

# Utjecaj površinske plijesni na sigurnost i kvalitetu tradicionalnih fermentiranih kobasica

---

Perković, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:479571>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-28**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Irena Perković, dipl. ing.

**UTJECAJ POVRŠINSKE PLIJESNI NA SIGURNOST I KVALITETU  
TRADICIONALNIH FERMENTIRANIH KOBASICA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, travanj, 2019.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo  
Zavod za prehrambene tehnologije  
Katedra za tehnologiju mesa i ribe  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska  
UDK: 664.92 : 579.67 : 582.28 (043.3)

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Znanstvena grana:** Inženjerstvo  
**Tema rada** je prihvaćena na III. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća ak. 2016./2017., održanoj 20. prosinca 2016. godine  
**Voditelj:** prof. dr. sc. Dragan Kovačević  
**Suvoditelj:** izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin

### UTJECAJ POVRŠINSKE PLIJESNI NA SIGURNOST I KVALITETU TRADICIONALNIH FERMETIRANIH KOBASICA *Irena Perković, 41/D*

#### Sažetak:

Slavonski kulen i Slavonska kobasica su trajne kobasice koje se u seoskim domaćinstvima proizvode tradicionalnim tehnologijama, pri čemu se tijekom zrenja na površini proizvoda razvijaju plijesni. Cilj ovog rada bio je tradicionalnom i molekularnom metodom identificirati površinske plijesni te utvrditi njihov utjecaj na kvalitetu proizvoda i pojavnost mikotoksina okratoksina A (OTA) i aflatoksina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Reprezentativnost uzorkovanja postignuta je odabirom pet proizvodnih lokaliteta na području Slavonije na kojima je pripremljeno 30 uzoraka Slavanskog kulena analiziranih nakon tri i šest mjeseci te 15 uzoraka Slavonske kobasice analiziranih nakon tri mjeseca proizvodnje. Prije faze zrenja, na tri uzorka namjerno su oštećeni ovitci. Ukupno je u oba proizvoda identificirano 322 izolata, uključujući 18 različitih vrsta plijesni, među kojima je dominirao rod *Penicillium*. Osim 11 *Penicillium* vrsta, izolirane su po dvije vrste iz rodova *Aspergillus* i *Mucor* te po jedna vrsta iz rodova *Alternaria*, *Cladosporium* i *Eurotium*. Identificirani su i mogući producenti OTA i AFB<sub>1</sub>, *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus flavus*. OTA je određen u Slavanskom kulenu nakon šest mjeseci proizvodnje, a OTA i AFB<sub>1</sub> u obje vrste uzoraka kojima su prethodno oštećeni ovitci. Istraživanje je pokazalo da je kontaminacija Slavanskog kulena i Slavonske kobasice mikotoksinima koje produciraju površinske plijesni moguća isključivo tijekom produženog zrenja ili kao posljedica oštećenosti ovitka.

**Ključne riječi:** *plijesni, mikotoksini, Slavonski kulen, Slavonska kobasica, PCR*

**Rad sadrži:** 173 stranice  
49 slika  
48 tablica  
3 priloga  
202 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. dr. sc. <i>Tomislav Klapac</i> , red. prof.      | predsjednik   |
| 2. dr. sc. <i>Krešimir Mastanjević</i> , izv. prof. | član-mentor   |
| 3. dr. sc. <i>Manuela Zadravec</i> , znan. sur.     | član          |
| 4. dr. sc. <i>Mario Mitak</i> , znan. sav.          | zamjena člana |

**Datum obrane:** 18. travnja 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Postgraduate University Study-Food Engineering  
Department of Food Technologies  
Subdepartment of Meat and Fish Technology  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia  
UDC: 664.92 : 579.67 : 582.28 (043.3)

Scientific area: Biotechnical sciences  
Scientific field: Food technology  
Scientific branch: Engineering  
Thesis subject: was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. III. held on December 20, 2016.  
Mentor: Dragan Kovačević, PhD, prof.  
Co-mentor: Jelka Pleadin, PhD, associate prof.

### THE INFLUENCE OF SURFACE MOULD ON THE SAFETY AND QUALITY OF TRADITIONAL FERMENTED SAUSAGES

*Irena Perković, 41/D*

#### Summary:

Slavonian kulen and Slavonian sausage are dry fermented sausages produced by traditional technologies in rural households, which results in the development of mould on the product surface during the ripening phase. The aim of this paper was to identify the surface moulds by the use of traditional and molecular methods and to determine their effect on product quality and occurrence of mycotoxins ochratoxin A (OTA) and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Representative sampling was achieved by selecting five production sites in Slavonia where 30 samples of Slavonian kulen were analyzed after three and six months and 15 samples of Slavonian sausage after three months of production. Before the ripening phase, the casings of three samples were deliberately damaged. A total of 322 isolates were identified in both products, including 18 different species of moulds, among which genus *Penicillium* dominated. In addition to the 11 *Penicillium* species, two species of *Aspergillus* and *Mucor* species and one species of *Alternaria*, *Cladosporium* and *Eurotium* were isolated. Also, possible producers of OTA and AFB<sub>1</sub>, *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus flavus*, were identified. The OTA was determined in the Slavonian kulen after six months of production, and OTA and AFB<sub>1</sub> in both types of samples that were previously damaged. The investigation has shown that the contamination of Slavonian kulen and Slavonian sausage with mycotoxins that produce surface moulds is possible only during an extended ripening or as a result of the casing damage.

**Key words:** *moulds, mycotoxins, „Slavonian kulen“, „Slavonian sausage“, PCR*

**Thesis contains:** 173 pages  
49 figures  
48 tables  
3 supplements  
202 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |    |  |              |
|----|--|--------------|
| 1. | Tomislav Klavec, PhD, prof.                | chair person |
| 2. | Krešimir Mastanjević, PhD, associate prof. | member       |
| 3. | Manuela Zadravec, PhD                      | member       |
| 4. | Mario Mitak, PhD                           | stand-in     |

**Defense date: April 18, 2019.**

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek.

*Hvala mentoru prof. dr. sc. Draganu Kovačević na ukazanom povjerenju i savjetima pri izradi ovoga rada.*

*Veliko hvala komentorici, kolegici i prijateljici izv. prof. dr. sc. Jelki Pleadin na nesebičnoj pomoći, savjetima, razgovorima i svemu onome što je bilo potrebno da bi ovaj rad bio završen.*

*Hvala izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu i doc. dr. sc. Mariu Škrivanku na potpori tijekom izrade ovoga rada.*

*Hvala kolegama iz Veterinarskog zavoda Vinkovci, a osobito mojoj ekipi iz laboratorija koji su uvijek imali razumijevanja za moje obveze i u svemu mi bili velika potpora.*

*Hvala kolegici i prijateljici Mariji Agičić, dr. vet. med. za svu pomoć oko esperimentalnog dijela doktorata. Hvala joj što je uvijek bila „tu“ kad je trebalo!*

*Hvala mome tati i sestrama na potpori.*

*I posebno hvala mojoj obitelji – Nikoli, Miji i Marinu koji su mi bili najveća podrška i snaga. Hvala vam na svemu, nije vam bilo lako! 😊*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	4
2.1. TRAJNE (FERMENTIRANE) KOBASICE .....	5
2.2. SLAVONSKI KULEN I SLAVONSKA KOBASICA.....	6
2.2.1. Sirovine i receptura za tradicionalnu proizvodnju Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	8
2.2.2. Tradicionalna tehnologija proizvodnje Slavanskog kulena i slavonske kobasice .....	11
2.2.3. Razlike u tradicionalnoj i industrijskoj proizvodnji Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	13
2.2.4. Fizikalno-kemijska svojstva Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	13
2.2.5. Mikroflora Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	14
2.3. KVASCI I PLIJESNI .....	17
2.3.1. KVASCI .....	17
2.3.2. PLIJESNI.....	17
2.4. MIKOTOKSINI .....	31
2.4.1. Okratoksin A .....	34
2.4.2. Aflatoksini .....	40
2.5. METODE ZA IDENTIFIKACIJU PLIJESNI .....	47
2.5.1. Tradicionalna metoda identifikacije .....	47
2.5.2. Molekularna metoda identifikacije – Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	49
2.6. METODE ZA ODREĐIVANJE OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA MESNIH PROIZVODA I METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA .....	51
2.6.1. Analitičke metode za određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava .....	51
2.6.2. Analitičke metode za određivanje koncentracije mikotoksina (OTA i AFB <sub>1</sub> ) .....	52
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	56
3.1. Zadatak .....	57
3.2. MATERIJAL .....	58
3.2.1. Priprema uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	58
3.2.2. Priprema uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice oštećivanjem ovitka .....	61
3.2.3. Hranjive podloge .....	63
3.2.4. Kemikalije .....	65
3.2.5. Laboratorijska oprema .....	68
3.3. METODE.....	72
3.3.1. Određivanje mikrobiološke ispravnosti uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	72
3.3.2. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	77
3.3.3. Senzorska analiza uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice .....	81



3.3.4. Određivanje koncentracije mikotoksina u sirovinama te uzorcima Slavanskog kulena i Slavanske kobasice .....	82
3.3.5. Izolacija plijesni s površine uzoraka Slavanskog kulena i Slavanske kobasice .....	86
3.3.6. Identifikacija plijesni s površine uzoraka Slavanskog kulena i Slavanske kobasice .....	86
3.3.7. Statistička analiza rezultata .....	94
4. REZULTATI.....	96
4.1. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIROVOG MESA, PAPRIKE TE UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	97
4.1.1. Mikrobiološke analize – Slavanski kulen .....	97
4.1.2. Mikrobiološke analize – Slavanska kobasica .....	100
4.2. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	102
4.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje .....	102
4.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje .....	102
4.2.3. Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavanske kobasice .....	104
4.3. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE.....	105
4.3.1. Senzorska analiza uzorka Slavanskog kulena .....	105
4.3.2. Senzorska analiza uzorka Slavanske kobasice .....	106
4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA U SIROVOM MESU, PAPRICI TE UZORCIMA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	108
4.4.1. Koncentracija mikotoksina – Slavanski kulen .....	108
4.4.2. Koncentracija mikotoksina – Slavanska kobasica .....	111
4.5. REZULTATI IDENTIFIKACIJE POVRŠINSKE PLIJESNI NA UZORCIMA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	112
4.5.1. Identifikacija površinske plijesni na uzorcima Slavanskog kulena .....	113
4.5.2. Identifikacija površinske plijesni na uzorcima Slavanske kobasice.....	115
5. RASPRAVA.....	124
5.1. MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIROVINA I UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	125
5.1.1. Enterobakterije.....	126
5.1.2. Sulfitoreducirajuće klostridije.....	128
5.1.3. Kvasci .....	128
5.1.4. Plijesni.....	129
5.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	131
5.2.1. Udio vode .....	131
5.2.2. Udio pepela .....	132
5.2.3. Udio bjelančevina .....	133
5.2.4. Udio masti .....	134

5.2.5. pH vrijednost .....	135
5.2.6. Aktivitet vode ( $a_w$ ) .....	136
5.3. SENZORSKA ANALIZA UZORKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	137
5.4. MIKOTOKSINI U SIROVINAMA I UZORCIMA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	139
5.4.1. Aflatoksin B <sub>1</sub> .....	139
5.4.2. Okratoksin A .....	140
5.5. PLIJESNI NA POVRŠINI UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE .....	142
5.5.1. Identificirani rodovi i vrste plijesni .....	142
5.5.2. Pojavnost toksikotvornih vrsta plijesni i mikotoksina .....	145
6. ZAKLJUČCI .....	147
7. LITERATURA .....	150
8. PRILOZI .....	165
8.1. PRILOG 1 - Dobivene sekvence za svaku vrstu plijesni nakon sekvencioniranja i obrade .....	166
8.2. PRILOG 2 – Ocjenjivački listić za senzorsku analizu uzoraka Slavenskog kulena .....	172
8.3. PRILOG 3 – Ocjenjivački listić za senzorsku analizu uzoraka Slavenske kobasice .....	173

## Popis oznaka, kratica i simbola

AFB <sub>1</sub>	Aflatoksin B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoksin B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoksin G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoksin G <sub>2</sub>
AFM <sub>1</sub>	Aflatoksin M <sub>1</sub>
AFM <sub>2</sub>	Aflatoksin M <sub>2</sub>
AFP <sub>1</sub>	Aflatoksin P <sub>1</sub>
AFQ <sub>1</sub>	Aflatoksin Q <sub>1</sub>
ANOVA	Analiza varijance (engl. <i>Analysis of variance</i> )
ATP	Adenozin trifosfat
a <sub>w</sub>	Aktivitet vode
BMK	Bakterije mliječne kiseline
BMV	Blijedo, mekano i vodnjikavo meso
CYA	Czapekov agar s ekstraktom kvasca (eng. <i>Czapeck yeast extract agar</i> )
CYP	Citokrom
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (eng. <i>European Food Safety Authority</i> )
EZ	Europska zajednica
FAO	Organizacija za prehranu i poljoprivredu (eng. <i>Food and Agriculture Organization</i> )
GC	Plinska kromatografija (eng. <i>Gas Chromatography</i> )
GC/MS	Plinska kromatografija/Masena spektrometrija (eng. <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> )
HACCP	Analiza opasnosti kritičnih kontrolnih točaka (eng. <i>Hazard Analysis Critical Control Points</i> )
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>High performance liquid chromatography</i> )
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
ICBN	Međunarodni kod za botaničke nomenklature (eng. <i>International Code of Botanical Nomenclature</i> )

KNS	koagulaza negativni stafilokoki
L	koordinata svjetline (eng. <i>lightness</i> )
LC/MS	Tekućinska kromatografija/Masena spektrometrija (eng. <i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> )
LOD	Limit detekcije
LOQ	Limit kvantifikacije
MDK	Maksimalno dopuštena količina
MEA	Sladni ekstrakt agar (eng. <i>Malt extract agar</i> )
MP	Ministarstvo poljoprivrede
NDK	Najveća dopuštena količina
NN	Narodne novine (službeno glasilo RH)
NOMb	Nitrozilmioglobin
OPG	Obiteljsko poljoprivredno gospodarstvo
OTA	Okratoksin A
PCR	Lančana reakcija polimerazom (eng. <i>Polymerase chain reaction</i> )
Rh	Relativna vlažnost zraka (%)
RNA	Ribonukleinska kiselina
SD	Standardna devijacija
SpVV	sposobnost vezanja vode
T	temperatura (°C)
t	vrijeme (s)
TAE	Tris-acetat-EDTA
v	brzina strujanja zraka (m/s)
1A	uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 1
1B	uzorci Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s mikrolokaliteta 1
2A	uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 2
2B	uzorci Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s mikrolokaliteta 2
3A	uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 3
3B	uzorci Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s mikrolokaliteta 3
4A	uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 4
4B	uzorci Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s mikrolokaliteta 4
5A	uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 5

- 5B        uzorci Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s mikrolokaliteta 5
- 2D-30    oštećeni uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s odabranog mikrolokaliteta
- 2D-60    oštećeni uzorci Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s odabranog mikrolokaliteta
- 2D-6N    neoštećeni uzorci Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s odabranog mikrolokaliteta
- 1C        uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 1
- 2C        uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 2
- 3C        uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 3
- 4C        uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 4
- 5C        uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 5
- 1D-0     oštećeni uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s odabranog mikrolokaliteta
- 1D-N     neoštećeni uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s odabranog mikrolokaliteta
- TČS      Tamno, čvrsto i suho meso

## **1. UVOD**

Slavonski kulen i Slavonska kobasica su trajne (fermentirane) kobasice koje se prema tradicionalnoj recepturi i tehnologiji proizvode tijekom zimskih mjeseci u seoskim domaćinstvima, pri čemu značajan problem za sigurnost i kvalitetu proizvoda predstavlja negativan utjecaj površinske plijesni na senzoričku, odnosno miris i okus proizvoda (posebice izražen u Slavonskoj kobasici zbog malog promjera nadjeva), te prisutnost njihovih toksičnih produkata, mikotoksina. Osim razlika u recepturi (omjer mesa i slanine u nadjevu te količina dodane soli, slatke i ljute crvene paprike i češnjaka) i tehnološkim parametrima (vremenu trajanja pojedinih tehnoloških operacija ( $t$ ), temperaturi ( $T$ ) te relativnoj vlažnosti ( $Rh$ ) i brzini strujanja zraka i dima ( $v$ )), značajne su i razlike u higijenskim te okolišnim uvjetima, što utječe i na specifičnost mikroflore, uključujući i površinske plijesni te razlike u sigurnosti i kvaliteti proizvoda između pojedinih proizvođača, mikrolokaliteta, ali kao posljedica različitih klimatskih uvjeta i na razlike između proizvodnih godina.

Tijekom procesa zrenja površinu fermentiranih kobasica obrastaju plijesni čije su spore najčešće podrijetlom sa žitnih polja u čijoj su blizini smješteni proizvodni pogoni i tradicionalne komore za zrenje. Intenzitetu obrastanja trajnih kobasica površinskim plijesnima doprinose tehnološki parametri koji su tipični za komore i tradicionalne uvjete višemjesečnog zrenja ( $T = 15 - 20$  °C;  $Rh = 86 - 92\%$ ) (Kovačević, 2014.; Kovačević i sur., 2014.a) te fizikalno-kemijska svojstva trajnih (fermentiranih) kobasica ( $a_w < 0,9$ ;  $pH < 6,0$ ) (Mižáková i sur., 2002.). Literaturni podaci pokazuju da površinske plijesni koje spontano obrastaju trajne (fermentirane) kobasice tijekom procesa zrenja dominantno čine rodovi *Penicillium* i *Aspergillus* (Lopez-Diaz i sur., 2001.; Mižáková i sur., 2002.; Comi i sur., 2004.; Tabuc i sur., 2004.; Sørensen i sur., 2008.; Asefa i sur., 2009.; Iacumin i sur., 2009.; Frece i sur., 2010.; Sonjak i sur., 2011.; Pleadin i sur., 2017.), čije pojedine vrste mogu u određenim uvjetima producirati mikotoksine, okratoksin A (OTA) kao dominantni kontaminant i aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) s manjom učestalošću i u manjim koncentracijama u odnosu na OTA. Osim mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub>, neke vrste navedenih rodova plijesni mogu producirati i druge sekundarne metabolite (citrinin, patulin, ciklopiazonična kiselina, sterigmatocistin) (Sweeney i sur., 1998.; Delaš, 2010.; Marin i sur., 2013.), no njihov utjecaj na sigurnost i kvalitetu proizvoda, a posljedično i na ljudsko zdravlje, nije dovoljno istražen ili se ne smatra značajnim (Bailly i Guerre, 2009.; Delaš, 2010.; EFSA, 2012.).

Mikotoksini pronađeni u trajnim (fermentiranim) kobasicama koje se proizvode tradicionalnom tehnologijom u seoskim domaćinstvima mogu biti podrijetlom iz kontaminirane stočne hrane („*carry over effect*“) ili ih tijekom višemjesečnog procesa zrenja proizvode pojedine vrste površinske plijesni, pri čemu vanjska oštećenja ovitka i/ili proizvoda dodatno intenziviraju njihovu difuziju u unutrašnjost proizvoda (Gareis i Wolff, 2000.; Kovačević i sur., 2014.a; Pleadin i sur., 2015.a).

Budući AFB<sub>1</sub> predstavlja najpotentniji karcinogen jetre u sisavaca te je klasificiran od strane Međunarodne organizacije za istraživanje raka u grupu 1, dokazanih ljudskih karcinogena (IARC, 2012.), a OTA u grupu 2B, mogućih ljudskih karcinogena (IARC, 1993.), te kako i OTA i AFB<sub>1</sub> predstavljaju česte kontaminante mesnih proizvoda, u ovom radu analizirani su navedeni mikotoksini kao potencijalni produkti površinskih plijesni prisutnih na trajnim kobasicama te se procijenio njihov utjecaj na sigurnost i kvalitetu Slavanskog kulena i Slavonske kobasice.

U ovom je radu identifikacija površinskih plijesni na uzorcima Slavonske kobasice provedena nakon tri, a na uzorcima Slavanskog kulena, nakon tri i šest mjeseci proizvodnje, primjenom tradicionalne - mikroskopske metode i molekularne - metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) (engl.: *Polymerase Chain Reaction*).

Identifikacija površinskih plijesni producenata mikotoksina primjenom molekularnih metoda, njihov utjecaj na sigurnost i kvalitetu tradicionalnih (fermentiranih) kobasica, te ispitivanja utjecaja dužine zrenja te mikrolokaliteta predstavljaju jedinstveni znanstveni doprinos s obzirom da do sada u Hrvatskoj nisu istraživani.

Molekularna metoda je po prvi puta upotrijebljena za identifikaciju plijesni na uzorcima Slavanskog kulena i Slavonske kobasice te je u kombinaciji s tradicionalnom metodom omogućila pouzdaniju identifikaciju roda i vrste plijesni koje obrastaju površinu Slavanskog kulena i Slavonske kobasice.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. TRAJNE (FERMENTIRANE) KOBASICE

Prema Pravilniku o mesnim proizvodima NN br. 62/18 (MP, 2018.), trajne kobasice, uz trajne suhomesnate proizvode i fermentirane polusuhe kobasice, pripadaju kategoriji toplinski neobrađenih mesnih proizvoda. Trajne kobasice su proizvodi od mesa, masnog tkiva i dodatnih sastojaka koji se nakon obrade i punjenja podvrgavaju postupcima fermentacije, sušenja i zrenja sa ili bez dimljenja. To su mesni proizvodi koji trebaju sadržavati najviše 40% vode, najmanje 16% bjelančevina, a proizvode se i stavljaju na tržište pod nazivima: kulen, zimski/zimski salama, čajna/čajna kobasica, srijemska/srijemska kobasica (MP, 2018.).

Trajne kobasice se prema brzini fermentacije dijele na:

- a) suhe brzofermentirane (engl. *dry sausages*) s kratkim vremenom sušenja i zrenja – kratko vrijeme fermentacije pri visokoj temperaturi rezultira većom koncentracijom bakterija mliječne kiseline (BMK) u prvim danima fermentacije, a gotov proizvod ima kiseliji okus i slabije izraženu aromu,
- b) polusuhe sporofermentirane (engl. *semi-dry sausages*) s dugim vremenom sušenja i zrenja – u kobasicama podvrgnutim duljem vremenu fermentacije, pri nižim temperaturama u prvim danima fermentacije dominiraju koagulaza-negativni stafilocoki (KNS), a gotov proizvod ima izraženiju specifičnu aromu i manje kiselkast okus.

Na području cijele Europe razvijena je proizvodnja trajnih (fermentiranih) kobasica te se one s obzirom na lokaciju proizvodnje dijele na:

- a) mediteranske ili južnoeuropske koje karakterizira dugotrajno zrenje i fermentacija; spori pad pH vrijednosti nakon pripreme sirovog proizvoda; konačna vrijednost pH > 5, a na okus značajno utječu začini te dodatak bijelog ili crnog vina,
- b) sjevernoeuropske koje karakterizira kratkotrajno zrenje i fermentacija; brzi pad vrijednosti pH nakon pripreme sirovog proizvoda; konačna vrijednost pH < 5 te obvezni postupak dimljenja i postizanje ljutih proizvoda dodatkom ljute paprike i papra (Kovačević, 2014.).

Svako zemljopisno područje proizvodnje trajnih (fermentiranih) kobasica karakteriziraju različiti klimatski uvjeti koji utječu na prirodnu mikrofloru samog proizvoda.

Proizvodnja trajnih (fermentiranih) kobasica u Republici Hrvatskoj ima dugu tradiciju, od kojih su najpoznatiji Slavonski kulen i Slavonska kobasica, a koji sve više dobivaju na vrijednosti, budući je danas značajan trend povećanja potražnje za hranom koja se proizvodi na tradicionalni način. U tradicionalnoj proizvodnji Slavenskog kulena i Slavonske kobasice koristi se ohlađeno svinjsko meso prve i druge kategorije, kuhinjska sol, slatka i ljuta paprika i bijeli luk, dok se aditivi poput nitrata, nitrita, askorbinske kiseline te bakterijske starter kulture i dr. koriste uglavnom u industrijskoj proizvodnji.

## 2.2. SLAVONSKI KULEN I SLAVONSKA KOBASICA

Slavonski kulen (**Slika 1**) je najistaknutiji tradicionalni slavonski proizvod od mesa kojemu je nastanak i razvoj vezan uz poljoprivredna gospodarstva na području Slavonije.



**Slika 1** Slavonski kulen (foto.: Perković, I., 2018.)

Prvi zapisi o kulenu sežu još iz 1768. godine, a djelomični opis tehnologije proizvodnje star je stotinjak godina. Naziv proizvoda „Slavonski kulen“/„Slavonski kulin“ registriran je kao oznaka zemljopisnog podrijetla rješenjem Ministarstva poljoprivrede od 2. rujna 2013. godine na nacionalnoj razini (Kovačević, 2014.) dok je Europska komisija 7. studenog 2017. odobrila zahtjev da se „Slavonski kulen“/„Slavonski kulin“ uvrsti u Registar proizvoda zaštićenih oznakom zemljopisnog podrijetla.

Slavonska kobasica (**Slika 2**) tradicionalna je trajna (fermentirana) kobasica koja se proizvodi u Slavoniji prema tradicionalnoj recepturi i tehnologiji, a pretpostavlja se da je njezina proizvodnja na području Slavonije započela polovicom 18. stoljeća za vrijeme sustavnog i planskog naseljavanja slavonskih područja oslobođenih od Turaka (Petričević i sur., 2010.)



**Slika 2** Slavonska kobasica (foto.: Perković, I., 2018.)

Rješenjem Ministarstva poljoprivrede od 13. travnja 2018. godine Slavonska kobasica dobiva zaštićenu oznaku zemljopisnog podrijetla.

Tradicionalna proizvodnja Slavanskog kulena i Slavonske kobasice se odvija u prirodnim nekontroliranim uvjetima i isključivo je sezonskog karaktera pa je u takvim uvjetima vrlo teško proizvesti proizvod ujednačene kvalitete. Na kvalitetu Slavanskog kulena i Slavonske kobasice mogu utjecati različiti faktori poput sirovine, recepture (omjer kuhinjske soli, paprike, češnjaka, njihova kvaliteta), tehnološki parametri (temperatura, relativna vlažnost, strujanje zraka), a svakako treba istaknuti i mikrolokaciju proizvodnje, jer tehnološke bakterije koje su odgovorne za pozitivne procese fermentacije i zrenja Slavanskog kulena i Slavonske kobasice uglavnom dolaze iz okoline.

## 2.2.1. Sirovine i receptura za tradicionalnu proizvodnju Slavenskog kulena i Slavonske kobasice

U tradicionalnoj tehnologiji proizvodnje Slavenskog kulena i Slavonske kobasice osnovna sirovina je svinjsko meso prethodno očišćeno od vezivnog tkiva, oštećenih dijelova i krvnih žila, zatim tvrda leđna slanina te kuhinjska sol, crvena ljuta i slatka začinska paprika te češnjak, koji se dodaju prema omjeru koji je naveden u **Tablici 1**.

Aditivi i drugi začini (osim mljevene crvene slatke i ljute paprike te češnjaka), kao i starter kulture, ne koriste se u tradicionalnoj proizvodnji Slavenskog kulena i Slavonske kobasice (Kovačević, 2001.).

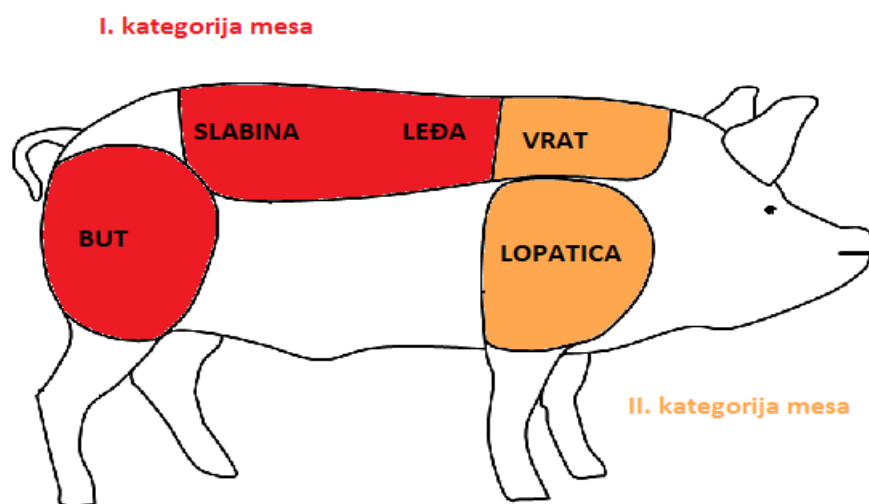
**Tablica 1** Receptura za proizvodnju Slavenskog kulena i Slavonske kobasice (Kovačević, 2014.)

SIROVINE	MASENI UDIO (%)	
	SLAVONSKI KULEN	SLAVONSKA KOBASICA
Omjer svinjskog mesa I. i II. kategorije	80 : 20	30 : 70
Ukupno svinjsko meso	90	min 70
Svinjska leđna slanina	10	do 30
Kuhinjska sol	1,8 – 2,0	1,8 – 2
Crvena ljuta paprika, mljevena	0,1 – 0,9	0,4
Crvena slatka paprika, mljevena	0,1 – 0,9	0,6
Češnjak	0,15 – 0,25	0,25
Ovitak	svinjsko slijepo crijevo (lat. <i>intestinum caecum</i> )	svinjsko tanko crijevo (lat. <i>intestinum tenue</i> )

### 2.2.1.1. Svinjsko meso

Crna slavonska svinja je tradicionalno bila glavni izvor sirovine za proizvodnju Slavenskog kulena. Nastala je u drugoj polovici 19. stoljeća na imanju vlastelina Pfeiffera u okolici Osijeka križanjem pasmina mangulice i berkšira. Pasmine svinja koje se uzgajaju na području Slavonije i Baranje, a čije se meso koristi u proizvodnji Slavenskog kulena, su: švedski landras (eng.: *Swedish Landrace*) i veliki jorkšir (eng.: *Large White*), dok se meso mangulice i crne slavonske svinje (fajferica) koristi sporadično. Pasmina durok (eng.: *Duroc*) je u proizvodnji Slavenskog kulena bitna zbog križanja s velikim jorkširom i švedskim landrasom.

Osnovna sirovina za proizvodnju kulena je „zrelo“ svinjsko meso (I. kategorije – but, slabina, leđa; II. kategorije - lopatica, vrat) (Slika 3) dobiveno od križanaca plemenitih pasmina starosti od minimalno godinu dana i „žive vage“ od 150 i više kilograma (Babić, 2011.; Kovačević, 2014.).



**Slika 3** Dijelovi svinjskog mesa za proizvodnju Slavanskog kulena i Slavonske kobasice (*Izrada shematskog prikaza: Perković, I., 2018.*)

U proizvodnji Slavanskog kulena, ali i drugih trajnih (fermentiranih) kobasica, najvažniji zahtjevi za korištenje mesa pojedine pasmine svinja su:

- a) da nisu sklone stresu, tj. stvaranju blijedog, mekanog i vodnjikavog mesa (BMV mesa) ili tamnog, čvrstog i suhog mesa (TČS mesa),
- b) da nemaju preveliku količinu intramuskularne masti (Kovačević, 2014.).

Kvaliteta svinjskog mesa ovisi o pasmini svinja, dobi, spolu, načinu ishrane i uzgoja, anatomskoj lokaciji, zdravstvenom stanju životinje, postupcima prerade, parcijalnom tlaku kisika, temperaturi i dr.

Boja mesa, pH i SpVV, pojedinačno ili u kombinaciji, pokazatelji su mogućih nepoželjnih promjena mesa uvjetovanih patološkim stanjem svinja. Svinjsko meso optimalne kvalitete za proizvodnju Slavanskog kulena treba biti crveno-ružičaste boje (koordinata svjetline, L = 42 – 50), čvrsto, nevodnjikavo, s pH vrijednosti < 6,0 i SpVV < 5 (Kovačević, 2014.).

### 2.2.1.2. Svinjska leđna slanina

Usitnjena svinjska leđna slanina miješa se s usitnjenim svinjskim mesom. Slanina treba biti svjež, karakterističnog mirisa i konzistencije, temperature oko 4 °C ili niže i pH < 6 (Kovačević, 2014.).

### 2.2.1.3. Kuhinjska sol

U nadjevu trajnih (fermentiranih) kobasica prosječni maseni udio kuhinjske soli kreće se u rasponu od 2,0% do 2,6%, a uslijed gubitka vode procesom sušenja taj udio u gotovom proizvodu iznosi i oko 3,3 - 5,5% (Kovačević, 2014.). Osim konzervirajućeg djelovanja, kuhinjska sol poboljšava i organoleptička svojstva proizvoda.

NaCl se otapa u vodi i disocira na ione klora ( $\text{Cl}^-$ ) i ione natrija ( $\text{Na}^+$ ). U vodenoj se otopini ioni klora i natrija okružuju dipolnim molekulama vode te povezuju slabim *van der Waalsovim* ion-dipolnim vezama dipola (vode) i iona ( $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ). Zbog vezanja dipolnih molekula vode za ione natrija i klora, molekule vode nisu slobodne niti dostupne za biokemijske ili kemijske reakcije u hrani, ali i u mikroorganizmima, što rezultira snižavanjem  $a_w$  i inhibicijom rasta i razmnožavanja mikroorganizama. Osim navedenog, NaCl poboljšava teksturu mesnog proizvoda. Naime, NaCl povećava SpVV na način da ioni  $\text{Cl}^-$  kao jača kiselina, razmiču proteinske lance istiskivanjem  $-\text{COO}^-$  skupina aminokiselina iz veze s  $\text{NH}_3^+$  skupinama te se za njih veže i neutralizira ga, dok slobodne  $-\text{COO}^-$  skupine Coulombovim silama vežu dipolne molekule vode, pri čemu dolazi do hidracije i bubrenja proteina te se povećava količina slobodnih  $\text{OH}^-$  te pH vrijednost mesa raste. Razmicanje proteinskih lanaca omogućava imobilizaciju većeg broja dipolnih molekula vode, povećanje SpVV, odnosno bubrenje proteina (Kovačević, 2017.).

#### 2.2.1.4. Crvena mljevena paprika

U proizvodnji Slavanskog kulena i Slavonske kobasice koristi se mali broj začina koji imaju ulogu u poboljšanju senzorskih svojstava proizvoda. Istraživanja su pokazala da veći udio crvene začinske paprike i to osobito ljute, ubrzava proces zrenja kobasica. Paprika sadrži dovoljno veliku količinu fermentirajućih šećera čime se značajno ubrzava proizvodnja mliječne kiseline, dolazi do pada pH i bržeg razvoja optimalne teksture proizvoda (Revilla i Quintana, 2005.; Kovačević, 2014.). Također, sprječava oksidaciju lipida, a samim time i pojavu užeglog okusa proizvoda jer sadrži visoki udio karotenoida i kapsaicina (Aguirrezábal i sur., 2000.; Revilla i Quintana, 2005.). Fermentirane kobasice s većom količinom paprike imaju jači intenzitet boje, koja je stabilnija tijekom dužeg vremena (Revilla i Quintana, 2005.).

#### 2.2.1.5. Češnjak

Sastojci češnjaka i ekstrakta češnjaka (alin, dialil sulfid, alil sulfid i propil sulfid) posjeduju antioksidativna svojstva. Češnjak sadrži askorbinsku kiselinu, nitrata i nitrite koji također imaju antioksidacijski učinak (Aguirrezábal i sur., 2000.).

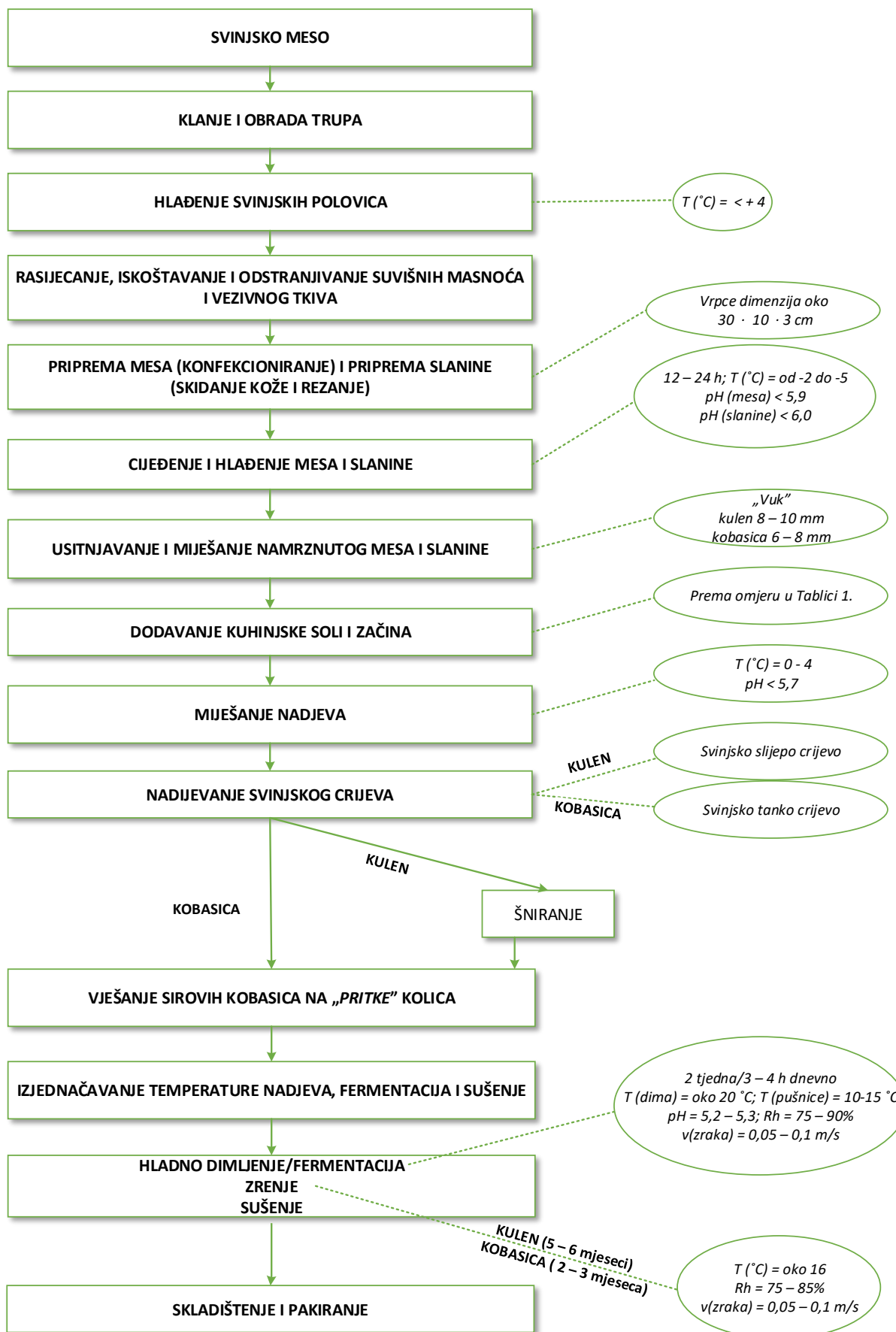
### 2.2.2. Tradicionalna tehnologija proizvodnje Slavanskog kulena i slavonske kobasice

Tradicionalna proizvodnja Slavanskog kulena i Slavonske kobasice obavlja se prema tehnološkoj shemi prikazanoj na **Slici 4**, dok su specifični tehnološki parametri za svaku kobasicu navedeni u **Tablici 2**.

