

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla



Branko D. Suvajdžić

Doktor veterinarske medicine

**Ispitivanje mikroflore i parametara
kvaliteta sremskog kulena proizvedenog
u industrijskim i tradicionalnim uslovima**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Department of Food Hygiene and Technology of Animal Origin



Branko D. Suvajdžić

Doctor of veterinary medicine

**Microbiota and quality parameters
of Sremski kulen produced
in industrial and traditional conditions**

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2019

MENTORI

Dr Dragan Vasilev, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Vesna Janković, naučni saradnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Mirjana Dimitrijević, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Neđeljko Karabasil, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Vladimir Tomović, vanredni profesor

Tehnološki fakultet Novi Sad

Datum odbrane:

.....

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru projekta „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu” (Ev. Br. III 46009), kao i projekta „Razvoj tradicionalnih tehnologija proizvodnje fermentisanih suvih kobasica sa oznakom geografskog porekla u cilju dobijanja bezbednih proizvoda standardnog kvaliteta” (Ev. Br. TR 31032). Navedene projekte finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvalnica

Pre svega, zahvaljujem se svom mentoru prof. dr Draganu Vasilevu na ukazanom poverenju, neizmernoj podršci, stručnim savetima i posvećenom vremenu tokom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Vesni Janković, drugom mentoru, na pruženoj pomoći tokom izrade doktorske disertacije. Preostalim članovima Komisije, prof. dr Mirjani Dimitrijević, prof. dr Nedeljku Karabasilu i prof. dr Vladimiru Tomoviću, zahvaljujem se na dobronamernim komentarima, sugestijama i dragocenim savetima tokom eksperimentalnog rada i pisanja doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Veri Katić na ukazanom poverenju i pruženoj šansi da se bavim naučno-istraživačkim radom. Uvek ste me podržavali i savetovali. Hvala Vam!

Takođe, želim da se zahvalim dragim kolegama, dr Nikoli Čobanoviću, dr Neveni Grković i dr Milijani Babić na pruženoj pomoći tokom eksperimentalnog rada, korisnim savetima i izuzetnoj kolegijalnosti.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za higijenu i tehnologiju mesa i Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu koji su mi pomagali tokom izvođenja laboratorijskih analiza. Koleginici Svetlani Čolović sam posebno zahvalan na ukazanoj pomoći tokom molekularne identifikacije izolata bakterija mlečne kiseline pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije.

Prof. dr Miloradu Miriloviću i asistentu Branislavu Vojnoviću zahvaljujem se na stručnim savetima tokom statističke obrade rezultata.

Dragi prijatelji, bili ste uz mene sve vreme... Hvala vam!

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, majci Dušanki, ocu Dušanu i sestri Verici koji su me podržavali i verovali u mene sve vreme. Davali ste mi vetar u leđa kada mi je ponestajalo samopouzdanja i snage. Moj uspeh posvećujem vama!

REZIME

Sremski kulen je fermentisana suva kobasica koja se vekovima proizvodi u seoskim domaćinstvima Srema prema jedinstvenoj recepturi i tradicionalnoj tehnologiji, bez upotrebe starter kultura i aditiva. Tradicionalni način proizvodnje sremskog kulena održao se jedino u seoskim domaćinstvima i kod zanatskih proizvođača čiji obim proizvodnje nije dovoljan da zadovolji potrebe tržišta. Usvajanje tradicionalnih normi od strane pojedinih industrijskih proizvođača sa teritorije Srema doprinelo bi unapređenju proizvodnje sremskog kulena. Stoga je istraživanje u okviru ove doktorske disertacije imalo za cilj da se uporedi mikroflora, kao i parametri kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u industrijskim uslovima u skladu sa tradicionalnim zahtevima (ISK), sa mikroflorom i kvalitetom sremskog kulena proizvedenog u seoskom domaćinstvu na tradicionalni način (TSK).

Rezultati mikrobiološkog ispitivanja ove studije pokazuju da su najbrojniji mikroorganizmi tokom zrenja ISK i TSK bile bakterije mlečne kiseline (BMK) praćene mikrokokama i enterokokama. Bakterije iz familija *Pseudomonadaceae* i *Enterobacteriaceae* su izmrle do kraja zrenja, dok patogeni mikroorganizmi, kao što su *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, nisu izolovani ni u jednoj fazi mikrobiološkog ispitivanja industrijskog i tradicionalnog proizvoda iz ove studije. Identifikacija bakterija mlečne kiseline izvršena je pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije. Od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz ISK, 137 izolata (76,11%) je identifikovano kao *Lactobacillus sakei*, 18 (10%) kao *Lactobacillus curvatus*, 5 (2,78%) kao *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, 2 (1,11%) kao *Lactobacillus paraplantarum* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, dok 16 izolata (8,89%) nije identifikovano. Sa druge strane, od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz TSK, 161 izolat (89,64%) je identifikovan kao *Lactobacillus sakei*, 13 (7,22%) kao *Lactobacillus curvatus* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, a 4 izolata (2,22%) nije identifikovano.

Tokom ispitivanja fizičko-hemijskih parametara, utvrđeno je da se pH vrednost sremskog kulena dobijenog u industrijskim uslovima značajno razlikovala od pH vrednosti proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima tokom celog perioda zrenja, na nivou statističke značajnosti od 5% ili 0,1%. Na kraju zrenja pH vrednost ISK i TSK iznosila je $5,64 \pm 0,03$ i $5,46 \pm 0,02$ redom, što je u skladu sa zahtevima važećeg *Pravilnika o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, 94/2015)* i *Elaborata o zaštiti geografskog porekla „Sremski kulen“ (2013)*. Tokom zrenja ISK i TSK došlo je do značajnog sušenja proizvoda. Posledično je kod ISK utvrđen kalo sušenja od 54,71% i a_w vrednost od

0,800±0,01, dok je kod TSK kalo sušenja iznosio 53,14%, a a_w vrednost 0,815±0,00.

Utvrđene niske a_w vrednosti ukazivale su na mikrobiološku stabilnost proizvoda.

Analizom hemijskog sastava, utvrđeno je da ISK i TSK ispunjavaju zahteve *Pravilnika (Sl. glasnik RS, 94/2015)* i *Elaborata (2013)* u pogledu sadržaja vlage, masti, proteina mesa, kao i sadržaja kolagena u proteinima mesa. Oba proizvoda su imala sadržaj vlage ispod 35%. U gotovom proizvodu industrijskog porekla utvrđen je sadržaj masti od 29,00±0,72%, dok je u tradicionalnom proizvodu bio manji i iznosio je 26,21±4,37% ($P>0,05$). Sadržaj proteina mesa u ispitanim proizvodima bio je približno isti i iznosio je 36,10±1,21% za ISK, odnosno 36,46±1,21% za TSK. Sa druge strane, ISK je imao značajno veći relativni sadržaj kolagena (6,18±0,41%) od TSK (5,27±0,71%) ($P<0,05$). Ispitivanjem hidrolitičkih i oksidativnih promena masti, utvrđen je nizak stepen lipolize i oksidacije masti tokom zrenja ISK i TSK. Kiselinski broj se konstantno povećavao tokom proizvodnog ciklusa, tako da je u gotovom proizvodu industrijskog porekla iznosio 3,45±0,58 mg KOH/g, dok je kiselinski broj proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima bio značajno manji i iznosio je 2,39±0,20 mg KOH/g ($P<0,01$). Na kraju zrenja TBARS vrednost industrijskog proizvoda iznosila je 0,11±0,02 mg MDA/kg, a tradicionalnog 0,11±0,04 mg MDA/kg, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između istih ($P>0,05$). Sa druge strane, proces proteolize u ISK i TSK, bio je izražen tokom celog proizvodnog ciklusa (ISK=10,03±0,30-18,36±0,86%; TSK=10,15±0,84-17,97±0,37%), pri čemu je u poslednjoj fazi proizvodnje utvrđeno smanjenje indeksa proteolize kod oba proizvoda, kao posledica dehidracije proizvoda odnosno povećanja koncentracije soli. Tokom zrenja, značajno veća akumulacija biogenih amina utvrđena je u ISK (1263,16 mg/kg) nego u TSK (410,83 mg/kg) ($P<0,001$). Triptamin i feniletilamin su detektovani u svakoj ispitanoj fazi zrenja eksperimentalnih proizvoda. Sadržaj tiramina, kadaverina i putrescina se povećavao tokom zrenja oba proizvoda. Na kraju zrenja sadržaj histamina u ISK iznosio je 12,36±1,72 mg/kg, a u TSK 16,55±5,22 mg/kg, pri čemu utvrđene koncentracije histamina nisu bile zabrinjavajuće sa aspekta bezbednosti proizvoda.

ISK i TSK su ispunili zahteve propisane *Elaboratom (2013)* i u pogledu senzorskih svojstava. Statistički značajna razlika između ISK i TSK tokom senzorne analize utvrđena je samo u pogledu mirisa i ukusa, jer je industrijski proizvod imao prihvatljiviju aromu za većinu senzoričara. S obzirom da je utvrđena prosečna ocena ukupnog senzornog kvaliteta za ISK iznosila 96,43±2,88, a za TSK 95,36±1,14, može se zaključiti da su u pitanju proizvodi visokog kvaliteta. Instrumentalnim ispitivanjem boje površine ISK i TSK, utvrđeno je da je

ISK imao značajno veću L^* vrednost ($L^*_{ISK}=30,13\pm 0,29$; $L^*_{TSK}=27,25\pm 0,43$), udeo crvene boje ($a^*_{ISK}=7,05\pm 0,32$; $a^*_{TSK}=6,07\pm 0,97$), kao i udeo žute boje ($b^*_{ISK}=9,17\pm 0,36$; $b^*_{TSK}=8,13\pm 0,71$). Međutim, boja površine oba proizvoda bila je u skladu sa zahtevom *Elaboratom* (2013). Instrumentalnim ispitivanjem boje poprečnog preseka ISK i TSK, utvrđeno je da je ISK imao značajno veću L^* vrednost ($35,71\pm 0,91$), udeo crvene boje ($23,99\pm 0,60$), kao i udeo žute boje ($18,08\pm 0,99$) od TSK ($L^*=32,65\pm 0,44$; $a^*=18,26\pm 1,36$; $b^*=13,04\pm 0,72$). Međutim, statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu nijanse boje, kao i relativnog odnosa crvene i žute boje ($P>0,05$). Značajno manji udeo crvene boje kod TSK nije ukazivao na senzorno manje prihvatljivu boju proizvoda, jer je veoma bitan udeo žute boje, kao i karakteristike same boje. Merenjem instrumentalnih parametara teksture, utvrđena je značajno veća vrednost za čvrstoću (12796 ± 1475 g) i žvkljivost ($3178\pm 321,7$ g) kod ISK, nego kod TSK (čvrstoća= 10048 ± 1197 g; žvkljivost= $2675\pm 395,7$ g), dok statistički značajna razlika nije utvrđena u pogledu elastičnosti i kohezivnosti između ISK i TSK ($P>0,05$). Manja vrednost za žvkljivost utvrđena kod TSK je u saglasnosti sa rezultatima senzorne analize, s obzirom da je ovaj proizvod dobio veću ocenu za teksturu od ISK jer je bio sočniji tokom žvakanja.

Uz poštovanje tradicionalnih normi, industrijska proizvodnja sremskog kulena može da obezbedi kvalitetan proizvod sa prepoznatljivim senzornim osobinama, kao i tradicionalna proizvodnja u seoskim domaćinstvima. Pored toga, ovaj način proizvodnje doprineo bi očuvanju kvaliteta i autentičnosti sremskog kulena, kao i bezbednosti proizvoda.

Ključne reči: sremski kulen, fermentisane suve kobasice, industrijska i tradicionalna proizvodnja, mikroflora, kvalitet, biogeni amini.

Naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

Uža naučna oblast: Tehnologija mesa

UDK broj: 637.524:637.07

SUMMARY

Sremski Kulen is a dry fermented sausage which has been produced for many centuries in rural households of Srem, according to a unique recipe and traditional technology, without the use of starter cultures and additives. The traditional manner of producing Sremski Kulen is being used only in rural households and by craftsmen whose production is insufficient to satisfy the market needs. The adoption of traditional norms by some industrial producers from the territory of Srem would contribute to the improvement of its production. Therefore, the research within this doctoral dissertation aimed to compare the microbiota and quality parameters of Sremski Kulen produced in industrial conditions according to traditional requirements with the microbiota and quality of Sremski Kulen produced on traditional manner in rural household.

The results of the microbiological examination in this study showed that the most numerous microorganisms during the ripening of industrial (ISK) and traditional (TSK) Sremski kulen were lactic acid bacteria (LAB) followed by *Micrococcaceae* and *Enterococcaceae*. Bacteria from the *Pseudomonadaceae* and Enterobacteriaceae families died off until the end of the ripening process, while pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were not isolated at any stage of the microbiological examination of both products from this study. Identification of LAB was performed using the MALDI-TOF mass spectrometry. Out of a total of 180 BMK isolates from ISK, 137 isolates (76.11%) were identified as *Lactobacillus sakei*, 18 (10%) as *Lactobacillus curvatus*, 5 (2.78%) as *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, 2 (1.11%) as *Lactobacillus paraplantarum* and 2 (1.11%) as *Leuconostoc mesenteroides*, while 16 isolates (8.89%) were not identified. On the other hand, out of a total of 180 BMK isolates originating from TSK, 161 isolates (89.64%) were identified as *Lactobacillus sakei*, 13 (7.22%) as *Lactobacillus curvatus* and 2 (1.11%) as *Leuconostoc mesenteroides*, while 4 isolates (2.22%) were not identified.

During the examination of physicochemical parameters, it was found that the pH value of ISK differed significantly from the pH of TSK during the entire ripening period, at a level of statistical significance of 5% or 0.1%. At the end of ripening, the pH value of the ISK and TSK was 5.64 ± 0.03 and 5.46 ± 0.02 , which is in accordance with the requirements of the *Official Gazette* (2015) and the *Elaborate* (2013). During the ripening of ISK and TSK, a significant drying was observed. Consequently, weight loss of ISK amounted 54.71% with a_w value of 0.800 ± 0.01 , while weight loss of TSK was 53.14% with the a_w value of

0.815±0.00. The identified low a_w values indicated the microbiological stability of the products.

The analysis of the chemical composition demonstrated that both ISK and TSK meet the requirements of the *Official Gazette (2015)* and the *Elaborate (2013)* regarding the contents of moisture, fat, meat protein, including the content of collagen in meat proteins. The observed moisture content for both products was below 35%. At the end of ripening TSK had lower fat content ($26.21\pm 4.37\%$) than ISK ($29.00\pm 0.72\%$) but without significant difference ($P>0.05$). The meat protein content of the tested products was approximately the same and amounted to $36.10\pm 1.21\%$ for the ISK and $36.46\pm 1.21\%$ for the TSK. Differently, the ISK had a significantly higher relative collagen content than TSK ($P<0.05$). By examining the hydrolytic and oxidative changes in fat, a low degree of fat lipolysis and oxidation of ISK and TSK was determined. The acid value was constantly increasing during the production cycle, so that in the final product of industrial origin it was 3.45 ± 0.58 mg KOH/g, while the acid value of the product obtained in traditional conditions was significantly lower and amounted 2.39 ± 0.20 mg KOH/g ($P<0.01$).

At the end of the ripening process, the TBARS values of the industrial and traditional products were 0.11 ± 0.02 mg MAL/kg and 0.11 ± 0.04 mg MAL/kg, with no statistically significant difference between them ($P>0.05$). Contrarily, the proteolysis process in ISK and TSK was expressed throughout the all production cycle (ISK= 10.03 ± 0.30 - $18.36\pm 0.86\%$; TSK= 10.15 ± 0.84 - $17.97\pm 0.37\%$). The decrease in the proteolysis index for both products was observed in the final stage of production due to dehydration of the products and increased salt concentration. During the ripening process, a significantly higher accumulation of biogenic amines was determined in ISK (1263.16 mg/kg) than in TSK (410.83 mg/kg) ($P<0.001$). Triptamine and phenylethylamine were detected in each of the examined ripening stages of the experimental products. The content of tiramine, cadaverine and putrescine increased during the ripening of both products. At the end of the ripening, the histamine contents in ISK and TSK were 12.36 ± 1.72 mg/kg and 16.55 ± 5.22 mg/kg. However the established histamine concentrations were not concerning from the aspect of product safety.

Both ISK and TSK have fulfilled the requirements presented in the *Elaborate (2013)* and in terms of their sensory properties. A statistically significant difference between ISK and TSK during sensory analysis was determined only in terms of smell and taste, since the industrial product had a more acceptable flavor ($P<0.001$). Considering that the total

sensory score for ISK and TSK was 96.43 ± 2.88 and 95.36 ± 1.14 , it can be concluded that these products are both of high quality. During the measurement of the surface color of ISK and TSK, it was found that the ISK had a significantly higher L^* value ($L^*_{\text{ISK}} = 30.13 \pm 0.29$; $L^*_{\text{TSK}} = 27.25 \pm 0.43$), redness ($a^*_{\text{ISK}} = 7.05 \pm 0.32$; $a^*_{\text{TSK}} = 6.07 \pm 0.97$) and yellowness ($b^*_{\text{ISK}} = 9.17 \pm 0.36$; $b^*_{\text{TSK}} = 8.13 \pm 0.71$). However, the surface colour of both products was in accordance with the requirements of *Elaborate (2013)*. The instrumental investigation of colour on the cross-section showed that the ISK had a significantly higher L^* value (35.71 ± 0.91), as well as redness (23.99 ± 0.60) and yellowness (18.08 ± 0.99) than TSK ($L^* = 32.65 \pm 0.44$; $a^* = 18.26 \pm 1.36$; $b^* = 13.04 \pm 0.72$). However, a statistically significant difference between ISK and TSK was not determined in terms of hue angle, as well as the relative ratio of redness and yellowness ($P > 0.05$). Significantly lower value for redness in the TSK did not indicate a sensorial less acceptable colour of the product since the yellowness as well as the colour characteristics are very important.

By measuring the texture instrumental parameters, a significantly higher value for hardness (12796 ± 1475 g) and chewiness (3178 ± 321.7 g) was determined for ISK than for TSK (hardness = 10048 ± 1197 g; chewiness = 2675 ± 395.7 g), while a statistically significant difference was not determined in terms of springiness and cohesiveness between ISK and TSK ($P > 0.05$). The lower value of chewiness determined for TSK is in accordance with the results of the sensory analysis since this product received a higher grade for its texture than ISK because it was juicier during chewing.

Respecting traditional norms, the industrial production of Sremski Kulen can provide a quality product with recognizable sensory properties, relative to traditional production in rural households. Additionally, this manner of production would contribute to the preservation of quality and authenticity of Sremski Kulen as well the product safety.

Key words: Sremski Kulen, dry fermented sausages, industrial and traditional production, microbiota, quality, biogenic amines.

Scientific field: Meat hygiene and technology

Field of academic expertise: Meat technology

UDK number: 637.524:637.07

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. SREMSKI KULEN	4
2.1.1. Izbor i priprema sirovine.....	4
2.1.2. Priprema nadeva	6
2.1.3. Punjenje i ceđenje	8
2.1.4. Dimljenje.....	8
2.1.5. Zrenje	10
2.1.5.1. Fermentacija i mikrobiološka sukcesija	10
2.1.5.2. Sušenje	14
2.1.5.3. Hidrolitičke i oksidativne promene lipida tokom zrenja	16
2.1.5.4. Proteolitičke promene tokom zrenja	17
2.1.5.5. Biogeni amini	19
2.1.5.6. Formiranje senzorskih svojstava	22
2.1.6. Skladištenje sremskog kulena.....	24
2.1.7. Kriterijumi kvaliteta za sremski kulen	25
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	26
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	29
4.1. MATERIJAL.....	30
4.2. METODE	33
4.2.1. MIKROBIOLOŠKA ISPITIVANJA	33
4.2.1.1. Ispitivanje broja mikroorganizama	33
4.2.1.2. Identifikacija BMK pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije	34
4.2.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ISPITIVANJA	35
4.2.2.1. Određivanje pH vrednosti	35
4.2.2.2. Određivanje kala sušenja	35
4.2.2.3. Određivanje a_w vrednosti.....	35
4.2.3. HEMIJSKA ISPITIVANJA	36
4.2.3.1. Ispitivanje hemijskog sastava.....	36
4.2.3.2. Ispitivanje hidrolitičkih i oksidativnih promena lipida.....	38
4.2.3.3. Ispitivanje proteolitičkih promena tokom zrenja - indeks proteolize... ..	39
4.2.3.4. Određivanje sadržaja biogenih amina... ..	39

4.2.4. ISPITIVANJE SENZORSKIH SVOJTAVA	41
4.2.4.1. Kvantitativna deskriptivna analiza	41
4.2.4.2. Instrumentalno ispitivanje boje	42
4.2.4.3. Instrumentalno ispitivanje teksture.....	43
4.2.5. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	44
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	45
5.1. MIKROBIOLOŠKA ISPITIVANJA	46
5.1.1. Ispitivanje broja mikroorganizama.....	46
5.1.2. Uticaj fizičko-hemijskih parametara na razvoj mikroflore tokom zrenja.....	49
5.1.3. Identifikacija BMK pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije	50
5.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ISPITIVANJA	51
5.2.1. pH vrednost	51
5.2.2. Kalo sušenja	52
5.2.3. a_w vrednost.....	52
5.3. HEMIJSKA ISPITIVANJA	53
5.3.1. Hemijski sastav	53
5.3.2. Hidrolitičke i oksidativne promene lipida.....	55
5.3.3. Proteolitičke promene tokom zrenja - indeks proteolize. . .	56
5.3.4. Biogeni amini. . .	57
5.4. ISPITIVANJE SENZORSKIH SVOJTAVA.....	60
5.4.1. Kvantitativna deskriptivna analiza	60
5.4.2. Instrumentalni parametri boje	62
5.4.3. Instrumentalni parametri teksture.....	63
6. DISKUSIJA.....	64
6.1. MIKROBIOLOŠKA ISPITIVANJA	65
6.1.1. Ispitivanje broja mikroorganizama.....	65
6.1.2. Identifikacija BMK pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije	68
6.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ISPITIVANJA	70
6.2.1. pH vrednost	70
6.2.2. Kalo sušenja	71
6.2.3. a_w vrednost.....	72
6.3. HEMIJSKA ISPITIVANJA	73
6.3.1. Hemijski sastav	73

6.3.2. Hidrolitičke i oksidativne promene lipida tokom zrenja.....	76
6.3.3. Proteolitičke promene tokom zrenja - indeks proteolize... ..	78
6.3.4. Biogeni amini... ..	79
6.4. ISPITIVANJE SENZORSKIH SVOJSTAVA.....	84
6.4.1. Kvantitativna deskriptivna analiza	84
6.4.2. Instrumentalni parametri boje	85
6.4.3. Instrumentalni parametri teksture.....	88
7. ZAKLJUČCI	90
8. LITERATURA.....	93

1. UVOD



Sremski kulen je fermentisana suva kobasica koja se vekovima proizvodi u seoskim domaćinstvima Srema prema jedinstvenoj recepturi i tradicionalnoj tehnologiji, bez upotrebe starter kultura i aditiva. Tradicionalni način proizvodnje sremskog kulena održao se jedino u seoskim domaćinstvima i kod zanatskih proizvođača čiji obim proizvodnje nije dovoljan da zadovolji potrebe tržišta. Proizvodnja sremskog kulena u seoskim domaćinstvima svakako obezbeđuje autentičnost proizvoda, ali kvalitet proizvoda varira od proizvođača do proizvođača. Sa druge strane, industrijski proizvođači odstupaju od tradicionalnih normi i plasiraju proizvod pod nazivom „kulen” koji se u pogledu kvaliteta i senzornih karakteristika značajno razlikuje od tradicionalnog sremskog kulena. Proizvodnja „kulena” u strogo kontrolisanim uslovima, zasnovana na upotrebi starter kultura, aditiva i veštačkih omotača, nesumnjivo doprinosi dobijanju bezbednog proizvoda sa mikrobiološkog aspekta, ali ne i proizvoda koji odgovara tradicionalnom sremskom kulenu u pogledu senzorskog kvaliteta (*Vuković i sar., 2011*). Stoga, *Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, 94/2015)* po prvi put izdvaja „domaći kulen” kao proizvod koji se dobija od svinjskog mesa i masnog tkiva uz dodatak soli ili soli za salamurenje, kao i mlevene začinske paprike i puni isključivo u prirodne omotače koji mogu biti slepo crevo (kata) ili zadnje crevo (kular) od svinja. Važeći *Pravilnik (Sl. glasnik RS, 94/2015)*, takođe, propisuje zahteve za „domaći kulen” koji su u pogledu fizičko-hemijskih i hemijskih parametara strožiji od zahteva propisanih za industrijski „kulen”.

Poslednjih godina raste interesovanje potrošača za tradicionalnim proizvodima od mesa, kako u svetu tako i u Republici Srbiji. Potrošači sve više cene kvalitet, a pre svega autentičnost ovih proizvoda. Takođe je prisutan trend unapređenja tradicionalnog načina proizvodnje u cilju dobijanja proizvoda ujednačenog kvaliteta i istovremeno bezbednih sa mikrobiološkog aspekta (*Rocha i Elias, 2016*). Kako bi se to postiglo, teži se ka povezivanju tradicionalnog načina proizvodnje sa industrijskim potencijalom i najnovijim tehnološkim dostignućima, kako bi se na taj način ostvarila njihova sinergija u proizvodnji tradicionalnih proizvoda od mesa (*Rocha i Elias, 2016*). Usvajanje tradicionalnih normi od strane pojedinih industrijskih proizvođača sa teritorije Srema doprinelo bi unapređenju proizvodnje sremskog kulena, ali neophodno je ispitati da li bi proizvod izrađen u skladu sa tradicionalnim zahtevima, ali u industrijskim uslovima, bio sličan sremskom kulenu koji se proizvodi u seoskim domaćinstvima.



2. PREGLED LITERATURE



2.1. SREMSKI KULEN

Kulen je fermentisana suva kobasica koja se, kao deo gastronomskog nasleđa, vekovima proizvodi na jednom ograničenom području Panonske nizije, koja obuhvata severnu Srbiju (Srem i Bačka), Hrvatsku (Slavonija i Baranja) i južnu Mađarsku (*Vuković i sar., 2012*). Shodno području gde se proizvodi, kulen je dobio i odgovarajući naziv, pa su tako prepoznatljivi sremski kulen, lemeški kulen, petrovska klobasa (Republika Srbija), slavonski kulen i baranjski kulen (Hrvatska). Iako se u osnovi radi o istom proizvodu, svaki varijetet kulena ima svoja prepoznatljiva svojstva, koja su rezultat uticaja različitih prirodnih faktora, specifičnih za područje u kojem se izrađuju. Zbog autentične proizvodnje i prepoznatljivog kvaliteta, sremski kulen je zaštićen oznakom geografskog porekla i zvaničnim *Elaboratom o zaštiti geografskog porekla „Sremski kulen” (2013)* propisan je tradicionalni način proizvodnje sremskog kulena, kao i zahtevi koje proizvod mora da ispuni (*Suvajdžić i sar., 2018*). Dijagram toka proizvodnje sremskog kulena prikazan je na slici 1.

2.1.1. Izbor i priprema sirovine

Kao osnovna sirovina za proizvodnju sremskog kulena koristi se svinjsko meso I kategorije i čvrsto masno tkivo dobijeno klanjem životinja uzgojenih na području Srema. Za proizvodnju mesa namenjenog izradi sremskog kulena koriste se isključivo obeležena, zdrava ženska i kastrirana muška grla, starija od 12 meseci, najčešće landras i jorkšir rase, kao i njihovi hibridi. Takođe, može se koristiti i meso dobijeno klanjem grla duroka, mangulice i fajferice. Pogonije je meso starijih, odnosno zrelih životinja (12 i više meseci) koje sadrži više suve materije i pigmenta mioglobina od mesa mlađih životinja (*Teodorović i sar., 2015*). Sa aspekta sadržaja masnog i vezivnog tkiva, meso treba da ispunjava zahteve važećeg Pravilnika o kvalitetu zaklanih svinja i kategorizaciji svinjskog mesa (*Sl. glasnik RS, 2/85 i 12/85*) za meso I kategorije, pod kojim se podrazumeva meso buta i slabina sa fileom. U skladu sa *Elaboratom (2013)* koristi se ohlađeno meso, 24 h *post mortem*, normalnih svojstava, odnosno karakteristične crvene boje, mirisa, građe i konzistencije. Prednost ima meso čija je pH vrednost manja od 6,0 s obzirom da niže vrednosti pH mesa pogoduju lakšoj difuziji soli, bržem otpuštanju vode, povezivanju nadeva, formiranju stabilne boje, kao i sprečavanju razvoja nepoželjnih mikrobioloških procesa (*Vuković, 2012*). Međutim, upotreba bledog, mekog i vodnjikavog (BMV) mesa čija je pH vrednost veoma niska ($\text{pH}_1 < 5,8$) nije preporučljiva, s obzirom da meso sa ovim nedostatkom ima nepoželjne

senzorske osobine poput blede boje i meke konzistencije. S druge strane upotreba tamnog, čvrstog i suvog (TČS) mesa, nije poželjna zbog visoke pH vrednosti ($pH_{24} > 6,2$) i posledično izraženog stepena vezivanja vode, pri čemu je otežan proces sušenja. Takođe, visoka pH vrednost TČS mesa pogoduje rastu i razmnožavanju mikroorganizama kvara, kao i patogenih mikroorganizama i negativno utiče na formiranje boje i povezivanje nadeva fermentisanih kobasica (*Vignolo i sar., 2010*).

U proizvodnji sremskog kulena koristi se čvrsto masno tkivo koje mora biti bele boje, zrnaste konzistencije i bez oksidativnih promena (užeglosti). Najčešće se koristi potkožno masno tkivo vrata, grebena i leđa svinja. Usitnjavanjem ohlađenog čvrstog masnog tkiva dobijaju se jasno definisani komadići, zahvaljujući kojima poprečni presek proizvoda poprima željeni izgled mozaika. Na čvrstinu masnog tkiva utiče zastupljenost veziva, kao i odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Čvrsto masno tkivo sadrži više veziva, a manje nezasićenih masnih kiselina koje su podložne oksidativnim promenama. Usled upotrebe masnog tkiva sa većim sadržajem nezasićenih masnih kiselina, koje je sklone otapanju dolazi do oblaganja komadića mesa uljastim frakcijama i nakupljanja istih ispod omotača, što za posledicu ima smanjeno odavanje vode iz nadeva i otežano sušenje proizvoda, kao i lošije povezivanje nadeva (*Teodorović i sar., 2015*).

Od dodatka koristi se kuhinjska so i crvena začinska paprika koja u skladu sa *Elaboratom (2013)* mora biti proizvedena na teritoriji Srema. Kuhinjska so utiče na formiranje poželjnih senzorskih osobina proizvoda, kao i na odvijanje mikrobioloških i fizičko-hemijskih procesa tokom zrenja proizvoda. Pored direktnog uticaja na ukus proizvoda u čiji sastav ulazi, kuhinjska so dodatno potencira aromatična svojstva drugih sastojaka mesa i utiče na formiranje čvršće konzistencije i povezanost nadeva. Povećanjem osmotskog pritiska i smanjenjem a_w vrednosti, kuhinjska so ostvaruje i inicijalnu antimikrobnu aktivnost u nadevu, inhibirajući, pre svega, rast gram-negativnih bakterija, dok su gram-pozitivne bakterija znatno otpornije.

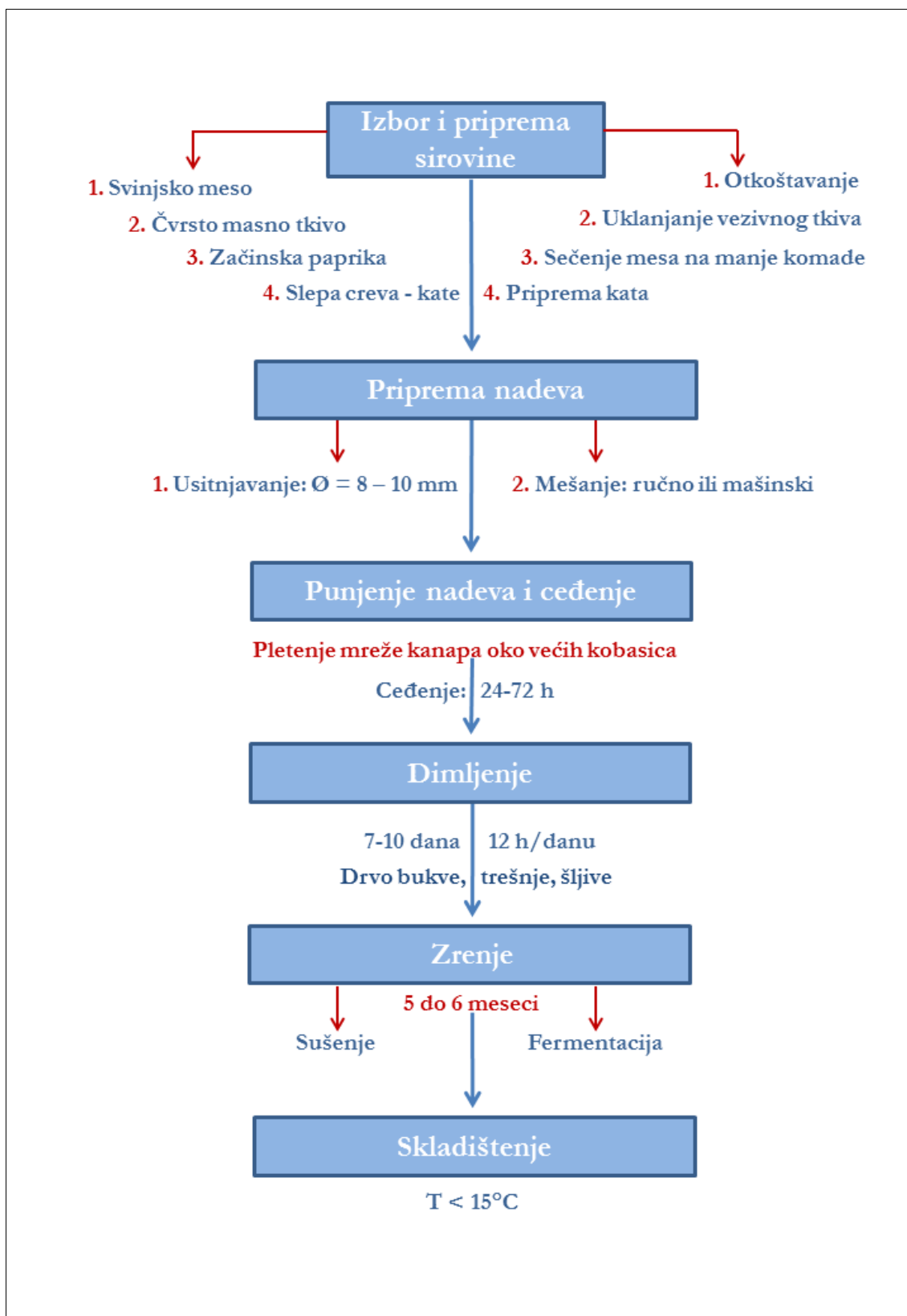
U proizvodnji sremskog kulena, crvena začinska paprika koristi se u dve različite forme, kao prah ili kao sos koji se dobija kuvanjem osušenih i očišćenih plodova paprike u vreloj vodi i mlevenjem istih do granulacije od $\varnothing = 3-4$ mm. Crvena začinska paprika je veoma značajna za formiranje stabilne crvene boje sremskog kulena, s obzirom da sadrži karotenoide (karoteni i ksantofili) čija količina u plodu crvene paprike iznosi od 0,3 do 0,8%. Najvažniji karotenoidi paprike su kapsantin, β -karoten, violksantin, kriptoksantin, kapsorubin, likopen, lutein i drugi. Pored karotenoida, nitrati iz paprike, takođe, doprinose

formiranju boje sremskog kulena. Bakterijskom redukcijom nitrata tokom zrenja proizvoda nastaju nitriti koji, iako se formiraju u maloj količini, sa mioglobinom mogu da grade stabilan pigment nitrozil-mioglobin. Nalaz malih količina nitrita u tradicionalnim fermentisanim kobasicama, upravo se objašnjava njihovim formiranjem od nitrata poreklom iz paprike (*Vuković i sar., 2012*). U paprici se nalaze i jedinjenja koja imaju antioksidativnu ulogu, kao što su askorbinska kiselina i tokoferol. Ljute vrste začinske paprike sadrže jedinjenja koja su odgovorna za senzaciju ljutog ukusa, od kojih su najznačajniji kapsaicin, dihidrokapsaicin, nordihidro-kapsaicin i homodihidro-kapsaicin, dok se norkapsaicin i homokapsaicin nalaze u tragovima. Sadržaj kapsaicina, kao vodeće supstance za senzaciju ljutog ukusa, u zrelim plodovima paprike varira od 0,15% do 0,50% (*Vuković i sar., 2012*).

Kvalitet gotovog proizvoda u mnogome zavisi od kvaliteta polaznih sirovina. Stoga je za proizvodnju sremskog kulena veoma važno odabrati svinjsko meso normalnog kvaliteta, čvrsto masno tkivo bez oksidativnih promena i kvalitetnu začinsku papriku. Nakon izbora sirovina sledi priprema istih. Dobro ohlađena muskulatura se odvaja od kostiju (otkoštava) i detaljno čisti od masnog i grubljeg vezivnog tkiva. Izabrani komadi mesa i čvrstog masnog tkiva se seku na manje delove kako bi se pripremili za postupak usitnjavanja. Zreli, osušeni i prethodno očišćeni plodovi paprike se melju, pri čemu se dobija prah ili se od istih kuva sos ukoliko se paprika dodaje u obliku sosa (*Elaborat, 2013*).

2.1.2. Priprema nadeva

Priprema nadeva počinje usitnjavanjem mesa i masnog tkiva pomoću mašine za mlevenje mesa, ručne ili električne. Pripremljeno mišićno i čvrsto masno tkivo usitnjava se do postizanja granulacije od $\varnothing = 8 - 10$ mm. Prema *Elaboratu (2013)* nadev sremskog kulena izrađuje se od 95% svinjskog mesa I kategorije i 5% čvrstog masnog tkiva. Na ukupnu masu mesa i masnog tkiva dodaje se 2,2-2,5% kuhinjske soli i začinska paprika, mlevena (1-1,8%) ili u obliku sosa (2,5-3,5%). Nakon dodavanja svih komponenti nadeva sledi postupak mešanja do postizanja homogene mase nadeva. Mešanje nadeva može da se izvede ručno ili mašinski. Ovim postupkom treba da se postigne ravnomerna raspoređenost svih komponenti u nadevu i omogući njihova interakcija, pre svega bolje dejstvo kuhinjske soli na rastvorljivost proteina mesa i fiksiranje poželjne crvene boje mesa (*Radetić, 1997*).



