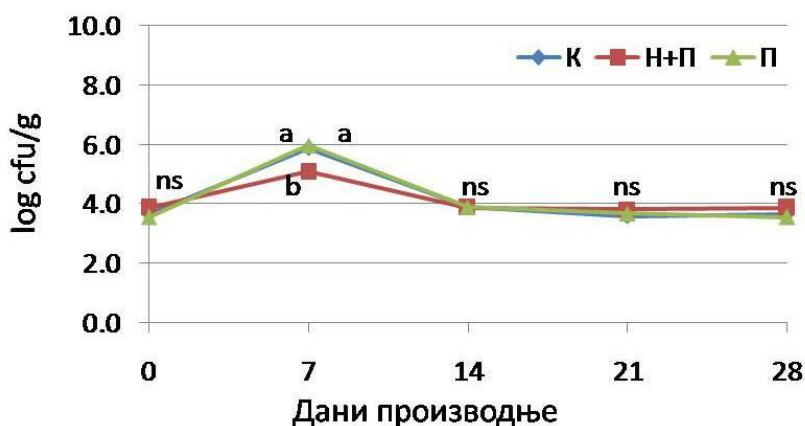


Графикон 13. Промена броја бактерија млечне киселине (БМК) у току производње ферментисаних кобасица

a,b = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Резултати испитивања микрофлоре у току производње експерименталних ферментисаних кобасица показују да су најдоминантније биле бактерије млечне киселине (БМК) (графикон 13.), чији се број повећао са $5,0 \pm 0,01$ до $5,1 \pm 0,07$ log cfu/g колико је утврђено у надеву свих кобасица, на $8,9 \pm 0,01$ log cfu/g код П кобасица, односно на $9,8 \pm 0,07$ и $9,9 \pm 0,12$ log cfu/g код контролних и Н+П кобасица појединачно, након 14 дана производње. У току осталих дана производње није било разлика у броју БМК између експерименталних група (p = од 0,08 до 0,98).

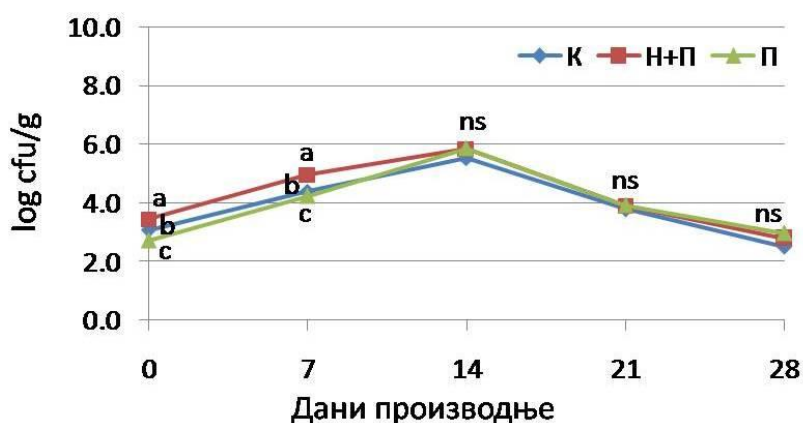


Графикон 14. Промена броја *Micrococcaceae* у току производње ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Број бактерија из фамилије *Micrococcaceae* (графикон 14.) био је приближан код свих експерименталних група (од $3,5 \pm 0,4$ log cfu/g код П кобасица до $3,9 \pm 0,5$ log cfu/g код Н+П кобасица, $p=0,07$) и није се значајније мењао до краја производње, изузев 7. дана, када су Н+П кобасице садржале значајно мање ($p<0,0001$) ових бактерија ($5,1 \pm 0,4$ log cfu/g) него К и П кобасице ($5,9 \pm 0,1$ и $6,0 \pm 0,2$ log cfu/g, појединачно).

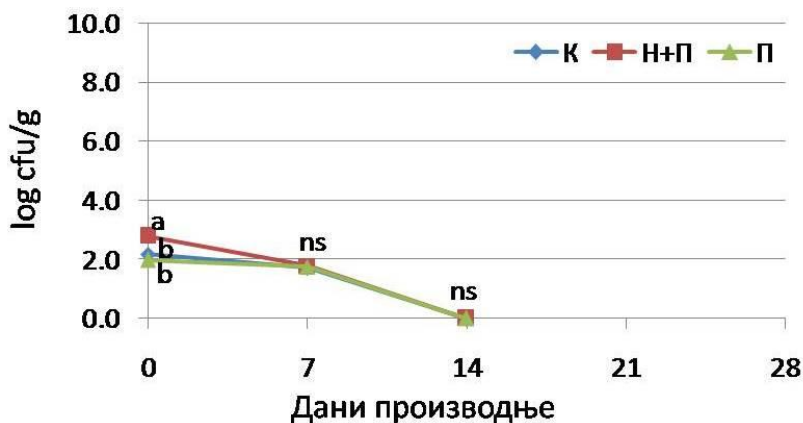


Графикон 15. Промена броја *Enterococcaceae* у току производње ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

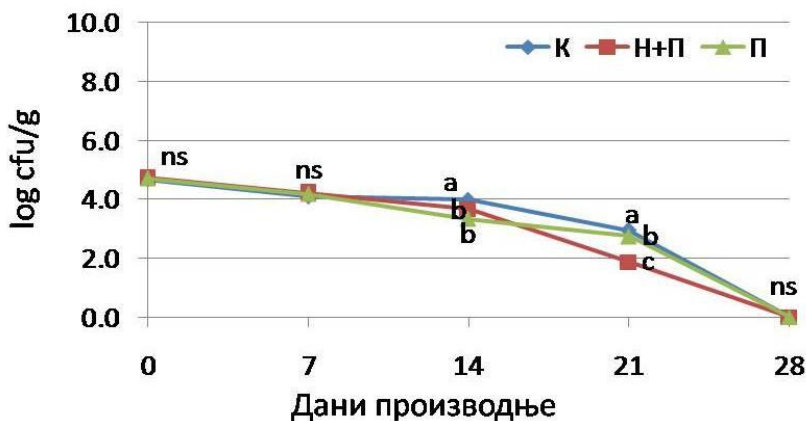
Број ентерокока (графикон 15.) је на почетку производње износио од $2,7 \pm 0,02 \log \text{ cfu/g}$ код П кобасица до $3,4 \pm 0,02 \log \text{ cfu/g}$ код Н+П кобасица ($p < 0,0001$), након чега се повећао до 14. дана када је износио од $5,5 \pm 0,01 \log \text{ cfu/g}$ код К кобасица до $5,8 \pm 0,3 \log \text{ cfu/g}$ код П кобасица, при чему разлика између ових вредности није била значајна ($p=0,09$), а потом опао на $2,5 \pm 0,04 \log \text{ cfu/g}$ код К кобасица до $2,9 \pm 0,02 \log \text{ cfu/g}$ код П кобасица ($p=0,07$) колико је утврђено 28. дана.



Графикон 16. Промена броја *Enterobacteriaceae* у току производње ферментисаних кобасица

a,b = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна



Графикон 17. Промена броја *Pseudomonadaceae* у току производње ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

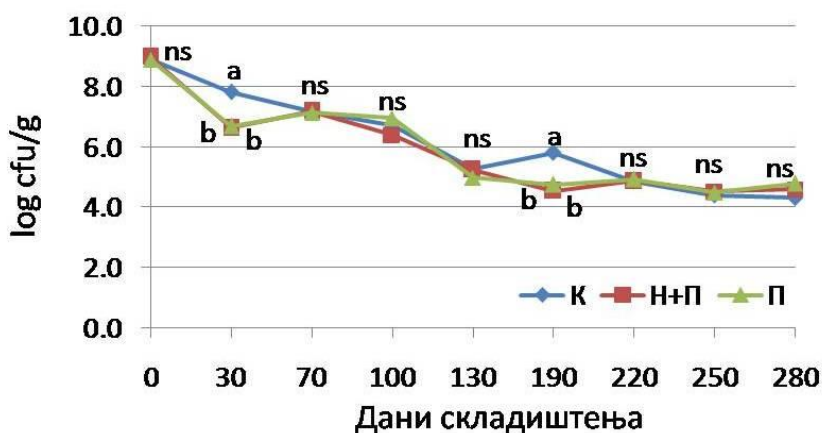
Enterobacteriaceae и *Pseudomonadaceae* (графикони 16. и 17.) које су биле присутне у надеву у броју од $2,0 \pm 0,07$ до $2,8 \pm 0,01 \log \text{ cfu/g}$ и од $2,9 \pm 0,03$ до $5,2 \pm 0,07 \log \text{ cfu/g}$ респективно, нису детектоване после 14., односно 28. дана производње. Код П и Н+П кобасица, значајно

мањи број бактерија из фамилије *Pseudomonadaceae* утврђен је 14. ($3,33 \pm 0,14$ и $3,68 \pm 0,03$ log cfu/g, појединачно) и 21. дана ($1,87 \pm 0,09$ и $2,75 \pm 0,04$ log cfu/g, појединачно) у поређењу са контролном групом ($3,98 \pm 0,01$ после 14 дана and $2,94 \pm 0,06$ log cfu/g после 21 дана).

Патогене бактерије *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* нису детектоване у току производње, ни у току складиштења.

У току складиштења, утврђено је присуство бактерија млечне киселине, микрокока и ентерокока, док узрочници квара (*Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*) нису изоловани.

У току складиштења целих кобасица, број бактерија млечне киселине (графикон 18.) је опао са $8,9 \pm 0,07$ log cfu/g (Н+П) до $9,00 \pm 0,1$ log cfu/g (К) на почетку складиштења, на $4,31 \pm 0,08$ log cfu/g (К) до $4,78 \pm 0,01$ log cfu/g (П) на крају складиштења. Број бактерија млечне киселине био је приближан код свих кобасица, са изузетком 30. дана ($6,62 \pm 0,09$ log cfu/g код Н+П и $6,69 \pm 0,2$ log cfu/g код П кобасица) и 190. дана ($4,52 \pm 0,2$ log cfu/g код Н+П кобасица и $4,74 \pm 0,06$ log cfu/g код П кобасица), када је број БМК био значајно мањи код кобасица које садрже полифеноле него код контролних кобасица ($7,81 \pm 0,07$ и $5,79 \pm 0,02$ log cfu/g, респективно, $p < 0,0001$).

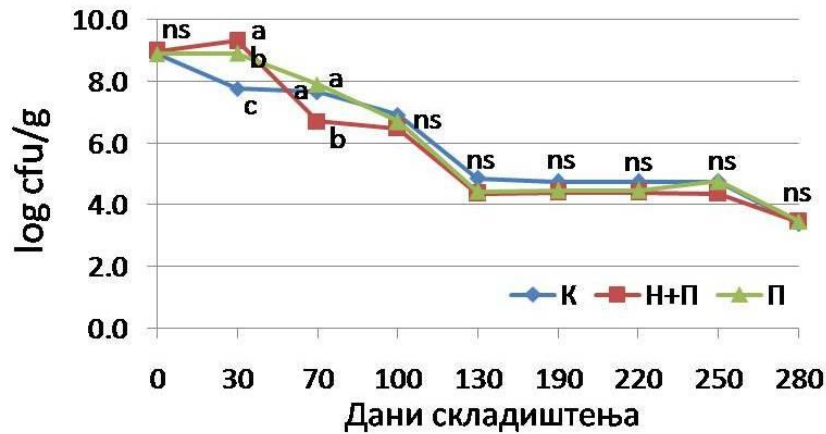


Графикон 18. Промена броја бактерија млечне киселине (БМК) у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($P < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Код нарезака кобасица (графикон19.) запажен је исти тренд, тако да је број бактерија млечне киселине опао са $6,69 \pm 0,01$ log cfu/g (Н+П) до $7,89 \pm 0,04$ log cfu/g (П) на почетку складиштења, на $3,39 \pm 0,1$ log cfu/g (К) до $3,45 \pm 0,07$ log cfu/g (П) на крају складиштења. Број бактерија млечне киселине је и код нарезака био приближан код свих кобасица, са изузетком 30. дана када је број БМК био значајно већи ($p < 0,0001$) код кобасица које садрже полифеноле ($9,30 \pm 0,04$ log cfu/g код Н+П и $8,85 \pm 0,02$ log cfu/g код П кобасица) него код контролних кобасица ($7,65 \pm 0,09$ log cfu/g), односно 70. дана када су Н+П кобасице ($6,47 \pm 0,06$ log cfu/g) садржале значајно мање ($p = 0,0013$) бактерија млечне киселине него контролна група ($7,92 \pm 0,02$ log cfu/g) и П кобасице ($7,69 \pm 0,3$ log cfu/g).

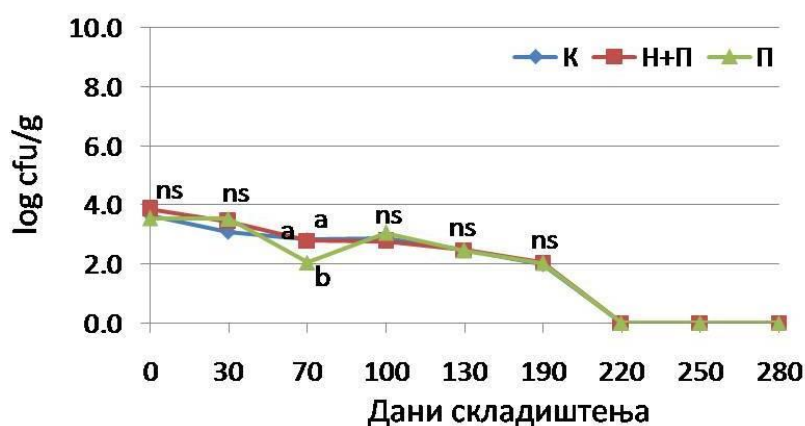


Графикон 19. Промена броја бактерија млечне киселине (БМК) у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

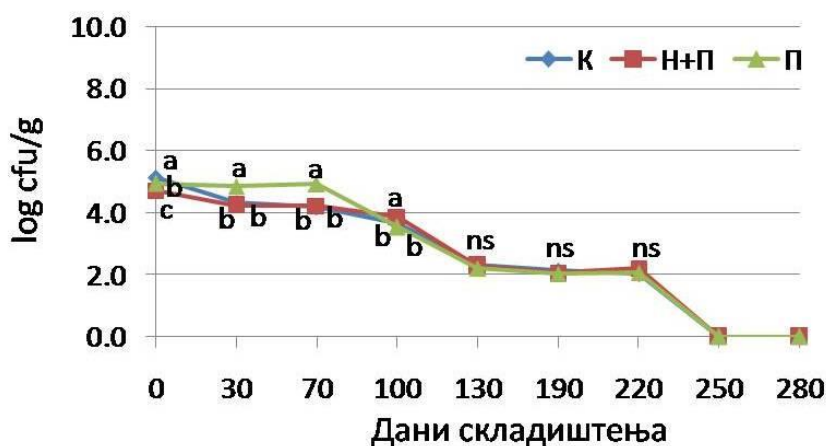
Број бактерија из фамилије *Micrococcaceae* опао је у току складиштења целих кобасица (графикон 20.) са $3,1 \pm 0,1$ log cfu/g код контролних до $3,5 \pm 0,1$ log cfu/g код П кобасица ($p=0,62$), на $1,9 \pm 0,1$ log cfu/g код контролних до $2,0 \pm 0,1$ log cfu/g код Н+П кобасица ($p=0,73$) после 130. дана и после тога ове бактерије нису биле детектоване до краја складиштења. Међутим, у току складиштења нарезака кобасица (графикон 21.), бактерије из фамилије *Micrococcaceae* су се одржале до 220. дана када је њихов број износио од $2,0 \pm 0,1$ log cfu/g код К кобасица до $2,6 \pm 0,2$ log cfu/g код Н+П кобасица ($p=0,88$).