**Tablica 2** Specifični tehnološki parametri u proizvodnji Slavanskog kulena i Slavonske kobasice (Kovačević, 2014.)

SPECIFIČNI TEHNOLOŠKI PARAMETRI	VRSTA TRAJNE (FERMENTIRANE) KOBASICE	
	SLAVONSKI KULEN	SLAVONSKA KOBASICA
Usitnjavanje (promjer perforacija)	8 – 10 mm	6 – 8 mm
Dimljenje	2 tjedna; 3 – 4 h dnevno	2 tjedna; 3 – 4 h svaki drugi dan
Zrenje	5 – 6 mjeseci	2 – 3 mjeseca
Kalo	45 – 50%	25 - 30%





Slika 4 Shema tehnološkog procesa proizvodnje Slavonskog kulena i Slavonske kobasice

(prilagođeno iz: Kovačević, 2014.)

### 2.2.3. Razlike u tradicionalnoj i industrijskoj proizvodnji Slavenskog kulena i Slavenske kobasice

I u industrijskoj i u tradicionalnoj proizvodnji redosljed tehnoloških operacija u procesu proizvodnje je jednak, a najvažnije razlike između ova dva načina proizvodnje Slavenskog kulena i Slavenske kobasice vezane su za recepturu te uporabu komora za zrenje s mogućnošću automatizirane regulacije procesnih uvjeta i tehnoloških parametara.

U industrijskoj proizvodnji se, osim usitnjenog mesa i slanine te slatke i ljute mljevene paprike, kuhinjske soli i češnjaka, u nadjev dodaju aditivi natrijev nitrat (E251), natrijev nitrit (E250) i natrijev izoaskorbat (E316) koji proizvodu osiguravaju veću sigurnost te komercijalne bakterijske starter kulture koje ubrzavaju i pojačavaju fermentaciju, a time doprinose većoj sigurnosti i trajnosti proizvoda te ekonomičnosti procesa (Kovačević, 2014.).

Uporaba automatiziranih komora za zrenje u kojima je moguće kontrolirati procesne parametre neovisno o klimatskim uvjetima, industrijskoj proizvodnji omogućavaju ujednačenu i kontinuiranu proizvodnju tijekom cijele godine.

### 2.2.4. Fizikalno-kemijska svojstva Slavenskog kulena i Slavenske kobasice

Slavenski kulen je proizvod visoke nutritivne vrijednosti posebno s obzirom na odnos bjelančevine/masti, koji iznosi  $B/F > 1,5$ . Pripada skupini suhih kobasica jer mu je omjer vode i bjelančevina  $M/B < 1,2 - 1,3$ , a aktivitet vode  $a_w = 0,8 - 0,9$ . Zreli Slavenski kulen, kao i Slavenska kobasica, kada su spremni za tržište, trebaju imati svojstva prikazana u **Tablici 3**.

**Tablica 3** Fizikalno-kemijska svojstva zrelog Slavenskog kulena i Slavenske kobasice (Kovačević, 2014.)

PARAMETAR	VRIJEDNOST	
	SLAVONSKI KULEN	SLAVONSKA KOBASICA
Udio vode	cca 35%	22% – 40%
Udio bjelančevina	cca 35%	22% – 35%
Udio masti	20% - 30%	24% – 45%
Udio kolagena	2,5% – 3%	1% – 5%

$a_w$	0,8 – 0,9	0,83 – 0,88
pH	5,2 – 5,6	5,3 – 5,8

Proces fermentacije značajno utječe na fizikalno-kemijska svojstva Slavonske kobasice i Slavanskog kulena, osobito na pH vrijednost i teksturu finalnog proizvoda.

### 2.2.5. Mikroflora Slavanskog kulena i Slavonske kobasice

Mikroflora Slavanskog kulena i Slavonske kobasice, kao i drugih trajnih (fermentiranih) kobasica, dijeli se na tehnološku, patogenu, mikrofloru kvarenja te kvasce i plijesni (**Slika 5**).



**Slika 5** Mikroflora Slavanskog kulena i Slavonske kobasice (prilagođeno iz: Kovačević, 2014.)

#### 2.2.5.1. Tehnološka mikroflora

Važnu ulogu u procesu fermentacije i zrenja te formiranju senzorskih obilježja Slavanskog kulena i Slavonske kobasice, kao i drugih trajnih (fermentiranih) kobasica, ima tehnološka mikroflora, koja je karakteristična za svako proizvodno područje, tj. regiju. Tehnološka mikroflora primarno potječe iz sirovine (meso, začini) ili proizvodne okoline, a sastoji se od BMK, KNS i u manjoj mjeri plijesni i kvasaca (Kovačević, 2014.).

Stabilnosti Slavenskog kulena i Slavenske kobasice doprinosi konzerviranje fermentacijom i zrenjem, u kojima važnu ulogu ima tehnološka mikroflora, tj. BMK od kojih je najbrojniji rod *Lactobacillus* i KNS i najčešći rodovi *Staphylococcus* i *Kocuria*, te dimljenje, sušenje i miješanje nadjeva s kuhinjskom soli i začinima. Po pitanju BMK, mnoga istraživanja su pokazala da dominantne vrste u trajnim (fermentiranim) kobasicama čine *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus* (Hammes i sur., 1990.; Hugas i sur., 1993.; Papamanoli i sur. 2003.; Comi i sur. 2005.; Urso i sur. 2006.; Bonomo i sur. 2008.).

Koagulaza negativni stafilokoki su vrlo tolerantni prema slanoj okolini te mogu rasti s ili bez prisustva kisika. Ove bakterije uglavnom nisu patogene i ne predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača (Kegalj i sur., 2012.).

Dominantni stafilokoki u Slavenskom kulenu su *S. xylosus* i *S. warneri*, dok od BMK prevladavaju *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides* (Babić, 2011.; Babić i sur., 2011.).

U **Tablici 4** opisana su glavna djelovanja BMK i KNS kod proizvodnje trajnih (fermentiranih) kobasica.

**Tablica 4** Glavna djelovanja BMK i KNS kod proizvodnje trajnih (fermentiranih) kobasica (Kovačević, 2014.)

TEHNOLOŠKA MIKROFLORA	GLAVNO DJELOVANJE
<b>Bakterije mliječne kiseline (BMK)</b>	proizvodnja mliječne kiseline: osiguravanje mikrobiološke stabilnosti, koagulacija i želiranje proteina
	proizvodnja spojeva male molekulske mase koji djeluju kao antagonisti patogenim i bakterijama kvarenja
	proizvodnja antimikrobnih spojeva bakteriocina: sprječavanje rasta i razvoja nekih bakterija
	razgradnja proteina na manje peptide koji doprinose specifičnom okusu
	redukcija nitrata i nitrita, nastaje nitrozilmioglobin (NOMb)
<b>Koagulaza negativni stafilokoki (KNS)</b>	povećanje koncentracije mliječne kiseline, snižavanje pH vrijednosti zaustavlja rast i razvoj KNS
	reduciranje nitrata i nitrita (nitrat reduktaza), nastaje nitrozilmioglobin (NOMb)
	posjedovanje proteolitičkih i lipolitičkih svojstava, sudjelovanje u razgradnji slobodnih aminokiselina, stvaranju kratkolančastih masnih kiselina i doprinos u stvaranju specifičnog mirisa i okusa proizvoda
	sprečavanje užeglosti fermentiranih kobasica (antioksidativnost)
	posjedovanje snažne katalazne aktivnosti (razgradnja peroksida)

### 2.2.5.2. Patogena mikroflora

Kontaminacija nadjeva patogenim bakterijama znatno se može smanjiti primjenom najviših higijenskih standarda te osiguranjem optimalnih uvjeta fermentacije, jer upravo proizvodnja mliječne kiseline, snižavanje pH vrijednosti i  $a_w$  djeluju antagonistički na razvoj patogenih bakterija (Kovačević, 2014.).

*Salmonella* spp. je često izolirana iz svinjskih polovica ili komada mesa namijenjenih preradi (Giovannacci i sur., 2001.; Pala i Sevilla, 2004.). No, u dosadašnjim istraživanjima fermentiranih kobasica, *Salmonella* spp. nije pronađena u gotovim proizvodima u Španjolskoj, Grčkoj i Italiji (Metaxopoulos i sur., 2001.; Aymerich i sur., 2003. Comi i sur. 2005.).

U nekim grčkim kobasicama *Listeria monocytogenes* ponekad je izolirana u sirovom nadjevu, ali njezin broj je smanjen ili nije niti izolirana u gotovom proizvodu (Samelis i sur., 1998.; Drosinos i sur., 2005.).

### 2.2.5.3. Mikroflora kvarenja

Kvarenje Slavonskog kulena i Slavonske kobasice je vrlo rijetko, jer se mikroflora kvarenja (Tablica 5), koja je najčešće posljedica kontaminacije tijekom klanja i pripreme nadjeva, uklanja primjenom različitih metoda konzerviranja: dimljenjem, sušenjem, fermentacijom, zrenjem i dodatkom soli i začina.

**Tablica 5** Mikroflora kvarenja trajnih kobasica (Kovačević, 2014.)

MIKROFLORA KVARENJA	
GRAM NEGATIVNE, AEROBNE BAKTERIJE	rodovi <i>Pseudomonas</i> i <i>Acinobacter</i>
GRAM NEGATIVNE, FAKULTATIVNO ANAEROBNE BAKTERIJE	porodica <i>Enterobacteriaceae</i>
OSTALE BAKTERIJE	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Hafnia alvei</i> ; <i>Serratia liquefaciens</i> ; <i>Serratia odorifera</i> ; <i>Enterobacter amnigenus</i> ; <i>Enterobacter intermedius</i> ; <i>Providencia alcalifaciens</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Providencia penneri</i> ; <i>Morganella morganii</i>

## 2.3. KVASCI I PLIJESNI

Kvasci i plijesni su prisutni u sirovom nadjevu Slavenskog kulena i Slavenske kobasice te i drugim fermentiranim kobasicama, ali se nakon procesa fermentacije i dugotrajnog zrenja, odnosno u finalnom proizvodu, uglavnom mogu naći na površini ovitka ili u pukotinama i šupljinama nadjeva. Kvasci dominiraju na početku procesa fermentacije, a plijesni nakon četiri tjedna fermentacije i zrenja (Kovačević, 2014.).

### 2.3.1. KVASCI

Mikrobiota kvasaca u kobasicama ovisi o higijeni sirovine i uvjetima koji su prisutni za vrijeme procesa proizvodnje.

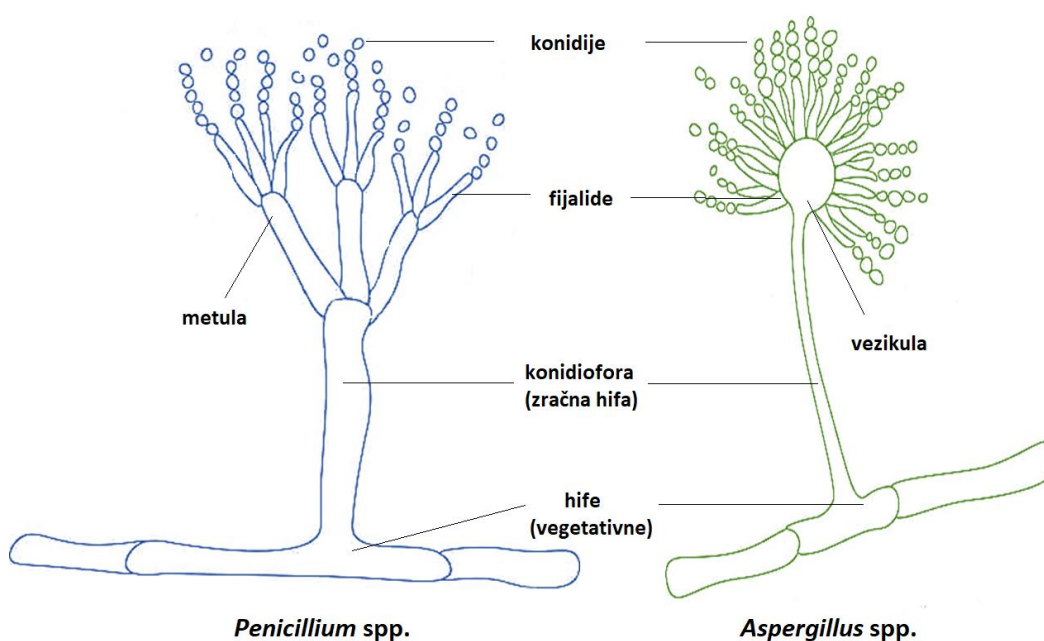
Osnovne uloge kvasaca u fermentiranim kobasicama su povećanje koncentracije amonijaka i proteolitička aktivnost, čime utječu na senzorska svojstva gotovog proizvoda (Kovačević, 2014.). Populacija kvasaca u fermentiranim proizvodima mijenja se tijekom procesa proizvodnje, a varijacije su uočene ovisno i o porijeklu mesa te proizvodnom okruženju. Različite vrste kvasaca koje pripadaju rodovima *Debaryomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia* i *Trichosporon* mogu biti izolirane u različitim fazama procesa fermentacije i zrenja (Samelis i Sofos, 2003.; Romano i sur., 2006.), a kao najčešće izolirana vrsta kvasca u mesnim proizvodima je *Debaryomyces hansenii* (teleomorfni oblik *Candida fomatata*) (Coppola i sur., 2000.; Encinas i sur., 2000.; Cocolin i sur., 2006.; Cano-García i sur., 2013.) koji je izrazito otporan na sol i može se dobro razvijati ne samo na površini već i u unutrašnjosti fermentirane kobasice (Coppola i sur., 2000.), a ima važnu ulogu u razvoju arome i boje (Kovačević, 2014.; Flores i sur., 2015.).

### 2.3.2. PLIJESNI

#### 2.3.2.1. Definicija i građa plijesni

Pored bakterija, kao česti uzročnici kvarenja različitih namirnica biljnog i životinjskog podrijetla javljaju se različite vrste plijesni koje u povoljnim okolišnim uvjetima rastu u/na namirnicama.

Plijesni su ubikvitarni eukariotski organizmi koji pripadaju carstvu gljiva (Hajsig i Delaš, 2016.). Tim mikroskopskim sitnim gljivama tijelo je građeno od gustog sustava cjevastih stanica koje ne sadrže klorofil i obično su bezbojne. Nitaste su građe, a niti tj. hife promjera od 2 do 10  $\mu\text{m}$ , rastu kao isprepletana masa koja se naziva micelij (Duraković 1996.; Naglič i sur., 2005.). Većina hifa je vegetativna, one aktivno rastu i oblikuju tijelo plijesni u koloniju. Zračne hife na ostalim dijelovima nose strukture za razmnožavanje i sudjeluju u tvorbi paučinastog oblika kolonije plijesni. Na krajevima zračnih hifa izrastaju posebne stanice, tzv. spore, od kojih svaka može stvoriti novu koloniju plijesni u povoljnim okolišnim uvjetima. Spore nastaju u velikim količinama, lagano se šire te su mnoge otporne na uvjete koji uništavaju vegetativne stanice. Stoga je njihova funkcija trostruka: razmnožavanje, širenje i zaštita vrste od štetnih okolišnih uvjeta (Duraković i Duraković, 2003.). Konidiofora se stvara na zračnim hifama, a sastoji se od izdužene drške *stipe* koja završava proširenjem, tzv. *vezikulom*. Na površini vezikule nalazi se niz sponosnih stanica *fijalida* koje mogu, ali i ne moraju biti na *metulama*. Uzastopnim dijeljenjem stanica *fijalida* nastaju nespodne spore *konidije* (Duraković i Duraković, 2003.) (Slika 6).



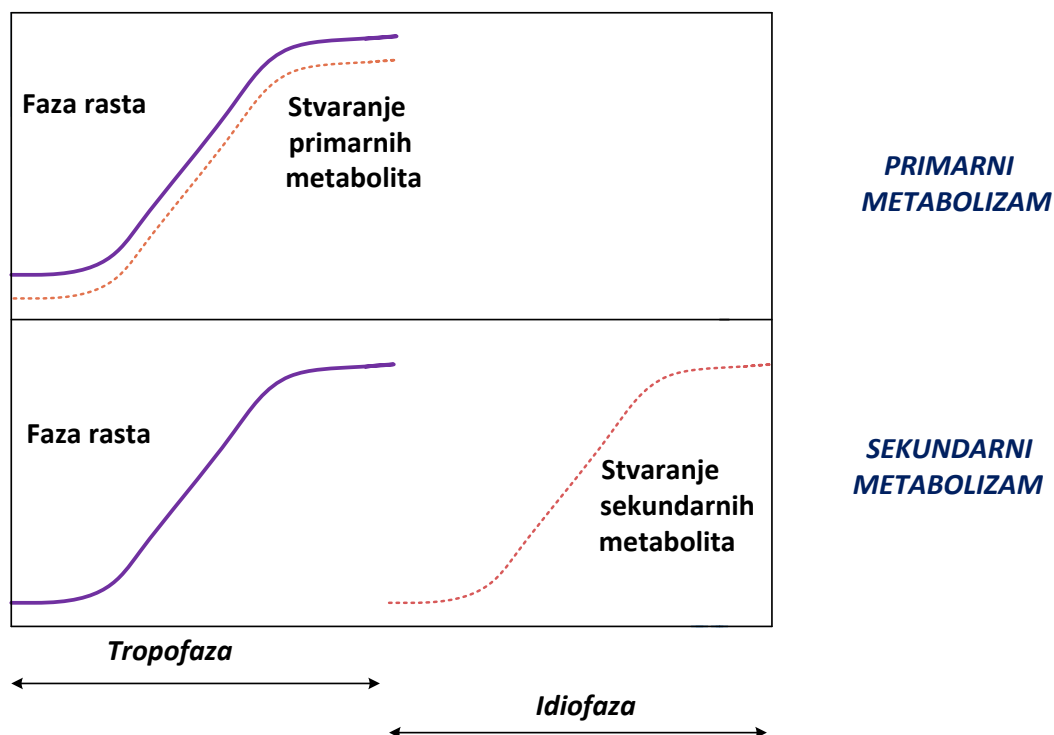
**Slika 6** Građa plijesni *Penicillium spp.* i *Aspergillus spp.* (Izrada shematskog prikaza: Perković, I., 2018.)

### 2.3.2.2. Metabolizam plijesni

Metabolizam mikroorganizama, pa tako i plijesni, ovisno o izvoru ugljika u supstratu, može se podijeliti na dva tipa: primarni i sekundarni metabolizam (**Slika 7**). Primarni metabolizam je onaj kada su izvor ugljika u supstratu jednostavni ugljikohidrati (glukoza, fruktoza, saharoza i škrob). Stanice koriste ugljikohidrate kao izvor energije za rast, razvoj i održavanje. Transportni mehanizmi za prijenos glukoze i nižih šećera koriste najmanju količinu energije. Primarni metaboliti su takve molekule koje omogućuju rast stanice, tj. potiču fazu rasta (tropofazu) i to su najčešće molekule poput etanola, organskih kiselina i nekih enzima. Autotrofni mikroorganizmi kao izvor ugljika koriste anorganske tvari, dok heterotrofni koriste ugljikove organske spojeve. Kao izvor ugljika gljive koriste uglavnom ugljikohidrate, ali i lipide, proteine i alkohole (Kalenić i sur., 1995.).

Sekundarnim metabolizmom nastaju tvari koje nisu nužne za rast plijesni, a sintetiziraju ih kao reakciju na okolinu (npr. borba za supstrat s nekim drugim mikroorganizmom) (Pleadin i sur., 2018.). Sekundarni metaboliti nisu vezani uz rast stanica i obično nastaju u vremenu nakon faze rasta i ta faza se naziva idiofaza. Najčešći sekundarni metaboliti su antibiotici, mikotoksini, imunosupresivi, hipokolesterolni, antitumorski i antiparazitski agensi, te bioinsekticidi (Janeš, 2009.). Tvorba sekundarnih metabolita ovisi o vrsti i soju plijesni te njezinim genetskim svojstvima (Pleadin i sur., 2018.).





**Slika 7** Primarni i sekundarni metabolizam mikroorganizama (Janeš, 2009.)

Energiju potrebnu za odvijanje metaboličkih reakcija mikroorganizmi mogu proizvoditi fotosintezom (fototrofni mikroorganizmi) i kemosintezom (kemosotrofni mikroorganizmi). Kako gljive ne posjeduju pigment klorofil, potrebnu energiju proizvode kemijskim (oksidacijskim) procesima i stoga se nazivaju kemoheterotrofni mikroorganizmi. Procesi razgradnje ugljikohidrata su najviše istraživane aktivnosti gljiva. Još je Foster 1949. godine utvrdio da su to najznačajniji metabolički procesi kojima gljive osiguravaju energiju i ugljik za rast i izgradnju staničnih organela. Kvasci i plijesni cijepaju različite vrste ugljikohidrata do glukoze koja se zatim metabolizira Embden-Meyerhof-Parnas-ovim putem do piruvata. Piruvat zatim ulazi u ciklus trikarbonskih kiselina čiji se krajnji stadiji uključuju u respiratorni lanac (Kalenić i sur., 1995.).

Razgradnja šećera može se odvijati u prisutnosti ili u odsutnosti kisika. Aerobnom oksidacijom – asimilacijom šećera npr. glukoze nastaje ugljični dioksid i voda (**Formula 1**).



Anaerobnom razgradnjom – fermentacijom šećera npr. glukoze nastaje etilni alkohol i ugljik dioksid (**Formula 2**).



Dušik dobivaju razgradnjom nitrata, amonijaka i aminokiselina.

Za rast plijesni ključna je dostupnost spora plijesni, dostupnost hrane, odgovarajuća temperatura i udio vlage. Uklanjanje bilo kojeg od navedenog, spriječit će rast plijesni. Većina plijesni raste pri sobnim temperaturama.

### 2.3.2.3. Uvjeti za rast plijesni

Općenito, plijesni su prilagođene okolišu koji je nepovoljan za rast bakterija; one tako mogu preživjeti na mjestima gdje se ne očekuje mikrobni rast. Uglavnom žive kao saprofiti u tlu, na drveću i drugom bilju u vegetaciji odakle se njihove lebdeće čestice (dijelovi micelija, konidije, spore) šire zrakom (Hajsig i Delaš, 2016.). Nekoliko je faktora koji utječu na rast plijesni:

- *Aktivitet vode ( $a_w$ )*. Slobodna voda u hrani najlakše se mjeri kao aktivitet vode. Aktivitet vode je fizikalni parametar kojeg je u mikrobiologiju uveo Scott još 1957., a pokazao je da aktivitet vode učinkovito kvantificira odnos između vlage u hrani i količine vode s kojom mikroorganizam raspolaže u reakcijama metabolizma. Također, dominantan je čimbenik okoliša koji regulira stabilnost hrane (Pitt i Hocking, 2009.). Vrijednosti  $a_w$  mogu se kretati od 0 do 1. Rast i metabolička aktivnost mikroorganizama uključujući bakterije i gljive ovise o dostupnoj vodi. Različite skupine mikroorganizama posjeduju različite minimalne vrijednosti  $a_w$  za svoj rast, koje su prikazane u **Tablici 6**. Aktivitet vode je u funkciji masenog udjela vode, vrste i količine tvari otopljenih u vodi te načina vezanja vode u proizvodu. Aktivitet vode snižavaju tvari topljive u vodi (npr. NaCl) te tvari koje bubre (npr. proteini u mesu) (Kovačević, 2014.; 2017.).

Svaka plijesni ima svoj optimalni  $a_w$  i raspon  $a_w$  potreban za rast, pa je tako prema nekim autorima optimalni  $a_w$  npr. za *Aspergillus* spp. 0,980, za *Rhizopus* spp. od 0,995 do 0,980 te za *Penicillium* spp. 0,9935. Kako bi se otklonila mogućnost rasta plijesni  $a_w$  bi trebao biti ispod 0,62, iako  $a_w$  ispod 0,70 zaustavlja rast većine plijesni uzročnika kvarenja namirnica. Smanjenje  $a_w$  ispod optimuma za određenu plijesni odgađa klijanje spora te smanjuje stopu rasta i stoga može biti važan čimbenik u očuvanju hrane

(Frazier, 1958.). Plijesni koje mogu rasti pri niskom  $a_w$  nazvane su kserofili ( $a_w < 0,85$ ) (Pitt i Hocking, 2009.),

**Tablica 6** Minimalni aktivitet vode za mikroorganizme (Adams i Moss, 2008.)

SKUPINA MIKROORGANIZAMA	MINIMALNI $a_w$
Većina gram negativnih bakterija	0,97
Većina gram pozitivnih bakterija	0,90
Većina kvasaca	0,88
<b>Većina plijesni</b>	<b>0,80</b>
Halofilne bakterije	0,75
<b>Kserofilne plijesni</b>	<b>0,61</b>

- **Temperatura.** Većina plijesni se smatra mezofilima te dobro rastu na sobnoj temperaturi. Optimalna temperatura za većinu plijesni je oko 25 – 30 °C, a samo manji broj njih dobro raste pri temperaturama od 35 do 37 °C. Termofilne plijesni, tj. one koje rastu samo pri visokim temperaturama, nisu od značaja za kvarenje hrane. No, ukoliko dođe do pregrijavanja, npr. u slučaju poput vlažnog zrna, tada termofilne plijesni mogu biti veliki problem. Termotolerantne plijesni, tj. vrste koje mogu rasti i na umjerenim i visokim temperaturama su od puno većeg značaja. *Aspergillus flavus* i *Aspergillus niger* mogu rasti između 8 °C i 45 °C te su najdestruktivnije poznate vrste plijesni (Pitt i Hocking, 2009.),
- **Kisik i pH vrijednost.** Plijesni koje uzrokuju kvarenje hrane zahtijevaju slobodan kisik za svoj razvoj. Količina kisika otopljenog u supstratu ima znatno veći utjecaj na rast plijesni nego atmosferski kisik (Pitt i Hocking, 2009.) Plijesni najbolje uspijevaju u kiselom pH području, no njihova pojava nije ograničena samo na kisele proizvode. Većina plijesni raste u širokom rasponu koncentracije vodikovih iona (pH od 2 do 8,5) (Frazier, 1958.), a optimum im je oko pH 5 (Duraković i Duraković, 2003.; Hajsig i Delaš, 2016.),
- **Hranjive tvari.** Općenito, metabolizmu plijesni najviše odgovaraju supstrati bogati ugljikohidratima, dok će bakterije prije utjecati na kvarenje hrane bogate bjelančevinama. Za svoj metabolizam trebaju izvor ugljika, dušika, vode te anorganskih soli koje su izvor nutritivnih elemenata (fosfora, kalija, magnezija, željeza, cinka, sumpora i bakra) (Hajsig i Delaš, 2016.).

### 2.3.2.4. Plijesni u trajnim (fermentiranim) kobasicama

Općenito, plijesni se klasificiraju kao plijesni polja (*Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* i *Fusarium*), plijesni skladišta (*Penicillium*, *Aspergillus*) i plijesni uznapredovalog kvarenja (*Papulaspora*, *Sordaria*, *Mucor*, *Chaetomium* i *Rhizopus*) (Duraković i Duraković, 2003.; Mašek i Šerman, 2006.; Delaš, 2010.).

Plijesni su prisutne u sirovom nadjevu kulena i drugih fermentiranih kobasica, ali se nakon procesa fermentacije i dugotrajnog zrenja mogu naći i u finalnom proizvodu na površini ovitka ili u pukotinama i šupljinama nadjeva (Kovačević, 2014.). Rast plijesni na površini mesa često je poželjna, tj. ima pozitivno djelovanje. Takve plijesni sudjeluju u razvoju arome i boje kroz oksidaciju laktata, proteolizu, razgradnju aminokiselina, lipolizu,  $\beta$ -oksidaciju masti; osiguravaju manji i postupniji gubitak vode iz proizvoda te nastanak suhog i tamnog ruba; štite od spontane kolonizacije nepoželjnim plijesnima, kvascima i bakterijama te sprječavaju sluzavost i ljepljivost površine ovitka; sprječavaju užeglost (razgrađuju i troše perokside); doprinose stabilizaciji boje kroz katalaznu aktivnost, potrošnju kisika te štiteći površinu ovitka od svjetlosti; olakšavaju guljenje ovitka; ne uzrokuju alergije i mikoze (Sonjak i sur., 2011.; Kovačević, 2014.). No, postoje i vrste plijesni koje imaju negativno djelovanje na kvalitetu i sigurnost finalnog mesnog proizvoda (**Tablica 7**).

**Tablica 7** Plijesni negativnog djelovanja na kvalitetu i sigurnost finalnog mesnog proizvoda (Kovačević, 2014.)

ROD PLIJESNI	NEGATIVNO DJELOVANJE
<i>Aspergillus</i>	Proizvodnja mikotoksina; Proizvodnja antibiotika penicilina ( <i>P. nalgiovense</i> ); Stvaranje nepoželjnih crnih, smeđih i zelenih mrlja na površini proizvoda; Stvaranje neugodnog mirisa i okusa; Poticanje lipolitičkih i proteolitičkih promjena; Razvoj truležnih bakterija;
<i>Penicillium</i>	
<i>Fusarium</i>	
<i>Claviceps</i>	
<i>Alternaria</i>	
<i>Pithomyces</i>	
<i>Phoma</i>	
<i>Stachybotrys</i>	
<i>Diplodia</i>	

Konzerviranje soljenjem i sušenjem, fermentacijom i/ili dimljenjem obično se koristi za kontrolu rasta plijesni te se nakon zrenja često kombinira sa skladištenjem pri temperaturi hlađenja ili pakiranjem u modificiranoj atmosferi. Dok svaki od tih postupaka ne može sam spriječiti rast plijesni, njihovo kombinirano korištenje („konzerviranje preprekama“) općenito je dovoljno za zaštitu mesnih proizvoda. Međutim, do pojave plijesni može doći ukoliko se proizvodnja mesnih proizvoda odvija u nekontroliranim uvjetima. Pri tome, najčešći problemi koji mogu uzrokovati pojavu plijesni su neodgovarajuća fermentacija koja vodi do polaganog pada pH vrijednosti te varijacije u procesu dimljenja ili nekontrolirane fluktuacije temperature i vlažnosti zraka tijekom procesa sušenja i zrenja. Također, neuobičajeno visoke koncentracije spora plijesni u zraku, koje su najčešće podrijetlom s okolnih njiva pod kulturama žitarica, mogu dovesti do veće pojave plijesni na proizvodu (**Slika 8**) (Sørensen i sur., 2009.; Kovačević, 2014.).



(a)

(b)

**Slika 8.** Površina (a) Slavonskog kulena i (b) Slavonske kobasice obrasla plijesnima tijekom procesa zrenja (foto.: Perković, I., 2018.)

Plijesni koje se pojave na površini proizvoda, potrebno je kontinuirano uklanjati tijekom procesa zrenja proizvoda (Sørensen i sur., 2008.; Kovačević, 2014.). Prema dosadašnjim istraživanjima, u svrhu sprječavanja prekomjerne pojave plijesni na površini proizvoda tijekom procesa zrenja, neophodno je osigurati razmak između proizvoda (ne smiju se

dodirivati) čime se osigurava nesmetano strujanja zraka. Zrenje proizvoda potrebno je provoditi u komorama za zrenje opremljenim biološkim mikrofilterima za dovod svježeg zraka; površine komore za zrenje neophodno je prethodno (prije unosa i operacije zrenja) premazati fungicidnim premazima; na uzlazu u komoru za zrenje potrebno je osigurati tlačnu barijeru koja sprječava ulaz vanjskog zraka u komoru (Kovačević i sur., 2014.a).

Tijekom procesa proizvodnje trajnih (fermentiranih) kobasica, meso je procesirano kroz niz faza koje karakteriziraju različiti fizikalno-kemijski parametri. Kvaliteta sirovine, fizikalni i biokemijski faktori, proizvođačka praksa te higijena proizvodnog okruženja određuju vrstu plijesni koja će se pojaviti na fermentiranim proizvodima (Asefa i sur., 2010.). U **Tablici 8** dane su opće značajke razvoja plijesni u mesu i mesnim proizvodima.

**Tablica 8** Opće značajke razvoja plijesni u mesu i mesnim proizvodima (Asefa i sur. 2011.; Kovačević, 2014.)

PARAMETRI	RAST PLIJESNI
Temperatura	- 12 do 55 °C
pH	1,7 – 10
$a_w$	min. 0,62
Redoks potencijal	aerobni uvjeti
Maseni udio soli	do 20%
Utjecaj začina	inhibicija

Provedena istraživanja pokazuju da površinske plijesni koje spontano obrastaju trajne (fermentirane) kobasice tijekom procesa zrenja dominantno čine rodovi *Penicillium* i *Aspergillus* (Lopez-Diaz i sur., 2001.; Mižáková i sur., 2002.; Comi i sur., 2004.; Tabuc i sur., 2004.; Sørensen i sur., 2008.; Asefa i sur., 2009.; Iacumin i sur., 2009.; Frece i sur., 2010.; Sonjak i sur., 2011.; Pleadin i sur., 2017 .), čije pojedine vrste mogu u određenim uvjetima producirati mikotoksine, (OTA) kao dominantni kontaminant i AFB<sub>1</sub> s manjom učestalošću i u manjim koncentracijama u odnosu na OTA. U **Tablici 9** prikazani su uvjeti za rast nekih vrsta plijesni koje se mogu pojaviti na površini Slavenskog kulena i Slavonske kobasice.

Tablica 9 Opći uvjeti za rast nekih vrsta plijesni

RAST PLIJESNI	VRIJEDNOST/ REFERENCA						
	Kozakiewicz i Smith, 1994.	Pitt i Hocking, 2009.	Wheeler i sur., 1991.	Sweeney i sur., 1998.	Pitt i sur., 1991.	Núñez i sur., 2000.	Leggieri i sur., 2017.
<i>Aspergillus flavus</i>							
$T / ^\circ\text{C}$	-	10 – 48 (33) <sub>op</sub>	-	10 – 43 (32 – 33) <sub>op</sub>	-	-	-
$a_w$	(0,71 - 0,74) <sub>min</sub>	0,80 – 0,84	-	-	-	-	-
pH	-	-	2,1 - 11,2	2 - 10	-	-	-
<i>Penicillium commune</i>							
$T / ^\circ\text{C}$	-	(25) <sub>op</sub>	-	-	-	-	-
$a_w$	-	0,85	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium polonicum</i>							
$T / ^\circ\text{C}$	-	-	-	-	-	(20 – 25) <sub>op</sub>	-
$a_w$	-	-	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium verrucosum</i>							
$T / ^\circ\text{C}$	-	0 – 31 (20) <sub>op</sub>	-	0 – 31 (20) <sub>op</sub>	-	-	5 – 35 (20) <sub>op</sub>
$a_w$	-	0,80	-	-	-	-	do 0,87
pH	-	2, 1 - 10	(6 – 8) <sub>op</sub>	-	-	-	-
<i>Penicillium solitum</i>							
$T / ^\circ\text{C}$	-	rast pri niskim temperatu rama, ne raste pri 37 °C	-	-	(20 – 25) <sub>op</sub>	-	-
$a_w$	-	-	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor plumbeus</i>							
$T / ^\circ\text{C}$	-	(20 – 25) <sub>op</sub>	-	-	-	-	-
$a_w$	-	(0,93) <sub>min</sub>	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor racemosus</i>							
$T / ^\circ\text{C}$	-	(20 – 25) <sub>op</sub>	-	-	-	-	-
$a_w$	-	(0,92) <sub>min</sub>	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	-	-	-

Na fermentiranim (trajnim) kobasicama češća je pojava *Penicillium*, nego *Aspergillus* ili *Eurotium* vrsta plijesni zbog bolje sposobnosti rasta *Penicillium* vrsta pri niskom  $a_w$  (0,78 – 0,83) te pri niskim i umjerenim temperaturama koje uglavnom vladaju u komorama za zrenje kobasica (Frisvad i Samson, 2004.; Sørensen i sur., 2008.; Berni, 2015.).