Slika 1. Dijagram toka proizvodnje sremskog kulena

2.1.3. Punjenje i ceđenje

Kao omotač obavezno se koristi svinjsko slepo crevo („kata”), što doprinosi autentičnosti proizvoda. Prethodno očišćene, oprane i usoljene kate se neposredno pre punjenja odsoljavaju potapanjem u mlaku vodu, pri čemu dolazi i do bubrenja kolagena, a omotač postaje elastičniji i otporniji na pritisak tokom punjenja nadeva. Dijametar kate, kao i debljina zida ovog prirodnog omotača, kasnije, značajno utiču na procese sušenja i zrenja sremskog kulena. U tradicionalnim uslovima punjenje se vrši ručnom punilicom, a napunjene kobasice se podvezuju kanapom. S obzirom da se u tradicionalnoj proizvodnji ne koristi vakuum punilica, treba sprečiti stvaranje vazdušnih džepova u kobasici tokom punjenja. Masa svežeg sremskog kulena se najčešće kreće u rasponu od 1200 do 2000 g, a oko većih komada se tradicionalno plete mreža od kanapa, kako bi se sprečilo pucanje omotača tokom dimljenja, sušenja i zrenja. Nakon punjenja u kate, sledi faza ceđenja (24-72 h), kako bi se površina omotača zasušila, a proizvod bio sreman za sledeću fazu proizvodnje, odnosno dimljenje (*Elaborat, 2013*).

2.1.4. Dimljenje

Proces dimljenja sremskog kulena traje 7 do 10 dana, 12 h dnevno. Sremski kulen se dimi po hladnom postupku, pri temperaturi dima od 12-25°C. Dim se proizvodi na tradicionalan način, sagorevanjem suvog drveta bukve, višnje i šljive na otvorenom ložištu, bez direktnog plamena (*Elaborat, 2013*). Mikroklimatski parametri u pušnici, kao što su temperatura, relativna vlažnost vazduha i cirkulacija vazduha, nisu kontrolisani kao u industrijskoj proizvodnji, već su pod direktnim uticajem spoljašnjih klimatskih uslova, što značajno utiče na tok procesa dimljenja (*Suvajdžić i sar., 2018*). Usled nepovoljnih uslova, dimljenje sremskog kulena može trajati i duže. Stoga je veoma važno svakodnevno pratiti tok samog procesa dimljenja, kako bi proizvod primio dovoljnu količinu dima, što proizvođači procenjuju na osnovu boje omotača proizvoda (*Elaborat, 2013*).

Dimljenje se prvenstveno primenjuje zbog uticaja na boju omotača, izgled i aromu proizvoda, mada doprinosi stabilnosti i održivosti proizvoda zahvaljujući antioksidativnom i antimikrobnom dejstvu određenih komponenti dima (*Roseiro i sar., 2011; Vuković, 2012*).

Boja omotača proizvoda se formira usled zbirnog delovanja obojenih materija prisutnih u dimu (čad, katran i fenoli), zatim materija koje nastaju polimerizacijom sastojaka dima, kao i proizvoda Maillardove reakcije inicirane delovanjem karbonilnih jedinjenja dima na amine mesa (*Teodorović i sar., 2015*). Vrsta drveta upotrebljenog za dobijanje dima, takođe, utiče na

boju proizvoda. Dim dobijen sagorevanjem bukovog drveta daje proizvodu svetliju žuto-smeđu boju, dok dim lipe, javora i pogotovo hrasta daje tamniju žuto-smeđu boju. Površina proizvoda dimljenih dimom koji je dobijen sagorevanjem drveta trešnje je mahagoni-crvene boje (Škaljac, 2014).

Aroma proizvoda potiče i od različitih sastojaka prisutnih u dimu od kojih su najznačajniji fenoli, karbonilna jedinjenja, furfurool i hidroksimetilfurfurool, i organske kiseline, naročito kiseline srednjih lanaca, zatim hidrosikiseline, oksikiseline i dikarbonske kiseline. Takođe, reakcije dima sa proteinima mesa doprinose formiranju arome proizvoda (Vuković, 2012).

Najznačajniji antioksidativni efekat tokom dimljenja ostvaruju fenoli, koji reaguju sa slobodnim radikalima sprečavajući njihovu oksidativnu aktivnost. Inhibicijom lipolitičkih mikroorganizma, određeni sastojci dima indirektno ostvaruju antioksidativni efekat (Vuković, 2012).

Antimikrobni efekat se postiže zahvaljujući baktericidnim i fungicidnim supstancama iz dima koje sprečavaju egzistenciju bakterija i plesni, pre svega, na površini kobasica (Vuković, 2012; Roseiro i sar., 2011). Najznačajnije antimikrobne supstance u dimu su karbonilna jedinjenja (aldehidi i ketoni), zatim fenoli (krezol, siringol, pirogalol, katehin itd.), organske kiseline (mravlja, sirćetna, propionska, buterna itd.), kao i alkoholi (Teodorović i sar., 2015). Njihov antimikrobni efekat ograničen je pretežno na površinu proizvoda gde se ove supstance i talože tokom dimljenja, odnosno gde ih najviše ima. Prema unutrašnjosti proizvoda njihova koncentracija opada, kao i antimikrobni efekat dima. Najosetljivije su gram-negativne bakterije, kojima pripada najveći broj patogenih vrsta, kao i uzročnici kvara, dok su gram-pozitivne bakterije otpornije. Dakle, antimikrobni efekat dima ima značaj u sprečavanju površinskog kvara i plesnivosti, dok se mikrobiološka stabilnost i održivost sremkog kulena zasniva na drugim antimikrobnim činiocima, kao što su niska pH i a_w vrednost (Škaljac, 2014).

Pored korisnih u dimu se nalaze i materije koje su štetne po zdravlje ljudi. Najznačajnije štetne materije dima su policiklični aromatični ugljovodonici, među kojima je kao vodeća kancerogena supstanca označen benzo[a]piren. Prema *Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u brani i brani za životinje i o brani i brani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja* (Sl. glasnik RS, 29/2014) maksimalno dozvoljena količina benzo[a]pirena u proizvodima od mesa iznosi 2,0 µg/kg, a suma benzo[a]pirena, benzo[a]antracena, benzo[b]fluorantana i krizena ne sme biti veća od 12,0 µg/kg.

2.1.5. Zrenje

Proces zrenja sremskog kulena obuhvata ceo period proizvodnje, od momenta izrade sirovog nadeva do momenta konzumiranja gotovog proizvoda. S obzirom da je proizvodnja sremskog kulena vezana za zimski period godine, proces zrenja se odvija sporo i traje minimalno 5 meseci, odnosno do postizanja optimalne vlage u kobasici (<35%) i poželjnih senzorskih svojstava (*Elaborat, 2013*). Tokom zrenja fermentisanih suvih kobasica, dolazi do sušenja istih, a istovremeno se odvija i fermentacija praćena mikrobiološkom sukcesijom i kompleksnim biohemijskim procesima, pri čemu se dobija dugotrajan i mikrobiološki bezbedan proizvod, optimalne nutritivne vrednosti i prepoznatljivih senzorskih svojstava (*Vuković i sar., 2011*). Proces sušenja karakteriše se dehidracijom proizvoda koju podstiče fermentacijom izazvana acidifikacija nadeva, a pomenuti biohemijski procesi dovode do značajnih promena osnovnih gradivnih elemenata mesa, nastalih usled aktivnosti enzima mišićnog i masnog tkiva, kao i enzima poreklom od mikroorganizama autohtone mikroflore. Za zrenje fermentisanih suvih kobasica, lipoliza i proteoliza su najznačajniji biohemijski procesi. Degradacijom masti i proteina mesa iniciraju se biohemijske reakcije drugog reda koje, takođe, doprinose zrenju proizvoda.

2.1.5.1. Fermentacija i mikrobiološka sukcesija

Tradicionalni način proizvodnje fermentisanih kobasica oslanja se na aktivnost mikroorganizama koji se prirodno nalaze u nadevu. U svežem nadevu tradicionalnih fermentisanih kobasica prisutne su različite vrste mikroorganizama koje potiču iz sredine proizvodnog pogona, sa ruku radnika, kao i sa upotrebljenih sirovina (*Nychas i sar., 2008*). Mikrobiološko opterećenje mesa, kao osnovne sirovine za izradu fermentisanih kobasica, zavisi od fiziološkog statusa životinja pre klanja, širenja kontaminacije tokom klanja i obrade, kao i uslova čuvanja (*Nychas i sar., 2008; Doulgeraki i sar., 2012*). Meso proizvedeno u skladu sa principima dobre higijenske prakse opterećeno je malim brojem mikroorganizama. Prema literaturi, na sveže isečenom mesu najčešće su prisutni mikroorganizmi roda *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bakterije mlečne kiseline (BMK), kao i mikroorganizmi iz familije *Enterobacteriaceae* (*Doulgeraki i sar., 2012*). Tokom pripreme sirovine za izradu nadeva dolazi do naknadne kontaminacije, a usitnjavanjem mesa i masnog tkiva, povećava se površina dostupna mikroorganizmima i oslobađa se mesni sok, kao izvor lako dostupnih

hranljivih materija, što podstiče rast i razmnožavanje prisutnih mikroorganizama. Mikroorganizmi koji se eventualno unesu dodavanjem začina u nadev, ne nailaze na povoljne uslove u novoj sredini i nisu konkurentni već adaptiranim mikroorganizmima mesa (Radetić, 1997). Mešanjem nadeva, takođe, dolazi do naknadne kontaminacije, a prisutni mikroorganizmi se još potpunije raspoređuju i osvajaju habitat. Nakon punjenja nadeva u omotač, stvaraju se novi uslovi za opstanak i uspostavljanje ekološke niše prisutnih mikroorganizama.

Mikroflora fermentisanih kobasica proizvedenih na tradicionalan način razvija se sporo, što je karakteristično za prirodno zrenje koje se odvija u zimskom periodu, na niskim temperaturama (Vuković i sar., 2012). Tip mikroflore koji će se razviti, dominirati i opstati u proizvodu zavisi od sastava inicijalne mikroflore, kao i od uticaja intrinzičnih i ekstrinzičnih faktora tokom zrenja proizvoda (Zdolec i sar., 2013; Suvajdžić i sar., 2018). Inicijalna mikroflora tradicionalnih fermentisanih kobasica je raznovrsna. Sa tehnološkog aspekta, najznačajniji mikroorganizmi inicijalne mikroflore su BMK i koagulaza negativne koke (Rantsiou i Cocolin, 2006; Bonomo i sar., 2008; Fonseca i sar., 2013; Aquilanti i sar., 2016). Pored bakterija značajnih za proces zrenja, inicijalna mikroflora sadrži i mikroorganizme kvara, a može se utvrditi i prisustvo patogenih mikroorganizama (Lebert i sar., 2007). Od mikroorganizama kvara najznačajniji su predstavnici familija *Pseudomonadaceae* i *Enterobacteriaceae*, a od patogenih mikroorganizama ističu se *Salmonella*-vrste, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 i *Staphylococcus aureus* kao toksogeni mikroorganizam. Stoga je cilj da se tokom zrenja tradicionalnih fermentisanih kobasica stimuliše rast tehnološki značajnih mikroorganizama i ograniči rast ostalih mikroorganizama (Drosinos i sar., 2005). Sinergističkim dejstvom različitih antimikrobnih činioca („hurdle concept“) stvaraju se nepovoljni uslovi za opstanak mikroorganizama kvara i eventualno prisutnih patogenih i toksogenih mikroorganizama, čime se postiže stabilnost i mikrobiološka bezbednost proizvoda (Holck i sar., 2011).

Sa tehnološkog aspekta, BMK su esencijalne za proizvodnju fermentisanih suvih kobasica (Fadda i sar., 2010; Fonseca i sar., 2013; Aquilanti i sar., 2016). Bakterije mlečne kiseline predstavljaju heterogenu grupu mikroorganizama, zajedničkih morfoloških i fizioloških osobina. U pitanju su Gram pozitivne, katalaza negativne, asporogene bakterije, kokoidnog ili štapićastog oblika, koje rastu u anaerobnim ili mikroaerofilnim uslovima i razlažu glukozu do mlečne kiseline (homofermentativne), ili do mlečne kiseline, CO₂ i etanola (heterofermentativne) (Siamansouri i sar., 2013). Najčešće izolovane vrste BMK iz

tradicionalnih fermentisanih kobasica su: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* i *Lactobacillus plantarum*, ali ne treba zanemariti ni vrste iz rodova *Pediococcus* i *Enterococcus* (Aymerich i sar., 2003; Bonomo i sar., 2008; Fontana i sar., 2009; Pisacane i sar., 2015). Broj BMK u svežem mesu kreće se od 3 do 5 log cfu/g, a ubrzo po uspotavljanju fermentacije dostiže vrednost od 8 do 9 log cfu/g sadržaja nadeva (Talon i Leroy, 2011). Na početku zrenja fermentisanih kobasica aerobna mikroflora troši kiseonik stvarajući mikroaerofilnu sredinu pogodnu za umnožavanje BMK koje fermentacijom šećera snižavaju pH vrednost nadeva od koje zavisi održivost proizvoda i formiranje poželjnih senzorskih svojstava (Fontana i sar., 2016). Promena pH vrednosti tradicionalnih fermentisanih kobasica zavisi od temperature pri kojoj se odvija fermentacija, sastava autohtone mikroflore koja učestvuje u fermentaciji i usitnjenosti nadeva. Upotreba šećera i glukono-delta-laktone u industrijskoj proizvodnji fermentisanih kobasica ima za cilj brže snižavanje pH vrednosti (Teodorović i sar., 2015). Pad pH vrednosti do izoelektrične tačke akto-miozina (5,3) olakšava proces sušenja proizvoda, s obzirom da se pH vrednost i sposobnost vezivanja vode mesa nalaze u pozitivnoj korelaciji (Honikel i Hamm, 1994). Posledično se smanjuje i a_w vrednost što doprinosi održivosti i bezbednosti proizvoda, s obzirom da a_w ispod 0,91 limitira rast patogenih mikroorganizama (Vignolo i sar., 2010; Laranjo i sar., 2015). BMK dodatno limitiraju rast nepoželjne mikroflore sintezom organskih kiselina, vodonik-peroksida, ugljen-dioksida, diacetila i reuterina. Međutim, stvaranje većih količina sircetne kiseline vodonik-peroksida, ugljen-dioksida ili diacetila tokom zrenja fermentisanih kobasica nije poželjno sa tehnološkog aspekta uprkos mogućoj antimikrobnoj aktivnosti (Zdolec i sar., 2013). Antimikrobno dejstvo prema srodnim, ali s tehnološkog aspekta nepoželjnim mikroorganizmima, predodređeni sojevi različitih vrsta BMK ostvaruju i produkcijom posebnih antimikrobnih supstanci, od kojih su za proizvodnju fermentisanih kobasica najznačajniji bakteriocini (De Vuyst i Leroy, 2007). Uprkos slaboj proteolitičkoj i lipolitičkoj aktivnosti, BMK imaju značajnu ulogu u razvoju arome fermentisanih kobasica (Papamanoli i sar., 2003). Acidifikacijom nadeva BMK iniciraju procese proteolize i nukleolize tokom kojih tkivni enzimi oslobađaju peptide, amino kiseline i nukleozide koje, zatim, BMK razgrađuju do različitih isparljivih supstanci, doprinoseći razvoju arome krajnjeg proizvoda (Chen i sar., 2015). Dodatno, pri niskoj pH vrednosti dolazi do geliranja rastvorenih proteina miofibrila i splepljivanja komadića mesa, pri čemu nadev postaje kompaktna, a konzistencija proizvoda čvršća (Vignolo i sar., 2010; Teodorović i sar., 2015). Takođe, pad pH vrednosti ima ključnu ulogu u formiranju stabilne boje proizvoda koja nastaje usled obrazovanja pigmenta nitrozil-mioglobina u reakciji

mioglobina i nitrita. Međutim, usled naglog pada pH vrednosti tokom fermentacije dolazi do inhibicije redukivnih bakterija što onemogućava redukciju nitrata u nitrite i samim tim stvaranje nitrozil-mioglobina. U kasnijim fazama zrenja, zaustavlja se metabolička aktivnost BMK zbog niske a_w vrednosti, a usled nakupljanja produkata proteolize pH vrednost se postepeno povećava, pa se koristi kao parametar za procenu stepena zrenja proizvoda (Vuković, 2012; Suvajdžić i sar., 2018).

Pored BMK, tehnološki značaj imaju i koagulaza-negativne koke, odnosno bakterije iz familija *Staphylococcaceae* i *Micrococcaceae*, među kojima preovladavaju *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus carnosus*, *Kocuria varians*, kao i vrste iz roda *Micrococcus* (Rantsiou i Cocolin, 2006; Cocolin i sar., 2009; Talon i Leroy, 2011). Većina ovih vrsta je osetljiva na brzu acidifikaciju sredine, te imaju povoljnije uslove za razvoj u tradicionalnim fermentisanim kobasicama koje se proizvode pri nižim temperaturama zrenja, kada je i snižavanje pH vrednosti sporije. Koagulaza-negativne koke ostvaruju višestruku ulogu tokom zrenja fermentisanih kobasica. Redukcijom nitrata do nitrita koagulaza-negativne koke omogućavaju stvaranje pigmenta nitrozil-mioglobina, što doprinosi razvoju stabilne boje tradicionalnih fermentisanih kobasica (Vignolo i sar., 2010). Optimalni uslovi za redukciju nitrata nastaju još na početku zrenja kada aerobna mikroflora troši kiseonik i smanjuje oksido-redukcioni potencijal, stvarajući optimalne uslove za reakcije redukcije u kobasici. Nastali nitriti, takođe imaju i antioksidativno dejstvo, pa limitiraju oksidaciju nezasićenih masnih kiselina. Razgradnjom peroksida, uključujući i vodonik-peroksid koji je nastao tokom fermentacije, koagulaza-negativne stafilokoke i mikrokoke dodatno sprečavaju oksidaciju nezasićenih masnih kiselina i pojavu užglosti koja dovodi do mana, kako u boji i izgledu, tako i u aromi proizvoda. Kao rezultat proteolitičke i lipolitičke aktivnosti, pre svega mikrokoaka, stvaraju se aromatična jedinjenja koja daju prepoznatljiv ukus proizvoda (Ferreira i sar., 2007; Vignolo i sar., 2010). Zahvaljujući dobroj sposobnosti prilagođavanja uslovima sredine koagulaza-negativne koke opstaju do kraja zrenja tradicionalnih fermentisanih kobasica, tako da njihov broj u gotovom proizvodu iznosi od 5 do 7 log cfu/g (Talon i Leroy, 2011).

Dakle, mikrobiološka sukcesija tokom zrenja tradicionalnih fermentisanih kobasica je veoma složen proces uslovljen kompleksnim interakcijama između biotičkih (sastav mikroflora i mikrobnih međuođnosni) i abiotičkih faktora (fizičko-hemijske osobine nadeva) koje značajno utiču na dinamičke promene koje se dešavaju tokom procesa zrenja proizvoda (Zdolec i sar., 2013).

2.1.5.2. Sušenje

Istovremeno sa postupkom dimljenja, počinje i proces sušenja sremskog kulena koji se odvija u tradicionalnim uslovima, gde mikroklimatski parametri, kao što su temperatura, relativna vlažnost vazduha i cirkulacija vazduha nisu kontrolisani, već su pod direktnim uticajem spoljašnjih klimatskih uslova. Sušenje je najvažniji postupak konzervisanja u procesu proizvodnje sremskog kulena kojim se postiže održivost proizvoda. Konzervišući efekat sušenja zasniva se na smanjenju sadržaja vlage, samim tim i a_w vrednosti proizvoda, čime se usporava aktivnost tkivnih enzima i inhibira rast mikroorganizama (Teodorović i sar., 2015). Aktivnost vode je mera slobodne, mikroorganizmima dostupne vode i od posebnog je značaja za procenu mikrobiološke bezbednosti proizvoda. Na početku procesa sušenja a_w vrednost fermentisanih suvih kobasica se kreće od 0,95 do 0,96, da bi u gotovom proizvodu iznosila 0,80 do 0,90 (Vuković, 2012). Prema Vignolo i sar. (2010) i Laranjo i sar. (2015) a_w vrednost ispod 0,91 inhibira rast patogenih mikroorganizama i čini proizvod bezbednim za konzumiranje.

Kvalitet sirovine i mikroklimatski uslovi u prostoriji za sušenje i zrenje, značajno utiču na proces sušenja sremskog kulena. S obzirom da se pH vrednost i sposobnost vezivanja vode nalaze u pozitivnoj korelaciji (Honikel i Hamm, 1994), za izradu nadeva sremskog kulena bira se meso normalnog kvaliteta koje ima pH vrednost manju od 6, odnosno meso koje bolje odaje vodu tokom sušenja proizvoda. Međutim, upotreba bledog, mekog i vodnjikavog (BMV) mesa čiji je pH veoma nizak ($pH_1 < 5,8$) nije preporučljiva, s obzirom da ovakvo meso ima nepoželjne senzorske karakteristike, poput blede boje i meke konzistencije. S druge strane, upotreba tamnog, čvrstog i suvog (TČS) mesa, nije poželjna zbog visoke pH vrednosti ($pH_{24} > 6,2$), samim tim i izraženog stepena vezivanja vode, pri čemu je otežan proces sušenja. Usled fermentacije dolazi do pada pH vrednosti što pospešuje proces sušenja, koji je najintenzivniji pri izoelektričnoj tački akto-miozina ($pH=5,3$) kada je zastupljen isti broj pozitivno i negativno naelektrisanih polarnih grupa aminokiselina, pri čemu se peptidni lanci međusobno privlače, kapilarni prostori miofibrila smanjuju, a meso lako otpušta vodu. U procesu sušenja najpre isparava vlaga sa površine kobasice, što se označava kao spoljašnja difuzija vlage, a zatim dolazi do migracije vlage iz unutrašnjosti kobasice ka površini, odnosno unutrašnje difuzije vlage. Pri optimalnim uslovima sušenja brzina spoljašnje difuzije približno je jednaka brzini unutrašnje difuzije vlage čime se postiže željena uniformna struktura proizvoda (Ikonić, 2013; Škaljac, 2014). Dakle, da bi se proces spoljašnje difuzije vlage normalno odvijao, neophodni su optimalni

mikroklimatski uslovi. Tokom procesa sušenja relativna vlažnost vazduha treba da prati opdanje a_w vrednosti proizvoda. Optimalno je da relativna vlažnost vazduha bude za 2 do 4 jedinice manja od a_w vrednosti (Teodorović i sar., 2015). U tradicionalnoj proizvodnji sremskog kulena, veoma je teško ispuniti navedeni zahtev, jer relativna vlažnost vazduha varira u zavisnosti od vremenskih prilika, čak i na dnevnom nivou. Suviše slaba cirkulacija vazduha dovodi do povećanja relativne vlažnosti vazduha u prostoriji, što onemogućava spoljašnju difuziju vlage, pa samim tim i sušenje proizvoda. Pri intenzivnoj cirkulaciji vazduha dolazi do brzog sušenja proizvoda, što za posledicu ima stvaranje suvog ruba tzv. prstena ispod omotača, koji bi usporio ili čak onemogućio dalji proces sušenja. Niska relativna vlažnost vazduha i viša temperatura vazduha, takođe, doprinose stvaranju suvog ruba, kao mane proizvoda (Teodorović i sar., 2015). Sa druge strane, treba voditi računa da ne dođe do smrzavanja proizvoda usled suviše niskih spoljašnjih temperatura, što bi odložilo proces sušenja usled stvaranja kristala leda, a istovremeno zaustavilo proces fermentacije, odnosno zrenja proizvoda.

Odavanjem vlage proizvod gubi masu, odnosno javlja se kalo sušenja koji zavisi od sastava i stepena usitnjenosti nadeva, vrste i dijametra omotača, mikroklimatskih uslova u komori za sušenje i zrenje, kao i dužine procesa sušenja i zrenja (Vasilev, 2010). Kalo sušenja je izraženiji ukoliko je sadržaj masnog tkiva u nadevu kobasice manji, stepen usitnjenosti nadeva veći, a dijametar kobasice uži. Takođe, pri višoj temperaturi, nižoj relativnoj vlažnosti vazduha i intenzivnijoj cirkulaciji vazduha, javlja se veći gubitak mase proizvoda. Fermentisane suve kobasice koje se duže suše, kao što je sremski kulen, imaju znatno izraženiji kalo sušenja (Ikonić, 2013; Škaljac, 2014). Kalo sušenja je veći u početku, nego na kraju ovog procesa (Radetić, 1997).

2.1.5.3. Hidrolitičke i oksidativne promene lipida tokom zrenja

Lipidi, pored proteina, čine jedan od najzastupljenijih sastojaka fermentisanih kobasica, s obzirom da se njihov sadržaj u ovim proizvodima kreće od 25% do 55% (Ordóñez i sar., 1999). Masno tkivo se uglavnom sastoji od triglicerida, dok mišićno tkivo sadrži oko 7% lipida, a od toga 62-80% čine trigliceridi i 16-34% fosfolipidi (Olivares i sar., 2009; Chen i sar., 2017). Promene na lipidima tokom zrenja fermentisanih kobasica imaju značajan uticaj na kvalitet finalnog proizvoda (Visesanguan i sar., 2006; Karsloğlu i sar., 2014). Lipoliza, odnosno parcijalna degradacija lipidne frakcije, je veoma važan biohemijski proces tokom zrenja fermentisanih kobasica regulisan od strane lipaza poreklom iz masnih ćelija, mišićnih vlakana, kao i mikroorganizama autohtone mikroflore (Leroy i sar., 2006; Šojić, 2013; Karsloğlu i sar., 2014). Koagulaza negativne koke, pre svega mikrokoke, su najznačajniji lipolitički mikroorganizmi, ali njihov doprinos lipolizi je manji od doprinosa tkivnih enzima (Visesanguan i sar., 2006). Tokom lipolize triglicerida i fosfolipida oslobađaju se masne kiseline, pa se stepen lipolize izražava kroz sadržaj slobodnih masnih kiselina, odnosno kao procenat oleinske kiseline (Teodorović i sar., 2015). Oslobađanje nižih masnih kiselina direktno utiče na aromu proizvoda, dok su masne kiseline srednjih i dugih lanaca podložne procesu oksidacije. Iako su fosfolipidi prisutni u manjoj količini od triglicerida, sa aspekta hidrolize i oksidacije masti su važniji jer su bogati polinezasićenim masnim kiselinama koje su podložne oksidativnim promenama (Gómez i Lorenzo, 2013; Fuentes i sar., 2014).

Slobodne nezasićene masne kiseline podležu procesu oksidacije pri čemu nastaju peroksidi, veoma reaktivna jedinjenja koja ubrzavaju dalje reakcije oksidacije. Razlaganjem peroksida formiraju se aromatična isparljiva jedinjenja, pre svega aldehidi i ketoni, koji utiču na aromu proizvoda (Visesanguan i sar., 2006). Stepenu oksidacije lipida određuje se preko peroksidnog broja, dok se nastajanje proizvoda peroksidne razgradnje prati određivanjem sadržaja malondialdehida, odnosno TBARS („Thiobarbituric acid reactive substances“) vrednosti. Oksidacija lipida je jedan od primarnih mehanizama koji dovodi do narušavanja kvaliteta proizvoda (Talon i sar., 2000; Nassu i sar., 2003). Izraženi proces oksidacije lipida dovodi do užeglosti proizvoda koji se, osim užegle arome, karakteriše i promenjenom bojom proizvoda usled degradacije nitrozil-mioglobina od strane peroksida. Na brzinu oksidacije lipida tokom proizvodnje fermentisanih kobasica utiču različiti faktori, od kojih su najznačajniji kvalitet sirovine, količina dodatog masnog tkiva, stepen usitnjenosti mesa i masnog tkiva, mikroflora, dimljenje, uslovi zrenja i skladištenja proizvoda, kao i dodatak egzogenih komponenti kao što su so, nitriti i antioksidansi (Talon i sar., 2000).

2.1.5.4. Proteolitičke promene tokom zrenja

Proteoliza miofibrilarnih i sarkoplazmatskih proteina je najznačajniji biohemijski proces tokom zrenja fermentisanih kobasica izazvan kombinovanim dejstvom mišićnih i proteolitičkih enzima mikrobnog porekla koji doprinosi formiranju ukusa i teksture ovih proizvoda (Ikonić, 2013; Latorre-Moratalla i sar., 2014; Berardo i sar., 2017; Jokanović i sar., 2017). Hidrolizom proteina mesa raste sadržaj neproteinskog azota, a posledično i indeks proteolize. Indeks proteolize je parametar koji ukazuje na stepen proteolitičkih promena tokom zrenja fermentisanih kobasica i predstavlja procentualni odnos sadržaja neproteinskog i ukupnog azota u proizvodu (Vasilev, 2010).

Mišićna ćelija poseduje različite enzime koji učestvuju u proteolizi, od kojih su najznačajniji kalpainsi (I, II i III), katepsini (B, D, E, F, H, L, K i S), kao i egzopeptidaze (tripeptidilpeptidaze, dipeptidilpeptidaze, aminopeptidaze i karboksipeptidaze) (Toldrá, 2006a). Kalpainsi su kalcijum zavisne proteinaze smeštene u sarkoplazmi uz Z-liniju miofibrila i vezane su za kalpastatin, protein koji inhibira njihovu funkciju. Kalpainsi svoju optimalnu aktivnost ostvaruju pri neutralnoj pH vrednosti i odgovorni su za inicijalnu hidrolizu filamenata koja se odvija u mišićima nekoliko časova *post mortem*, pri čemu dolazi do razlaganja miofibrilarnih struktura, a strukturni proteini postaju dostupni drugim proteolitičkim enzimima. S obzirom da pad pH vrednosti inhibira aktivnost kalpaina, njihov značaj za proces proteolize tokom zrenja fermentisanih kobasica je zanemarljiv. Za proces proteolize veoma su važne lizozomske proteinaze, odnosno katepsini, među kojima se posebno ističu katepsini B i L (cisteinske proteinaze, veoma aktivne pri pH=5,5-6,5), a pre svega katepsin D (aspartatna proteinaza, najaktivnija pri pH=3-5). Prethodno navedeni katepsini hidrolizuju različite strukturne proteine mesa od kojih su najvažiji titin, nebulin, aktin, miozin, tropomiozin, C-protein i dr. (Lawrie i Ledward, 2006). Pad pH vrednosti tokom fermentacije inicira aktivnost katepsina D koji ostaje stabilan i aktivan tokom celog perioda zrenja fermentisanih kobasica (Toldrá, 2002).

Međutim, ne treba zanemariti ni aktivnost mikrobnih vanćelijskih proteinaza, koje vezane za ćelijski zid hidrolizuju proteine mesa do oligopeptida, a zatim asimilovane oligopeptide razlažu do slobodnih aminokiselina (Toldrá, 2002). Prema literaturi, degradacija miofibrilarnih proteina dovodi se u vezu sa aktivnošću pomenutih endogenih enzima, dok je proteolitička aktivnost mikroorganizama izraženija prema proteinima sarkoplazme (Aro i sar., 2010; Fadda i sar., 2010). Sa druge strane, Berardo i sar. (2017) navode da su endogeni

proteolitički enzimi, naročito katepsin D, odgovorni za inicijalnu hidrolizu proteina do polipeptida i peptida koje kasnije hidrolizuju enzimi mikroorganizama.

Posredstvom mišićnih i mikrobnih egzopeptidaza, peptidi nastali degradacijom proteina, bivaju hidrolizovani sa N- ili C-kraja do tripeptida, dipeptida i slobodnih aminokiselina (Berardo i sar., 2017). Mišićne egzopeptidaze čine grupu proteolitičkih enzima koja obuhvata tripeptidilpeptidaze (TPP I i TPP II), dipeptidilpeptidaze (DPP I, II III i IV), dipeptidaze, aminopeptidaze i karboksipeptidaze. TPP I iz peptidnog lanca odvaja tripeptide Gly-Pro-X, s tim da je X hidrofobna aminokiselina. Pripada enzimima lizozoma i optimalnu aktivnost ostvaruje pri pH=4,0. TPP II je sarkoplazmatski enzim i za razliku od TPP I ima široku specifičnost delovanja, pri optimalnoj pH vrednosti od 6,5 do 7,5. DPP I i II poreklom iz lizozoma i DPP III i IV poreklom iz citoplazme odgovorni su za nastajanje različitih dipeptida tokom procesa proteolize (Ikonić, 2013). Porast koncentracije slobodnih aminokiselina u poslednjoj fazi proteolize nastaje usled dejstva dipeptidaza, aminopeptidaza i karboksipeptidaza. Dipeptidaze razlažu širok spektar dipeptida nastalih usled aktivnosti dipeptidilpeptidaze, pri čemu dolazi do oslobađanja dve aminokiseline. Aminopeptidaze odvajaju aminokiseline sa N-kraja. Postoji pet aminopeptidaza za koje je poznato da su aktivne u mišićima *post mortem*: leucil, arginil, alanil, piroglutamil i metionil aminopeptidaze (Toldrá, 2006b). Aminopeptidaze ostvaruju optimalnu aktivnost u neutralnoj sredini, a pri pH=5,0 njihova aktivnost je limitirana (Toldrá, 2006b). Sa druge strane karboksipeptidaze (A i B), kao enzimi poreklom iz lizozoma, aktivni su u kiseloj sredini, tako da im pogoduje pad pH vrednosti tokom procesa fermentacije. Karboksipeptidaze cepaju aminokisecine sa C-kraja, pri čemu karboksipeptidaza A odvaja samo hidrofobne aminokiseline (Berardo i sar., 2017). Značajan pad pH vrednosti (pH<5), dehidracija proizvoda i povećanje sadržaja soli negativno utiču na porast koncentracije slobodnih aminokiselina, s obzirom da inhibiraju aktivnost enzima u poslednjoj fazi proteolize. Mikroorganizmi asimiluju peptide male molekulske mase i slobodne aminokiseline i transformišu ih do različitih jedinjenja koja doprinose razvoju arome proizvoda, a neki od njih ispoljavaju i biološku aktivnost (Singh i sar., 2012; Toldrá i sar., 2018; Gallego i sar., 2018). Dekarboksilacijom aminokiselina mikroorganizmi stvaraju biogene amine, jedinjenja od značaja za bezbednost i kvalitet fermentisanih suvih kobasica (Latorre-Moratalla i sar., 2017), o kojima će biti reči u narednom poglavlju.

2.1.5.5. Biogeni amini

Tokom procesa zrenja, fermentisane suve kobasice mogu akumulirati značajan sadržaj biogenih amina koji se formiraju usled dekarboksilacije odgovarajućih aminokiselina zahvaljujući aktivnosti mikroorganizama autohtone mikroflore (Bunčić i sar., 1993; Spano i sar., 2010; EFSA, 2011; Latorre-Moratalla i sar., 2012; Latorre-Moratalla i sar., 2017). Akumulacija biogenih amina zavisi od dostupnosti slobodnih aminokiselina, prisustva mikroorganizama odgovornih za dekarboksilaciju, kao i uslova za njihov rast i sintezu aminokiselinskih dekarboksilaza (Latorre-Moratalla i sar., 2008; Tasić i sar., 2012). Kao potencijalni prekursori biogenih amina, aminokiseline se oslobađaju tokom proteolize sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina usled aktivnosti mišićnih i mikrobnih enzima (Ikonić i sar., 2013; Latorre-Moratalla i sar., 2014). Proces dekarboksilacije se aktivira kao odgovor mikrobne ćelije na acidifikaciju sredine tokom fermentacije i takođe predstavlja dodatni izvor energije za mikroorganizme (Gardini i sar., 2016). Štaviše, neke dekarboksilaze ostaju aktivne čak i nakon dezintegracije bakterijske ćelije i dodatno doprinose akumulaciji biogenih amina u proizvodu (Gardini i sar., 2016; Laranjo i sar., 2017). Biogeni amini od značaja za bezbednost i kvalitet fermentisanih kobasica i način njihove sinteze prikazan je u Tabeli 1 (Lorenzo i sar., 2017).

Tabela 1. Biogeni amini od značaja za bezbednost i kvalitet fermentisanih kobasica

	<i>Biogeni amin</i>	<i>Prekursor</i>	<i>Način sinteze</i>	<i>Enzim</i>
<i>Monoamini</i>	Histamin	Histidin	Dekarboksilacija	Histidin dekarboksilaza
	Tiramin	Tirozin	Dekarboksilacija	Tirozin dekarboksilaza
	Feniletilamin	Fenilalanin	Dekarboksilacija	Fenilalanin dekarboksilaza
	Triptamin	Triptofan	Dekarboksilacija	Triptofan dekarboksilaza
<i>Diamini</i>	Putrescin	Ornitin	Dekarboksilacija	Ornitin dekarboksilaza
	Kadaverin	Lizin	Dekarboksilacija	Lizin dekarboksilaza

Dodatno, tokom analize fermentisanih kobasica mogu se detektovati još i amini koji se prirodno nalaze u svežem mesu, kao što su spermin i spermidin. Njihov sadržaj uglavnom ostaje konstantan tokom procesa zrenja proizvoda, ili se smanjuje usled utilizacije od strane mikroorganizama kojima je neophodan azot (Lorenzo i sar., 2017).

Biogene amine stvaraju kako Gram pozitivne, tako i Gram negativne bakterije (*Marcobal i sar., 2012; Wunderlichová i sar., 2014; Gardini i sar., 2016*), ali je aminogeni potencijal specifičan za soj, a ne za vrstu mikroorganizma (*Mobedano i sar., 2015*). BMK, kao veoma raznovrsna grupa mikroorganizama, pokazuju izraženu varijabilnost u proizvodnji biogenih amina (*Lorenzo i sar., 2017*). BMK, pre svega laktobacili i enterokoke, su poznati kao glavni proizvođači tiramina, ali takođe mogu da proizvode histamin, kadaverin i putrescin (*Kuley i Özogul, 2011; Ladero i sar., 2012; Gardini i sar., 2016*). U odsustvu tirozina, BMK mogu da vrše dekarboksilaciju fenilalanina, što dovodi do akumulacije 2-feniletilamina (*Bargossi i sar., 2015*). Akumulacija feniletilamina i triptamina se dovodi u vezu sa visokim sadržajem tiramina nastalog usled aktivnosti BMK ili koagulaza-negativnih stafilokoka (*Vidal-Carou i sar., 2007*). Među Gram-negativnim bakterijama, predstavnici familija *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonadaceae* su najefikasniji proizvođači histamina, kadaverina i putrescina (*Pircher i sar., 2007; Lorenzo i sar., 2010; Gardini i sar., 2016*). Prisustvo putrescina i tiramina u fermentisanim kobasicama dovodi se u vezu sa aktivnošću BMK, dok značajne koncentracije kadaverina i histamina ukazuju na lošu higijensku praksu u procesu proizvodnje i izraženu mikrobiološku kontaminaciju sirovina korišćenih u proizvodnji kobasica (*Suzzi i Gardini 2003; Bover-Cid i sar., 2006; Lorenzo i sar., 2017*).

Na akumulaciju biogenih amina u fermentisanim suvim kobasicama utiču različiti intrinzični i ekstrinzični faktori, kao što su higijenski kvalitet sirovina, sastav autohtone mikroflore, pH vrednost, a_w vrednost, oksido-redukcioni potencijal, koncentracija NaCl, dijametar kobasice i uslovi tokom zrenja i skladištenja proizvoda (*Teodorović i sar., 1994; Komprda i sar., 2004; Stadnik i Dolatowski, 2010; Gardini i sar., 2016; Lorenzo i sar., 2017*). Loš higijenski kvalitet sirovine i prisustvo mikroorganizama predodređenih za sintezu pojedinih biogenih amina povećavaju mogućnost akumulacije istih u fermentisanim kobasicama. Optimalnu aktivnost aminokiselinske dekarboksilaze ostvaruju pri pH vrednosti od 4,0 do 5,5 (*Sinell, 1978*) i najviše koncentracije biogenih amina utvrđene su u proizvodima sa niskim pH vrednostima (*Santos, 1996*). Značajan pad a_w vrednosti i porast koncentracije kuhinjske soli negativno utiču na formiranje i akumulaciju biogenih amina u fermentisanim kobasicama (*Lorenzo i sar., 2017*). Prema *Halasz i sar. (1994)* smanjenje oksido-redukcionog potencijala negativno utiče na formiranje putrescina i kadaverina, a podstiče aktivnost histidin dekarboksilaze, odnosno sintezu histamina. Širi dijametar omotača i dug period zrenja, pri optimalnim uslovima za dekarboksilaciju aminokiselina, značajno doprinose akumulaciji biogenih amina u fermentisanim kobasicama (*Bover-Cid i sar., 1999; Komprda i sar., 2009*). Kobasice šireg

dijametra imaju veći sadržaj vlage i a_w vrednost usled čega se favorizuje rast mikroorganizama i sinteza biogenih amina. Iz istih razloga periferni delovi kobasice imaju manje koncentracije biogenih amina od unutrašnjih delova iste kobasice (Ruiz-Capillas i Jimenez-Colmenero, 2005).