Графикон 20. Промена броја *Micrococcaceae* у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

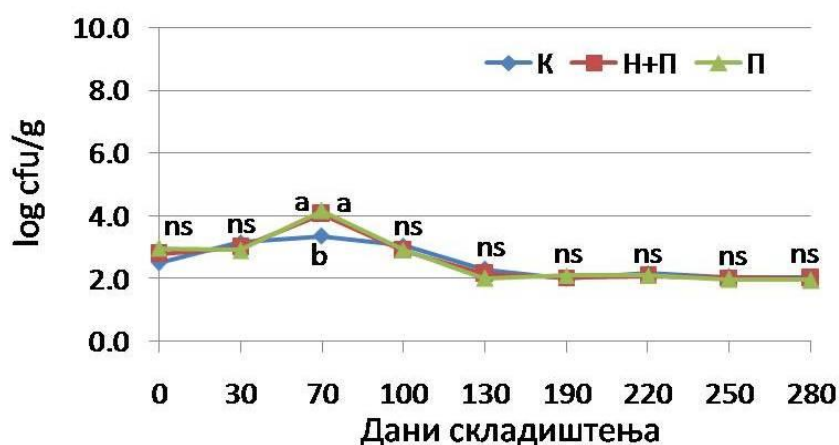


Графикон 21. Промена броја *Micrococcaceae* у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

У току складиштења целих кобасица, број бактерија из фамилије *Enterococcaceae* (графикон 22.) повећавао се до 70. дана када је био значајно већи ($p < 0,0001$) код обе групе кобасица са полифенолима ($4,17 \pm 0,1 \log \text{ cfu/g}$ код H+П и $4,06 \pm 0,07 \log \text{ cfu/g}$ код П кобасица) неко код контролне групе кобасица ($3,35 \pm 0,03 \log \text{ cfu/g}$). Потом се њихов број смањило тако да је након 280. дана износио од $1,98 \pm 0,08 \log \text{ cfu/g}$ код П кобасица до $2,05 \pm 0,08 \log \text{ cfu/g}$ код К кобасица, при чему разлика није била значајна ($p=0,39$).

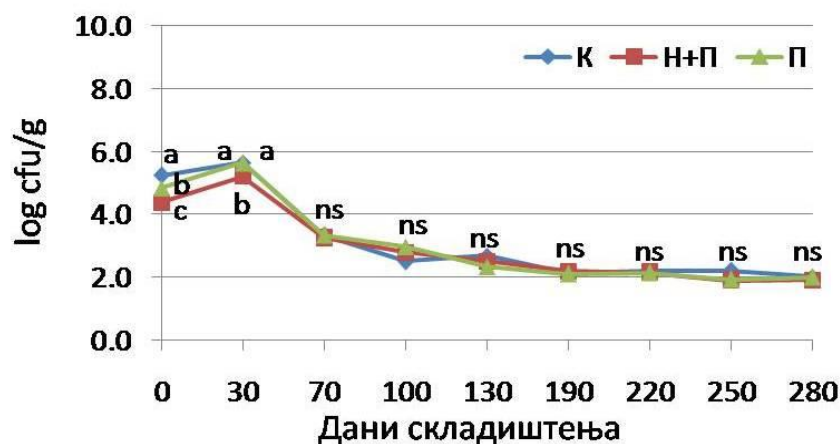


Графикон 22. Промена броја *Enterococcaceae* у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

У току складиштења нарезака кобасица, број бактерија из фамилије *Enterococcaceae* (графикон 23.) такође се повећавао, али само до 30. дана када је био значајно већи ($p < 0,0001$) код К и П кобасица ($5,64 \pm 0,02 \log \text{ cfu/g}$ и $5,63 \pm 0,02 \log \text{ cfu/g}$, појединачно) него код H+П кобасица ($5,20 \pm 0,03 \log \text{ cfu/g}$). Потом се њихов број смањило тако да је након 280. дана износио од $1,91 \pm 0,04 \log \text{ cfu/g}$ код H+П кобасица до $2,02 \pm 0,1 \log \text{ cfu/g}$ код К кобасица, при чему разлика није била значајна ($p=0,06$).



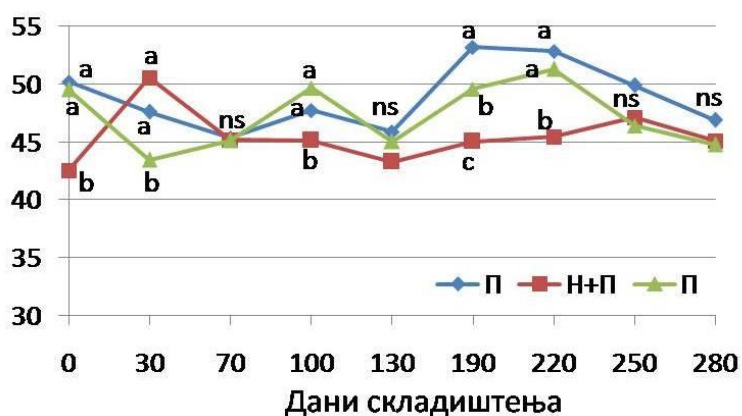
Графикон 23. Промена броја *Enterococcaceae* у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

5.5. Параметри боје и сензорска својства

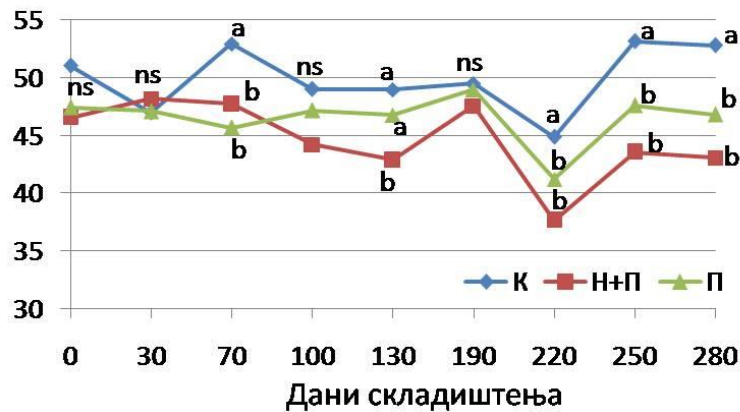
Резултати инструменталног мерења боје према CIE $L^*a^*b^*$ систему показали су да на почетку складиштења целих кобасица (графикон 24.) К и П производи имају сличну светлоћу ($L^* = 50,2 \pm 1,5$ и $49,5 \pm 2,7$ појединачно), док су Н+П кобасице значајно тамније ($L^* = 42,5 \pm 3,0$, $p=0,0048$ и $0,0085$ појединачно). На крају складиштења, светлоћа је била приближна код свих експерименталних група 250. (L^* вредност је износила од $46,4 \pm 0,9$ код Н+П кобасица до $49,9 \pm 1,9$ код К кобасица, $p=0,41$) и 280. дана (L^* вредност је износила од $44,7 \pm 0,5$ код Н+П кобасица до $46,9 \pm 1,6$ код К кобасица, $p=0,22$). Међутим, када је у питању складиштење нарезака кобасица (графикон 25.), на почетку складиштења није било значајне разлике у светлости између експерименталних група (од $43,1 \pm 2,9$ код Н+П кобасица до $52,8 \pm 2,6$ код К кобасица, $p=0,09$) али су на крају складиштења најсветлије биле К кобасице ($52,8 \pm 2,6$), значајно тамније биле су П кобасице ($46,8 \pm 2,0$; $p=0,009$ у односу на контролну групу), а најтамније Н+П кобасице ($43,1 \pm 1,9$; $p=0,0004$ у односу на контролну групу).



Графикон 24. Промена L^* вредности у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

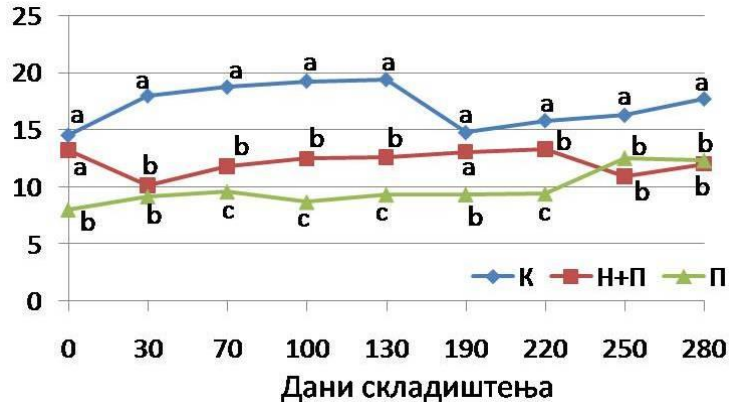


Графикон 25. Промена L* вредности у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

У погледу интензитета црвене боје (a^* вредност), на почетку складиштења целих кобасица (графикон 26.) значајно мањи интензитет црвене боје имале су П кобасице ($a^*=8,0 \pm 1,6$) у поређењу са К ($a^*=14,5 \pm 0,7$, $p=0,0005$) и Н+П кобасицама ($a^*=13,2 \pm 2,0$, $p=0,0026$). Међутим, од 30. дана па до краја складиштења, К кобасице су имале значајно већи ($p<0,0001$) интензитет црвене боје у поређењу са обе групе кобасица које садрже полифеноле, тако да је 280. дана a^* вредност код К кобасица износила $17,7 \pm 1,0$ док је код Н+П кобасица износила $12,0 \pm 0,3$ и код П кобасица $12,3 \pm 0,4$.

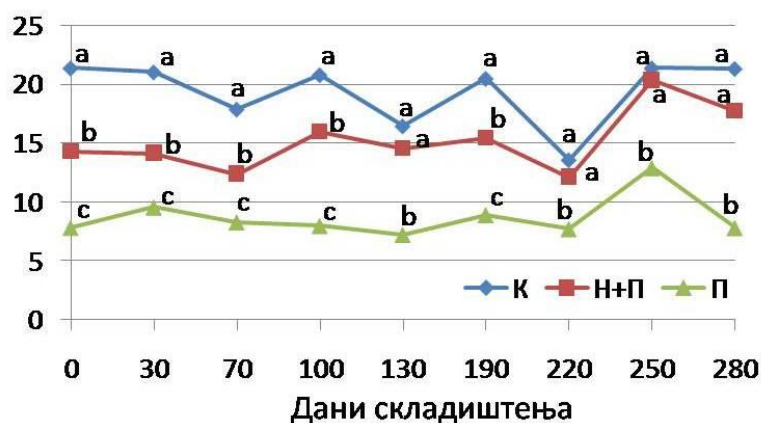


Графикон 26. Промена a^* вредности у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

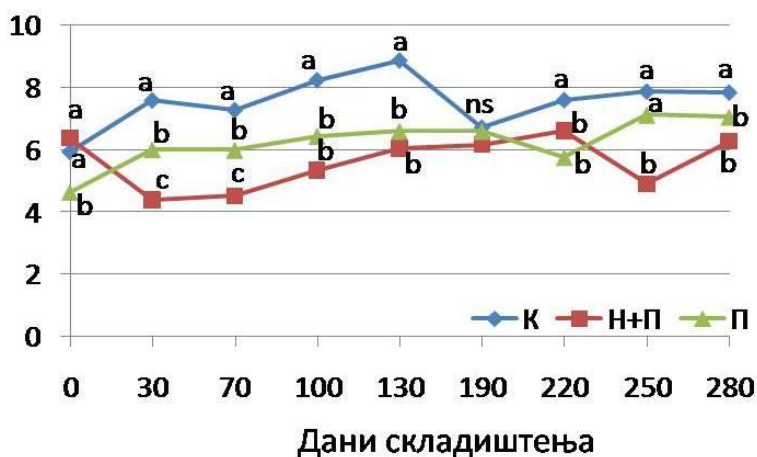
Код нарезака кобасица (графикон 27.), током целокупног периода складиштења највећу a^* вредност имале су К кобасице, код којих је 280. дана ова вредност износила $21,3 \pm 1,7$, нешто мања a^* вредност утврђена је код Н+П кобасица ($a^*=17,7 \pm 2,4$; $p=0,06$), а најмањи интензитет црвене боје имале су П кобасице ($a^*=7,8 \pm 1,5$), што је било значајно мање од Н+П ($p=0,0001$) и К кобасица ($p<0,0001$).



Графикон 27. Промена a* вредности у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

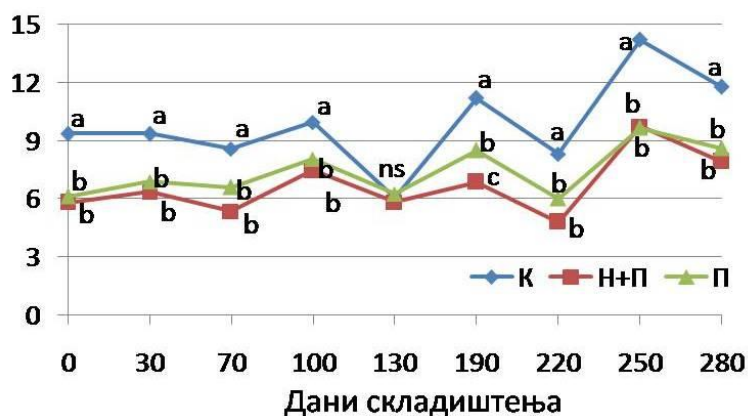
a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

Највећи интензитет жуте боје утврђен је код контролних производа, како у току складиштења целих кобасица, тако и у току складиштења нарезака. Након 280. дана складиштења целих кобасица (графикон 28.), b* вредност је код К производа износила $7,8 \pm 0,3$, а значајно мање вредности утврђене су код П ($7,0 \pm 0,4$; $p=0,04$) и Н+П кобасица ($6,3 \pm 0,3$, $p=0,0018$) међу којима није утврђена значајна разлика ($p=0,07$). На крају складиштења нарезака кобасица (графикон 29.), b* вредност код К кобасица износила је $11,7 \pm 1,2$, а значајно мање вредности имале су П ($8,6 \pm 0,4$; $p=0,004$) и Н+П кобасице ($7,9 \pm 1,2$; $p=0,001$) међу којима такође није утврђена значајна разлика ($p=0,62$).



Графикон 28. Промена b* вредности у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

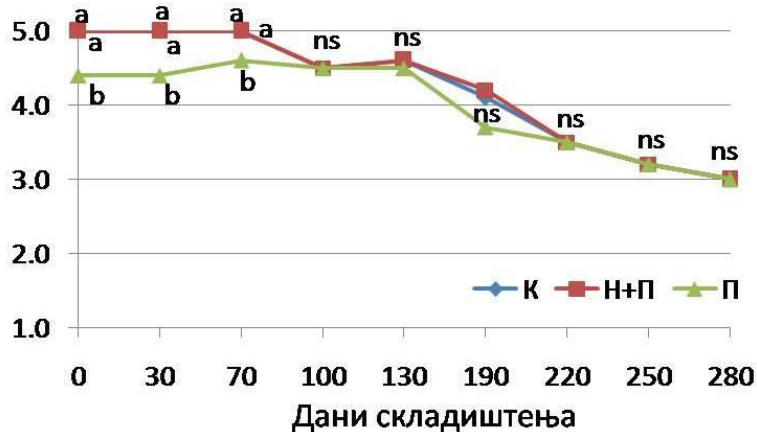


Графикон 29. Промена b^* вредности у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Резултати сензорског испитивања су показали да је у току складиштења целих кобасица (график 30) боја П кобасица била значајно слабије ($p=0,03$) оцењена током првих 30 дана ($4,4 \pm 0,5$) у поређењу са К и Н+П кобасицама ($5,0 \pm 0,0$), али у периоду од 70. до 130. дана боја П кобасица је боље оцењена ($4,5 \pm 0,3$ до $4,6 \pm 0,3$) него на почетку складиштења и није било разлике ($p=0,83$) у поређењу са К ($4,6 \pm 0,2$) и Н+П кобасицама ($4,6 \pm 0,2$). После 130. дана, код свих кобасица је боја постепено слабије оцењена тако да је 280. дана оцена износила 3,0 код свих кобасица.