### 2.3.2.5. Plijesni producenti mikotoksina

Mnogi rodovi plijesni sadrže vrste koje mogu producirati mikotoksine, ali većinu mikotoksina produciraju rodovi *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium* (Frisvad, 2011.; Varga i sur., 2015.). Do sada je poznato više od 220 vrsta plijesni producenata mikotoksina (Sweeney i Dobson, 1998.; Duraković i Duraković, 2003.). Više vrsta plijesni može producirati isti mikotoksin, ali isto tako jedna vrsta plijesni može producirati više vrsta mikotoksina (Mižáková i sur., 2002.; Bennett i Klich, 2003; Pleadin i sur., 2018.). Odsutnost vidljivih plijesni u/na hrani ne znači nužno da nisu prisutni mikotoksini, budući da su isti vrlo stabilni te kao otporni perzistiraju tijekom procesiranja hrane. Isto tako, rast toksikotvornih plijesni na mesnim proizvodima ne znači nužno i prisutnost mikotoksina. Podloga, temperatura,  $a_w$  i pH vrijednost najčešći su faktori koji mogu utjecati na produkciju mikotoksina. U **Tablici 10** navedeni su uvjeti pri kojima neke, najčešće vrste plijesni mogu producirati određeni mikotoksin. Kontaminacija mikotoksinima je moguća tijekom svih faza proizvodnje i čuvanja hrane i hrane za životinje (Pleadin i sur., 2018.).

**Tablica 10** Raspon vrijednosti aktiviteta vode i temperature pri kojima je uočena produkcija mikotoksina za neke vrste plijesni povezane s mesnim proizvodima (Sørensen i sur. 2009.)

VRSTA PLIJESNI	MIKOTOKSIN	$a_w$ RASPON	T / °C RASPON	Autor
<i>Aspergillus flavus</i>	AFB <sub>1</sub>	≥ 0,84; ≥ 0,80	12 – 35	Northolt i sur., 1982; Ribeiro i sur. 2006.
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AFB <sub>1</sub>	≥ 0,84	12 - 35	Northolt i sur., 1982.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	OTA	≥ 0,87	12 - 35	Northolt i sur., 1982; Ribeiro i sur., 2006.
<i>Penicillium verrucosum</i>	OTA	≥ 0,85	2 - 34	Northolt i sur., 1982.
<i>Penicillium nordicum</i>	OTA	-	15 - 30	Geisen, 2004.
<i>Penicillium commune</i>	Ciklopiazonična	≥ 0,90	12 - 30	Sosa i sur., 2002.



	kiselina			
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin	$\geq 0,95$	0 - 28	Northolt i sur., 1982.; Sweeney i sur., 1998.
<i>Penicillium polonicum</i>	Verukozidin	$\geq 0,95$	12 - 30	Núñez i sur., 2000.

### Plijesni roda *Penicillium*

U odnosu na rod *Aspergillus*, rod *Penicillium* je raznolikiji u smislu broja vrsta i raspona staništa u kojima mogu rasti. Pripadnici ovog roda su u mogućnosti rasti u gotovo svakom okruženju i u širokom rasponu  $a_w$ , temperature i pH. Mnoge vrste su psihotrofne i sposobne su uzrokovati kvarenje hrane pri rashladnim temperaturama. Plijesni roda *Penicillium* obično oblikuju isprepletene, neprozirne, plosnate kolonije s bijelim zračnim micelijem, dok su spore zasebne, obično okrugle, ovalne ili rjeđe cilindrične te imaju glatku ili hrapavu površinu. Rod *Penicillium* čine plijesni razreda *Ascomycetes* te sadrži više od 200 poznatih vrsta plijesni (Pleadin i sur., 2018.). U prošlosti je postojalo mnogo nejasnoća u pogledu proizvodnje mikotoksina od strane *Penicillium* spp. i to uglavnom zbog pogrešne identifikacije toksikotvornih vrsta (Sweeney i sur., 1998.).

Tri najvažnija mikotoksina koja mogu producirati plijesni roda *Penicillium* su OTA, patulin i citrinin, dok zasada jedini dobro utvrđeni producenti OTA iz roda *Penicillium* pripadaju vrstama *Penicillium verrucosum* i *Penicillium nordicum* (Cabañes i sur., 2010.; Ostry i sur., 2013.; Wang i sur., 2016.).

*Penicillium verrucosum* i *Penicillium nordicum* imaju vrlo sličan promjer kolonija na hranjivim podlogama, no njihova je ekologija različita (Cabañes i sur., 2010.). *Penicillium nordicum* općenito kontaminira hranu bogatu NaCl-om i bjelančevinama, kao što su meso i sirevi, dok *Penicillium verrucosum* uglavnom kontaminira proizvode biljnog podrijetla (žitarice), ali je pronađen i u šunki i usoljenim maslinama (Pitt i Hocking, 2009.; Cabañes i sur., 2010.; Schmidt-Heydt i sur., 2012.; Ostry i sur., 2013.). *Penicillium nordicum* može dobro rasti pri niskim temperaturama (15 °C) i povećanoj količini soli (5% NaCl) i stoga je vrlo često izoliran iz ohlađenih i slanah prehrambenih proizvoda (Frisvad i Samson, 2004.; Sonjak i sur., 2011.).

*Penicillium verrucosum* je psihrofilna plijesan koju je 1901. opisao Dierckx. U početku je pogrešno označen kao sinonim za vrstu *Penicillium viridicatum*, no daljnja istraživanja su

pokazala da su to dvije odvojene vrste (Pitt, 1987.; Pitt i Hocking, 2009.). Unutar vrste *Penicillium verrucosum* opisano je i šest sojeva koji se prvenstveno razlikuju po boji kolonija: *Penicillium verrucosum* var. *album*, *Penicillium verrucosum* var. *corymbiferum*, *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, *Penicillium verrucosum* var. *ochraceum*, *Penicillium verrucosum* var. *melanochlorum*, *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* (Mycobank Database, 2017.).

Nakon sedam dana inkubacije na CYA i MEA agaru postiže rast u promjeru između 15 i 25 mm, micelij je bijele boje sa sivozelenim ili zelenim konidijama, dok je revers na CYA agaru žutosmeđe do tamnosmeđe boje, a kod nekih sojeva može biti i ružičast. Postoje i sojevi *Penicillium verrucosum* koji mogu imati drugačije obojene konidije, tamnozeleno i plavozelene. Ova vrsta plijesni ima izražen miris koji je opisan najčešće kao zemljani i opor, a ponekad može biti aromatičan ili voćni (Samson i sur., 2004.; Mycobank Database, 2017.). *Penicillium verrucosum* je važna vrsta plijesni koja može producirati OTA u umjerenim i hladnijim klimama (Pitt i Hocking, 2009.; El Khoury i Atoui, 2010.; Ostry i sur., 2013.).

### **Plijesni roda *Aspergillus***

U rod *Aspergillus* svrstano je oko 250 vrsta (Klich, 2007.) od kojih je tek dvadesetak patogeno za čovjeka (Kalenić i sur., 1995.). Postoji oko osam teleomorfni, tj. spolnih rodova (npr. *Eurotium*) koji imaju stanje razvoja konidija kao rod *Aspergillus*, iako mnoge *Aspergillus* vrste (oko 60 %) nemaju poznato spolno stanje. Među čisto aseksualnim aspergilima su i neke od najvažnijih vrsta poput *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus fumigatus* (Webster i Weber, 2007.). *Aspergillus* vrste su vrlo raširene u prirodi, prije svega u zemljištu, a mogu se naći i na raznim uskladištenim proizvodima kao što su žitarice, orašasti plodovi, začini. Češće se javljaju u tropskim i suptropskim, nego u umjerenim klimatskim područjima. Ubrajaju se u gospodarski važne gljive koje se koriste za sintezu kemikalija, biosintetske transformacije i proizvodnju enzima. Negativna strana im je sudjelovanje u kvarenju velikog broja namirnica te proizvodnja aflatoksina, koji predstavljaju najvažniju skupinu mikotoksina (Pitt i Hocking, 2009.). Aflatoksine sintetizira samo nekoliko vrsta roda *Aspergillus*, od kojih su *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* najznačajniji predstavnici (Bennett, 2010.).

*Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* su plijesni koje rastu na velikom broju podloga, osobito u uvjetima visoke vlažnosti (Bennett, 2010.). Vrsta *Aspergillus flavus* je najznačajniji proizvođač aflatoksina po kojemu su i dobili ime. Ovu vrstu je prvi opisao Link 1809. godine, zajedno sa skupinom srodnih vrsta (Hedayati i sur., 2007.; Amaike i Keller, 2011.). *Aspergillus flavus* je široko rasprostranjen zbog proizvodnje velikog broja spora koje se lako šire zrakom. Prirodno stanište plijesni vrste *Aspergillus flavus* je tlo gdje živi kao saprofit na ostacima uginulih biljaka i životinja, a ima i važnu ulogu u biodegradaciji (Klich, 2007.). Razmnožava se prvenstveno aseksualno dijeljenjem micelija ili germinacijom spora (Horn, 2009.). Visoka temperatura i relativno niska vlažnost zraka pogoduju rastu ove vrste plijesni.

Kao kultura, *Aspergillus flavus* je karakterizirana brzim rastom baršunastih žutozelenih do smeđih kolonija sa zlatnom do crvenosmeđom stražnjom stranom (Hedayati i sur., 2007.), koje su obično promjera 65 - 70 mm, nakon 7 dana rasta u tami pri 25 °C na CYA (**Slika 9**) (Klich, 2007.). Vrsta *Aspergillus flavus* proizvodi konidije koje su različite po obliku i veličini, imaju relativno tanke, slabo hrapave stijenke. Konidije plijesni vrste *Aspergillus parasiticus* su sferične i s relativno debelim, hrapavim stijenkama, iako ima i iznimaka unutar sojeva. Kao dodatna razlika navode se veće vezikule plijesni *Aspergillus flavus* (do 50 µm u promjeru) koje obično nose metule, dok su vezikule plijesni *Aspergillus parasiticus* manje (rijetko dosegnu od 30 µm u promjeru) i metule su rijetke (El Khoury, i sur., 2011.).



**Slika 9** *A.flavus* na CYA agaru

(foto.: Perković, I., 2018.)

*Aspergillus ochraceus* je vrsta plijesni iz roda *Aspergillus*, poznata po proizvodnji OTA, jednog od najzastupljenijih mikotoksina koji mogu kontaminirati hranu, ujedno meso i mesne proizvode. Otkrio ga je 1877. godine njemački botaničar i mikolog Karl Adolf Wilhelm. Mogućnost sinteze toksičnih tvari kod plijesni *Aspergillus ochraceus* je otkrivena u laboratoriju, kada su otkrivena tri važna toksina – najtoksičniji, okratoksin A, u manjoj količini i manje toksični okratoksin B i C. Osim toga, *Aspergillus ochraceus* sintetizira i penicilinsku kiselinu i emodin (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.). Prirodno stanište ovoj vrsti plijesni je tlo, no pronađena je i u kukuruzu, kikirikiju, riži, orašastim plodovima, voću i mesnim proizvodima (Wilson i sur., 2002.; Comi i sur., 2004.; Iacumin i sur., 2009.; Iacumin i sur., 2012.). Uglavnom kolonizira u umjerenim i tropskim geografskim područjima (Magan i Aldred, 2007.). Promjer kolonija na CYA agaru je 40 – 55 mm nakon 7 dana, micelij je bijel, konidije svijetložute do zlatnožute, a boja reversa sivonarančasta do smeđa. Kolonije na MEA agaru su također promjera 40 – 55 mm, slične su onima na CYA agaru, ali prilično rijetke, dok je revers blijedo žutosmeđe ili malo tamnije boje (Pitt i Hocking, 2009.).

## 2.4. MIKOTOKSINI

Kontaminacija mesnih proizvoda toksikotvornim plijesnima može biti potencijalni izvor mikotoksina u navedenim proizvodima. Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji mogu inducirati akutne i toksične efekte kod ljudi i životinja. Naziv im dolazi od grčke riječi „mykes“ što znači gljiva i latinske riječi „toxicum“ što znači otrov (Turner i sur. 2009.). To su kemijski spojevi u pravilu bez boje i okusa, a koji se međusobno razlikuju po vrsti plijesni koja ih producira, kemijskoj strukturi, mehanizmu djelovanja i toksičnosti (Sweeney i Dobson, 1999.; Bennett i Klich, 2003.; Delaš, 2010.). Predstavljaju globalni problem budući su prisutni svugdje u svijetu, a prema procjeni FAO-a, 25% hrane koja se proizvodi u svijetu kontaminirano je mikotoksinima. Posebno je zabrinjavajuće to što ih se pronalazi u vrlo važnim i različitim poljoprivrednim i prehrambenim proizvodima. Glavni izvor mikotoksina kod ljudi su žitarice i proizvodi na bazi žitarica te proizvodi životinjskog podrijetla (FAO, 2007.).

U prehrambeni lanac mikotoksini mogu dospjeti na više načina (**Tablica 11**). Kako gotovo sve biljke mogu biti podloga za rast toksikotvornih plijesni, do sinteze mikotoksina može doći na

polju, tijekom berbe/žetve, transporta, skladištenja sirovina, prerade, skladištenja gotovih proizvoda i njihove distribucije. Mikotoksini u namirnice životinjskog podrijetla najčešće dopijevaju neizravnim putem preko hrane za životinje koja je kontaminirana mikotoksinima (tzv. *carry over effect*). Ukoliko farmske životinje konzumiraju takvu kontaminiranu hranu postoji velika vjerojatnost da će se mikotoksini kumulirati u različitim tkivima koja se nadalje koriste u proizvodnji hrane životinjskog podrijetla (Pleadin i sur., 2013; Perši i sur., 2014.).

**Tablica 11** Mogućnosti kontaminacije namirnica i krmiva mikotoksinima (Delaš, 2010.)

PROIZVODI KONTAMINIRANI PLIJESNIMA		OSTACI U ŽIVOTINJSKIM TKIVIMA I PRODUKTIMA	NAMIRNICE KOJE SE PROIZVODE POMOĆU PLIJESNI
BILNOG PODRIJETLA	ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Žitarice</li> <li>• Uljarice (kikiriki)</li> <li>• Voće</li> <li>• Povrće</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Miješana krmiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mlijeko</li> <li>• Mliječni proizvodi</li> <li>• Meso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sirevi</li> <li>• Fermentirani mesni proizvodi</li> <li>• Orijentalna fermentirana hrana</li> </ul>

Mikotoksini su stabilni i u pravilu otporni na povišenu temperaturu, a njihova biosinteza ovisi o vrsti toksikotvorne plijesni, o klimatskim i okolišnim uvjetima te fizikalno-kemijskim čimbenicima ( $T =$  od - 5 do 60 °C; sadržaju vode u namirnici = 13% i više;  $a_w > 0,65$ ; pH = 3 - 9; koncentraciji plinova u atmosferi i sastavu namirnice) (Delaš, 2010.).

Toksični učinak mikotoksina na čovjekovo i životinjsko zdravlje naziva se mikotoksikoza, čija težina ovisi o toksičnosti mikotoksina, opsegu izloženosti, dobi i nutritivnom statusu pojedinca te mogućim sinergijskim učincima više različitih mikotoksina, kao i sinergijskim učincima s drugim toksinima u izloženom organizmu (Peraica i sur., 1999.). Uglavnom su uzrokovane konzumiranjem hrane kontaminirane mikotoksinima, a u manjoj mjeri mogu se javiti i nakon udisanja mikotoksina ili njihova unosa preko kože u organizam (IARC 1993.; IARC 2012.). Javljaju se u zemljama lošeg socijalno-ekonomskog stanja te lošeg poljoprivredno-veterinarskog standarda, osobito kod uzgoja, transporta i skladištenja hrane biljnog i životinjskog podrijetla (Delaš, 2010.). Bolesti koje mikotoksini mogu izazvati kod ljudi prikazane su u **Tablici 12**. Općenito imaju hepatotoksično (aflatoksini), nefrotoksično (OTA i citrinin), karcinogeno (AFB<sub>1</sub>, OTA i fumonizin B<sub>1</sub>), dermonekrotično (trihoteceni), neurotoksično (fumonizin B<sub>1</sub>), imunosupresijsko (aflatoksini, OTA i T-2 toksin) i estrogenu

(zearalenon) djelovanje (FAO, 1997.; Hussein i Brasel, 2001.). Neki djeluju i teratogeno i genotoksično (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

**Tablica 12** Bolesti u ljudi koje se povezuju s unošenjem mikotoksina (Delaš, 2010.)

SUSTAV	ZDRAVSTVENI PROBLEM	MIKOTOKSINI
Krvožilni sustav	Smanjenje elastičnosti žila, unutarnje krvarenje	Aflatoksini, safratoksini
Probavni sustav	Proljevanje, povraćanje, oštećenje jetre, anoreksija	Aflatoksini, T-2 toksin, DON
Dišni sustav	Poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća	Trihoteceni
Živčani sustav	Drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija	Tremorgenih trihoteceni
Koža	Osip, osjet vrućine, fotosenzitivnost	Trihoteceni
Mokraćni sustav	Oštećenje bubrega	OTA, citrinin
Reproduktivni sustav	Sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima	T-2 toksin, zearalenon
Imunosustav	Promjene ili potpuno uništenje	Aflatoksini, T-2 toksin, OTA

Literaturni podaci pokazuju da unosu mikotoksina u organizam potrošača mogu pridonijeti i proizvodi životinjskog podrijetla kao što su meso i mesni proizvodi, bilo kao rezultat neizravnog prijenosa od domaćih životinja koje se koriste za proizvodnju hrane životinjskog podrijetla, izloženih kontaminiranim krmivima i krmnim smjesama (*carry over efekt*), ali i mješavinama začina koje se koriste u njihovoj proizvodnji (Pleadin i sur., 2013.a; Perši i sur., 2014.) ili izravne kontaminacije proizvoda plijesnima koje pod određenim uvjetima mogu producirati mikotoksine (Gareis i Wolff, 2000.).

Ranijim istraživanjima mikotoksina u trajnim (fermentiranim) kobasicama dokazana je prisutnost mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> i to u sljedećim proizvodima: Slavonska kobasica (koncentracija OTA = 2,03 - 6,68 µg/kg (Markov i sur., 2013.; Vulić i sur., 2014.); koncentracija AFB<sub>1</sub> = < 1 - 1,2 µg/kg (Markov i sur., 2013.)), Slavonski kulen (koncentracija OTA = 0,9 - 19,84 µg/kg (Frece i sur., 2010.; Vulić i sur., 2014.; Pleadin i sur., 2017.); koncentracija AFB<sub>1</sub> = 0,1 - 14,46 µg/kg (Frece i sur., 2010.; Pleadin i sur., 2015.a; Pleadin i sur., 2017.)).

Dubina do koje mikotoksini prodiru u meso i mesne proizvode, te ih posljedično kontaminiraju, ovisi o sposobnosti prodiranja micelija vrste koja ga producira te sposobnosti

mikotoksina da migrira u određeni proizvod (Núñez i sur., 2007.). Difuzija mikotoksina u mesne proizvode ovisi o kemijskim svojstvima mikotoksina kao što su polaritet i naboj te kemijskim i fizikalnim svojstvima mesnih proizvoda kao što su distribucija vode i masti te pH vrijednost (Sørensen i sur., 2009.).

### 2.4.1. Okratoksin A

Najtoksičniji predstavnik skupine okratoksina je okratoksin A (OTA) koji je izoliran iz plijesni *Aspergillus ochraceus* i identificiran 1965. godine u Južnoj Africi (Van der Merwe, 1965). OTA je sekundarni metabolit kojeg produciraju različite vrste plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium* koje su navedene u **Tablici 13** (Moss, 2002.; Iacumin i sur., 2009.).

**Tablica 13** Plijesni producenti OTA (Moss, 2002.; Abrunhosa i sur., 2010.; El Khoury i Atoui, 2010.)

ROD	SEKCIJA	VRSTA
<i>Aspergillus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus cretensis</i> ; <i>Aspergillus flocculosus</i> ; <i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>Aspergillus pseudoelegans</i> ; <i>Aspergillus roseoglobulosus</i> ; <i>Aspergillus sclerotiorum</i> ; <i>Aspergillus steynii</i> ; <i>Aspergillus sulphureus</i> ; <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ; <i>Neopetromyces muricatus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Flavi</i>	<i>Aspergillus alliaceus</i> ; <i>Petromyces albertensis</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Nigri</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i> ; <i>Aspergillus lacticoffeatus</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Aspergillus sclerotioniger</i> ; <i>Aspergillus citricus</i> ; <i>Aspergillus fonsecaeus</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Viridicata</i>	<i>Penicillium nordicum</i> ; <i>Penicillium verrucosum</i>

U hladnijim regijama OTA sintetiziraju uglavnom plijesni rodova *Penicillium* (najčešće *Penicillium verrucosum* i *Penicillium nordicum*) dok su rodovi *Aspergillus* (najčešće *Aspergillus ochraceus*) karakteristični za sintezu OTA u toplijim zemljopisnim regijama (Marin i sur., 2009.). Produkcija OTA ovisi o različitim faktorima, kao što su: temperatura,  $a_w$  i sastav podloge koji utječu na fiziologiju plijesni producenata. Međunarodna agencija za istraživanje raka klasificirala je ovaj mikotoksin u skupinu 2B, mogućih ljudskih karcinogena, a brojna istraživanja ukazala su na njegova teratogena, neurotoksična, genotoksična, imunotoksična i nefrotoksična svojstva (IARC, 1993.). Glavni ciljni organ mu je bubreg.

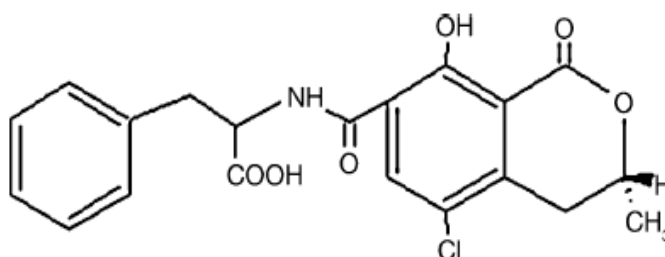
Značajne koncentracije OTA u hrani biljnog podrijetla pronađene su uglavnom u istočnoj Europi, i to u pšenici, riži, kukuruzu, raženom brašnu, heljdi i žitaricama za doručak (Pohland i

sur., 1992.) te u mesu i mesnim proizvodima kao rezultat sekundarne odnosno neizravne kontaminacije (Petzinger i Weidenbach 2002.; Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007.; Amézqueta i sur., 2009.). Ranija istraživanja u Republici Hrvatskoj također su ukazala na kontaminaciju žitarica i krmiva s OTA te izloženost ljudi i životinja ovom kontaminantu (Pepeljnjak i sur., 2008.). Literaturni podaci govore da može biti prisutan u mesu i iznutricama farmskih životinja, posebno u bubrezima i jetri svinja te nadalje i proizvodima životinjskog podrijetla proizvedenim iz kontaminiranih sirovina kao rezultat prirodne kontaminacije krmnih smjesa namijenjenih hranidbi životinja za proizvodnju mesa (Madsen i sur., 1982.; Boorman, 1989.; Gareis, 1996.; Jørgensen, 1998.; Peraica i sur., 1999.; Creppy, 1999.; Gareis i Scheuer 2000.; Gareis i Wolff, 2000.; Walker i Larsen, 2005.; Pleadin i sur., 2013.a; Perši i sur., 2014.).

Literaturni podaci navode da najviše OTA sadrže mesni proizvodi na bazi iznutrica, kao što su krvavice i jetrenjače (Petzinger i Weidenbach 2002.; Perši i sur., 2014.). Dall'Asta i sur. (2010.) i Pleadin i sur. (2013.) spominju dimljene mesne proizvode, a Pfohl-Leszkowicz i Manderville (2007.) i druge proizvode životinjskog podrijetla u kojima su detektirane značajne razine OTA.

#### 2.4.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva OTA

Prema IUPAC-ovoj nomenklaturi puno ime OTA glasi: L-fenilalanin-N-[(5-kloro-3,4-dihidro-8hidroksi-3-metil-1-okso-1H-2-benzopiran-7-il)karbonil]-(R)-izokumarin (Slika 10) (Ringot i sur., 2006.). Njegova opća struktura sadrži  $\beta$  - fenilalanin povezan amidnom vezom s dihidroizokumarinskom skupinom (El Khoury i Atoui, 2010.).



Slika 10 Kemijska struktura OTA (Ringot i sur., 2006.)



Molekulska formula:  $C_{20}H_{18}ClNO_6$  (Ringot i sur., 2006.)

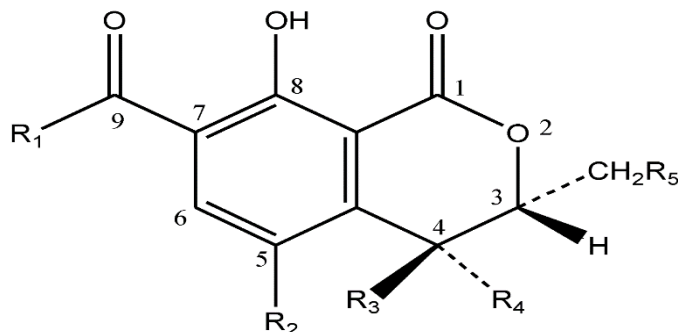
Molekularna težina: 403,82 g/mol (Ringot i sur., 2006.)

OTA je slaba organska kiselina s vrijednošću konstante disocijacije (pKa) od 7,1 (AFSSA, 2009.). Čini ga bijeli prah kristalične strukture temperature taljenja oko 90 °C. Pod UV svjetlom OTA pokazuje intenzivnu zelenu fluorescenciju u kiselom mediju te plavu fluorescenciju u alkalnim uvjetima. U kiselom i neutralnom pH području topljiv je u organskim otapalima (alkoholi, ketoni, kloroform), slabo je topljiv u vodi i nije topljiv je u petroleteru. U alkalnim uvjetima topljiv je u vodenoj otopini natrijevog hidrogen-bikarbonata (El Khoury i Atoui, 2010.; Abrunhosa i sur., 2010.). U etanolnoj otopini pohranjenoj na 4 – 8 °C, zaštićenoj od svjetla, stabilan je preko godinu dana, dok je u metanolnoj otopini pohranjenoj na -20 °C stabilan i nekoliko godina (Neely i West, 1972.; Valenta, 1998.). Među mikotoksinima, molekula OTA je osobito stabilna te može preživjeti većinu postupaka obrade hrane, pojavljujući se u gotovim proizvodima, a nakon kontaminacije hrane vrlo teško ju je ukloniti daljnjim postupcima njezine obrade. Kovačević i sur. (2014.b) su pokazali da tehnološke operacije, tj. metode konzerviranja (dimljenje, fermentacija, sušenje i zrenje) koje se koriste u tehnologiji proizvodnje Slavenskog kulena, te dodatak soli i začina, ne utječu na promjenu/smanjenje koncentracije OTA u uzorcima Slavenskog kulena tijekom šestomjesečnog procesa proizvodnje odnosno zrenja.

#### 2.4.1.2. Metabolizam OTA

Zbog sličnosti s fenilalaninom OTA inhibira biosintezu makromolekula (proteini, DNA, RNA) i adenzin trifosfata (ATP), povećava lipidnu peroksidaciju te negativno utječe na metabolizam glukoze i homeostazu kalcija u biološkom sustavu (Dirheimer i Creppy, 1991.; Petrik i sur. 2003.; Marin i sur., 2009.). OTA se biotransformira enzimima faze I i faze II. **Slika 11** prikazuje opću strukturu koja je zajednička svim OTA metabolitima, a u **Tablici 14** navedene su karakteristične strukture nekih od njih (El Khoury i Atoui, 2010.). Glavni metabolički put OTA sastoji se od njegove hidrolize u manje toksične spojeve (**Slika 12**). U crijevima se OTA hidrolizira u netoksičan  $OT\alpha$  koji nastaje cijepanjem peptidne veze (Kószegi i Poór, 2016.). Pokazalo se *in vitro* da ovu hidrolizu mogu obaviti karboksipeptidaza A, tripsin, kimotripsin i katepsin C (Ringot i sur. 2006.). U jetri OTA metabolizira u nekoliko manjih

metabolita poput 4(R)-, 4(S)-hidroksiokratoksin i 10 hidroksiokratoksin A (Marin i sur., 2009.). Postoji još nekoliko metabolita povezanih s OTA, osobito okratoksin B (OTB), okratoksin C (OTC), okratoksin  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) i okratoksin  $\beta$  (OT $\beta$ ).

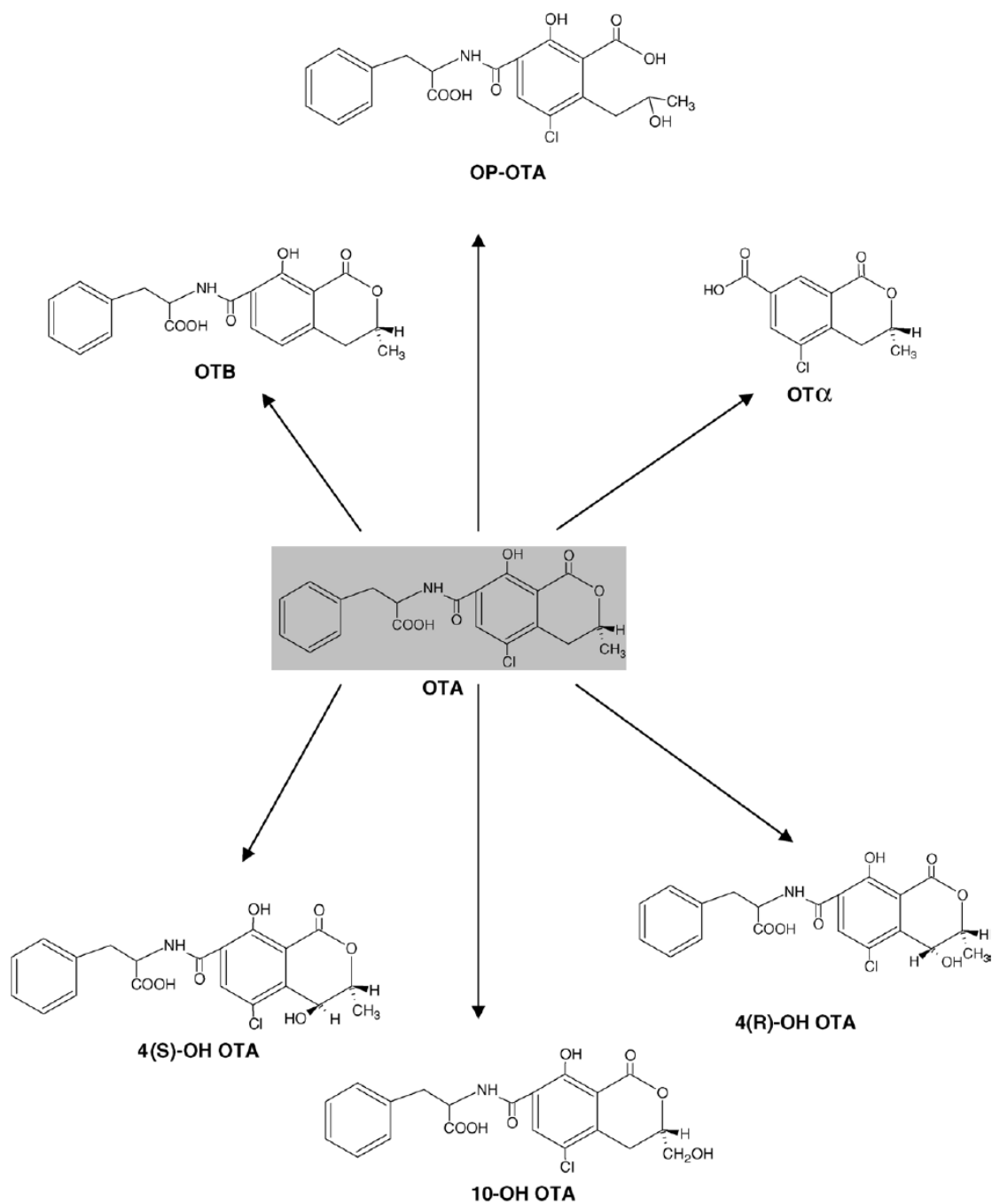


**Slika 11** Općenita struktura OTA metabolita (El Khoury i Atoui, 2010.)

**Tablica 14** Karakteristična struktura nekih OTA metabolita (El Khoury i Atoui, 2010.)

NAZIV	R1	R2	R3	R4	R5
Okratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin B	Fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin C	Etil-ester, fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin A metil-ester	Metil-ester, fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin B metil-ester	Metil-ester, fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin B etil-ester	Etil-ester, fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin $\alpha$	OH	Cl	H	H	H
Okratoksin $\beta$	OH	H	H	H	H
4-R-hidroksiokratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	OH	H
4-S-hidroksiokratoksin A	Fenilalanin	Cl	OH	H	H
10-hidroksiokratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	H	OH

R1, R2, R3, R4, R5 – funkcionalne grupe

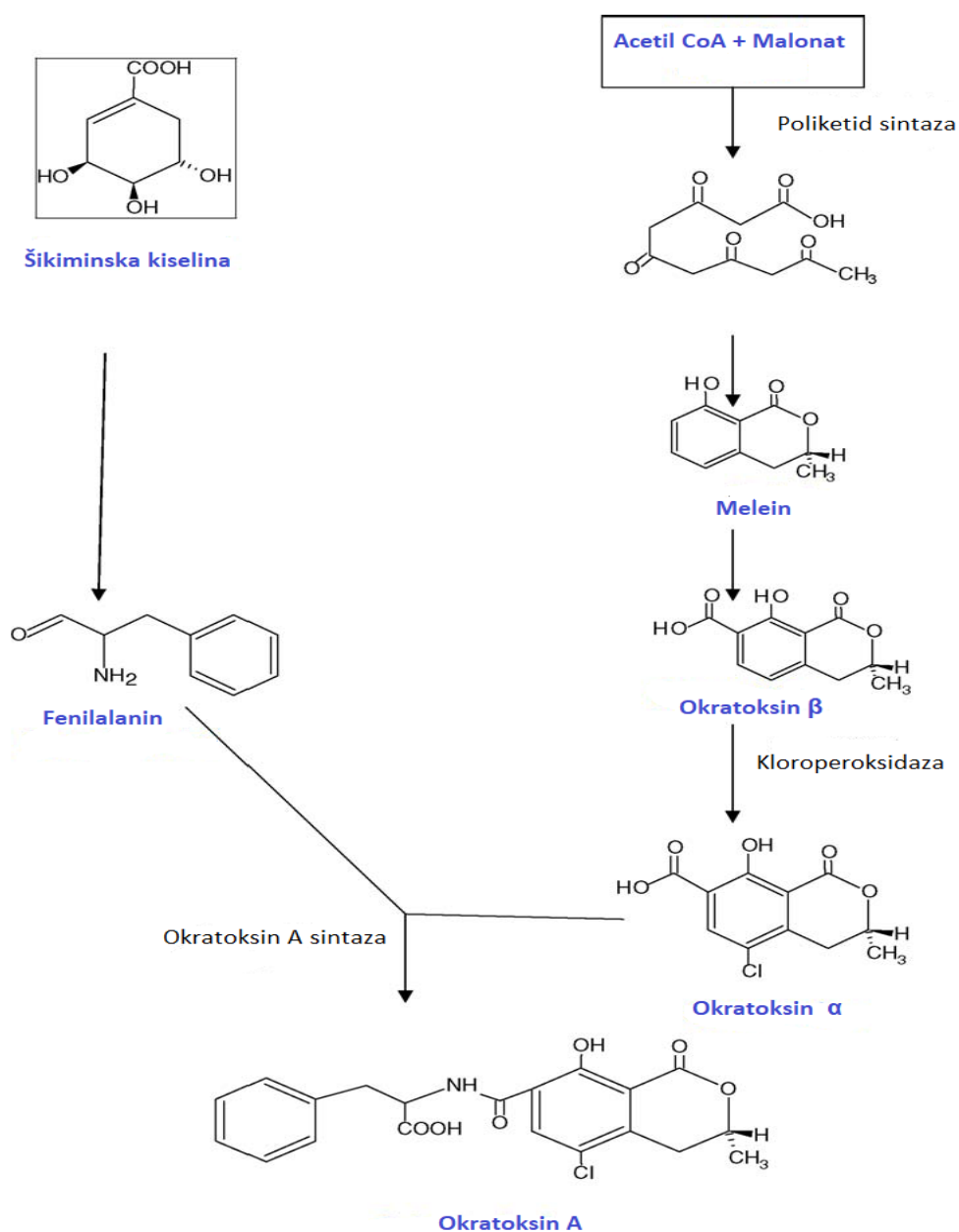


**Slika 12** Metabolizam OTA (Ringot i sur. 2006.)

Raspodjela toksina u tkivima pokazuje da se koncentracija OTA smanjuje, kako slijedi: bubreg > pluća > jetra > slezena > mišićno tkivo > masno tkivo > srce > mozak (Bailly i Guerre, 2009.; Pleadin i sur., 2016.).

### 2.4.1.3. Biosinteza OTA

Za razliku od ostalih važnih mikotoksina, nije poznato mnogo o biosintetskom putu OTA (Slika 13) u bilo kojoj vrsti plijesni. Neki eksperimenti su pokazali da je dihidroizokumarinski dio molekule formiran iz acetata i malonata preko puta poliketidne sinteze dok fenilalaninski dio potječe od puta šikiminske kiseline (Ringot i sur., 2006.; El Khoury i Atoui, 2010.).



Slika 13 Biosinteza OTA (Ringot i sur., 2006.)