Određivanje sadržaja biogenih amina u fermentisanim suvim kobasicama je veoma važno sa aspekta bezbednosti i kvaliteta proizvoda (Tasić i sar., 2012; Latorre-Moratalla i sar., 2017).

Uneti u prekomernim količinama putem hrane, biogeni amini mogu izazvati različite štetne efekte po zdravlje ljudi. Histamin i tiramin su najtoksičniji amini među biogenim aminima. Budući da histamin u organizmu ima ulogu neurotransmitera i vazodilatatora, povećanje njegove koncentracije u krvi može rezultirati nizom kliničkih manifestacija usled poremećaja hemodinamike (hipotenzija), neuroloških funkcija (glavobolja, palpitacije, svrab) i gastrointestinalnog trakta (mučnina, povraćanje, dijareja), a može izazvati i promene na koži (osip, urtikarija, edem i lokalizovano zapaljenje) (Alvarez i Moreno-Arribas, 2014; Dimitrijevic i sar., 2016; Lorenzo i sar., 2017). Trovanje histaminom poznato je pod nazivom „Skombroidno trovanje” jer je najčešće nastajalo usled konzumiranja mesa riba iz familije *Scromboidae*. Prisustvo putrescina i kadaverina može povećati toksičnost histamina, s obzirom da pomenuti diamini vrše inhibiciju histamin oksidaza (Mohedano i sar., 2015). Tiramin, zajedno sa triptaminom i feniletilaminom, se klasifikuje kao vazokonstriktivni amini, jer pri visokim koncentracijama može izazvati hipertenzivnu krizu. Abnormalno visok nivo tiramina u mozgu se dovodi u vezu sa depresijom, šizofrenijom, Parkinsonovom bolesti i Rejevim sindromom (Ladero i sar., 2010). Intoksikacija tiraminom poznata je pod nazivom „Cheese reaction” i karakteriše se sličnim simptomima kao i trovanje histaminom. Putrescin i kadaverin se smatraju manje opasnim biogenim aminima, s obzirom da visoke koncentracije ovih diamina dovode do razvoja neprijatnog ukusa proizvoda što odvraća potrošače da konzumiraju iste. Ovi diamini mogu reagovati sa prisutnim nitritima usled čega dolazi do formiranja nitrozamina koji su kancerogeni. Takođe, postoje sve veći dokazi da putrescin može imati ulogu u promovisanju malignih transformacija ćelija (Gerner i Meyskens, 2004; Ignatenko i sar., 2006; Shah i Swiatlo, 2008).

Sa druge strane, sadržaj biogenih amina u fermentisanim kobasicama koristi se kao indeks za procenu neželjenih mikrobioloških aktivnosti tokom zrenja (Lu i sar., 2010) i za ocenu dobre proizvođačke prakse (Shalaby, 1996; Eerola i sar., 1998). Shalaby (1996) je predložio nivo tiramina (100-800 mg/kg), histamina (50-100 mg/kg) i feniletilamina (<30,0 mg/kg) kao indikatore dobre proizvođačke prakse. Dodatno, Eerola i sar. (1998) su predložili

ukupnu količinu vazoaktivnih biogenih amina (triptamin, feniletilamin, tiramin i histamin) od 200 mg/kg kao mogući indikator dobre proizvođačke prakse primenjene tokom proizvodnje fermentisanih kobasica. *Latorre-Moratalla i sar. (2008)* su klasifikovali tradicionalne fermentisane kobasice iz različitih evropskih zemalja u pet grupa (A-E) na osnovu ukupnog sadržaja biogenih amina. Grupa A je obuhvatala proizvode sa vrlo niskim ukupnim sadržajem biogenih amina (od ne detektovanih do 150 mg/kg). Grupi B su pripadali proizvodi sa umerenim sadržajem biogenih amina (150-350 mg/kg), pri čemu je tiramin bio glavni amin. C grupu su činili proizvodi sa umerenim sadržajem biogenih amina, ali je kadavarin bio dominantan amin. Grupe D i E, su obuhvatale proizvode sa visokim sadržajem (350-550 mg/kg) i vrlo visokim sadržajem biogenih amina (više od 550 mg/kg). *Latorre-Moratalla i sar. (2008)* ističu da su tradicionalne fermentisane kobasice iz grupa C, D i E manje poželjne zbog povećanog sadržaja određenih biogenih amina.

2.1.5.6. Formiranje senzorskih svojstava

Senzorska svojstva tradicionalnih fermentisanih kobasica zavise pre svega od kvaliteta upotrebljene sirovine i dodataka, sastava nadeva, metaboličke aktivnosti autohtone mikroflora, biohemijskih promena tokom zrenja, kao i od uslova i dužine zrenja (*Spaziani i sar., 2009; Vuković, 2012*). Senzorska svojstva ovih proizvoda rezultat su složenih procesa koji se odvijaju tokom zrenja.

Prvi utisak o kvalitetu fermentisanih kobasica potrošač stiče na osnovu vizuelnog zapažanja, odnosno percepcijom spoljašnjeg izgleda, kao i izgleda poprečnog preseka proizvoda. Tokom procene spoljašnjeg izgleda treba obratiti pažnju na izgled i stanje omotača koji treba da je suv, čist, nepromašćen, dobro prilegao uz nadev, bez uočljivih oštećenja, mrlja, diskoloracija i plesni. Boja površine fermentisanih kobasica pre svega zavisi od vrste i kvaliteta omotača, načina i intenziteta dimljenja, kao i trajanja procesa zrenja (*Elaborat, 2013*).

Izgled preseka fermentisanih kobasica je veoma važan pokazatelj kvaliteta. Prema *Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, 94/2015)*, poprečni presek fermentisanih suvih kobasica treba da ima izgled mozaika sastavljenog od približno jednakih komadića mesa stabilne i ujednačene crvene boje i masnog tkiva beličaste boje, pri čemu su sastojci u nadevu ravnomerno raspoređeni i međusobno čvrsto povezani, bez prisutnih šupljina i pukotina. Kompaktnost nadeva, odnosno čvrsta konzistencija fermentisanih kobasica formira se postepeno tokom zrenja istih. Kada pH

vrednost nadeva dostigne vrednost izolektrične tačke aktomiozina (pH=5,3), proteini miofibrila prelaze iz stanje sola u gel stanje, pri čemu se komadići mesa međusobno slepljuju. Proces geliranja prati izdvajanje vode iz strukture proteina, odnosno sinereza, koja doprinosi formiranju čvršće konzistencije proizvoda. Sa druge strane, poželjna tekstura fermentisanih kobasica je zapravo rezultat balansa između procesa koji doprinose formiranju čvršće konzistencije i procesa proteolize koji dovodi do omekšavanja proizvoda i bolje žvkljivosti (*Barbut, 2007*).

Stabilna crvena boja poprečnog preseka fermentisanih kobasica je veoma važan pokazatelj kvaliteta koji ukazuje na uspešno odvijanje procesa zrenja. U industrijskoj proizvodnji fermentisanih kobasica koriste se soli za salamurenje koje sadrže nitrite i/ili nitrata, jedinjenja koja u mnogome doprinose formiranju stabilne crvene boje. Kao izvor azotmonoksida, nitrati i nitriti omogućavaju stvaranje nitrozilmioglobina, pri čemu se nitrati prethodno moraju redukovati do nitrita pod dejstvom mikrobnih nitratoreduktaza (*Honikel, 2008*). Nitrozilmioglobin, pigment crvene boje, nastaje vezivanjem veoma reaktivnog azotmonoksida za gvožđe u hemu porfirinskog prstena mioglobina. Optimalne uslove za sintezu nitrozilmioglobina stvara mikroflora nadeva, tako što na početku zrenja aerobne bakterije troše kiseonik i snižavaju oksido-redukcionu potencijal, a zatim BMK fermentacijom šećera snižavaju pH vrednost. Prema podacima iz literature, najznačajniji uticaj na stabilnu crvenu boju poprečnog preseka tradicionalnih fermentisanih kobasica ima crvena začinska paprika koja se dodaje pri izradi nadeva ovih proizvoda (*Petrović i sar., 2010; Ikonić i sar., 2010; Vuković i sar., 2012; Roblík i sar., 2013*). U tradicionalnoj proizvodnji fermentisanih kobasica ne koriste se soli za salamurenje, a paprika kao začim sa dobrim antioksidativnim karakteristikama i malim redoks potencijalom, povoljno utiče na formiranje poželjne crvene boje tradicionalnih fermentisanih kobasica, s obzirom da sadrži karotenoide (karoteni i ksantofili) (*Vuković i sar., 2012*). Nitrati iz paprike, takođe, doprinose formiranju boje ovih proizvoda, iako su prisutni u malim količinama (*Vuković i sar., 2011*).

Miris i ukus fermentisanih kobasica rezultat su prisustva različitih jedinjenja koja nastaju tokom procesa fermentacije ugljenih hidrata, proteolize, kao i hidrolize i oksidacije lipida (*Singh i sar., 2012*). Razgradnjom ugljenih hidrata BMK stvaraju mlečnu kiselinu koja dobro disosuje dovodeći do opadanja pH vrednosti i formiranja prijatno kiselkaste arome fermentisanih kobasica. S druge strane, usled stvaranja mravlje, sirćetne i buterne kiseline dolazi do pojave neprijatno kisele arome kobasica. Tokom zrenja fermentisanih kobasica, kao rezultat proteolize nastaju peptidi i slobodne aminokiseline koje mikroorganizmi

transformišu do različitih aromatičnih jedinjenja (*Singh i sar., 2012*). Takođe, dolazi i do hidrolize lipidne frakcije, pri čemu se iz triglicerida i fosfolipita oslobađaju slobodne masne kiseline. Oslobođene niže masne kiseline direktno utiču na aromu proizvoda, dok nezasićene masne kiseline podležu procesu osidacije koji dovodi do formiranja aromatičnih jedinjenja, pre svega aldehida i ketona (*Visessanguan i sar., 2006*). Pored navedenog, lipidi imaju i ulogu rastvarača aromatičnih jedinjenja, s ozirom da je većina njih lipofilna (*Olivares i sar., 2009*). Tipičan ukus fermentisanih kobasica rezultat je ravnoteže između isparljivih (alkohol, ketoni, aldehidi i furani) i neisparljivih jedinjenja (aminokiseline, peptidi, šećeri i nukleotidi), koji potiču od sirovina (mesa, začina, aditiva) ili nastaju u složenim biohemijskim reakcijama tokom zrenja (*Flores i sar., 1997; Toldrá, 1998; Fadda i sar., 2010*).

2.1.6. Skladištenje sremskog kulena

Održivost sremskog kulena, kao fermentisane suve kobasice, zasniva se na niskoj a_w i pH vrednosti. Preporuka je da se ovi proizvodi skladište na temperaturi do +15 °C. Pored temperature skladištenja, neophodno je obezbediti i optimalnu relativnu vlažnost i cirkulaciju vazduha. Poželjno je da relativna vlažnost vazduha bude manja od 75%, a cirkulacija vazduha bude svedena na minimum. Niska relativna vlažnost vazduha limitira rast plesni, od kojih najveći značaj imaju mikotoksogene plesni iz roda *Penicillium* i *Aspergillus*, odnosno zelene plesni (*Teodorović i sar., 2015*). Tokom skladištenja, proces dehidracije proizvoda se nastavlja, što negativno utiče na senzorska svojstva. Ukoliko se proizvod dugo skladišti može doći do pojave naboranosti omotača, suviše tvrde konzistencije i tamnije boje. Takođe, prolongirana oksidacija lipida narušava kvalitet proizvoda pojavom užegle arome i diskoloracija na poprečnom preseku. Proces oksidacije utiče i na hranljivu vrednost proizvoda, s obzirom da izaziva razlaganje vitamina i smanjenje sadržaja polinezasićenih esencijalnih masnih kiselina, a poznato je i da dovodi do nakupljanja toksičnih jedinjenja (*Ansorena i Astiasarán, 2004; Škaljac, 2014*). Stoga je veoma važno obezbediti optimalne uslove skladištenja, kako bi se kvalitet proizvoda što duže održao. Očuvanje kvaliteta fermentisanih suvih kobasica tokom dužeg vremenskog perioda skladištenja može se postići primenom odgovarajućeg načina pakovanja (*Škaljac, 2014*).

2.1.7. Kriterijumi kvaliteta za sremski kulen

Kvalitet sremskog kulena, kao fermentisane suve kobasice, zavisi od kvaliteta svežeg mesa, masnog tkiva i dodataka, zatim od metaboličke aktivnosti mikroorganizama, kao i od mikroklimatskih uslova tokom zrenja proizvoda. Zvanični *Elaborat (2013)*, pored tradicionalnog načina proizvodnje sremskog kulena, propisuje i zahteve u pogledu kvaliteta koje proizvod mora da ispuni. Prema *Elaboratu (2013)*, pH vrednost sremskog kulena treba da je veća od 5,3, s obzirom da u drugoj fazi zrenja pH vrednost raste kao rezultat izražene proteolize (*Vuković i sar., 2012*). Ovaj parametar ukazuje na stepen zrelosti proizvoda. Sremski kulen treba da sadrži manje od 35% vlage, što je i *Pravilnikom o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, 94/2015)* propisano za sve fermentisane suve kobasice. Sadržaj proteina mesa u sremskom kulenu treba da je veći od 30%, a sadržaj kolagena u proteinima mesa manji od 10%. Zahtev za sadržaj proteina mesa u sremskom kulenu propisan *Elaboratom (2013)* strožiji je od zahteva propisanog *Pravilnikom (Sl. glasnik RS, 94/2015)* za domaći kulen, gde sadržaj proteina mesa treba da je najmanje 24%. Sadržaj masti u sremskom kulenu ne sme biti veći od 30% a sadržaj soli manji od 5%. U pogledu senzorskih karakteristika, proizvod takođe mora da ispuni zahteve propisane *Elaboratom (2013)*. Omotač sremskog kulena treba da je suv, čist, nepromašćen, dobro priliegao uz nadev, bez uočljivih oštećenja, mrlja i diskoloracija, a kolonije belih plesni mogu biti mestimično prisutne. Boja omotača treba da je narandžasto-smeđa do crvenkasto-smeđa. Masa gotovog proizvoda može značajno da varira u zavisnosti od veličine kate, ali nikada nije manja od 700 g. Na preseku sremski kulen treba da ima mozaičan izgled koji se sastoji od grubo usitnjenog svinjskog mišićnog i u manjem obimu čvrstog masnog tkiva, pri čemu su sastojci istog stepena usitnjenosti ($\varnothing=8-10$ mm), dobro povezani i ravnomerno raspoređeni. Ne sme biti uočljivih rupica i šupljina, niti većih ostataka vezivnog tkiva, ali mogu biti uočeni komadići ljute začinske paprike ukoliko je pri proizvodnji korišćena kaša (sos) od paprike. Sremski kulen treba da ima čvrstu konzistenciju i da se dobro narezuje u tanke listiće bez ispadanja sastojaka. Komadići mišićnog tkiva treba da su ujednačene, stabilne tamno-crvene boje, dok masno tkivo treba da zadrži belu boju. Boja na preseku mora biti ravnomerna, bez sivih diskoloracija u centru, ali uz mogućnost postojanja nešto tamnijeg perifernog ruba. Miris sremskog kulena mora biti prijatan, na dim, fermentisano svinjsko meso i papriku, a ukus specifičan, pikantno ljut, ne previše slan i kiseo. Pri žvakanju sremski kulen je tvrde teksture i optimalne sočnosti i može se, bez većeg napora, pripremiti do oblika spremnog za gutanje.



3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je da se uporedi mikroflora, kao i parametri kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u industrijskim uslovima u skladu sa tradicionalnim zahtevima, sa mikroflorom i kvalitetom sremskog kulena proizvedenog u seoskom domaćinstvu na tradicionalni način.

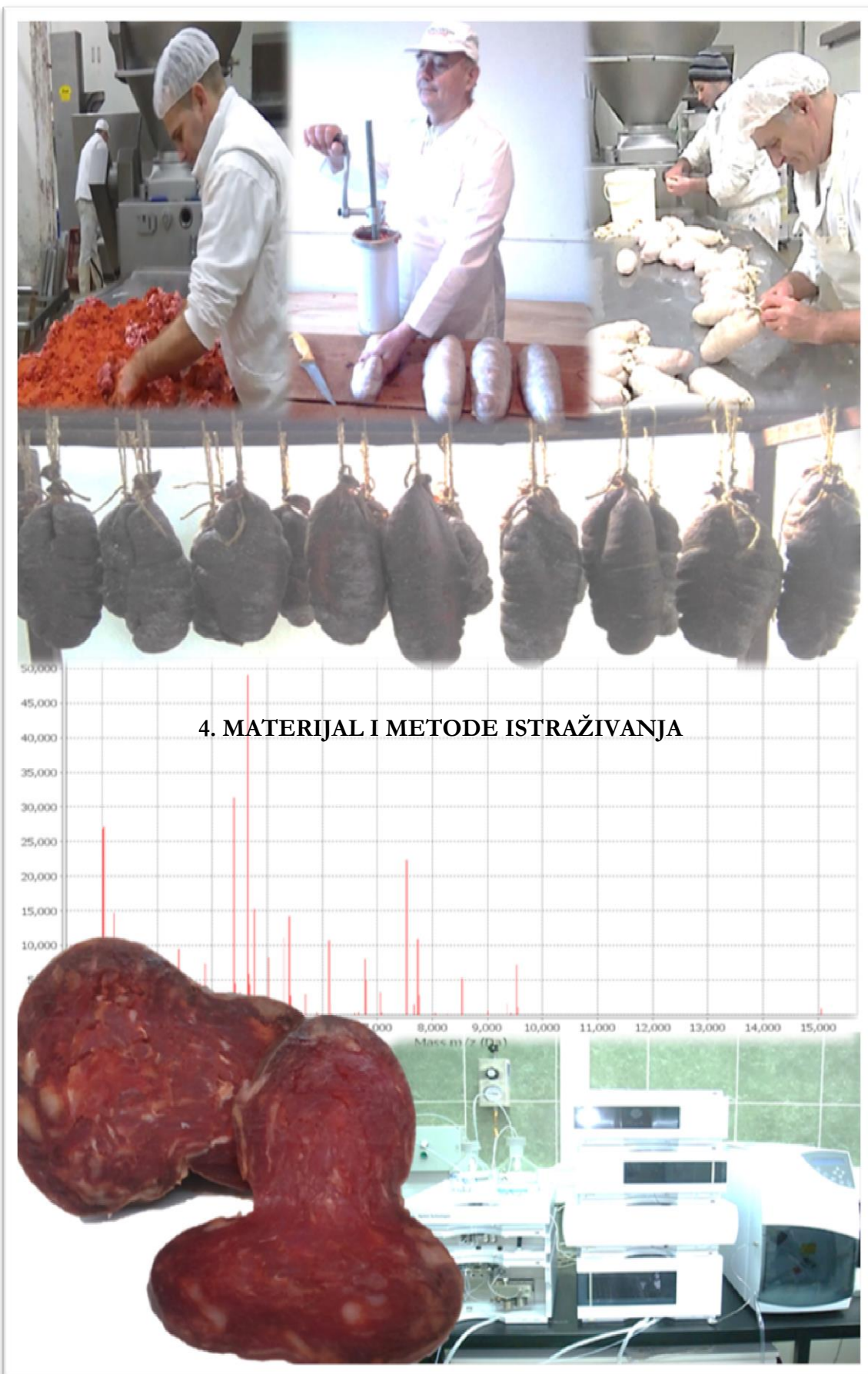
Za ostvarenje ovog cilja, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Izvršiti mikrobiološka ispitivanja:
 - Pratiti dinamiku razvoja autohtone mikroflore oba proizvoda tokom zrenja:
 - broj BMK,
 - broj enterokoka,
 - broj koagulaza-negativnih koka,
 - broj bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*,
 - broj bakterija iz familije *Pseudomonadaceae*,
 - prisustvo *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*.
 - Izvršiti identifikaciju BMK pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry)

2. Pratiti fizičko-hemijske parametre tokom zrenja industrijskog (ISK) i tradicionalnog sremskog kulena (TSK):
 - pH vrednost,
 - kalo sušenja,
 - a_w vrednost

3. Izvršiti hemijska ispitivanja:
 - Utvrditi hemijski sastav oba proizvoda:
 - sadržaj vlage,
 - sadržaj masti,
 - sadržaj proteina mesa,
 - sadržaj kolagena u proteinima mesa,
 - sadržaj pepela,
 - sadržaj hlorida,
 - sadržaj nitrata,
 - sadržaj nitrita.

- Ispitati hidrolitičke i oksidativne promene na mastima tokom zrenja oba proizvoda:
 - sadržaj slobodnih masnih kiselina,
 - peroksidni broj,
 - TBARS vrednost.
 - Pratiti proteolitičke promene tokom zrenja oba proizvoda posredstvom indeksa proteolize,
 - Pratiti sadržaj biogenih amina od značaja za bezbednost i kvalitet fermentisanih kobasica (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina i kadaverina) tokom zrenja oba proizvoda.
4. Izvršiti ispitivanja senzorskih svojstava oba proizvoda na kraju zrenja, odnosno:
- oceniti senzorska svojstva kvantitativnom deskriptivnom analizom,
 - instrumentalno ispitati boju proizvoda,
 - instrumentalno ispitati teksturu proizvoda.



4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. MATERIJAL

Predmet istraživanja doktorske disertacije bio je sremski kulen proizveden u industrijskim i tradicionalnim uslovima. Eksperimentalna proizvodnja ISK i TSK započeta je u decembru 2015. godine. ISK je proizveden u registrovanom industrijskom objektu za klanje životinja i preradu mesa koji se nalazi na teritoriji opštine Pećinci, dok je TSK napravljen u seoskom domaćinstvu u mestu Bešenovo, opština Sremska Mitrovica. Obe eksperimentalne grupe proizvoda proizvedene su prema recepturi iz *Elaborata (2013)*.

Sastav nadeva bio je sledeći:

- 95% svinjsko meso I kategorije,
- 5% čvrsto masno tkivo,
- 2,2% kuhinjska so,
- 1,5% mešavina ljute i slatke crvene začinske paprike u odnosu 1:5.

Za pravljenje nadeva obe eksperimentalne grupe proizvoda koristilo se meso i masno tkivo poreklom od svinja zaklanih u registrovanom objektu za klanje životinja i preradu mesa, poštujući dobrobit životinja, kao i principe dobre proizvođačke i dobre higijenske prakse. U pitanju su bile svinje melezi jorkšir i landras rase, starije od godinu dana, ženskog pola, mase od 150-200 kg, gajene pod istim uslovima, na istoj farmi koja se nalazi na teritoriji Srema. U skladu sa zahtevom *Elaborata (2013)*, korišćena je mlevena začinska paprika proizvedena na teritoriji Srema.

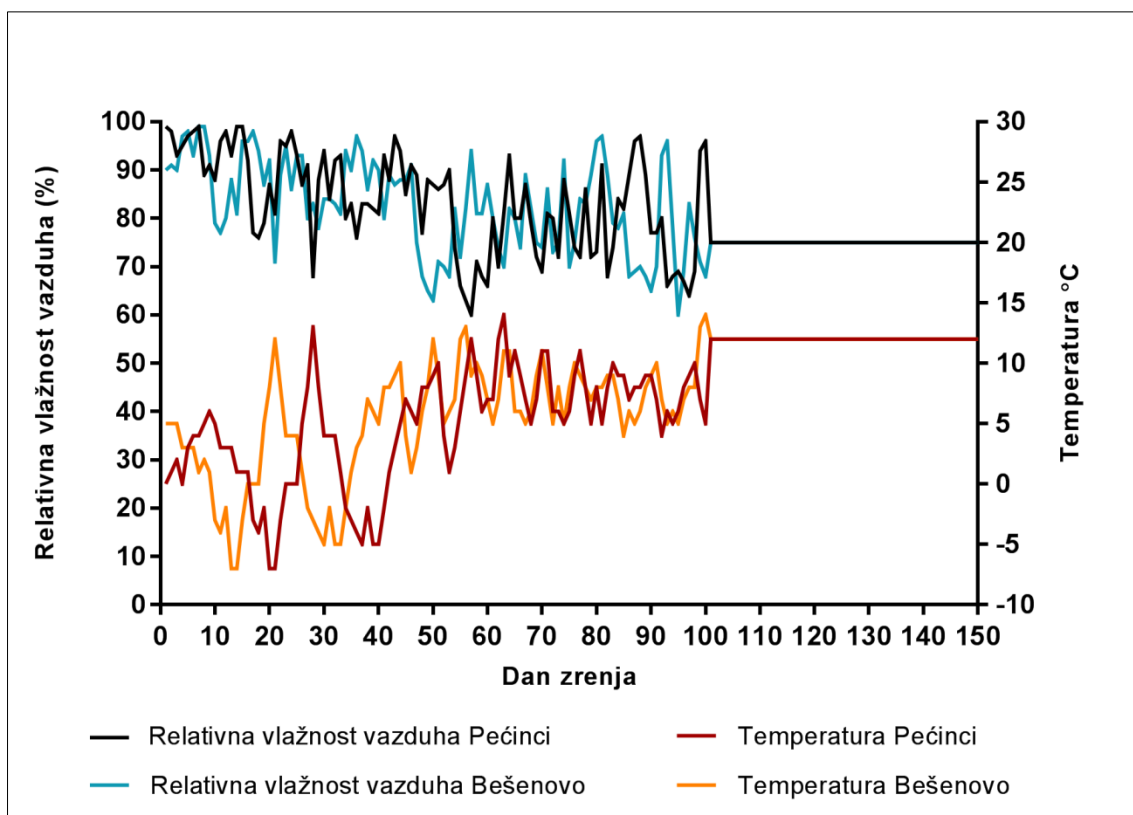
Priprema nadeva ISK bila je u potpunosti sprovedena u industrijskom okruženju pomoću savremenih uređaja, kao što su mašina za mlevenje mesa i vakuum punilica. Prethodno ohlađeno meso i masno tkivo je najpre usitnjeno do granulacije $\varnothing = 8$ mm, a zatim izmešano sa ostalim dodacima. Mešanje nadeva do postizanja homogene mase izvršeno je ručno, poštujući tradicionalni zahtev. Pripremljen nadev ISK punjen je u prethodno očišćena, oprana i usoljena svinjska slepa creva, koja su neposredno pre punjenja odsoljena potapanjem u mlaku vodu. Dobijeni kuleni kačeni su na štapove, jedan do drugog, da se međusobno ne dodiruju, a potom su ostavljeni na ceđenje 24 časa u hladnu prostoriju, kako bi se omotač delimično osušio pre dimljenja. Proces dimljenja ISK trajao je 7 dana, 12 h dnevno, primenom hladnog dima koji se dobijao pirolizom drveta bukve. Dimljenje je sprovedeno u skladu sa tradicionalnim zahtevima, u specijalno napravljenj komori industrijskog kapaciteta čiji su mikroklimatski parametri (temperatura, relativna vlažnost vazduha i cirkulacija vazduha) bili pod uticajem lokalnih klimatskih uslova. Po završenom

dimljenju, proizvod je zadržan u istoj komori, kako bi se sušenje i zrenje proizvoda odvijalo pod uticajem lokalnih klimatskih uslova, a zatim je nakon 100 dana zrenja zbog visokih spoljnih temperatura ($>20^{\circ}\text{C}$) prebačen u komoru sa kontrolisanim mikroklimatskim parametrima (temperatura 12°C ; relativna vlažnost vazduha 75%). Zrenje ISK trajalo je 150 dana. Proces proizvodnje ISK i TSK ilustrativno je prikazan na *slici 2*.



Slika 2. Ilustrativni prikaz procesa proizvodnje ISK i TSK

Nadev za TSK pripremljen je u tradicionalnim uslovima, primenom zanatskih uređaja. Ohlađeno meso i masno tkivo usitnjeno je do granulacije $\varnothing = 8$ mm pomoću mašine za mlevenje mesa. Nakon dodavanja svih sastojaka usledio je tradicionalni postupak ručnog mešanja nadeva do postizanja homogene mase, a zatim je nadev pomoću ručne punilice punjen u prethodno očišćena, oprana i usoljena svinjska slepa creva, koja su neposredno pre punjenja odsoljena potapanjem u mlaku vodu. Napravljeni kuleni kačeni su na štapove, jedan do drugog, da se međusobno ne dodiruju, a potom su odneti u pušnicu gde su se pre dimljenja cedili 24 h. Dimljenje TSK odvijalo se u tradicionalnoj pušnici sa otvorenim ložištem, primenom hladnog dima, koji se dobijao pirolizom drveta bukve. Proces dimljenja takođe je trajao 7 dana (12 h dnevno), a zatim je usledilo sušenje proizvoda sa istovremenim zrenjem u tradicionalnim uslovima, pod uticajem lokalnih klimatskih uslova. Zbog visokih spoljnih temperatura proizvod je nakon 100 dana zrenja, kao i ISK, prebačen u već pomenutu komoru sa kontrolisanim mikroklimatskim parametrima gde je boravio do 150. dana zrenja. Relativna vlažnost vazduha i temperaturni režim tokom zrenja ISK i TSK prikazani su na *slici 3*.



Slika 3. Relativna vlažnost vazduha i temperatura tokom zrenja ISK i TSK

4.2. METODE

Nakon pripreme nadeva i punjenja u omotače ISK i TSK usledilo je kontinuirano ispitivanje oba proizvoda koje se odvijalo do kraja zrenja istih. Izvršena su mikrobiološka, fizičko-hemijska, hemijska i senzorna ispitivanja. Za potrebe navedenih ispitivanja izvršeno je uzorkovanje proizvoda obe eksperimentalne grupe nultog dana (uzorkovan je nadev), a zatim nakon 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120 i 150 dana zrenja. Tokom svakog uzorkovanja uzeto je po šest uzoraka sremskog kulena iz obe eksperimentalne grupe proizvoda.

4.2.1. MIKROBIOLOŠKA ISPITIVANJA

U cilju ispitivanja dinamike razvoja i sastava mikroflore ispitivanih proizvoda izvršena su mikrobiološka ispitivanja, koja su obuhvatila ispitivanje broja mikroorganizama, kao i identifikaciju BMK pomoću MALDI-TOF metode.

4.2.1.1. Ispitivanje broja mikroorganizama

Ispitivanje broja mikroorganizama u eksperimentalnim proizvodima izvršeno je nultog dana (ispitivanje nadeva), kao i nakon 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120 i 150 dana zrenja ispitivanih proizvoda, na šest slučajno odabranih uzoraka iz obe eksperimentalne grupe. Za potrebe bakteriološkog ispitivanja pripremano je osnovno razblaženje od svakog uzorka, tako što je u *Stomacher* kesi odmereno 25 g uzorka, naliveno sa 225 ml puferisane peptonske vode (Himedia) i homogenizovano 30 sekundi u *Stomacher-u*. Iz osnovnog razblaženja svakog uzorka pripremana je serija decimalnih razblaženja iz kojih su u duplikatu zasejavane ploče sa različitim hranljivim podlogama u cilju određivanja broja BMK, *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp. i bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonadaceae*. Zasejane hranljive podloge su inkubirane pod uslovima navedenim u **Tabeli 2**.

Tabela 2. Uslovi kultivisanja ispitivanih mikroorganizama

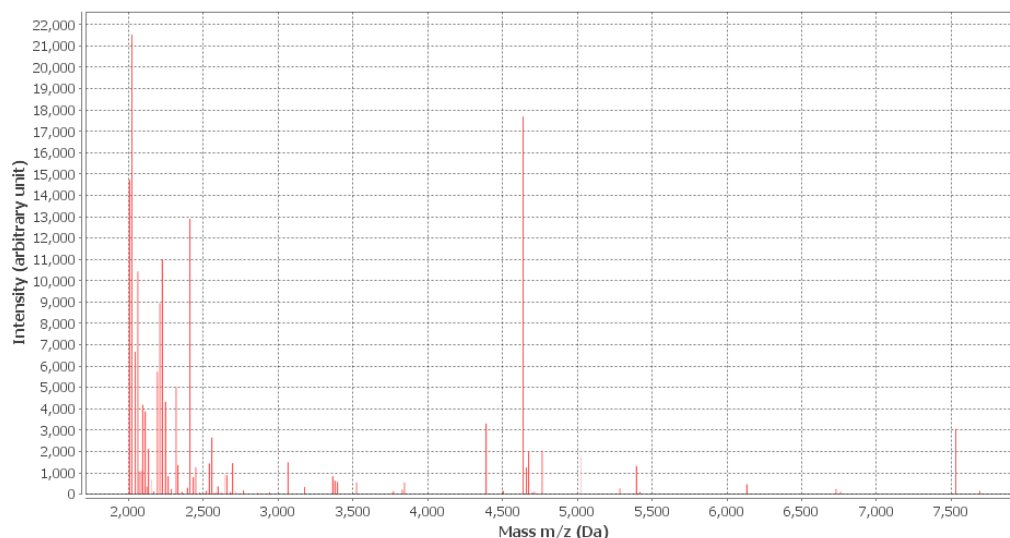
Mikroorganizam	Hranljiva podloga	Uslovi inkubacije		
		Temperatura °C	Vreme h	O ₂
BMK	MRS agar (Merck, Nemačka)	30	72	-
<i>Enterococcus</i> spp.	KEA (Merck)	37	48	+
<i>Micrococcus</i> spp.	MSA (Merck)	37	48	+
<i>Enterobacteriaceae</i>	BG agar (Lab M Limited, UK)	37	24	+
<i>Pseudomonadaceae</i>	Pseudomonas agar (Lab M Limited)	30	48	+

Nakon inkubacije izvršeno je brojanje izraslih kolonija, a utvrđeni broj bakterija iskazan je kao log cfu/g uzorka. Bakteriološko ispitivanje ISK i TSK obuhvatilo je i utvrđivanje prisustva *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*. Utvrđivanje prisustva *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes* rađeno je prema standardnim metodama ISO 6579:2002 i ISO 11290-1:1996.

4.2.1.2. Identifikacija BMK pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije

Identifikacija BMK izolovanih iz ISK i TSK izvršena je primenom MALDI TOF masene spektrometrije pomoću aparata Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Identifikacija izolata BMK izvršena je nultog dana, kao i nakon 30, 60, 90, 120 i 150 dana zrenja proizvoda. Po danu ispitivanja identifikovao je 30 izolata BMK iz obe eksperimentalne grupe proizvoda, do kojih se došlo nasumičnim odabirom tipičnih kolonija tokom određivanja broja BMK. Samim tim, u cilju ispitivanja diverziteta BMK, formirana je kolekcija od 360 izolata, 180 poreklom iz industrijskog proizvoda i 180 poreklom iz proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima. Ispitivani izolati BMK su pre identifikacije presejani na neselektivnu podlogu, a zatim inkubirani u anaerobnim uslovima (*GenBox anaer*, BioMérieux, France) pri temperaturi od 30°C, tokom 24 h.

Primenjena je metoda direktnog transfera. Po završenoj inkubaciji mala količina pojedinačnih kolonija je sterilnim štapićem, u vidu tankog filma, direktno naneta na čeličnu pločicu sa 96 mesta. Pločica sa nanetim filmom je ostavljena oko 1 min da se osuši na sobnoj temperaturi, a zatim je na pločicu nanesen 1 µl VITEK MS-CHCA matriksa, (*BioMérieux*). Nakon podešavanja i kalibracije aparata prema instrukciji proizvođača, izolati BMK pripremljeni na ovaj način su zatim podvrgnuti MALDI TOF masenoj spektrometriji. Za kalibraciju aparata korišćen je soj *Escherichia coli* ATCC® 8739. Tokom samog procesa masene spektrometrije, pod dejstvom lasera na tanki film bakterija i matriksa dolazi do jonizacije proteina i njihovog razdvajanja u električnom polju, a zatim se usmeravaju u vakuum cev i razdvajaju u zavisnosti od mase i naboja. Na ovaj način proteini pristižu u detektor u sekvencama koje su obrnuto proporcionalne njihovoj masi stvarajući profil proteina (*mass spectral fingerprinting*). Glavni pikovi pripadaju ribozomalnim i ostalim većinski zastupljenim proteinima, kao što su HSP (*heat shock proteini*), DNK vezujući proteini i RNK šaperoni. Zatim se dobijeni profil analizira i poredi sa bazom podataka, što omogućava preciznu identifikaciju mikroorganizama. Za očitavanje rezultata korišćena je baza podataka VITEK MS V2.0 Knowledge Base - Industry Use. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije za *Lactobacillus sakei* prikazan je na slici 4.



Slika 4. Prikaz spektra MALDI-TOF masene spektrometrije za *Lactobacillus sakei*

4.2.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ISPITIVANJA

U cilju praćenja toka sušenja i zrenja ispitivanih proizvoda izvršena su fizičko-hemijska ispitivanja koja su obuhvatila merenje pH vrednosti, gubitka mase proizvoda (kalo sušenja) i a_w vrednosti. Fizička i fizičko-hemijska ispitivanja vršena su nakon svakog uzorkovanja.

4.2.2.1. Određivanje pH vrednosti

Određivanje pH vrednosti ISK i TSK vršeno je prema referentnoj metodi *SRPS ISO 2917:2004* pomoću ubodnog pH-metra WTW 340i (Nemačka). Pre svakog merenja izvršena je kalibracija pH-metra standardnim fosfatnim puferima (pH 7,00 i 4,00 na 20°C).

4.2.2.2. Određivanje kala sušenja

Kalo sušenja je određen gravimetrijskom metodom. Za ove potrebe izdvojeno je 5 kobasica iz obe eksperimentalne grupe proizvoda odmah po završenoj operaciji punjenja, koje su potom izmerene, a zatim kontinuirano merene do kraja procesa zrenja proizvoda. Razlika u masi, izražena kao procenat početne mase kobasica, predstavljala je kalo sušenja.

4.2.2.3. Određivanje a_w vrednosti

Određivanje a_w vrednosti ISK i TSK rađeno je u skladu sa referentnom metodom *ISO 21807:2004E* pomoću a_w -metra (a_w -Wert Messer, GBX Scientific Instruments, Fa-St/1). Postupak određivanja a_w vrednosti obuhvatao je punjenje merne posudice do 2/3 njene visine sa grubo usitnjenim uzorkom i postavljanje istih u merni deo aparata, kao i sam proces merenja pri konstantnoj temperaturi od 20 °C.

4.2.3. HEMIJSKA ISPITIVANJA

4.2.3.1. Ispitivanje hemijskog sastava

Ispitivanje hemijskog sastava ISK i TSK izvršeno je nultog i 150. dana zrenja proizvoda primenom standardnih metoda opisanih u nastavku teksta.