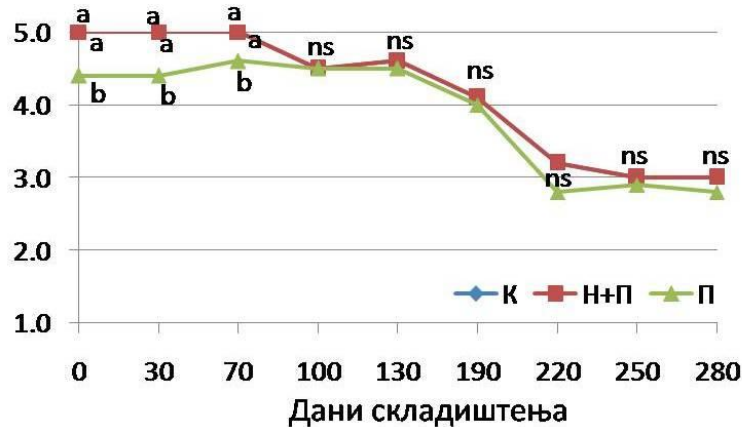


Графикон 30. Оцене за боју у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

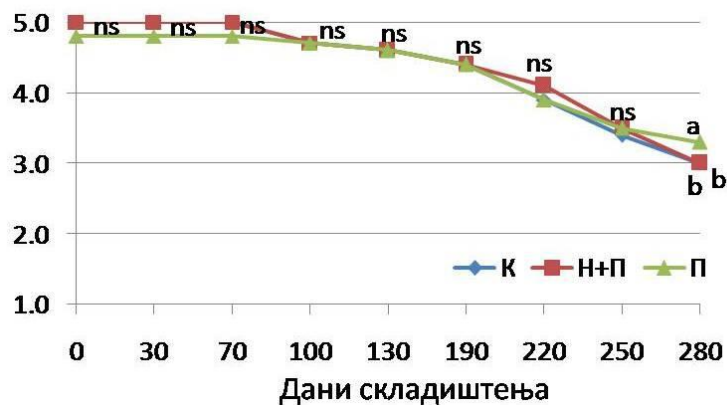
ns= разлика није статистички значајна

У току складиштења нарезака кобасица (графикон 31.), оцене за боју су биле сличне као у току складиштења целих кобасица. На почетку складиштења су такође најслабије оцењене П кобасице ($4,4 \pm 0,5$), међутим до 70. дана њихова боја је све боље оцењена ($4,6 \pm 0,3$), да би од 100. дана била исто оцењена код код К и Н+П кобасица ($4,5 \pm 0,3$; $p>0,99$).



Графикон 31. Оцене за боју у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

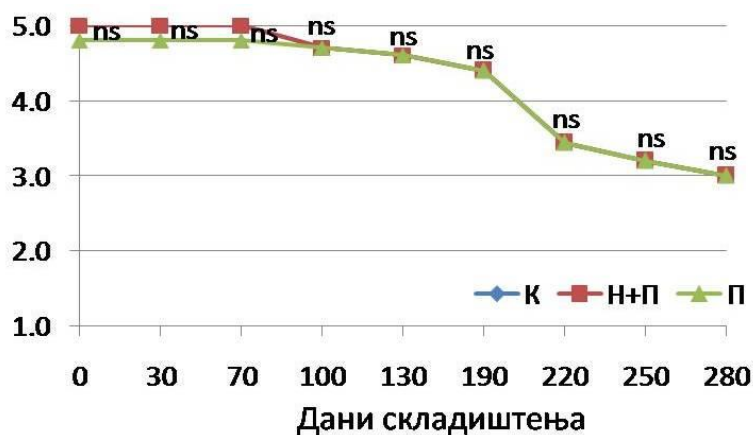
a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна



Графикон 32. Оцене за изглед пресека у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

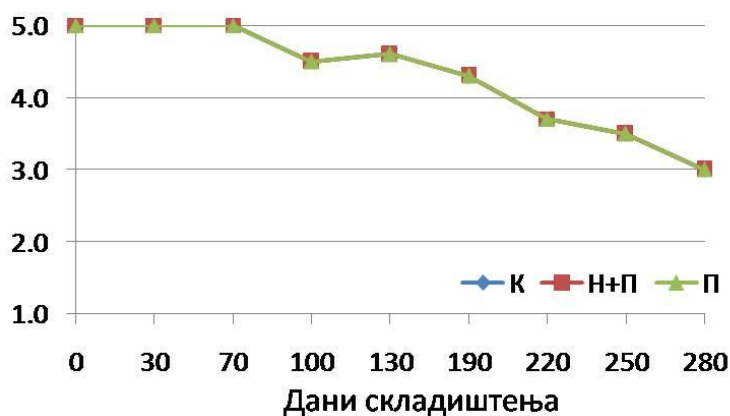
Изглед пресека је веома приближно оцењен код свих производа, како код целих, тако и код нарезака кобасица. У првих 70 дана складиштења и код целих кобасица (графикон 32.) и код нарезака (графикон 33.), изглед пресека П кобасица је био нешто слабије оцењен ($4,8 \pm 0,3$) од К и Н+П кобасица (5,0), при чему ова разлика није била значајна ($p=0,15$). Од 100. дана до краја складиштења оцене за изглед пресека се смањују тако да су на крају складиштења целих кобасица П кобасице оцењене просечном оценом $3,3 \pm 0,3$ а К и Н+П кобасице оценом $3,0 \pm 0,0$ ($p=0,03$), а код нарезака су сви производи оцењени истом просечном оценом $3,0 \pm 0,0$.



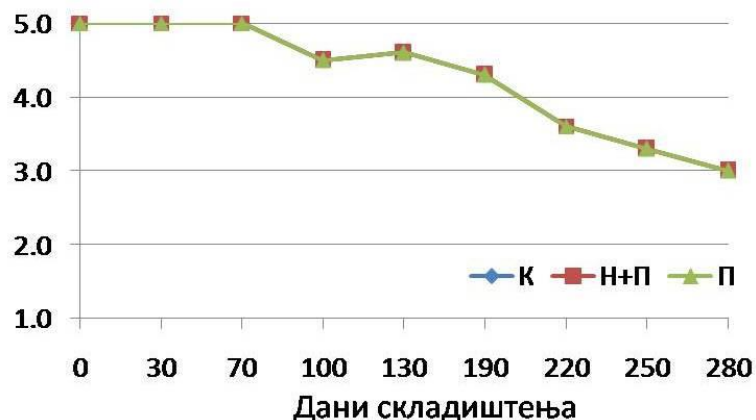
Графикон 33. Оцене за изглед пресека у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

У погледу конзистенције, све групе производа су идентично оцењене ($p > 0,99$) без обзира да ли се ради о складиштењу целих (графикон 34.) или нарезака кобасица (графикон 35.). До 70. дана складиштења, конзистенција свих производа је оцењена са 5,0, затим се оцене постепено смањују тако да 190. дана износе просечно $4,3 \pm 0,3$ а на крају складиштења износе 3,0 код свих група кобасица.

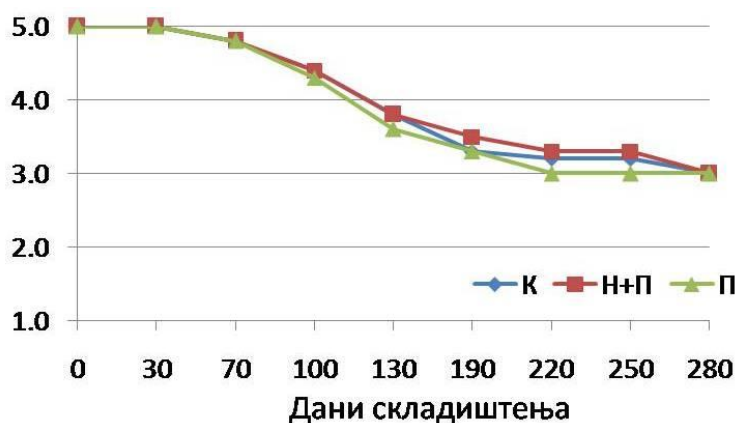


Графикон 34. Оцене за конзистенцију у току складиштења целих ферментисаних кобасица

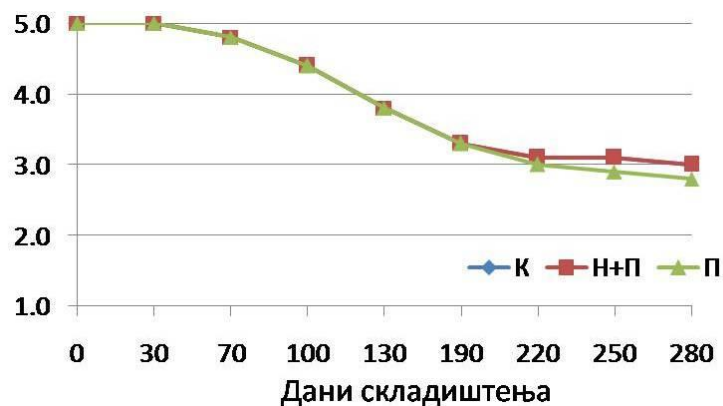


Графикон 35. Оцене за конзистенцију у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

Мирис свих група кобасица је до 30. дана оцењен просечном оценом 5,0 без обзира на начин складиштења (графикони 36. и 37.), након чега се постепено смањују да би 100. дана просечне оцене износиле од $4,3 \pm 0,6$ код П кобасица до $4,4 \pm 0,5$ код К и Н+П кобасица, при чему ова разлика није била статистички значајна ($p=0,95$). Мирис П кобасица је 220. и 250. дана био опет нешто лошије оцењен (3,0) него код К ($3,2 \pm 0,3$) и Н+П кобасица ($3,3 \pm 0,3$), али ова разлика није била статистички значајна ($p=0,4$ и $0,7$, појединачно). На крају складиштења целих кобасица, мирис свих кобасица био је оцењен истим просечним оценама (3,0), док је код нарезака П кобасица мирис био слабије оцењен у поређењу са К ($2,8 \pm 0,4$) и Н+П кобасицама (3,0) али и ова разлика није била значајна ($p=0,46$).

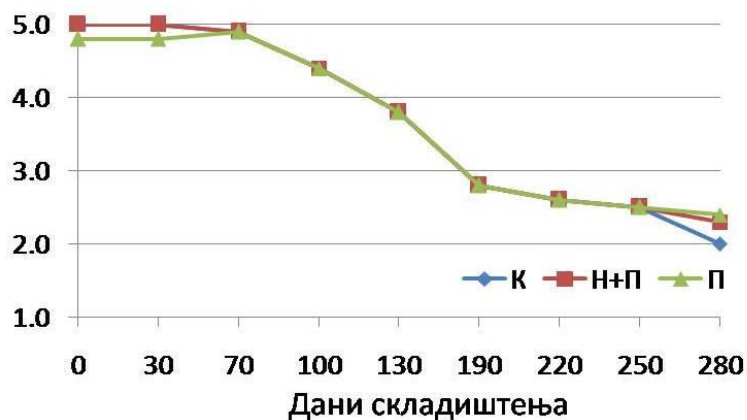


Графикон 36. Оцене за мирис у току складиштења целих ферментисаних кобасица

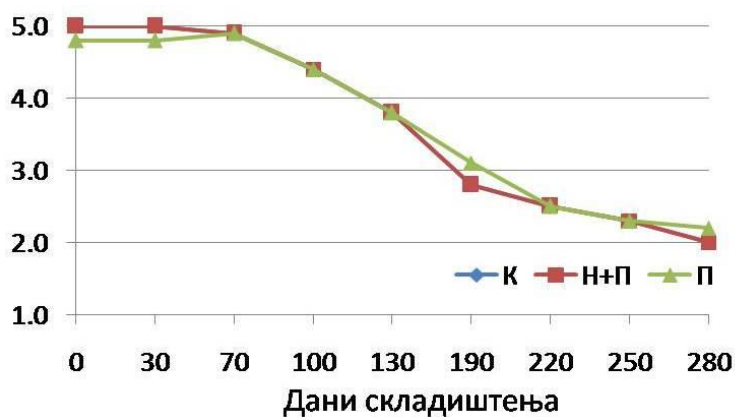


Графикон 37. Оцене за мирис у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

Укус П кобасица ($4,80 \pm 0,4$) је лошије оцењен у првих 30 дана у поређењу са К и Н+П кобасицама (5,0 код обе), без обзира на начин складиштења (графикони 38. и 39.) с тим да разлика није била значајна ($p=0,46$). Од 70. дана оцене се постепено смањују, а све кобасице су идентично оцењене. На крају складиштења целих кобасица најлошије је оцењен укус контролне кобасице (2,0) у поређењу са Н+П ($2,3 \pm 0,4$) и П ($2,4 \pm 0,4$) кобасицама, с тим да разлика није била значајна ($p=0,2$ и $0,4$, појединачно). На крају складиштења нарезака, укус П кобасица је нешто боље оцењен ($2,2 \pm 0,4$) него К и Н+П кобасице (2,0, $p=0,46$).



Графикон 38. Оцене за укус у току складиштења целих кобасица

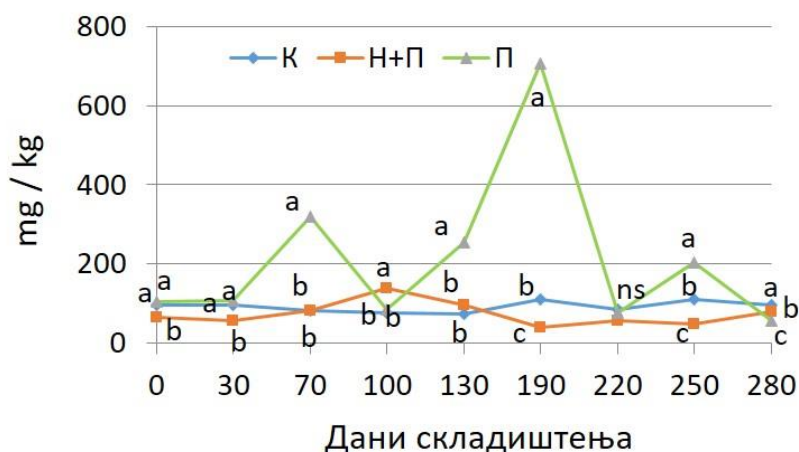


Графикон 39. Оцене за укус у току складиштења нарезака кобасица

5.6. Садржај биогених амина

Резултати испитивања укупног садржаја биогених амина у ферментисаним кобасицама у току складиштења приказани су у графиконима 40. (целе кобасице) и 41. (наресци кобасица).

На почетку складиштења целих кобасица (графикон 40.), већи садржај биогених амина утврђен је код контролне групе ($96,0 \pm 16,4$ mg/kg) и П кобасица ($106,3 \pm 2,2$ mg/kg) него код Н + П кобасица ($66,8 \pm 7,7$ mg/kg), при чему је разка била статистички значајна ($p = 0,045$ и $0,0009$, појединачно). У току складиштења, садржај биогених амина је остао битније не промењен код контролних и Н+П кобасица, док се код П кобасица значајно повећао 70., 190. и 250. дана, када је износио $320,7 \pm 11,5$ mg/kg, $704,8 \pm 15,8$ mg/kg и $203,5 \pm 5,3$ mg/kg, појединачно, што је статистици веома значајно више од контролне групе ($p = 0,0000042$, $0,00000026$ и $0,00048$, појединачно), односно Н+П кобасица ($p = 0,0004$, $0,0002$ и $0,0002$, појединачно).