Prvi korak u sintezi izokumarinskog poliketida sastoji se od kondenzacije jedne acetatne jedinice (acetyl-CoA) do četiri jedinice malonata. Taj korak zahtjeva aktivnost enzima poliketid-sintaze koji se smatra ključnim enzimom u biosintezi OTA. Gen koji kodira poliketid-sintazu razlikuje se između *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta. Naime, *Aspergillus ochraceus* ima gen za poliketid-sintaze koji se eksprimira samo u optimalnim uvjetima za sintezu OTA i samo tijekom ranog stadija sinteze mikotoksina. Jednom formiran, poliketidni se lanac modificira stvaranjem laktonskog prstena (sinteza meleina) i dodavanjem karboksilne skupine koja potječe od S-metilmationina ili natrij formata (sinteza OT $\beta$ ). Nakon toga, atom klora ugrađuje se djelovanjem kloroperoksidaze (sinteza OT $\alpha$ ). Sintetaza OTA katalizira povezivanje OT $\alpha$  i fenilalanina (sinteza OTA) (Ringot i sur., 2006.).

#### 2.4.1.4. Zakonska regulativa za OTA

Najveće dopuštene količine (NDK) OTA u hrani definirane su Uredbom Komisije europske zajednice (EZ) br. 1881/2006 koja propisuje najveće dopuštene količine mikotoksina u različitim vrstama hrane. Međutim, spomenuta Uredba ne propisuje NDK za OTA u mesu i proizvodima od mesa. Ipak, pojedine zemlje Europske unije, npr. Italija i Danska, u okviru nacionalnog zakonodavstva, za ovu skupinu proizvoda (meso, mesne proizvode i iznutrice) imaju propisanu NDK vrijednost od 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Najveće dopuštene količine OTA u hrani za životinje također nisu definirane, ali njegove preporučene orijentacijske vrijednosti u krmivima i različitim krmnim smjesama navode se u Preporuci Komisije 2006/576/EZ.

#### 2.4.2. Aflatoksini

Aflatoksini su sekundarni metaboliti koje produciraju pretežno plijesni iz roda *Aspergillus* prikazane u **Tablici 15** (Varga i sur., 2015.). Po prvi puta su otkriveni početkom šezdesetih godina nakon što je više od 100 000 purana u Engleskoj uginulo zbog trovanja krmnom smjesom koja je sadržavala brazilski kikiriki kontaminiran aflatoksinima. Aflatoksini mogu kontaminirati različite prehrambene i poljoprivredne proizvode, kao i hranu za životinje, uzrokujući ozbiljan ekonomski i zdravstveni problem diljem svijeta (Pleadin i sur., 2014.a; Pleadin i sur., 2015.c).

**Tablica 15** *Aspergillus* vrste koje mogu producirati aflatoksine (Varga i sur., 2015.)

ROD	SEKCIJA	VRSTA	VRSTA AFLATOKSINA
<b><i>Aspergillus</i></b>	<i>Flavi</i>	<i>Aspergillus arachidicola</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus bombycis</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus flavus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus nomius</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus parasiticus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus pseudonomius</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus togoensis</i>	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus transmontanensis</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus mottae</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>
	<i>Aspergillus sergii</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub>	
	<i>Ochraceorosei</i>	<i>Aspergillus ochraceoseus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>
		<i>Aspergillus rambellii</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub>
	<i>Nidulantes</i>	<i>Aspergillus astellatus</i> (= <i>Emericella astellata</i> )	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus olivicola</i> (= <i>Emericella olivicola</i> )	AFB <sub>1</sub>
		<i>Aspergillus venezuelensis</i> (= <i>Emericella venezuelensis</i> )	AFB <sub>1</sub>

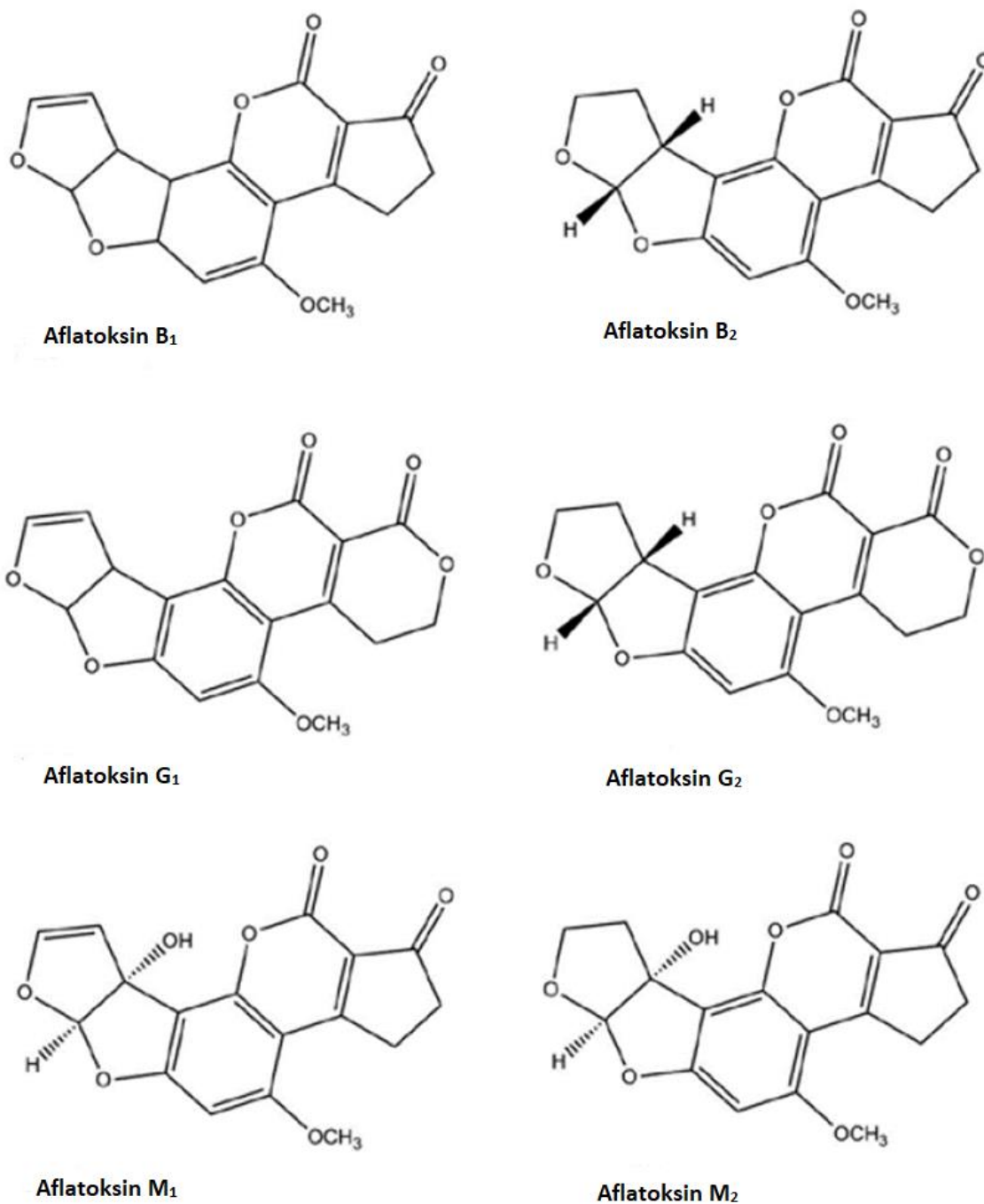
AFB<sub>1</sub> – aflatoksin B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub> – aflatoksin B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> – aflatoksin G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub> – aflatoksin G<sub>2</sub>

Aflatoksini se uglavnom pojavljuju u umjereno kontinentalnim, subtropskim i tropskim regijama, a brzina i stupanj onečišćenja ovise o različitim čimbenicima kao što su temperatura, vlaga, aktivitet vode, fizičko oštećenje supstrata i ostali uvjeti skladištenja (EFSA, 2007.).

Među svim aflatoksinima najznačajniji je AFB<sub>1</sub> koji predstavlja najsnažniji hepatokarcinogen poznat u sisavaca, a Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) svrstala ga je u karcinogene 1. skupine (IARC, 1993.).

### 2.4.2.1 Fizikalno-kemijska svojstva aflatoksina

Kemijski, aflatoksini su derivati difurokumarina među kojima su najvažniji predstavnici: aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoksin B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoksin G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) i aflatoksin G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). Oznake B i G su dobili po boji njihove fluorescencije u ultraljubičastom svjetlu. AFB<sub>1</sub> i AFB<sub>2</sub> emitiraju plavu (eng. „blue“), dok AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub> emitiraju zelenu (eng. „green“) boju. Uz navedena četiri aflatoksina, značajni su i aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) i aflatoksin M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) (**Slika 14**), čija pojavnost u hrani je vezana isključivo za mlijeko i mliječne proizvode. Naime, aflatoksini B skupine se metabolizmom prevode u hidroksilirani oblik aflatoksina M, a koji se kao takav izlučuje putem urina, kod sisavaca mlijekom, a kod peradi u jajima (EFSA, 2004.; Herzallah, 2009.). Metabolizmom AFB<sub>1</sub> dobiva se AFM<sub>1</sub>, a metabolizmom AFB<sub>2</sub> nastaje AFM<sub>2</sub>.



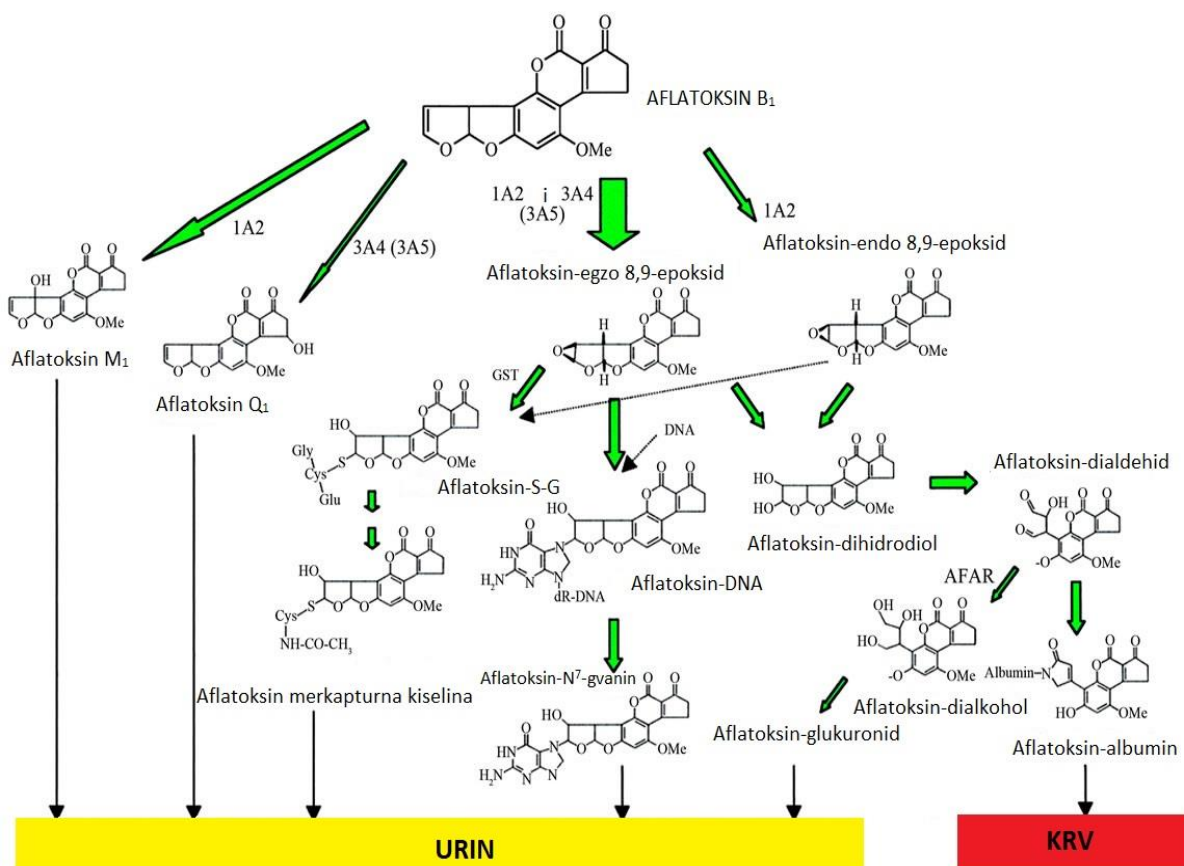
**Slika 14** Kemijske strukture najčešćih aflatoksinâ (Pleadin i sur., 2014.b)

Aflatoksinâ su slabo topljivi u vodi (10-30 µg/mL), netopljivi su u nepolarnim otapalima, a topljivi u polarnim organskim otapalima poput metanola i kloroforma, a osobito u dimetil sulfoksidu. Nestabilni su i pri pH vrijednostima manjim od 3 i većim od 10.



### 2.4.2.2. Metabolizam aflatoksina

Za razliku od mnogih mikotoksina, aflatoksini su bez metaboličke aktivacije relativno netoksični i ne predstavljaju veliku opasnost za žive organizme. U tijelu se aflatoksini, uglavnom AFB<sub>1</sub>, biotransformiraju uz pomoć CYP (citokrom) enzima do različitih metabolita (Slika 15) od kojih je AFB<sub>1</sub>-egzo-8,9-epoksid (AFBO) osobito aktivan te se veže na biomolekule u tijelu (DNA, RNA). Biotransformacija aflatoksina uglavnom se odvija u jetri, no moguća je i u bubrezima te enterocitima koji imaju visoke količine CYP3A enzima te metabolizmom smanjuju apsorpciju u tankom crijevu (Wild i Turner, 2002.). Biotransformacija omogućuje produktu iz faze I da se uklopi u enzimski sustav faze II gdje postaje konjugiran s drugom supstancom kako bi se dobila polarna ili u vodi topljiva tvar koja se lako može izlučiti iz bubrega (Bbosa i sur., 2013.).



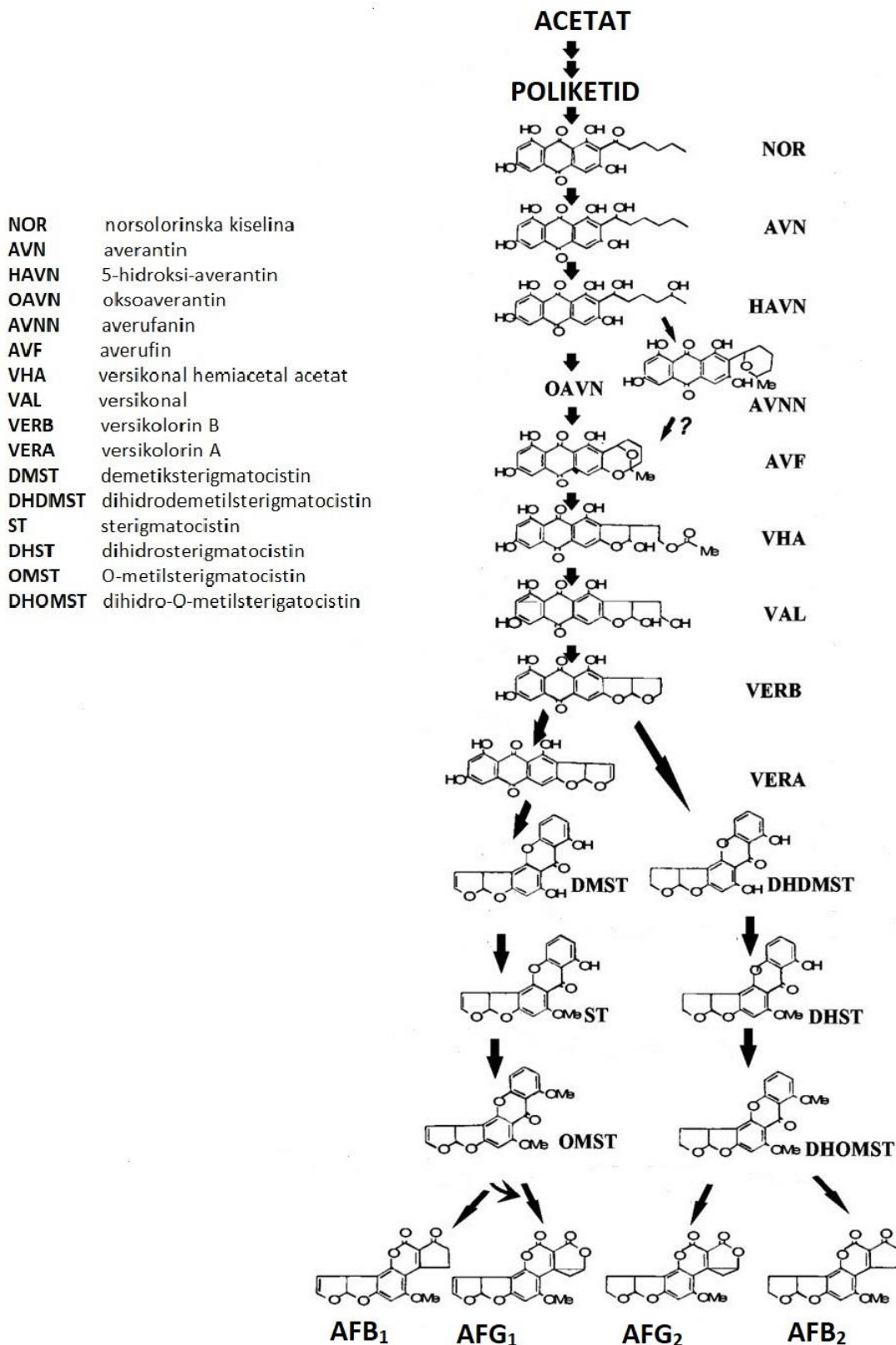
Slika 15 Biotransformacija AFB<sub>1</sub> u organizmu (Wild i Turner, 2002.)

Najvažniji CYP enzimi koji sudjeluju u metabolizmu aflatoksina su: CYP3A4 – pomoću kojeg nastaje AFBO, AFP1 (aflatoksin P<sub>1</sub>) i AFQ1 (aflatoksin Q<sub>1</sub>) dok CYP1A2 može dovesti do stvaranja nekih egzoepoksida, ali i visokog udjela endoepoksida i AFM<sub>1</sub>. CYP3A5 može stvoriti egzoepoksid i nešto manje AFQ<sub>1</sub>. Kod ljudi, kao i kod drugih vrsta, vezanje DNA i karcinogenost AFB<sub>1</sub> rezultat je njegove pretvorbe u AFBO pomoću CYP3A4 (IARC, 2012.).

Osim osnovnih oblika aflatoksina koje biosintetiziraju plijesni, postoje i drugi oblici koji se dobivaju daljnjim metabolizmom metabolita, poput: AFM<sub>2a</sub> (aflatoksin M<sub>2a</sub>), AFG<sub>2a</sub> (aflatoksin G<sub>2a</sub>), AFGM<sub>2</sub> (aflatoksin GM<sub>2</sub>) (Bbosa i sur., 2013.).

### **2.4.2.3. Biosinteza aflatoksina**

Poput ostalih kumarina i aflatoksini slijede poliketidni put biosinteze gdje se acetat prevodi u poliketid, pa antrakinon, ksanton te na kraju u molekulu aflatoksina. Biosintetski put aflatoksina (**Slika 16**) se može podijeliti u tri dijela. U prvom dijelu dolazi do stvaranja osnovnog dijela aflatoksina od acetata do deketetida norsolorinske kiseline (NOR), koja je prvi stabilni metabolit. Drugi dio obuhvaća transformaciju NOR-a do versikolorina B (VERB), dok u trećem dijelu dolazi do oblikovanja i transformacije ogranaka do konačne podjele aflatoksina na AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub> (Cleveland i sur., 2009.).



Slika 16 Biosinteza aflatoksina (Yu, 2012.)

Na biosintezu aflatoksina utječu mnogi okolišni faktori, a posebno nutritivni sastav supstrata na kojem plijesan raste. Izvori ugljika i dušika imaju glavnu ulogu u regulaciji biosinteze. Jednostavni ugljikohidrati (glukoza, saharoza, maltoza, galaktoza) potiču biosintezu aflatoksina za razliku od složenih ugljikohidrata (škrob) ili tvari poput peptona (Yu i sur., 2003.).

#### 2.4.2.4. Zakonska regulativa za aflatoksine

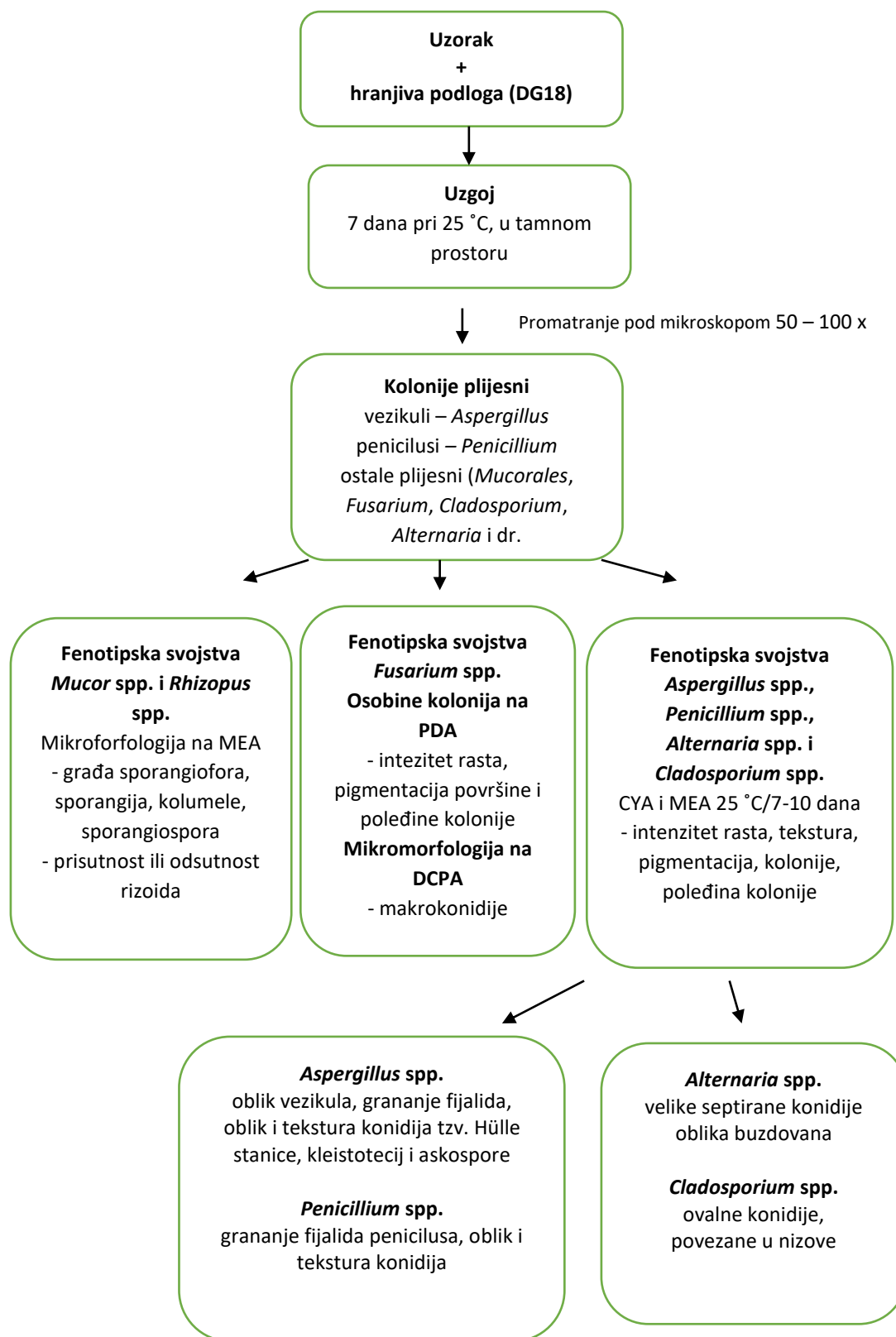
U EU NDK za aflatoksine u hrani, uključujući posebno razinu AFB<sub>1</sub> te ukupnu razinu aflatoksina, propisane su Uredbom Komisije br. 1881/2006 te dodatno Uredbom Komisije br. 165/2010. Međutim, navedene Uredbe ne propisuju NDK vrijednosti ovih mikotoksina u mesu i mesnim proizvodima. Najveće dopuštene količine za AFB<sub>1</sub> u krmivima, trenutno važeće u svim državama članicama EU i propisane Direktivom Komisije 2003/100/EC te izmjenom i dopunom 2002/32/EC, značajno se razlikuju od onih propisanih u drugim državama svijeta. Spomenutom Direktivom definirane su NDK po vrstama krmiva i krmnih smjesa u ovisnosti o svrsi za koju se krmivo koristi.

### 2.5. METODE ZA IDENTIFIKACIJU PLIJESNI

Identifikacija plijesni može se provesti na osnovu makro- i mikromorfologije (tradicionalna metoda), ekstrofitnog profila, sekvencioniranja specifične genske regije (molekularna metoda) te određivanja gljivičnih antigena i metabolita, što se najčešće primjenjuje u medicinskoj mikologiji (Hajsig i Delaš, 2016.). U svrhu identifikacije se koristi čista kultura, bez kontaminacija. Kulture se uzgajaju 7 dana pri temperaturi od 25 °C na dva standardna agara: Czapek ekstrakt kvasca (CYA – Czapek yeast extract agar) i sladni ekstrakt agar (MEA – Malt extract agar).

#### 2.5.1. Tradicionalna metoda identifikacije

Postupak identifikacije plijesni prikazan je shematski na **Slici 17** (Hajsig i Delaš, 2016.).



**Slika 17** Shematski prikaz uzgoja i identifikacije najznačajnijih rodova plijesni (Hajsig i Delaš, 2016.)

Fenotipske osobitosti tj. makromorfologija (kolonije na hranjivoj podlozi) i mikromorfologija (spolne i nespolne plodne strukture) služe za identifikaciju plijesni na razini roda i/ili vrste. Makroskopska svojstva poraslih kolonija određuju se nakon sedam dana inkubacije na standardnim hranjivim podlogama. Pri određivanju makromorfologije promatra se boja površine i poledine porasle kolonije, promjer i tekstura kolonije, boja podloge, te rast pri 4 °C i 37°C. Za promatranje mikromorfoloških značajki plijesni najčešće se izrađuju preparati u laktofenolnom modrilu.

### 2.5.2. Molekularna metoda identifikacije – Lančana reakcija polimerazom (PCR)

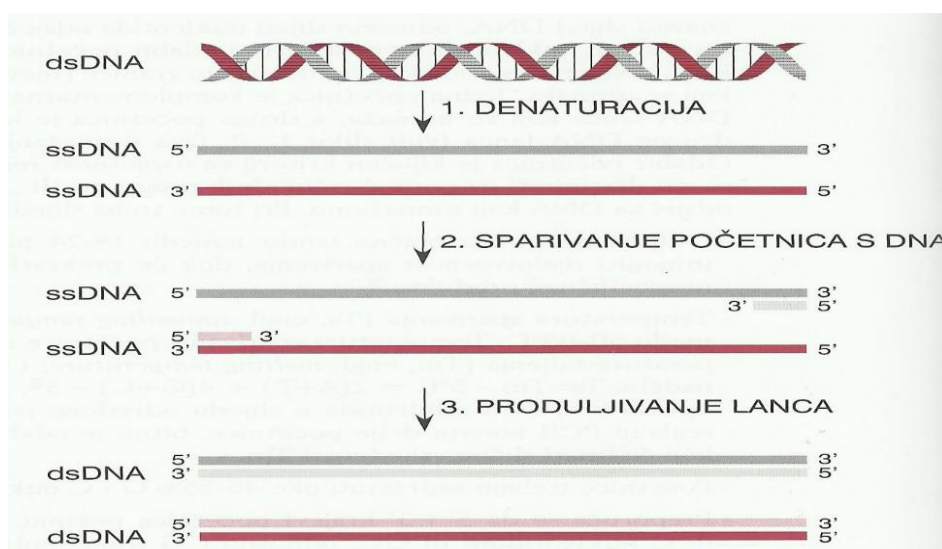
Lančana reakcija polimerazom (PCR, eng. *Polymerase chain reaction*) je molekularna metoda umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*. Osnovni preduvjet za ovu reakciju je poznavanje barem malog dijela nukletidnog slijeda ciljane DNA što omogućava sintezu kratkih jednolančanih komplementarnih oligonukleotidnih početnica (eng. *primer*) koje su komplementarne početnom i završnom dijelu sekvence gena koji se želi umnožiti (Habrun, 2014.). Odabir početnica je ključan kriterij za uspješnost PCR reakcije. Početnice se mogu izabrati ručno (prema slijedu) ili uz pomoć specijaliziranih programa (Katušić Hećimović, 2007.). Za PCR reakciju potrebna su i sva četiri deoksiribonukleotid fosfata (deoksiadenozin trifosfat - dATP, deoksiguanozin trifosfat - dGTP, deoksicitidin trifosfat - dCTP i deoksitimidin trifosfat - dTTP). Enzim DNA polimeraza mora biti stabilan pri višestrukim uzastopnim ciklusima grijanja pa se danas najčešće koristi DNA polimeraza izdvojena iz bakterija poput vrste *Thermus aquaticus* (*Taq* polimeraza), koja se obično nalazi u termalnim vodama. DNA polimeraza može produžiti kratke oligonukleotidne početnice dodavajući na njezin kraj nukleotide koji će biti komplementarni bazama na odgovarajućim mjestima u kalupu.

Svaki ciklus PCR reakcije sastoji se od tri dijela (**Slika 18**). U **Tablici 16** navedeni su karakteristični uvjeti (temperatura i vrijeme) za svaki korak PCR reakcije (Katušić Hećimović, 2007.).

**Tablica 16** Karakteristični uvjeti za svaki korak PCR reakcije

KORAK PCR REAKCIJE	VRIJEME	TEMPERATURA
Početno zagrijavanje	3 - 5 min	94 - 96 °C
<b>20 - 40 ciklusa:</b>		
- denaturacija	15 - 30 s	94 - 96 °C
- sparivanje početnica	15 - 45 s	50 - 65 °C
- produljivanje DNA lanca	15 s - 2 min	72 °C
Završno produljivanje DNA lanca	7 min	72 °C
Hlađenje reakcijske smjese	∞	4 °C

Reakcijsku smjesu najprije je potrebno zagrijati na 95 °C kako bi se aktivirale polimeraze te omogućila denaturacija ciljne DNA. Hlađenjem smjese omogućava se sparivanje početnica sa svojim komplementarnim bazama u jednolančanim odvojenim nizovima ciljne DNA. Potom se temperatura povisuje te termostabilna DNA polimeraza ugrađuje u novi lanac DNA i više od 150 nukleotida u sekundi (Habrun, 2014.). Temperatura ovog koraka ovisi o DNA polimerazi koja se koristi, a za Taq polimerazu to je najčešće 72 °C. Uobičajeni broj ciklusa se kreće od 20 – 40, u kojima količina umnožene DNA eksponencionalno raste. U konačnici nastaje  $2^n$  kopija odsječka DNA, gdje „n“ predstavlja broj ciklusa. Reakcija se izvodi u PCR aparatu (eng. *thermocycler*) koji zagrijava i hladi epruvete te na taj način postižu temperature karakteristične za svaki korak PCR reakcije (Katušić Hećimović, 2007.). Uspješnost PCR reakcije provjerava se elektroforezom produkata u agaroznom gelu.



ds (eng. *double stranded*) – dvolančana DNA  
 ss (eng. *single stranded*) – jednolančana DNA

**Slika 18** Lančana reakcija polimerazom (PCR) (Katušić Hećimović, 2007.)

Za identifikaciju plijesni molekularnim metodama koristi se ITS regija DNA (eng. *internal transcribed spacer*). Za amplifikaciju gena koji kodiraju ITS regiju DNA za plijesni se koriste specifične univerzalne početnice ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') i ITS4 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3') (White i sur., 1990.).

## **2.6. METODE ZA ODREĐIVANJE OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA MESNIH PROIZVODA I METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA**

Kako bi se odredila nutritivna vrijednost, odnosno sastav proizvoda, nužna je provedba kemijskih analiza. Sve metode koje se koriste u određivanju osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava i koncentracije mikotoksina (OTA i AFB<sub>1</sub>) moraju prethodno biti validirane.

### **2.6.1. Analitičke metode za određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava**

**Određivanje udjela vode** je gravimetrijska metoda kojom se određuje slobodna voda u uzorku, a zasniva se na gubitku dijela mase testnog uzorka sušenjem. Provodi se vaganjem uzoraka u lončice s poklopcima, pijeskom i štapićima te sušenjem do konstantne mase. Određivanje udjela vode provodi se primjenom metode ISO 1442 (ISO, 1997.).

**Određivanje udjela sirovih masti** je gravimetrijska metoda kojom se određuju ukupne masti. Postupak se temelji na kiselinskoj hidrolizi uzoraka u cilju oslobađanja zatvorenih i vezanih lipidnih frakcija, filtraciji dobivenog sadržaja, ekstrakciji s organskim otapalom, predestilaciji otapala, sušenju masti dobivene ekstrakcijom te vaganju. Određivanje udjela sirovih masti provodi se metodom po Soxhlet-u HRN ISO 1443 (HZN, 1999.).

**Određivanje udjela pepela** je fizikalna metoda koja se zasniva na razlaganju organske tvari spaljivanjem testnog dijela uzorka. Provodi se vaganjem uzoraka u porculanske lončice i karbonizacijom uzoraka pri nižim temperaturama te spaljivanjem na visokim temperaturama. Nakon spaljivanja uzorci se hlade te slijedi vaganje sivo-bijelog pepela (anorganskog ostatka) i izračunavanje udjela u proizvodu. Određivanje udjela pepela provodi se primjenom metode ISO 936 (ISO, 1998.).



**Određivanje udjela ukupnih bjelančevina** je titrimetrijska metoda, a temelji se na određivanju količine dušika. Testni dio uzorka razgrađuje se u bloku za razaranje uz dodatak sulfatne kiseline i amonijevog sulfata. Koncentrirana sulfatna kiselina provodi konverziju proteinskog dušika u amonijev sulfat u točki vrelišta, koja je povišena dodatkom kalijevog sulfata. Katalizator na bazi bakra koristi se kako bi poboljšao iskorištenje reakcije. Dodatkom natrijevog hidroksida dolazi do oslobađanja amonijaka koji se destilira uz suvišak borne kiseline. Slijedi titracija kloridnom kiselinom, a sadržaj dušika određuje se temeljem njenog utroška. Udio dušika množi se s faktorom konverzije 6,25 te se izračunava udio sirovih bjelančevina u proizvodu. Određivanje udjela bjelančevina najčešće se provodi metodom po Kjeldah-u uz primjenu metode HRN ISO 937 (HZN, 1999.).

**Određivanje pH vrijednosti** je fizikalna metoda, a temelji se na mjerenju množinske koncentracije vodikovih iona (H<sup>+</sup>) u otopini. pH vrijednost mjerilo je okusa, kvalitete te održivosti mesnog proizvoda.

**Određivanje aktiviteta vode** je fizikalna metoda koja mjeri tlak pare koju proizvodi vlaga prisutna u proizvodu. Aktivitet vode u mesu predstavlja dio vode koji je dostupan za biokemijske reakcije i rast mikroorganizama te uz temperaturu i pH vrijednost predstavlja ključni čimbenik održivosti mesa i mesnih proizvoda (Karolyi, 2004.).

### **2.6.2. Analitičke metode za određivanje koncentracije mikotoksina (OTA i AFB<sub>1</sub>)**

U određivanju koncentracije mikotoksina koriste se analitičke metode koje se mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne metode te orijentacijske (*screening*) i potvrde metode. U **Tablici 17** prikazane su prednosti i nedostaci nekih od metoda koje se koriste u određivanju koncentracije mikotoksina. Orijentacijske metode uključuju analitičke postupke za koje se može na dokumentirani sljedivi način pokazati da su vrednovane te da im je na razini koncentracije od interesa postotak lažno negativnih rezultata manji od 5%. Od screening metoda u određivanju koncentracije mikotoksina najčešće se koristi imunoenzimska (ELISA) metoda (Pleadin i sur., 2014.b).

Pri korištenju komercijalno dostupnih imunoenzimskih kitova za imunoenzimsku metodu u kvantitativnim analizama mikotoksina postižu se vrlo niski limiti detekcije odnosno visoka

osjetljivost metode, brza i jednostavna analiza uzoraka te niska cijena analize. Kvaliteta ELISA kitova može varirati od proizvođača do proizvođača, a postoje razlike i u različitim serijama kitova istog proizvođača. Stoga je kvalitetu određivanja koncentracije mikotoksina u matriksu ELISA metodom potrebno ispitati prethodnom validacijom analitičke metode. U slučaju sumnje na pozitivni rezultat, takav rezultat mora se dokazati jednom od validiranih potvrdnih metoda (Perši, 2012.).

**Tablica 17** Prednosti i nedostaci nekih metoda u određivanju koncentracije mikotoksina (Pascale i Visconti, 2008.; Perši, 2012.)