Određivanje sadržaja vlage

Određivanje sadržaja vlage rađeno je prema referentnoj metodi *SRPS ISO 1442:1998*. Princip metode se zasniva na potpunom mešanju dela homogenizovanog uzorka za ispitivanje sa kvarcnim peskom i sušenju do konstantne mase na $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, pri čemu se sadržaj vlage izražava u g/100g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja ukupnih masti

Određivanje sadržaja ukupnih masti rađeno je prema metodi po Soxhletu (*SRPS ISO 1443:1998*). Princip metode zasniva se, najpre, na hidrolizi dela uzorka sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom i na filtriranju dobijene mase uz ispiranje vrućom destilovanom vodom do neutralne reakcije. Nakon završenog filtriranja pristupa se sušenju zaostale masti na filter papiru i njenoj ekstrakciji petroletrom u aparaturi po Soxhletu u trajanju od 5 h. Zatim se ekstrahovani uzorak suši do konstantne mase u sušnici na temperaturi $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, a sadržaj ukupne masti izražava u g/100 g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja azota (proteina mesa)

Određivanje sadržaja proteina mesa rađeno je prema referentnoj metodi *SRPS ISO 937:1992*, pomoću uređaja Digestor 1001 (Foss, Švedska) i Kjeltec 8400 Analyzer Unit (Foss, Švedska). Princip metode se zasniva na digestiji uzorka koncentrovanom sumpornom kiselinom uz korišćenje bakar(II)-sulfata kao katalizatora sa ciljem da se organski azot prevede u amonijum-jone. Potom sledi alkalizacija i destilacija oslobođenog amonijaka u višku rastvora borne kiseline, a zatim titracija sa hlorovodoničnom kiselinom kako bi se odredio amonijak vezan za bornu kiselinu. Sadržaj azota u uzorku izračunava se iz količine utvrđenog amonijaka dok je sadržaj proteina jednak proizvodu sadržaja azota i faktora 6,25.

Određivanje sadržaja hidrosiprolina (kolagena)

Određivanje sadržaja hidrosiprolina rađeno je u skladu sa referentnom metodom *SRPS ISO 3496:2002*. Princip metode zasniva se na hidrolizi dela uzorka za ispitivanje u

sumpornoj kiselini na 105°C, a zatim sledi filtriranje i razblaživanje hidrolizata. Oksidacija hidroksiprolina hloraminom-T praćena je obrazovanjem jedinjenja crvene boje sa *p*-dimetilamino-benzaldehidom. Nakon toga sledi fotometrijsko merenje na talasnoj dužini od 558 nm. Sadržaj kolagena dobijen je množenjem sadržaja hidroksiprolina sa faktorom 8, a zatim je određen relativni sadržaj kolagena ($\text{sadržaj kolagena} / \text{sadržaj proteina} \times 100\%$).

Određivanje sadržaja pepela

Određivanje sadržaja pepela rađeno je u skladu sa referentnom metodom *SRPS ISO 936:1999*. Princip metode zasniva se, najpre na sušenju i ugljenisanju dela ispitivanog uzorka, a zatim na žarenju istog (550 ± 25 °C), do postizanja sivobeke boje ostatka. Posle hlađenja odredi se masa ostatka, a sadržaj pepela se izražava u g/100g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja hlorida

Određivanje sadržaja hlorida (NaCl) rađeno je prema metodi po Volhardu (*SRPS ISO 1841-1:1999*). Metoda se zasniva na ekstrakciji dela uzorka vrućom vodom i taloženju proteina, a zatim se po završetku filtracije i zakišeljavanja ekstrakta dodaje rastvor srebro nitrata u višku, koji se titruje rastvorom kalijum tiocijanata. Sadržaj hlorida se izražava u g/100g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja nitrata

Određivanje sadržaja nitrata rađeno je u skladu sa referentnom metodom *SRPS ISO 3091:1999*. Princip metode se zasniva na ekstrakciji dela uzorka za ispitivanje toplom vodom, taloženju proteina i filtraciji, uz redukciju ekstrahovanih nitrata iz filtrata u nitrite metalnim kadmijumom. Dodavanjem sulfanilamid-hlorida i naftiletildiamina, filtrat zbog prisutnih nitrita poprima crvenu boju, a zatim sledi fotometrijsko merenje na talasnoj dužini od 538 nm. Pomoću koncentracije nitrita očitane sa kalibracione krive i njihovog sadržaja izračuna se sadržaj nitrata, koji se izražava u mg/kg proizvoda.

Određivanje sadržaja nitrita

Određivanje sadržaja nitrita rađeno je u skladu sa referentnom metodom *SRPS ISO 2918:1999*. Princip metode se zasniva na ekstrakciji dela uzorka za ispitivanje toplom vodom, taloženju proteina i filtraciji, uz dodavanje sulfanilamid-hlorida i naftiletildiamina u filtrat koji usled prisutnih nitrita poprima crvenu boju. Zatim sledi fotometrijsko merenje

na talasnoj dužini od 538 nm i očitavanje koncentracije nitrita sa kalibracione krive. Sadržaj nitrita se izražava u mg/kg proizvoda.

4.2.3.2. Ispitivanje hidrolitičkih i oksidativnih promena lipida

Ispitivanje hidrolitičkih i oksidativnih promena lipida ISK i TSK izvršeno je nultog dana, kao i nakon 28, 60, 90, 120 i 150 dana zrenja proizvoda primenom metoda opisanih u nastavku teksta.

Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina (kiselinski broj)

Pod kiselinskim brojem se podrazumeva broj miligrama kalijum-hidroksida potrebnih za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina prisutnih u 1 g masti. Kiselinski broj ISK i TSK određen je u skladu sa referentnom metodom *SRPS EN ISO 660:2011*. Ekstahovane masti iz uzoraka prvo su rastvorene u toplom etanolu, a zatim je izvršena titracija sa vodenim rastvorom kalijum-hidroksida. Kiselinski broj se izražava u mg KOH/g masti.

Određivanje peroksidnog broja

Peroksidni broj se definiše kao količina onih supstancija u uzorku, izražena kao aktivni kiseonik, koje oksidišu kalijum-jodid podeljena masom dela uzorka za ispitivanje. Peroksidni broj ISK i TSK određen je u skladu sa referentnom metodom *SRPS EN ISO 3960:2011*. Princip metode se zasniva na tretiranju dela uzorka za ispitivanje u rastvoru sirćetne kiseline i izo-okšana rastvorom kalijum-jodida, usled čega dolazi do oslobađanja joda. Titracija oslobođenog joda vrši se standardnim volumetrijskim rastvorom natrijum-tiosulfata. Peroksidni broj se izražava u mmol/kg ili miliekvivalentima kiseonika po kilogramu masti (meq O₂/kg).

Određivanje TBARS vrednosti

TBARS vrednost („*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*”) ISK i TSK određena je prema kombinovanoj metodi *Tarladgis i sar. (1964)* i *Holland (1971)*. Princip metode se zasniva na izdvajanju malondialdehida procesom destilacije vodenom parom, a zatim se dodaje tiobarbiturna kiselina koja reaguje sa malondialdehidom dovodeći do pojave crvene boje rastvora, čiji se intenzitet meri pomoću spektrofotomera na talasnoj dužini 532 nm. Pomoću očitane koncentracije malondialdehida sa kalibracione krive određuje se TBARS vrednost izražena kao broj mg malondialdehida po kilogramu uzorka (mg MDA/kg).

4.2.3.3. Ispitivanje proteolitičkih promena tokom zrenja - indeks proteolize

Određivanje indeksa proteolize vršeno je nultog dana, kao i nakon 28, 60, 90, 120 i 150 dana zrenja. Kako bi se utvrdio indeks proteolize neophodno je bilo utvrditi ukupan sadržaj azota i sadržaj neproteinskog azota. Određivanje sadržaja ukupnog azota rađeno je prema već pomenutoj standardnoj metodi po Kjeldahlu (SRPS ISO 937:1992). U cilju utvrđivanja sadržaja neproteinskog azota, 10 g uzorka je homogenizovano sa 20 ml 10% (w/v) trihlorsirćetne kiseline. Dobijeni homogenat je ostavljen da odstoji 2 h na temperaturi od 4 °C, a zatim je profiltrovao. Određivanje sadržaja neproteinskog azota vršeno je u 10 ml filtrata pomoću standardne metode po Kjeldahlu (SRPS ISO 937:1992). Izračunavanje indeksa proteolize vršeno je prema formuli: $\text{sadržaj neproteinskog azota} / \text{sadržaj ukupnog azota} \times 100\%$.

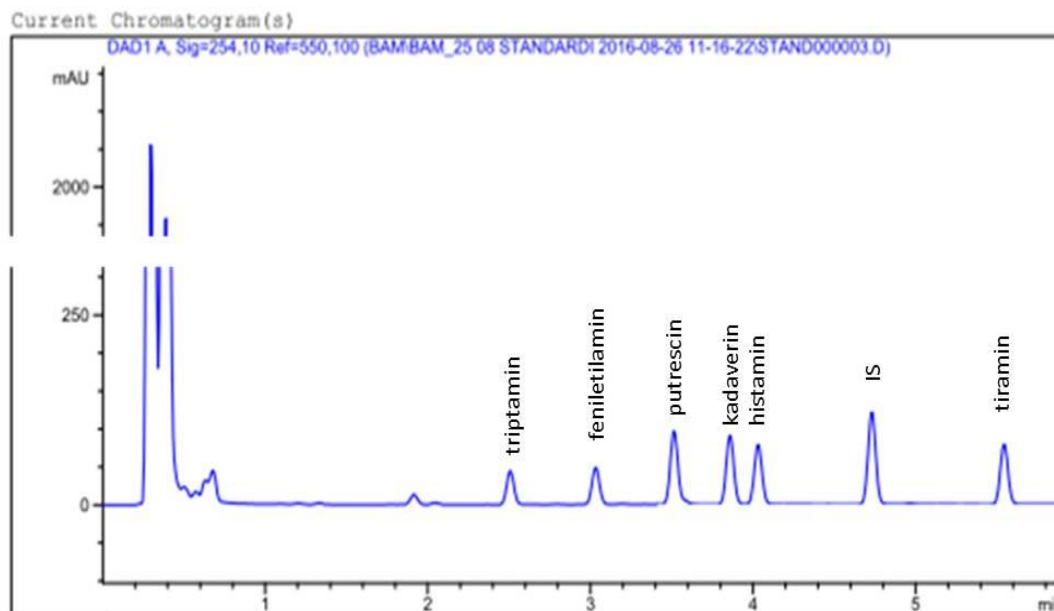
4.2.3.4. Određivanje sadržaja biogenih amina

Određivanje sadržaja biogenih amina vršeno je tečnom hromatografijom visoke rezolucije („High Performance Liquid Chromatography”) prema Tasić i sar. (2012). Za potrebe HPLC analize neophodno je bilo pripremiti standardne rastvore biogenih amina, radni rastvor standarda, rastvor internog standarda, kao i rastvor danzilhlorida. Svaki od šest standarda biogenih amina je posebno rastvoren u 50 ml destilovane vode i to: 80 mg histamin dihidrohlorida, 60 mg tiramin hidrohlorida, 70 mg β-feniletilamin hidrohlorida, 60 mg triptamin hidrohlorida, 90 mg putrescin dihidrohlorida i 90 mg kadaverin dihidrohlorida. Osnovni rastvori standarda čuvani su na 4 °C najduže mesec dana. Radni rastvor standarda je dobijen razblaživanjem osnovnih standardnih rastvora biogenih amina u vodi do koncentracije od 100 µg/ml i čuvan je na 4 °C najduže nedelju dana. Rastvor internog standarda je pravljen tako što je 50 mg 1,7-diaminoheptana rastvoreno u 50 ml vode i čuvan je na 4 °C najduže nedelju dana. Rastvor danzilhlorida je pripreman neposredno pre upotrebe tako što je 20 mg danzilhlorida, reagensa za derivatizaciju rastvoreno u 2 ml acetona.

Priprema i ekstrakcija uzoraka izvršene su prema metodi Eerola i sar. (1993). Najpre je u epruvete tačno izmereno oko 2 g uzorka. Nakon dodatka određene količine internog standarda i 10 ml 0,4 M perhlorne kiseline, uzorak je homogenizovan na ultraturaksu 1 min, a zatim je homogenat centrifugiran 10 minuta na 3000 obrtaja. Supernatant je nakon filtriranja prenet u odmerni sud od 25 ml. Ekstrakcija je ponovljena sa dodatkom još 10 ml

0.4 M perhlorne kiseline, a sadržaj je dobro izmešan pre ponovnog centrifugiranja pod istim uslovima. Supernatanti su spojeni i odmerni sud je dopunjen do oznake perhlornom kiselinom. U 1 ml ekstrakta uzorka dodato je 200 μL 2 M NaOH, 300 μl zasićenog rastvora NaHCO_3 i 2 ml danzilhlorida, nakon čega je reakciona smeša inkubirana u vodenom kupatlu 45 minuta na 40 °C. Ostatak danzilhlorida uklonjen je dodatkom 100 μl amonijaka (25%). Nakon 30 minuta reakciona smeša je razblažena acetonitrilom do zapremine od 5 ml i filtrirana kroz membranske filtre sa veličinom pora od 0.45 μm (*MCE, mixed cellulose esters*).

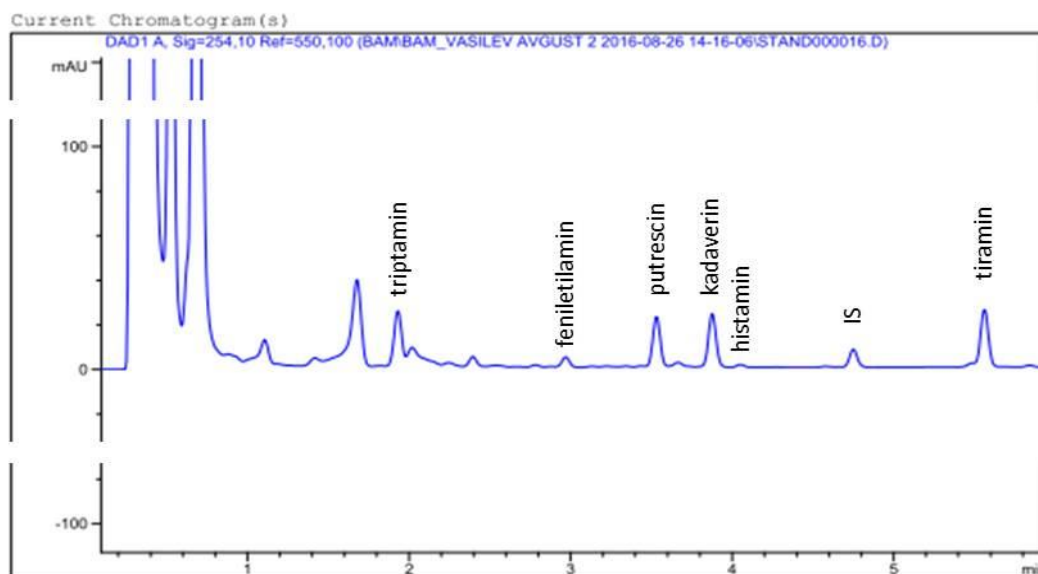
HPLC analiza je rađena pomoću aparata (*Agilent 1200 series*), koji sadrži binarnu pumpu, vakuumski degazer, autosempler, termostat, kolonu Eclipse XDB-C18, 1.8 μm 4.6 x 50 mm i detektor sa serijom dioda (*DAD*). Tokom hromatografskog razdvajanja, kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača A (acetonitril) i B (ultračista voda) primenom sledećeg gradijenta: u početku 50% B; linearni gradijent do 10% B za 7,6 minuta, 10% B do 10 minuta; linearni gradijent do 50% B za 2 minuta. Sistem je stabilizovan na početne uslove 3 minuta pre sledeće analize. Protok pokretne faze je bio 1,5 ml u minutu, a temperatura kolone 40 °C. Injektovano je 5 μl uzorka. Razdvojene komponente su detektovane na 254 nm, a spektri su snimljeni u opsegu 190-400 nm.



Slika 5. HPLC profil biogenih amina standardne smeše

Takođe, utvrđeni su limiti detekcije za ispitivane biogene amine: 0,10 mg/g za putrescin, 0,17 mg/g za kadaverin i tiramin, 0,25 mg/g za histamin, triptamin i feniletilamin. Tipičan

hromatogram za standardnu smešu prikazan je na **slici 5**, dok je hromatogram uzorka sremskog kulena prikazan na **slici 6**.



Slika 6. HPLC profil biogenih amina u uzorku sremskog kulena

4.2.4. ISPITIVANJE SENZORSKIH SVOJSTAVA

Ispitivanje senzorskih svojstava ISK i TSK obuhvatilo je kvantitativnu deskriptivnu analizu, instrumentalno ispitivanje boje i instrumentalno ispitivanje teksture proizvoda. Ispitivanje senzorskih svojstava vršeno je na kraju procesa zrenja proizvoda.

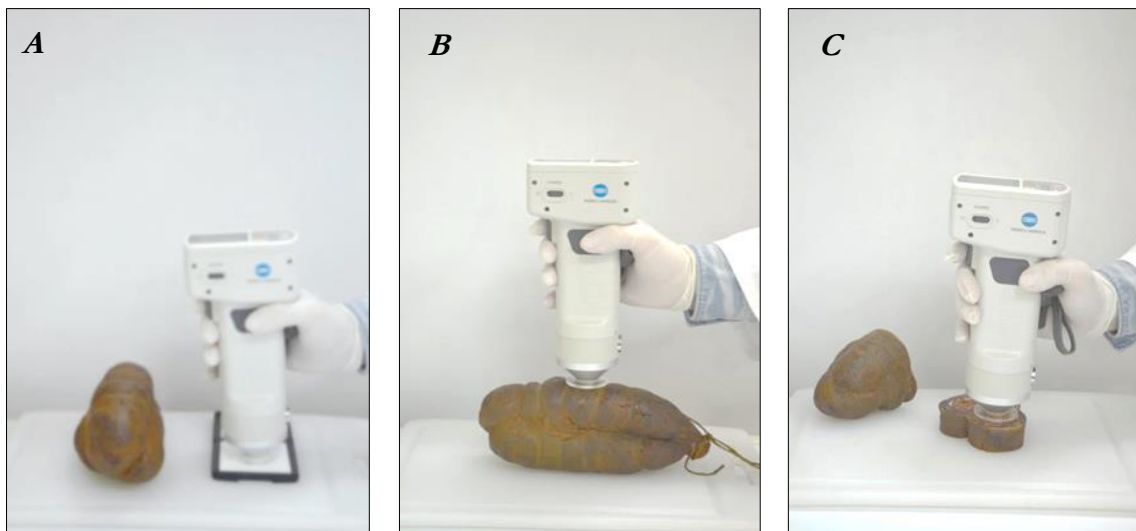
4.2.4.1. Kvantitativna deskriptivna analiza

Senzorska analiza ISK i TSK izvršena je pomoću kvantitativnog deskriptivnog testa (*ISO 6564:1985*) od strane komisije koju su činili 7 izabranih i obučeni ocenjivača (*ISO 8586-2:2008*) u prostorijama koje su projektovane prema zahtevima standarda *SRPS EN ISO 8589:2012*. Izvršeno je ocenjivanje: spoljašnjeg izgleda; izgleda i sastava preseka; boje i održivosti boje; mirisa i ukusa; teksture i sočnosti. Svako navedeno svojstvo je ocenjeno ocenom od 1 do 5, gde je svaka ocena predstavljala određeni nivo kvaliteta. Tako je ocena 0 ukazivala na vidljiva mehanička oštećenja i/ili na vidljivu mikrobiološku neispravnost; ocena 1 je ukazivala na izmenjeno i netipično senzorsko svojstvo proizvoda, neprihvatljiv proizvod; ocena 2 je ukazivala na izražene do veoma izražene mane i nedostatke u kvalitetu proizvoda; ocena 3 je ukazivala na određene mane i nedostatke kvaliteta proizvoda; ocena 4 je ukazivala na uočljiva odstupanja ili neznatne nedostatke u kvalitetu proizvoda; dok je ocena 5 ukazivala na izuzetna, tipična senzorska svojstva, odnosno na optimalan kvalitet

proizvoda. Kako bi se dobila ocena ukupnog senzorskog kvaliteta, ocena svakog analiziranog senzorskog svojstva je pomnožena sa odgovarajućim koeficijentom značajnosti, i to: ocena spoljašnjeg izgleda x 2; ocena izgleda i sastava preseka x 5; ocena boje i održivosti boje x 3; ocena mirisa i ukusa x 7; ocena teksture i sočnosti x 3. Prikazane su srednje vrednosti ocena ispitivanih senzorskih parametara, kao i srednja ponderisana ocena ukupnog senzorskog kvaliteta sremskog kulena (Baltić i Karabasil, 2011).

4.2.4.2. Instrumentalno ispitivanje boje

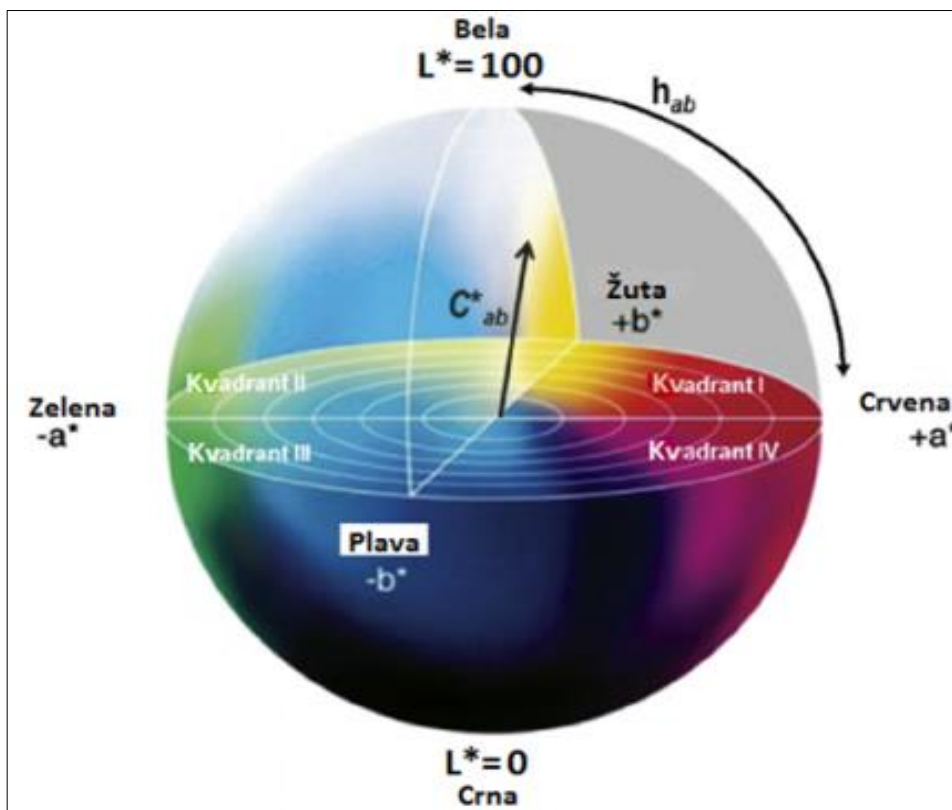
Instrumentalno ispitivanje boje ISK i TSK rađeno je na kraju zrenja proizvoda pomoću kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 sa otvorom 8 mm na mernoj glavi i standardnim nastavkom za merenje CR-A33b (Konica Minolta Inc., Osaka, Japan). Merenja su izvršena u D-65 osvetljenju sa standardnim uglom zaklona od 2°, a pre svake serije merenja izvršena je kalibracija kolorimetra standardnom procedurom, prema instrukcijama proizvođača. Parametri boje izmereni su na površini ISK i TSK (preko omotača), kao i na svežim presecima uzoraka kobasica (Slika 7). Boja površine merena je na gornjoj, srednjoj i donjoj trećini tradicionalnog i industrijskog sremskog kulena, kao i na šest preseka oba proizvoda, pri čemu je na svakom preseku izvršeno šest merenja.



Slika 7. Instrumentalno određivanje boje: **A**- kalibracija uređaja; **B**-merenje boje na površini kobasice; **C**- merenje boje na poprečnom preseku kobasice.

Parametri boje su predstavljeni u CIE $L^*a^*b^*$ sistemu zasnovanom na tri koordinate preko kojih se definiše boja: L^* (svetloća), a^* (udeo crvene boje) i b^* (udeo žute boje) (Slika 8). Na osnovu izmerenih parametara boje, a pomoću matematičkih formula, određene su i sledeće karakteristike boje:

- nijansa boje - $h = \arctan(b^*/a^*)$
- zasićenost boje - $C^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{0,5}$
- relativni odnos crvene i žute boje - $R = a^*/b^*$
- indeks braon boje - $BI = (100 \times (x - 0,31)) / 0,17$, $x = (a^* + 1,75 \times L^*) / (5,645 \times L^* + a^* - 3,012 \times b^*)$.



Slika 8. CIE $L^*a^*b^*$ sistem

4.2.4.3. Instrumentalno ispitivanje teksture

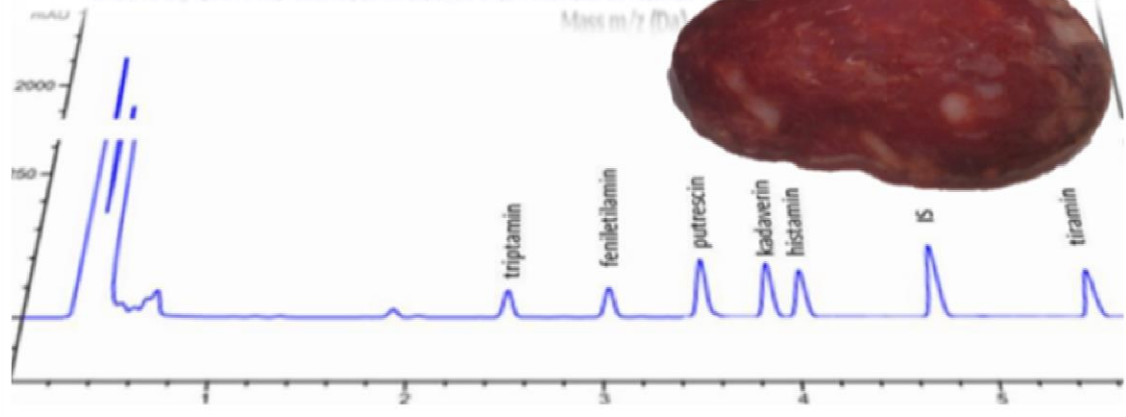
Instrumentalno ispitivanje teksture ISK i TSK rađeno je na kraju zrenja proizvoda pomoću TPA (Texture Profile Analysis) testa na aparatu Instron 4301, na uzorku debljine 2 cm i promera 2,54 cm, pri 50% kompresije i brzini od 1 mm/s. Od parametara teksture, određeni su: čvrstoća, elastičnost, kohezivnost i žvkljivost.

4.2.5. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Tokom statističke analize dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta najpre su određeni deskriptivni statistički parametri. Deskriptivni statistički parametri, odnosno aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, minimalna, maksimalna vrednost i koeficijent varijacije, omogućavaju opisivanje eksperimentalnih rezultata i njihovo tumačenje. Dalja statistička analiza odvijala se u zavisnosti od toga da li su analizirani podaci normalno distribuirani ili ne. Testiranje na normalnost podataka izvedena je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. U slučaju normalne distribucije podataka, za utvrđivanje značajnih razlika između dve eksperimentalne grupe korišćen je t-test. U slučaju kada podaci nisu bili normalno distribuirani upotrebljen je Mann-Whitney test. Signifikantnost razlika je utvrđena na nivoima značajnosti od 5%, 1% i 0,1%. Dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u statističkom paketu PrismaPad 6.00. za Windows, (GraphPad Software, San Diego, California, USA) www.graphpad.com i MS Excel-u.



5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA



5.1. MIKROBIOLOŠKA ISPITIVANJA

5.1.1. Ispitivanje broja mikroorganizama

U cilju praćenja dinamike razvoja mikroflore i mikrobiološke sukcesije tokom zrenja eksperimentalnih proizvoda, izvršeno je ispitivanje broja BMK, *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp., bakterija iz familija *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonadaceae*, kao i prisustva patogena, *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, koje nije utvrđeno tokom ispitivanja industrijskog i tradicionalnog proizvoda.

Rezultati broja BMK tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 3. ISK je imao značajno veći broj BMK na početku zrenja od TSK ($P < 0,001$). Po uspostavljanju fermentacije, u prvih sedam dana zrenja broj BMK u ISK i TSK se udvostručio i nastavio da raste do 90. dana zrenja, a zatim je zabeleženo smanjenje broja ovih mikroorganizama. Na kraju zrenja ISK je imao značajno manji broj BMK od TSK ($P < 0,001$).

Tabela 3. Broj BMK tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	BMK ($\bar{X} \pm S.D.$ log cfu/g)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	3,90 \pm 0,12	3,16 \pm 0,02	<0,001	***
7.	7,09 \pm 0,11	6,96 \pm 0,15	0,113	N.Z.
14.	8,17 \pm 0,06	7,67 \pm 0,15	<0,001	***
21.	8,23 \pm 0,06	8,24 \pm 0,16	0,887	N.Z.
28.	8,45 \pm 0,04	8,46 \pm 0,08	0,828	N.Z.
60.	8,44 \pm 0,05	8,50 \pm 0,06	0,102	N.Z.
90.	8,57 \pm 0,11	8,68 \pm 0,12	0,155	N.Z.
120.	7,96 \pm 0,19	8,59 \pm 0,14	<0,001	***
150.	7,86 \pm 0,16	8,41 \pm 0,11	<0,001	***

N.Z.- nema značajnosti; *** $P < 0,001$.

Rezultati broja enterokoka tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 4. Na početku zrenja nije utvrđena statistički značajna razlika između industrijskog i tradicionalnog proizvoda u pogledu broja enterokoka ($P > 0,05$). ISK je imao značajno manji broj enterokoka od 7. do 28. dana zrenja od TSK ($P < 0,001$), ali ne i na kraju procesa proizvodnje ($P > 0,05$). Na kraju zrenja broj enterokoka u industrijskom proizvodu iznosio je 2,15 \pm 0,08 log cfu/g, a u proizvodu dobijenom u tradicionalnim uslovima 2,14 \pm 0,12 log cfu/g.

Tabela 4. Broj *Enterococcus* spp. tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	<i>Enterococcus</i> spp. ($\bar{X} \pm S.D.$ log cfu/g)		<i>p</i> vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	3,35±0,32	3,67±0,16	0,123	N.Z.
7.	2,54±0,09	3,13±0,11	<0,001	***
14.	2,13±0,14	3,05±0,12	<0,001	***
21.	2,01±0,12	2,50±0,16	<0,001	***
28.	1,89±0,11	2,55±0,14	<0,001	***
60.	1,83±0,28	2,08±0,24	0,119	N.Z.
90.	2,25±0,12	2,23±0,17	0,761	N.Z.
120.	2,14±0,10	2,11±0,05	0,587	N.Z.
150.	2,15±0,08	2,14±0,12	0,767	N.Z.

N.Z.- nema značajnosti; *** $P < 0,001$.

Rezultati broja mikrokoka tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 5. Na početku zrenja broj mikrokoka u industrijskom proizvodu iznosio je $3,81 \pm 0,02$ log cfu/g, dok je u tradicionalnom proizvodu utvrđen značajno veći broj mikrokoka od $4,06 \pm 0,03$ log cfu/g ($P < 0,001$). Broj mikrokoka se održao do kraja zrenja u slučaju oba proizvoda, pri čemu je u gotovom proizvodu industrijskog porekla bilo značajno manje ovih bakterija ($P < 0,05$).

Tabela 5. Broj *Micrococcus* spp. tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	<i>Micrococcus</i> spp. ($\bar{X} \pm S.D.$ log cfu/g)		<i>p</i> vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	3,81±0,02	4,06±0,03	<0,001	***
7.	3,94±0,18	4,17±0,07	0,012	*
14.	4,08±0,03	3,92±0,05	<0,001	***
21.	3,81±0,06	3,75±0,12	0,284	N.Z.
28.	3,34±0,03	3,71±0,09	<0,001	***
60.	3,15±0,04	3,67±0,08	<0,001	***
90.	4,14±0,06	4,15±0,07	0,934	N.Z.
120.	4,20±0,05	4,30±0,08	0,026	*
150.	3,97±0,10	4,14±0,12	0,029	*

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Rezultati broja bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 6. Na početku zrenja broj enterobakterija u industrijskom proizvodu iznosio je $3,54 \pm 0,27$ log cfu/g, dok je u tradicionalnom proizvodu utvrđen značajno veći broj enterobakterija od $4,07 \pm 0,12$ log cfu/g ($P < 0,05$). Broj enterobakterija se smanjivao tokom zrenja oba proizvoda, tako da njihovo prisustvo nije utvrđeno posle 90. dana zrenja.

Tabela 6. Broj bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	<i>Enterobacteriaceae</i> ($\bar{X} \pm S.D.$ log cfu/g)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	3,54±0,27	4,07±0,12	0,011	*
7.	3,92±0,05	4,10±0,16	0,026	*
14.	3,84±0,08	3,90±0,16	0,461	N.Z.
21.	3,58±0,11	3,90±0,12	0,001	**
28.	3,55±0,07	3,56±0,12	0,976	N.Z.
60.	2,58±0,06	2,70±0,12	0,055	N.Z.
90.	1,74±0,12	1,70±0,14	0,643	N.Z.
120.	< 1	< 1	-	-
150.	< 1	< 1	-	-

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Rezultati broja bakterija iz familije *Pseudomonadaceae* tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 7. Na početku zrenja nije utvrđena statistički značajna razlika između ISK i TSK u pogledu broja bakterija iz familije *Pseudomonadaceae* ($P > 0,05$). Nakon sedam dana zrenja broj bakterija iz familije *Pseudomonadaceae* se povećao kod oba proizvoda, a zatim je počeo da se smanjuje do 28. dana zrenja, od kada ovi mikroorganizmi više nisu detektovani.

Tabela 7. Broj bakterija iz familije *Pseudomonadaceae* tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	<i>Pseudomonadaceae</i> ($\bar{X} \pm S.D.$ log cfu/g)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	2,29±0,19	2,29±0,20	0,999	N.Z.
7.	2,77±0,07	2,67±0,06	0,026	*
14.	2,52±0,05	2,34±0,15	0,017	*
21.	1,98±0,31	1,61±0,22	0,036	*
28.	1,26±0,63	1,64±0,17	0,185	N.Z.
60.	< 1	< 1	-	-
90.	< 1	< 1	-	-
120.	< 1	< 1	-	-
150.	< 1	< 1	-	-

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$.

5.1.2. Uticaj fizičko-hemijskih parametara na razvoj mikroflore tokom zrenja

Rezultati korelacione analize između broja mikroorganizama i a_w vrednosti prikazani su u tabeli 8. Tokom zrenja TSK, utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između broja BMK i a_w vrednosti ($P < 0,05$), kao i statistički značajna pozitivna korelacija između broja enterokoka i a_w vrednosti ($P < 0,05$), što se ne može reći za ISK. Značajan uticaj a_w vrednosti na rast mikrokoka nije utvrđen tokom zrenja ispitanih proizvoda. Broj enterobakterija je bio u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa a_w vrednosti tokom zrenja oba proizvoda ($r_{ISK} = 0,720$, $P < 0,05$; $r_{TSK} = 0,966$, $P < 0,001$), kao i broj bakterija iz familije *Pseudomonadaceae* ($r_{ISK} = 0,892$, $P < 0,001$; $r_{TSK} = 0,939$, $P < 0,01$).

Tabela 8. Uticaj a_w vrednosti na razvoj mikroflore

Mikroorganizmi	ISK		TSK	
	r	Značajnost	r	Značajnost
BMK	-0,383	N.Z.	-0,812	*
<i>Enterococcus</i> spp.	0,283	N.Z.	0,804	*
<i>Micrococcus</i> spp.	-0,360	N.Z.	-0,192	N.Z.
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,720	*	0,966	***
<i>Pseudomonadaceae</i>	0,892	***	0,939	**
a_w vrednost				

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Rezultati korelacione analize između broja mikroorganizama i pH vrednosti prikazani su u tabeli 9. Tokom zrenja kod oba ispitana proizvoda utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između broja BMK i pH vrednosti ($P < 0,05$). Sa druge strane, broj enterokoka je bio u statistički značajnoj, ali pozitivnoj, korelaciji sa pH vrednosti ($P < 0,05$). Tokom zrenja ISK i TSK, statistički značajna korelacija između pH vrednosti i broja mikrokoka, enterobakterija i bakterija iz familije *Pseudomonadaceae* nije utvrđena.

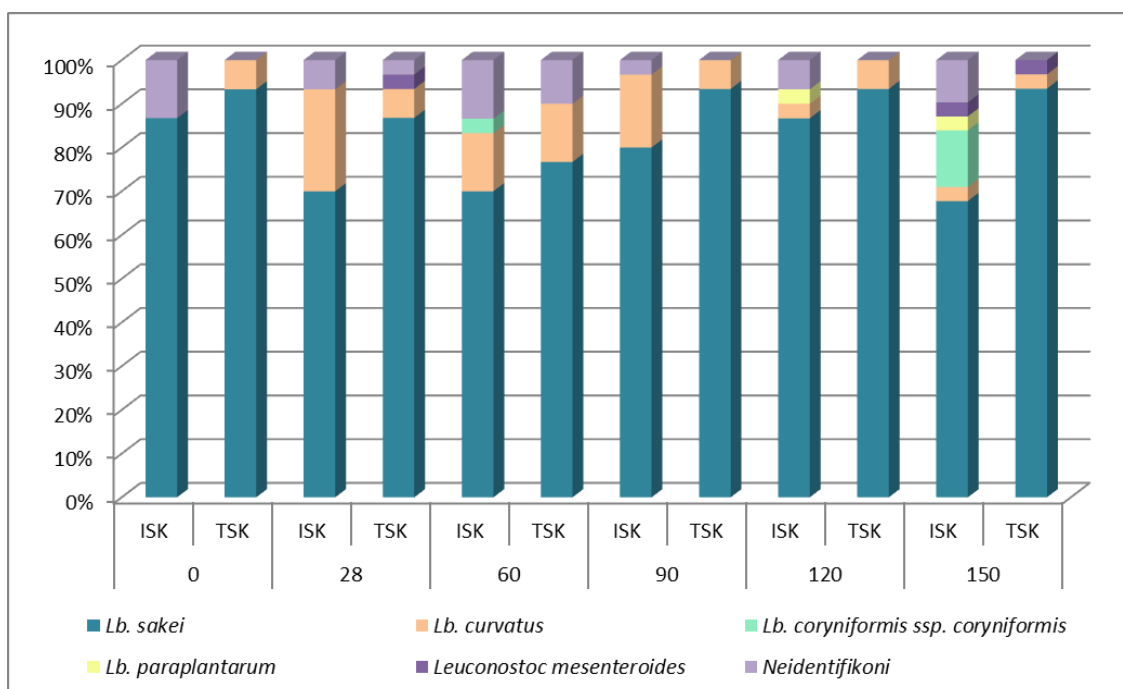
Tabela 9. Uticaj pH vrednosti na razvoj mikroflore

Mikroorganizmi	ISK		TSK	
	r	Značajnost	r	Značajnost
BMK	-0,776	*	-0,917	*
<i>Enterococcus</i> spp.	0,800	*	0,825	*
<i>Micrococcus</i> spp.	0,294	N.Z.	0,215	N.Z.
<i>Enterobacteriaceae</i>	-0,369	N.Z.	0,318	N.Z.
<i>Pseudomonadaceae</i>	0,416	N.Z.	0,715	N.Z.
pH vrednost				

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$.