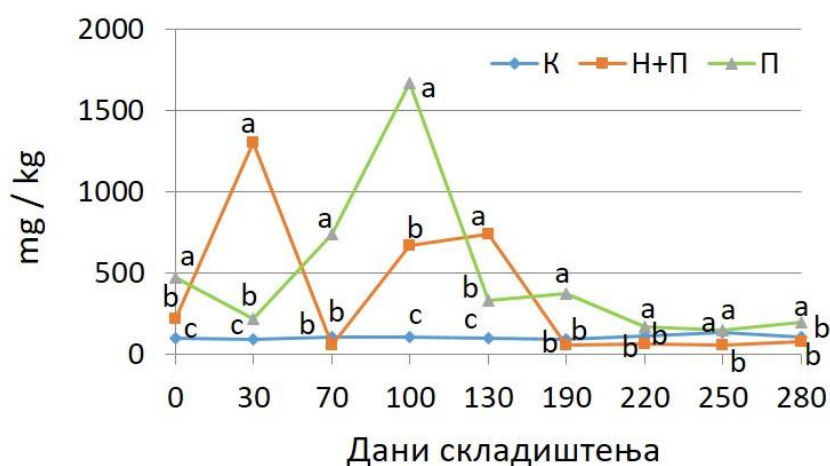


Графикон 40. Укупан садржај биогених амина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

На почетку складиштења нарезака експерименталних ферментисаних кобасица (графикон 41.), највише биогних амина су садржале П кобасице ($473,5 \pm 22,4$ mg/kg), нешто мање Н+П кобасице ($215,1 \pm 18,2$ mg/kg), а најмање К кобасице које су садржале $97,9 \pm 9,3$ mg/kg биогених амина, што је било статистички значајно мање од претходне две групе производа ($p = 0,0023$ и $0,00025$, појединачно). У току складиштења, код контролних кобасица се садржај биогних амина није битније мењао, док се код Н+П кобасица значајно повећао 30. дана када је достигао $1300,6 \pm 43,1$ mg/kg, а код П кобасица 100. дана када је износио $1670,9 \pm 40,0$ mg/kg. У поређењу са контролном групом, ове разлике су биле статистички веома значајне ($p = 0,00019$, односно $0,0002$, појединачно). Поред тога, Н+П кобасице су 30. и 130. дана садржале значајно више биогених амина у поређењу са П кобасицама ($p = 0,000097$, односно $0,0058$), док је 70., 100. и 190. дана било обратно, при чему су П кобасице садржале више биогених амина од Н+П кобасица ($p = 0,000014$; $0,000058$ и $0,000015$).



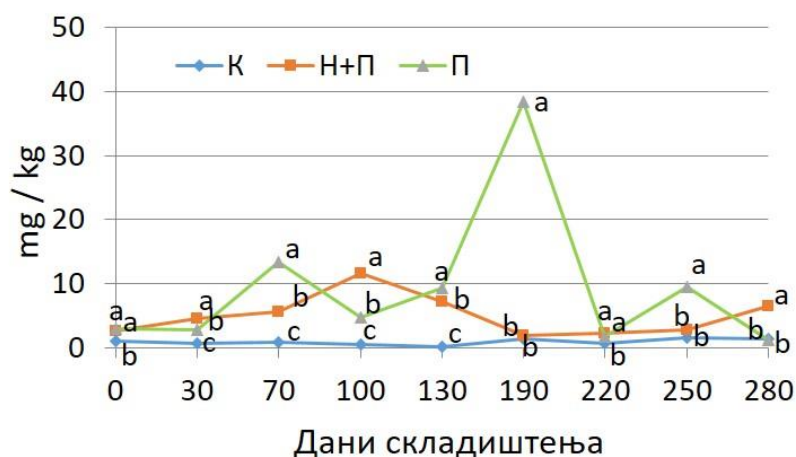
Графикон 41. Укупан садржај биогених амина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($P < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Садржај појединачних биогених амина (хистамин, тирамин, триптамин, кадаверин, путресцин, спермин и спермидин) приказан је на графиконима 42. до 55.

На почетку складиштења (графикон 42.), садржај хистамина је био већи код обе групе кобасица са полифенолима (Н+П = $2,59 \pm 0,2$ mg/kg и П = $2,89 \pm 0,1$ mg/kg) у поређењу са контролном групом (К = $1,02 \pm 0,2$ mg/kg), при чему је разлика била статистички значајна ($p = 0,001$ и $0,0017$, појединачно). У току складиштења, садржај хистамина се повећао код П кобасица на $13,37 \pm 0,15$ mg/kg 70. дана и $38,38 \pm 0,97$ mg/kg 190. дана, док је код Н+П кобасица максималан садржај хистамина износио $11,55 \pm 0,85$ mg/kg 100. дана, што је било значајно више у поређењу са контролном групом ($p = 0,0000001$; $0,00012$ и $0,0018$ појединачно). На крају складиштења, садржај хистамина је био највећи код Н+П кобасица ($6,42 \pm 0,45$ mg/kg) што је било статистички значајно више од контролне групе ($1,46 \pm 0,01$ mg/kg, $p = 0,0028$) и П кобасица ($1,27 \pm 0,32$ mg/kg, $p = 0,00019$).

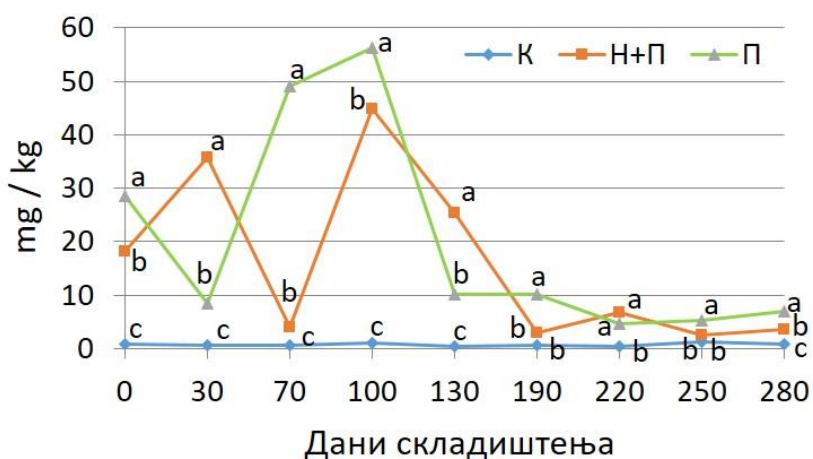


Графикон 42. Садржај хистамина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Код нарезака кобасица (графикон 43.), садржај хистамина је на почетку производње био највећи код П кобасица ($28,64 \pm 0,99$ mg/kg) што је био значајно више од Н+П кобасица ($18,24 \pm 2,56$ mg/kg, $p = 0,011$) и контролне групе ($0,82 \pm 0,13$ mg/kg, $p = 0,0003$). У току складиштења, садржај хистамина се није битније мењао код контролне групе, док се знатно повећао код обе групе кобасица са полифенолима, при чему је максимум утврђен 100. дана када је износио $56,19 \pm 2,47$ mg/kg код П кобасица и $44,93 \pm 1,41$ mg/kg код Н+П кобасица, што је било статистички значајно више у поређењу са контролним производима ($p = 0,0003$ и $0,0007$, појединачно). На крају складиштења, садржај хистамина био је највећи код П кобасица ($6,98 \pm 0,03$ mg/kg) што је било статистички значајно више него код Н+П кобасица ($3,64 \pm 1,04$ mg/kg, $p = 0,03$) и контролне групе ($0,78 \pm 0,1$ mg/kg, $p = 0,000019$).

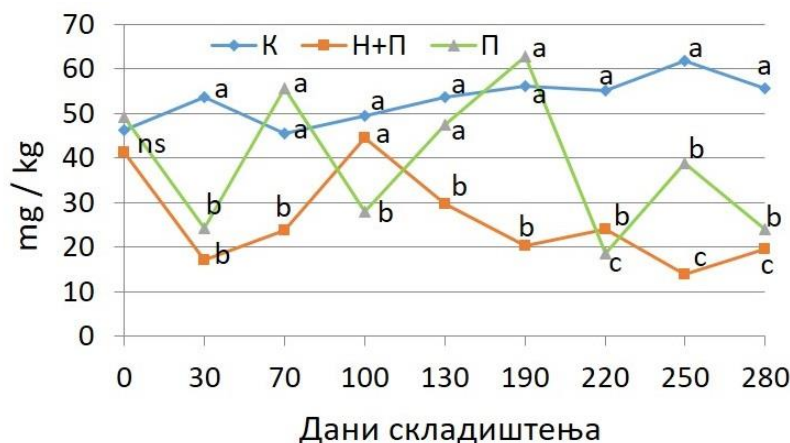


Графикон 43. Садржај хистамина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

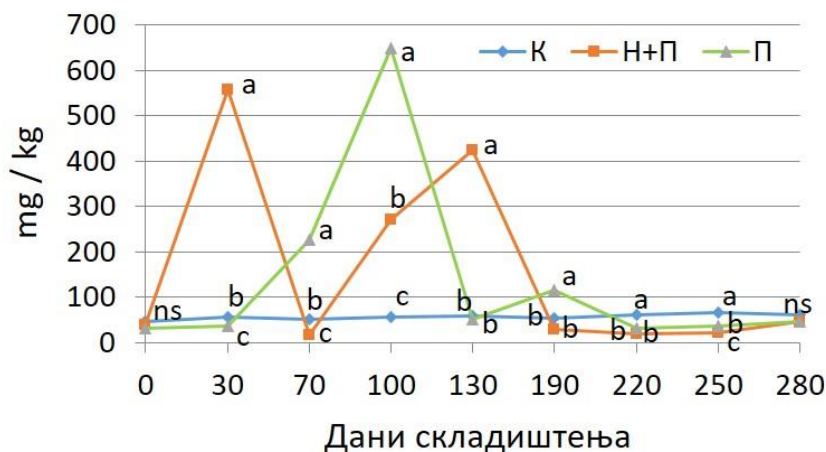
ns= разлика није статистички значајна

Садржај тирамина на почетку складиштења целих кобасица (графикон 44.) био је приближан код свих експерименталних група при чему је износио од $41,16 \pm 5,6$ mg/kg код Н+П кобасица, до $49,21 \pm 0,46$ mg/kg код П кобасица ($p = 0,13$). У току складиштења, највећи садржај тирамина је утврђен 190. дана код П кобасица ($62,76 \pm 2,26$ mg/kg) и контролне групе ($55,99 \pm 6,36$ mg/kg) што је било значајно више него код Н+П кобасица ($20,39 \pm 1,83$ mg/kg, $p = 0,00002$ и $0,007$ појединачно). На крају складиштења, највећи садржај тирамина је утврђен код контролних кобасица ($55,57 \pm 6,74$ mg/kg) што је било статистички значајно више од обе групе кобасица са полифенолима (П= $23,9 \pm 1,5$ mg/kg, $p = 0,01$ и Н+П= $19,66 \pm 1,1$ mg/kg, $p = 0,009$).



Графикон 44. Садржај тирамина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна



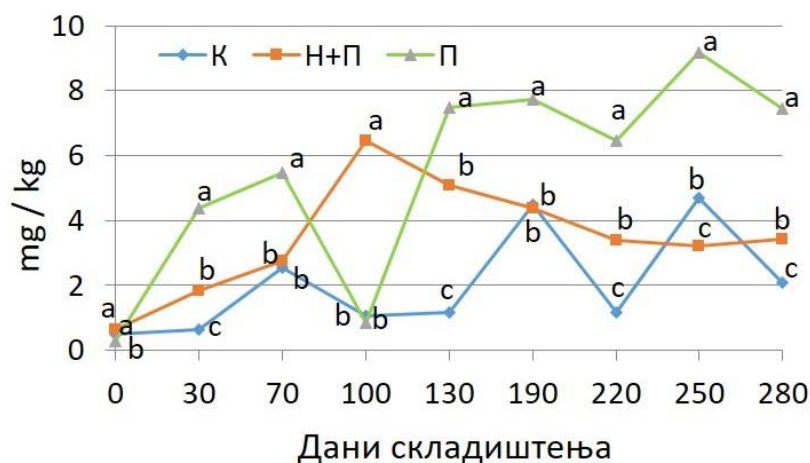
Графикон 45. Садржај тирамина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

Садржај тирамина код нарезака кобасица (графикон 45.) на почетку складиштења износио је од $32,41 \pm 1,56$ mg/kg код П кобасица до $46,86 \pm 2,1$ mg/kg код контролне групе. У току складиштења, садржај тирамина остао је битније непромењен код контролне групе, док се значајно повећао код обе групе кобасица са полифенолима (Н+П= $557 \pm 16,1$ mg/kg 30. дана и $423 \pm 37,6$ mg/kg 130. дана, односно П = $648,3 \pm 13,5$ mg/kg 100. дана). Ове вредности су биле значајно веће у поређењу са контролном групом ($p = 0,0003$; $0,0027$ и $0,00009$ појединачно). Међутим, до краја складиштења садржај тирамина је опао и износио од $46,15 \pm 2,3$ mg/kg код Н+П кобасица до $60,85 \pm 0,4$ mg/kg код контролне групе, при чему ове разлике нису биле статистички значајне ($p = 0,35$).

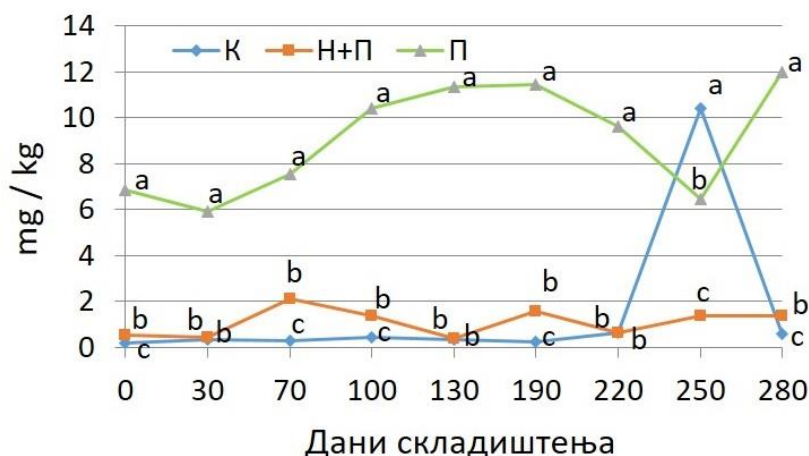
Садржај триптамина на почетку складиштења целих кобасица (графикон 46.) био је значајно мањи код П кобасица ($0,29 \pm 0,02$ mg/kg) у поређењу са контролном групом ($0,51 \pm 0,13$ mg/kg, $p = 0,043$) и Н+П кобасицама ($0,63 \pm 0,04$ mg/kg, $p = 0,0009$). У току складиштења, садржај триптамина се повећао код свих експерименталних група кобасица, при чему је највећи садржај овог биогеног амина је уврђен 250. дана код П кобасица ($9,17 \pm 0,15$ mg/kg). На крају складиштења, највећи садржај триптамина је уврђен код П кобасица ($7,43 \pm 0,11$ mg/kg), значајно мањи садржај је уврђен код Н+П кобасица ($3,41 \pm 0,11$ mg/kg, $p = 0,000001$), а најмањи код контролне групе ($2,07 \pm 0,35$ mg/kg, $p = 0,0006$).

Код нарезака кобасица (графикон 47.), садржај триптамина је на почетку складиштења био највећи код П кобасица ($6,84 \pm 0,16$ mg/kg) и при томе био значајно већи у односу на контролну групу ($0,17 \pm 0,02$ mg/kg, $p = 0,00003$) и Н+П кобасице ($0,53 \pm 0,06$ mg/kg, $p = 0,00015$). Током целокупног складиштења садржај триптамина је био највећи код П кобасица при чему је максимална вредност уврђена на крају складиштења ($11,95 \pm 0,64$ mg/kg) при чему је била значајно већа од вредности уврђених код контролних ($0,96 \pm 0,05$ mg/kg, $p = 0,001$) и Н+П кобасица ($1,38 \pm 0,08$ mg/kg, $p = 0,0009$).