METODA	PREDNOSTI	NEDOSTACI
<b>TLC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- jednostavna, brza i jeftina <i>screening</i> metoda</li> <li>- mogućnost simultanog određivanja više mikotoksina</li> <li>- dobra osjetljivost metode za aflatoksine i okratoksin A</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- slaba osjetljivost metode (za neke mikotoksine)</li> <li>- slaba preciznost metode</li> <li>- kvantitativna metoda samo kad se primjenjuje densitometar</li> </ul>
<b>GC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- simultano određivanje više mikotoksina</li> <li>- dobra osjetljivost metode</li> <li>- mogućnost automatizacije (autosempler)</li> <li>- potvrdna metoda (MS detektor)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- skupa oprema</li> <li>- potrebni koraci derivatizacije</li> <li>- nelinearna kalibracijska krivulja</li> <li>- <i>carry over</i> efekti</li> <li>- varijacije u reproducibilnosti i repetibilnosti</li> </ul>
<b>HPLC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dobra osjetljivost, selektivnost i repetabilnost metode</li> <li>- mogućnost automatizacije (autosempler)</li> <li>- kratko vrijeme trajanja analiza</li> <li>- dostupnost službenih analitičkih metoda</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- skupa oprema</li> <li>- potrebni koraci derivatizacije</li> </ul>
<b>LC/MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- simultano određivanje više mikotoksina</li> <li>- dobra osjetljivost i potvrdna metoda (LC/MS/MS)</li> <li>- ne zahtjeva derivatizacijske korake</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vrlo skupa oprema</li> <li>- osjetljivost se oslanja na tehnici ionizacije</li> </ul>
<b>ELISA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- jednostavna priprema uzorka</li> <li>- jeftina oprema visoke osjetljivosti</li> <li>- simultano određivanje više mikotoksina</li> <li>- pogodna kao <i>screening</i> metoda</li> <li>- limitirajuća uporaba organskih otapala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>cross</i> reaktivnost sa srodnim mikotoksinima</li> <li>- mogućnost lažno pozitivnih/negativnih rezultata</li> <li>- zahtjeva potvrdnu metodu</li> </ul>
<b>BRZI TESTOVI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- brze i jednostavne metode</li> <li>- ne zahtjeva skupu opremu</li> <li>- limitirajuća uporaba organskih otapala</li> <li>- pogodni za <i>screening</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>cross</i> reaktivnost sa srodnim mikotoksinima</li> <li>- mogućnost lažno pozitivnih/negativnih rezultata</li> <li>- slaba senzitivnost</li> </ul>

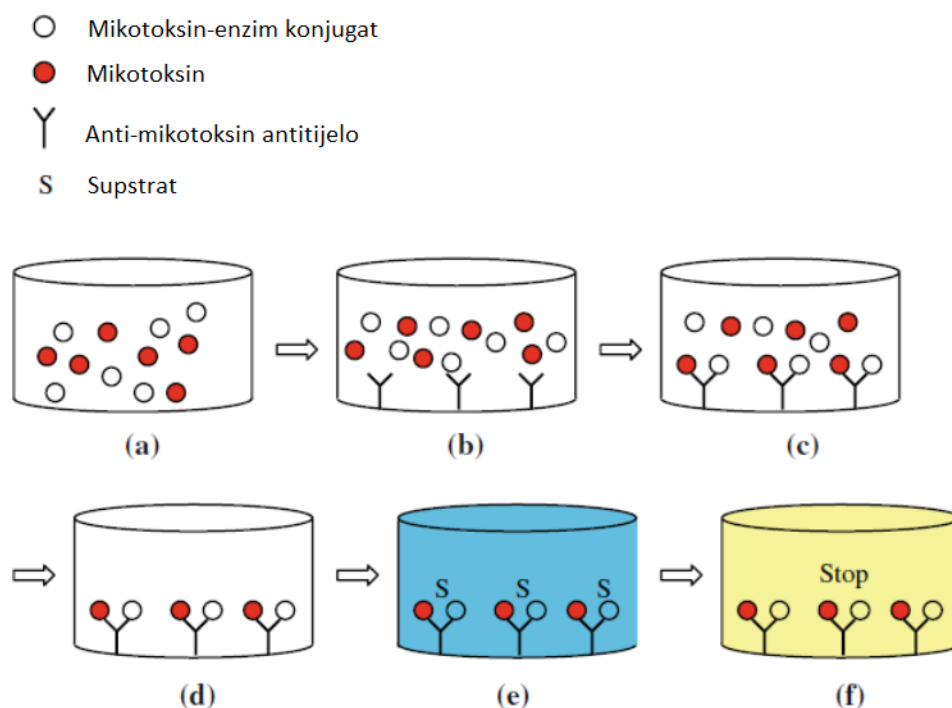
**ELISA** (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) je imunološka metoda razvijena šezdesetih godina iz RIA (*radioimmunoassay*) metode, na osnovi zapažanja da se antitijelo, kao i analit, (antigen) mogu vezati na krutu površinu i doprinositi specifičnom jakom afinitetu vezivanja. ELISA metoda široko je upotrebljavana u raznim ispitivanjima u veterini, proizvodnji hrane,

medicini, ekologiji te u mnogim drugim granama jer omogućuje brzi *screening* ili kvantifikaciju vrlo niskih koncentracija traženog analita ili antitijela na velikom broju uzoraka. ELISA metodu karakterizira i lakoća provedbe, točnost i dostupnost reagenasa. Nedostatak ove metode jest da daje informaciju o prisustvu analita, ali ne i o njegovim kemijskim svojstvima, kao što je npr. molekularna težina, kao i moguća *cross* reaktivnost srodnih supstancija (Pleadin, 2006.).

U ELISA metodi primjenjuju se polistirenske mikrotitracijske ploče (plitice) četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica. Kvantitativno određivanje koncentracije antigena ili antitijela provodi se mjerenjem intenziteta obojenja produkta reakcije koji nastaje interakcijom enzima i dodanog supstrata na spektrofotometrijskom čitaču.

Postoje tri oblika ELISA metode i to: osnovno ili primarno vezivanje, sendvič metoda i kompetitivno ili inhibicijsko vezivanje.

U analizi mikotoksina uobičajeno se koristi kompetitivna metoda (Zheng i sur., 2006.) čiji je princip prikazan na **Slici 19**.



(a) uzorak pomiješan s konjugatom; (b) pomiješani sadržaj dodan u jažice s antitijelom; (c) mikotoksin se veže na protutijelo u prvoj inkubaciji; (d) ispiru se nevezani materijali; (e) dodan supstrat kako bi se razvila boja; (f) dodana stop otopina za zaustavljanje reakcije

**Slika 19** Princip kompetitivne ELISA metode za analizu mikotoksina (Zheng i sur., 2006.)

U kompetitivnoj ELISA metodi antigen iz ispitivanog uzorka i enzimom-označen-antigen-konjugat natječu se za ograničen broj imobiliziranih antitijelo-vezujućih mjesta. Količina antitijelo-antigen-enzim kompleksa vezanog za krutu fazu (jažica) obrnuto je proporcionalna koncentraciji antigena prisutnog u uzorku. Nakon što se nevezani enzim-antigen-konjugat ispere, dodaje se kromogeni supstrat. Vezani enzimski konjugat reagira s kromogenim supstratom i prevodi ga u plavo obojeni produkt. Dodatkom stop otopine mijenja se boja iz plave u žutu. Kvantitativno određivanje koncentracije antigena provodi se mjerenjem apsorpcije produkta obojene reakcije koristeći spektrofotometrijski ELISA čitač s apsorpcijskim filtrom od 450 nm (Pleadin, 2006.; Zheng i sur., 2006.).

Druge metode u određivanju mikotoksina uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC, eng. *High Performance Liquid Chromatography*), plinsku kromatografiju (GC, eng. *Gas Chromatography*), tekućinsku kromatografiju/masenu spektrometriju (LC/MS, eng. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*), odnosno plinsku kromatografiju/masenu spektrometriju (GC/MS eng. *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*). Za razliku od orijentacijskih metoda, navedene potvrdne metode zahtijevaju i uporabu sofisticirane laboratorijske opreme. U određivanju mikotoksina rjeđe su zastupljene metode kapilarne elektroforeze te metode s biosenzorima kojima se isti određuju prema intenzitetu fluorescencije. Prema Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 2/05) za određivanje mikotoksina mogu se primijeniti i druge potvrdne metode poput LC i GC uz dokazivanje IR spektrometrijskom detekcijom, LC-full-scan DAD, 2-D TLC-full scan UV/VIS, LC-UV/VIS te GC-elektron apsorpcijska detekcija (Perši, 2012.; Pleadin i sur., 2014.b).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je:

- 1) Označiti uzorke Slavenskog kulena i Slavenske kobasice na pet različitim mikrolokacija, obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava (OPG) s područja Slavonije: na svakom OPG-u označiti po šest uzoraka Slavenskog kulena koji će se analizirati nakon tri (3 uzorka) i nakon šest (3 uzorka) mjeseci proizvodnje. Isto tako, na svakom OPG-u označiti i po tri uzorka Slavenske kobasice koji će se analizirati nakon tri mjeseca proizvodnje,
- 2) Na jednom OPG-u odabranog lokaliteta označiti tri uzorka Slavenskog kulena, od kojih u dva oštetiti ovitak nakon mjesec dana proizvodnje te uzorke analizirati nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje, a jedan neoštećeni uzorak analizirati nakon šest mjeseci proizvodnje,
- 3) Na jednom OPG-u odabranog lokaliteta označiti dva uzorka Slavenske kobasice, od kojih u jednog oštetiti ovitak nakon mjesec dana proizvodnje. Oštećeni i neoštećeni uzorak Slavenske kobasice analizirati nakon tri mjeseca proizvodnje,
- 4) Na svakom uzorku Slavenskog kulena i Slavenske kobasice provesti mikrobiološku analizu primjenom standardnih mikrobioloških metoda,
- 5) Na svakom uzorku Slavenskog kulena i Slavenske kobasice odrediti fizikalno-kemijska svojstva primjenom standardnih akreditiranih metoda,
- 6) Izvršiti izolaciju plijesni s površine svih uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice,
- 7) Izvršiti identifikaciju plijesni koje su porasle na površini uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice i to:
  - a) Tradicionalnom metodom, izolate plijesni identificirati do razine roda definiranjem njihovih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika,
  - b) Molekularnom metodom, koja obuhvaća DNA ekstrakciju, umnažanje i sekvencioniranje, izolate plijesni identificirati do razine vrste,

- 8) U svakom uzorku Slavenskog kulena i Slavenske kobasice te sirovog mesa i začina korištenih u proizvodnji odrediti koncentraciju mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> uz primjenu akreditiranih kvantitativnih ELISA metoda,
- 9) Odrediti senzorska svojstva neoštećenih uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice s OPG-a odabranog lokaliteta,
- 10) Statistički obraditi i analizirati eksperimentalno dobivene rezultate.

## 3.2. MATERIJAL

### 3.2.1. Priprema uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice

Uzorci Slavenskog kulena i Slavenske kobasice proizvedeni su na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima na području Slavonije:

- a) Slavonski kulen: Soljani, Vinkovci, Nard, Slavonski Brod, Bjeliševac (Kutjevo),
- b) Slavonska kobasica: Bošnjaci, Otok, Babina Greda, Štitar, Komletinci,
- c) Odabrani lokalitet za Slavonski kulen i slavonsku kobasicu: Županja.

Svi uzorci Slavenskog kulena i Slavenske kobasice proizvedeni su prema tradicionalnoj recepturi i podvrgnuti tehnološkim postupcima proizvodnje odabranog OPG-a.

U **Tablici 18** i **Tablici 19** prikazani su oznake i broj označenih uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice po svakom mikrolokalitetu.

**Tablica 18** Oznake i broj označenih uzoraka Slavenskog kulena po mikrolokalitetima

MIKROLOKALITET	OZNAKA UZORKA	BROJ OZNAČENIH UZORAKA (N)
1	1A – uzorci s mikrolokaliteta 1 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
	1B - uzorci s mikrolokaliteta 1 nakon 6 mjeseci proizvodnje	3
2	2A – uzorci s mikrolokaliteta 2 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
	2B - uzorci s mikrolokaliteta 2 nakon 6 mjeseci proizvodnje	3
3	3A – uzorci s mikrolokaliteta 3 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
	3B - uzorci s mikrolokaliteta 3 nakon 6	3

	mjeseci proizvodnje	
<b>4</b>	4A – uzorci s mikrolokaliteta 4 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
	4B - uzorci s mikrolokaliteta 4 nakon 6 mjeseci proizvodnje	3
<b>5</b>	5A – uzorci s mikrolokaliteta 5 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
	5B - uzorci s mikrolokaliteta 5 nakon 6 mjeseci proizvodnje	3
<b>2D</b>	2D-30 – oštećeni uzorak nakon 3 mjeseca proizvodnje na odabranom lokalitetu	1
	2D-6O - oštećeni uzorak nakon 6 mjeseci proizvodnje na odabranom lokalitetu	1
	2D-6N - neoštećeni uzorak nakon 6 mjeseca proizvodnje na odabranom lokalitetu	1
<b>UKUPNO UZORAKA SLAVONSKOG KULENA (N)</b>		<b>33</b>

Mikrolokalitet 1 – Slavonski Brod; mikrolokalitet 2 – Bjeliševac (Kutjevo); mikrolokalitet 3 – Soljani; mikrolokalitet 4 – Vinkovci; mikrolokalitet 5 – Nard; mikrolokalitet 2D – Županja

**Tablica 19** Oznake i broj označenih uzoraka Slavonske kobasice po mikrolokalitetima

MIKROLOKALITET	OZNAKA UZORKA	BROJ OZNAČENIH UZORAKA (N)
<b>1</b>	1C – uzorci s mikrolokaliteta 1 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
<b>2</b>	2C – uzorci s mikrolokaliteta 2 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
<b>3</b>	3C – uzorci s mikrolokaliteta 3 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
<b>4</b>	4C – uzorci s mikrolokaliteta 4 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
<b>5</b>	5C – uzorci s mikrolokaliteta 5 nakon 3 mjeseca proizvodnje	3
<b>1D</b>	1D-3O - oštećeni uzorak nakon 3 mjeseca proizvodnje na odabranom lokalitetu	1
	1D-3N - neoštećeni uzorak nakon 3 mjeseca proizvodnje na odabranom lokalitetu	1
<b>UKUPNO UZORAKA SLAVONSKE KOBASICE (N)</b>		<b>17</b>

Mikrolokalitet 1 – Štitar; mikrolokalitet 2 – Bošnjaci; mikrolokalitet 3 – Babina Greda; mikrolokalitet 4 – Komletinci; mikrolokalitet 5 – Otok; mikrolokalitet 1D – Županja

Neki od označenih uzoraka Slavanskog kulena prikazani su na **Slici 20** i **Slici 21**, a označeni uzorak Slavonske kobasice na **Slici 22**.





**Slika 20** Označeni uzorak Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta Soljani (foto.: Perković, I., 2018.)



**Slika 21** Označeni uzorak Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s mikrolokaliteta Soljani (foto.: Perković, I., 2018.)



**Slika 22** Označeni uzorak Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokalityta Bošnjaci (foto.: Perković, I., 2018.)

### 3.2.2. Priprema uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice oštećivanjem ovitka

Na jednom odabranom lokalitetu označena su tri uzorka Slavanskog kulena, a nakon mjesec dana od dana proizvodnje na dva uzorka je oštećena površina ovitka.

Isto tako, na jednom odabranom lokalitetu označena su dva uzorka Slavonske kobasice, a nakon mjesec dana od dana proizvodnje, jednom uzorku je oštećena površina ovitka. Neoštećenom uzorku Slavonske kobasice je nakon tri mjeseca proizvodnje, očišćena površina ovitka od porasle površinske plijesni, a uzorak je nakon toga vakuumiran i senzorski analiziran nakon 180 dana, zajedno s uzorkom Slavanskog kulena.

Oštećenje površine ovitka učinjeno je način da je sterilnim nožem uzorak Slavanskog kulena/ Slavonske kobasice oštećen na 5 mjesta, s površinom svakog oštećenja od oko 0,5 – 1,0 cm<sup>2</sup> (Slika 23).



**Slika 23** Oštećenje površine ovitka Slavonskog kulena nakon mjesec dana proizvodnje s odabranog mikrolokalityta Županja (*foto.: Perković, I., 2018.*)

### 3.2.3. Hranjive podloge

Za izolaciju plijesni s površine uzoraka Slavenskog kulena i Slavonske kobasice te mikrobiološke analize, korišteno je:

#### a) Podloga za kvasce i plijesni te izolaciju plijesni s površine uzorka

- DG-18 (Dichloran-glicerol agar) (Biokar, Pantin, Francuska), sastav podloge: tripton 5,0 g/L; glukoza 10,0 g/L; mononatrijev fosfat 1,0 g/L; magnezijev sulfat 0,5 g/L; dikloran 0,002 g/L; kloramfenikol 0,1 g/L; glicerol 220,0 g/L; agar 13,0 g/L
- DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol agar base) (Biokar, Pantin, Francuska), sastav podloge: polipepton 5,0 g/L; glukoza 10,0 g/L; mononatrijev fosfat 1,0 g/L; magnezijev sulfat 0,5 g/L; dikloran 0,002 g/L; Rose-Bengal 0,025 g/L; kloramfenikol 0,05 g/L; klortetraciklin klorhidrat 0,05 g/L; cinkov sulfat heptahidrat 0,01 g/L; bakrov (II) sulfat pentahidrat 0,005 g/L; tergitol 1 mL; agar 12,4 g/L

#### b) Podloga za identifikaciju plijesni s površine uzorka

- MEA (BD Difco, SAD), sastav podloge: maltoza 12,75 g/L; dekstrin 2,75 g/L; glicerol 2,35 g/L; pepton 0,78 g/L; agar 15,0 g/L
- CYA (BDDifco, SAD), sastav podloge: sukroza 30,0 g/L; ekstrakt kvasca 5,0 g/L; dikalijev hidrogen fosfat 1,0 g/L; natrijev nitrat 0,3 g/L; kalijev klorid 0,05 g/L; magnezijev sulfat 0,05 g/L; željezov sulfat 0,001 g/L; cinkov sulfat 0,001 g/L; bakrov sulfat 0,0005 g/L; agar 15,0 g/L

#### c) Otopina za čuvanje izolata plijesni

- Fiziološka otopina: natrijev klorid 9,0 g/L

#### d) Podloga za predobogaćenje bakterija

- Puferirana peptonska voda, PPV (Biolife, Milano, Italija), sastav: pepton g/L; natrijev klorid 5,0 g/L; dinatrijev hidrogen fosfat anhidrid 3,5 g/L; monokalijev fosfat 1,5 g/L

#### e) Podloga za izolaciju i identifikaciju *Enterobacteriaceae*

- VRBG agar (Violet Red Bile Glucose agar) (Biolife, Milano, Italija), sastav podloge: pepton 7,0 g/L; ekstrakt kvasca 3,0 g/L; natrijev klorid 5,0 g/L; žučne

soli br. 3 1,5 g/L; glukoza 10,0 g/L; neutralno crvenilo 0,03 g/L; kristal violet 0,002 g/L; agar 15,0 g/L

- PGA agar (Purple Glucose agar) (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija), sastav podloge: enzimatski digest kazeina 10,0 g/L; ekstrakt kvasca 1,5 g/L; glukoza 10,0 g/L; natrijev klorid 5,0 g/L; bromokrezol ljubičasti 0,015 g/L; agar 12,2 g/L

**f) Podloge za izolaciju bakterija roda *Salmonella* spp.**

- RVS bujon (Rappaport Vassiliadis Soy) (Biolife, Milano, Italija), sastav bujona: soja pepton 4,5 g/L; natrijev klorid 7,2 g/L; kalijev dihidrogen fosfat 1,260 g/L; dikalijev hidrogen fosfat 0,180 g/L; magnezijev klorid 13,4 g/L; malahit zeleni oksalat 0,036 g/L
- MKTT bujon (Mueller Kauffmann Tetrathionate) (Biolife, Milano, Italija), sastav bujona: enzimatski mesni digest 4,3 g/L; enzimatski digest kazeina 8,6 g/L; natrijev klorid 2,6 g/L; kalcijev karbonat 38,7 g/L; natrijev tiosulfat anhidrid 30,3 g/L; goveđa žuč 4,78 g/L; brilijantno zelenilo 9,60 mg
- XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) (Biolife, Milano, Italija), sastav podloge: ksiloza 3,75 g/L; L-lizin 5,0 g/L; laktoza 7,5 g/L; sukroza 7,5 g/L; natrijev klorid 5,0 g/L; ekstrakt kvasca 3,0 g/L; natrijev dezoksikolat 1,0 g/L; natrijev tiosulfat 6,8 g/L; željezo amonijev citrat 0,8 g/L; fenolno crvenilo 0,08 g/L; agar 14,5 g/L
- CSA (Chromgenic Salmonella agar) (Biolife, Italija), sastav podloge: pepton 10,0 g/L; selektivne komponente 12,0 g/L; kromogena smjesa 0,9 g/L; agar 15,0 g/L;

**g) Podloge za izolaciju *Listeria monocytogenes***

- Listeria Fraser bujon (Biolife, Milano, Italija), sastav bujona: proteoza pepton 5,0 g/L; tripton 5,0 g/L; goveđi ekstrakt 5,0 g/L; ekstrakt kvasca 5,0 g/L; natrijev klorid 20,0 g/L; dinatrijev hidrogen fosfat anhidrid 9,5 g/L; kalijev dihidrogen fosfat 1,35 g/L; eskulin 1,0 g/L; litijev klorid 3,0 g/L; akrilflavin HCl 0,025 g/L; nalidiksična kiselina 0,02 g/L
- Listeria Fraser bujon polovična koncentracija (Biolife, Milano, Italija), sastav bujona: proteoza pepton 5,0 g/L; tripton 5,0 g/L; goveđi ekstrakt 5,0 g/L;

ekstrakt kvasca 5,0 g/L; natrijev klorid 20,0 g/L; dinatrijev hidrogen fosfat anhidrid 9,5 g/L; kalijev dihidrogen fosfat 1,35 g/L; eskulin 1,0 g/L; litijev klorid 3,0 g/L; akrilflavin HCl 0,0125 g/L; nalidiksična kiselina 0,01 g

- ALOA agar (Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti) (Biolife, Milano, Italija), sastav podloge: mesni pepton 18,0 g/L; tripton 6,0 g/L; ekstrakt kvasca 10,0 g/L; natrijev piruvat 2,0 g/L; glukoza 2,0 g/L; magnezijev glicerofosfat 1,0 g/L; magnezijev sulfat 0,50 g/L; natrijev klorid 5,0 g/L; litijev klorid 10,0 g/L; dinatrijev hidrogen fosfat anhidrid 2,5 g/L; 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukopiranozid 0,05 g/L; agar 15,0 g/L; nalidiksična kiselina 20 mg; ceftazidim 20 mg; cikloheksimid 50 mg; polimiksin B 76700 IU; L- $\alpha$ -fosfatidilinositol 2,0 g

#### h) Podloga za sulfitoreducirajuće klostridije

- Sulfitni agar (Biolife, Milano, Italija), sastav podloge: pepton iz kazeina 15 g/L; ekstrakt kvasca 10,0 g/L; natrijev sulfit 0,5 g/L; agar 15,0 g/L

#### i) Podloga za koagulaza pozitivne stafilokoke/ *Staphylococcus aureus*

- Baird Parker agar (Biolife, Milano, Italija), sastav podloge: pankreatin 10,0 g/L; goveđi ekstrakt 5,0 g/L; kvašičev ekstrakt 1,0 g/L; natrijev piruvat 10,0 g/L; glicin 12,0 g/L; litijev klorid 5,0 g/L; agar 15,0 g/L

### 3.2.4. Kemikalije

Za izradu ove disertacije korištene su sljedeće kemikalije:

#### a) Za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava (udio ukupnih masti, udio vode, udio bjelančevina, udio pepela)

- kloridna kiselina, HCl min. 36,5 %, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- sulfatna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> min. 96%, p.a., T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska
- perkloratna kiselina, HClO<sub>4</sub> min. 60%, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- borna kiselina, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- limunska kiselina, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min. 30%, p.a., T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska
- natrijev hidroksid, NaOH, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etanol, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O apsolutni, p.a., Carlo Erba, Rodano, Italija

- srebro nitrat,  $\text{AgNO}_3$ , p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijev dikromat,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- amonijev sulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dietil eter,  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ , p.a., Carlo Erba, Rodano, Italija
- 1-propanol,  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ , p.a. Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 2-propanol,  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ , p.a. Kemika, Zagreb, Hrvatska
- L-4-hidroksiprolin,  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$ , p.a., Sigma, Steinheim, Njemačka
- natrij-acetata,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kloramin-T hidrat,  $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNNaO}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ , p.a., Sigma, Steinheim, Njemačka
- p-dimetilaminobenzaldehida,  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$ , Fluka, Steinheim, Njemečka
- Kjeldahl tablete katalizatora, Foss Analytical, Höganäs, Švedska

**b) Za pripremu i pročišćavanje uzoraka za ELISU metodu**

- fosforna kiselina,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , p.a., Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka
- kloridna kiselina, HCl min. 36, 5%, p.a, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etil acetat,  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ , p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev hidrogen karbonat,  $\text{NaHCO}_3$ , p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- destilirana voda,  $\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

**c) Za provedbu ELISA metode**

Za određivanje koncentracije okratoksina A korišten je kit Ochratoxin A, R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Njemačka koji sadrži:

- mikrotitracijsku ploču s 96 jažica (12 redova s po 8 jažica)
- 6 standardnih otopina okratoksina A (1,3 mL) koncentracije: 0, 50, 100, 300, 900, 1800 ng/L
- enzimski konjugat-koncentrat (0,7 mL)
- supstrat/kromogen (10 mL)
- stop otopina-1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (14 mL)
- pufer za razrjeđivanje (7 mL)
- pufer za ispiranje (sol)

**Dodatni reagensi:**

- 0,13 M natrij-hidrogen karbonatni pufer ( $\text{NaHCO}_3$ ), pH 8,1: 10,9 g/L destilirane vode

- 0,65 M natrij-hidrogen karbonatni pufer ( $\text{NaHCO}_3$ ): 54,6 g/L destilirane vode
- 1 M fosforna kiselina: 14,21 mL 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i do 100 mL dopuniti vodom
- etilacetat

**Za određivanje koncentracije aflatoksina B<sub>1</sub> korišten je kit Aflatoxin B<sub>1</sub>, R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Njemačka koji sadrži:**

- mikrotitracijsku ploču sa 96 jažica (12 redova s po 8 jažica)
- 6 standardnih otopina aflatoksina B<sub>1</sub> (1,3 mL) koncentracije: 0, 1, 5, 10, 20, 50 ng/mL  
enzimski konjugat (6 mL)
- anti-aflatoksin antitijelo (6 mL)
- supstrat / kromogen (10 mL)
- stop otopina – 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (14 mL)
- sol za pufer za ispiranje, za pripremu 10 mM fosfatnog pufera (pH 7,4), sadrži 0,05%
- Tween 20

**Dodatni reagensi:**

- metanol > 99,8%

**d) Za izolaciju DNA plijesni koje su izolirane s površine uzoraka Slavenskog kulena i Slavonske kobasice korišten je DNeasy Plant Mini kit, Qiagen, Hilden, Njemačka koji sadrži:**

- RNase A
- Pufere (AP1, P3, AW1, AW2, AE)

**e) Za provedbu PCR reakcije**

- Početnica ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), Metabion international AG, Planegg, Njemačka
- Početnica ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), Metabion international AG, Planegg, Njemačka

HotStarTaq Plus Master Mix kit Qiagen, Hilden, Njemačka koji sadrži:

- HotStarTaq Master Mix (koji se sastoji od HotStarTaq DNA polimeraze, PCR pufera s 3 mM  $\text{MgCl}_2$ )



- 10 x Coral Load
- Voda bez RNase

**f) Za provedbu gel elektroforeze**

- SeaKem® LE Agaroza, Lonza, Rockland, SAD
- AccuGENE™ TAE pufer 50x s 2M tris acetatom i 0,05 M EDTA, Lonza, Verviers, Belgija
- GelStar™ Nucleic Acid Gel boja, Lonza, Rockland, SAD
- 100 bp DNA ljestve, Takara, Kusatsu, Japan
- Demineralizirana voda, tip II (0,1  $\mu$ S/cm)

**g) Za pročišćavanje PCR produkata prije sekvencioniranja**

- Illustra ExoProStar, GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija
- AccuGENE™ voda za molekularne pretrage, Lonza, Verviers, Belgija

**3.2.5. Laboratorijska oprema**

Za izradu ove disertacije korišteni su sljedeći laboratorijski uređaji i pribor:

**a) Laboratorijski uređaji:**

- termostat pri 25 °C, INE 500, Memmert, Schwabach, Njemačka
- termostat pri 30 °C, Sutjeska, Bosna i Hercegovina
- termostat pri 37 °C, BD 240 E2, Binder, Bohemia, SAD
- termostat pri 41,5 °C, INE 200, Memmert, Schwabach, Njemačka
- sušionik pri 103 °C, Memmert UF75, Schwabach, Njemačka
- mikroskop, Carl Zeiss Axio Imager A2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka
- kamera za mikroskop, Axio Cam Erc5s, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka
- kemijski analizator, ChemWell 2190, Awareness Technologies, Los Angeles, SAD
- analitička vaga, AUW220D, Shimadzu, Kyoto, Japan
- analitička vaga, MC1 Laboratory LC 620P, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- precizna vaga, AND GF 2000, A&D, San Jose, SAD

- analitička vaga, Kern & Sohn GmbH, EW6000 1M, Balingen, Njemačka
- klasična centrifuga, Megafuge 1.0. Heraeus, Sepatech, Gottlieb, Švedska
- centrifuga s hlađenjem, Universal 320 R, Hettich, Buckinghamshire, Velika Britanija
- rotacioni vakuum uparivač, Laborota 4001 efficient G3, Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, Njemačka
- uređaj za pročišćavanje, VacMaster 20, International Sorbet Technology, Hengoed, Velika Britanija
- pH metar UNICAM 9455 pH/ISE Meter, Apeldoorn, Nizozemska
- čitač ELISA ploča, EL 800, BioTek, Vermont, SAD
- ispirać ELISA ploča, EL 50, BioTek, Vermont, SAD
- mješalica (vorteks), MS1 minshaker, IKA®Works, Inc. Wilmington, SAD
- mješalica, HS 260 control, IKA®Werke, GmbH&Co.KG, Staufen, Njemačka
- mješalica (minishaker) MS1, IKA®Works, Inc. Wilmington, SAD
- mješalica (vorteks), V-1 plus, LO23, Kisker Biotech GmbH&Co.KG, Steinfurt, Njemačka
- homogenizator, UltraTurrax DI 25 basic, IKA®Werke, GmbH&Co.KG, Staufen, Njemačka
- homogenizator, Grindomix GM 200, Retsch GmbH, Haan, Njemačka
- homogenizator, BagMixer 400, Interscience, Saint Nom, Francuska
- laboratorijski mlin, Cylotec 1093, Tecator, Hillerød, Danska
- vodena kupelj, GFL, Burgwedel, Njemačka
- uređaj za ekstrakciju masti, Soxtherm 2000, Gerhardt, Königswinter, Njemačka
- blok za razaranje organskih tvari, Unit 8 Basic, Foss, Höganäs, Švedska
- uređaj za destilaciju i titraciju bjelančevina, Kjeltec 8400 Foss, Höganäs, Švedska

- neutralizator para, Scrubber 1001, Foss, Höganäs, Švedska
- električno kuhalo, SG 2000, GWM, Rommelsbacher, Njemačka
- vakuum pumpa, NO 35 AN 18, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Njemačka
- mufolna peć, LV9/11/P 320, Nabertherm, Lilienthal, Njemačka
- ledenica, Gorenje F6181AW, Valjevo, Srbija
- homogenizator, FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals, Solon, SAD
- laminar, Flow Activa AQUaria, Lacchiarella, Italija
- UV sterilizacijski kabinet, GLE-UVSC 30036899, Scie-Plas, Cambrige, Velika Britanija
- mini centrifuga - Green Euro play, D1008, Isolab, Wertheim, Njemačka
- mini centrifuga, MiniSpin plus, CL 771576, Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka
- PCR aparat, Prime Thermal Cyclor 51149-2, Staffordshire, Velika Britanija
- sustav za horizontalnu elektroforezu, Vari-Gel Midi, TVG-SYS, Scie-Plas, Cambrige, Velika Britanija
- uređaj za napajanje za provedbu elektroforeze, Mini PRO 300V, EEPS-300, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Njemačka
- sustav za snimanje UVIDOC, UVITEC, Cambrige, Velika Britanija
- uređaj za mjerenje aktiviteta vode, HygroPalm AW1, Rotronic, Bassersdorf, Švicarska
- mikrovalna pećnica
- plinski plamenik

#### **b) Laboratorijski pribor**

- sterilne vrećice
- škare
- skalpel
- laboratorijske pincete
- rukavice latex bez pudera
- igle za seciranje (lancete), dužine 50 mm, Karl Hammacher GmbH, Solingen, Njemačka
- mikrobiološke ušice

- plastične petrijeve zdjelice  $\varnothing$  90 mm
- staklene petrijeve zdjelice  $\varnothing$  140 mm
- plastični štapići po Drigalskom
- mikropipete 100-1000  $\mu$ L, Acura 825, Socorex, Ecublens, Švicarska
- mikropipete za pripremu razrijeđenja 1 mL + 0,1 mL, Acura 810, Socorex, Ecublens, Švicarska
- mikropipete 0,1-2,5  $\mu$ L; 0,5-10  $\mu$ L; 10-100  $\mu$ L; 20-200  $\mu$ L; 100-1000  $\mu$ L; Eppendorf Research, Hamburg, Njemačka
- laboratorijski stalci
- laboratorijske staklene čaše od 5 i 100 mL
- staklene epruvete od 10 mL
- konusne plastične epruvete, Centrifuge Tubes, Labcon, Kalifornija, SAD
- epruvete s antikoagulansom EDTA, Greiner Bio-One, GmbH, Kremsmünster, Austrija
- graduirane pipete od 10 i 20 mL, Hirschmann, Chambersburg, SAD
- staklene bočice od 7 i 20 mL (high performance glass vials), Perkin Elmer, Waltham, SAD
- staklene bočice za autosampler (screw top vials) N9 306503, Perkin Elmer, Waltham, SAD
- jednokanalna mikropipeta 10-100  $\mu$ L i 100-1000  $\mu$ L, Eppendorf Research, Hamburg, Njemačka
- multikanalna mikropipeta 30-300  $\mu$ L, Eppendorf Research, Hamburg, Njemačka
- jednokanalna pipeta 1-10 mL, Eppendorf Research, Hamburg, Njemačka
- Erlenmayerove tikvice od 150, 250 i 500 mL
- epruvete za otparavanje od 12 mL
- posudice za pročišćene uzorke za ELISA

- porculanske zdjelice
- stakleni štapići
- porculanski lončići
- digestivne tube
- odmjerne tikvice od 250 mL
- satna stakalca
- stakleni lijevci
- plastične epruvetice od 1 mL s čepom, Eppendorf Research, Hamburg, Njemačka
- bočice s čepovima sa silikonskom septom 12x32 mm Waters®, Milford, SAD
- umetci za bočice, 300 µL, 6x29 mm Waters®, Milford, SAD
- imunoafinitetne kolonice za pročišćavanje Ochraprep®, R-Biopharm Rhône Ltd, Glasgow, Škotska
- mikrocentrifugalne tubice 2 mL
- epruvete Lysing Matrix C 2 mL, MP Biomedicals, Ohio, SAD
- DNeasy Mini spin tubice, Qiagen, Hilden, Njemačka
- QIAshredder Mini spin tubice, Qiagen, Hilden, Njemačka
- tubice za sakupljanje 2 mL, Qiagen, Hilden, Njemačka
- PCR epruvete 0,2 mL, Eppendorf Research, Hamburg, Njemačka
- nastavci za mikropipete
- inkubacijski stalak, Deltalab, Barcelona, Španjolska
- PCR stalci, Deltalab, Barcelona, Španjolska
- kutije za pohranu izolata, Deltalab, Barcelona, Španjolska

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Određivanje mikrobiološke ispravnosti uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice**

Mikrobiološka ispravnost uzoraka Slavanskog kulena određivala se nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje, a uzoraka Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje. Sve

mikrobiološke analize provedene su u skladu s važećim, propisanim standardnim ISO normama (**Tablica 20**).

**Tablica 20** Mikroorganizmi i važeće ISO norme

MIKROORGANIZAM	OZNAKA NORME	NAZIV NORME
<i>Enterobacteriaceae</i>	HRN ISO 21528-2:2017	Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja <i>Enterobacteriaceae</i> – 2. dio: Postupak određivanja broja kolonija
<i>Salmonella</i> spp.	HRN EN ISO 6579-1:2017	Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti, određivanja broja i serotipizaciju <i>Salmonella</i> - 1. dio: Dokazivanje prisutnosti <i>Salmonella</i> spp.
<i>Listeria monocytogenes</i>	HRN EN ISO 11290-1:2017	Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja <i>Listeria monocytogenes</i> i drugih <i>Listeria</i> spp. – 1. dio: Metoda dokazivanja prisutnosti
KPS/ <i>Staphylococcus aureus</i>	HRN EN ISO 6888-1:2004	Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka ( <i>Staphylococcus aureus</i> i druge vrste) - 1.dio: Postupak primjene Baird-Parkerove hranjive podloge na agaru
Sulfitoreducirajuće klostridije	HRN ISO 15213:2004	Horizontalna metoda za brojenje sulfitoreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima
Kvasci i plijesni	HRN ISO 21527-1:2012 i HRN ISO 21527-2:2012	Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni-1. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode većim od 0,95 i Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni-2. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode manjim ili jednakim 0,95

### 3.3.1.1. Priprema početne otopine

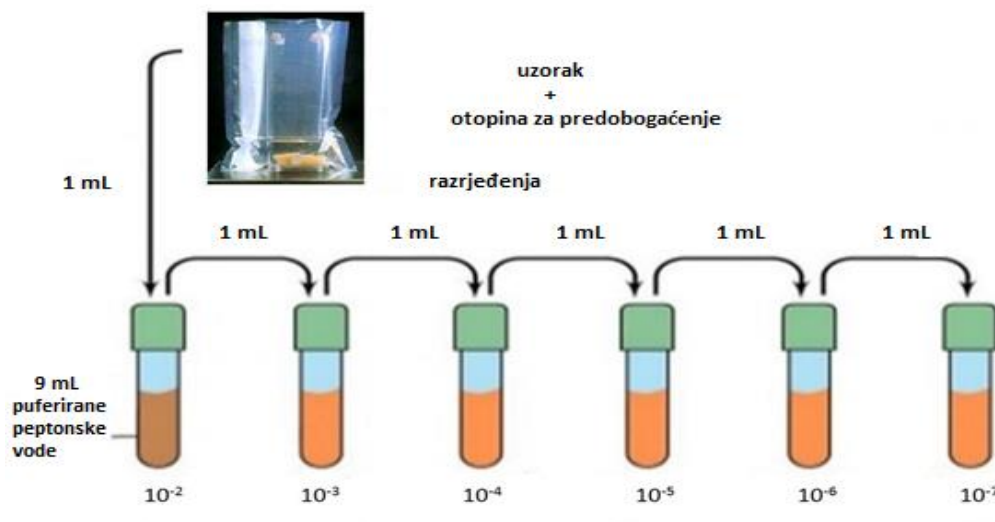
Za određivanje enterobakterija, *Salmonella* spp., sulfitoreducirajućih klostridija, koagulaza pozitivnih stafilokoka, kvasaca i plijesni početna otopina za inokulaciju pripremljena je na način da je u sterilnu vrećicu odvagano 25 g uzorka (Slavonski kulen/Slavonska kobasica) i

dobrano 225 mL puferirane peptonske vode. Pripremljena otopina je homogenizirana, te ostavljena na sobnoj temperaturi oko 30 min. Iz tako pripremljene otopine, vršila se daljnja inokulacija uzoraka.