5.1.3. Identifikacija BMK pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije

MALDI-TOF masena spektrometrija je savremena metoda koja se uspešno primenjuje u identifikaciji bakterija izolovanih kako iz kliničkog materijala, tako i iz hrane. U cilju ispitivanja diverziteta BMK, formirana je kolekcija od 360 izolata, tako što je po danu ispitivanja sačuvano 30 izolata BMK iz obe eksperimentalne grupe proizvoda, do kojih se došlo nasumičnim odabirom kolonija tokom određivanja broja BMK. Od ukupno 360 izolata BMK poreklom iz ISK i TSK, primenom MALDI-TOF masene spektrometrije, identifikovano je 340 izolata (95,55%), odnosno 164 izolata (91,11%) poreklom iz ISK i 176 izolata (97,78%) poreklom iz TSK. Od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz ISK, 137 izolata (76,11%) je identifikovano kao *Lactobacillus sakei*, 18 (10%) kao *Lactobacillus curvatus*, 5 (2,78%) kao *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, 2 (1,11%) kao *Lactobacillus paraplantarum* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, dok 16 izolata (8,89%) nije identifikovano. Sa druge strane, od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz TSK, 161 izolat (89,64%) je identifikovan kao *Lactobacillus sakei*, 13 (7,22%) kao *Lactobacillus curvatus* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, a 4 izolata (2,22%) nije identifikovano. Rezultati identifikacije izolata BMK primenom MALDI-TOF masene spektrometrije, prikazani su na slici 9.



Slika 9. Rezultati identifikacije izolata BMK primenom MALDI-TOF masene spektrometrije

Dakle, među identifikovanim izolatima BMK poreklom iz ISK i TSK, dominantna vrsta bio je *Lactobacillus sakei*. Zastupljenost ove vrste među izolatima poreklom iz industrijskog proizvoda po danu ispitivanja bila je od 66,67-86,7%, dok je u slučaju izolata poreklom iz proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima zastupljenost *Lactobacillus sakei* po danu ispitivanja iznosila 76,7-93,4%. Pored *Lactobacillus sakei*, u idustrijskom proizvodu identifikovan je i *Lactobacillus curvatus* čija je zastupljenost po danu ispitivannja iznosila od 0-23,3%. Sa druge strane *Lactobacillus curvatus* je identifikovan među izolatima poreklom iz tradicionalnog proizvoda tokom svakog dana ispitivanja, sa zastupljenošću od 3,3 do 13,3%. Među izolatima poreklom iz ISK, identifikovani su i *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, *Lactobacillus paraplantarum*, kao i *Leuconostoc mesenteroides*. Pored *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus*, identifikacijom izolata poreklom i iz TSK, utvrđen je i *Leuconostoc mesenteroides*.

5.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ISPITIVANJA

5.2.1. pH vrednost

Rezultati pH vrednosti tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 10. ISK je imao značajno veću pH vrednost na početku zrenja od TSK ($P < 0,001$). Tokom fermentacije, pH vrednost oba proizvoda je kontinuirano opadala, i to do 28. dana kod ISK, odnosno do 60. dana u slučaju TSK. Posle inicijalnog pada, pH vrednost oba proizvoda se povećavala u drugoj fazi zrenja, da bi na kraju zrenja za ISK iznosila $5,64 \pm 0,03$, dok je pH vrednost tradicionalnog proizvoda od $5,46 \pm 0,03$ bila značajno manja ($P < 0,001$).

Tabela 10. Promena pH vrednosti tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	pH vrednost		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	$5,84 \pm 0,01$	$5,67 \pm 0,01$	$< 0,001$	***
7.	$5,58 \pm 0,02$	$5,64 \pm 0,03$	0,011	**
14.	$5,34 \pm 0,03$	$5,63 \pm 0,01$	$< 0,001$	***
21.	$5,32 \pm 0,03$	$5,58 \pm 0,02$	$< 0,001$	***
28.	$5,33 \pm 0,03$	$5,38 \pm 0,03$	0,015	*
60.	$5,46 \pm 0,03$	$5,24 \pm 0,02$	$< 0,001$	***
90.	$5,53 \pm 0,04$	$5,31 \pm 0,02$	$< 0,001$	***
120.	$5,61 \pm 0,06$	$5,38 \pm 0,03$	$< 0,001$	***
150.	$5,64 \pm 0,03$	$5,46 \pm 0,03$	$< 0,001$	***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.2.2. Kalo sušenja

Rezultati ispitivanja kala sušenja tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 11. Iako je TSK imao izraženiji gubitak mase na početku zrenja, veći kalo sušenja na kraju proizvodnog ciklusa utvrđen je kod ISK. Na kraju zrenja kalo sušenja industrijskog proizvoda iznosio je 54,71%, a proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima 53,14.

Tabela 11. Kalo sušenja tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Kalo sušenja (%)							
	7.	14.	21.	28.	60.	90.	120.	150.
ISK	8,33	15,42	20,83	25,42	40,83	48,95	53,42	54,71
TSK	13,39	18,81	19,51	22,66	35,70	44,36	48,80	53,14

5.2.3. a_w vrednost

Rezultati ispitivanja a_w vrednosti tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 12. Na početku zrenja nije utvrđena statistički značajna razlika između ISK i TSK u pogledu a_w vrednosti ($P > 0,05$). Tokom zrenja a_w vrednost oba proizvoda se kontinuirano smanjivala, pri čemu je najintenzivniji pad zabeležen u drugoj fazi zrenja. Industrijski proizvod je do kraja zrenja imao značajno manju a_w vrednost od proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima, na nivou statističke značajnosti od 5% ili 1%. Na kraju zrenja a_w vrednost ISK i TSK iznosila je $0,800 \pm 0,01$ i $0,815 \pm 0,00$. Niske a_w vrednosti utvrđene u gotovim proizvodima ukazivale su na mikrobiološku stabilnost istih.

Tabela 12. Promena a_w vrednosti tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	a_w vrednost		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	$0,955 \pm 0,01$	$0,960 \pm 0,00$	0,182	N.Z.
7.	$0,948 \pm 0,01$	$0,948 \pm 0,01$	0,999	N.Z.
14.	$0,943 \pm 0,01$	$0,943 \pm 0,01$	0,999	N.Z.
21.	$0,938 \pm 0,00$	$0,943 \pm 0,01$	0,273	N.Z.
28.	$0,920 \pm 0,01$	$0,937 \pm 0,01$	0,006	**
60.	$0,863 \pm 0,00$	$0,898 \pm 0,00$	0,002	**
90.	$0,822 \pm 0,01$	$0,840 \pm 0,01$	0,020	*
120.	$0,808 \pm 0,01$	$0,823 \pm 0,01$	0,028	*
150.	$0,800 \pm 0,01$	$0,815 \pm 0,00$	0,022	*

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

5.3. HEMIJSKIH ISPITIVANJA

5.3.1. Hemijski sastav

Rezultati hemijskog sastava ISK i TSK ispitanog na početku (hemijski sastav nadeva) i na kraju zrenja proizvoda prikazani su u tabeli 13. Sadržaj vlage u nadevu ispitanih proizvoda bio je približno isti i iznosio je $65,20 \pm 0,76\%$ za ISK, odnosno $65,81 \pm 0,35\%$ za TSK. ISK je imao značajno veći sadržaj masti u nadevu od TSK ($P < 0,001$). Sadržaj proteina mesa u nadevu proizvoda industrijskog porekla iznosio je $18,22 \pm 0,96\%$, dok je nadev tradicionalnog proizvoda imao $19,95 \pm 0,41\%$ proteina mesa, što je značajno više ($P < 0,05$). Sa druge strane, ISK je imao značajno veći relativni sadržaj kolagena u nadevu od TSK ($P < 0,001$). Sadržaj pepela i kuhinjske soli u nadevu ispitivanih proizvoda bio je približno isti ($P > 0,05$). Sadržaj kuhinjske soli u nadevu industrijskog proizvoda iznosio je $2,18 \pm 0,08\%$, a u nadevu tradicionalnog proizvoda $2,05 \pm 0,14\%$. U nadevu ISK utvrđen je sadržaj nitrata od $38,03 \pm 2,08$ mg/kg, dok je u nadevu TSK bio značajno manji i iznosio je $29,54 \pm 5,39$ mg/kg ($P < 0,01$). Sadržaj nitrita u nadevu industrijskog proizvoda iznosio je $0,10 \pm 0,03$ mg/kg, dok isti nisu utvrđeni tokom ispitivanja nadeva tradicionalnog proizvoda.

Na kraju zrenja proizvoda, sadržaj vlage bio je značajno manji i iznosio je $27,70 \pm 1,05\%$ za ISK, odnosno $30,26 \pm 4,60\%$ za TSK. U gotovom proizvodu industrijskog porekla utvrđen je sadržaj masti od $29,00 \pm 0,72\%$, dok je u tradicionalnom proizvodu bio manji i iznosio je $26,21 \pm 4,37\%$ ($P > 0,05$). Sadržaj proteina mesa u ispitanim proizvodima bio je približno isti i iznosio je $36,10 \pm 1,21\%$ za ISK, odnosno $36,46 \pm 1,21\%$ za TSK. Sa druge strane, ISK je imao značajno veći relativni sadržaj kolagena od TSK ($P < 0,05$). Relativni sadržaj kolagena u industrijskom proizvodu iznosio je $6,18 \pm 0,41\%$, a u proizvodu tradicionalnog porekla $5,27 \pm 0,71\%$. Statistički značajna razlika u pogledu sadržaja pepela i kuhinjske soli između ISK i TSK nije utvrđena na kraju zrenja ($P > 0,05$). Sadržaj kuhinjske soli u industrijskom proizvodu iznosio je $4,99 \pm 0,32\%$, a u proizvodu tradicionalnog porekla $4,95 \pm 0,12\%$. Tokom zrenja ISK i TSK, sadržaj nitrata se smanjio, dok se sadržaj nitrita povećao. Statistički značajna razlika u pogledu sadržaja nitrata između ispitanih proizvoda nije utvrđena na kraju zrenja ($P > 0,05$). Međutim, industrijski proizvod je imao značajno veći sadržaj nitrita ($4,61 \pm 0,50$ mg/kg) od proizvoda tradicionalnog porekla ($1,09 \pm 0,27$ mg/kg) ($P < 0,001$).

Tabela 13. Hemijski sastav ISK i TSK na početku i na kraju zrenja

	Sadržaj vlage (%)	Sadržaj masti (%)	Sadržaj proteina (%)	Relativni sadržaj kolagena (%)	Sadržaj pepela (%)	Sadržaj NaCl (%)	Sadržaj nitrata (mg/kg)	Sadržaj nitrita (mg/kg)
NADEV								
TSK	65,81±0,35	10,58±0,64	19,95±0,41	4,53±0,20	3,31±0,34	2,05±0,14	29,54±5,39	0,00±0,00
ISK	65,20±0,76	13,52±0,82	18,22±0,96	6,84±0,24	3,03±0,08	2,18±0,08	38,03±2,08	0,10±0,03
p vrednost	0,101	<0,001	0,023	<0,001	0,812	0,063	0,005	<0,001
Značajnost	N.Z.	***	*	***	N.Z.	N.Z.	**	**
KRAJ ZRENJA								
TSK	30,26±4,60	26,21±4,37	36,46±1,21	5,27±0,71	6,88±0,92	4,95±0,12	20,00±7,15	1,09±0,27
ISK	27,70±1,05	29,00±0,72	36,10±1,21	6,18±0,41	6,75±1,08	4,99±0,32	21,48±7,37	4,61±0,50
p vrednost	0,212	0,153	0,618	0,022	0,827	0,788	0,760	<0,001
Značajnost	N.Z.	N.Z.	N.Z.	*	N.Z.	N.Z.	N.Z.	***

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.3.2. Hidrolitičke i oksidativne promene lipida tokom zrenja

U cilju ispitivanja hidrolitičkih i oksidativnih promena masti tokom zrenja ISK i TSK utvrđeni su kiselinski i peroksidni broj, kao i TBARS-vrednost. Rezultati kiselinskog broja tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 14. Na početku zrenja kiselinski broj za ISK iznosio je $0,45 \pm 0,05$ mg KOH/g, a za TSK $0,42 \pm 0,03$ mg KOH/g, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). Tokom zrenja kiselinski broj se povećavao u slučaju oba proizvoda. Na kraju zrenja kiselinski broj proizvoda industrijskog porekla bio je $3,45 \pm 0,58$ mg KOH/g i značajno veći od kiselinskog broja tradicionalnog proizvoda, koji je iznosio $2,39 \pm 0,20$ mg KOH/g ($P < 0,01$).

Tabela 14. Kiselinski broj tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Kiselinski broj (mg KOH/g masti)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	$0,45 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,03$	0,228	N.Z.
28.	$1,05 \pm 0,13$	$0,47 \pm 0,06$	$< 0,001$	***
60.	$1,10 \pm 0,16$	$0,80 \pm 0,03$	0,002	**
90.	$1,32 \pm 0,09$	$1,20 \pm 0,09$	0,044	*
120.	$1,50 \pm 0,03$	$1,63 \pm 0,07$	0,003	**
150.	$3,45 \pm 0,58$	$2,39 \pm 0,20$	0,002	**

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Rezultati peroksidnog broja tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 15. Porast peroksidnog broja utvrđen je 90. dana zrenja kod industrijskog proizvoda, odnosno 150. dana kod tradicionalnog proizvoda. ISK je imao značajno veći peroksidni broj 90. i 120. dana zrenja od TSK. Na kraju zrenja peroksidni broj proizvoda industrijskog porekla iznosio je $0,30 \pm 0,06$ mmol/kg, a tradicionalnog proizvoda $0,46 \pm 0,13$ mmol/kg, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika na nivou od 95% ($P < 0,05$).

Tabela 15. Peroksidni broj tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Peroksidni broj (mmol/kg)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	-	N.Z.
28.	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	-	N.Z.
60.	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	-	N.Z.
90.	$0,19 \pm 0,04$	$0,00 \pm 0,00$	0,002	**
120.	$0,17 \pm 0,04$	$0,00 \pm 0,00$	0,002	**
150.	$0,30 \pm 0,06$	$0,46 \pm 0,13$	0,021	*

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Rezultati TBARS vrednosti tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 16. Na početku zrenja ispitani proizvodi su imali približno iste TBARS vrednosti, tako da statistički značajna razlika nije utvrđena ($P>0,05$). ISK je imao značajno veću TBARS vrednost od TSK u periodu od 60. do 120. dana zrenja ($P<0,01$ i $P<0,001$). Na kraju zrenja TBARS vrednost industrijskog proizvoda iznosila je $0,11\pm 0,02$ mg MDA/kg, a tradicionalnog $0,11\pm 0,04$ mg MDA/kg, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između istih ($P>0,05$).

Tabela 16. TBARS vrednost tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	TBARS vrednost (mg MDA/kg)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	$0,11\pm 0,02$	$0,11\pm 0,01$	0,858	N.Z.
28.	$0,17\pm 0,02$	$0,15\pm 0,01$	0,092	N.Z.
60.	$0,27\pm 0,03$	$0,08\pm 0,03$	0,002	**
90.	$0,28\pm 0,06$	$0,08\pm 0,02$	$<0,001$	***
120.	$0,23\pm 0,06$	$0,13\pm 0,04$	0,006	**
150.	$0,11\pm 0,02$	$0,11\pm 0,04$	0,783	N.Z.

N.Z.- nema značajnosti; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

5.3.3. Proteolitičke promene tokom zrenja - indeks proteolize

Rezultati indeksa proteolize tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 17. Na početku zrenja indeks proteolize za ISK iznosio je $10,03\pm 0,30\%$, a za TSK $10,15\pm 0,84\%$, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P>0,05$). Tokom zrenja proizvoda indeks proteolize se povećao u oba slučaja. Statistički značajna razlika između ISK i TSK u pogledu indeksa proteolize utvrđena je samo 60. ($P<0,001$) i 90. dana zrenja ($P<0,05$). Na kraju zrenja indeks proteolize proizvoda industrijskog porekla iznosio je $16,41\pm 0,63\%$, a tradicionalnog proizvoda $15,66\pm 0,62\%$.

Tabela 17. Indeks proteolize tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Indeks proteolize (%)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	$10,03\pm 0,30$	$10,15\pm 0,84$	0,724	N.Z.
28.	$18,06\pm 1,74$	$16,57\pm 1,23$	0,119	N.Z.
60.	$17,82\pm 0,50$	$15,75\pm 0,16$	$<0,001$	***
90.	$17,02\pm 1,11$	$15,85\pm 0,56$	0,042	*
120.	$18,36\pm 0,86$	$17,97\pm 0,37$	0,461	N.Z.
150.	$16,41\pm 0,63$	$15,66\pm 0,62$	0,062	N.Z.

N.Z.- nema značajnosti; * $P<0,05$; *** $P<0,001$.

5.3.4. Biogeni amini

Rezultati ispitivanja sadržaja biogenih amina izraženi su u mg/kg svežeg uzorka. Sadržaj histamina tokom zrenja ISK i TSK prikazan je u tabeli 18. Histamin nije detektovan na početku zrenja, odnosno u nadevu ispitanih proizvoda. Sadržaj histamina u industrijskom proizvodu utvrđen je 28. dana zrenja, a u tradicionalnom proizvodu tek na kraju zrenja. Najviši nivo histamina od $76,30 \pm 3,22$ mg/kg utvrđen je 60. dana zrenja u proizvodu industrijskog porekla, a nakon toga usledio je pad koncentracije ovog biogenog amina. Na kraju zrenja sadržaj histamina u ISK iznosio je $12,36 \pm 1,72$ mg/kg, a u TSK $16,55 \pm 5,22$ mg/kg, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$).

Tabela 18. Sadržaj histamina tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Histamin (mg/kg)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	N.D.	N.D.	-	-
28.	$43,68 \pm 4,43$	N.D.	<0,001	***
60.	$76,30 \pm 3,22$	N.D.	<0,001	***
90.	$7,99 \pm 0,53$	N.D.	<0,001	***
120.	$9,32 \pm 0,61$	N.D.	<0,001	***
150.	$12,36 \pm 1,72$	$16,55 \pm 5,22$	0,127	N.Z.

N.D. – nije detektovan; N.Z.- nema značajnosti; *** $P < 0,001$.

Sadržaj tiramina tokom zrenja ISK i TSK prikazan je u tabeli 19. Tiramin nije detektovan na početku zrenja, odnosno u nadevu ispitanih proizvoda. Sadržaj tiramina utvrđen je nakon 28 dana zrenja, kako u industrijskom proizvodu, tako i u tradicionalnom proizvodu. ISK je od 28. dana do kraja zrenja imao značajno veći sadržaj tiramina od TSK i to na nivou statističke značajnosti od 0,1% ($P < 0,001$). Na kraju zrenja sadržaj tiramina u ISK iznosio je $241,10 \pm 21,01$ mg/kg, a u TSK $115,80 \pm 34,58$ mg/kg.

Tabela 19. Sadržaj tiramina tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Tiramin (mg/kg)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	N.D.	N.D.	-	-
28.	$150,30 \pm 5,10$	$41,48 \pm 8,21$	<0,001	***
60.	$270,00 \pm 17,15$	$97,11 \pm 15,88$	<0,001	***
90.	$268,30 \pm 11,56$	$117,60 \pm 12,16$	<0,001	***
120.	$288,00 \pm 7,42$	$160,70 \pm 22,38$	<0,001	***
150.	$241,10 \pm 21,01$	$115,80 \pm 34,58$	<0,001	***

N.D. – nije detektovan; *** $P < 0,001$.

Rezultati ispitivanja sadržaja triptamina tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 20. Na početku zrenja TSK je imao značajno veći sadržaj triptamina od ISK, kao i 28. dana ispitivanja ($P < 0,001$). Tokom zrenja sadržaj triptamina se smanjio, kako u industrijskom proizvodu, tako i u tradicionalnom proizvodu. Statistički značajna razlika u pogledu sadržaja triptamina između ISK i TSK nije utvrđena od 60. do 120. dana zrenja ($P > 0,05$). Na kraju zrenja, industrijski proizvod je imao značajno veći sadržaj triptamina ($64,47 \pm 7,53$ mg/kg) od proizvoda tradicionalnog porekla ($53,79 \pm 3,93$ mg/kg) ($P < 0,05$).

Tabela 20. Sadržaj triptamina tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Triptamin (mg/kg)		<i>p</i> vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	150,70±11,21	225,40±19,72	<0,001	***
28.	43,17±4,47	119,50±15,64	<0,001	***
60.	63,43±5,40	60,84±12,68	0,655	N.Z.
90.	61,21±9,50	61,63±7,18	0,933	N.Z.
120.	58,50±2,28	60,51±2,65	0,189	N.Z.
150.	64,47±7,53	53,79±3,93	0,010	*

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Sadržaj feniletilamina tokom zrenja ISK i TSK prikazan je u tabeli 21. Na početku zrenja, utvrđen je sličan sadržaj feniletilamina u ispitanim proizvodima ($P > 0,05$). Sadržaj feniletilamina je rastao do 60. dana zrenja u slučaju oba proizvoda, a zatim se kod ISK održao na približno istom nivou do kraja zrenja, dok se u slučaju TSK smanjio. ISK je imao značajno manji sadržaj feniletilamina od TSK nakon 60 dana zrenja ($P < 0,01$). Na kraju zrenja, sadržaj feniletilamina u proizvodu industrijskog porekla iznosio je $43,43 \pm 4,28$ mg/kg, a u tradicionalnom proizvodu $33,57 \pm 3,85$ mg/kg, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika na nivou od 1% ($P < 0,01$).

Tabela 21. Sadržaj feniletilamina tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Feniletilamin (mg/kg)		<i>p</i> vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	25,37±2,99	25,05±3,04	0,856	N.Z.
28.	38,55±2,99	43,12±4,21	0,071	N.Z.
60.	41,65±3,61	60,17±11,88	0,004	**
90.	40,22±7,79	38,77±7,78	0,753	N.Z.
120.	46,13±1,12	41,18±6,25	0,086	N.Z.
150.	43,43±4,28	33,57±3,85	0,002	**

N.Z.- nema značajnosti; ** $P < 0,01$.

Rezultati ispitivanja sadržaja putrescina tokom zrenja ISK i TSK prikazani su u tabeli 22. Putrescin nije detektovan na početku zrenja, odnosno u nadevu ispitanih proizvoda. Sadržaj putrescina u industrijskom proizvodu utvrđen je nakon 28 dana zrenja, a u tradicionalnom proizvodu tek 60. dana zrenja. Tokom zrenja, sadržaj putrescina se povećao u slučaju oba proizvoda, pri čemu je značajno veća akumulacija ovog biogenog amina utvrđena kod ISK ($P < 0,001$). Na kraju zrenja sadržaj putrescina u industrijskom proizvodu iznosio je $457,40 \pm 4,62$ mg/kg, a u tradicionalnom $68,55 \pm 5,85$ mg/kg.

Tabela 22. Sadržaj putrescina tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Putrescin ($\bar{X} \pm S.D.$ mg/kg)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	N.D.	N.D.	-	-
28.	$161,60 \pm 4,49$	N.D.	$< 0,001$	***
60.	$393,30 \pm 9,12$	$17,39 \pm 1,55$	$< 0,001$	***
90.	$417,80 \pm 16,13$	$24,25 \pm 3,18$	$< 0,001$	***
120.	$440,80 \pm 9,21$	$68,77 \pm 10,54$	$< 0,001$	***
150.	$457,40 \pm 4,62$	$68,55 \pm 5,85$	$< 0,001$	***

N.D. – nije detektovan; *** $P < 0,001$.

Sadržaj kadaverina tokom zrenja ISK i TSK prikazan je u tabeli 23. Sadržaj kadaverina nije utvrđen u nadevu ispitanih proizvoda, već nakon 28 dana zrenja. Tokom zrenja, sadržaj kadaverina se povećao u slučaju oba proizvoda, pri čemu je ISK konstanto imao značajno veći sadržaj ovog biogenog amina od TSK, i to na nivou statističke značajnosti od 0,1% ($P < 0,001$). Na kraju zrenja sadržaj kadaverina u proizvodu industrijskog porekla iznosio je $444,40 \pm 23,89$ mg/kg, a u tradicionalnom proizvodu $132,40 \pm 10,10$ mg/kg.

Tabela 23. Sadržaj kadaverina tokom zrenja ISK i TSK

Dan zrenja	Kadaverin ($\bar{X} \pm S.D.$ mg/kg)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
0.	N.D.	N.D.	-	-
28.	$212,20 \pm 21,09$	$44,90 \pm 13,31$	$< 0,001$	***
60.	$433,60 \pm 15,10$	$66,65 \pm 6,96$	$< 0,001$	***
90.	$436,20 \pm 27,32$	$60,19 \pm 8,02$	$< 0,001$	***
120.	$447,4 \pm 13,01$	$85,77 \pm 13,37$	$< 0,001$	***
150.	$444,40 \pm 23,89$	$132,40 \pm 10,10$	$< 0,001$	***

N.D. – nije detektovan; *** $P < 0,001$.

5.4. ISPITIVANJE SENZORSKIH SVOJSTAVA

5.4.1. Kvantitativna deskriptivna analiza

Rezultati senzorskog ispitivanja ISK i TSK dobijeni primenom kvantitativne deskriptivne analize prikazani su u tabeli 24 i 25. Prosečna senzorska ocena za spoljašnji izgled iznosila je $5,00 \pm 0,00$ za ISK, odnosno $4,93 \pm 0,19$ za TSK. Na površini ispitanih proizvoda nisu primećena oštećenja, mrlje i diskoloracije. Međutim, ISK je imao intenzivniju i prihvatljiviju boju omotača od TSK. Prosečna senzorska ocena za izgled i sastav preseka industrijskog proizvoda iznosila je $4,64 \pm 0,38$, a proizvoda tradicionalnog porekla $4,93 \pm 0,19$, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). Presek oba proizvoda sastojao se od grubo usitnjenog mišićnog i u manjem obimu čvrstog masnog tkiva koji su bili dobro povezani i ravnomerno raspoređeni u obliku mozaika. Veća zastupljenost masnog tkiva uočena je na preseku industrijskog proizvoda, kao i manje stabilna boja. Zbog toga je ISK imao manju prosečnu senzorsku ocenu za boju i održivost boje ($4,77 \pm 0,39$) od TSK ($4,86 \pm 0,24$). Statistički značajna razlika između industrijskog i tradicionalnog proizvoda utvrđena je samo u pogledu mirisa i ukusa, s obzirom da je industrijski proizvod imao intenzivniju aromu ($P < 0,001$). Prosečna senzorska ocena za teksturu iznosila je $4,78 \pm 0,27$ za ISK, odnosno $4,93 \pm 0,19$ za TSK. Oba proizvoda su imala čvrstu konzistenciju, ali je TSK bio sočniji tokom žvakanja.

Tabela 24. Ocene senzorskih parametara kvaliteta za ISK i TSK

Parametri senzorskog kvaliteta	Senzorske ocene ($\bar{x} \pm S.D.$)		p vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
Spoljašnji izgled	$5,00 \pm 0,00$	$4,93 \pm 0,19$	0,337	N.Z.
Izgled i sastav preseka	$4,64 \pm 0,38$	$4,93 \pm 0,19$	0,099	N.Z.
Boja i održivost boje	$4,77 \pm 0,39$	$4,86 \pm 0,24$	0,690	N.Z.
Miris i ukus	$4,93 \pm 0,19$	$4,50 \pm 0,00$	<0,001	***
Tekstura i sočnost	$4,78 \pm 0,27$	$4,93 \pm 0,19$	0,270	N.Z.

N.Z.- nema značajnosti; *** $p < 0,001$.

Kako bi se dobila ocena ukupnog senzorskog kvaliteta, dodeljene ocene za parametre senzorskog kvaliteta industrijskog i tradicionalnog proizvoda su korigovane, tako što su pomnožene sa koeficijentima značajnosti koji su navedeni u poglavlju 4. Ponderisane ocene parametara senzorskog kvaliteta, kao i ocena ukupnog senzorskog kvaliteta za ISK i TSK, prikazane su u tabeli 25.

Tabela 25. Ponderisane ocene senzorskih parametara kvaliteta za ISK i TSK

Parametri senzorskog kvaliteta	Ponderisane senzorske ocene ($\bar{x} \pm S.D.$)		<i>p</i> vrednost	Značajnost
	ISK	TSK		
Spoljašnji izgled	10,00±0,00	9,83±0,41	0,341	N.Z.
Izgled i sastav preseka	23,21±1,89	24,64±0,94	0,098	N.Z.
Boja i održivost boje	14,36±1,18	14,57±0,73	0,690	N.Z.
Miris i ukus	34,50±1,32	31,50±0,00	<0,001	***
Tekstura i sočnost	14,36±0,80	14,79±0,57	0,270	N.Z.
Ukupna ocena	96,43±2,88	95,36±1,14	0,378	N.Z.

N.Z.- nema značajnosti; *** $p < 0,001$.

Prosečna ocena ukupnog senzorskog kvaliteta za ISK iznosila je $96,43 \pm 2,88$, a za TSK $95,36 \pm 1,14$, pa statistički značajna razlika između ispitanih proizvoda nije utvrđena ($P > 0,05$). Na slici 10 prikazani su proizvodi koji su bili predmet ocenjivanja.



Slika 10. Tradicionalni i industrijski sremski kuleni

5.4.2. Instrumentalni parametri boje

Tokom instrumentalnog ispitivanja boje ISK i TSK praćeni su parametri boje na površini proizvoda, kao i na poprečnim presecima istih. Utvrđeni parametri boje na površini ISK i TSK prikazani su u tabeli 26. Svetloća boje, odnosno L^* vrednost površine industrijskog proizvoda od $30,13 \pm 0,29$ bila je značajno veća od L^* vrednosti tradicionalnog proizvoda koja je iznosila $27,25 \pm 0,43$ ($P < 0,001$). ISK je imao značajno veći udeo crvene boje (a^*) na površini omotača od TSK ($P < 0,05$), kao i udeo žute boje (b^*) ($P < 0,01$). Međutim, statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu nijanse boje (b) i relativnog odnosa crvene i žute boje (R) na površini ispitanih proizvoda ($P > 0,05$). Zasićenost boje (C^*) bila je značajno veća na površini industrijskog proizvoda, dok se indeks braon boje (BI) među proizvodima nije razlikovao ($P > 0,05$).

Tabela 26. Parametri boje površine ISK i TSK

Parametri boje	ISK	TSK	p vrednost	Značajnost
	$(\bar{x} \pm S.D.)$			
L^*	$30,13 \pm 0,29$	$27,25 \pm 0,43$	$< 0,001$	***
a^*	$7,05 \pm 0,32$	$6,07 \pm 0,97$	0,027	*
b^*	$9,17 \pm 0,36$	$8,13 \pm 0,71$	0,006	**
h	$52,46 \pm 2,39$	$53,20 \pm 5,16$	0,729	N.Z.
R	$0,77 \pm 0,06$	$0,75 \pm 0,14$	0,736	N.Z.
C^*	$11,58 \pm 0,09$	$10,17 \pm 0,78$	$< 0,001$	***
BI	$52,74 \pm 0,60$	$51,17 \pm 3,38$	0,227	N.Z.

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Utvrđeni parametri boje na poprečnom preseku ISK i TSK prikazani su u tabeli 27. L^* vrednost poprečnog preseka industrijskog proizvoda od $35,71 \pm 0,91$ bila je značajno veća od L^* vrednosti tradicionalnog proizvoda, koja je iznosila $32,65 \pm 0,44$ ($P < 0,001$). ISK je imao značajno veće a^* ($23,99 \pm 0,60$) i b^* ($18,08 \pm 0,99$) vrednosti poprečnog preseka od TSK kod koga je utvrđena a^* vrednost iznosila $18,26 \pm 1,36$, a b^* vrednost $13,04 \pm 0,72$ ($P < 0,001$). Međutim, statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu nijanse boje i relativnog odnosa crvene i žute boje na poprečnom preseku ispitanih proizvoda ($P > 0,05$). Utvrđene vrednosti za nijansu boje na preseku ispitanih proizvoda ukazuju na zastupljenost crvenih nijansi boje. Na poprečnom preseku industrijskog proizvoda utvrđene su značajno veće vrednosti za zasićenost boje i indeks braon boje nego na poprečnom preseku tradicionalnog proizvoda ($P < 0,001$).

Tabela 27. Parametri boje poprečnog preseka ISK i TSK

Parametri boje	ISK	TSK	<i>p</i> vrednost	Značajnost
	(X±S.D.)			
L*	35,71±0,91	32,65±0,44	<0,001	***
a*	23,99±0,60	18,26±1,36	<0,001	***
b*	18,08±0,99	13,04±0,72	<0,001	***
h	36,96±1,18	35,46±1,93	0,134	N.Z.
R	1,33±0,05	1,40±0,09	0,128	N.Z.
C*	30,05±0,99	22,33±1,53	<0,001	***
BI	115,10±6,37	88,94±4,79	<0,001	***

N.Z.- nema značajnosti; *** $P < 0,001$.

5.4.3. Instrumentalni parametri teksture

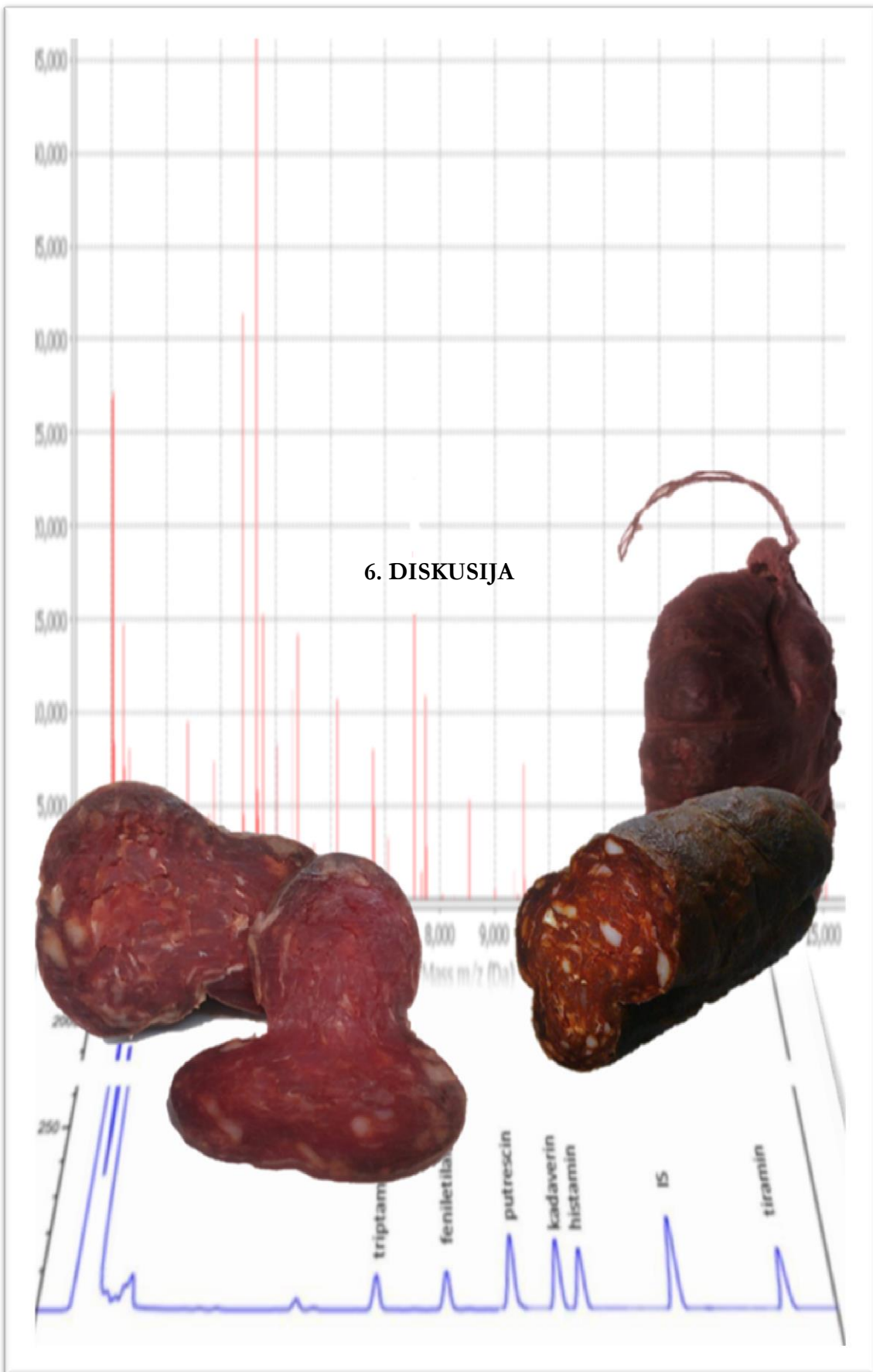
Rezultati instrumentalnog ispitivanja teksture ISK i TSK prikazani su u tabeli 28. Od parametara teksture, određeni su: čvrstoća, elastičnost, kohezivnost i žvakljivost. Čvrstoća, odnosno maksimalna sila potrebna za kompresiju uzorka, bila je značajno veća kod industrijskog proizvoda nego kod proizvoda tradicionalnog porekla ($P < 0,01$). Utvrđena prosečna vrednost za čvrstoću ISK iznosila je 12796 ± 1475 g, a za TSK 10048 ± 1197 g. Sa druge strane, statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu elastičnosti i kohezivnosti ($P > 0,05$). Rezultati ove studije pokazuju da je žvakljivost, odnosno rad potreban da se uzorak pripremi za gutanje, bila značajno veća kod industrijskog proizvoda nego kod proizvoda tradicionalnog porekla ($P < 0,05$). Utvrđena prosečna vrednost za žvakljivost ISK iznosila je $3178 \pm 321,7$ g, a za TSK $2675 \pm 395,7$ g.

Tabela 28. ISK i TSK

Parametri teksture	ISK	TSK	<i>p</i> vrednost	Značajnost
	(X±S.D.)			
Čvrstoća (g)	12796±1475	10048±1197	0,005	**
Elastičnost	0,520±0,04	0,539±0,04	0,396	N.Z.
Koheivnost	0,479±0,03	0,495±0,04	0,466	N.Z.
Žvakljivost (g)	3178±321,7	2675±395,7	0,036	*

N.Z.- nema značajnosti; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

6. DISKUSIJA



6.1. MIKROBIOLOŠKA ISPITIVANJA

6.1.1. Ispitivanje broja mikroorganizama

Mikrobiološka sukcesija tokom zrenja tradicionalnih fermentisanih kobasica je konstantan i veoma složen proces uslovljen kompleksnim interakcijama između biotičkih i abiotičkih faktora koji značajno utiču na dinamičke promene koje se dešavaju tokom procesa zrenja proizvoda (Zdolec i sar., 2013). Rezultati mikrobiološkog ispitivanja ove studije pokazuju da su najbrojniji mikroorganizmi tokom zrenja ISK i TSK bile BMK praćene mikrokokama i enterokokama. Nalazi drugih autora takođe ukazuju na dominantnost BMK u fermentisanim kobasicama koje su pravljene bez upotrebe starter kultura (Elias i Carrascosa, 2010; Ferreira i sar., 2007). Bakterije iz familija *Pseudomonadaceae* i *Enterobacteriaceae* su izumrle do kraja zrenja, dok patogeni mikroorganizmi, kao što su *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, nisu otkriveni ni u jednoj fazi mikrobiološkog ispitivanja industrijskog i tradicionalnog proizvoda iz ove studije.