Графикон 46. Садржај триптамина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

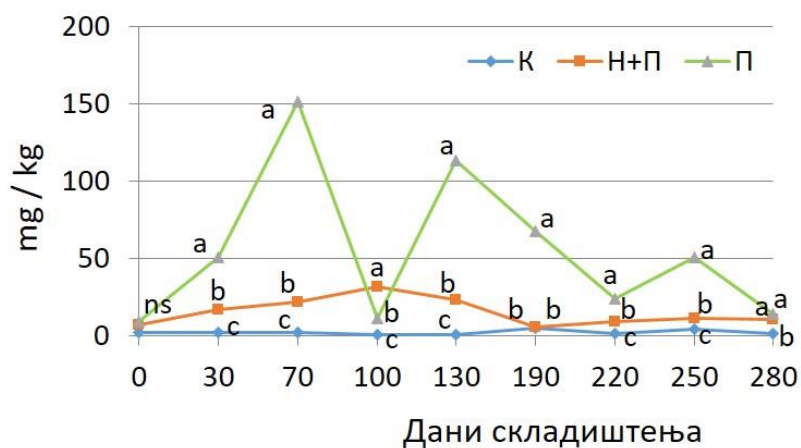
a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан



Графикон 47. Садржај триптамина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

У погледу садржаја кадаверина, на почетку складиштења целих кобасица (графикон 48.) нису утврђене значајне разлике између експерименталних група кобасица (од $1,25 \pm 0,8$ mg/kg код К групе до $2,81 \pm 0,1$ mg/kg код П групе; $p = 0,06$). У току складиштења, највећи садржај кадаверина је утврђен код П кобасица, код којих је максимална вредност утврђена 70. дана када је износила $151,5 \pm 1,81$ mg/kg и била значајно већа у поређењу са Н+П кобасицама ($21,7 \pm 2,1$ mg/kg, $p = 0,00004$) и контролном групом ($1,56 \pm 0,4$ mg/kg, $p = 0,00002$). До краја складиштења, садржај кадаверина је опао и био приближан код обе групе кобасица са полифенолима (Н+П = $10,5 \pm 0,9$ mg/kg и П = $13,6 \pm 0,6$ mg/kg, $p = 0,052$) при чему су ове вредности биле значајно веће него код контролних кобасица ($1,28 \pm 0,09$ mg/kg; $p = 0,0007$).

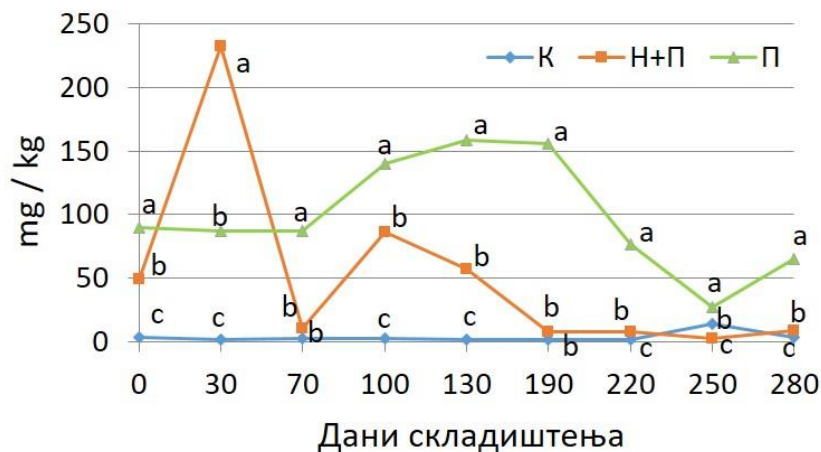


Графикон 48. Садржај кадаверина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

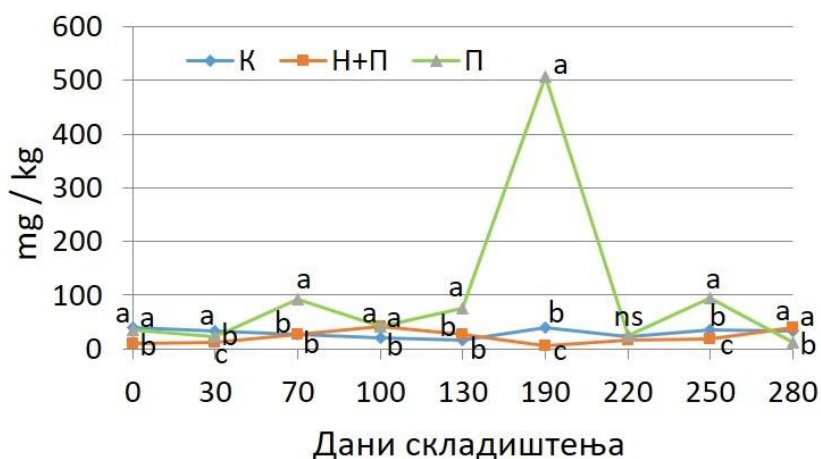
ns= разлика није статистички значајна

Код нарезака кобасица (графикон 49.), садржај кадаверина је на почетку складиштења био значајно већи код обе групе кобасица са полифенолима (Н+П = $49,6 \pm 9,6$ mg/kg и П = $89,7 \pm 5,3$ mg/kg) у поређењу са контролном групом ($3,24 \pm 1,78$ mg/kg, $p = 0,001$ и $0,0004$ појединачно). У току складиштења, саржај кадаверина је остао битније непромењен код контролне групе кобасица, док се код обе групе кобасица са полифенолима садржај овог биогеног амина повећао, при чему је највећа вредност утврђена код Н+П кобасица 30. дана ($232,5 \pm 17,8$ mg/kg), а код П кобасица 130. дана ($156,1 \pm 3,7$ mg/kg). На крају складиштења, највише кадаверина су садржале П кобасице ($65,4 \pm 0,4$ mg/kg), а значајно мање Н+П кобасице ($8,65 \pm 0,33$ mg/kg, $p = 0,00000007$) и контролна група ($3,00 \pm 0,12$ mg/kg, $p = 0,000003$).



Графикон 49. Садржај кадаверина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан



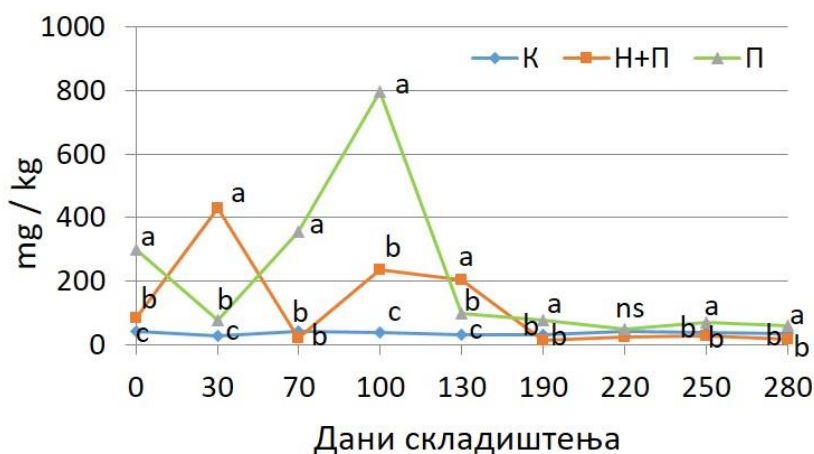
Графикон 50. Садржај путресцина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

ns= разлика није статистички значајна

Садржај путресцина је током складиштења целих кобасица (графикон 50.) био највећи код П кобасица, при чему се са $34,6 \pm 0,64$ mg/kg колико је утврђено на почетку, повећао до $506,7 \pm 9,8$ mg/kg 190. дана, након чега је до краја складиштења опао на $11,5 \pm 0,7$ mg/kg. Код контролне групе и Н+П кобасица, садржај путресцина се није битније мењао током складиштења и износио је од $10,9 \pm 1,5$ mg/kg код Н+П, односно $39,9 \pm 4,3$ mg/kg код К кобасица на почетку складиштења, до $32,8 \pm 0,35$ mg/kg код К, односно $39,2 \pm 0,9$ mg/kg код Н+П кобасица.

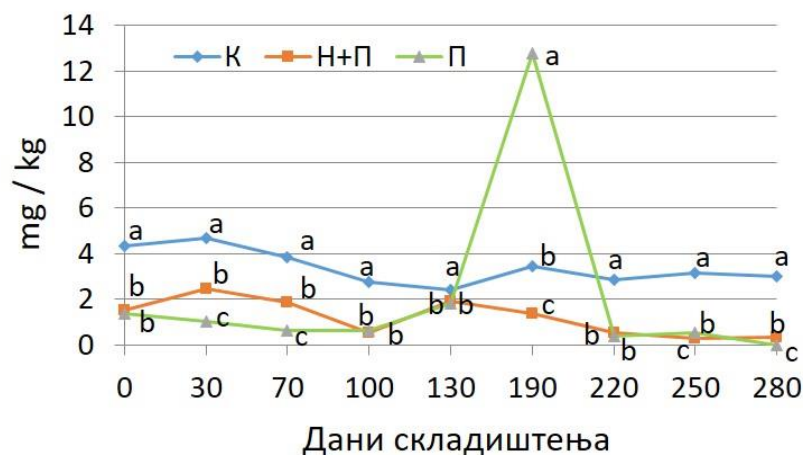
Код нарезака кобасица, највећи садржај путресцина (графикон 51.) је утврђен код Н+П кобасица 30. дана ($430,8 \pm 9,3$ mg/kg), а код П кобасица 100. дана ($795,3 \pm 17,5$ mg/kg) складиштења. Код контролних кобасица садржај путресцина је остао битније не промењен у току складиштења и износио је од $40,4 \pm 9,3$ mg/kg на почетку до $33,8 \pm 0,26$ mg/kg на крају складиштења. Код кобасица са полифенолима, садржај путресцина је опао од 130. дана, тако да је на крају складиштења 280. дана био најмањи код Н+П кобасица када је износио $18,8 \pm 1,4$ mg/kg што је било значајно мање од вредности која је утврђена код контролне групе ($33,81$ mg/kg; $p = 0,008$) и П кобасица ($60,28 \pm 4,2$ mg/kg, $p = 0,0015$).



Графикон 51. Садржај путресцина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна

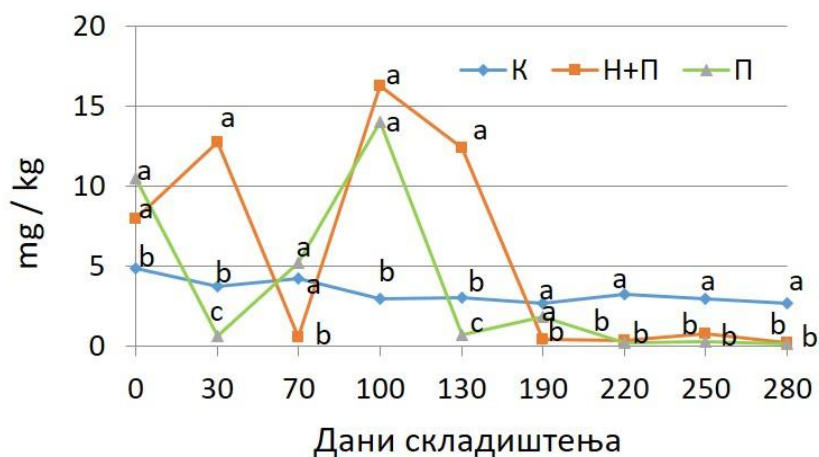
На графикону 52. је приказан садржај спермина у току складиштења целих кобасица, на коме се запажа да су контролне кобасице током целокупног периода складиштења садржале већу количну овог биогеног амина него обе групе кобасица са полифенолима, изузев 190. дана када је највећи удео спермина утврђен код П кобасица ($12,8 \pm 0,9$ mg/kg). На крају складиштења, највише спермина садржале су контролне кобасице ($3,0 \pm 0,05$ mg/kg), што је било значајно више него код Н+П кобасица ($0,31 \pm 0,03$ mg/kg; $p = 0,00002$) и П кобасица ($0,007 \pm 0,002$ mg/kg; $p = 0,00008$).



Графикон 52. Садржај спермина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

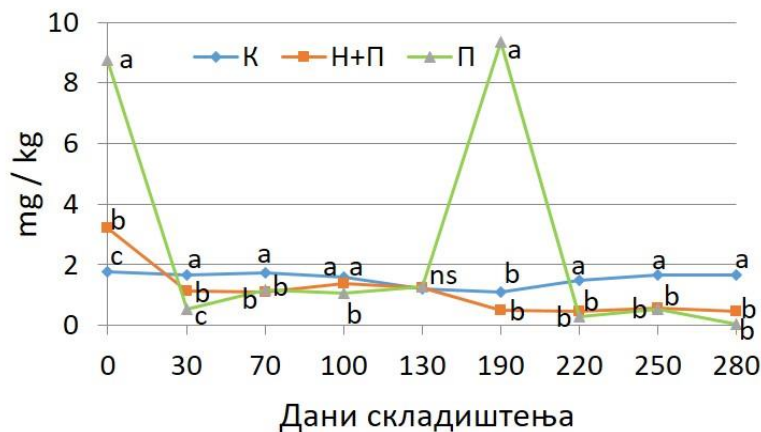
У току складиштења нарезака кобасица (графикон 53.), код контролне групе садржај спермина се није битније мењао и износио је од $4,87 \pm 1,8$ mg/kg на почетку до $2,66 \pm 0,4$ mg/kg на крају складиштења. Међутим, код обе групе кобасица са полифенолима, садржај спермина је достигао највише вредности 100. дана када је износио $16,3 \pm 1,9$ mg/kg код H+P кобасица, односно $14,1 \pm 0,6$ mg/kg код П кобасица, што је било статистички значајно више од контролних производа ($p = 0,0002$ и $0,003$, појединачно). У другој половини складиштења садржај спермина је опао тако да су 280. дана обе групе кобасица са полифенолима садржале значајно мање спермина од контролних кобасица (H+P = $0,19 \pm 0,01$ mg/kg, $p = 0,007$, односно П= $0,16 \pm 0,02$ mg/kg, $p=0,006$).



Графикон 53. Садржај спермина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

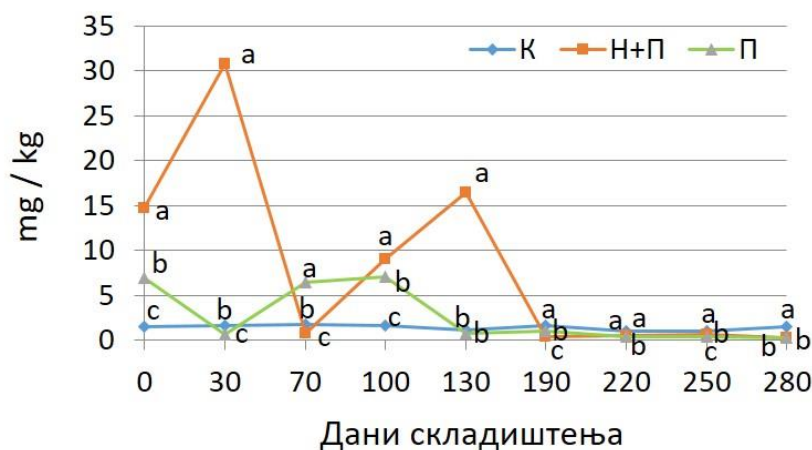
a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

Садржај спермидина је на почетку складиштења целих ферментисаних кобасица (графикон 54.) био највећи код П кобасица ($8,6 \pm 0,86$ mg/kg) што је било значајно више него код Н+П кобасица ($3,21 \pm 0,2$ mg/kg, $p = 0,006$) и контролних кобасица ($1,76 \pm 0,3$ mg/kg, $p=0,002$). У току складиштења, садржај спермидина је опадао код кобасица са полифенолима, са изузетком 190. дана када је утврђен скок овог биогеног амина код П кобасица ($9,35 \pm 0,7$ mg/kg), док се код контролних производа није битније мењао. На крају складиштења, највећи садржај спермидина је утврђен код контролних кобасица ($1,67 \pm 0,03$ mg/kg), који је при томе био значајно већи него код обе групе кобасица са полифенолима (Н+П = $0,45 \pm 0,1$ mg/kg, $p = 0,002$, односно П = $0,03 \pm 0,01$ mg/kg, $p=0,0004$).