Za određivanje bakterije *Listeria monocytogenes*, početna otopina se pripremila na način da je u sterilnu vrećicu odvagano 25 g uzorka (Slavonski kulen/Slavonska kobasica) i dodano 225 mL Listeria Fraser bujona. Pripremljena otopina je homogenizirana u homogenizatoru, te ostavljena na sobnoj temperaturi 30 min. Iz tako pripremljene otopine, razrjeđenja  $10^{-1}$ , vršila se daljnja inokulacija uzoraka.

### 3.3.1.2. Priprema decimalnih razrjeđenja

U sterilnu epruvetu s 9 mL puferirane peptonske vode, mikropipetom je dodano 1 mL početne otopine ( $10^{-1}$ ), sve se dobro homogeniziralo na laboratorijskoj miješalici. Na taj način se dobilo razrjeđenje  $10^{-2}$ . Nadalje su pripremana i ostala decimalna razrjeđenja prema shemi na **Slici 24** koja su nasađivana na hranjive podloge tehnikom nalijeivanja ili razmazivanja, ovisno o mikroorganizmu koji se analizira.



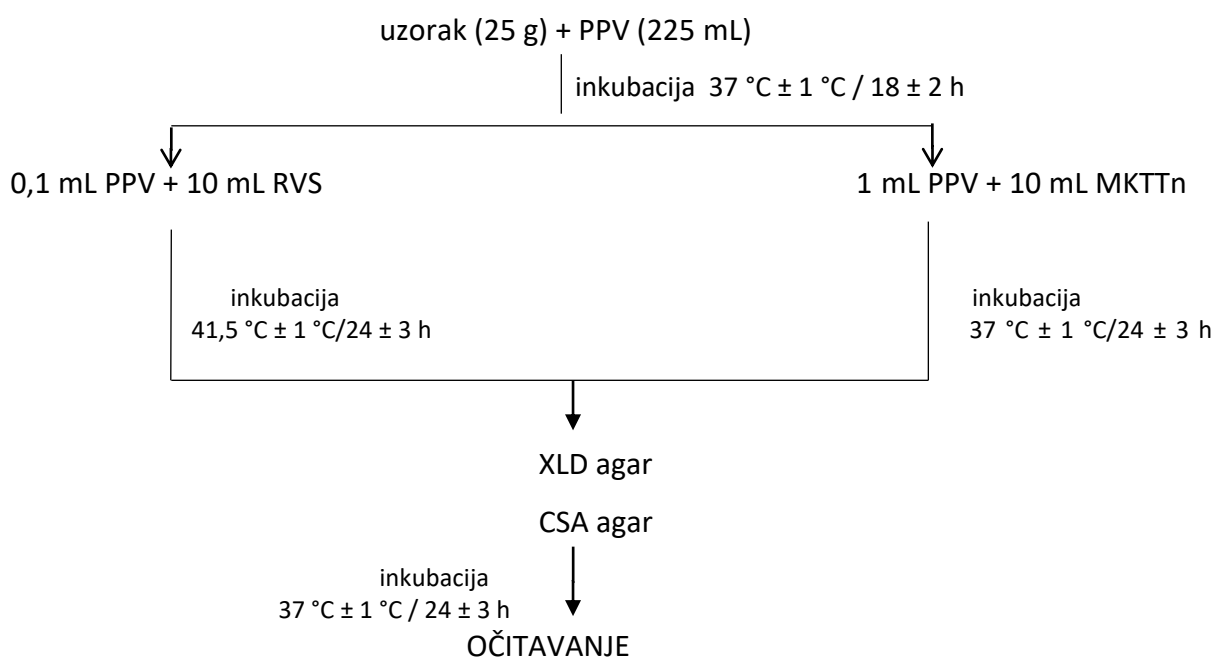
**Slika 24** Shema pripreme decimalnih razrjeđenja (Izrada shematskog prikaza: Perković, I., 2018.)

### 3.3.1.3. Izolacija bakterija *Enterobacteriaceae*

Izolacija i identifikacija enterobakterija naprovedena je u skladu s normom HRN ISO 21528-2 (HZN, 2017.). Početna otopina za inokulaciju napravljena je kako je opisano u poglavlju 3.3.1.1. U svaku od dvije sterilne Petrijeve zdjelice mikropipetom je stavljeno 1 mL početne otopine. U druge dvije Petrijeve zdjelice mikropipetom stavljeno je po 1 mL prvog decimalnog razrjeđenja početne otopine ( $10^{-2}$ ). U svaku Petrijevu zdjelicu stavljeno je oko 10 mL otopljenog i ohlađenog na 44 °C do 47 °C VRBG agara. Pažljivo je promiješan inokulum s medijem, horizontalnim pokretima. Nakon potpunog ujednačenja podloge, dodan je pokrovni sloj od oko 15 mL VRBG agara. Ohlađene Petrijeve zdjelice inkubirane su u termostatu pri 37 °C kroz  $24 \pm 2$  h.

### 3.3.1.4. Izolacija *Salmonella* spp.

Izolacija i identifikacija *Salmonella* spp. provedena je u skladu s normom HRN EN ISO 6579 (HZN, 2017.). Početna otopina za inokulaciju pripremljena je kako je opisano u poglavlju 3.3.1.1. Postupak izolacije *Salmonella* spp. prikazan je na **Slici 25**.

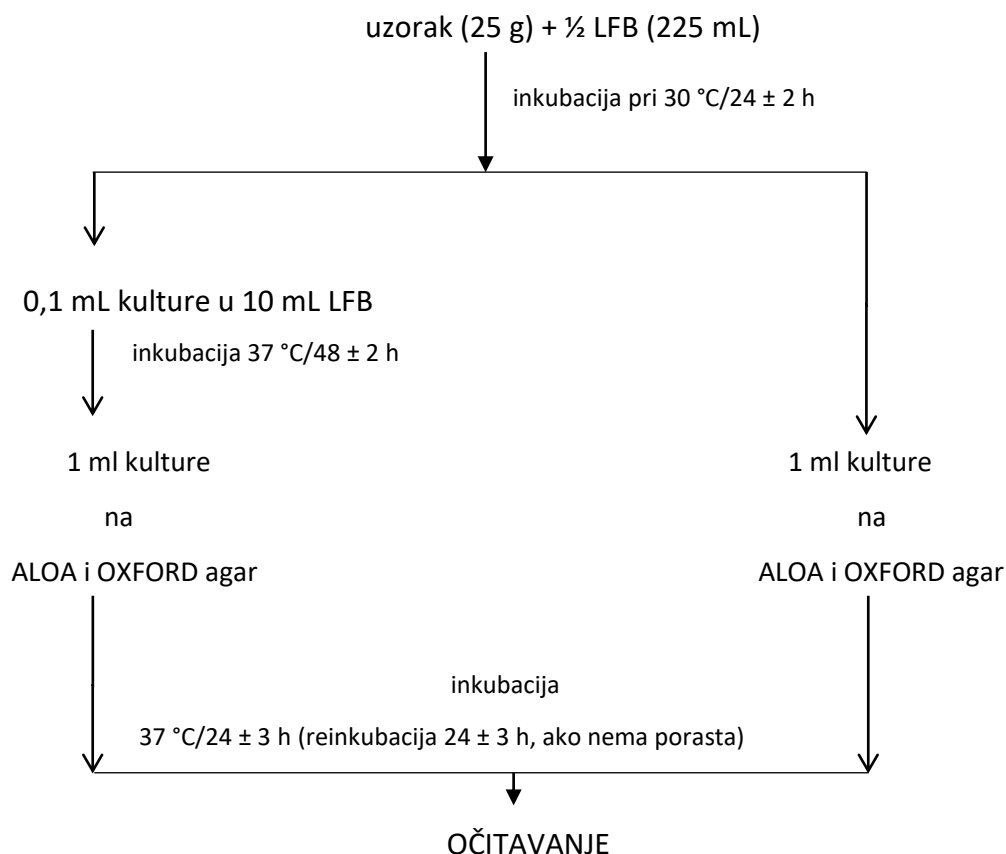


**Slika 25** Dijagram procedure horizontalne metode za izolaciju *Salmonella* spp. (Izrada shematskog prikaza: Perković, I., 2018.)



### 3.3.1.5. Izolacija bakterije *Listeria monocytogenes*

Izolacija bakterije *Listeria monocytogenes* provedena je u skladu s normom koja je navedena u **Tablici 20**. Početna otopina za inokulaciju pripravljena je kako je opisano u točki 3.3.1.1. Postupak izolacije bakterije *Listeria monocytogenes* prikazan je na **Slici 26**.



**Slika 26** Dijagram procedure horizontalne metode za izolaciju bakterije *Listeria monocytogenes* u hrani (Izrada shematskog prikaza: Perković, I., 2018.)

### 3.3.1.6. Izolacija koagulaza pozitivnih stafilokoka/*Staphylococcus aureus*

Izolacija koagulaza pozitivnih stafilokoka/*Staphylococcus aureus* provedena je u skladu s normom koja je navedena u **Tablici 20**. Početna otopina za inokulaciju pripravljena je kako je opisano u poglavlju 3.3.1.1. Sterilnom mikropipetom preneseno je 1 mL homogenizata ( $10^{-1}$ ), na svaku od dvije Petrijeve zdjelice (promjera 140 mm) s hranjivom podlogom (BP agar). Inokulum je razmazan po površini agara uporabom razmazivača (štipića "L" oblika).

Petrijeve zdjelice su nakon toga inkubirane pri  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  tijekom  $24 \pm 2\text{ h}$ , a onda reinkubirane tijekom daljnjih  $24 \pm 2\text{ h}$ .

### 3.3.1.7. Izolacija sulfitoreducirajućih klostridija

Izolacija sulfitoreducirajućih klostridija napravljena je u skladu s normom koja je navedena u **Tablici 20**. Početna otopina za izolaciju napravljena je kako je opisano u poglavlju 3.3.1.1. Po 1 mL početne otopine je zagrijan na temperaturu od  $80\text{ °C}$  tijekom 5 min. Nakon toga je inokuliran 1 mL volumena pojedinačnog decimalnog razrjeđenja u svaku od dvije epruvete s podlogom koje su držane pri  $44\text{ °C}$  do  $47\text{ °C}$ . Nakon što se agar skrutnuo, stavljeno je još 2 - 3 mL istog agara u svaku epruvetu kao pokrovni sloj. Epruvete su inkubirane pri  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  tijekom 24 h, pa reinkubirane još 24 h.

### 3.3.1.8. Izolacija kvasaca i plijesni

Izolacija kvasaca i plijesni provedena je u skladu s normom koja je navedena u **Tablici 20**. Početna otopina za inokulaciju pripremljena je kako je opisano u poglavlju 3.3.1.1. Sterilnom mikropipetom preneseno je 0,1 mL homogenizata ( $10^{-1}$ ) na svaku od dvije Petrijeve zdjelice promjera 90 mm s hranjivom podlogom. Inokulum je razmazan po površini agara uporabom razmazivača (štapića „L“ oblika). Petrijeve zdjelice su nakon toga inkubirane tijekom pet dana pri temperaturi  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

## 3.3.2. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice

Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavanskog kulena određivala su se nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje, a uzoraka Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje. Sve fizikalno-kemijske analize napravljene su primjenom validiranih standardnih i internih analitičkih metoda. Svi uzorci Slavanskog kulena i Slavonske kobasice homogenizirani su primjenom uređaja za homogenizaciju (Grindomix GM 200, Retch, Njemačka) tijekom 15 s pri 6000 rpm te su pohranjeni u plastične posudice, napunjene do vrha, kako bi se zbog

manjeg kontakta sa zrakom usporili procesi kvarenja. Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

### 3.3.2.1. Određivanje udjela vode

Određivanje udjela vode u uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice provedeno je prema ISO metodi (ISO 1442:1997). U porculanski lončić kvantitativno je prenesen pijesak u količini 3 do 4 puta većoj od testnog uzorka te su porculanski lončić, pijesak i stakleni štapić sušeni u termostatu 30 min na 103 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu u desikatoru, lončić s pijeskom i staklenim štapićem je izvagan. U takav pripremljeni i izvagani lončić izvagano je 5 g homogeniziranog uzorka i pomoću staklenog štapića dobro je izmiješan uzorak i pijesak. Tako pripremljeni uzorak sušen je u termostatu 2 h pri 103 °C. Nakon isteka tog vremena uzorak je ohlađen na sobnu temperaturu u desikatoru te je ponovno vagan. Potom su se ponavljali procesi sušenja (1 h pri 103 °C), hlađenja i vaganja sve dok se rezultati dvaju uzastopnih vaganja nisu razlikovali za manje od 0,1%. Na temelju razlika masa, prema **Formuli 3** određen je udio vode u uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice.

$$\% \text{ vode} = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje je:

$m_0$  - masa lončića s pijeskom i staklenim štapićem (g)

$m_1$  - masa lončića, testnog uzorka, pijeska i staklenog štapića prije sušenja (g)

$m_2$  - masa lončića, testnog uzorka, pijeska i staklenog štapića poslije sušenja (g)

### 3.3.2.2. Određivanje udjela pepela

Određivanje udjela pepela u uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice provedeno je prema metodi ISO 936 (ISO, 1998.). Porculanski lončić prethodno je zagrijan u mufolnoj peći tijekom 20 min pri 550 °C. Lončić je ohlađen u desikatoru na sobnu temperaturu i izvagan. U tako pripremljeni lončić odvagano je 1,5 – 2 g uzorka. Lončić s uzorkom stavljen je u hladnu mufolnu peć te je tijekom 45 min temperatura podizana na 550 ± 25 °C. Ukupno spaljivanje uzoraka trajalo je 6 h, a postupak se provodio sve dok pepeo nije poprimio sivkasto bijelu

boju. Nakon spaljivanja lončić s uzorkom stavljen je u sušionik pola sata na  $103 \pm 2$  °C. Zatim je hlađen u desikatoru na sobnu temperaturu i izvagan. Na temelju razlika masa, prema **Formuli 4** određen je sadržaj pepela u uzorcima Slavenskog kulena i Slavonske kobasice.

$$\% \text{ pepela} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \cdot 100 \quad (4)$$

gdje je:

$m_0$  - masa lončića s pijeskom i staklenim štapićem (g)

$m_1$  - masa lončića, testnog uzorka, pijeska i staklenog štapića prije sušenja (g)

$m_2$  - masa lončića, testnog uzorka, pijeska i staklenog štapića poslije sušenja (g)

### 3.3.2.3. Određivanje udjela ukupnih masti

Određivanje udjela ukupnih masti u uzorcima Slavenskog kulena i Slavonske kobasice provedeno je prema normi ISO 1443 (ISO, 1973.). U Erlenmayerovu tikvicu odvažano je 3 g homogeniziranog uzorka i dodano 50 mL 37% kloridne kiseline. Tikvica je poklopljena satnim stakalcem, zagrijavana na električnom kuhlalu do vrenja, uz povremeno protresanje tijekom sljedećih sat vremena. Zatim je dodano 150 mL vruće vode. Navlaženi nabrani filter papir stavljen je u stakleni lijevak te je sadržaj tikvice profiltriran. Filter papir ispiran je vrućom vodom sve do promjene boje plavog lakmus papira. Takav filter papir stavljen je na satno stakalce ili u Petrijevu zdjelicu i sušen 1 h u sušioniku na  $103 \pm 2$  °C te ohlađen na sobnu temperaturu. Postupak ekstrakcije masti proveden je na način da se u osušeni ( $103 \pm 2$  °C tijekom 1 h u sušioniku), ohlađeni (na sobnu temperaturu u desikatoru) i izvagani tuljac za ekstrakciju umetnuo zamotani filter papir. Svi tragovi masnoće sa satnog stakalca ili Petrijeve zdjelice obrisani su vatom namočenom u dietil eter (sredstvo za ekstrakciju), koja je također umetnuta u tuljac za ekstrakciju. Tuljac za ekstrakciju stavljen u ekstraktor u koji je dodano 140 mL dietil etera. S 10 mL dietil etera isprana je Erlenmayerova tikvica koja je korištena za razaranje uzorka. Ekstrakcija sirovih masti provedena je na uređaju Soxtherm 2000 pri temperaturi od 150 °C i trajanju ekstrakcije 1 h i 11 min. Nakon završene ekstrakcije tuljac za ekstrakciju sušen je 1 h u sušioniku na  $103 \pm 2$  °C. Nakon hlađenja u desikatoru na sobnu temperaturu tuljac je izvagan. Postotak ukupnih masti izračunat je prema **Formuli 5**.

$$\% \text{ ukupnih masti} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{m} \quad (5)$$

gdje je:

$m$  - masa testnog uzorka (g)

$m_1$  - masa praznog ekstraktora (g)

$m_2$  - masa ekstraktora s ekstrahiranim mastima (g)

### 3.3.2.4. Određivanje udjela ukupnih bjelančevina

Određivanje udjela ukupnih bjelančevina u uzorcima Slavenskog kulena i Slavonske kobasice provedeno je prema zahtjevima norme HRN ISO 937 (HZN, 1999.). U digestivnu tubu odvagano je 1,5 g testnog uzorka te dodano 5 mL koncentrirane sulfatne kiseline i 2 tablete katalizatora. Sadržaj tube oprezno je promiješan uz stvaranje vrtloga tekućine. Digestivna tuba umetnuta je u stalak koji je zatim umetnut u blok za razaranje organskih tvari zagrijan na 420 °C. Na digestivnu tubu postavljen je nastavak za skupljanje kondenzata koji je spojen s uređajem za neutralizaciju para. Potpuna razgradnja trajala je 1 h. Nakon završetka razgradnje uzorak je ohlađen na ~ 40 °C. Postupak destilacije i titracije proveden je tako da se digestivna tuba s razorenim uzorkom postavila u uređaj za destilaciju i titraciju Kjeltec 8400. Uređaj je proveo destilaciju dodatkom 60 mL 40% otopine natrijevog hidroksida i 80 mL vode u digestivnu tubu te 30 mL 1% otopine borne kiseline u titrator. Destilacija i titracija trajale su 4 min uz maksimalni pritisak vodene pare (100%). Nakon završetka programa uređaj odsisava suvišak tekućine iz digestivne tube. Slijepa proba postavljena je prema gore opisanom postupku samo bez uzorka. Na temelju podatka o masi uzorka koja je unijeta u uređaj prije početka analize, uređaj je automatski izračunavao udio ukupnih bjelančevina, temeljeno na **Formuli 6**.

$$\% \text{ ukupnih bjelančevina} = \frac{1,4007 (V_s - V_b) \cdot c_s}{m} \cdot F \quad (6)$$

gdje je:

$V_s$  - volumen klorovodične kiseline korištene za određivanje (mL)

$V_b$  - volumen klorovodične kiseline korišten za slijepu probu (mL)

$c_s$  - koncentracija klorovodične kiseline, izražena na 4 decimalna mjesta

$m$  - masa testnog dijela uzorka (g)

$F$  – faktor pretvorbe 6,25

### 3.3.2.5. Određivanje pH vrijednosti

U uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice pH vrijednost je izmjerena prema internoj metodi, na način da je odvagano 5 g homogeniziranog uzorka u tikvicu i dodano 50 mL vode. Sadržaj tikvice mućkan je 15 min na tresilici, a nakon mućkanja, pomoću pH metra izmjerena je pH vrijednost uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice.

### 3.3.2.6. Određivanje $a_w$

U uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice određen je aktivitet vode prema internoj metodi, na način da se uzorak dobro usitnio, homogenizirao i napunio do oznake u originalnu PVC posudu te stavio u uređaj za mjerenje aktiviteta vode. Pokrenuto je automatsko mjerenje koje je trajalo oko 5 min. Nakon završetka mjerenja očitana je rezultat i temperatura pri kojoj je mjerenje izvršeno.

### 3.3.3. Senzorska analiza uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice

Senzorska analiza provedena je na gotovim proizvodima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice testom bodovanja.

#### Test bodovanja

Pet zaposlenika Veterinarskog zavoda Vinkovci ocjenjivalo je izgled vanjske površine, teksturu, izgled presjeka te okus i miris jednog uzorka Slavenskog kulena i jednog uzorka Slavenske kobasice s OPG-a odabranog lokaliteta prema obrascima navedenim u **Prilogu 2**. Svaki uzorak, kao i ocjenjivač, su dobili svoju šifru. Maksimalan broj bodova za svaki uzorak je bio 100. Najveći broj bodova bio je za izgled presjeka 30, zatim 25 za okus, 20 za teksturu, 15

za miris i 10 za izgled vanjske površine. Svakom od ocjenjivanih svojstava oduzimali su se bodovi od maksimalnog broja s obzirom na uočene nedostatke. Ukupna ocjena senzorske kvalitete za svaki uzorak izračunata je zbrajanjem bodova svakog pojedinog svojstva.

### 3.3.4. Određivanje koncentracije mikotoksina u sirovinama te uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice

U sirovinama te uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice određene su koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub>. Primjenom kvantitativne ELISA metode koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> određene su u uzorcima Slavenskog kulena nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje, dok su kod Slavenske kobasice određene nakon tri mjeseca proizvodnje. ELISA test procedura provedena je prema uputama proizvođača kitova R-Biopharm (Darmstadt, Njemačka) i uporabu kemijskog analizatora (Chemwell 2910, Awareness Technologies, Palm City, SAD) (Slika 27).



Slika 27 Kemijski analizator ChemWell 2910 Awareness Technologies (foto.: Perković, I., 2018.)

#### 3.3.4.1. Određivanje koncentracije OTA

##### a) Priprema reagenasa

- Okratoksin A enzimski konjugat: razrijeđeni okratoksin A enzimski konjugat je nestabilan tako da ga je potrebno pripremiti neposredno prije analize. Konjugat je razrijeđen puferom za razrjeđivanje u omjeru 1:10 (1 + 10).
- Pufer za ispiranje: Nalazi se u kitu u obliku soli. Pakiranje iz kita se otopilo u 1 L destilirane vode i pohranilo na +4 °C na period od 4 - 6 tjedana. Manja količina

pufera pripremana je za svaku pojedinu analizu otapanjem 1 g soli u 100 mL destilirane vode, podešen je pH na 7,4 te je pufer pohranjen na +4 °C do početka analize.

**b) Priprema uzoraka**

- homogenizirana je reprezentativna količina uzorka (oko 100 g) primjenom homogenizatora
- izvagano je 1 g homogeniziranog uzorka u 12 mL plastičnu epruvetu s čepom
- dodano je 0,5 mL 1 M  $H_3PO_4$  i dobro promiješano (vortex) oko 1 min
- dodano je 3 mL etilacetata i dobro promiješano (vortex) oko 30 s
- sve je centrifugirano 1 min / 2000 g / sobna temperatura (20 - 25 °C)
- prebačen je supernatant (sloj etilacetata) dekantiranjem u novu plastičnu epruvetu
- dodano je 3 mL etilacetata ostatku uzorka i dobro promiješano (vortex) 30 s
- sve je centrifugirano 1 min / 2000 g / sobna temperatura (20 - 25 °C)
- dekantiran je supernatant (etilacetat) i pripojen prvom etilacetatnom dijelu
- dodano je 3 mL 0,65 M  $NaHCO_3$  spojenim etilacetatnim slojevima, dobro promiješano oko 15 s (vortex) i nastavljeno miješati rotirajućim pokretima 15 min
- sve je centrifugirano 5 min / 2000 g / sobna temperatura (20 - 25 °C)
- prebačeno je 1 mL donje vodene faze u 12 mL staklenu epruvetu i uzorak je grijan u vodenoj kupelji pri 100 °C 3 min
- uzorak je kratko protresen, ohlađen i dodano mu je 4 mL destilirane vode
- razrijeđen je alikvotni dio (1 + 1) s 0,13 M  $NaHCO_3$
- 50  $\mu$ L razrijeđenog uzorka aplicirano je na jažice

**c) ELISA test procedura**



- pripremljena je mikrotitracijska ploča s dovoljnim brojem jažica tako da su standardi i uzorci postavljeni u duplikatima te se odredio položaj svakog od njih
- dodano je 50  $\mu\text{L}$  otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redosljed u duplikatima u jažice
- dodano je 50  $\mu\text{L}$  razrijeđenog enzimskog konjugata u svaku jažicu; lagano promiješano i inkubirano 30 min u mraku pri sobnoj temperaturi
- cjelokupni sadržaj tekućine se uklonio iz jažica; u sve jažice je dodano 250  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje i ponovno se uklonila tekućina; ispiranje je ponovljeno 3 puta
- dodano je 100  $\mu\text{L}$  supstrata /kromogena u svaku jažicu i lagano promiješano te inkubirano u mraku pri sobnoj temperaturi 15 min ( $\pm 1$  min)
- dodano je 100  $\mu\text{L}$  stop otopine u svaku jažicu, ploča se lagano protresla i mjerila se apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm. Vrijednost je očitana unutar 30 min nakon dodatka stop otopine
- cjeloviti postupak proveden je pomoću automatiziranog kemijskog analizatora ChemWell 2190 Awareness Technologies

#### **d) Izračunavanje koncentracije analita**

Nakon analize pristupilo se određivanju koncentracije OTA u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke podijeljene su s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda (0 ng/mL) i pomnožene sa 100, te su dobiveni %-tci apsorbancije B/ B0. Koncentracija OTA u uzorcima očitana je iz izrađene baždarne krivulje pri čemu su na ordinatu nanosene vrijednosti %-taka apsorbancije za standardne koncentracije OTA, a na apscisu koncentracije OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Koncentracija OTA koja je očitana s krivulje pomnožena je s odgovarajućim faktorom razrjeđenja (korišteni faktor je 30).

#### **3.3.4.2. Određivanje koncentracije AFB<sub>1</sub>**

##### **a) Priprema reagenasa**

- 70%-tna otopina metanola: razrijeđeno je 70 mL metanola s 30 mL destilirane vode po uzorku
- pufer za ispiranje: sol za pripremu pufera za ispiranje dana je u omotu unutar kita. Otopljena je sol u 1 L destilirane vode. Pufer za ispiranje pripremljen na ovaj način ima trajnost 4 - 6 tjedana pri temperaturi 2 - 8 °C

**b) Priprema uzoraka**

- samljeveno je 100 g uzorka na homogenizatoru
- pomiješano je 20 g uzorka s 10 mL destilirane vode, 100 mL kloroforma i 10 g celita u Erlenmeyer tikvici sa čepom od 250 mL
- mućkano je 30 min pri sobnoj temperaturi koristeći magnetsku mješalicu
- sadržaj je profiltriran kroz filter papir u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL
- otpareno je 1 mL filtrata do suha
- ostaci su otopljeni u 1440  $\mu$ L metanola i 360  $\mu$ L destilirane vode

**c) ELISA test procedura**

- pripremljena je mikrotitracijska ploča s dovoljnim brojem jažica tako da su standardi i uzorci postavljeni u duplikatima te se odredio položaj svakog od njih
- dodano je 50  $\mu$ L otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redosljed u duplikatima u jažice
- dodano je 50  $\mu$ L enzimskog konjugata u svaku jažicu
- dodano je 50  $\mu$ L anti-aflatoksin otopine antitijela, lagano promiješano i inkubirano 30 min ( $\pm$  1 min) pri sobnoj temperaturi
- cjelokupni sadržaj tekućine se uklonio iz jažica; u sve jažice je dodano 250  $\mu$ L pufera za ispiranje i ponovno se uklonila tekućina; ispiranje je ponovljeno 3 puta
- dodano je 100  $\mu$ L supstrata/kromogena u svaku jažicu i lagano promiješano te inkubirano u mraku pri sobnoj temperaturi 15 min ( $\pm$  1 min)

- dodano je 100  $\mu\text{L}$  stop otopine u svaku jažicu, ploča se lagano protresla, a apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 450 nm. Vrijednosti su očitane unutar 15 min nakon dodatka stop otopine
- cjeloviti postupak proveden je pomoću automatiziranog kemijskog analizatora ChemWell 2190 Awareness Technologies

#### **d) Izračunavanje koncentracije analita**

Nakon analize odredila se koncentracija AFB<sub>1</sub> u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda (0 ng/mL) i pomnožene s 100, te su dobiveni %-tci apsorbancije B/ B<sub>0</sub>. Koncentracija AFB<sub>1</sub> u uzorcima očitana je iz izrađene baždarne krivulje pri čemu su na ordinati nanese vrijednosti %-taka apsorbancije za standardne koncentracije AFB<sub>1</sub>, a na apscisu koncentracije AFB<sub>1</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Koncentracija aflatoksina B<sub>1</sub> očitana je iz krivulje (faktor razrijeđenja za uzorke je 10, međutim već je uzet u obzir kod pripreme standarda od strane proizvođača kita te se koncentracija AFB<sub>1</sub> u uzorcima može direktno očitati iz baždarne krivulje).

### **3.3.5. Izolacija plijesni s površine uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice**

Svaka vidljivo različita kolonija plijesni se sterilnim nožem prenijela na Petrijevu zdjelicu ( $\emptyset$  90 mm) s DG - 18 agarom (Dichloran 18% glicerol) i inkubirala pri  $25 \pm 1$  °C tijekom 7 dana. Postupak se ponavljao sve dok se nisu dobile čiste kulture plijesni. Svaka čista kultura plijesni je stavljena u sterilnu epruvetu s fiziološkom otopinom te ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom 7 dana, a nakon toga čuvana u hladnjaku pri 4 °C do analize.

### **3.3.6. Identifikacija plijesni s površine uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice**

Identifikacija plijesni s površine uzoraka Slavenskog kulena i Slavenske kobasice provedena je tradicionalnom te molekularnom tzv. PCR metodom. Za provedbu identifikacije (i tradicionalne i molekularne) pripremljena je svježna kultura plijesni na način da je svaka

izolirana plijesan koja je pohranjena u epruveti s fiziološkom otopinom inokulirana na CYA i MEA agare te inkubirana pri  $25 \pm 1$  °C tijekom 7 dana.

### 3.3.6.1. Tradicionalna metoda identifikacije plijesni

Izolirane plijesni identificirane su do razine roda definiranjem njihovih makroskopskih i mikroskopskih karakteristika. Kod određivanja makroskopskih karakteristika poraslih kolonija plijesni gledala se njihova boja površine i poledine, boja podloge, veličina i tekstura kolonije te rast pri 4 °C i 37°C. Preparati za mikroskopiranje pripremljeni su s CYA agara nakon inkubacije pri  $25 \pm 1$  °C tijekom 7 dana. Na predmetnicu je stavljena kap plavog laktofenola i mikrobiološkom iglom uzet je dio micelija plijesni s agara. Uzorak plijesni se razvukao u što tanjem sloju mikrobiološkom iglom te pokrio pokrovnicom. Preparat je mikroskopiran uljnom imerzijom, pod povećanjem 1000x. Svi izolati su identificirani do razine roda prema Samson i sur. (2004.) te Pitt i Hocking (2009.).

### 3.3.6.2. Molekularna metoda identifikacije plijesni

Molekularna metoda obuhvaća ekstrakciju DNA, umnažanje DNA te sekvencioniranje, a izvršena je kako bi se uklonila bilo koja nepouzdana identifikacija provedena tradicionalnom metodom te se identificirale vrste plijesni koje se nisu mogle identificirati tradicionalnom metodom. Rezultati obje metode su uspoređene kako bi se točno odredila vrsta porasle plijesni na uzorcima Slavonskog kulena i Slavonske kobasice.

#### a) Ekstrakcija DNA

U svrhu ekstrakcije DNA, pojedinačno izolirane plijesni inokulirane su na MEA agar i inkubirane pri  $25 \pm 1$  °C tijekom 7 dana. DNA je ekstrahirana iz oko 100 µg kolonija plijesni pomoću DNeasy Plant Mini kita (Qiagen, Germany), pridržavajući se uputa proizvođača.

1. Mikrobiološkom iglom izrezan je isječak plijesni koja je porasla na MEA agaru i stavljen je u epruvetu od 2 mL Lysing Matrix C sa silikonskim kuglicama za razaranje. Epruvete s izolatima i kuglicama stavljene su u homogenizator FastPrep-24™ 5G (**Slika 28**) te je izvršeno mehaničko razaranje stanica plijesni pri 6,0 m/s tijekom 50 s.



**Slika 28** Homogenizator FastPrep-24™ 5G za mehaničko razaranje stanica plijesni (foto.: Perković, I., 2018.)

1. Nakon mehaničkog razaranja stanica plijesni u svaku epruvetu dodano je po 400  $\mu\text{L}$  pufera AP1 i 4  $\mu\text{L}$  RNase A. Sadržaj epruvete je vorteksiran te inkubiran 10 min pri 65 °C. Tijekom inkubacije, epruvete su okrenute 2-3 puta.
2. Dodano je 130  $\mu\text{L}$  pufera P3, vorteksirano i inkubirano na ledu 5 min.
3. Lizat je centrifugiran 5 min pri 14 000 rpm.
4. Lizat je pipetiran u QIAshredder spin tubice i centrifugiran 2 min pri 14 000 rpm.
5. Protok je prebačen u čiste mikrocentrifugalne tubice od 1,5-2 mL. Dodano je 1,5 volumena pufera AW1 i miješano pipetiranjem.
6. Prebačeno je 650  $\mu\text{L}$  mješavine u DNeasy Mini spin tubice te centrifugirano 1 min pri 8 000 rpm. Protok je izbačen. Sve je ponovljeno s ostatkom mješavine.
7. Spin kolona je stavljena u novu 2 mL tubicu za prikupljanje, dodano je 500  $\mu\text{L}$  pufera AW2 i centrifugirano 1 min pri 8 000 rpm. Protok je odbačen.
8. Ponovno je dodano 500  $\mu\text{L}$  pufera AW2 i centrifugirano 2 min pri 14 000 rpm.

9. Spin kolona stavljena je u novu tubicu za prikupljanje od 2 mL.
10. Dodano je 100  $\mu\text{L}$  pufera AE za ispiranje te inkubirano 5 min pri sobnoj temperaturi.  
Nakon toga je sve centrifugirano 1 min pri 8 000 rpm.
11. Dodano je 100  $\mu\text{L}$  pufera AE za ispiranje te inkubirano 5 min pri sobnoj temperaturi.  
Nakon toga je sve centrifugirano 1 min pri 8 000 rpm.
12. Mikrocentrifugalne tubice s izoliranom DNA su označene brojevima i spremljene u ledenicu do analize.

### b) Umnažanje DNA – Lančana reakcija polimerazom

Za provedbu lančane reakcije polimerazom korišten je HotStarTaq Plus MasterMix Kit, Qiagen i specifične početnice ITS1 i ITS4. Umnažanje DNA je provedeno na sljedeći način:

1. Svi zamrznuti reagensi su bili odmrznuti prije uporabe i kratko vorteksirani.
2. Pripremljene su otopine početnica:
  - **Osnovni stock koncentracije 100  $\mu\text{M}$ :** tubice s liofiliziranim početnicama su prije otvaranja centrifugirane kratko kako bi se sav sadržaj spustio na dno tubice. Otopina početnice koncentracije 100  $\mu\text{M}$  pripremljena je prema formuli (7):

$$100 \mu\text{M} = X \text{ nmol liofilizirana početnica} + (X \cdot 10 \mu\text{L vode za molekularne pretrage}) \quad (7)$$

Stoga je dodano prema formuli (8 i 9):

$$\text{ITS1} = 22,0 \text{ nmol} \cdot 10 = 220 \mu\text{L vode za molekularne pretrage} \quad (8)$$

$$\text{ITS4} = 20,2 \text{ nmol} \cdot 10 = 202 \mu\text{L vode za molekularne pretrage} \quad (9)$$

Osnovni stock je prije pripreme radnog stocka dobro vorteksiran.

- **Radni stock koncentracije 10  $\mu\text{M}$ :** 10  $\mu\text{L}$  otopine osnovnog stock-a početnice stavljen je u mikrocentrifugalnu tubicu i dodano je 90  $\mu\text{L}$  vode za molekularne pretrage (**Formula 10 i 11**).

$$10 \mu\text{M ITS1} = 10 \mu\text{L} (100 \mu\text{M ITS1}) + 90 \mu\text{L vode za molekularne pretrage} \quad (10)$$

$$10 \mu\text{M ITS4} = 10 \mu\text{L} (100 \mu\text{M ITS4}) + 90 \mu\text{L vode za molekularne pretrage} \quad (11)$$

3. Svaka PCR reakcijska smjesa od 25  $\mu\text{L}$  koja je pripremljena u mikrocentrifugalnoj tubici sadržavala je 12,5  $\mu\text{L}$  2x PCR pufera (HotStarTaq Plus MasterMix Kit, Qiagen,

Germany), 2,5  $\mu\text{L}$  10x Coral Load, 0,4  $\mu\text{M}$  svake početnice, 7  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  bez nukleaze i 1  $\mu\text{L}$  ekstrahirane DNA. Reakcijska smjesa je promiješana pipetiranjem i kratko centrifugirana u mini centrifugi kako bi sav sadržaj tubice bio na dnu. Za svaku PCR reakcijsku rađena je pozitivna i negativna kontrola. Za pozitivnu kontrolu korištena je ekstrahirana DNA plijesni iz prethodnih postupaka molekularne identifikacije, a za negativnu kontrolu voda za molekularne reakcije u količini od 1  $\mu\text{L}$ .