BMK igraju glavnu ulogu u procesu fermentacije i konzervisanja mesa, smanjujući pH vrednost, stvarajući bakteriocine, poboljšavajući senzorske karakteristike i održivost fermentisanih kobasica (Fontana i sar., 2016). Statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između ISK i TSK utvrđena je u inicijalnom broju BMK, s obzirom da je ISK imao $3,90 \pm 0,12$ log CFU/g, a TSK $3,16 \pm 0,02$ log CFU/g BMK. Rezultati ove studije su uporedivi sa nalazima Talon i Leroy (2011) koji navode da se broj BMK u svežem mesu kreće se od 3 do 5 log cfu/g, a ubrzo po uspostavljanju fermentacije dostiže vrednost od 8 do 9 log cfu/g sadržaja nadeva. Usled povoljnih klimatskih uslova tokom prve sedmice zrenja ISK i TSK (slika 3), broj BMK se povećao za 3-4 logaritamske jedinice. Slični rezultati dobijeni su za petrovsku klobasu (Danilović i sar., 2011), kao i za tradicionalne fermentisane kobasice proizvedene u Italiji, Mađarskoj i Argentini (Casaburi i sar., 2008; Rantsiou i sar., 2005, Fontana i sar., 2005). Nakon toga, broj BMK se postepeno povećavao do 90. dana zrenja oba proizvoda, a zatim je usledila redukcija populacije ovih mikroorganizama. Tokom zrenja tradicionalnog proizvoda broj BMK je bio u značajnoj negativnoj korelaciji sa pH ($r = -0,917$, $P < 0,05$) i a_w vrednosti ($r = -0,812$, $P < 0,05$). U slučaju proizvoda industrijskog porekla, korelacija između broja BMK i pH vrednosti je bila nešto slabija, ali takođe značajna ($r = -0,776$, $P < 0,05$), dok između BMK i a_w vrednosti značajna korelacija nije utvrđena ($r = -0,383$, $P > 0,05$). Utvrđena negativna korelacija između broja BMK i fizičko-hemijskih parametara zrenja (pH i a_w vrednosti) bila je očekivana, jer se sa povećanjem broja BMK intenzivira proces

fermentacije što dovodi do pada pH vrednosti, a sa druge strane poznato je da su BMK prilično otporne na smanjenje a_w vrednosti. Smanjenjem pH vrednosti, BMK doprinose smanjenju a_w vrednosti, s obzirom da se pH i sposobnost vezivanja vode mesa nalaze u pozitivnoj korelaciji (*Honikel i Hamm, 1994*). Na kraju zrenja, ISK je imao $7,86 \pm 0,16$ log CFU/g BMK, dok je u TSK utvrđen značajno veći broj ovih mikroorganizama, koji je iznosio $8,41 \pm 0,11$ log CFU/g ($P < 0,001$). U poređenju sa lemeškim kulenom (*Vuković i sar., 2012*), oba proizvoda iz ove studije imali su veći broj BMK na kraju zrenja.

Na početku zrenja broj enterokoka u industrijskom i tradicionalnom proizvodu iznosio je $3,35 \pm 0,32$ i $3,67 \pm 0,16$ log CFU/g, a zatim je usledila redukcija populacije ovih mikroorganizama do vrednosti od 2 log CFU/g. ISK je imao značajno manji broj enterokoka od 7. do 28. dana zrenja od TSK ($P < 0,001$), ali ne i na kraju procesa proizvodnje ($P > 0,05$). S obzirom na to da enterokoke učestvuju u razvoju arome fermentisanih kobasica (*Hugas i sar., 2003*), njihov opstanak do kraja zrenja je od suštinskog značaja. Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa nalazima *Vukovića i sar. (2011)* koji ističu da enterokoke u domaćem kulenu preživljavaju proces zrenja. *Hugas i sar. (2003)* navode da se opstanak enterokoka tokom zrenja fermentisanih kobasica može pripisati njihovom širokom rasponu temperature rasta i toleranciji na so. Sa druge strane, utvrđena je značajno pozitivna korelacija ($r = 0,804$; $P < 0,05$) između broja enterokoka i a_w vrednosti u TSK, ali ne i u slučaju ISK. Tokom procesa zrenja broj enterokoka u industrijskom i tradicionalnom proizvodu bio je u značajno pozitivnoj korelaciji sa pH vrednosti ($P < 0,05$), što je suprotno utvrđenom rezultatu za BMK kojima i pripadaju.

Na početku zrenja broj mikrokoka u industrijskom proizvodu iznosio je $3,81 \pm 0,02$ log cfu/g, dok je u tradicionalnom proizvodu utvrđen značajno veći broj mikrokoka od $4,06 \pm 0,03$ log cfu/g ($P < 0,001$). Tokom fermentacije došlo je do redukcije populacije mikrokoka u proizvodima iz ove studije, dok se u drugoj fazi zrenja broj ovih mikroorganizama povećao. Prema podacima iz literature, mikrokoke su osetljive na brzu acidifikaciju sredine, te imaju povoljnije uslove za razvoj u tradicionalnim fermentisanim kobasicama koje se proizvode pri nižim temperaturama zrenja, kada je i opadanje pH vrednosti sporije. *Fernández-López i sar. (2008)*, takođe, ističu da se broj mikrokoka u fermentisanim kobasicama smanjuje sa opadanjem pH vrednosti. Na kraju zrenja, TSK je imao značajno više mikrokoka od ISK ($P < 0,05$). U poređenju sa lemeškim kulenom (*Vuković i sar., 2012*), oba proizvoda iz ovog istraživanja imali su veći broj mikrokoka na kraju zrenja. Do kraja zrenja lemeškog kulena broj mikrokoka se smanjio za jednu

logaritamsku jedinicu (Vuković i sar., 2012), dok se u industrijskom i tradicionalnom proizvodu iz ove studije broj mikrokoke, uz periodične varijacije, održao na istom nivou. Prema podacima iz literature, mikrokoke igraju značajnu ulogu u zrenju fermentisanih kobasica zbog njihovog antioksidativnog efekta i uticaja na formiranje boje i arome proizvoda (Leroy i sar., 2006; Vasilev i sar., 2015). Razgradnjom peroksida, uključujući i vodonik-peroksid nastao tokom fermentacije, mikrokoke sprečavaju oksidaciju nezasićenih masnih kiselina i pojavu užglosti koja dovodi do mana, kako u boji i izgledu, tako i u aromi proizvoda. Redukcijom nitrata do nitrita mikrokoke omogućavaju stvaranje pigmenta nitrozil-mioglobina, što doprinosi razvoju stabilne boje tradicionalnih fermentisanih kobasica (Vignolo i sar., 2010). Kao rezultat proteolitičke i lipolitičke aktivnosti mikrokoke stvaraju se aromatična jedinjenja koja daju prepoznatljiv ukus proizvodu (Ferreira i sar., 2007; Vignolo i sar., 2010).

Inicijalni broj bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* bio je znatno manji ($P < 0,05$) u industrijskom nego u tradicionalnom proizvodu, što se može dovesti u vezu sa boljim higijenskim kvalitetom sirovine, kao i boljim uslovima u industrijskom pogonu za preradu mesa. Tokom zrenja, broj enterobakterija bio je u značajno pozitivnoj korelaciji sa a_w vrednosti kako kod ISK ($r = 0,720$, $P < 0,05$), tako i kod TSK ($r = 0,966$, $P < 0,01$). Nalazi Fontán i sar. (2007) govore u korist rezultata ove studije, s obzirom da su takođe utvrdili značajno pozitivnu korelaciju ($r = 0,774$, $P < 0,01$) između broja enterobakterija i a_w vrednosti. Nakon 90. dana zrenja enterobakterije nisu detektovane u industrijskom i tradicionalnom proizvodu iz ovog istraživanja. Slične rezultate dobili su Vuković i sar. (2012) tokom ispitivanja lemeškog kulena, koji su istakli da su članovi porodice *Enterobacteriaceae* osetljivi na povišeni sadržaj soli, nisku a_w i pH vrednost. Osim toga, Latorre-Moratalla i sar. (2007) navode da je redukcija populacije Gram negativnih bakterija tokom zrenja fermentisanih kobasica delimično posledica rasta BMK i smanjenja pH vrednosti. Međutim, u ovom istraživanju nije utvrđena značajna korelacija između pH vrednosti i broja Gram-negativnih bakterija (*Enterobacteriaceae* i *Pseudomonadaceae*). Tokom zrenja broj bakterija iz familije *Pseudomonadaceae* bio je u značajno pozitivnoj korelaciji sa a_w vrednosti kod ISK ($r = 0,892$, $P < 0,01$), kao i kod TSK ($r = 0,939$, $P < 0,01$). Bakterije iz familije *Pseudomonadaceae* su izumrle nakon 28. dana zrenja industrijskog i tradicionalnog proizvoda usled nepovoljnih abiotičkih i biotičkih faktora, što je veoma značajno sa aspekta kvaliteta i održivosti proizvoda.

6.1.2. Identifikacija BMK pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije

MALDI TOF masena spektrometrija je metoda koja se poslednjih nekoliko godina, široko primenjuje za identifikaciju i tipizaciju mikroorganizama (Šedo i sar., 2011; Dušková i sar., 2012). Metoda se zasniva na stvaranju "fingerprint"-ova najzastupljenih proteina iz bakterijske ćelije, najčešće ribozomalnih, i njihovim poređenjem sa postojećom bazom podataka (Cherkaoui i sar., 2010; Doan i sar., 2012). MALDI-TOF masena spektrometrija omogućava brzu i ekonomičnu diferencijaciju i identifikaciju velikog broja mikroorganizama (Sauer i Kliem, 2010; Janßen i sar., 2018). U poređenju sa molekularnim metodama, MALDI-TOF masena spektrometrija ima brojne prednosti, s obzirom da je metoda brza, jednostavna za izvođenje i precizna, zahteva malu količinu uzorka, a cena reagenasa je niska (Cherkaoui i sar., 2010; Doan i sar., 2012). Naravno, pre postupka identifikacije neophodno je izvršiti izolaciju bakterija u čistoj kulturi (Singhal i sar., 2015). Pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije mogu se identifikovati bakterije, ne samo na nivou roda i vrsta, već i na nivo podvrsta u nekim slučajevima (Carbonnelle i sar., 2011). MALDI-TOF masena spektrometrija se uspešno primenjuje u identifikaciji bakterija izolovanih kako iz kliničkog materijala, tako i iz hrane (Doan i sar., 2012; Dušková i sar., 2012). Stoga je MALDI-TOF masena spektrometrija bila metoda izbora za ispitivanje diverziteta BMK, izolovanih iz industrijskog proizvoda i proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima.

Od ukupno 360 izolata BMK poreklom iz ISK i TSK, primenom MALDI-TOF masene spektrometrije, identifikovano je 340 izolata (95,55%), dok 20 izolata (4,55%) nije identifikovano. Identifikacija je ponovljena za preostalih 20 izolata, ali je iznova bila neuspešna. Pretpostavlja se da nisu bile u pitanju čiste kulture. Od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz ISK, 137 izolata (76,11%) je identifikovano kao *Lactobacillus sakei*, 18 (10%) kao *Lactobacillus curvatus*, 5 (2,78%) kao *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, 2 (1,11%) kao *Lactobacillus paraplantarum* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, dok 16 izolata (8,89%) nije identifikovano. Sa druge strane, od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz TSK, 161 izolat (89,64%) je identifikovan kao *Lactobacillus sakei*, 13 (7,22%) kao *Lactobacillus curvatus* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, a 4 izolata (2,22%) nije identifikovano.

Dakle, među identifikovanim izolatima BMK poreklom iz ISK i TSK, dominantna vrsta bio je *Lactobacillus sakei*, što je u saglasnosti sa nalazima Champomier-Vergès i Zagorec, (2015), kao i Tremonte i sar. (2017). Zastupljenost ove vrste među izolatima poreklom iz industrijskog proizvoda po danu ispitivanja kretala se od 66,67-86,7%, dok je u slučaju

izolata poreklom iz proizvoda dobijenog u tradicionalnim uslovima zastupljenost *Lactobacillus sakei* po danu ispitivanja iznosila 76,7-93,4%. Dakle, *Lactobacillus sakei* je od početka do kraja zrenja ISK i TSK bio dominantna vrsta među BMK. Pored *Lactobacillus sakei*, u industrijskom proizvodu identifikovan je i *Lactobacillus curvatus* čija je zastupljenost po danu ispitivanja iznosila od 0-23,3%. Sa druge strane *Lactobacillus curvatus* je identifikovan među izolatima poreklom iz tradicionalnog proizvoda tokom svakog dana ispitivanja, sa zastupljenošću od 3,3 do 13,3%. Prema podacima iz literature, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* i *Lactobacillus plantarum* su najčešće izolovane vrste BMK iz tradicionalnih fermentisanih kobasica (Aymerich i sar., 2003; Bonomo i sar., 2008; Fontana i sar., 2009; Pisacane i sar., 2015). *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus* se lako prilagođavaju uslovima fermentacije tokom zrenja fermentisanih kobasica (Hammes i Knauf, 1994; Janßen i sar., 2018) i zastupljeniji su u ovim proizvodima od *Lactobacillus plantarum* (Franciosa i sar., 2018). Dokazano je da *Lactobacillus sakei* koristi različite aminokiseline i peptide nastale tokom proteolize, kao i ribozu koja potiče iz ribonukleinske kiseline (Janßen i sar., 2018). Osim toga, *Lactobacillus sakei* je otporan na sušenje, hlađenje, kao i oksidativni stres (Leistner, 2000; Zagorec i Champomier-Verges, 2017; Janßen i sar., 2018). Među izolatima poreklom iz ISK, identifikovani su i *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, *Lactobacillus paraplantarum*, kao i *Leuconostoc mesenteroides*. Pored *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus*, identifikacijom izolata poreklom i iz TSK, utvrđen je i *Leuconostoc mesenteroides*. Prema Aquilanti i sar. (2016), pripadnici rodova *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Pediococcus* su manjinske vrste BMK u okviru mikroflore fermentisanih kobasica. Sumirajući rezultate istraživanja koja su imala za cilj ispitivanje diverziteta BMK u tradicionalnim fermentisanim kobasicama poreklom iz Mediterana (severna, centralna i južna Italija, Francuska, Španija, Portugalija i Grčka), isti autori su došli do zaključka da su heterofermentativni laktobacili, pre svega *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus*, bili dominantni. Aquilanti i sar. (2016) takođe ističu da je između proizvoda poreklom iz različitih zemalja utvrđena mala varijabilnost u pogledu identifikovanih vrsta.

Dakle, mikrobiološka sukcesija tokom zrenja tradicionalnih fermentisanih kobasica je konstantan i veoma složen proces uslovljen kompleksnim interakcijama između biotičkih i abiotičkih faktora koji značajno utiču na dinamičke promene koje se dešavaju tokom procesa zrenja proizvoda (Zdolec i sar., 2013). Pri tome, opstaju samo vrste koje se bolje prilagođavaju pomenutim promenama.

6.2. FIZIČKO-HEMIJSKA ISPITIVANJA

6.2.1. pH vrednost

Na početku zrenja pH vrednost ISK i TSK iznosila je $5,84 \pm 0,01$ i $5,67 \pm 0,01$ što odgovara pH vrednosti ohlađnog svinjskog mesa (Dokmanović i sar., 2014; Čobanović, 2018). Utvrđene pH vrednosti nadeva ukazuju na dobar odabir sirovine, s obzirom da se za proizvodnju fermentisanih kobasica koristi svinjsko meso čija je pH vrednost manja od 6 (Teodorović i sar., 2015). Tokom procesa fermentacije u prvoj fazi zrenja, došlo je do smanjenja pH vrednosti kod oba proizvoda. Nagli pad pH vrednosti utvrđen je kod industrijskog proizvoda, dok se pH vrednost tradicionalnog proizvoda postepeno smanjivala do 21. dana zrenja, verovatno zbog niskih spoljašnjih temperatura koje su zadesile taj period zrenja, što je usporilo proces fermentacije. Sa poboljšanjem vremenskih prilika i povećanjem temperature vazduha, došlo je do intenziviranja procesa fermentacije i posledično do bržeg pada pH vrednosti kod TSK, pa je 60. dana zrenja zabeležena najniža vrednost ovog parametra od $5,24 \pm 0,02$. Smanjenje pH vrednosti tokom prve faze zrenja veoma je važno za proces sušenja, povezivanje nadeva, optimalne konzistencije, formiranje stabilne boje, karakterističnog ukusa i arome, kao i za održivost proizvoda (Vuković i sar., 2004). Pad pH vrednosti do izoelektrične tačke akto-miozina (pH=5,3) olakšava proces sušenja proizvoda, s obzirom da se pH i sposobnost vezivanja vode mesa nalaze u pozitivnoj korelaciji (Honikel i Hamm, 1994). Posledično se smanjuje i a_w vrednost što doprinosi održivosti i bezbednosti proizvoda. Pri niskoj pH vrednosti dolazi do geliranja rastvorenih proteina miofibrila i slepljivanja komadića mesa, pri čemu nadev postaje kompaktna, a konzistencija proizvoda čvršća (Vignolo i sar., 2010; Teodorović i sar., 2015). Takođe, pad pH vrednosti ima ključnu ulogu u formiranju stabilne boje proizvoda koja nastaje usled obrazovanja pigmenta nitrozil-mioglobina u reakciji mioglobina i nitrita. Acidifikacijom nadeva inicira se proces proteolize i nukleolize tokom kojih tkivni enzimi oslobađaju peptide, amino kiseline i nukleozide čijom daljom razgradnjom nastaju isparljive supstance koje doprinose razvoju arome krajnjeg proizvoda (Chen i sar., 2015). Međutim, pad pH vrednosti indukuje i nastanak biogenih amina, jer se proces dekarboksilacije aktivira kao odgovor mikrobnih ćelija na stres izazvan acidifikacijom sredine (Gardini i sar., 2016).

U drugoj fazi zrenja, pH vrednost se postepeno povećavala kod oba proizvoda, kao posledica izražene proteolize i posledične akumulacije alkalnih jedinjenja, na šta ukazuju rezultati indeksa proteolize (tabela 17). Iz prikazanih rezultata, može se zapaziti da se pH

vrednost industrijskog proizvoda značajno razlikovala od pH vrednosti proizvoda tradicionalnog porekla tokom celog perioda zrenja, na nivou statističke značajnosti od 5% ili 0,1%. Na kraju zrenja pH vrednost ISK i TSK iznosila je $5,64 \pm 0,03$ i $5,46 \pm 0,02$, što je u skladu sa zahtevima *Pravilnika o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, 94/2015)* i zvaničnog *Elaborata (2013)*, koji propisuju da pH vrednost mora biti veća od 5,3. *Vuković i sar. (2012)* su utvrdili sličnu pH vrednost ($5,49 \pm 0,20$) u lemeškom kulenu, dok se pH vrednost domaćeg kulena kretala od 5,22 do 5,51 (*Vuković i sar., 2011*). *Kovačević i sar. (2010)* su uglavnom utvrdili niže pH vrednosti tokom ispitivanja slavonskog kulena, koje su varirale od $5,06 \pm 0,21$ do $5,58 \pm 0,18$. Prema *Vukoviću i sar. (2004)*, vrednosti pH ispod 5,3 ukazuju na nedovoljnu zrelost proizvoda ili upotrebu glukono- δ -laktona (GDL) u industrijskoj proizvodnji.

6.2.2. Kalo sušenja

Sušenje je najvažniji postupak konzervisanja u procesu proizvodnje sremskog kulena kojim se postiže održivost proizvoda. Konzervišući efekat sušenja zasniva se na smanjenju sadržaja vode, a samim tim i a_w vrednosti proizvoda. Odavanjem vlage proizvod gubi masu, odnosno javlja se kalo sušenja. Tokom prvih sedam dana zrenja, TSK je imao izraženiji gubitak mase od ISK, što se može dovesti u vezu sa kvalitetom upotrebljenih sirovina, kao i mikroklimatskim parametrima zrenja koji su bili pod direktnim uticajem spoljašnjih klimatskih uslova. Naime, utvrđena niža pH vrednost nadeva tradicionalnog proizvoda ukazuje na to da je i meso upotrebljeno za izradu ovog proizvoda imalo značajno nižu pH vrednost od mesa koje se koristilo za izradu industrijskog proizvoda. S obzirom da se pH i sposobnost vezivanja vode mesa nalaze u pozitivnoj korelaciji (*Honikel i Hamm, 1994*), došlo je do lakšeg odavanja vode kod TSK tokom prvih dana zrenja, a tome su doprineli i povoljniji meteorološki uslovi, pre svega niža relativna vlažnost vazduha (Slika 3). Nakon 14 dana zrenja, došlo je do pada pH vrednosti industrijskog proizvoda do izoelektrične tačke aktomiozina (pH=5,3) što je dovelo do smanjenog kapaciteta vezivanja vode, a samim tim i bržeg sušenja proizvoda (*Honikel i Hamm, 1994*). Pri izoelektričnoj tački aktomiozina zastupljen je isti broj pozitivno i negativno naelektrisanih polarnih grupa aminokiselina, pri čemu se peptidni lanci međusobno privlače, kapilarni prostori miofibrila smanjuju, a meso lako otpušta vodu (*Teodorović i sar., 2015*). Sa druge strane, pH tradicionalnog proizvoda dostigao je vrednost izoelektrične tačke aktomiozina tek nakon 28 dana zrenja, pa se i proces sušenja sporije odvijao. Posledično je ISK od 21. dana ispitivanja pa do kraja zrenja

imao veći kalo sušenja od TSK. S obzirom da se proces sušenja do 100. dana ispitivanja industrijskog i tradicionalnog proizvoda nije odvijao pod istim mikroklimatskim uslovima, ne sme se zanemariti ni njihov uticaj na kalo sušenja ovih proizvoda. Pri višoj temperaturi, nižoj relativnoj vlažnosti vazduha i intenzivnijoj cirkulaciji vazduha, javlja se veći gubitak mase proizvoda. Dodatno, može se primetiti da je najveći kalo sušenja kod oba proizvoda utvrđen tokom prvih dana zrenja, kada se proizvodi još cede, kao i u periodu kada je pH proizvoda bio približan pH vrednosti izoelektrične tačke aktomiozina. U poslednjoj fazi zrenja utvrđeni su najmanji gubici mase proizvoda. Ovi nalazi su u skladu sa navodima *Radetića, (1997)* koji ističe da je kalo sušenja veći u početku, nego na kraju ovog procesa. Na kraju zrenja, kalo sušenja industrijskog proizvoda iznosio je 54,71%, a proizvoda tradicionalnog porekla 53,14%, što je karakteristično za suve fermentisane kobasice sa dugim periodom zrenja (*Ikonić, 2013; Škaljac, 2014*).

6.2.3. a_w vrednost

Tokom zrenja, kalo sušenja se povećao, a sa druge strane, došlo je do smanjenja a_w vrednosti, što je veoma važno sa aspekta održivosti i bezbednosti proizvoda. Aktivnost vode je mera slobodne, mikroorganizmima dostupne vode i od posebnog je značaja za procenu mikrobiološke bezbednosti proizvoda. Na početku zrenja, a_w vrednost ISK i TSK iznosila je $0,955 \pm 0,01$ i $0,960 \pm 0,00$ pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). Aktivnost vode ispitanih proizvoda se nije značajno razlikovala do 21. dana zrenja, a zatim je utvrđen brži pad a_w vrednosti kod ISK. Posledično je industrijski proizvod do kraja zrenja imao značajno manju a_w vrednost od proizvoda tradicionalnog porekla, na nivou statističke značajnosti od 5% ili 1%. Utvrđene razlike su rezultat različitih dinamičkih promena pH vrednosti tokom zrenja ispitanih proizvoda, što je već objašnjeno tokom diskusije kala sušenja. Na kraju zrenja a_w vrednost ISK i TSK iznosila je $0,800 \pm 0,01$ i $0,815 \pm 0,00$. Rezultati ove studije su u saglasnosti sa navodima *Vukovića (2012)* koji ističe da se a_w vrednost fermentisanih suvih kobasica na početku procesa sušenja kreće od 0,95 do 0,96, da bi u gotovom proizvodu iznosila 0,80 do 0,90. Izmerene a_w vrednosti su slične onima koje su dobijene za lemeški kulen (*Vuković i sar., 2012*), domaći kulen (*Vuković i sar., 2011*) i Slavonski kulen (*Kovačević i sar., 2010*). Niska a_w vrednost utvrđena na kraju zrenja oba proizvoda ukazuje na mikrobiološku stabilnost istih, s obzirom da a_w ispod 0,91 limitira rast patogenih mikroorganizama (*Vignolo i sar., 2010; Laranjo i sar., 2015*).

6.3. HEMIJSKA ISPITIVANJA

6.3.1. Hemijski sastav

Hemijski sastav fermentisanih kobasica, zavisi od kvaliteta i količine upotrebljenog mesa, masnog tkiva i dodataka tokom izrade nadeva, kao i uslova i dužine zrenja. Stoga je hemijski sastav ISK i TSK utvrđen je na početku (hemijski sastav nadeva) i na kraju zrenja ovih proizvoda. Sadržaj vlage u nedevu ispitanih proizvoda bio je približno isti i iznosio je $65,20 \pm 0,76\%$ za ISK, odnosno $65,81 \pm 0,35\%$ za TSK. ($P > 0,05$). Usled sušenja proizvoda, sadržaj vlage se smanjio, tako da je na kraju procesa proizvodnje iznosio $27,70 \pm 1,05\%$ za ISK, odnosno $30,26 \pm 4,60\%$ za TSK, pri čemu statistički značajna razlika nije utvrđena ($P > 0,05$). Smanjenje sadržaja vlage odgovaralo je gubitku mase proizvoda, odnosno kalu sušenja utvrđenom na kraju zrenja industrijskog i tradicionalnog proizvoda. Dakle, sadržaj vlage u gotovim proizvodima iz ove studije bio je ispod 35%, što je u skladu sa zahtevima važećeg *Pravilnika (Sl. glasnik RS, 94/2015)* i *Elaborata (2013)*. Sličan sadržaj vlage utvrđen je u lemeškom kulenu, petrovskoj klobasi, slavonskom kulenu, kao i fermentisanim suvim kobasicama koje su proizvedene u Italiji, Španiji i Grčkoj (*Vuković i sar., 2012; Ikonić i sar., 2010; Kovačević i sar., 2010; Casaburi i sar., 2007; Salgado i sar., 2005; Papamanoli i sar., 2003*).

U nedevu industrijskog proizvoda utvrđen je sadržaj masti od $13,52 \pm 0,82\%$, dok je sadržaj masti u nadevu tradicionalnog proizvoda iznosio $10,58 \pm 0,64\%$. Iako su ISK i TSK proizvedeni prema istoj recepturi, statistički značajna razlika ($P < 0,001$) utvrđena je u inicijalnom sadržaju masti (tabela 13). Ovaj nalaz ukazuje na niži procenat intramuskularne masti u mesu koje je korišćeno u proizvodnji tradicionalnog proizvoda. Na kraju zrenja TSK je takođe imao manji sadržaj masti ($26,21 \pm 4,37\%$) od ISK ($29,00 \pm 0,72\%$), ali statistički značajna razlika nije utvrđena ($P > 0,05$). Prema *Vukoviću i sar. (2011)*, sadržaj masti u domaćem kulenu kreće se od 27,9 do 28,3%, što je u skladu sa nalazima ove studije. Veći sadržaj masti ($32,6 \pm 6,2\%$) na kraju zrenja utvrđen je u lemeškom kulenu od strane *Vuković i sar. (2012)*. *Ikonić i sar. (2010)* su takođe utvrdili veći sadržaj masti u petrovskoj klobasi, koji se kretao od $34,09 \pm 1,15$ do $46,01 \pm 0,56\%$, dok su *Radovčić i sar. (2016)* zabeležili znatno manji sadržaj masti (12,61%) u baranjskom kulenu. Ispitivanjem hemijskog sastava slavonskog kulena poreklom od različitih proizvođača, *Kovačević i sar. (2010)* su konstatovali da sadržaj masti varira od $14,05 \pm 0,74$ do $28,84 \pm 1,32\%$. *Olivares i sar. (2011)* ističu da je veći sadržaj masti (40-50%) u fermentisanim kobasicama od suštinskog značaja za senzorske karakteristike kao što su čvrstoća, sočnost i ukus, ali se ne preporučuje

sa aspekta zdravlja, pa su proizvodi koji sadrže manje masti više cenjeni od strane potrošača.

Sadržaj proteina mesa u nadevu industrijskog proizvoda iznosio je $18,22 \pm 0,96\%$, dok je u nadevu tradicionalnog proizvoda bilo značajno više proteina mesa, odnosno $19,95 \pm 0,41\%$ ($P < 0,05$). S obzirom da su oba proizvoda proizvedena prema istoj recepturi, razlika u inicijalnom sadržaju proteina mesa može se dovesti u vezu sa kvalitetom upotrebljenih sirovina. Iako je za izradu nadeva oba proizvoda birano isključivo meso buta, rezultati ispitivanja hemijskog sastava nadeva ISK i TSK ukazuju na to da je meso upotrebjeno za proizvodnju TSK bilo kvalitetnije, odnosno da je imalo više proteina i manje masti. Na kraju zrenja nije utvrđena statistički značajna razlika između ISK i TSK u pogledu sadržaja proteina mesa, s obzirom da je ISK imao $36,10 \pm 1,21$, a TSK $36,46 \pm 1,21\%$ proteina mesa. Industrijski i tradicionalni proizvod iz ove studije ispunjavaju zahtev *Pravilnika (Sl. glasnik RS, 94/2015)* u pogledu sadržaja proteina mesa, prema kome sadržaj proteina mesa u domaćem kulenu mora biti veći od 24%. Sadržaj proteina mesa oba proizvoda bio je i u skladu sa zahtevom *Elaborata (2013)* koji nalaže da sremski kulen mora imati više od 30 % proteina mesa. Prema podacima iz literature, manji sadržaj proteina mesa utvrđen je u lemeškom kulenu (*Vuković i sar., 2012*), kao i u petrovskoj klobasi (*Ikonić i sar., 2010*), dok su *Radovčić i sar. (2016)* utvrdili značajno veći procent (41,16%) proteina mesa u baranjskom kulenu. Pored toga, *Kovačević i sar. (2010)* navode da sadržaj proteina mesa u slavonskom kulenu poreklom od različitih proizvođača varira od $26,21 \pm 0,27$ do $53,03 \pm 0,27\%$.

Sa nutritivnog i kvalitativnog aspekta, značajna je podela proteina mesa na proteine mišićnog i proteine vezivnog tkiva, ako se uzme da proteini mišićnog tkiva sadrže 43%, a proteini vezivnog tkiva 23% esencijalnih aminokisela. Dodatak čvrstog masnog tkiva svinja u nadev fermentisanih kobasica dovodi do povećanja sadržaja proteina vezivnog tkiva, s obzirom da sadrži 1,6–2,5% ovih proteina (*Thalhammer, 2000*). Stoga je tokom ispitivanja hemijskog sastava ISK i TSK utvrđen i sadržaj kolagena preko koga se izražava sadržaj proteina vezivnog tkiva. Udeo kolagena u proteinima mesa bio je znatno veći kod industrijskog proizvoda nego kod tradicionalog proizvoda kako na početku zrenja ($P < 0,001$), tako i na kraju zrenja ($P < 0,05$), što se takođe može dovesti u vezu sa kvalitetom upotrebljenih sirovina. Relativni sadržaj kolagena u gotovom proizvodu industrijskog porekla iznosio je $6,18 \pm 0,41\%$, a u tradicionalnom proizvodu $5,27 \pm 0,71\%$ što je u skladu sa zahtevom važećeg *Pravilnika (Sl. glasnik RS, 94/2015)* i *Elaborata (2013)* koji nalažu da sadržaj kolagena u proteinima mesa mora biti manji od 10%. Prema podacima iz literature,

sličan relativni sadržaj kolagena utvrđen je u domaćem (*Vuković i sar., 2011*), lemeškom (*Vuković i sar., 2012*), kao i slavonskom kulenu (*Kovačević i sar., 2010*).

Statistički značajna razlika u pogledu sadržaja pepela i kuhinjske soli između ISK i TSK nije utvrđena ni u nadevu, ni na kraju zrenja ovih proizvoda ($P > 0,05$). Prema *Elaboratu (2013)*, tokom izrade nadeva ispitanih proizvoda dodato je 2,2% kuhinjske soli, što je veoma važno za postizanje inicijalnog antimikrobnog efekta (*Leistner, 1986*). Kuhinjska so, takođe, utiče na biohemijske procese proteolize, lipolize i oksidacije koji su značajni za razvoj senzorskih karakteristika fermentisanih kobasica, kao što su tekstura, ukus i vizuelni izgled (*Safa i sar., 2015*). Na kraju zrenja, sadržaj kuhinjske soli u industrijskom proizvodu iznosio je $4,99 \pm 0,32\%$, a u proizvodu tradicionalnog porekla $4,95 \pm 0,12\%$, što je u skladu sa *Elaboratom (2013)* koji propisuje da sadržaj kuhinjske soli mora biti manji od 5 %. Iako soli za salamurenje nisu korišćene pri izradi nadeva eksperimentalnih proizvoda, prisustvo nitrata utvrđeno je u nadevu oba proizvoda. U nadevu industrijskog proizvoda utvrđeno je $38,03 \pm 2,08$ mg/kg nitrata, dok je nadev tradicionalnog proizvoda imao značajno manje nitrata, odnosno $29,54 \pm 5,39$ mg/kg ($P < 0,01$). *Vuković i sar. (2011)* ističu da domaći kulen uvek sadrži određenu količinu nitrata koji potiču od crvene začinske paprike. Tokom zrenja, sadržaj nitrata se smanjio kod oba proizvoda, verovatno kao posledica njihove redukcije do nitrita posredstvom bakterijske aktivnosti (*Vuković i sar., 2011*). Shodno tome, na kraju zrenja u industrijskom proizvodu utvrđen je sadržaj nitrita od $4,61 \pm 0,50$ mg/kg, dok je u tradicionalnom proizvodu sadržaj nitrita bio značajno manji i iznosio je $1,09 \pm 0,27$ mg/kg ($P < 0,001$). *Vuković i sar. (2011)* su u domaćem kulenu utvrdili značajno manji sadržaj nitrata koji se kretao od 10,50 do 12,10 mg/kg, kao i sličan sadržaj nitrita od 2,35 do 2,47 mg/kg. Sa druge strane, sadržaj nitrata se povećao tokom zrenja lemeškog kulena, a nitriti nisu detektovani u gotovom proizvodu (*Vuković i sar. 2012*). Nitriti ostvaruju višestruku ulogu tokom zrenja fermentisanih kobasica. Pre svega, imaju baktericidno dejstvo, što je značajno sa aspekta bezbednosti fermentisanih kobasica. Pored toga, nitriti u reakciji sa mioglobinom stvaraju stabilni pigment nitrozil-mioglobin doprinoseći formiranju poželjne boje proizvoda, zatim deluju antioksidativno sprečavajući oksidaciju nezasićenih masnih kiselina, a kao reaktivna jedinjenja učestvuju i u formiranju arome (*Teodorović i sar., 2015*).

6.3.2. Hidrolitičke i oksidativne promene lipida tokom zrenja

Pored proteina, lipidi su najzastupljeniji sastojak fermentisanih kobasica, s obzirom da se njihov sadržaj u ovim proizvodima kreće od 25% do 55% (Ordóñez i sar., 1999). Lipoliza je veoma važan biohemijski proces tokom zrenja fermentisanih kobasica regulisan od strane lipaza poreklom iz masnih ćelija, mišićnih vlakana, kao i mikroorganizama autohtone mikroflore (Leroy i sar., 2006; Šojić, 2013; Karsloğlu i sar., 2014). Tokom lipolize triglicerida i fosfolipida oslobađaju se masne kiseline, pa se stepen lipolize izražava preko sadržaja slobodnih masnih kiselina, odnosno kao procenat oleinske kiseline (Teodorović i sar., 2015).

Na početku zrenja kiselinski broj za ISK iznosio je $0,45 \pm 0,05$ mg KOH/g, a za TSK $0,42 \pm 0,03$ mg KOH/g, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). Tokom zrenja utvrđen je porast sadržaja slobodnih masnih kiselina kod oba proizvoda. Prema podacima iz literature, smanjenje pH vrednosti inicira proces lipolize, a aktivnost kiselih lipaza se dodatno indukuje smanjenjem a_w vrednosti, odnosno povećanjem koncentracije soli (Zhao i sar., 2010; Chen i sar., 2017). Pomenute fizičko-hemijske promene utvrđene su i tokom zrenja industrijskog i tradicionalnog proizvoda iz ove studije, što je iniciralo proces lipolize. Bazne i neutralne lipaze, nisu značajne za proces proteolize u fermentisanim kobasicama zbog niske pH vrednosti ovih proizvoda koja inhibira aktivnost pomenutih enzima (Ordóñez i sar., 1999). Sa druge strane, ne treba zanemariti ni aktivnost mikrobnih lipaza, s obzirom da se broj mikrokoka, kao najznačajnijih lipolitičkih mikroorganizama, održao do kraja zrenja oba proizvoda (Visessanguan i sar., 2006). Dakle, pretpostavlja se da su endogene i mikrobne lipaza sinergističkim dejstvom dovele do porasta sadržaja slobodnih masnih kiselina, odnosno do povećanja kiselinskog broja. Na kraju zrenja kiselinski broj industrijskog proizvoda iznosio je $3,45 \pm 0,58$ mg KOH/g, dok je proizvod tradicionalnog porekla imao značajno manji kiselinski broj od $2,39 \pm 0,20$ mg KOH/g ($P < 0,01$). U poređenju sa nalazima drugih autora koji su ispitivali slične proizvode, ISK i TSK su imali nizak sadržaj slobodnih masnih kiselina. Ispitivanjem domaćeg kulena Vuković i sar. (2011) su utvrdili kiselinski broj od 7,5–16,3 mg KOH/g, dok je kiselinski broj lemeškog kulena na kraju zrenja iznosio $23,8 \pm 5,0$ mg KOH/g (Vuković i sar., 2012).

Oksidacija lipida je jedan od primarnih mehanizama koji dovodi do narušavanja kvaliteta proizvoda (Talon i sar., 2000; Nassu i sar., 2003). Stepem oksidacije lipida određuje se preko peroksidnog broja, dok se akumulacija proizvoda peroksidne razgradnje prati određivanjem sadržaja malondialdehida, odnosno TBARS vrednosti. Tokom ispitivanja proizvoda iz ove studije, peroksidni broj utvrđen je tek 90. dana zrenja kod industrijskog proizvoda,

odnosno 150. dana kod tradicionalnog proizvoda. Na kraju zrenja peroksidni broj industrijskog proizvoda iznosio je $0,30 \pm 0,06$ mmol/kg, a tradicionalnog proizvoda $0,46 \pm 0,13$ mmol/kg, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika na nivou od 95% ($P < 0,05$).