Графикон 54. Садржај спермидина у току складиштења целих ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан
 ns= разлика није статистички значајна



Графикон 55. Садржај спермидина у току складиштења нарезака ферментисаних кобасица

a,b,c = различита слова указују на статистички значајну разлику ($p < 0,05$) између експерименталних група за одређени дан

Код нарезака кобасица (графикон 55.), садржај спермидина је на почетку складиштења био значајно већи код Н+П кобасица ($14,71 \pm 0,1$ mg/kg) него код П кобасица ($6,89 \pm 0,38$ mg/kg, $p=0,004$) и контролне групе ($1,56 \pm 0,18$ mg/kg, $p=0,0003$). Након 30. дана складиштења, садржај спермидина се повећао код Н+П кобасица на $30,8 \pm 0,67$ mg/kg, након чега се смањује до краја складиштења када је износио $0,23 \pm 0,1$ mg/kg. Код П кобасица садржај спермидина је 70. и 100. дана био приближан као на почетку складиштења ($6,46 \pm 0,42$ mg/kg и $7,06 \pm 0,22$ mg/kg mg/kg, појединачно), а потом је опао на $0,21 \pm 0,02$ mg/kg на крају складиштења. Код контролних кобасица садржај овог биогеног амина се није битније мењао у односу на почетну вредност тако да је 280. дана износио $1,46 \pm 0,1$ mg/kg, што је било значајно веће него код Н+П кобасица ($p=0,00004$) и П кобасица ($p=0,0005$).

5.7. Садржај полифенола

Резултати испитивања садржаја полифенола у екстракту кобасица показали су да је доминантан представник ових једињења код Н+П и П кобасица био каемферол-6-О-глукозид ($23,7$ и $33,0$ ng/g, респективно), а затим следе кверцетин ($14,7$ - $15,2$ ng/g), лутеолин-7-О-глукозид ($8,6$ - $12,1$ ng/g), катехин ($6,8$ - $7,5$ ng/g) и сиригинска киселина ($4,0$ - $5,4$ ng/g). Запажено је да се укупна количина полифенола детектованих у екстракту кобасица повећава у току складиштења, и то са $96,9$ ng/g до $152,2$ ng/g код П кобасица и од $71,9$ ng/g до $438,4$ ng/g код Н+П кобасица. Укупан садржај полифенола који је утврђен у Н+П кобасицама био је већи у поређењу са П кобасицама у свим фазама производње и складиштења, и то 1,7 пута већи на крају производње, 2,0 пута већи 30. дана и 5,2 пута већи 70. дана.

Табела 3. Промене садржаја полифенола у екстракту кобасица за време производње и складиштења (ng/g)

Полифеноли	надев		готов производ		30. дан		70. дан	
	Н+П	П	Н+П	П	Н+П	П	Н+П	П
Гална киселина	0,0	0,0	6,7	7,2	8,2	4,5	7,5	3,3
Лутеолин	0,4	0,5	4,3	2,6	9,7	5,9	11,6	2,3
Каемферол	0,4	0,8	13,2	6,0	18,3	10,0	21,3	7,0
Катехин	6,8	7,5	12,3	6,0	19,2	6,1	22,5	2,0
Епикатехин	2,0	3,1	4,7	2,2	10,1	4,8	15,2	0,8
Кверцетин	14,7	15,2	52,0	28,7	110,5	38,0	158,2	34,6
Изорхамнетин	0,0	0,0	25,6	14,2	30,0	14,2	35,1	15,2
Каемферол-3-О-глукозид	23,7	33,0	10,4	7,2	36,8	21,5	50,4	5,8
Изокверцетин/хиперозид	4,5	15,0	8,9	5,9	32,6	20,6	66,4	4,5
Лутеолин-7-О-глукозид	8,6	12,1	3,5	2,3	13,6	7,8	18,8	1,7
Ферулинска киселина	0,1	0,1	0,8	0,1	0,7	1,8	4,1	0,3
Сиригинска киселина	5,4	4,0	6,4	2,7	6,7	5,5	11,9	3,1
Нарингенин	0,8	2,1	2,4	1,7	6,5	4,8	6,0	1,4
Протокатехуинска киселин	0,0	0,3	1,8	1,4	3,2	1,9	3,6	1,5
П-кумаринска киселина	3,5	1,9	0,6	0,2	0,9	0,7	1,7	0,5
Ванилинска киселина	1,0	1,3	2,0	1,3	3,1	4,1	4,1	0,9
Σ	71,9	96,9	155,6	89,7	310,1	152,2	438,4	84,9

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Хемијски састав

Сви испитивани хемијски параметри су били у опсегу који је према наводима других аутора (Leistner, 1986; Vignolo и сар., 2010) типичан за ферментисане суве кобасице, и уједно испуњавају захтеве дефинисане прописима (Правилник, 2019) у погледу садржаја воде и протеина меса, као и удела колагена у протеинима меса (Табела 2). Садржај нитрита у надеву кобасица са полифенолима без додатка нитрита био је значајно нижи него код контролних и кобасица са полифенолима и нитритима. Присуство нитрата у надеву контролних и кобасица са додатком нитрита и полифенола може да се објасни брзом оксидацијом нитрита у нитрате након њиховог додавања, пошто су нитрити веома реактивни и према подацима из литературе (Marco и сар., 2006) подлежу оксидацији веома брзо након контакта са супстратом. Детекција нитрита у надеву кобасица са полифенолима које су произведене без додатка нитрита, а чије је присуство утврђено у малим количинама, може бити резултат природног присуства нитрита у зачинама као што наводе Вуковић и сар. (2011), а који су додати у ове кобасице у току производње. У готовим производима, садржај нитрита и нитрата је био мањи у поређењу са њиховим садржајем у надеву, што би се могло објаснити комплексним реакцијама нитрита и нитрата са матриksom кобасице у складу са наводима Marco и сар. (2006). Интересантно је да су кобасице са нитритима и полифенолима садржале готово двоструко више нитрата него контролне кобасице, што се може приписати активности полифенола. На основу података из литературе, фенолни састојци реагују са нитритима (Takahata и сар., 2017) али природа ових реакција би требало да се даље детљније испита.

6.2. Физичко хемијски параметри и степен протеолизе

Опадање активности воде које је утврђено код свих експерименталних група је имало уобичајену динамику за ферментисане суве кобасице, као што описује Leistner (1986), при чему је достигла вредност мању од 0,90 што је према литературним подацима (Takahata и сар., 2017; Holck и сар., 2017) важно за безбедност производа, и остаје битније непромењена током складиштења. Интензивнији пад a_w вредности је запажен код обе групе кобасица које су биле обогачене полифенолима (Н+П и П кобасице), што се може приписати симултаном интензивнијем опадању рН вредности код ових кобасица (графикон 1.). Наиме, према наводима других аутора (Hopfel и Hamm, 1994), са опадањем рН вредности смањује се способност везивања воде меса, што резултира интензивнијим отпуштањем воде и самим тим интензивнијим сушењем кобасица. Ниже рН вредности кобасица са додатком полифенола утврдили су и Moawad и сар (2012) уз тумачење да је то последица интензивније инхибиције микроорганизама квара који доприносе већим рН вредностима ферментисаних кобасица због њихове протеолитичке активности, јер су продукти протеолизе базног карактера. У овој дисертацији, уједно је утврђен већи индекс протеолизе на крају производње код контролних кобасица, што је у сагласности са наведеним литературним подацима. Интензивнија протеолиза код контролних кобасица може се објаснити и присуством статистички значајно већег броја протеолитичких бактерија (*Pseudomonadaceae*) код ове групе кобасица 14. и 21. дана производње (графикон 16.), који је утврђен у овој дисертацији. За време складиштења, рН вредност се повећавала упоредо са индексом протеолизе, како код целих кобасица, тако и код нарезака (графикони 5. и 6.) што се приписује активности ткивних протеолитичких ензима с обзиром бактерије узрочници квара више нису детектоване, а што је нормално у току складиштења и зрења производа од, што је у складу са наводима других аутора (Cageri и сар., 1993). У овој дисертацији, већи индекс

протеолизе у току складиштења је утврђен код кобасица обогаћених полифенолима али је био у опсегу који је према подацима из литературе (Glišić и сар., 2019) типичан за ферментисане суве кобасице и представља уједно показатељ и мерило степена зрења производа, што је пожељно код сушених производа од меса (Cageri и сар., 1993).

6.3. Параметри оксидације масти

На крају производње, киселински број који указује на интензитет хидролизе масти био је већи код кобасица обогаћених полифенолима, а овакав тренд се наставља све до 90. дана складиштења целих и нарезака кобасица (графикони 7. и 8.). Након тога, највећи киселински број је запажен код контролне групе. Пошто према наводима из литературе (Hughes и сар., 2002; Ferreira и сар., 2007; Leroy и сар., 2008) слободне масне киселине ослобођене током хидролизе доприносе ароми ферментисаних кобасица, овакве промене се не могу сматрати непожељним. С друге стране, пероксидни број и TBARS вредност, који указују на процес оксидације липида, показује другачији тренд у првој (до 130 дана) и другој фази складиштења (од 130 до 280 дана). У првој фази, најнижи пероксидни број и највећа TBARS вредност утврђени су код кобасица са полифенолима без нитрита, али пошто је садржај алдехида у овим производима био далеко испод сензорског лимита за детекцију ужеглости од 2,2 mg MAL/kg који наводе Gwiazdowska и сар. (2015) и типичан је за ферментисане суве кобасице (Glišić и сар., 2019), овакав налаз не представља значајнији недостатак производа. После 130 дана складиштења, кобасице обогаћене полифенолима имале су значајно мањи пероксидни број и TBARS вредност него контролне кобасице. Поред тога, у овом периоду су кобасице са полифенолима без нитрита имале значајно мањи пероксидни број и TBARS вредност него кобасице са нитритима и полифенолима, највероватније захваљујући хемијским реакцијама између нитрита и полифенола које описују Takahama и сар., (2017) што је умањило антиоксидативно деловање полифенола у овим кобасицама.

6.4. Промене у микрофлори

Пошто се према литературним подацима (Leistner, 1986) најинтензивније промене у микрофлори ферментисаних кобасица одигравају у првих неколико недеља, микробиолошка испитивања су спроведена сваких седам дана у току производње експерименталних кобасица (графикони 13., 14., 15. и 16.), док је за време складиштења ова врста испитивања спровођена једанпут месечно (графикони 17., 18., 19. и 20.). Резултати испитивања су показали да доминантну микрофлору представљају бактерије млечне киселине. Иако су кобасице са полифенолима без нитрита садржале значајно мањи број бактерија млечне киселине 14. дана производње (графикон 13.), што се може приписати благој антимикуробној активности полифенола према бактеријама млечне киселине и у складу је са подацима које наводе Gwiazdowska и сар. (2015), у току осталих фаза производње није утврђена значајна разлика у броју БМК између експерименталних група кобасица, како целих тако и нарезака, а број је био у опсегу који је оптималан за нормално одвијање ферментације код ове врсте кобасица и одговара наводима других аутора (Leistner, 1986).

Број бактерија из фамилије *Micrococcaceae* и *Enterococcaceae* био је прилично приближан код свих кобасица у току производње, изузев 7. дана (графикон 14.), када су кобасице са нитритима и полифенолима садржале значајно мањи број ових бактерија него контролна група и кобасице са полифенолима без нитрита, што би се могло приписати здруженом антимикуробном деловању нитрита и полифенола. *Micrococcaceae* и *Enterococcaceae* представљају део корисне микрофлоре код ферментисаних кобасица јер, према литературним

подацима (Leistner, 1986), играју значајну улогу захваљујући пероксидаза активности и учешћу у формирању ароме зрелог производа.

Када су у питању бактерије које су узрочници квара (графикони 15. и 16.), *Enterobacteriaceae* су нису детектоване после 14 дана, а *Pseudomonadaceae* после 28 дана производње, код свих експерименталних група кобасица. Код Н+П и П кобасица, утврђен је статистички значајно мањи број *Pseudomonadaceae* 14. и 21. дана производње, што се може приписати антимикуром деловању полифенола на *Pseudomonadaceae* што је описано и од стране других аутора (Alberto и сар., 2006).

За време складиштења, број бактерија млечне киселине је опадао и био је приближан код свих експерименталних кобасица (графикони 18. и 19.). Изузетак је запажен 30. и 190. дана складиштења, када је број БМК био значајно мањи код обе групе кобасица обогаћених полифенолима, што је према литературним подацима (Alberto и сар., 2006) највероватније резултат антимикуробне активности полифенола. Код нарезака кобасица, у првих 70 дана складиштења утврђен је нешто већи број бактерија из фамилије *Micrococcaceae* и *Enterococcaceae*, што се може приписати накнадној контаминацији приликом нарезивања и паковања, али у току даљег складиштења њихов број опада тако да после 250. дана нису детектоване у производима без обзира на начин складиштења (графикони 20. и 21.). Упркос разликама између експерименталних група у неким фазама у току складиштења, промене у микрофлори су биле у опсегу карактеристичном за ферментисане кобасице које наводе и други аутори (Leistner, 1986). Што се тиче патогених бактерија, *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* нису детектоване ни у једној од експерименталних кобасица, како у току производње, тако ни у току складиштења, што је према литературним подацима (Vignolo и сар., 2010) неопходно за безбедност производа у свим фазама у току процеса производње.

6.5. Параметри боје и сензорски параметри квалитета

На почетку периода складиштења, како код целих тако и нарезака кобасица, контролне кобасице и кобасице са полифенолима без нитрита имале су сличну светлоћу (графикони 24 и 25), док су кобасице са нитритима и полифенолима биле значајно тамније. Уједно, контролне и кобасица са нитритима и полифенолима имале су сличан удео црвене (графикони 26. и 27.) и жуте боје (графикони 28. и 29.), док су ови параметри били значајно нижи код кобасица са полифенолима без нитрита. Овакви резултати могу да се објасне бржем формирању ружичасто-црвеног пигмента нитрозил-миоглобина који, према наводима из литературе (Marco и сар., 2006), настаје у реакцијама између нитрита и миоглобина. Код ферментисаних кобасица које се иначе производе без употебе адитива, као што је то случај у традиционалној производњи, стабилна црвена боја се формира у току спорих процеса редукције и стабилизације миоглобина (Vuković и сар., 2011).

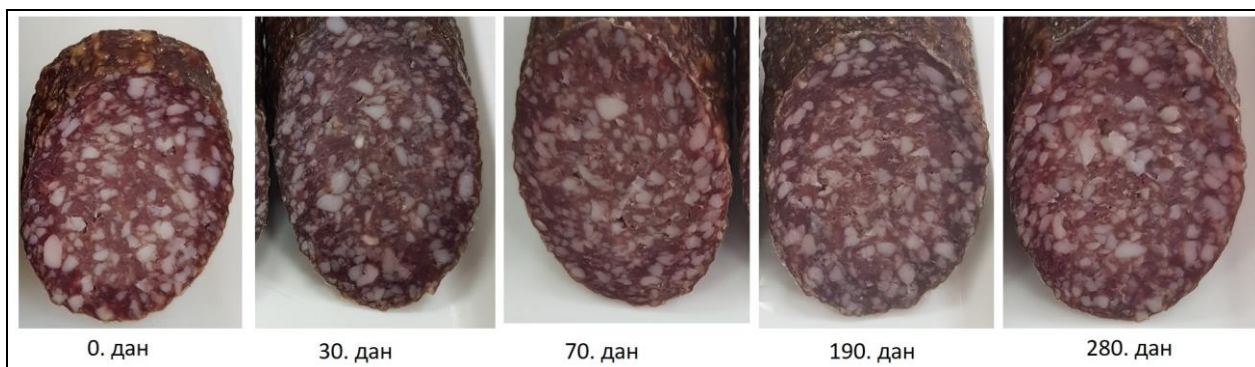
За време складиштења, светлоћа је постала уједначена код свих експерименталних група 130., 250. и 280-ог дана. Удео црвене боје се значајно смањило код кобасица обогаћених полифенолима у току укупног периода складиштења. Иако су кобасице са нитритима и полифенолима садржале нитрите, удео црвене боје ових производа био је мањи у поређењу са контролним кобасицама, што је вероватно последица делимичног губитка нитрита у реакцијама са полифенолима које описују Такаћама и сар. (2017). Значајно већи удео жуте боје код контролних кобасица се може приписати интензивнијој оксидацији липида која је утврђена код ове групе кобасица (графикони 9., 10., 11. и 12.), пошто пероксиди и други продукти оксидације разлажу миоглобин чиме повећавају удео жуте боје код кобасица, што је у складу са наводима других аутора (Alberto и сар., 2006).