4. PCR tubice s reakcijskom smjesom te pozitivnom i negativnom kontrolom stavljene su u termokružnik, a reakcija se odvijala prema protokolu (**Tablica 21**).

**Tablica 21** Osnovni protokol PCR reakcije

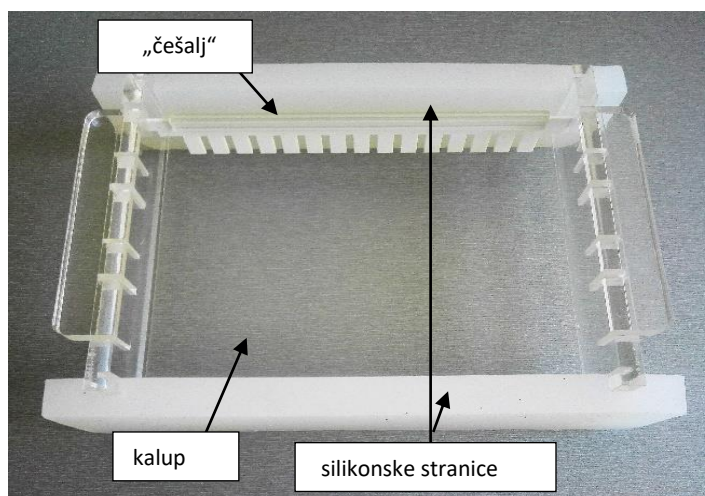
KORAK	VRIJEME	TEMPERATURA
Početno zagrijavanje	5 min	95 °C
40 ciklusa:		
- denaturacija	30 s	94 °C
- sparivanje početnica	30 s	55 °C
- produljivanje DNA lanca	1 min	72 °C
Završno produljivanje DNA lanca	10 min	72 °C
Hlađenje reakcijske smjese	$\infty$	4 °C

### c) Gel elektroforeza – provjera PCR produkata

Produkti lančane reakcije polimerazom ovizualizirani su gel elektroforezom. Za njezinu provedbu učinjeno je:

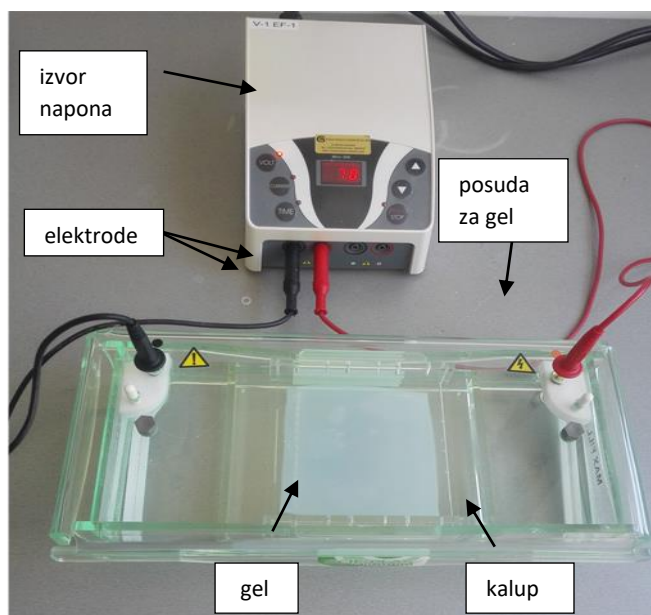
1. Priprema 1,5 % agaroz gela: u Erlenmayerovu tikvicu je odvagano 1,5 g agaroz agara i dodano 100 mL 1X TAE pufera (Tris-acetat-EDTA) koji je pripremljen na način da je u bocu stavljeno 20 mL 50X TAE pufera i 980 mL deionizirane vode. Sadržaj Erlenmayerove tikvice je postupno zagrijavan u mikrovalnoj pećnici, sve dok se gel nije potpuno otopio. Otopljeni gel je ohlađen na oko 50 °C te je dodano 5  $\mu\text{L}$  boje GelStar™.
2. Priprema kalupa za gel elektroforezu: plastičnom kalupu su stavljene dvije bočne silikonske stranice, a u utore na kalupu stavljen je tzv. „češalj“ (**Slika 29**). U tako pripremljen kalup uliveno je oko 80 mL pripremljenog gela s bojom i

ostavljen je na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi oko 30 min kako bi se gel skrutnuo. Kada se gel skrutnuo, izvađen je „češalj“ i skinute silikonske bočne stranice.



**Slika 29** Pripremljeni kalup za gel (foto.: Perković, I., 2018.)

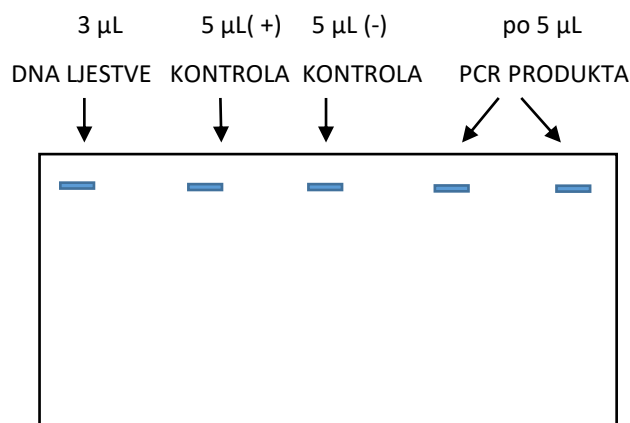
3. Posuda za gel punjena je otprilike do polovine s 1X TAE puferom. U tako pripremljenu posudu stavljen je kalup s gelom i posuda je nadopunjena s 1X TAE puferom sve do oznake „max fill“. **Slika 30** prikazuje opremu za provedbu gel elektroforeze.



**Slika 30.** Oprema za provedbu gel elektroforeze (foto.: Perković, I., 2018.)

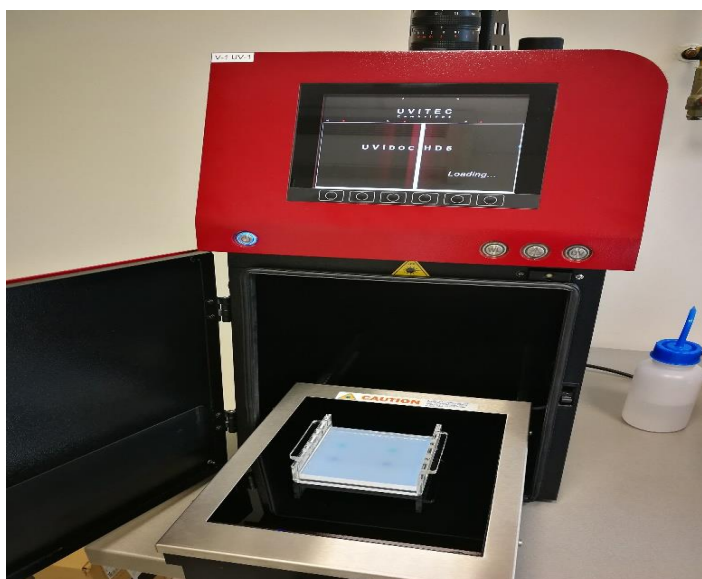


4. DNA ljestve, pozitivna i negativna kontrola te PCR produkti nanešeni su mikropipetom u jažice kao na **Slici 31**.



**Slika 31** Nanošenje PCR produkata u jažice gela (Izrada shematskog prikaza: Perković, I., 2018.)

5. Nakon nanošenja svih PCR produkata u jažice gela, pokrenut je gel pri naponu od 70 V tijekom 90 min.
6. Po završetku elektroforeze, isključeno je napajanje, elektrode su odvojene od izvora napajanja, a gel je pažljivo uklonjen iz posude.
7. Gel je stavljen u UV transluminator (**Slika 32**), upaljeno je UV svjetlo te su DNA fragmenti vizualizirani.



**Slika 32** UV transluminator (foto.: Perković, I., 2018.)

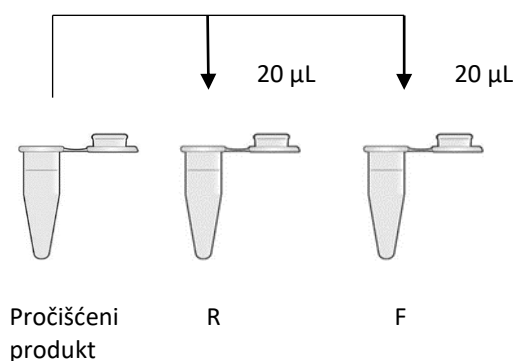
#### d) Pročišćavanje PCR produkata

Prije sekvencioniranja PCR produkata, uzorci su pročišćeni korištenjem illustra™ ExoStar. ExoStar prije upotrebe je izvađen iz ledenice i čuvan na ledu za vrijeme korištenja. U svaku tubicu s PCR produktom dodano je 3  $\mu\text{L}$  illustra™ ExoStar-a i 25  $\mu\text{L}$  vode za molekularne pretrage. Tubice su stavljene u termokružnik i pokrenut je program za pročišćavanje (**Tablica 22**).

**Tablica 22** Program za pročišćavanje PCR produkata prije sekvencioniranja

VRIJEME/min	TEMPERATURA /°C
45	37
15	80

Nakon završenog programa pročišćavanja, sadržaj svake tubice je podijeljen na sljedeći način (**Slika 33**):

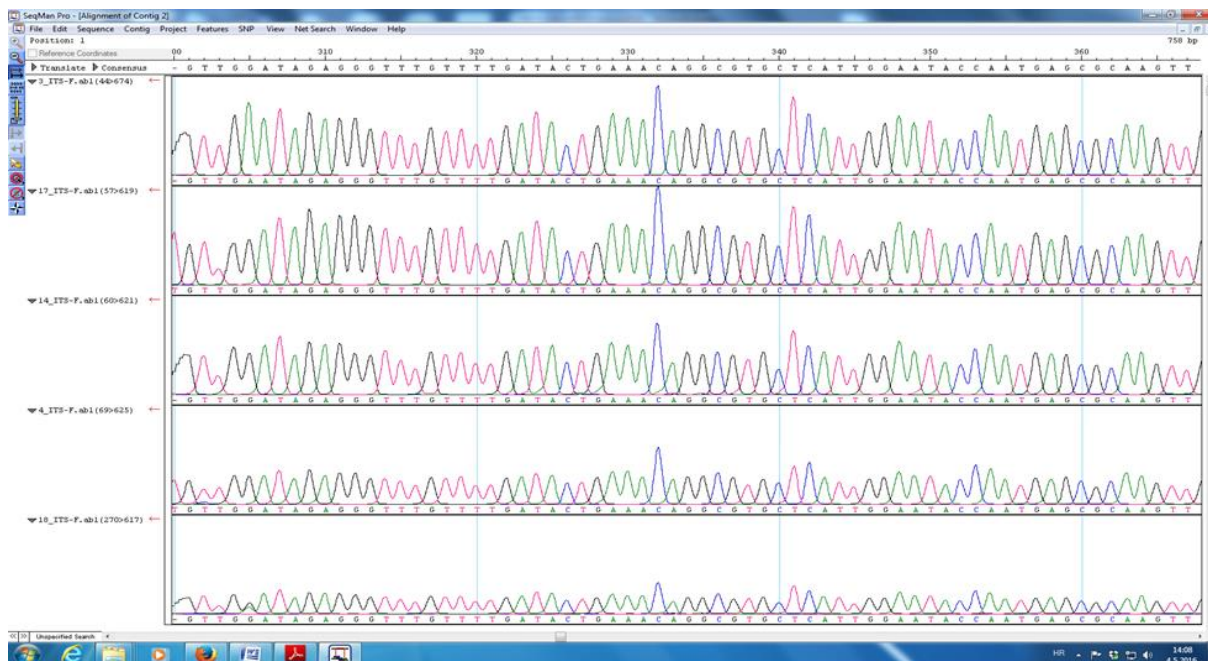


**Slika 33** Shema podjele uzorka za pročišćavanje (*Izrada shematskog prikaza: Perković, I., 2018.*)

Na svaku tubicu napisana je oznaka uzorka gdje slovo F označava početnicu ITS1, a slovo R početnicu ITS4. Tako pripremljeni uzorci spremljeni su u ledenicu do slanja uzoraka na sekvencioniranje u Microgen Inc., Amsterdam, Nizozemska.

### e) Uređivanje sekvenci

Sve dobivene sekvence su uređene pomoću programa Lasergene SeqManPro DNASTAR 13 (Madison, Wisconsin, SAD) (Slika 34). Uređene sekvence uspoređene su s onima koje su dostupne u bazama CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre database (<http://www.cbs.knaw.nl/>) i GeneBank-e pomoću BLAST algoritma (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kako bi se potvrdila izolirana vrsta plijesni.



Slika 34 Print screen programa SeqManPro DNASTAR 13 (foto.: Perković, I., 2018.)

### 3.3.7. Statistička analiza rezultata

Statistička analiza rezultata odradila se primjenom računalnog programa SPSS Statistics 22.0 (NY IBM, SPSS Inc., SAD, 2013.). Statistička značajnost postavljena je na razini  $p = 0,05$ .

#### a) Slavonski kulen

Rezultati brojčanih vrijednosti količine mikotoksina i fizikalno-kemijskih parametara, uspoređivani su s obzirom na:

5 različitih lokaliteta za neoštećene uzorke i 1 lokalitet za oštećeni uzorak (6 skupina) te s obzirom na 2 vremenska perioda zrenja (90. i 180. dan) (2 skupine) upotrebom dvo-faktorske analize varijance (ANOVA) (2 faktora: lokalitet i vrijeme).

**b) Slavonska kobasica**

Rezultati brojčanih vrijednosti količine mikotoksina i fizikalno-kemijskih parametara, uspoređivani su s obzirom na: 5 različitih lokaliteta za neoštećene uzorke i 1 lokalitet za oštećeni uzorak (6 skupina) za 90. dan upotrebom one-way ANOVA testa (jedno-faktorska ANOVA – 1 faktor: lokalitet).

Za statističku obradu podataka za koncentracije mikotoksina uzeti su svi uzorci (i oni u kojima nisu detektirani mikotoksini), no u statističku obradu uzeta je  $\frac{1}{2}$  LOD vrijednosti za svaki pojedini mikotoksin.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIROVOG MESA, PAPRIKE TE UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE

### 4.1.1. Mikrobiološke analize – Slavonski kulen

Prikazani su rezultati mikrobiološke analize sirovog mesa (**Tablica 23**) i paprike (mljevene) (**Tablica 24**) korištenih u proizvodnji Slavonskog kulena po različitim mikrolokalitetima te mikrobiološke analize uzoraka Slavonskog kulena nakon tri (**Tablica 25**) i nakon šest mjeseci proizvodnje (**Tablica 26**).

#### 4.1.1.1. Mikrobiološka analiza sirovog mesa i paprike korištenih u proizvodnji Slavonskog kulena

**Tablica 23** Mikrobiološka analiza sirovog mesa za proizvodnju Slavonskog kulena na različitim mikrolokalitetima i na jednom odabranom mikrolokalitetu

PARAMETAR/ OZNAKA	1A - M	2A - M	3A - M	4A - M	5A - M	2D - M
E ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	1,917	2,277	2,129	1,829	1,619	2,123
KPS ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
S / 25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
LM / 25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
SRK ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
K ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	1,751	1,743	1,892	< 1	1,007	1,932
P ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

n.n. – nije nađeno

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilokoki; S - *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfireducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A - uzorci Slavonskog kulena; 2D - odabrani mikrolokalitet; M - meso (sirovina)

**Tablica 24** Mikrobiološka analiza paprike (mljevene) za proizvodnju Slavenskog kulena na različitim mikrolokalitetima i na jednom odabranom mikrolokalitetu

PARAMETAR/ OZNAKA	1A - P	2A - P	3A - P	4A - P	5A - P	2D - P
E (log <sub>10</sub> cfu/g)	1,899	2,204	< 1	< 1	< 1	1,909
KPS (log <sub>10</sub> cfu/g)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
S/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
LM/g	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
SRK (log <sub>10</sub> cfu/g)	< 1	< 1	1,898	< 1	1,059	1,736
K (log <sub>10</sub> cfu/g)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
P (log <sub>10</sub> cfu/g)	< 1	1,201	1,929	< 1	< 1	1,721

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

n.n. – nije nađeno

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilocoki; S - *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfitoreducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A - uzorci Slavenskog kulena; 2D - odabrani mikrolokalitet; P - paprika (mljevena)

#### 4.1.1.2. Mikrobiološka analiza uzoraka Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje

U **Tablici 25** prikazani su rezultati mikrobiološke analize uzoraka Slavenskog kulena na različitim mikrolokalitetima te rezultati mikrobiološke analize oštećenih uzoraka Slavenskog kulena na jednom odabranom mikrolokalitetu nakon tri mjeseca proizvodnje.

**Tablica 25** Mikrobiološka analiza uzoraka Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje

PARAMETAR/ OZNAKA	1A	2A	3A	4A	5A	2D-30
E (log <sub>10</sub> cfu/g)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	1,777
KPS (log <sub>10</sub> cfu/g)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
S/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
LM/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
SRK (log <sub>10</sub> cfu/g)	< 1	< 1	1,398	< 1	< 1	< 1

<b>K (log<sub>10</sub>cfu/g)</b>	2,301	1,602	2,392	< 1	< 1	4,462
<b>P (log<sub>10</sub>cfu/g)</b>	< 1	2,341	1,954	< 1	< 1	2,999

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

n.n. – nije nađeno

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilokoki; S - *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfitoreducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A - uzorci Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje; 2D-30 – oštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje

#### 4.1.1.3. Mikrobiološka analiza uzoraka Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje

U **Tablici 26** prikazani su rezultati mikrobiološke analize uzoraka Slavenskog kulena na različitim mikrolokalitetima te rezultati mikrobiološke analize oštećenih i neoštećenih uzoraka Slavenskog kulena na jednom odabranom mikrolokalitetu nakon šest mjeseci proizvodnje.

**Tablica 26** Mikrobiološka analiza uzoraka Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje

PARAMETAR/ OZNAKA	1B	2B	3B	4B	5B	2D-6O	2D-6N
<b>E (log<sub>10</sub>cfu/g)</b>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>KPS (log<sub>10</sub>cfu/g)</b>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>S / 25 g</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>LM / 25 g</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>SRK (log<sub>10</sub>cfu/g)</b>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>K (log<sub>10</sub>cfu/g)</b>	2,809	1,000	2,166	2,176	1,301	3,361	3,361
<b>P (log<sub>10</sub>cfu/g)</b>	3,516	2,380	2,471	1,775	1,301	6,310	< 1

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

n.n. – nije nađeno

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilokoki; S - *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfitoreducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; B - uzorci Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6O – oštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6N – neoštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje



#### 4.1.2. Mikrobiološke analize – Slavonska kobasica

Prikazani su rezultati mikrobiološke analize sirovog mesa (**Tablica 27**) i paprike (mljevene) (**Tablica 28**) koji su korišteni u proizvodnji Slavonske kobasice po različitim mikrolokalitetima. U **Tablici 29** prikazani su rezultati mikrobiološke analize uzoraka Slavonske kobasice na različitim mikrolokalitetima te rezultati mikrobiološke analize oštećenih i neoštećenih uzoraka Slavonske kobasice na jednom odabranom mikrolokalitetu nakon tri mjeseca proizvodnje.

##### 4.1.2.1. Mikrobiološka analiza sirovog mesa i paprike korištenih u proizvodnji Slavonske kobasice

**Tablica 27** Mikrobiološka analiza sirovog mesa za proizvodnju Slavonske kobasice

PARAMETAR/ OZNAKA	1C - M	2C - M	3C - M	4C - M	5C - M	1D - M
E ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	1,699	1,793	1,610	1,912	2,178	1,876
KPS ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
S/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
LM/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
SRK ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
K ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	1,849	< 1	2,016	2,079	2,019
P ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

n.n. – nije nađeno

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilocoki; S - *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfitoreducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; C - uzorci Slavonske kobasice; 1D - odabrani mikrolokalitet; M - meso (sirovina)

Tablica 28 Mikrobiološka analiza paprike (mljevene) za proizvodnju Slavonske kobasice

PARAMETAR/ OZNAKA	1C - P	2C - P	3C - P	4C - P	5C - P	1D - P
E ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	2,050	2,255	< 1	1,705	< 1	2,089
KPS ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
S/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
LM/g	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
SRK ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	1,872	< 1	< 1	1,956	1,525
K ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
P ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	1,292	1,159	< 1	< 1	1,824	2,126

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

n.n. – nije nađeno

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilokoki; S - *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfitoreducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; C - uzorci Slavonske kobasice; 1D - odabrani mikrolokalitet; P – paprika (mljevena)

#### 4.1.2.2. Mikrobiološka analiza uzoraka Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje

Tablica 29 Mikrobiološka analiza uzoraka Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje

PARAMETAR/ OZNAKA	1C	2C	3C	4C	5C	1D-30	1D-3N
E ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	2,176	3,380	< 1	1,845	3,155	2,732	2,826
KPS ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
S/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
LM/25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
SRK ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
K ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	1,392	4,477	4,477	4,653	5,322	5,477	5,477
P ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ )	1,000	2,079	2,065	2,301	< 1	1,292	< 1

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

n.n. – nije nađeno

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilokoki; S - *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfitoreducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; C - uzorci Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje; 1D-3O – oštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje; 1D-3N - neoštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje

## 4.2. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE

Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavonskog kulena analizirana su nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje, dok su za uzorke Slavonske kobasice analizirani nakon tri mjeseca proizvodnje. U **Tablici 30** prikazani su rezultati fizikalno-kemijske analize uzoraka Slavonskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje, a u **Tablici 31** nakon šest mjeseci proizvodnje.

### 4.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavonskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje

**Tablica 30** Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavonskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje

PARAMETAR/ OZNAKA	1A	2A	3A	4A	5A	2D-3O	$\bar{X}$	SD
voda (%)	48,81	50,43	49,42	49,06	37,94	50,21	47,65	4,80
pepeo (%)	4,44	4,05	4,90	5,35	4,19	4,04	4,50	0,53
bjelančevine (%)	23,61	25,06	25,49	27,95	27,25	28,94	26,38	2,00
mast (%)	22,95	20,40	20,13	17,50	30,50	16,78	21,38	4,99
pH	5,09	4,92	5,50	5,21	5,07	5,60	5,23	5,60
$a_w$	0,98	0,99	0,97	0,98	0,95	0,96	0,97	0,01

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A - uzorci Slavonskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje; 2D-3O – oštećeni uzorak Slavonskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje;  $\bar{X}$  - srednja vrijednost; SD – standardna devijacija

### 4.2.2. Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavonskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje

**Tablica 31** Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje

PARAMETAR/ OZNAKA	1B	2B	3B	4B	5B	2D-6O	2D-6N	$\bar{X}$	SD
voda (%)	36,47	40,45	40,90	36,38	29,42	29,53	31,75	34,99	4,83
pepeo (%)	5,31	4,72	4,67	6,31	5,23	4,18	4,41	4,98	0,72
bjelančevine (%)	31,03	28,72	32,03	36,49	38,16	35,96	35,18	33,94	3,40
mast (%)	26,74	25,83	22,28	20,65	27,05	30,15	28,45	25,88	3,35
pH	5,37	5,16	5,78	5,37	5,35	6,72	5,85	5,66	0,53
$a_w$	0,88	0,91	0,92	0,86	0,82	0,86	0,89	0,88	0,03

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; B - uzorci Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6O – oštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6N – neoštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje;  $\bar{X}$  - srednja vrijednost; SD – standardna devijacija

primjenom One-way ANOVA testa kod uzoraka Slavenskog kulena, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u udjelu pepela i masti u odnosu na promatrane mikrolokalitete ( $p < 0,05$ ) dok kod ostalih promatranih parametara (udio vode, udio bjelančevina, pH i  $a_w$ ) nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ). Za uzorke Slavenskog kulena, p vrijednosti navedene su u **Tablici 32**.

**Tablica 32** p vrijednosti dobivene One-way ANOVA testom za uzorke Slavenskog kulena

PARAMETRI	p VRIJEDNOST SLAVONSKI KULEN
voda (%)	0,102798
pepeo (%)	$1,31 \times 10^{-7}$
bjelančevine (%)	0,25
mast (%)	0,00000696
pH	0,094308
$a_w$	0,4399

### 4.2.3. Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavonske kobasice

**Tablica 33** Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavonske kobasice

PARAMETAR/ OZNAKA	1C	2C	3C	4C	5C	1D-3O	1D-3N	$\bar{X}$	SD
voda (%)	19,87	26,83	22,48	25,48	22,00	23,38	21,45	23,07	2,39
pepeo (%)	5,52	4,45	4,81	5,01	3,52	4,53	4,33	4,60	0,62
bjelančevine (%)	32,82	28,37	28,34	30,61	24,94	30,85	25,91	28,83	2,81
mast (%)	41,68	40,17	44,18	38,85	49,44	41,10	48,10	43,36	4,05
pH	5,81	5,72	5,63	5,77	5,26	5,75	5,29	5,60	0,23
$a_w$	0,71	0,82	0,78	0,80	0,75	0,77	0,76	0,77	0,04

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; C - uzorci Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje; 1D-3O – oštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje; 1D-3N – neoštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje;  $\bar{X}$  - srednja vrijednost; SD – standardna devijacija

primjenom One-way ANOVA testa, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u kemijskom sastavu uzoraka Slavonske kobasice u odnosu na pojedinačno promatrane fizikalno-kemijske parametre (udio vode, udio pepela, udio bjelančevina, udio masti, pH i  $a_w$ ) i promatrane mikrolokalitete. Za uzorke Slavonske kobasice, p vrijednosti navedene su u **Tablici 34**.

**Tablica 34** p vrijednosti dobivene One-way ANOVA testom za uzorke Slavonske kobasice

PARAMETRI	p VRIJEDNOST SLAVONSKA KOBASICA
voda (%)	0,000084
pepeo (%)	0,001385
bjelančevine (%)	0,03973
mast (%)	0,000702
pH	0,021958
$a_w$	0,001446

### 4.3. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE

Senzorska analiza neoštećenih uzoraka Slavonskog kulena i Slavonske kobasice s odabranog mikrolokality provedena je testom bodovanja prema ocjenjivačkim listićima (**Prilog 2** i **Prilog 3**).

#### 4.3.1. Senzorska analiza uzorka Slavonskog kulena

U **Tablici 35**. prikazani su rezultati senzorske analize neoštećenog uzorka Slavonskog kulena.

**Tablica 35** Senzorska analiza neoštećenog uzorka Slavonskog kulena

SENZORSKO SVOJSTVO/BODOVI	OCJENJIVAČ 1	OCJENJIVAČ 2	OCJENJIVAČ 3	OCJENJIVAČ 4	OCJENJIVAČ 5
IZGLED VANJSKE POVRŠINE (max. 10 bodova)	9	8	8	9	8
TEKSTURA (max. 20 bodova)	20	19	20	20	20
IZGLED PRESJEKA (max. 30 bodova)	28	27	27	28	27
OKUS (max. 25 bodova)	7	11	16	15	10
MIRIS (max. 15 bodova)	13	14	13	13	13
<b>UKUPNA OCJENA</b> (max. 100 bodova)	<b>77</b>	<b>79</b>	<b>84</b>	<b>85</b>	<b>78</b>

Na **Slici 35** prikazana je površina oštećenog uzorka Slavonskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje, a na **Slici 36** njegov presjek na kojem je vidljivo da je došlo do difuzije plijesni s površine u unutrašnjost uzorka.



**Slika 35** Površina oštećenog uzorka Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje (foto.: Perković, I., 2018.)



**Slika 36** Presjek oštećenog uzorka Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje (foto.: Perković, I., 2018.)

#### 4.3.2. Senzorska analiza uzorka Slavonske kobasice

U **Tablici 36** prikazani su rezultati senzorske analize neoštećenog uzorka Slavonske kobasice.

Tablica 36 Senzorska analiza neoštećenog uzorka Slavonske kobasice

SENZORSKO SVOJSTVO/BODOVI	OCJENJIVAČ 1	OCJENJIVAČ 2	OCJENJIVAČ 3	OCJENJIVAČ 4	OCJENJIVAČ 5
IZGLED VANJSKE POVRŠINE (max. 10 bodova)	9	4	7	7	7
TEKSTURA (max. 20 bodova)	18	16	17	16	17
IZGLED PRESJEKA (max. 30 bodova)	24	26	23	18	26
OKUS (max. 25 bodova)	21	25	16	21	23
MIRIS (max. 15 bodova)	11	14	12	15	11
UKUPNA OCJENA (max. 100 bodova)	83	85	75	77	84

Na **Slici 37** prikazana je površina oštećenog uzorka Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje, a na **Slici 38** njezin presjek.



**Slika 37** Porast površinske plijesni na oštećenom uzorku Slavonske kobasice (foto.: Perković, I., 2018.)





**Slika 38** Presjek oštećenog uzorka Slavonske kobasice (foto.: Perković, I., 2018.)

#### **4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA U SIROVOM MESU, PAPRICI TE UZORCIMA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE**

##### **4.4.1. Koncentracija mikotoksina – Slavonski kulen**

Prikazani su rezultati određivanja koncentracije mikotoksina u sirovom mesu i paprici (mljevena) koji su korišteni u proizvodnji Slavonskog kulena po različitim mikrolokalitetima te koncentracije mikotoksina u uzorcima Slavonskog kulena nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje. Isto tako, prikazani su i rezultati određivanja koncentracije mikotoksina u sirovom mesu i paprici (mljevena) te oštećenih i neoštećenih uzoraka Slavonskog kulena na jednom odabranom lokalitetu.

##### **4.4.1.1. Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u sirovom mesu i paprici (mljevena)**

U **Tablici 37** prikazane su određene koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u sirovom mesu, a u **Tablici 38** u mljevenoj paprici, koji se koriste za proizvodnju Slavonskog kulena.

**Tablica 37** Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u sirovom mesu za proizvodnju Slavenskog kulena

Parametar/Oznaka	1A-M	2A-M	3A-M	4A-M	5A-M	2D-M
OTA (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

okratoksin A – OTA; aflatoksin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>

limit detekcije (LOD): OTA - 1,5 µg/kg; AFB<sub>1</sub> – 2,0 µg/kg

n.d. – nije detektirano

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A – uzorci Slavenskog kulena; M - meso (sirovina); 2D – odabrani mikrolokalitet

**Tablica 38** Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u paprici (mljevenoj) za proizvodnju Slavenskog kulena

Parametar/Oznaka	1A-P	2A-P	3A-P	4A-P	5A-P	2D-P
OTA (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

okratoksin A – OTA; aflatoksin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>

limit detekcije (LOD): OTA - 1,5 µg/kg; AFB<sub>1</sub> – 2,0 µg/kg

n.d. – nije detektirano

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A – uzorci Slavenskog kulena; P - paprika (sirovina); 2D – odabrani mikrolokalitet

#### 4.4.1.2. Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje

U **Tablici 39** prikazani su rezultati određivanja koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavenskog kulena na različitim mikrolokalitetima te rezultati određivanja koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u oštećenim uzorcima Slavenskog kulena na jednom odabranom mikrolokalitetu nakon tri mjeseca proizvodnje.

**Tablica 39** Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje

Parametar/Oznaka	1A	2A	3A	4A	5A	2D-3O
OTA (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,35
AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

okratoksin A – OTA; aflatoksin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>

limit detekcije (LOD): OTA - 1,5 µg/kg; AFB<sub>1</sub> – 2,0 µg/kg

n.d. – nije detektirano

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A - uzorci Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje; 2D-3O – oštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje

#### 4.4.1.3. Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje

U **Tablici 40** prikazani su rezultati određivanja koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavenskog kulena na različitim mikrolokalitetima, rezultati određivanja koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u oštećenim i neoštećenim uzorcima Slavenskog kulena na jednom odabranom mikrolokalitetu nakon šest mjeseci proizvodnje.

**Tablica 40** Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje

Parametar/Oznaka	1B	2B	3B	4B	5B	2D-6O	2D-6N
OTA (µg/kg)	2,20	2,59	3,55	n.d.	n.d.	8,07	n.d.
AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,36	n.d.

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

okratoksin A – OTA; aflatoksin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>

limit detekcije (LOD): OTA - 1,5 µg/kg; AFB<sub>1</sub> – 2,0 µg/kg

n.d. – nije detektirano

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; B - uzorci Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6O – oštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6N – neoštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje

#### 4.4.2. Koncentracija mikotoksina – Slavonska kobasica

U niže prikazanim tablicama navedeni su rezultati određivanja koncentracije mikotoksina u sirovom mesu (**Tablica 41**) i paprici (mljevena) (**Tablica 42**), koji su korišteni u proizvodnji Slavonske kobasice po različitim mikrolokalitetima, koncentracije mikotoksina u uzorcima Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje te rezultati određivanja mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u oštećenim i neoštećenim uzorcima Slavonske kobasice na jednom odabranom mikrolokalitetu nakon tri mjeseca proizvodnje (**Tablica 43**).

##### 4.4.2.1. Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u sirovom mesu i paprici (mljevena)

**Tablica 41** Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u sirovom mesu za proizvodnju Slavonske kobasice

Parametar/Oznaka	1C-M	2C-M	3C-M	4C-M	5C-M	1D-M
OTA (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

okratoksin A – OTA; aflatoksin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>

limit detekcije (LOD): OTA - 1,5 µg/kg; AFB<sub>1</sub> – 2,0 µg/kg

n.d. – nije detektirano

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; C – uzorci Slavonske kobasice; M - meso (sirovina); 1D – odabrani mikrolokalitet

**Tablica 42** Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u paprici (mljevenoj) za proizvodnju Slavonske kobasice

Parametar/Oznaka	1C-P	2C-P	3C-P	4C-P	5C-P	1D-P
OTA (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

okratoksin A – OTA; aflatoksin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>

limit detekcije (LOD): OTA - 1,5 µg/kg; AFB<sub>1</sub> – 2,0 µg/kg

n.d. – nije detektirano

Oznake uzoraka: Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; C – uzorci Slavonske kobasice; P - paprika (sirovina); 1D – odabrani mikrolokalitet

#### 4.4.2.2. Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavonske kobasice

**Tablica 43** Koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u uzorcima Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje

Parametar/Oznaka	1C	2C	3C	4C	5C	1D-3O	1D-3N
OTA (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,09	5,10
AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost 3 analizirana uzorka po mikrolokalitetu

okratoksin A – OTA; aflatoksin B<sub>1</sub> – AFB<sub>1</sub>

limit detekcije (LOD): OTA - 1,5 µg/kg; AFB<sub>1</sub> – 2,0 µg/kg

n.d. – nije detektirano

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; C – uzorci Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje; 1D-3O – oštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje; 1D-3N – neoštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje

p vrijednost za uzorke Slavonskog kulena i Slavonske kobasice prikazane su u **Tablici 44**.

**Tablica 44** p vrijednosti dobivene One-way ANOVA testom za uzorke Slavonskog kulena i Slavonske kobasice

PARAMETAR	p vrijednost	
	SLAVONSKI KULEN	SLAVONSKA KOBASICA
OTA	0,025660	0,041358
AFB <sub>1</sub>	0,302365	n.d.

OTA - okratoksin A; AFB<sub>1</sub> - aflatoksin B<sub>1</sub>; n.d. – nije detektirano

#### 4.5. REZULTATI IDENTIFIKACIJE POVRŠINSKE PLIJESNI NA UZORCIMA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE

Identifikacija porasle površinske plijesni na uzorcima Slavonskog kulena i Slavonske kobasice izvršena je tradicionalnom metodom do razine roda, a molekularnom metodom izvršena je identifikacija do razine vrste.

#### 4.5.1. Identifikacija površinske plijesni na uzorcima Slavenskog kulena

U **Tablici 45** prikazani su rezultati izolacije plijesni koje su porasle na uzorcima Slavenskog kulena na različitim mikrolokalitetima te oštećenim uzorcima Slavenskog kulena s odabranog lokaliteta nakon tri mjeseca proizvodnje, a u **Tablici 46** su prikazani rezultati izolacije plijesni koje su porasle na uzorcima Slavenskog kulena na različitim mikrolokalitetima te oštećenim i neoštećenim uzorcima Slavenskog kulena s odabranog lokaliteta nakon šest mjeseci proizvodnje.

**Tablica 45** Plijesni izolirane s površine uzoraka Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje prema broju izoliranih vrsta po različitim mikrolokalitetima

OZNAKA UZORKA	TRADICIONALNA METODA		MOLEKULARNA METODA	
	ROD	VRSTA	ROD	VRSTA
1A	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>
2A	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor plumbeus</i>
3A	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Cladosporium</i>	-	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
4A	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
5A	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>

	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Alternaria</i>	-	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<b>2D-30</b>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A – uzorci Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje; 2D-30 – oštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje

**Tablica 46** Plijesni izolirane s površine uzoraka Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje prema broju izoliranih vrsta po različitim mikrolokalitetima

OZNAKA UZORKA	TRADICIONALNA METODA		MOLEKULARNA METODA	
	ROD	VRSTA	ROD	VRSTA
<b>1B</b>	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<b>2B</b>	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor plumbeus</i>
<b>3B</b>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
<b>4B</b>	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor plumbeus</i>

	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	<i>Eurotium</i>	-	<i>Eurotium</i>	<i>Eurotium repens</i>
<b>5B</b>	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<b>2D-6O</b>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus</i>	-	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus proliferans</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<b>2D-6N</b>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; B – uzorci Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6O – oštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje; 2D-6N – neoštećeni uzorak Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje

#### 4.5.2. Identifikacija površinske plijesni na uzorcima Slavenske kobasice

U **Tablici 47** prikazani su rezultati izolacije plijesni koje su porasle na uzorcima Slavenske kobasice na različitim mikrolokalitetima te oštećenim i neoštećenim uzorcima Slavenske kobasice s odabranog lokaliteta nakon tri mjeseca proizvodnje dok je u **Tablici 48** dan zbirni prikaz svih izoliranih vrsta plijesni na uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice.