Na početku zrenja ispitani proizvodi su imali približno iste TBARS vrednosti ($P > 0,05$). TBARS vrednost se tokom zrenja tradicionalnog proizvoda nije značajno menjala, dok se kod industrijskog proizvoda povećavala do 90. dana zrenja, a zatim se sadržaj sekundarnih proizvoda oksidacije smanjio. Na kraju zrenja TBARS vrednost industrijskog proizvoda iznosila je $0,11 \pm 0,02$ mg MDA/kg, a tradicionalnog $0,11 \pm 0,04$ mg MDA/kg, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između istih ($P > 0,05$). Rezultati ove studije su u saglasnosti sa navodima *Zanardi i sar. (2004)* koji ističu da je TBARS vrednost fermentisanih kobasica proizvedenih od svežih sirovina uvek niža od 0,50 mg MDA/kg. Slične rezultate utvrdili su *Vuković i sar. (2012)* ispitivanjem lemeškog kulena, čija je TBARS vrednost na kraju procesa zrenja iznosila $0,08 \pm 0,02$ mg MDA/kg, dok se TBARS vrednost domaćeg kulena kretala od 0,19 do 0,29 mg MDA/kg (*Vuković i sar., 2012*). *Stanišić i sar. (2014)* su tokom ispitivanja sremske kobasice utvrdili da se TBARS vrednost, u zavisnosti od varijanteta ispitanih proizvoda, kretala od 0,12 do 0,19 mg MDA/kg. Nasuprot našim rezultatima, *Radović i sar. (2014)* su utvrdili znatno veću TBARS vrednost za baranjski kulen, koja je iznosila 0,79 mg MDA/kg za tradicionalni proizvod i 1,01 mg MDA/kg za proizvod industrijskog porekla.

Iz prikazanih rezulta može se zaključiti da proces oksidacije slobodnih masnih kiselina tokom zrenja ISK i TSK nije bio izražen. Ovaj nalaz može se objasniti upotrebom svežih sirovina, odnosno mesa i čvrstog masnog tkiva dobrog kvaliteta. Takođe, ne treba zanemariti ni antioksidativnu ulogu paprike, s obzirom da sadrži antioksidativna jedinjenja, kao što su: askorbinska kiselina, tokoferoli i karotenoidi (*Vuković i sar., 2012*). Za supresiju procesa oksidacije nezasićenih masnih kiselina, važna je razgradnja peroksida pomoću katalazne, pseudokatalazne ili mangan-zavisne superoksid-dizmutazne aktivnosti mikrokokka i laktobacila, koji su u ISK i TSK opstali do kraja zrenja (*Škaljac, 2014*).

6.3.3. Proteolitičke promene tokom zrenja - indeks proteolize

Proteoliza miofibrilarnih i sarkoplazmatskih proteina je najznačajniji biohemijski proces tokom zrenja fermentisanih kobasica koji doprinosi formiranju ukusa i teksture ovih proizvoda (Ikonić, 2013; Latorre-Moratalla i sar., 2014; Berardo i sar., 2017; Jokanović i sar., 2017; Gallego i sar., 2018). Stepen proteolitičkih promena tokom zrenja ISK i TSK praćen je preko indeksa proteolize, odnosno procentualnog odnos sadržaja neproteinskog i ukupnog azota u proizvodu (Vasilev, 2010). Na početku zrenja indeks proteolize za ISK iznosio je $10,03 \pm 0,30\%$, a za TSK $10,15 \pm 0,84\%$, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). Sa padom pH vrednosti došlo je do intenziviranja procesa proteolize i posledično do povećanja indeksa proteolize u prvih 28 dana zrenja kod oba proizvoda. Pad pH vrednosti inhibira aktivnost kalpaina, kalcijum zavisnih proteinaza, odgovornih za inicijalno razlaganje miofibrilarnih struktura u mišićima, međutim aktiviraju se katepsini, enzimi odgovorni za hidrolizu različitih strukturnih proteina mesa. Za zrenje fermentisanih kobasica najznačajniji je katepsin D, aspartatna proteinaza koja ostaje stabilna i aktivna tokom celog perioda zrenja fermentisanih kobasica (Toldrá, 2002). Pored pomenutih endopeptidaza, značajne su i egzopeptidaze (tripeptidaze i dipeptidaze) koje dovode do stvaranja niskomolekularnih peptida, kao i aminopeptidaze i karboksipeptidaze zaslužne za akumulaciju slobodnih aminokiselina. Međutim, ne treba zanemariti ni aktivnost mikrobnih vanćelijskih proteinaza, koje hidrolizuju proteine mesa do oligopeptida, a zatim asimilovane oligopeptide razlažu do slobodnih aminokiselina (Toldrá, 2002). Stepen hidrolize miofibrilarnih i sarkoplazmatskih proteina zavisi od formulacije nadeva, autohtone mikroflore, odnosno upotrebljene starter kulture, kao i fizičko-hemijskih promena nastalih tokom zrenja koje utiču na aktivnost proteolitičkih enzima, od kojih su najvažnije promena pH vrednosti i koncentracije soli, odnosno dehidracija proizvoda (Tasić, 2012). Dakle, proces proteolize je veoma kompleksan, s obzirom da je regulisan od strane različitih enzima koji ostvaruju svoju aktivnost samo pod uslovom da su stvoreni optimalni uslovi za njihovo delovanje. Proces proteolize u industrijskom i tradicionalnom proizvodu iz ove studije, bio je izražen tokom celog proizvodnog ciklusa uz manje oscilacije, ali nakon 120. dana zrenja utvrđeno je smanjenje indeksa proteolize kod oba proizvoda, kao posledica dehidracije proizvoda odnosno povećanja koncentracije soli. Iz prikazanih rezultata indeksa proteolize može se zapaziti da je proces proteolize bio intenzivniji kod industrijskog proizvoda. Kao posledica veće akumulacije baznih jedinjenja usledilo je značajno veće povećanje pH vrednosti kod ISK nego kod TSK u drugoj fazi zrenja proizvoda.

6.3.4. Biogeni amini

Tokom zrenja fermentisane kobasice mogu akumulirati značajan sadržaj biogenih amina koji se formiraju usled dekarboksilacije odgovarajući^o aminokiselina zahvaljujući aktivnosti mikroorganizama autohtone mikroflore (Bunčić i sar., 1993; Spano i sar., 2010; EFSA, 2011; Latorre-Moratalla i sar., 2012; 2017). Određivanje sadržaja biogenih amina u fermentisanim kobasicama je veoma važno sa aspekta bezbednosti i kvaliteta proizvoda (Tasić i sar., 2012; Latorre-Moratalla i sar., 2017). Stoga se jedan od zadataka ovog istraživanja odnosio na praćenje aminogeneze u ISK i TSK tokom zrenja ovih proizvoda.

Analizom nadeva industrijskog i tradicionalnog proizvoda tiramin, histamin, putrescin i kadaverin nisu detektovani. Prema Hernandez-Jover i sar. (1996), odsustvo ovih biogenih amina ukazuje na dobar kvalitet sirovog mesa koje je korišćeno za proizvodnju kobasica. Uprkos povišenom inicijalnom broju enterobakterija u proizvodima iz ove studije, aktivnost histidin, lizin i ornitin dekarboksilaza nije utvrđena na početku zrenja. Prisustvo bakterija predodređenih za proces dekarboksilacije aminokiselina je esencijalno, ali ne i dovoljno za proizvodnju biogenih amina. Međutim, analizom nadeva industrijskog i tradicionalnog proizvoda utvrđeno je prisustvo triptamina i feniletilamina. Utvrđeni sadržaj triptamina u ISK od $150,70 \pm 11,21$ mg/kg bio je značajno manji od sadržaja triptamina u TSK koji je iznosio $225,40 \pm 19,72$ mg/kg ($P < 0,001$). Sadržaj triptamina se značajno smanjio do kraja procesa zrenja verovatno kao posledica njegove degradacije mikroorganizmima koji koriste triptamin kao izvor azota (Laranjo i sar., 2017). Pored toga, sinteza triptamina je nekompetitivno inhibirana u prisustvu drugih biogenih amina (Mebedano i sar., 2015). Sa druge strane, statistički značajna razlika između ISK i TSK u pogledu sadržaja feniletilamina u nadevu nije utvrđena ($P > 0,05$). Sadržaj feniletilamina u industrijskom i tradicionalnom proizvodu iz ove studije je porastao u prvoj fazi zrenja, a zatim je istovremeno počeo da opada sa akumulacijom tiramina. Prema literaturi, tiraminogene bakterije, naročito vrste iz roda *Enterococcus*, poznati su kao glavni proizvođači feniletilamina koji vrše dekarboksilaciju fenilalanin kada njihov primarni supstrat, tirozin, nije dostupan (Bargossi i sar., 2015; Latorre-Moratalla i sar., 2014). Slične rezultate dobili su Ikonić i sar. (2013) koji su utvrdili triptamin i feniletilamin u petrovskoj klobasi tokom celog perioda zrenja. Triptamin i feniletilamin su takođe utvrđeni u fermentisanim kobasicama iz Španije, Rumunije, Finske, Turske, Rusije i Kine (Lorenzo i sar., 2008; Simion i sar., 2010; Eerola i sar., 1998; Lu i sar., 2010).

Prema literaturi, tiramin je najzastupljeniji biogeni amin u fermentisanim kobasicama koji u prekomernim količinama može izazvati štetne efekte kod ljudi, kao što su hipertenzivne krize i migrene (Stadnik i Dolatovski 2010). Tiramin je dominantan biogeni amin u kobasicama poreklom iz Španije (Latorre-Moratalla i sar., 2008), Francuske (Lebert i sar., 2007), kao i kobasicama iz južne Italije (Parente i sar., 2001). Tiramin se javlja u fermentisanim kobasicama uglavnom kao rezultat aktivnosti BMK (Laranjo i sar., 2017), među kojima su bakterije iz roda *Enterococcus* prepoznati kao najefikasniji proizvođači ovog biogenog amina (Bargossi i sar., 2015). Opšte je prihvaćeno da se tiramin u fermentisanim kobasicama formira simultano sa eksponencijalnim razvojem BMK. U proizvodima iz ove studije, tiramin je detektovan nakon 28 dana zrenja i to u značajno većoj koncentraciji kod industrijskog proizvoda ($P < 0,001$). Veća produkcija tiramina u industrijskom proizvodu može se dovesti u vezu sa intenzivnijim procesom fermentacije koji je za posledicu imao nagli pad pH vrednosti što je iniciralo proces dekarboksilacije tirozina. Produkciji tiramina prethodio je proces proteolize na šta ukazuju rezultati indeksa proteolize (tabela 17). Sadržaj tiramina u ISK i TSK je rastao tokom zrenja proizvoda, pri čemu je najveća koncentracija od $288,00 \pm 7,42$, odnosno $160,70 \pm 22,38$ mg/kg utvrđena nakon 120 dana. Poznato je da širi dijametar i dug period zrenja fermentisanih kobasica mogu doprineti većoj akumulaciji tiramina (Bover-Cid i sar., 1999; Komprda i sar., 2009). Na kraju zrenja u industrijskom proizvodu utvrđeno je $241,10 \pm 21,01$ mg/kg tiramina, a u tradicionalnom proizvodu značajno manje, odnosno $115,80 \pm 34,58$ mg/kg ($P < 0,001$). Akutni nivo toksičnosti za tiramin je veći od 2000 ppm, dok je za NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) uzeta vrednost od 2000 ppm (Til i sar., 1997; Naila i sar., 2010). Uzimajući u obzir utvrđene koncentracije tiramina u proizvodima iz ove studije, kao i podatke o toksičnosti ovog biogenog amina, može se reći da konzumiranje ISK i TSK ne predstavlja rizik po zdravlje potrošača.

Sa aspekta bezbednosti najznačajniji biogeni amin, histamin, detektovan je u industrijskom proizvodu nakon 28 dana zrenja, dok u tradicionalnom proizvodu nije bio prisutan do samog kraja proizvodnog procesa. Koncentracija histamina u finalnom proizvodu industrijskog porekla iznosila je $12,36 \pm 1,72$ mg/kg, dok je tradicionalni proizvod imao neznatno veći sadržaj histamina ($16,55 \pm 5,22$ mg/kg), ali takođe ispod granice od 100 mg/kg koja se koristi za utvrđivanje potencijalnog rizika za zdrave osobe (EC, 2005). Prema podacima iz literature, histamin je utvrđen u različitim fermentisanim kobasicama i to uglavnom u koncentraciji koja je manja od zadovoljavajućih 100 mg/kg (Hernandez-Jover i

sar., 1997; *Parente i sar.*, 2001; *Ansorena i sar.*, 2002; *Komprda i sar.*, 2004; *Roseiro i sar.*, 2006; *Ruiz-Capillas i sar.*, 2007; *Ferreira i sar.*, 2007; *Latorre-Morattala i sar.*, 2008). Nasuprot našim rezultatima, *Tasić i sar.* (2012) i *Ikonić i sar.* (2013) nisu tvrdili histamin u petrovskoj klobasi, dok su *Károlyi i sar.*, (2010) pronašli znatno veći sadržaj histamina u slavonskom kulenu ($330,8 \pm 126,3$ mg/kg). Prema podacima iz literature, kontaminentne bakterije, prvenstveno enterobakterije, su glavni proizvođači histamina (*Holck i sar.* 2017). Zbog toga se veće koncentracije histamina retko nalaze u fermentisanim kobasicama proizvedenim pod odgovarajućim higijenskim uslovima, pa je predložen kao hemijski indikator higijene u proizvodnom procesu (*Latorre-Moratalla i sar.*, 2008; *Ikonić i sar.*, 2013). Shalaby (1996) je predložio nivo tiramina (100-800 mg/kg), histamina (50-100 mg/kg) i feniletilamina (<30,0 mg/kg) kao indikatore dobre proizvodne prakse. Sadržaj tiramina i histamina u industrijskom i tradicionalnom proizvodu iz ove studije nalazi se u okviru predloženih vrednosti, dok je sadržaj feniletilamina kod oba proizvoda bio nešto veći od navedenog limita. Sa druge strane, *Eerola i sar.* (1998) su predložili ukupnu količinu vazoaktivnih biogenih amina (triptamina, feniletilamina, tiramina i histamina) od 200 mg/kg kao mogući indikator dobre proizvođačke prakse. Sadržaj vazoaktivnih biogenih amina u ISK (361,36 mg/kg) bio je značajno veći od navedene granice, pri čemu je ukupnom zbiru ovih amina najviše doprineo tiramin koji, prema podacima iz literature, nastaje usled aktivnosti BMK (*Laranjo i sar.*, 2017). Sa druge strane, sadržaj vazoaktivnih amina u TSK iznosio je 209,88 mg/kg, što je neznatno veće od predložene granice.

Tokom zrenja industrijskog i tradicionalnog proizvoda iz ove studije utvrđeno je i prisustvo diamina, odnosno putrescina i kadaverina. Prema podacima iz literature, prisustvo putrescina i kadaverina utvrđeno je i u kobasicama poreklom iz Španije (*Hernandez-Jover i sar.*, 1997), Portugalije (*Roseiro i sar.*, 2006; 2010), Francuske (*Montel i sar.*, 1999), kao i kobasicama iz južne Italije (*Parente i sar.*, 2001). Akumulacija putrescina i kadaverina, u ISK i TSK može se dovesti u vezu sa povećanim brojem enterobakterija u nadevu ovih proizvoda, jer su bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* poznati kao glavni proizvođači diamina. Akumulacija diamina kod ISK i TSK utvrđena je tek nakon pada pH vrednosti i izražene proteolize, verovatno kao odgovor enterobakterija na stres izazvan acidifikacijom nadeva. Ovaj nalaz ukazuje na sintezu putrescina i kadaverina u uslovima nepovoljnim za opstanak enterobakterija, kada procesi dekarboksilacije mogu imati važnu energetska ulogu za metabolizam bakterija (*Suzzi i Gardini*, 2003). Iako su enterobakterije izumrle nakon 90 dana zrenja, sadržaj putrescina i kadaverina u industrijskom i tradicionalnom proizvodu se

povećavao do kraja proizvodnog procesa. Ovaj nalaz se može objasniti kontinuiranom aktivnošću ornitin i lizin dekarboksilaza čak i nakon dezintegracije bakterijskih ćelija (Gardini i sar., 2016; Laranjo i sar., 2017) ili sintezom putrescina i kadaverina od strane drugih mikroorganizama, jer su ornitin i lizin dekarboksilaze takođe pronađeni u mikroorganizama iz rodova *Bacillus*, *Staphilococcus*, *Enterococcus* i *Lactobacillus* (Papavergou i sar., 2012; Mobedano, i sar., 2015; Laranjo i sar., 2017, Suzzi i Gardini, 2003). Na kraju zrenja u industrijskom proizvodu utvrđeno je $457,40 \pm 4,62$ mg/kg putrescina i $444,40 \pm 23,89$ mg/kg kadaverina, značajno više nego u proizvodu tradicionalnog porekla ($P < 0,001$). Sa aspekta bezbednosti, povišene koncentracije ovih diamina u industrijskom proizvodu nisu zabrinjavajuće, s obzirom da je za NOAEL u slučaju putrescina i kadaverina uzeta vrednost od 2000 ppm (Til i sar., 1997; Naila i sar., 2010). Dodatno, putrescin i kadaverin se smatraju manje opasnim biogenim aminima, s obzirom da visoke koncentracije ovih diamina dovode do razvoja neprijatnog ukusa proizvoda što sprečava njihovo konzumiranje od strane potrošača. Neprijatan ukus nije utvrđen tokom senzorske analize ISK. Prema podacima iz literature, putrescin i kadaverin mogu reagovati sa prisutnim nitritima usled čega dolazi do formiranja nitrozamina koji su kancerogeni. U proizvodnji ISK i TSK nisu korišćene soli za salamurenje, a utvrđene koncentracije nitrita nastalih redukcijom nitrata iz paprike su male, tako da stvaranje većih količina nitrozamina nije bilo moguće. Toksičnost nitrozamina ispoljava se samo u slučaju unosa većih količina ovih kancerogena, koje se ne mogu očekivati u dnevnom obroku (Kalac, 2009).

Ukupan sadržaj biogenih amina u tradicionalnom proizvodu na kraju zrenja iznosio je 410,83 mg/kg, dok je industrijski proizvod imao značajno veći ukupan sadržaj biogenih amina od 1263,16 mg/kg. Latorre-Moratalla i sar. (2008) su klasifikovali tradicionalne fermentisane kobasice iz različitih evropskih zemalja u pet grupa (AE) na osnovu ukupnog sadržaja biogenih amina, pri čemu su u obzir uzeli samo biogene amine mikrobnog porekla koji su između ostalog i analizirani u ISK i TSK. Prema ovoj klasifikaciji TSK bi pripadao grupi D koja se karakteriše sadržajem biogenih amina u finalnom proizvodu od 350-550 mg/kg. Najzastupljeniji biogeni amin u grupi D bio je kadavarin, nakon čega je sledio tiramin (Latorre-Moratalla i sar., 2008), isto kao u slučaju tradicionalnog proizvoda iz ovog istraživanja. Međutim, zrenje TSK trajalo je duže (150 dana) od procesa zrenja kobasica iz eksperimenta Latorre-Moratalla i sar. (2008) (maksimalno 90 dana). Ako se uzme u obzir ukupni sadržaj biogenih amina u TSK nakon 90 dana zrenja, TSK bi pripadao grupi B, koja se karakteriše ukupnim sadržajem biogenih amina od 150 do 350 mg/kg i tiraminom kao

dominantnim biogenim aminom. Shodno tome, dug period zrenja značajno je doprineo akumulaciji biogenih amina u tradicionalnom proizvodu iz ove studije. Sa druge strane, najintenzivnija produkcija biogenih amina u industrijskom proizvodu utvrđena je do 90. dana zrenja, a nakon toga se ukupni sadržaj biogenih amina nije značajno menjao. Prema klasifikaciji tradicionalnih fermentisanih kobasica izvršenoj od strane *Latorre-Moratalla i sar. (2008)*, ISK bi pripadao grupi E u koju su svrstani proizvodi sa ukupnim sadržajem biogenih amina većim od 550 mg/kg. Najzastupljeniji biogeni amin u grupi E bili kadaverin, putrescin i tiramin (*Latorre-Moratalla i sar., 2008*), slično kao u slučaju ISK. Prema podacima iz literature, povećane koncentracije kadaverina, pa i putrescina, ukazuju na neadekvatnu higijensku praksu u procesu proizvodnje i izraženu mikrobiološku kontaminaciju uporebljenih sirovina enterobakterijama (*Suzzi i Gardini 2003; Latorre-Moratalla i sar., 2008; Bover-Cid i sar., 2006; Lorenzo i sar., 2017*). Međutim, ISK je imao značajno manji inicijalni broj enterobakterija od TSK ($P < 0,05$), a značajno veći sadržaj diamina u gotovom proizvodu ($P < 0,001$). Manji broj enterobakterija u nadevu industrijskog proizvoda ukazivao je na bolji higijenski kvalitet sirovine, kao i bolje uslove u industrijskom pogonu za preradu mesa, što očigledno nije uticalo na proizvodnju diamina tokom zrenja. Prema *Lorenzo i sar., (2017)*, varijabilnost u produkciji diamina između različitih vrsta enterobakterija postoji, pa čak i između sojeva iste vrste. Shodno tome, postoji mogućnost da je populaciju enterobakterija u industrijskom proizvodu činio veći broj bakterija predodređenih za sintezu putrescina i kadaverina. Sa druge strane, verovatno je i sam tok zrenja industrijskog proizvoda više pogodovao sintezi biogenih amina, s obzirom da je proces dekarboksilacije aminokiselina uslovljen dejstvom različitih intrinzičnih i ekstrinzičnih faktora (*Lorenzo i sar., 2017; Gardini i sar., 2016*). Na to ukazuje i značajno veća produkcija tiramina u industrijskom proizvodu, koji se javlja u fermentisanim kobasicama uglavnom kao rezultat aktivnosti BMK (*Laranjo i sar., 2017*).

Dakle, kvalitet sirovine i higijena u procesu proizvodnje fermentisanih kobasica su veoma važni faktori koji utiču na formiranje biogenih amina, ali neminovno je da intrinzični i ekstrinzični faktori uslovljavaju proces dekarboksilacije aminokiselina tokom procesa zrenja. S obzirom da se zrenje sremskog kulena tradicionalno odvija u prostorijama gde su ambijentalni uslovi nekontrolisani, nemoguće je u većoj meri uticati na tok zrenja proizvoda. Stoga, treba težiti ka boljem kvalitetu sirovine i voditi računa o higijeni u procesu proizvodnje, kako bi se smanjila kontaminacija nadeva nepoželjnim mikroorganizmima.

6.4. ISPITIVANJA SENZORSKIH SVOJSTAVA

6.4.1. Kvantitativna deskriptivna analiza

Prosečna senzorska ocena za spoljašnji izgled iznosila je $5,00 \pm 0,00$ za ISK, odnosno $4,93 \pm 0,19$ za TSK. Omotač industrijskog i tradicionalnog proizvoda iz ove studije bio je suv, čist, nepromašćen i dobro prilegao uz nadev. Na površini ispitanih proizvoda nisu primećena oštećenja, mrlje, diskoloracije, kao ni kolonije belih plesni. Boja omotača ISK i TSK bila je narandžasto-smeđa, ali je ISK imao svetliju i prihvatljiviju boju od TSK, pa je i dobio nešto veću ocenu za ovaj pokazatelj kvaliteta. Prosečna senzorska ocena za izgled i sastav preseka industrijskog proizvoda iznosila je $4,64 \pm 0,38$, a proizvoda tradicionalnog porekla $4,93 \pm 0,19$, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$). Presek oba proizvoda sastojao se od grubo usitnjenog mišićnog i u manjem obimu čvrstog masnog tkiva koji su bili dobro povezani i ravnomerno raspoređeni u obliku mozaika. Komadići mišićnog tkiva bili su ujednačeno tamno-crvene boje, dok je masno tkivo zadržalo belu boju. Na poprečnom preseku ISK i TSK nisu uočene rupice i šupljine, niti veći ostaci vezivnog tkiva. Veća zastupljenost masnog tkiva uočena je na preseku industrijskog proizvoda, kao i manje stabilna boja. Zbog toga je ISK imao manju prosečnu senzorsku ocenu za boju i održivost boje ($4,77 \pm 0,39$) od TSK ($4,86 \pm 0,24$). Statistički značajna razlika između industrijskog i tradicionalnog proizvoda utvrđena je samo u pogledu mirisa i ukusa, s obzirom da je industrijski proizvod imao prihvatljiviju aromu za većinu senzoričara ($P < 0,001$). Aroma suvih fermentisanih kobasica je složena senzorska osobina koja se formira usled akumulacije isparljivih jedinjenja nastalih u biohemijskim procesima zrenja pod uticajem endogenih i mikrobnih enzima čija aktivnost zavisi od intrinzičnih i ekstrinzičnih faktora (Ordóñez i sar., 1999). Tokom senzorske analize utvrđeno je da su oba proizvoda imala čvrstu konzistenciju i da su se, pri tom, dobro narezivala u tanke listiće, bez ispadanja sastojaka. Prosečna senzorska ocena za teksturu iznosila je $4,78 \pm 0,27$ za ISK, odnosno $4,93 \pm 0,19$ za TSK. Oba proizvoda su imala čvrstu konzistenciju, ali je TSK bio sočniji tokom žvakanja. Nakon ponderisanja dodeljenih ocena ispitane pokazatelje kvaliteta, utvrđena je i prosečna ocena ukupnog senzorskog kvaliteta koja je za ISK iznosila $96,43 \pm 2,88$, a za TSK $95,36 \pm 1,14$ pri čemu statistički značajna razlika između ispitanih proizvoda nije utvrđena ($P > 0,05$). Oba proizvoda su ispunili zahteve propisane *Elaboratom* (2013) i u pogledu senzorskih svojstava.

6.4.2. Instrumentalni parametri boje

Formiranje boje tradicionalnih suvih fermentisanih kobasica je veoma složen proces, s obzirom da se proizvode bez dodatka soli za salamurenje i da upotreba crvene začinske paprike doprinosi razvoju boje, ali ne uvek i optimalne. Stoga je jedan od zadataka u okviru ove doktorske disertacije bio da se utvrde instrumentalni parametri boje industrijskog i tradicionalnog proizvoda, odnosno potencijalne razlike između ovih parametara. Instrumentalni parametri boje ISK i TSK utvrđeni su na površini i na poprečnom preseku proizvoda (Tabela 26 i 27).

Karakteristična boja površine fermentisanih kobasica nastaje u toku dimljenja i sušenja, pre svega kao rezultat hemijskih reakcija između sastojaka dima i omotača proizvoda, kao i koncentrovanja pigmenata usled gubitka vlage (Vasilev, 2010). Prosečna L^* vrednost površine industrijskog proizvoda od $30,13 \pm 0,29$ bila je značajno veća od prosečne L^* vrednosti proizvoda tradicionalnog porekla koja je iznosila $27,25 \pm 0,43$ ($P < 0,001$). Rezultati L^* vrednosti utvrđeni na površini oba ispitana proizvoda iz ove studije su u saglasnosti sa rezultatima koje je utvrdila Škaljac (2014), s obzirom da se L^* vrednost površine petrovačke kobasice kretala od 21,38 do 31,89 na kraju procesa sušenja. Slične rezultate utrdili su Živković i sar. (2011) merenjem parametara boje sremske kobasice, kao i Fernández-Fernández i sar. (1998) ispitivanjem španske fermentisane kobasice *Galician chorizo*. Prema podacima iz literature, L^* vrednost na površini proizvoda tokom dimljenja i sušenja postepeno opada, u početku kao rezultat taloženja različitih komponenti dima na površini omotača, a zatim i zbog gubitka vlage tokom procesa sušenja (Fernández-Fernández i sar., 1998; Pérez-Alvarez i sar., 1999; Škaljac, 2014). Dakle, značajno manja L^* vrednosti utvrđena na površini tradicionalnog proizvoda iz ove studije može se dovesti u vezu sa količinom primljnog dima, odnosno većom količinom nataloženih čestica iz dima na površini omotača ovog proizvoda, što je uticalo i na udeo crvene i žute boje. Samim tim, TSK je imao značajno manji udeo crvene boje na površini omotača od ISK ($P < 0,05$), kao i udeo žute boje ($P < 0,01$). Da bi se preciznije definisala boja površine ISK i TSK, pored instrumentalnih parametara boje određeni su i sledeći pokazatelji boje: nijansa boje, relativni odnos crvene i žute boje, zasićenost boje, kao i indeks braon boje. Statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu nijanse boje i relativnog odnosa crvene i žute boje na površini ispitanih proizvoda ($P > 0,05$). Utvrđene vrednosti nijanse boje odgovaraju narandžastim tonovima što je u saglasnosti sa zvaničnim *Elaboratom* (2013), prema kome boja omotača sremskog kulena treba da je narandžasto-smeđa do crvenkasto-smeđa.

Zasićenost boje bila je značajno veća na površini industrijskog proizvoda ($P < 0,001$), dok se indeks braon boje među proizvodima nije razlikovao ($P > 0,05$). Zasićenost boje i indeks braon boje na površini ispitivanih proizvoda bili su u saglasnosti sa rezultatima koje je utvrdila Škaljac (2014) tokom ispitivanja petrovačke kobasice na kraju procesa sušenja.

Sa druge strane, karakteristična boja poprečnog preseka fermentisanih kobasica je rezultat složenih biohemijskih procesa tokom zrenja proizvoda. Izgled i boja preseka fermentisanih kobasica su za potrošače veoma važni pokazatelji kvaliteta prilikom kupovine proizvoda. Prosečna L^* vrednost na poprečnom preseku industrijskog proizvoda od $35,71 \pm 0,91$ bila je značajno veća od prosečne L^* vrednosti proizvoda tradicionalnog porekla koja je iznosila $32,65 \pm 0,44$ ($P < 0,001$). S obzirom da je zrenje oba proizvoda trajalo 150 dana, dužina zrenja, kao faktor koji se nalazi u negativnoj korelaciji sa svetloćom boje, nije doprinela ovoj razlici. Utvrđena razlika može se dovesti u vezu sa većom zastupljenošću partikula masnog tkiva na poprečnom preseku ISK koja je utvrđena tokom senzorske analize ovih proizvoda, odnosno sa većim sadržajem masti i suve materije koje su utvrđene u gotovom proizvodu industrijskog porekla (tabela 13). U prilog ovoj konstataciji idu navodi Papadima i Bloukas (1999), koji ističu da fermentisane kobasice sa većim sadržajem ukupnih masti u nadevu i manjim sadržajem vlage, imaju veću L^* vrednost, kao i udeo žute boje na poprečnom preseku. Vuković i sar. (2012) su utvrdili sličnu L^* vrednost na poprečnom preseku lemeškog kulena, ističući da je L^* vrednost slatkog lemeškog kulena ($33,74 \pm 21,40$) bila veća od L^* vrednosti ljutog ($31,86 \pm 0,74$). Slične rezultate utvrdili su Živković i sar. (2011) kod sremske kobasice, Kovačević i sar. (2010) kod slavonskog kulena, kao i Ikonić i sar. (2010) i Škaljac (2014) tokom ispitivanja petrovačke kobasice. U Tehnološkom elaboratu o petrovačkoj kobasici Petrović i sar. (2007) navode da proizvod u momentu konzumiranja treba da ima svetloću boje u intervalu od 32 do 37, a obzirom da je u pitanju sremskom kulenu srodan proizvod, može se reći da su utvrđene L^* vrednosti na poprečnim prescima ISK i TSK optimalne. Sa druge strane, Škaljac (2014) predlaže da u obzir treba uzeti samo gornju granicu ($L^* \leq 37$), jer vrednosti niže od 32 mogu biti posledica manjeg sadržaja masti ili dužeg procesa sušenja i zrenja, što može rezultirati boljim senzorskim kvalitetom i poželjnijim senzorskim karakteristikama sa aspekta prihvatljivosti od strane potrošača, ako je zadovoljen kriterijum za pH vrednost. Utvrđene prosečne L^* vrednosti poprečnog preseka ISK i TSK bile su uglavnom manje od svetloće boje koja je utvrđena na poprečnom preseku tradicionalnih proizvoda istog tipa iz drugih zemalja (Dellaglio i sar.,

1996; Ansorena i sar., 1997; Papadima i Bloukas, 1999; Gimeno i sar., 2000; Muguerza i sar., 2001; Rubio i sar., 2008; Elías i Carrascosa, 2010; Casquete i sar., 2011).

Udeo crvene boje je veoma važan parametar boje preseka fermentisanih kobasica. Prema podacima iz literature, najznačajniji uticaj na udeo crvene boje poprečnog preseka tradicionalnih fermentisanih kobasica ima crvena začinska paprika koja se dodaje pri izradi nadeva ovih proizvoda (Petrović i sar., 2010; Ikonić i sar., 2010; Vuković i sar., 2012; Roblík i sar., 2013). Kao začín sa dobrim antioksidativnim karakteristikama i malim redoks potencijalom, paprika povoljno utiče na formiranje poželjne crvene boje tradicionalnih fermentisanih kobasica, s obzirom da sadrži karotenoide (karoteni i ksantofili). Nitrati iz paprike, takođe, doprinose formiranju boje ovih proizvoda, s obzirom da ih bakterije redukuju do nitrita koji, iako stvoreni u maloj količini, sa mioglobinom mogu da grade stabilan pigment nitrozilmioglobin (Vuković i sar., 2012). Međutim, u proizvodnji industrijskog i tradicionalnog proizvoda iz ovog istraživanja upotrebljena je ista vrsta i količina crvene začinske paprike, a analizom rezultata utvrđeno je da je ISK imao značajno veću prosečnu a^* vrednost na poprečnom preseku od TSK ($P < 0,001$). Ovaj nalaz se može dovesti u vezu sa samim tokom zrenja, s obzirom da je proces fermentacije kod industrijskog proizvoda bio intenzivniji, što je za posledicu imalo brži pad pH vrednosti koji je pogodovao stvaranju stabilne crvene boje proizvoda. Takođe, nalaz značajno veće koncentracije rezidualnih nitrita u gotovom proizvodu industrijskog porekla (tabela 13), ukazuje na intenzivni proces redukcije nitrata u nitrite koji sa mioglobinom grade nitrozilmioglobin, pigment crvene boje. Nitrozilmioglobin nastaje kada pH dostigne vrednost od 5,4 do 5,5, a optimalne uslove za njegovo formiranje stvaraju mikroaerofilne bakterije koje troše kiseonik i snižavaju oksidoredukcioni potencijal.

Međutim, manje vrednosti udela crvene boje na preseku fermentisanih kobasica u čijoj se proizvodnji kao dodatak koristi crvena začinska paprika ne moraju ukazivati na senzorsko manje prihvatljivu boju proizvoda, jer je veoma bitan udeo žute boje, kao i karakteristike same boje (Škaljac, 2014). Analizom rezultata utvrđeno je da je ISK imao i značajno veću prosečnu b^* vrednost na poprečnom preseku od TSK ($P < 0,001$), što nije poželjna karakteristika. Žuta boja nastaje usled diskolorativnih promena crvene začinske paprike i samih komponenata nadeva tokom procesa zrenja (Fernández-López i sar., 2002). Prema Papadima i Bloukas (1999), veći sadržaj ukupnih masti u nadevu i manji sadržaj vlage su u korelaciji sa većim vrednostima udela žute boje na poprečnom preseku fermentisanih kobasica, što je u saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije. Prosečne vrednosti

udela crvene i žute boje na poprečnom preseku ISK i TSK bile su slične vrednostima ovih parametara koje su utvrđene tokom ispitivanja sremske kobasice (Živković i sar., 2011), lemeškog kulena (Vuković i sar., 2012), petrovačke kobasice (Škaljac, 2014), kao i tradicionalnih fermentisanih kobasica poreklom iz drugih zemalja (Ansorena i sar., 1997; Fernández-Fernández i sar., 1998; Gimeno i sar., 2000; Muguertza i sar., 2001; Casaburi i sar., 2007; Elías i Carrascosa, 2010; Kovačević i sar., 2010).

Da bi se preciznije definisala boja poprečnog preseka ISK i TSK, pored instrumentalnih parametara boje određeni su i sledeći pokazatelji boje: nijansa boje, relativni odnos crvene i žute boje, zasićenost boje, kao i indeks braon boje. Analizom rezultata, statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu nijanse boje i relativnog odnosa crvene i žute boje na poprečnom preseku ispitanih proizvoda ($P > 0,05$). Utvrđene vrednosti za nijansu boje na preseku ispitanih proizvoda ukazuju na zastupljenost crvenih nijansi boje i kod jednog i kod drugog proizvoda, što je poželjna karakteristika. Na poprečnom preseku industrijskog proizvoda utvrđene su značajno veće vrednosti za zasićenost boje i indeks braon boje nego na poprečnom preseku tradicionalnog proizvoda ($P < 0,001$). Veća vrednost indeksa braon boje utvrđena kod industrijskog proizvoda ukazuje na izražene oksidativne promene pigmenta crvene boje poreklom iz mišićnog tkiva ili iz papike (Škaljac, 2014). Ova pojava negativno utiče na opšti utisak o boji poprečnog preseka proizvoda. Tokom ispitivanja petrovačkih kobasica proizvedenih u različitim uslovima, Škaljac (2014) je utvrdila da su eksperimentalne grupe kobasica sa manjim vrednostima za nijansu boje i indeks braon boje, kao i većim relativnim odnosom crvene i žute boje, bile bolje ocenjene od strane senzoričara, iako su imale manji udeo crvene boje. Upravo ove grupe kobasica (B1 i B2) imale su slične karakteristike boje kao i TSK iz ovog istraživanja koji je tokom senzorske analize dobio veću ocenu za boju i održivost boje od ISK.

6.4.3. Instrumentalni parametri teksture

Tekstura fermentisanih kobasica je senzorsko svojstvo koje se formira tokom zrenja kao rezultat balansa između procesa koji doprinose formiranju čvršće konzistencije i procesa proteolize koji dovodi do omekšavanja i bolje žvakljivosti proizvoda (Barbut, 2007). Kompaktnost nadeva, odnosno čvrsta konzistencija fermentisanih kobasica formira se postepeno tokom zrenja istih. Kada pH nadeva dostigne vrednost izolektrične aktomiozina (pH=5,3) proteini miofibrila prelaze iz stanje sola u gel stanje, pri čemu se komadići mesa međusobno slepljuju (González-Fernández i sar., 2006; Spaziani i sar., 2009; Vasilev, 2010).