Резултати инструменталног мерења боје потврђени су и кроз сензорску евалуацију производа. Боја кобасица са полифенолима без нитрита била је значајно слабије оцењена после првих 30 дана у поређењу са контролом и кобасицама са нитритима и полифенолима али од 70. до 130. дана добила је веће оцене (графикони 27. и 28.) због развијања интензивније црвене боје, што је такође запажено и повећањем a^* вредности које је утврђено 70. дана инструменталним мерењем боје (графикони 23. и 24.). Осим интензитета црвене боје, слабијим оценама боје код кобасица без нитрита у првој фази зрења допринела је и појава тамнијег периферног прстена величине 5-10 mm (слика 2).



Слика 2. Тамнија боја периферног прстена код П кобасица

У овом случају није се радило о сувом рубу, већ о пребојавању периферних делова кобасица услед миграције полифенолних пигмената заједно са влагом која у складу са литературним подацима (Honikel и Hamt, 1994) дифундује ка периферији кобасица у току сушења. У даљим фазама зрења и складиштења овај прстен постепено је нестао (слика 3) највероватније као последица изједначавања боје кобасице на пресеку у току формирања стабилних форми редукованог миоглобина код зрелог производа, што наводе и други аутори (Leistner, 1986). На основу наведеног, појава тамније обојеног прстена код кобасица са полфенолима, може се сматрати нормалном појавом пролазног карактера.



Слика 3. нестанак тамније обојеног прстена у току складиштења П кобасица

Када су у питању остали сензорски параметри, сви производи су оцењени приближно, у свим фазама складиштења како целих кобасица, тако и нарезака. Опadaње вредности оцена за све параметре, нарочито после 130. дана складиштења, може се приписати пре свега оксидативним променама које су угрозиле пре свега мирис и укус, боју и изглед пресека кобасица. Међутим, кобасице које су биле обогаћене полифенолима, биле су прихватљиве до краја целокупног периода складиштења од 280 дана, са просечним оценама 3,0 за сва испитивана сензорска својства, при чему су контролне кобасице најслабије оцењене због лоше ароме која је добила оцену 2,0. Боља арома кобасица обогаћених полифенолима може да се припише антиоксидативној улози полифенола која је описана од стране других аутора (Nowak и сар., 2016) и што је потврђено и мањим параметрима оксидације липида у овој студији (графикони 9., 10., 11. и 12.). Поред тога, експерименталне кобасице из ове дисертације су веома високо оцењене чак и 190. дана складиштења, што је важно јер се ферментисане кобасице према наводима других аутора (Woiciak и сар., 2015) складиште обично не дуже од 180 дана. На овај начин, ова студија потврђује могућност продужене одрживости ферментисаних кобасица, чак и када се ради о кобасицама произведеним без нитрита, а које су обогаћене полифенолима.

6.6. Садржај биогених амина

Укупан садржај биогених амина био је већи током складиштења како целих кобасица, тако и нарезака кобасица без додатка нитрита. Овакав резултат се може приписати конзервишућем деловању нитрита, што је у складу са наводима других аутора (Gençcelер и сар. 2007; Kurt и Zorba, 2009) према којима кобасице произведене са додатком нитрита садрже мање биогених амина него кобасице без нитрита. Поред тога, код нарезака кобасица садржај биогених амина био је скоро двоструко већи него код целих кобасица. Разлог за то може бити већи број бактерија млечне киселине, микрокока и ентерокока који је утврђен код нарезака кобасица у првих 70 дана складиштења (графикони 18. до 23.) јер према наводима Çarpen и сар. (2014) и Suzzi и сар. (2003), бактерије млечне киселине, од којих поготово неке врсте лактобацила, као и коагулаза негативне стафилококе и ентерококе могу да стварају биогене аmine. У овој дисертацији, већи број ових микроорганизама код нарезака може се приписати накнадној контаминацији у току поступка нарезивања и паковања производа. Поред тога, у поређењу са контролним кобасицама, код кобасица са полифенолима и нитритима утврђен је значајно већи садржај биогених амина, поготово 30., 100. и 130. дана складиштења нарезака кобасица, што може бити последица смањеног инхибиторног ефекта нитрита на стварање биогених амина услед узajамних реакција нитрита и полифенола које описују други аутори (Takahama и сар., 2017).

У погледу безбедности кобасица, било је важно испитати садржај хистамина и тирамина, који према литературним подацима (Teodorović и сар., 2000; Spano и сар., 2010) припадају вазоактивним аминима. Резултати испитивања су показали да је већи садржај хистамина и тирамина утврђен код обе групе кобасица са полифенолима у поређењу са контролом, што се може тумачити на исти начин као код укупног садржаја биогених амина. Важно је нагласити да се максималан садржај хистамина, који је утврђен у појединим фазама складиштења (графикони 42. и 43.) код кобасице без нитрита ($38,38 \pm 0,97$ mg/kg код целих кобасица и $56,19 \pm 2,47$ mg/kg код нарезака) налази у границама уобичајеним за ферментисане кобасице и знатно је мањи од максималних вредности од 133 mg/kg које наводе Alves и сар. (2017) тако да се не може сматрати као опасност по здравље људи. Садржај тирамина је био значајно већи код контролних кобасица у поређењу са обе групе кобасица са полифенолима, током дужег периода у току складиштења целих кобасица, док је код нарезака било обрнуто,

односно садржај тирамина је био значајно већи код обе групе кобасица са полифенолима него код контролне групе. Kurt и Zorba (2009) наводе да нитрити имају посебну улогу у редукцији садржаја тирамина код ферментисаних кобасица, тако се овакав резултат код нарезака може приписати изостанку инхибиције стварања тирамина од стране микрофлоре чији је већи број утврђен код нарезака, а која учествује у производњи овог биогеног амина, о чему говоре и други аутори (Carmen и сар. 2014; Suzzi и сар., 2003). Максималан садржај тирамина код нарезака у овој дисертацији износио је $557 \pm 16,1$ mg/kg код кобасица са полифенолима и нитритима, и $648,3 \pm 13,5$ mg/kg код кобасица са полифенолима без нитрита, што је веће од вредности од 246 mg/kg које наводе други аутори (Alves и сар., 2017). С друге стране, максималне вредности садржаја тирамина од $55,99 \pm 6,36$ mg/kg код целих кобасица из ове дисертације, знатно су мање од вредности коју наводе Alves и сар. (2017) што указује на то да додаток полифенола и одсуство нитрита није примарни разлог за већи садржај тирамина, већ је то пре свега последица других фактора који су описани у литератури (Carmen и сар., 2014; Suzzi и сар., 2003) попут већег броја микроорганизама услед накнадне контаминације приликом нарезивања и паковања.

Садржај триптамина, кадаверина и путресцина био је већи код кобасица са додатим полифенолима у поређењу са контролном групом, а највећи код кобасица без нитрита у току целокупног периода складиштења, како код целих кобасица, тако и код нарезака. Пошто бактерије квара, које према наводима из литературе (Carmen и сар., 2014) представљају главни извор ових биогених амина, нису детектоване после 14 до 28 дана производње свих експерименталних кобасица, већи садржај ових биогених амина може бити последица изостанка инхибиторног деловања нитрита на производњу ових биогених амина (Gençseleler и сар., 2007) код кобасица које су произведене без додатка нитрита с једне стране, и узајамних реакција нитрита и полифенола (Takahama и сар., 2017) код кобасица произведених са додатком нитрита и полифенола.

С друге стране, садржај спермина и спермидина био је већи код кобасица са полифенолима само у појединим фазама складиштења, с тим да је на крају складиштења садржај ових биогених амина био већи код контролне кобасице. Овакав резултат се може објаснити тиме да спермин и спермидин нису само продукти активности микроорганизама, већ у складу са литературним подацима (Hernández-Jover и сар., 1997), природно постоје у мишићима, тако да њихов садржај не зависи од броја бактерија и додатих нитрита и уједно може да се повећа у току зрења ферментисаних кобасица.

6.7. Садржај полифенола

Испитивање садржаја полифенола у екстракту ферментисаних кобасица показало је да је најдоминантнији каемферол-3-О-глукозид, а затими кверцетин, лутеолин-7-О-глукозид, катехин, сиригинска киселина и друге, које су према наводима других аутора (Cosme и сар., 2018) карактеристичне за грожђе које је употребљено као извор полифенола у овој дисертацији. За време складиштења, запажено је да се садржај екстрахованих полифенола повећава, што се према литературним подацима (Leistner, 1986) може објаснити концентровањем састојака кобасице захваљујући отпуштању воде у току сушења. Интересантно је да је екстракт кобасица са нитритима и полифенолима садржао на крају производње и 30. дана складиштења скоро двоструко више, а након 70. дана чак и петоструко више полифенола него кобасице са полифенолима без нитрита, иако је иста количина праха којица и семенки грожђа додата у надев кобасица. Ово би се могло објаснити склоношћу полифенола да се везују за протеине и граде нерастворљиве комплексе у складу са наводима Charlton и сар. (2002), што је узроковало лимитирану екстрактивност полифенола из кобасице са полифенолима без нитрита. Што се тиче кобасица са

полифенолима и нитритима, мора се узети у обзир да захваљујући реактивности полифенола са нитритима, што описују Takahata и сар., (2017), настају одређени растворљиви деривати које је могуће лакше екстраховати из кобасица, али ови процеси би требало да буду потврђени додатним испитивањима.

Пошто полифеноли могу да остваре низ позитивних ефеката на здравље људи, о чему говоре бројни литературни подаци (Pandey и Rizvi, 2014; Đudarić и сар., 2015; Hügel и сар., 2016, Molino и сар., 2016; Xu и сар., 2017; Costa и сар., 2017) ферментисане кобасице обogaћене полифенолима поседују и одређени потенцијал као функционална храна. Поред тога, концепт функционалне хране подразумева не само додавање функционалних додатака већ и смањење потенцијално штетних састојака хране (Vasilev и сар., 2017), тако да кобасице произедене без нитрита уз додатак полифенола испуњавају оба наведена принципа од зачаја за дизајнирање функционалних производа од меса.

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Додати полифеноли нису утицали на процесе ферментације и сушења кобасица. Између испитиваних хемијских параметара квалитета свих експерименталних група кобасица нису утврђене статистички значајне разлике ($p > 0,05$).
2. Кобасице са полифенолима без додатка нитрита садржале су нитрите у траговима, што је било значајно мање ($p < 0,05$) у поређењу са контролним и кобасицама са нитритима и полифенолима. Кобасице са нитритима и полифенолима садржале су значајно више ($p < 0,05$) нитрата него контролне кобасице.
3. Пероксидни број и TBARS вредност били су значајно већи ($p < 0,05$) код контролних кобасица у поређењу са обе групе кобасица обогачених полифенолима. Уједно, код кобасица произведених са додатком нитрита и полифенола утврђен је значајно већи ($p < 0,05$) интензитет оксидације липида у односу на кобасице са полифенолима без нитрита.
4. Између броја бактерија из фамилије *Micrococcaceae*, *Enterococcaceae* и бактерија млечне киселине у свим експерименталним групама није утврђена разлика ($p > 0,05$) и вредности су биле типичне за ферментисане кобасице. Кобасице обогачене полифенолима садржале су 14. и 21. дана производње значајно мањи ($p < 0,05$) број бактерија узрочника квара из фамилије *Pseudomonadaceae* у односу на контролне кобасице. Ни у једној групи испитиваних кобасица нису изоловане патогене бактерије (*Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*).
5. Инструментални параметри боје по CIE L*a*b* систему били су код свих експерименталних група кобасица у границама уобичајеним за ферментисане кобасице. При томе су кобасице са полифенолима биле тамније и имале су слабији интензитет црвене и жуте боје у поређењу са контролном групом.
6. Сензорска својства свих група кобасица високо су оцењена до 130. дана, док су на крају складиштења оцене биле у оквиру лимита прихватљивости. Кобасице без нитрита су на почетку складиштења имале значајно слабије ($p < 0,05$) оцењену боју од контролне групе и кобасица са нитритима и полифенолима, али од 70. дана па до краја складиштења није било разлика ($p > 0,05$) у оценама за боју између експерименталних група. Између оцена за изглед пресека, конзистенцију, мирис и укус није било значајне разлике ($p > 0,05$) код свих експерименталних група.
7. Укупан садржај биогених амина на почетку складиштења био је значајно већи ($p > 0,05$) код кобасица са полифенолима без нитрита у односу на контролну групу и кобасице са нитритима и полифенолима. У току складиштења садржај биогених амина се није битније мењао код контролне групе и кобасица са нитритима и полифенолима, док се код кобасица без нитрита додатно повећао до 190. дана, а потом опао до краја складиштења. Код нарезака кобасица, укупан садржај биогених амина био је већи него код целих кобасица, при чему су највеће вредности утврђене 100. дана код кобасица са полифенолима без нитрита.
8. Садржај вазоактивних амина хистамина и тирамина био је у границама уобичајеним за ферментисане кобасице, при чему је њихов највећи садржај је утврђен 130. дана складиштења код нарезака и 190. дана у целим кобасицама са полифенолима без нитрита.
9. Најдоминантније фенолно једињење код обе групе кобасицама са полифенолима (са и без нитрита) био је каемпферол-6-О-глукозид, а затим следе кверцетин, лутеолин-7-О-

глукозид, изокверцетин, катехин, сиригинска киселина и П-кумаринска киселина. Остала једињења била су присутна у траговима.

10. Одрживост кобасица са полифенолима без додатка нитрита била је иста као код кобасица са додатком нитрита, без обзира да ли су складиштене као целе кобасице или наресци, што охрабрује потенцијалну употребу полифенола као замене за нитрите у ферментисаним кобасицама, при чему је потребно пронаћи адекватно решење за смањење продукције биогених амина код ових производа.

8. СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ

1. Alves PS, Alfaia CM, Škrbić BD, Živančev JR, Fernandes MJ, Bessa RJB, Fraqueza MJ. Screening chemical hazards of dry fermented sausages from distinct origins: Biogenic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy elements. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017; 59:124-131
2. Alberto MR, Canavosio MAR, Manca de Nadra MC: Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology* 2006, 9: 205-209.
3. Anon. Правилник о квалитету уситњеног меса, полупроизвода од меса и производа од меса, Сл. Гласник РС, 50/2019.
4. Balzan S., Taticchi A., Cardazzo B., Urbani S., Servili M., Di Lecce G., Zabalza I.B., Rodriguez-Estrada M.T., Novelli E., Fasolato L. Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives. *LWT - Food Science and Technology*, 2017. 85, 89-95.
5. Bozkurt H, Bayram M. Colour and textural attributes of sucuk during ripening. *Meat Science* 2006; 73: 344–350.
6. Careri M, Mangia A, Barbieri G, Bouoni L, Virgili R, Parolari G: Sensory property relationships to chemical data of italian-type dry-cured ham. *Journal of Food Science* 1993, 58: 968-972.
7. Carmen Vidal Carou M, Teresa Veciana-Nogués M, Luz Latorre-Moratalla M, Bover-Cid S. Biogenic amines: risks and control, in *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, F. Toldrá, Ed. 2014; 413–428, Wiley Blackwell, 2nd Edition, West Sussex, UK.
8. Charlton A, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP: Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50: 1593-1601.
9. Chikthimmah N, Knabel SJ. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in and on vacuum packaged Lebanon Bologna stored at 3.6 and 13.0°C. *Journal of Food Protection* 2001; 64(7): 958–963.
10. Chong CY, Abu Bakar F, Russly AR, Jamilah B, Mahyudin N A MiniReview, The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal* 2011; 18 (3): 867-876.
11. Cosme F, Pinto T, Vilela A: Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Grape Juices: A Chemical and Sensory View. *Beverages* 2018, 4: 22.
12. Costa C, Tsatsakis A, Mamoulakis C, Teodoro M, Briguglio G, Caruso E, Tsoukalas D, Margina D, Dardiotis E, Kouretas D, Fengad C. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology*. 2017; 110: 286-299.
13. De Mey E, De Klerck K, De Maere H, Dewulf L, Derdelinckx G, Peeters MC, Fraeye I, Heydenb YV, Paelinck H. The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation *Meat Science*. 2014; 96:821-28
14. Della Valle CT, Xiao Q, Yang G: Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. *International Journal of Cancer* 2014, 134: 2917-2926.
15. Demeyer D, Raemaekers M, Rizzo A, Holck A, De Smedt A, Ten Brink B, Hagen B, Montel C, Zanardi E, Murbrekk E, Leroy F, Vendendriessche F, Lorentsen K, Venema K, Sunesen L, Stahnke L, De Vuyst L, Talon R, Chizzolini R, Eerola S. Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International*, 2000; 33 (3-4): 171–180.
16. Džinić N, Ivić, M, Jokanović M, Šojić B, Škaljac S, Tomović V. Chemical, Color, Texture and Sensory Properties of Čajna Kobasica, a Dry Fermented Sausage. *Quality*

- of Life 2016; 7(1-2):5-11.
17. Đudarić L, Fužinac-Smojver A, Muhvić D, Giacometti J. The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis. *Food Research International*. 2015; 77: 290-298
 18. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015, 13 (1): 3991.
 19. Ferreira V, Barbosa J, Silva J, Vendeiro S, Mota A, Silva F, Monteiro MJ, Hogg T, Gibbs P, Teixeira P: Chemical and microbiological characterisation of "Salpicão de Vinhais" and "Chouriça de Vinhais": Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food microbiology* 2007, 24:618-623.
 20. Fontana C, Bassi D, López C, Pisacane V, Otero MC, Puglisi E, Rebecchi A, Cocconcelli PS, Vignolo G. Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. *International Journal of Food Microbiology*. 2016; 236:17-25.
 21. FSIS. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products, 2011, Federal Register, Dept of Agriculture, USA, 76, 58157.
 22. Gençcelep H, Kaban G, Kaya M. Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Science* 2007; 77: 424–430
 23. Glisic M, Baltic M, Glisic M, Trbovic D, Jokanovic M, Parunovic N, Dimitrijevic M, Suvajdzic B, Boskovic M, Vasilev D: Inulin-based emulsion-filled gel as a fat replacer in prebiotic and PUFA enriched dry fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology* 2019, 54:787-797.
 24. Gimeno O, Ansorena D, Astiasarán I, Bello J. Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. *Food Control* 2000; 69: 195-200.
 25. Gwiazdowska D, Ju K, Jasnowska-Maecka J, Kluczyska K: The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth. *Acta Biochimica Polonica* 2015, 62: 895-901.
 26. Hammes WP, Bantleon A, and Min S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 1990; 87 (1-2): 165–173.
 27. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 2012; 36 (4); 815–836.
 28. Hernández-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogues M T, Marine-Font A, Vidal-Carou M C. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45: 2098–2102.
 29. Holck A, Axelsson L, McLeod A, Rode TM, Heir E: Health and Safety Considerations of Fermented Sausages. *Journal of Food Quality* 2017, Article ID 9753894..
 30. Holland CD: Determination of malonaldehyde as an index of rancidity in nut meats. *Journal of the AOAC* 1971, 54: 1024-1026.
 31. Honikel KO, Hamm R: Measurement of water-holding capacity and juiciness. In: *Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products* (edited by A.M. Pearson & T.R. Dutson). Boston, MA: Springer US; 1994, 125-161.
 32. Hügel HM, Jackson N, May B, Anthony L, Xueb CC. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*. 2016; 23: 220-231.
 33. Hughes MC, JP Kerry, EK Arendt, PM Kenneally, PLH McSweeney, EE O'Neill. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages, *Meat Science*. 2002; 62: 205-216.
 34. Hunt MC, Acton JC, Benedict RC, Calkins CR, Cornforth DP, Jeremiah LE, Olson DG, Salm CP, Savell JW, Shivas DS. Guidelines for Meat Color Evaluation. *AMSA*, 1991, Champaign.
 35. Incze K. Dry fermented sausages. *Meat Science* 1998, 49(1): 169–177.
 36. ISO 21807:2004 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Determination of water activity. International Organization for Standardization.

37. ISO 11290-1:2017, Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp., Part 1: Detection method.
38. ISO 6579-1:2017, Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*, Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
39. ISO 8586:2012, Sensory analysis, General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors.
40. Kaban G, Kaya M, Lücke FK. Meat starter cultures. *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*. 2012; Taylor and Francis, New York; USA.
41. Kameník J, Saláková A, Bořilová G, Pavlík Z, Standarová E, Steinhauser L. Effect of Storage Temperature on the Quality of Dry Fermented Sausage Polican. *Czech Journal of Food Sciences* 2012; 30 (4): 293–301.
42. Kröckel, L., Bacterial fermentation of meats, in *Fermented Meats*, Campbell-Platt, G. and Cook, P. E., Eds., Blackie Academic and Professional, Suffolk, 1995, 69.
43. Kumar P., Chatli M, Verma AK, Mehta N, Malav OP, Kumar D, Sharma N. Quality, Functionality and Shelf Life of Fermented Meat and Meat Products: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015; DOI: 10.1080/10408398.2015.1074533.
44. Kurt S, Zorba Ö. The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of “sucuk” – A Turkish dry fermented sausage. *Meat Science* 2009; 82: 179–184
45. Kurt S. The Effects of Grape Seed Flour on the Quality of Turkish Dry Fermented Sausage (Sucuk) during Ripening and Refrigerated Storage. *Korean Journal of Food Science Anim Resour.* 2016; 36 (3): 300–308.
46. Laranjo M, Agulheiro-Santos AC, Potes ME, Cabrita MJ, Garcia R, Fraqueza MJ, Elias M. Effects of genotype, salt content and calibre on quality of traditional dry-fermented sausages. *Food Control.* 2015; 56:119-27.
47. Latorre-Moratalla ML, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Frontiers in Microbiology* 2012, 3, article 169.
48. Leistner L. Allgemeines über Rohwurst, Fleischwirtschaft. 1986; 66 (3): 290-300.
49. Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L: Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 2006, 106: 270-285.
50. Lücke FK. Fermented sausages, in *Microbiology of Fermented Foods*, Wood BJB Ed., 1998, 2: 441–483, Blackie Academic Professional, London, UK, 1998.
51. Marco A, Navarro J L, Flores M: The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science* 2006, 73: 660-673.
52. Mendoza E, Garcia ML, Casas C, Selgas M D. Inulin as fat substitute in low fat , dry fermented sausages. *Meat Science* 2001; 57: 387–393.
53. Millar SJ, Moss BW, Stevenson MH. Some observation on the absorption spectra of various myoglobin derivatives found in meat. *Meat Science* 1996; 42: 277–288.
54. Moawad RK, Wafaa M, Abozeid, Nadir A.S. Effect of Nitrite Level and Tea Catechins on Residual Nitrite and Quality Indices of Raw-Cured Sausages. *Journal of Applied Sciences Research* 2012, 8 (2): 815-822.
55. Molino S, Dossena M, Buonocore D, Ferrari F, Venturini L, Ricevuti G, Verri M. Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials. *Life Sciences.* 2016; 161: 69-77.
56. Møller JKS, Jensen JS, Skibsted LH, Chel SK. Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and a commercial starter culture. *European Food Research and Technology* 2003; 216: 463–469.
57. Nowak, Czyzowska , Efenberger, Krala L. Polyphenolic extracts of cherry (*Prunus*

- cerasus L.) and blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as natural preservatives in meat products. *Food Microbiology*. 2016; 59: 142-149.
58. Ordóñez JA , Hierro EM, Bruna JM, De la Hoz L. Changes in the Components of Dry-Fermented Sausages during Ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1999; 39 (4): 329-367.
 59. Ordóñez M, Rovira J, Jaime I. The relationship between the composition and texture of conventional and low-fat frankfurter. *International Journal of Food Science and Technology* 2001; 36: 749–758.
 60. Pandey KB, Rizvi SI. Role of red grape polyphenols as antidiabetic agents. *Integrative Medicine Research*. 2014;3: 119-125.
 61. Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V, Stefan G. Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety* 2017;16:,1243-1268.
 62. Pierre C. Foodborne outbreaks, in *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, F. Toldr'a, Ed., 2015; 435–439, Wiley Blackwell, West Sussex, UK.
 63. Radetić, P. *Sirove kobasice*. 1997; Ilijanum, Šid.
 64. Rhoades JR, Duffy G, Koutsoumanis K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiology* 2009; 26 (4) 357–376.
 65. Ribas-Agustí, Gratacós-Cubarsí, Sárraga, M. Guàrdia D. García-Regueiro JA, Castellari M. Stability of phenolic compounds in dry fermented sausages added with cocoa and grape seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 2014; 57:329-336.
 66. Safa H, Gatellier P, Lebert A, Picgirard L, Mirade PS. Effect of Combined Salt and Animal Fat Reductions on Physicochemical and Biochemical Changes During the Manufacture of Dry-Fermented Sausages. *Food Bioprocess Technol* 2015; 8:2109–2122.
 67. Sagratini, G., Fernandez-Franzon, M., De Berardinis, F., Font, G., Vittori, S., Manes, J., Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Food Chemistry*. 2012; 132, 537-543.
 68. Saičić S, Vasilev D, Vuković I, Trbović D. Lipid Oxidation in Kulen, Traditional Raw Sausage from Northern Serbia. Conference: 9th Euro Fed Lipid Congress. September 2011. Rotterdam, The Netherlands.
 69. Salgado A, Fontan MCG, Franco I, Lopez M, Carballo J. Biochemical changes during the ripening of Chorizo de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chemistry* 2005; 92: 413–424.
 70. Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 1996; 29 (7) 675–690.
 71. Spano G, Russo P, A. Lonvaud-Funel A, P Lucas, H Alexandre, C Grandvalet, E Coton, M Coton, L Barnavon, B Bach, F Rattray, A Bunte, C Magni, V Ladero, M Alvarez, M Fernández, P Lopez, P F de Palencia, A Corbi, H Trip, J S Lolkema. Biogenic amines in fermented foods, *European Journal of Clinical Nutrition* 2010; 64, 95–100..
 72. SRPS EN ISO 3960:2011, Animal and vegetable fats and oils, Determination of peroxide value, Iodometric (visual) endpoint determination (ISO 3960:2007, corrected version 2009-05-15).
 73. SRPS EN ISO 660:2015, Animal and vegetable fats and oils, Determination of acid value and acidity (ISO 660:2009).
 74. SRPS ISO 1442:1998, Meat and meat products, Determination of moisture content (Reference method).
 75. SRPS ISO 1444:1998, Meat and meat products, Determination of free fat content.

76. SRPS ISO 1841-1:1999, Meat and meat products, Determination of chloride content Volhard method.
77. SRPS ISO 2917:2004, Meat and meat products, Measurement of pH, Reference method.
78. SRPS ISO 2918:1999, Meat and meat products, Determination of nitrite content (Reference method).
79. SRPS ISO 3091:1999, Meat and meat products, Determination of nitrate content (Reference method).
80. SRPS ISO 3496:2002, Meat and meat products, Determination of hydroxyproline content.
81. SRPS ISO 936:1999, Meat and meat products, Determination of total ash.
82. SRPS ISO 937:1992, Meat and meat products, Determination of nitrogen content (Reference method).
83. Suvajdžić B, Petronijević R, Teodorović V, Tomović V, Dimitrijević M, Karabasil N, Vasilev D. Qualität der Rohwurst Sremski Kulen, Produktion unter traditionellen und industriellen Bedingungen in Serbien. *Fleischwirtschaft* 2018; 6: 93-99.
84. Suzzi G, Gardini F. Biogenic amines in dry-fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88 (1): 41–54.
85. Takahama U, Hirota S: Possible Reactions of Dietary Phenolic Compounds with Salivary Nitrite and Thiocyanate in the Stomach. *Antioxidants* 2017, 6: 53.
86. Tarladgis BG, Pearson AM, Dugan LR: Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination oxidative rancidity in foods. II Formation of the TBA malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1996, 15: 602.
87. Teodorović V, Smiljanić D, Baltić M, Bunčić O. Biogenic amines formation influenced by tissue enzymes and pH value in the mixture prepared for raw sausages. *Acta veterinaria*. 2000; 50 (1): 51-58.
88. Toldrá F, Rico E, Flores J. Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. *Biochimie* 1992; 74: 291.
89. Toldra F, Y. Hui YH, Astiasaran I, Sebranek JG, Talon R. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, Second edition, 2014.
90. Vasilev D, Glišić M, Dimitrijević M, Karabasil N, Suvajdžić B, Teodorović V: Perspectives in production of functional meat products. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 2017, 85: 012033.
91. Vignolo G M, de Ruíz Holgado AP, Oliver, G. Acid production and proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry sausages. *Journal of Food Protection* 1988; 5: 481, 1988.
92. Vignolo G, Fontana C, Fadda S. Semidry and dry fermented sausages. *Handbook of meat processing*. 2010; 21:379-98.
93. Vukašinić MV, Kurčubić VS, Kaljević VM, Mašković PZ, Petrović MD. Examinations of certain chemical characteristics of fermented dry sausage quality parameters. *Veterinarski glasnik* 2012; 76: 73-84.
94. Vuković I. *Osnove tehnologije mesa, Četvrto izdanje*, 2012; VKS, Beograd.
95. Vukovic I, Petrovic LJ, Vasilev D, Saicic S. Microflora and quality of raw sausages from Northern Serbia produced according to traditional process *Fleischwirtschaft*. 2011; 91:118-122
96. Wójciak KM, Karwowska M, Dolatowski ZJ: Fatty acid profile, color and lipid oxidation of organic fermented sausage during chilling storage as influenced by acid whey and probiotic strains addition. *Scientia Agricola* 2015, 72: 124-131.
97. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences* 2010; 11(2): 622–646.
98. Xu Z, Sun T, Li W, Sun X. Inhibiting effects of dietary polyphenols on chronic eye

- diseases. *Journal of Functional Foods*. 2017; 39: 186-197.
99. Yurchenko S, Mölder U. The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chemistry*.2007; 100:1713-21.
100. Zhang QQ, Jiang M, Rui X, Li W, Chen XH,Dong MS.Effect of rose polyphenols on oxidation, biogenic amines and microbial diversity in naturally dry fermented sausages. *Food Control*. 2017; 78:324-330.

БИОГРАФИЈА

Александра Николић је дипломирала на Факултету ветеринарске медицине у Београду 2016. године са просечном оценом 9,24. Током студија, активно је учествовала у раду Студентског парламента Факултета ветеринарске медицине, у периоду од 2013. године до 2016. године.

Докторске студије уписује школске 2016/2017. године, положила је све предвиђене испите, са просечном оценом 9,94. Као докторанд је као истраживач била укључена у рад на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом "Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производња безбедне хране " (Број пројекта III Е.Б. 46002), а тренутно је истраживач пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под називом "Одабране биолошке опасности за безбедност/квалитет хране анималног порекла и контролне мере од фарме до потрошача" (Број пројекта ТР 31034).

Специјалистичке академске студије и уже специјалистичке студије, завршила је из области Хигијена и технологија намирница анималног порекла.

Приправнички и волонтерски стаж је обавила на Институту за хигијену и технологију меса, где је и тренутно запослена на Одељењу за сензорска и физичка испитивања са паразитологијом.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Александра Николић

Број индекса : 2016/5006

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај полифенола на квалитет, безбедност и одрживост ферментисаних
кобасица

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

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

Име и презиме аутора: Александра Николић
Број индекса: 2016/5006
Студијски програм : Докторске академске студије
Наслов рада: Утицај полифенола на квалитет, безбедност и
 одрживост ферментисаних кобасица

Ментор 1: Др Драган Василев, ванредни професор
Ментор 2: Др Весна Ђорђевић, научни саветник

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Утицај полифенола на квалитет, безбедност и одрживост ферментисаних
кобасица

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

Потпис аутора

У Београду, _____