Proces geliranja prati izdavanje vode iz strukture proteina, odnosno sinereza, koja doprinosi formiranju čvršće konzistencije proizvoda. Rezultati ove studije pokazuju da je čvrstoća, odnosno maksimalna sila potrebna za kompresiju uzorka, bila značajno veća kod industrijskog proizvoda nego kod proizvoda tradicionalnog porekla ($P < 0,01$). Čvrstoća fermentisanih kobasica zavisi od sastava proizvoda, odnosno upotrebene količine mesa i masnog tkiva tokom izrade nadeva, fizičko-hemijskih procesa koji se odvijaju tokom zrenja, kao i dužine samog zrenja (Vasilev, 2010). Prema podacima iz literature, fermentisane kobasice sa manjim procentom masnog tkiva su čvršće (García i sar., 2002; Salazar i sar., 2009; Olivares i sar., 2010). S obzirom da su oba proizvoda iz ove studije pravljena prema istoj recepturi, količina upotrebljenog mesa, odnosno masnog tkiva nije uzrok utvrđene razlike u tvrdoći između istih. Tokom fermentacije industrijskog proizvoda utvrđen je nagli pad pH vrednosti do izoelektrične tačke aktomiozina, što je iniciralo povezivanje nadeva i ubrzalo proces sušenja proizvoda, s obzirom da se pH i sposobnost vezivanja vode mesa nalaze u pozitivnoj korelaciji (Honikel i Hamm, 1994). Sa druge strane, pH vrednosti tradicionalnog proizvoda se postepeno smanjivala, pa su se i procesi koji doprinose čvrstoći proizvoda sporije odvijali. Nakon fermentacije, sušenje je glavni faktor koji utiče na povezivanje i reološke osobine nadeva (González-Fernández i sar., 2006). Skupljanje nadeva koje doprinosi povećanju čvrstoće proizvoda je proporcionalno gubitku vode tokom sušenja (Spaziani i sar., 2009). Na kraju zrenja, kod ISK utvrđen je veći kalorijski sadržaj i manji sadržaj vlage nego kod TSK, što objašnjava utvrđenu razliku u čvrstoći između ispitanih proizvoda. Sa druge strane, statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu elastičnosti i kohezivnosti ($P > 0,05$). Elastičnost se definiše kao brzina kojom se deformisani uzorak vraća u prvobitno stanje nakon prestanka dejstva sile, dok kohezivnost predstavlja snagu unutrašnjih veza uzorka (Jokanović i sar., 2017). Merenjem instrumentalnih parametara teksture, utvrđena je značajno veća vrednost za žvkljivost kod industrijskog proizvoda ($P < 0,05$). Žvkljivost se definiše kao rad potreban da se uzorak pripremi za gutanje. Stoga, proizvodi sa čvršćom konzistencijom, manjim sadržajem vlage i masnog tkiva imaju veće vrednosti za žvkljivost (Olivares i sar., 2010). Manja vrednost za žvkljivost utvrđena kod tradicionalnog proizvoda je u saglasnosti sa rezultatima senzorske analize, s obzirom da je ovaj proizvod dobio veću ocenu za teksturu od industrijskog proizvoda jer je bio sočniji tokom žvakanja.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja ove studije pokazuju da su najbrojniji mikroorganizmi tokom zrenja industrijskog (ISK) i tradicionalnog (TSK) sremskog kulena bile bakterije mlečne kiseline BMK praćene mikrokokama i enterokokama. Bakterije iz familija *Pseudomonadaceae* i *Enterobacteriaceae* su izmrle do kraja zrenja, dok patogeni mikroorganizmi, kao što su *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, nisu izolovani ni u jednoj fazi mikrobiološkog ispitivanja industrijskog i tradicionalnog proizvoda iz ove studije.
2. Od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz ISK, 137 izolata (76,11%) je identifikovano kao *Lactobacillus sakei*, 18 (10%) kao *Lactobacillus curvatus*, 5 (2,78%) kao *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*, 2 (1,11%) kao *Lactobacillus paraplantarum* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, dok 16 izolata (8,89%) nije identifikovano. Sa druge strane, od ukupno 180 izolata BMK poreklom iz TSK, 161 izolat (89,64%) je identifikovan kao *Lactobacillus sakei*, 13 (7,22%) kao *Lactobacillus curvatus* i 2 (1,11%) kao *Leuconostoc mesenteroides*, a 4 izolata (2,22%) nije identifikovano.
3. Dinamika promene pH vrednosti ISK i TSK je odgovarala vrsti proizvoda, a na kraju zrenja je iznosila $5,64 \pm 0,03$ odnosno $5,46 \pm 0,02$, što ukazuje na odgovarajuću zrelost oba proizvoda i u skladu je sa zahtevima propisa koji definiše kvalitet proizvoda od mesa, kao i elaborata o zaštiti geografskog porekla sremskog kulena.
4. Tokom zrenja ISK i TSK došlo je do značajnog sušenja proizvoda. Posledično je kod ISK utvrđen kalo sušenja od 54,71% i a_w vrednost od $0,800 \pm 0,01$, dok je kod TSK kalo sušenja iznosio 53,14%, a a_w vrednost $0,815 \pm 0,00$. Utvrđene niske a_w vrednosti ukazivale su na mikrobiološku stabilnost proizvoda.
5. ISK i TSK ispunjavaju zahteve propisa koji definiše kvalitet proizvoda od mesa, kao i elaborata o zaštiti geografskog porekla sremskog kulena u pogledu sadržaja vlage (<35 %), masti (ISK= $29,00 \pm 0,72\%$; TSK= $26,21 \pm 4,37\%$), proteina mesa (ISK= $36,10 \pm 1,21\%$; TSK= $36,46 \pm 1,21\%$), kao i sadržaja kolagena u proteinima mesa (ISK= $6,18 \pm 0,41\%$; TSK ($5,27 \pm 0,71\%$)).
6. Proces oksidacije slobodnih masnih kiselina tokom zrenja ISK i TSK nije bio izražen, tako da je kiselinski broj u proizvodu iz industrijske proizvodnje iznosio $3,45 \pm 0,58$ mg KOH/g, a iz tradicionalne proizvodnje $2,39 \pm 0,20$ mg KOH/g

- ($P < 0,01$), odnosno TBARS vrednost je kod industrijskog proizvoda iznosila $0,11 \pm 0,02$ mg MDA/kg, a kod tradicionalnog $0,11 \pm 0,04$ mg MDA/kg, što ukazuje na oksidativnu stabilnost oba proizvoda.
7. Proces proteolize se odvijao sličnom dinamikom kod oba proizvoda, tako da je indeks proteolize na početku proizvodnje iznosio $10,03 \pm 0,30$ % (ISK) odnosno $10,15 \pm 0,84$ % (TSK) i u toku zrenja dostigao vrednosti od $18,36 \pm 0,86$ % (ISK), odnosno $17,97 \pm 0,37$ % (TSK) što je značajno kao pokazatelj stepena zrelosti proizvoda.
 8. Tokom zrenja, značajno veća akumulacija biogenih amina utvrđena je u ISK ($1263,16$ mg/kg) nego u TSK ($410,83$ mg/kg). Triptamin i fenietilamin su detektovani u svakoj ispitanoj fazi zrenja eksperimentalnih proizvoda. Sadržaj tiramina, kadaverina i putrescina se povećavao tokom zrenja oba proizvoda. Na kraju zrenja sadržaj histamina u ISK iznosio je $12,36 \pm 1,72$ mg/kg, a u TSK $16,55 \pm 5,22$ mg/kg, pri čemu utvrđene koncentracije histamina nisu bile zabrinjavajuće sa aspekta bezbednosti proizvoda.
 9. ISK i TSK ispunjavaju zahteve elaborata o zaštiti geografskog porekla sremskog kulena u pogledu senzornih svojstava, a s obzirom da je prosečna ponderisana ocena ukupnog senzornog kvaliteta za ISK iznosila $96,43 \pm 2,88$, a za TSK $95,36 \pm 1,14$, može se zaključiti da su u pitanju proizvodi visokog kvaliteta.
 10. Instrumentalnim ispitivanjem boje površine utvrđeno je da je ISK bio značajno svetliji ($L^*_{ISK} = 30,13 \pm 0,29$; $L^*_{TSK} = 27,25 \pm 0,43$) i imao veći udeo crvene ($a^*_{ISK} = 7,05 \pm 0,32$; $a^*_{TSK} = 6,07 \pm 0,97$) i žute boje ($b^*_{ISK} = 9,17 \pm 0,36$; $b^*_{TSK} = 8,13 \pm 0,71$). Isto tako, boja preseka ISK je bila svetlija ($35,71 \pm 0,91$) sa većim udelom crvene ($23,99 \pm 0,60$) i žute boje ($18,08 \pm 0,99$) nego kod TSK ($L^* = 32,65 \pm 0,44$; $a^* = 18,26 \pm 1,36$; $b^* = 13,04 \pm 0,72$). Međutim, statistički značajna razlika između ISK i TSK nije utvrđena u pogledu nijanse boje, kao i relativnog odnosa crvene i žute boje ($P > 0,05$).
 11. Merenjem instrumentalnih parametara teksture, utvrđena je značajno veća vrednost za čvrstoću (12796 ± 1475 g) i žvkljivost ($3178 \pm 321,7$ g) kod ISK, nego kod TSK (čvrstoća = 10048 ± 1197 g; žvkljivost = $2675 \pm 395,7$ g), dok statistički značajna razlika nije utvrđena u pogledu elastičnosti i kohezivnosti između ISK i TSK ($P > 0,05$).

12. Uz poštovanje tradicionalnih normi, industrijska proizvodnja sremskog kulena može da obezbedi kvalitetan proizvod sa prepoznatljivim senzornim osobinama, kao i tradicionalna proizvodnja u seoskim domaćinstvima. Pored toga, ovakav način proizvodnje doprineo bi očuvanju kvaliteta i autentičnosti sremskog kulena, kao i bezbednosti proizvoda.

8. LITERATURA

1. Alvarez, M. A. & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology* 39(2), 146-155.
2. Ansorena, D., Montel, M. C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., ... & Demeyer, D. (2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61(2), 141-147.
3. Ansorena, D., & Astiasaran, I. (2004). Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. *Meat science*, 67(2), 237-244.
4. Ansorena, D., De Pena, M.P., Astiasarán, I., Bello, J. (1997). Colour Evaluation of Chorizo de Pamplona, a Spanish Dry Fermented Sausage: Comparison Between the CIE L*a*b* and the Hunter Lab Systems with Illuminants D65 and C. *Meat Science*, 46, 3, 313-318.
5. Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., & Clementi, F. (2016). Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview. *International Food Research Journal*, 23(2).
6. Aro, J. M. A., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K. I., Fukushima, M., & Sekikawa, M. (2010). The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry*, 119(1), 279-285.
7. Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., & Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4583-4594.
8. Baltić Ž.M., & Karabasil, N. (2011). Kontrola namirnica animalnog porekla. *Veterinarska komora Srbije*.
9. Barbut, S. (2007). Texture. In: *Handbook of fermented meat and poultry* (Toldrá, F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Nip, W.K., Sebranek, J.G., Silveira, E.T.F., Stahnke L.H., Talon R., ur.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

10. Bargossi, E., Tabanelli, G., Montanari, C., Lanciotti, R., Gatto, V., Gardini, F., & Torriani, S. (2015). Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression. *Frontiers in Microbiology* 6: 259.
11. Berardo, A., Devreese, B., De Maere, H., Stavropoulou, D. A., Van Royen, G., Leroy, F., & De Smet, S. (2017). Actin proteolysis during ripening of dry fermented sausages at different pH values. *Food chemistry*, 221, 1322-1332.
12. Bonomo, M. G., Ricciardi, A., Zotta, T., Parente, E., & Salzano, G. (2008). Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*, 80(4), 1238-1248.
13. Bover-Cid, S., Miguelez-Arrizado, M. J., Moratalla, L. L. L. & Carou, M. C. V. (2006). Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Science* 72(1): 62-68.
14. Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M. C. (1999). Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science* 51(4): 305-311.
15. Bunčić, S., Paunović, L. J., Teodorović, V., Radišić, D., Vojinović, G., Smiljanić, D., & Baltić, M. (1993). Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 17(4): 303-309.
16. Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., ... & Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical biochemistry*, 44(1), 104-109.
17. Casaburi, A., Aristoy, M.C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, 76(2), 295-307.
18. Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., & Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*, 25(2), 335-347.

19. Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, J. J., Córdoba, M. G. (2011). Role of an autochthonous starter culture and the protease EPg222 on the sensory and safety properties of a traditional Iberian dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Microbiology*, 28, 1432-1440.
20. Champomier-Vergès, M. C., & Zagorec, M. (2015). *Lactobacillus sakei* in meat fermentation. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 209-215.
21. Chen, Q., Kong, B., Han, Q., Xia, X., & Xu, L. (2017). The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavour development. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 389-396.
22. Chen, Q., Liu, Q., Sun, Q., Kong, B., & Xiong, Y. (2015). Flavour formation from hydrolysis of pork sarcoplasmic protein extract by a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage. *Meat science*, 100, 110-117.
23. Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P. and Schrenzel, J. (2010) Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 48, 1169–1175.
24. Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., Urso, R., Cantoni, C., & Comi, G. (2009). Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science*, 82(1), 125-132.
25. Čobanović, N.(2018). Pre-mortem uslovi i kvalitet mesa svinja. Doktorska disertacija. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
26. Danilović, B., Joković, N., Petrović, L., Veljović, K., Tolinački, M., & Savić, D. (2011). The characterisation of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovska Klobasa). *Meat Science*, 88(4), 668-674.
27. Dellaglio, S., Casiraghi, E., Pompei, C. (1996). Chemical, physical and sensory attributes for the characterization of an Italian dry-cured sausages. *Meat Science*, 42, 25-32.
28. De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 13(4), 194-199.

-
29. Dimitrijevic, M., Stefanovic, S., Karabasil, N., Vasilev, D., Cobanovic, N., Ilic, N., & Djordjevic, V. (2016). UPLC-MS/MS determination of histamine levels in canned fish collected from Belgrade retail markets. *Meat Technology* 57(1): 51-60.
 30. Doan, N. T. L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh, B., & Vandamme, P. (2012). Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in applied microbiology*, 55(4), 265-273.
 31. Dokmanović, M., Baltić, Ž., Marković, R., Bošković, M., Lončina, J., Glamočlija, N., & Đorđević, M. (2014). Relationships among pre-slaughter stress, rigor mortis, blood lactate, and meat and carcass quality in pigs. *Acta Veterinaria-Beograd*, 64(1), 124-137.
 32. Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology*, 157(2), 130-141.
 33. Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69(2), 307-317.
 34. Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International journal of food microbiology*, 159(2), 107-114.
 35. Eerola, H. S., Roig Sagues, A. X., & Hirvi, T. K. (1998). Biogenic amines in Finnish dry sausages. *Journal of Food Safety* 18: 127-138.
 36. Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., & Hirvi, T. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International* 76: 575-577.
 37. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393.
 38. Elías, M., & Carrascosa, A.V. (2010). Characterisation of the Paio do Alentejo, a traditional Portuguese Iberian sausage, in respect to its safety. *Food Control*, 21(1), 97-102.

39. European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union, L388, 1-26.
40. Fadda, S., López, C., & Vignolo, G. (2010). Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat science*, 86(1), 66-79.
41. Fernández-Fernández, E., Vázquez-Odériz, M.L., Romero-Rodríguez, M.A. (1998). Colour changes during manufacture of Galician chorizo sausage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 207, 18–21.
42. Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J.A., Sayas-Barberá, E., López-Santoveña, F. (2002). Effect of Paprika (*Capsicum annum*) on Color of Spanish-type Sausages During the Resting Stage. *Journal of Food Science* , 67, 6, 2410-2414.
43. Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., & Pérez-Alvarez, J.A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 80(2), 410-417.
44. Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., Monteiro, M.J., Hogg, T., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2007). Chemical and microbiological characterisation of “Salpicão de Vinhais” and “Chouriça de Vinhais”: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food Microbiology*, 24(6), 618-623.
45. Flores, J., Marcus, J. R., Nieto, P., & Navarro, J. L. (1997). Effect of processing conditions on proteolysis and taste of dry-cured sausages. *Zetischrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 204, 168–172.
46. Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., & Carballo, J. (2013). Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food microbiology*, 33(1), 77-84.
47. Fontán, M.C, Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I., & Carballo, J. (2007). Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*, 24(1), 52-58.
48. Fontana, C., Bassi, D., López, C., Pisacane, V., Otero, M.C., Puglisi, E., Rebecchi, A., Cocconcelli, P.S., & Vignolo, G. (2016). Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 17-25.

49. Fontana, C., Cocconcelli, P.S., & Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 103(2), 131-142.
50. Fontana, C., Gazzola, S. I. M. O. N. A., Cocconcelli, P. S., & Vignolo, G. (2009). Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. *Letters in applied microbiology*, 49(3), 411-414.
51. Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2018). Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International journal of food microbiology*, 279, 26-32.
52. Fuentes, V., Estévez, M., Ventanas, J., & Ventanas, S. (2014). Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages. *Food Chemistry*, 147, 70-77.
53. Gallego, M., Mora, L., Escudero, E., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides and free amino acids profiles in different types of European dry-fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 276, 71-78.
54. García, M. L., Domínguez, R., Galvez, M. D., Casas, C., & Selgas, M. D. (2002). Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Science*, 60, 227–236.
55. Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G. & Özogul, F. (2016). Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology* 7: 1218.
56. Gerner, E. W., & Meyskens Jr, F. L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 781.
57. Gimeno, O., Ansorena, D., Astiasaran I., Bello, J. (2000). Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. *Food Chemistry*, 69,195– 200.
58. Gómez, M., & Lorenzo, J. M. (2013). Effect of fat level on physicochemical, volatile compounds and sensory characteristics of dry-ripened “chorizo” from Celta pig breed. *Meat Science*, 95(3), 658-666.
59. Gonzalez-Fernandez, C., Santos, E. M., Rovira, J., & Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74, 467–475.

-
60. Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42-49.
 61. Hammes, W. P., & Knauf, H. J. (1994). Starters in the processing of meat products. *Meat science*, 36(1-2), 155-168.
 62. Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(10): 3097-3101.
 63. Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2098-2102.
 64. Holck, A. L., Axelsson, L., Rode, T. M., Høy, M., Måge, I., Alvseike, O., ... & Heir, E. (2011). Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. *Meat science*, 89(3), 286-295.
 65. Holck, A., Axelsson, L., McLeod, A., Rode, T. M. & Heir, E. (2017). Health and safety considerations of fermented sausages. *Journal of Food Quality* 2017: 1-25.
 66. Holland, D.C. (1971). Determination of malonaldehyde as an index of rancidity in nut meats. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 54(5), 1023.
 67. Honikel, K. O. & Hamm, R. (1994). Measurement of water-holding capacity and juiciness. In *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products* (pp. 125-161). Springer US.
 68. Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 1 – 2, 68 – 76.
 69. Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 223-233.
 70. Ignatenko, N. A., Besselsen, D. G., Roy, U. K. B., Stringer, D. E., Blohm-Mangone, K. A., Padilla-Torres, J. L., ... & Gerner, E. W. (2006). Dietary putrescine reduces the intestinal anticarcinogenic activity of sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Nutrition and cancer*, 56(2), 172-181.
 71. Ikonić, P. (2013). Razvoj procesa sušenja i zrenja tradicionalne fermentisane kobasice (Petrovska klobasa) u kontrolisanim uslovima. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom sadu.

-
72. Ikonić, P., Petrović, Lj., Tasić, T., Džinić, N., Jokanović, M., Tomović, V. (2010). Physicochemical, biochemical and sensory properties for the characterization of Petrovska klobasa (traditional fermented sausage). *Acta Periodica Technologica*, 41, 19- 31.
73. Ikonić, P., Tasić, T., Petrović, L., Škaljac, S., Jokanović, M., Mandić, A., & Ikonić, B. (2013). Proteolysis and biogenic amines formation during the ripening of Petrovska klobasa, traditional dry-fermented sausage from Northern Serbia. *Food Control* 30(1): 69-75.
74. Ikonić, P.M., Petrović, L.S., Tasić, T.A., Džinić, N.R., Jokanović, M.R., & Tomović, V.M. (2010). Physicochemical, biochemical and sensory properties for the characterisation of Petrovska klobasa (traditional fermented sausage). *Acta Periodica Technologica*, 41, 19-31.
75. Izmena i dopuna Elaborata o zaštiti geografskog porekla „Sremski kulen”. (2013). <http://www.mpzss.gov.rs/izmena-i-dopuna-elaborata-o-zastiti-oznake-geografskog-porekla-sremski-kulen/>
76. ISO 11290-1:1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, (1996).
77. ISO 21807:2004 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Determination of water activity. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, (2004).
78. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
79. ISO 6564:1985. Sensory analysis - Methodology -Flavour profile methods. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
80. ISO 8586-2:2008. Sensory analysis - General guidance for the selection, training and monitoring of assessors - Part 2: Expert sensory assessors. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
81. Janßen, D., Eisenbach, L., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2018). Assertiveness of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* in a fermented sausage model. *International journal of food microbiology*.
-

82. Jokanovic, M., Ikonic, P., Skaljac, S., Tasic, T., Tomovic, V., Sojic, B., ... & Dzinic, N. (2017). Proteolysis and texture profile of traditional dry-fermented sausage as affected by primary processing method. *Scientific journal "Meat Technology"*, 58(2), 103-109.
83. Kalac, P. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open)*, 7(2).
84. Karolyi, D., Salajpal, K., Luković, Z., & Kovačić, D. (2010). Physicochemical, hygienic and organoleptic characterisation of Slavonian Kulen, a traditional pork sausage from eastern Croatia. In 7th International Symposium on Mediterranean Pig.
85. Karsloğlu, B., Çiçek, Ü. E., Kolsarici, N., & Candoğan, K. (2014). Lipolytic changes in fermented sausages produced with turkey meat: effects of starter culture and heat treatment. *Korean journal for food science of animal resources*, 34(1), 40.
86. Komprda, T., Sládková, P., & Dohnal, V. (2009). Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat Science* 83(3): 534-542.
87. Komprda, T., Smělá, D., Pechová, P., Kalhotka, L., Štencl, J., & Klejdus, B. (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat science*, 67(4), 607-616.
88. Kovačević, D., Mastanjević, K., Šubarić, D., Jerković, I., & Marijanović, Z. (2010). Physico-chemical, colour and textural properties of Croatian traditional dry sausage (Slavonian Kulen). *Meso*, 12(5), 270-275.
89. Kuley, E., & Özogul, F. (2011). Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food chemistry*, 127(3), 1163-1168.
90. Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & A Alvarez, M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156.
91. Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiology* 30: 132–138.

92. Laranjo, M., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Fraqueza, M.J., & Elias, M. (2015). Effects of genotype, salt content and calibre on quality of traditional dry-fermented sausages. *Food Control*, 56, 119-127.
93. Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M. E., Cabrita, M. J., Garcia, R., & Elias, M. (2017). Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. *Food Chemistry* 218: 129-136.
94. Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T. & Vidal-Carou, M. C. (2014). Amino acid availability as an influential factor on the biogenic amine formation in dry fermented sausages. *Food Control* 36(1): 76-81.
95. Latorre-Moratalla, M. L., Comas-Basté, O., Bover-Cid, S., & Vidal-Carou, M. C. (2017). Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food and Chemical Toxicology* 99: 78-85.
96. Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, T., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Patarata, L., Drosinos, E. H., & Laukova, A. (2008). Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry* 107(2): 912-921.
97. Latorre-Moratalla, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2012). Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Frontiers in microbiology*, 3, 169.
98. Latorre-Moratalla, M.L, Bover-Cid, S., Aymerich, T., Marcos, B., Vidal-Carou, M.C., & Garriga, M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*, 75(3), 460-469.
99. Lawrie, R.A., Ledward, D.A. (2006). *Lawrie's meat science*, seventh edition. Abington, Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
100. Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J. P., Bover-Cid, S., ... & Talon, R. (2007). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat science*, 76(1), 112-122.
101. Leistner, L. (1986). Allgemeines über Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, 66(3), 290-300.
102. Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181-186.

103. Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3), 270-285.
104. Lorenzo, J. M., Cachaldora, A., Fonseca, S., Gómez, M., Franco, I., & Carballo, J. (2010). Production of biogenic amines “in vitro” in relation to the growth phase by *Enterobacteriaceae* species isolated from traditional sausages. *Meat Science* 86: 684–691.
105. Lorenzo, J. M., Franco, D., & Carballo, J. (2017). Biogenic Amines in Fermented Meat Products. *Fermented Meat Products: Health Aspects*.
106. Lorenzo, J. M., Martínez, S., Franco, I., & Carballo, J. (2008). Biogenic amine content in relation to physico-chemical parameters and microbial counts in two kinds of Spanish traditional sausages. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 59(2): 70-75.
107. Lu, S., Xu, X., Zhou, G., Zhu, Z., Meng, Y., & Sun, Y. (2010). Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control*, 2: 444-449.
108. Marcobal, A., De Las Rivas, B., Landete, J. M., Tabera, L., & Muñoz, R. (2012). Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(5), 448-467.
109. Mohedano, M. L., López, P., Spano, G., & Russo, P. (2015). Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 273-310).
110. Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R. (1999). Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sciences des Aliments (France)*.
111. Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J.G., Astiasaran, I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona — a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Science*, 59, 251 – 258.
112. Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75(7), R139-R150.

-
113. Nassu, R. T., Gonçalves, L. A. G., da Silva, M. A. A. P., & Beserra, F. J. (2003). Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science*, 63(1), 43-49.
114. Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat science*, 78(1-2), 77-89.
115. Olivares, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2009). Distribution of volatile compounds in lean and subcutaneous fat tissues during processing of dry fermented sausages. *Food research international*, 42(9), 1303-1308.
116. Olivares, A., Navarro, J. L., Salvador, A., & Flores, M. (2010). Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat science*, 86(2), 251-257.
117. Olivares, A., Navarro, J.L., & Flores, M. (2011). Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages. *Meat Science*, 87(3), 264-273.
118. Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & Hoz, L. D. L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical reviews in food science and nutrition*, 39(4), 329-367.
119. Papadima, S.N., Bloukas, J.G. (1999). Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Science*, 51, 103-113.
120. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*, 65(2), 859-867.
121. Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M. A., & Suzzi, G. (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6), 882-891.
122. Pérez-Alvarez, J. A., Sayas-Barberá, M. E., Fernández-López, J., Aranda-Catalá, V. (1999). Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research International*, 32, 599-607.
123. Petrović, Lj., Džinić, N., Tomović, V., Ikonić, P., Tasić, T. (2007). Tehnološki Elaborat o načinu proizvodnje i specifičnim karakteristikama proizvoda Petrovska klobása (Petrovačka kobasica). Rešenje o registraciji oznake geografskog porekla
-

- Petrovska klobasa (Petrovačka kobasica) kao IMENA POREKLA za suvomesnati proizvod fermentisanu kobasicu, broj: 9652/06 Γ-03/06, 21. 05. 2007. godine, Republika Srbija, Zavod za intelektualnu svojinu.
124. Petrović, Lj., Savatić, S., Džinić, N., Ikonić, P., Tomović, V., Tasić, T., Šojić, B., Jokanović, M. (2010). Color changes of traditional fermented dry sausage (Petrovska Klobasa) during smoking and drying under controlled conditions. Proc. 2nd Workshop "Feed-to-Food" – XII International Meat Technology Symposium "NODA 2010", "Meat technology, quality and safety", Novi Sad, 117-125.
125. Pircher, A., Bauer, F., & Paulsen, P. (2007). Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 225-231.
126. Pisacane, V., Callegari, M. L., Puglisi, E., Dallolio, G., & Rebecchi, A. (2015). Microbial analyses of traditional Italian salami reveal microorganisms transfer from the natural casing to the meat matrix. *International journal of food microbiology*, 207, 57-65.
127. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, 94/2015).
128. Pravilnika o kvalitetu zaklanih svinja i kategorizaciji svinjskog mesa (Sl. glasnik RS, 2/85 i 12/85).
129. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS, 29/2014).
130. Radetić, P. (1997). *Sirove kobasice*. Autor, Beograd.
131. Radovčić, N.M., Ćurić, T., Kušec, G., Janči, T., Vidaček, S., & Medić, H. (2016). Effect of ripening period and different meat quality on the physico-chemical properties of "Baranja kulen". *Radovi Poljoprivrednog Fakulteta Univerziteta u Sarajevu (Works of the Faculty of Agriculture University of Sarajevo)*, 61(66 (1)), 160-163.
132. Radovčić, N.M., Heleš, S., Vidaček, S., Petrak, T., & Medić, H. (2014). Fat content, fatty acid composition and lipid oxidation in industrial and traditional Baranja kulen. *Meso*, 16(3), 265-269.

133. Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 255-267.
134. Rantsiou, K., Drosinos, E.H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichardt, J., Tóth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G., & Cocolin, L. (2005). Molecular characterisation of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, 22(1), 19-28.
135. Rocha, J. M., & Elias, M. N. (2016). Quality improvement of traditional dry fermented sausages based on innovative technological strategies. *BAOJ Nutrition*, 2(3), 016.
136. Rohlík, B. A., Pipek, P., Pánek, J. (2013). The effect of natural antioxidants on the colour and lipid stability of paprika salami. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 307–312.
137. Roseiro, L. C., Gomes, A., Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1340–1345.
138. Roseiro, C., Santos, C., Sol, M., Silva, L., & Fernandes, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science*, 74(3), 557-563.
139. Rubio B., Martínez B., García-Cachán M.D., Rovina J., Jaime I. (2008). Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids. *Meat Science*, 80, 1182-1187.
140. Ruiz-Capillas, C., Colmenero, F. J., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2007). Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, 77(3), 365-371.
141. Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2005). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 44(7-8), 489-599.
142. Safa, H., Gatellier, P., Lebert, A., Picgirard, L., & Mirade, P.S. (2015). Effect of combined salt and animal fat reductions on physicochemical and biochemical changes during the manufacture of dry-fermented sausages. *Food Bioprocess Technology*, 8(10), 2109-2122.

143. Salazar, P., García, M. L., & Selgas, M. D. (2009). Short-chain fructooligosaccharides as potencial functional ingredient in dry fermented sausages with different fat levels. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1100–1107.
144. Salgado, A., Fontán, M.C., Franco, I., López, M., & Carballo, J. (2005). Biochemical changes during the ripening of Chorizo de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chemistry*, 92(3), 413-424.
145. Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International journal of food microbiology*, 29(2-3), 213-231.
146. Sauer, S., & Kliem, M. (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 74.
147. Shah, P., & Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular microbiology*, 68(1), 4-16.
148. Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29: 675-690.
149. Siamansouri, M., Mozaffari, S., & Alikhani, F. E. (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *Journal of Biology*, 2(5), 227-234.
150. Simion, A. M. C., Vizireanu, C., Alexe, P., Franco, I., & Carballo, J. (2014). Effect of the use of selected starter cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety. *Food Control*, 35(1), 123-131.
151. Sinell, H. J. (1978). Biogene Amine als Risikofaktoren in der Fischhygiene. *Archiv Fur Lebensmittel-Hygiene* 29: 206–210.
152. Singh, V. P., Pathak, V., & Verma, A. K. (2012). Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines—a review. *American Journal of food technology*, 7(5), 278-288.
153. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791.
154. Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., ... & Rattray, F. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European journal of clinical nutrition*, 64(S3), S95.

155. Spaziani, M., Del Torre, M., & Stecchini, M. L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Science*, 81, 71–85.
156. SRPS ISO 2917:2004. Meso i proizvodi od mesa - Merenje pH - Referentna metoda. Institut za standardizaciju Srbije.
157. SRPS ISO 1442:1998. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja vlage (Referentna metoda). Institut za standardizaciju Srbije.
158. SRPS ISO 1444:1998. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja slobodne masti. Institut za standardizaciju Srbije.
159. SRPS ISO 937:1992. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja azota (Referentna metoda). Institut za standardizaciju Srbije.
160. SRPS ISO 3496:2002. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja hidroksiprolina. Institut za standardizaciju Srbije.
161. SRPS ISO 936:1999. Meso i proizvodi od mesa. Određivanje ukupnog pepela. Institut za standardizaciju Srbije.
162. SRPS ISO 1841-1:1999. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja hlorida - Deo 1: Metoda po Volhardu. Institut za standardizaciju Srbije.
163. SRPS ISO 3091:1999. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja nitrata (Referentna metoda). Institut za standardizaciju Srbije.
164. SRPS ISO 2918:1999. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja nitrita (Referentna metoda). Institut za standardizaciju Srbije.
165. SRPS EN ISO 660:2011. Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje kiselinskog broja i kiselosti. Institut za standardizaciju Srbije.
166. SRPS EN ISO 3960:2011. Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje peroksidnog broja - Jodometrijsko (vizuelno) određivanje završne tačke. Institut za standardizaciju Srbije.
167. SRPS EN ISO 8589:2012. Senzorske analize - Opšte uputstvo za projektovanje prostorija za ispitivanje. Institut za standardizaciju Srbije.
168. Stadnik, J., & J Dolatowski, Z. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 9(3): 251-263.

-
169. Stanišić, N., Parunović, N., Petrović, M., Radović, Č., Lilić, S., Stajić, S., & Gogić, M. (2014). Changes in chemical and physicochemical characteristics during the production of traditional Sremska sausage. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 30(4), 705-715.
170. Suvajdžić, B., Petronijević, R., Teodorović, V., Tomović, V., Dimitrijević, M., Karabasil, N., & Vasilev, D. (2018). Qualität der Rohwurst Sremski Kulen Produktion unter traditionellen und industriellen Bedingungen in Serbien. *Fleischwirtschaft* 98(6): 93-99.
171. Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* 88(1): 41-54.
172. Šedo, O., Sedláček, I., & Zdráhal, Z. (2011). Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass spectrometry reviews*, 30(3), 417-434.
173. Škaljac, S. (2014). Uticaj različitih tehnoloških parametara na formiranje boje tradicionalne fermentisane kobasice (Petrovačka kobasica) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom sadu.
174. Šojić, B. (2013). Ispitivanje lipolitičkih i oksidativnih promena u tradicionalnoj fermentisanoj kobasici (Petrovačka kobasica) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
175. Talon, R., & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat science*, 89(3), 303-309.
176. Talon, R., Walter, D., & M. C. (2000). Growth and effect of staphylococci and lactic acid bacteria on unsaturated free fatty acids. *Meat Science*, 54(1), 41-47.
177. Tarladgis, B.G., Pearson, A.M., & Jun, L.R. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. II.—formation of the tba-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15(9), 602-607.
178. Tasić, T., Ikonić, P., Mandić, A., Jokanović, M., Tomović, V., Savatić, S., & Petrović, L. (2012). Biogenic amines content in traditional dry fermented sausage Petrovská klobása as possible indicator of good manufacturing practice. *Food Control* 23(1): 107-112.

-
179. Tasić, T., (2012). Formiranje biogenih amina u tradicionalnoj fermentisanoj kobasici (Petrovska klobasa) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
180. Teodorovic, V., Buncic, S., & Smiljanic, D. (1994). A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtschaft* 74: 170-172.
181. Teodorović, V., Dimitrijević, M., Karabasil, N., & Vasilev, D. (2015). Higijena i tehnologija mesa. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine. Naučna KMD.
182. Thalhammer, F. (2000). *Gekonnt Produzieren, Allgemeines und Wissenswertes aus der Praxis*. 2. Auflage, RAPS, Obertrum, Österreich.
183. Til, H. P., Falke, H. E., Prinsen, M. K., & Willems, M. I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3-4), 337-348.
184. Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, 67, 711–719.
185. Toldrá, F. (2002). Dry-cured meat products. pp. 1–238. Trumbull, CT: Food & Nutrition Press.
186. Toldrá, F. (2006a). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 17(4), 164-168.
187. Toldrá, F. (2006b). Biochemistry of Processing Meat and Poultry. In Y. H. Hui (Ed), *Food 395 Biochemistry and Food Processing*, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
188. Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395-404.
189. Tremonte, P., Sorrentino, E., Pannella, G., Tipaldi, L., Sturchio, M., Masucci, A., ... & Succi, M. (2017). Detection of different microenvironments and *Lactobacillus sakei* biotypes in Ventricina, a traditional fermented sausage from central Italy. *International journal of food microbiology*, 242, 132-140.
190. Vasilev, D., Aleksic, B., Tarbuk, A., Dimitrijevic, M., Karabasil, N., Cobanovic, N., & Vasiljevic, N. (2015). Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages Sremski and Lemeski kulen. *Procedia Food Science*, 5, 300-303.

-
191. Vasilev, D. (2010). Ispitivanje činilaca od značaja za bezbednost i kvalitet fermentisanih kobasica proizvedenih kao funkcionalna hrana. Doktorska disertacija. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
192. Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., & Bover-Cid, S. (2007). Biogenic amines: risks and control. Handbook of fermented meat and poultry, 455-468.
193. Vignolo, G., Fontana, C. Fadda, S. (2010). Semidry and Dry Fermented Sausages. In: Handbook of meat processing, edited by F. Toldrá (pp. 379-398). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.
194. Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., Yarchai, M., & Tapingkae, W. (2006). Changes in lipid composition and fatty acid profile of Nham, a Thai fermented pork sausage, during fermentation. Food Chemistry, 94(4), 580-588.
195. Vuković, I. (2012). Osnove tehnologije mesa. Četvrto izdanje, Veterinarska komora Srbije, Beograd.
196. Vuković, I., Saičić, S., & Vasilev, D. (2011). Contribution to knowledge of major quality parameters of traditional (domestic) kulen. Meat Technology, 52(1), 134-140.
197. Vuković, I., Vasilev, D., Saičić, S., & Bunčić, O. (2004). Microflora and physico-chemical parameters of the quality of kulen. Meat Technology, 45(3-4), 104-107.
198. Vuković, I., Vasilev, D., Saičić, S., & Ivanković, S. (2012). Investigation of major changes during ripening of traditional fermented sausage Lemeski kulen. Meat Technology, 53(2), 140-147.
199. Wunderlichová, L., Buňková, L., Koutný, M., Jančová, P., & Buňka, F. (2014). Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13(5): 1012-1030.
200. Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M. C. (2017). *Lactobacillus sakei*: a starter for sausage fermentation, a protective culture for meat products. Microorganisms, 5(3), 56.
201. Zanardi, E., Ghidin, S., Battaglia, A., & Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. Meat Science, 66, 415-423.
202. Zdolec, N., Dobranić, V., Horvatić, A., & Vučinić, S. (2013). Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages. International Food Research Journal, 20(1).

203. Zhao, J., Ji, Y., Kong, B., & Wang, W. (2010). The multi-analysis of changes in microflora and physiochemistry of the naturally dry fermented sausages produced during the processing. *Food Science and Technology*, 35, 137-140.
204. Živković, D., Tomović, V., Perunović, M., Stajić, S., Stanišić, N., Bogićević, N. (2011). Senzorna prihvatljivost sremske kobasice izrađene od mesa svinja različite starosti. *Tehnologija mesa*, 52, 252–261.

BIOGRAFIJA

Branko Suvajdžić je rođen 22.01.1989. godine u Sremskoj Mitrovici gde je i završio osnovnu školu „Jovan Popović” 2004. godine . Srednju poljoprivredno-prehrambenu školu „Stevan Petrović Brile”, obrazovnog profila veterinarski tehničar-ogled, završio je 2008. godine u Rumi. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2008/2009 godine. Tokom studija bio je stipendista Fonda „Atanasije Stojković” iz Sremske Mitrovice, kao i Fonda za mlade talente Republike Srbije „Dositeja”. Diplomirao je 10.10.2013. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i time stekao zvanje doktora veterinarske medicine. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2013/2014 godine. Položio je sve ispite u predviđenom roku sa prosečnom ocenom 10,00.

U martu 2016. godine zaposlen je kao asistent na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, za užu naučnu oblast Higijena i tehnologija mesa i od tada je uključen u izvođenje praktične nastave iz predmeta Higijena i tehnologija mesa, Kontrola namirnica animalnog porekla i Osnove higijene namirnica animalnog porekla.

U cilju usavršavanja, bio je polaznik dvonedeljne letnje škole - *BfR-Summer Academy on Risk Assessment and Risk Communication in Food Safety* (2017) u organizaciji Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) iz Berlina, Nemačka.

Učesnik je na nacionalnom projektu evidencionog broja III 46009 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu”.

Do sada je kao autor ili koautor objavio 7 radova u časopisima međunarodnog značaja (M22 i M23).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: Branko D. Suvajdžić

Broj upisa: 15/01

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje mikroflore i parametara kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u industrijskim i tradicionalnim uslovima”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14.01.2019.

Branko Suvajdžić

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Potpisani: Branko D. Suvajdžić

Broj upisa: 15/01

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada:

**„Ispitivanje mikroflore i parametara kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u
industrijskim i tradicionalnim uslovima”**

Mentor 1: prof. dr Dragan Vasilev

Mentor 2: dr Vesna Janković

Potpisani: Branko D. Suvajdžić

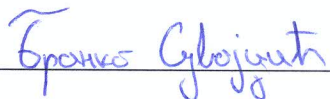
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14.01.2019.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje mikroflore i parametara kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u industrijskim i tradicionalnim uslovima“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14.01.2019.

Branko Gylajevic