**Tablica 47** Plijesni izolirane s površine uzoraka Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje prema broju izoliranih vrsta po različitim mikrolokalitetima

OZNAKA UZORKA	TRADICIONALNA METODA		MOLEKULARNA METODA	
	ROD	VRSTA	ROD	VRSTA
1C	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
2C	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>
3C	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
4C	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
5C	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
1D-30	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	<i>Mucor</i>	-	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>
1D-3N	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>
	<i>Penicillium</i>	-	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>

Oznake uzoraka: 1, 2, 3, 4, 5 – oznaka mikrolokaliteta; A – uzorci Slavonske kobasice nakon tri mjeseca

proizvodnje; 1D-3O – oštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje; 1D-3N – neoštećeni uzorak Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, nakon tri mjeseca proizvodnje

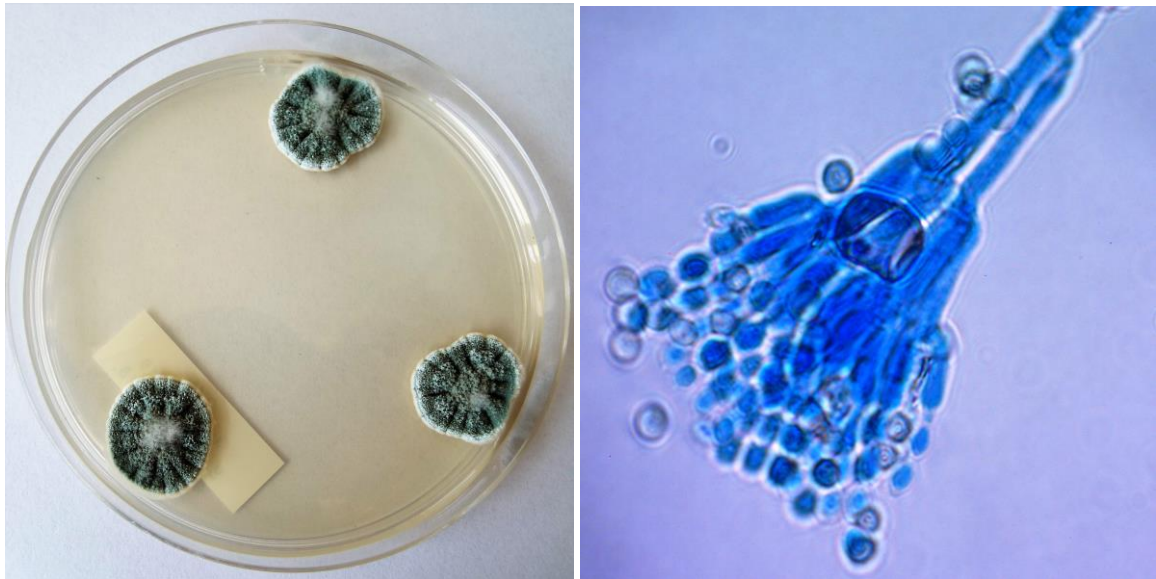
**Tablica 48** Sve plijesni izolirane s površine uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice, njihova učestalost kod izolacije i pripadajuće sekvence (navedene u **Prilogu 1**)

VRSTA PLIJESNI	SLAVONSKI KULEN		SLAVONSKA KOBASICA	UKUPNO IZOLATA	% IZOLATA	SEKVENCA (Prilog 1)
	3 mjeseca	6 mjeseci	3 mjeseca			
<i>Alternaria alternata</i>	1	-	-	1	0,31	P1 n)
<i>Aspergillus flavus</i>	-	6	6	12	3,73	P1 i)
<i>Aspergillus proliferans</i>	-	-	4	4	1,24	P1 q)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	-	-	1	0,31	P1 p)
<i>Eurotium repens</i>		1	-	1	0,31	P1 o)
<i>Mucor plumbeus</i>	2	6	1	9	2,80	P1 g)
<i>Mucor racemosus</i>	9	2	1	12	3,73	P1 j)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	-	13	-	13	4,04	P1 f)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6	1	-	7	2,17	P1 h)
<i>Penicillium citrinum</i>	1	-	-	1	0,31	P1 l)
<i>Penicillium commune</i>	39	37	18	94	29,19	P1 a)
<i>Penicillium echinulatum</i>	1	22	-	23	7,14	P1 e)
<i>Penicillium nalgiovense</i>	-	1	-	1	0,31	P1 m)
<i>Penicillium polonicum</i>	13	9	24	46	14,29	P1 b)
<i>Penicillium roqueforti</i>	-	2	-	2	0,62	P1 k)
<i>Penicillium rubens</i>	-	-	5	5	1,55	P1 r)
<i>Penicillium solitum</i>	19	26	-	45	13,98	P1 d)
<i>Penicillium verrucosum</i>	14	19	12	45	13,98	P1 c)
<b>UKUPNO IZOLATA</b>	107	144	71	322	100,00	—

Oznake sekvenci: P1 – Prilog 1; a) – r) – oznake vrste plijesni s pripadajućom sekvencom

#### 4.5.3. Tradicionalna metoda identifikacije površinske plijesni

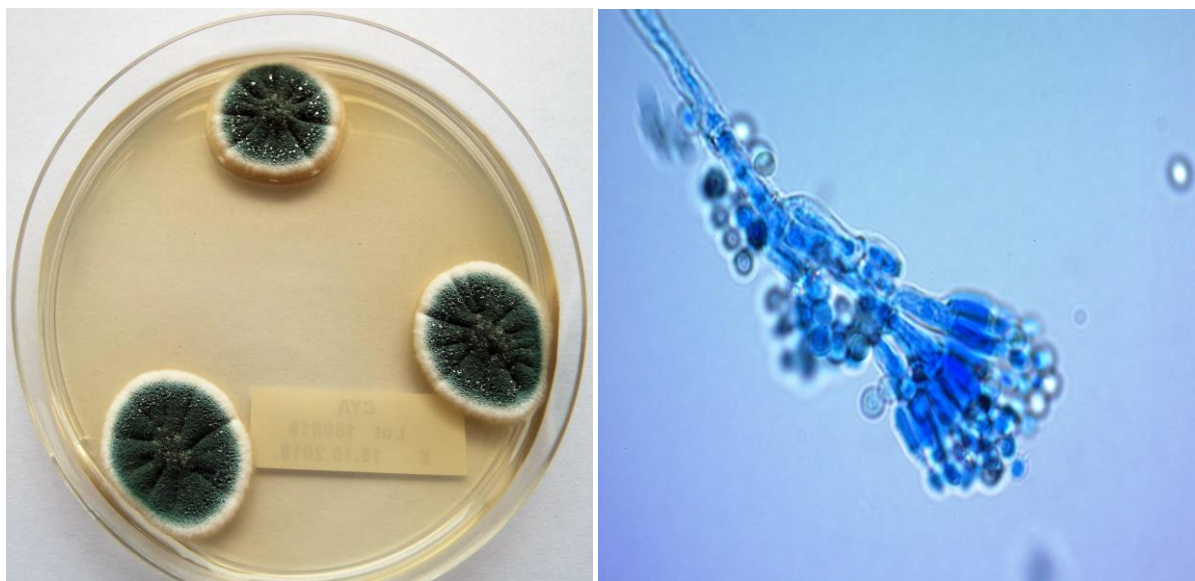
Na **Slikama 39 – 46** su prikazane najzastupljenije vrste plijesni koje su identificirane tradicionalnom metodom na uzorcima Slavanskog kulena i Slavonske kobasice.



(a)

(b)

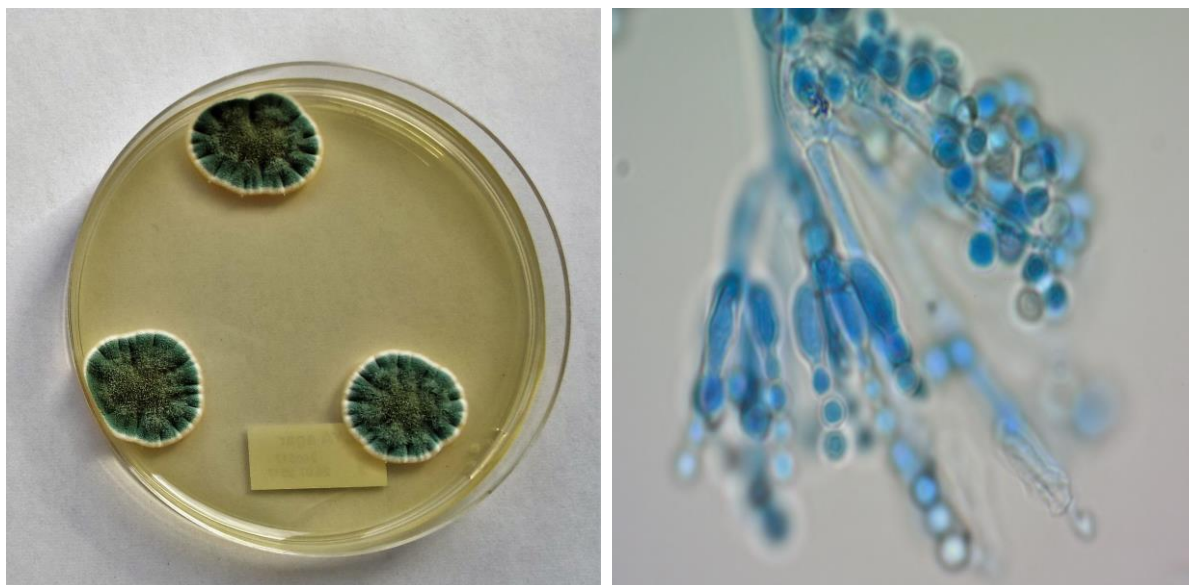
**Slika 39** *Penicillium commune* na (a) CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)



(a)

(b)

**Slika 40** *Penicillium polonicum* (a) na CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)



(a)

(b)

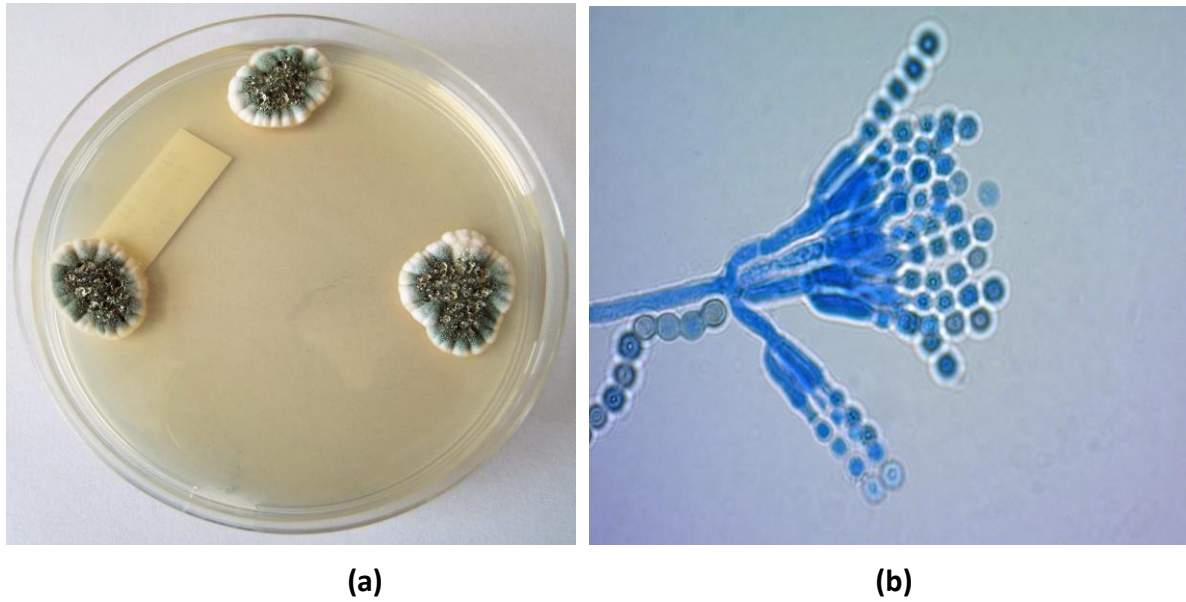
**Slika 41** *Penicillium solitum* (a) na CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)



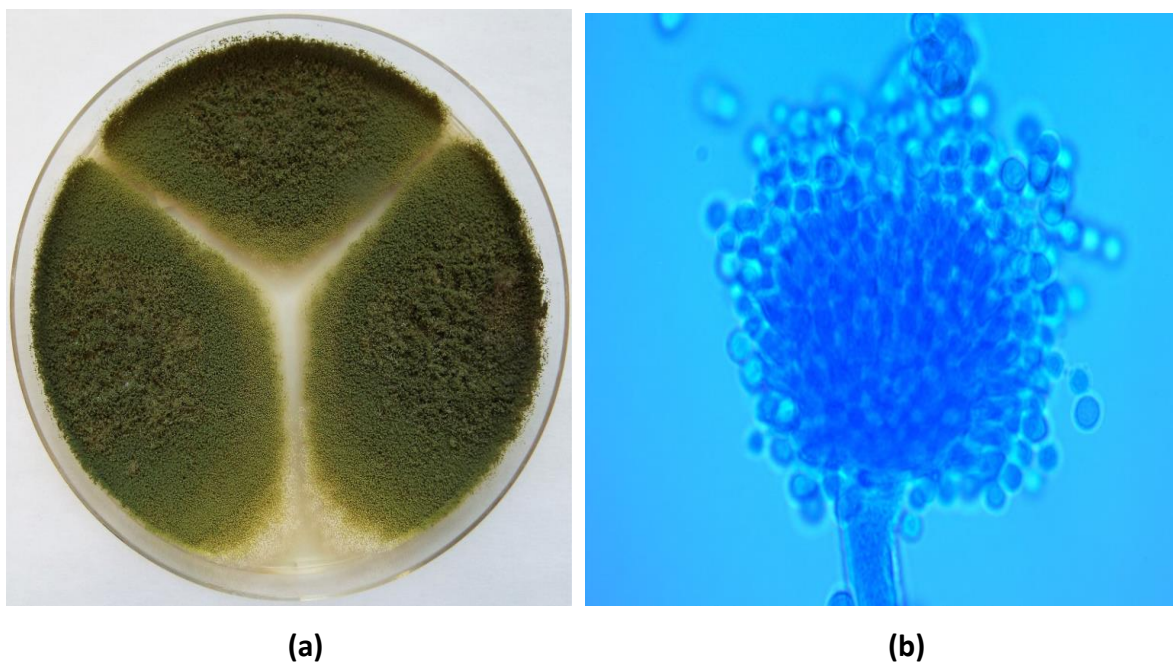
(a)

(b)

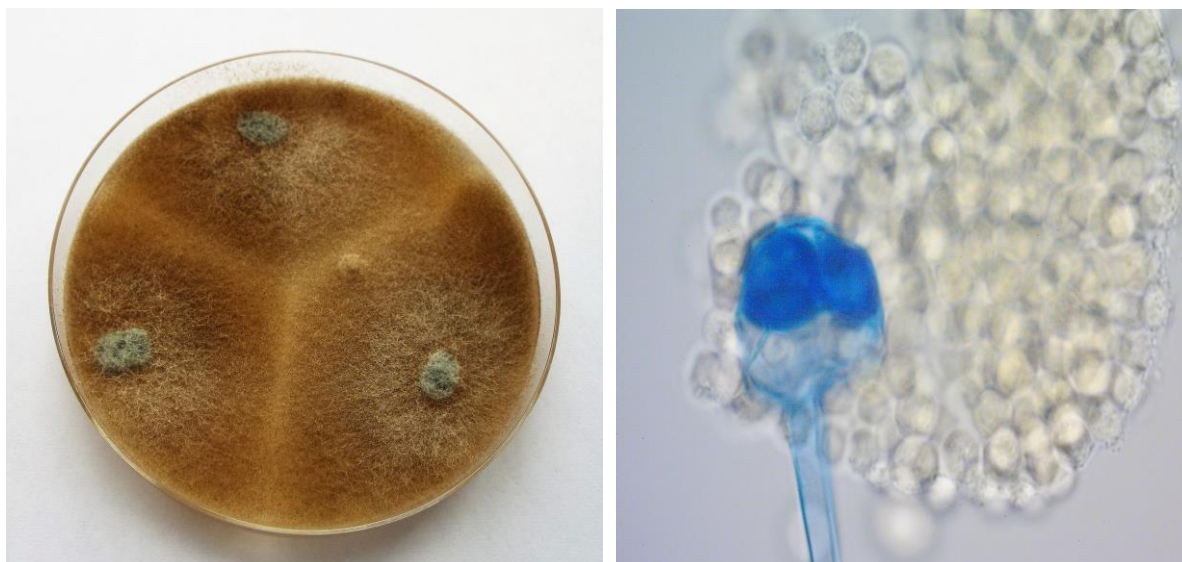
**Slika 42** *Penicillium verrucosum* (a) na CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)



**Slika 43** *Penicillium echinulatum* (a) na CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)



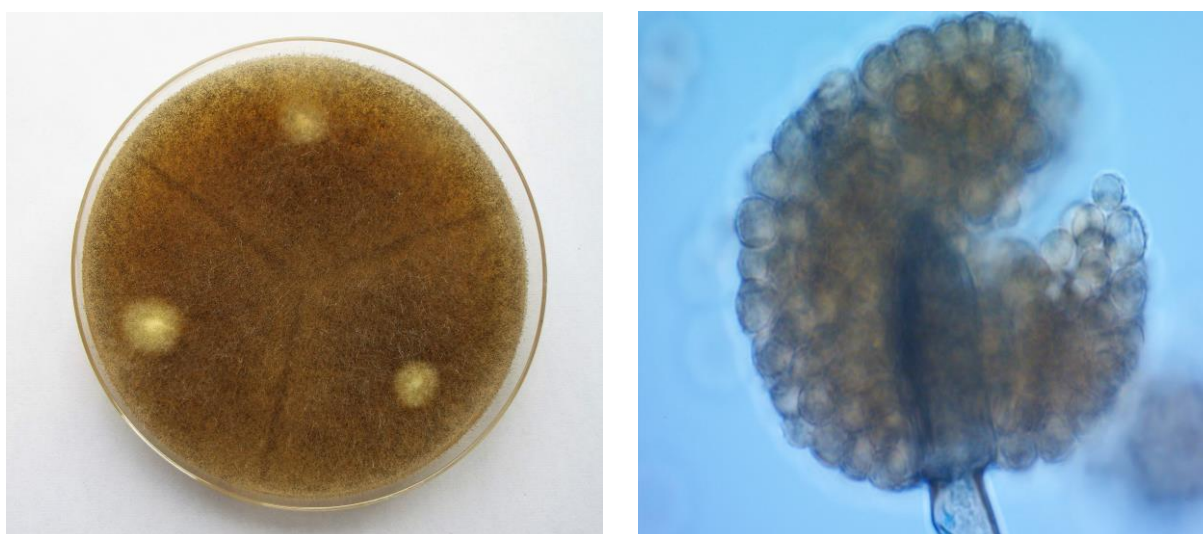
**Slika 44** *Aspergillus flavus* (a) na CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)



(a)

(b)

**Slika 45** *Mucor racemosus* (a) na CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)



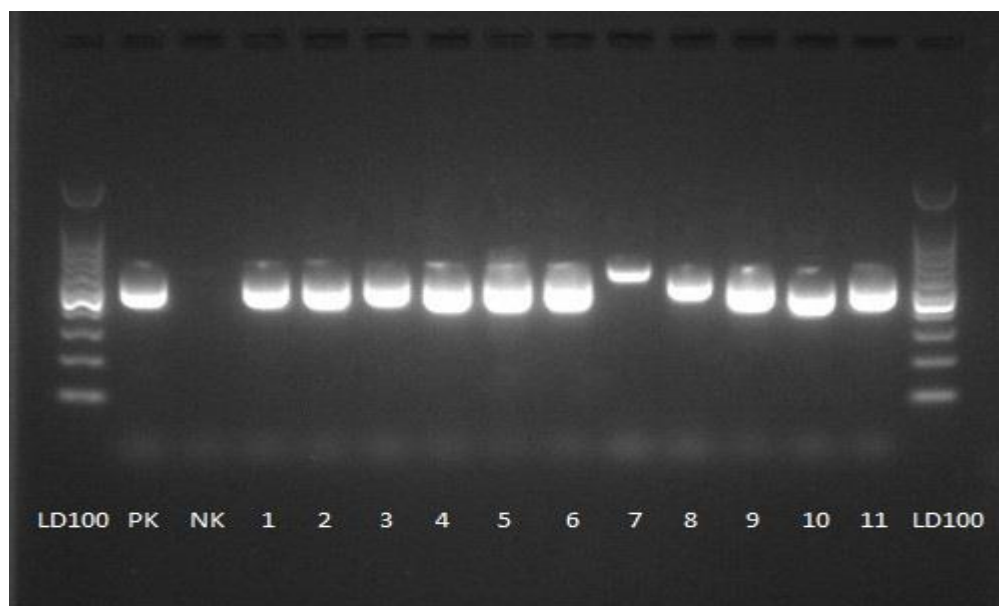
(a)

(b)

**Slika 46** *Mucor plumbeus* (a) na CYA agaru i (b) mikroskopski prikaz uljnom imerzijom (povećanje 100x) (foto.: Perković, I., 2018.)

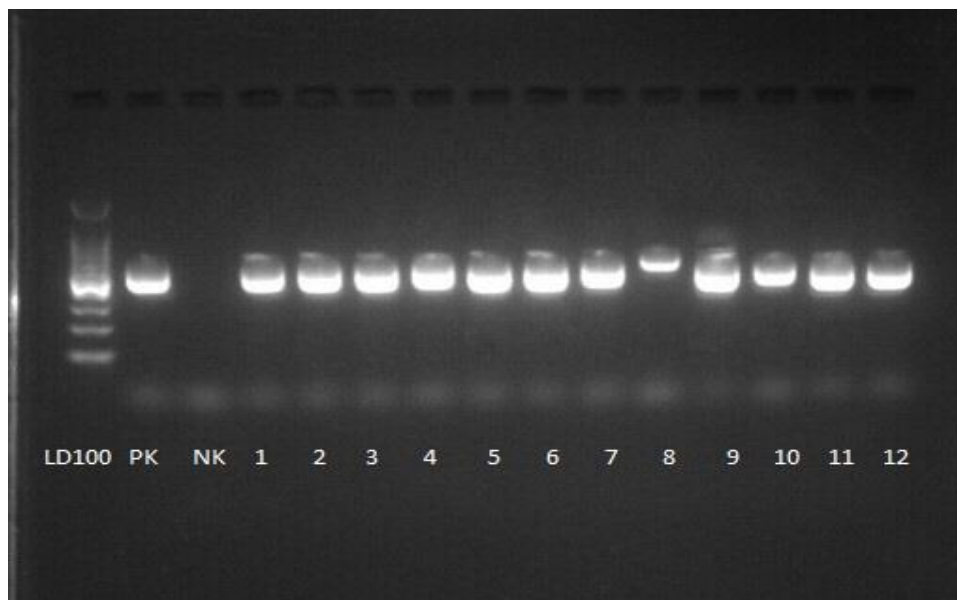
#### 4.5.4. Molekularna metoda identifikacije površinske plijesni

Na **Slici 47** i **Slici 48** prikazana je gel elektroforeza PCR produkata odgovarajuće kvalitete i prinosa iz kojih su naknadno identificirane plijesni koje su izolirane s površine uzoraka Slavanskog kulena i Slavonske kobasice (**Slika 49**).



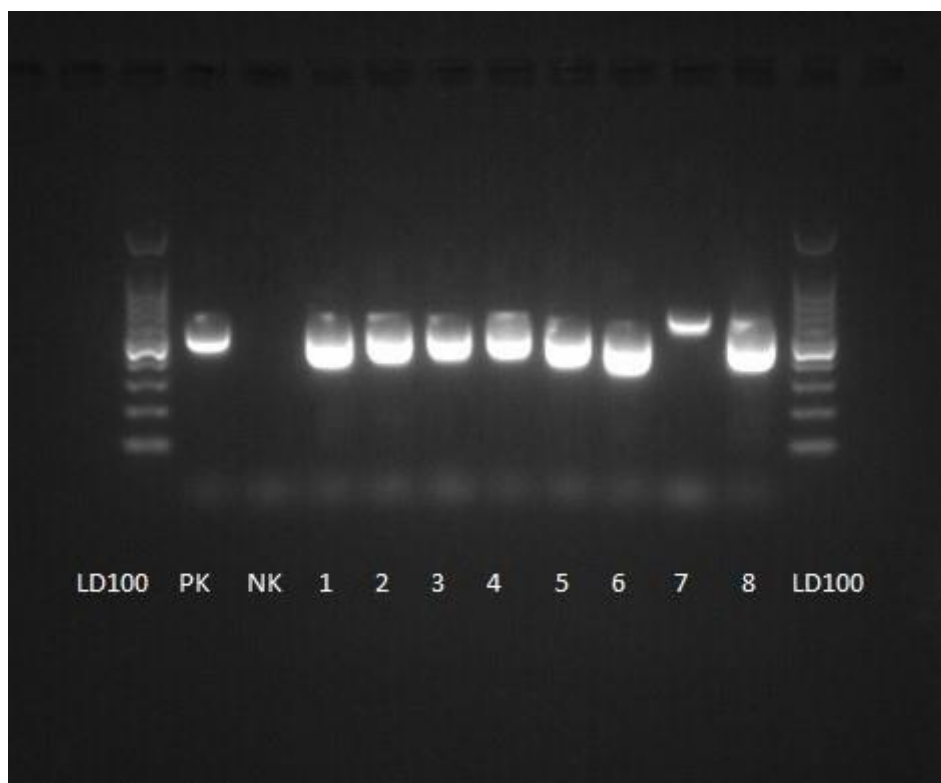
LD100 – standard duljine odsječka DNA (od 100 parova baza); PK – pozitivna kontrola; NK – negativna kontrola; 1 – *P. commune*; 2 – *P. solitum*; 3 – *P. verrucosum*; 4 – *P. polonicum*; 5 – *M. racemosus*; 6 – *P. chrysogenum*; 7 – *M. plumbeus*; 8 – *A. alternata*; 9 – *C. cladosporioides*; 10 – *P. citrinum*; 11 – *P. echinulatum*

**Slika 47** Gel elektroforeza PCR produkata dobivenih umnožavanjem DNA s početnicama ITS1 i ITS4 iz izoliranih plijesni s površine uzoraka Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje (foto.: Perković, I., 2018.)



LD100 - standard duljine odsječka DNA (od 100 parova baza); PK – pozitivna kontrola; NK – negativna kontrola; 1 – *P. commune*; 2 – *P. solitum*; 3 – *P. echinulatum*; 4 – *P. verrucosum*; 5 – *P. brevicompactum*; 6 – *P. polonicum*; 7 – *A. flavus*; 8 – *M. plumbeus*; 9 – *M. racemosus*; 10 – *P. roqueforti*; 11 – *P. chrysogenum*; 12 - *P. nalgiovense*

**Slika 48** Gel elektroforeza PCR produkata dobivenih umnožavanjem DNA s početnicama ITS1 i ITS4 iz izoliranih plijesni s površine uzoraka Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje (foto.: Perković, I., 2018.)



LD100 - standard duljine odsječka DNA (od 100 parova baza); PK – pozitivna kontrola; NK – negativna kontrola; 1 – *P. polonicum*; 2 – *P. commune*; 3 – *P. verrucosum*; 4 – *A. flavus*; 5 – *P. rubens*; 6 – *P. proliferans*; 7 - *M. plumbeus*; 8 – *M. racemosus*

**Slika 49** Gel elektroforeza PCR produkata dobivenih umnožavanjem DNA s početnicama ITS1 i ITS4 iz izoliranih plijesni s površine uzoraka Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje (foto.: Perković, I., 2018.)



## **5. RASPRAVA**

U Europi, pa tako i u Hrvatskoj, trend proizvodnje i konzumacije tradicionalnih mesnih proizvoda je sve više u porastu. Među tradicionalnim mesnim proizvodima u Republici Hrvatskoj, veliki značaj imaju trajne (fermentirane) kobasice, od kojih se Slavonski kulen i Slavonska kobasica najčešće proizvode i konzumiraju. Proizvodnja navedenih proizvoda je vrlo često neujednačena i provodi se u nekontroliranim uvjetima seoskih domaćinstava.

Kako bi se preciznije odredila vrsta površinske plijesni koja raste na trajnim (fermentiranim) kobasicama, u ovom radu je po prvi puta na tradicionalnim hrvatskim mesnim proizvodima, uz tradicionalnu metodu identifikacije, upotrijebljena i molekularna metoda. Nadalje, kako bi se utvrdio utjecaj poraslih vrsta plijesni na sigurnost i kvalitetu navedenih proizvoda, provedene su i mikrobiološke analize sirovina i proizvoda, ispitana fizikalno-kemijska i senzorska svojstva proizvoda po određenim fazama procesa proizvodnje te određene koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u sirovinama i proizvodima, također po određenim fazama procesa proizvodnje. Uzorci Slavanskog kulena i Slavonske kobasice označeni su na pet različitih mikrolokaliteta kako bi se utvrdila pojavnost različitih vrsta plijesni s obzirom na mikrolokalitet.

Tijekom procesa proizvodnje i skladištenja mesnih proizvoda vrlo često može doći do oštećenja površine proizvoda i stvaranja pukotina, najčešće zbog neodgovarajućeg rukovanja tijekom čišćenja ili održavanja. Stoga su u svrhu ispitivanja utjecaja oštećenja površine ovitka proizvoda na kontaminaciju Slavanskog kulena i Slavonske kobasice s OTA i AFB<sub>1</sub>, tijekom procesa proizvodnje, površine uzoraka navedenih proizvoda namjerno oštećene.

## **5.1. MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIROVINA I UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE**

Standardnim mikrobiološkim metodama analizirale su se enterobakterije, sulfitoreducirajuće klostridije, kvasci i plijesni, koagulaza pozitivni stafilocoki, aerobne mezofilne/sporogene bakterije, patogene bakterije *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, u svježem mesu i mljevenoj paprici za proizvodnju Slavanskog kulena i Slavonske kobasice te u uzorcima nakon tri i šest mjeseci proizvodnje za Slavonski kulen i nakon tri mjeseca proizvodnje za slavonsku kobasicu. U niti jednom uzorku svježeg mesa i mljevene paprike nisu izolirane patogene bakterije *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, niti koagulaza pozitivni stafilocoki

(**Tablice 23 i 24**) dok su vrijednosti za enterobakterije, sulfitoreducirajuće klostridije te kvasce i plijesni bile različite. Također, niti u jednom uzorku Slavanskog kulena nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje i Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje nisu izolirane navedene patogene bakterije (**Tablice 25 i 26**), što je u skladu i s drugim istraživanjima koja su provedena na nekim trajnim (fermentiranim) kobasicama (Comi i sur., 2005.; Drosinos i sur., 2005.; Ferreira i sur., 2009.).

Svi analizirani uzorci, kako sirovina tako i gotovih proizvoda, bili su u skladu s preporučenim MDK (maksimalno dopuštena količina) vrijednostima koje su propisane u Vodiču o mikrobiološkim kriterijima za hranu (3. izmijenjeno izdanje, Zagreb, 2011.), što pokazuje da se svi proizvođači kod kojih je istraživanje obavljeno pridržavaju pravila propisanih u HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points – Analiza opasnosti kritičnih kontrolnih točaka) planovima, tj. provode mjere nužne za zdravstvenu ispravnost sirovina i u konačnici gotovih proizvoda.

Osim toga, u proizvodnji trajnih (fermentiranih) kobasica primjenjuje se i tzv. „konzerviranje preprekama“ (miješanje s dodacima, fermentacija, dimljenje, sušenje i zrenje) koje proizvodu osigurava optimalan konzervirajući učinak, a kojim se zaustavlja djelovanje i razmnožavanje mikroorganizama i njihovih metaboličkih produkata, te se na taj način dobiva mikrobiološki stabilan proizvod.

### **5.1.1. Enterobakterije**

U svim uzorcima svježeg mesa koji su se koristili za proizvodnju Slavanskog kulena izolirane su enterobakterije, a njihov broj iznosio je od 1,619 log<sub>10</sub> cfu/g na mikrolokalitetu 5 (5A) do najveće vrijednosti od 2,277 log<sub>10</sub> cfu/g koja je određena na mikrolokalitetu 2 (2A). Enterobakterije u svježem mesu mogu biti prisutne kao posljedica kontaminacije mesa za vrijeme klanja i obrade mesa. Osim navedenog, izvor kontaminacije također mogu biti i oprema, pribor, radne površine i ruke s kojima meso dolazi u kontakt tijekom procesa obrade i prerade (Talon i sur., 2007.).

U uzorcima mljevene paprike koja se koristila za proizvodnju Slavanskog kulena enterobakterije nisu izolirane u uzorcima s mikrolokaliteta 3 (3A), 4 (4A) i 5 (5A), dok je na

mikrolokalitetu 1 (1A) određen najmanji broj enterobakterija od 1,899 log<sub>10</sub> cfu/g, a na mikrolokalitetu 2 (2A) najveći broj od 2,204 log<sub>10</sub> cfu/g (**Tablica 24**).

Niti u jednom uzorku Slavanskog kulena s pet različitih mikrolokaliteta nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje nisu izolirane enterobakterije (**Tablice 25 i 26**), što pokazuje da se njihov broj smanjuje tijekom proizvodnog procesa zbog procesa acidifikacije i sušenja (Lücke, 2000.; Zdolec i sur., 2007.), a to su pokazala i istraživanja provedena na tradicionalnim grčkim kobasicama (Drosinos i sur., 2005.), fermentiranim kobasicama u Španjolskoj (Castãno i sur., 2002.) te Srbiji (Ducic i sur., 2014.).

U oštećenim uzorcima Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje određen je broj enterobakterija od 1,777 log<sub>10</sub> cfu/g (**Tablica 25**), dok nakon šest mjeseci proizvodnje, u oštećenim uzorcima kao i u neoštećenim, također nisu izolirane enterobakterije (**Tablica 26**). Ovi rezultati pokazuju da oštećenje ovitka uzoraka Slavanskog kulena nije utjecalo na povećanje broja enterobakterija tijekom proizvodnog procesa.

Broj enterobakterija kod uzoraka svježeg mesa koji su se koristili za proizvodnju Slavonske kobasice iznosio je od 1,610 log<sub>10</sub> cfu/g na mikrolokalitetu 3 (3C) do najveće vrijednosti od 2,178 log<sub>10</sub> cfu/g koja je određena na mikrolokalitetu 5 (5C) (**Tablica 27**).

Uzorci mljevene paprike 3C i 5C nisu imali enterobakterije, dok je kod ostalih uzoraka njihov broj određen i to u rasponu od 1,705 log<sub>10</sub> cfu/g do 2,255 log<sub>10</sub> cfu/g (**Tablica 28**).

U gotovim uzorcima Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje broj enterobakterija je iznosio od 1,845 log<sub>10</sub> cfu/g do 3,380 log<sub>10</sub> cfu/g. U uzorcima s mikrolokaliteta 3 (3C) nisu određene enterobakterije (**Tablica 29**). Uzorci Slavonske kobasice s mikrolokaliteta 2 (2C) su imali najveći broj enterobakterija, kao i uzorci mljevene paprike koje su se koristile za proizvodnju Slavonske kobasice s tog mikrolokaliteta, što indicira da zdravstvena ispravnost sirovina, osim uvjeta procesa proizvodnje, može također utjecati na zdravstvenu ispravnost gotovog proizvoda.

I oštećeni i neoštećeni uzorci Slavonske kobasice, nakon tri mjeseca proizvodnje, imali su podjednak broj enterobakterija (**Tablica 29**), što pokazuje da oštećenje ovitka proizvoda, kao i u Slavanskom kulenu, nije utjecalo na povećanje broja enterobakterija.

### 5.1.2. Sulfitoreducirajuće klostridije

U niti jednom uzorku svježeg mesa za proizvodnju Slavanskog kulena nisu određene sulfitoreducirajuće klostridije (**Tablica 23**), dok u uzorcima mljevene paprike s mikrolokaliteta 1 (1A), 2 (2A) i 4 (4A) nisu izolirane sulfitoreducirajuće klostridije, a najveći je broj određen u uzorcima s mikrolokaliteta 3 (3A) (**Tablica 24**). Jedino u uzorcima Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 3 (3A) određene su sulfitoreducirajuće klostridije u količini od  $1,398 \log_{10}$  cfu/g (**Tablica 25**), no nakon šest mjeseci proizvodnje, u uzorcima s navedenog mikrolokaliteta, nisu određene sulfitoreducirajuće klostridije. U ostalim uzorcima Slavanskog kulena, nakon šest mjeseci proizvodnje, s drugih mikrolokaliteta, također nisu određene sulfitoreducirajuće klostridije (**Tablica 26**). Broj sulfitoreducirajućih klostridija nije određen ni u oštećenim ni u neoštećenim uzorcima Slavanskog kulena s odabranog mikrolokaliteta (**Tablica 26**).

U uzorcima svježeg mesa za proizvodnju Slavanskog kulena i Slavonske kobasice nisu određene sulfitoreducirajuće klostridije (**Tablica 27**). U uzorcima mljevene paprike korištene u proizvodnji Slavonske kobasice s mikrolokaliteta 1 (1C), 3(3C) i 4 (4C) nisu određene sulfitoreducirajuće klostridije, dok je u uzorcima s ostalih mikrolokaliteta određen broj u rasponu od  $1,525 \log_{10}$  cfu/g do  $1,956 \log_{10}$  cfu/g (**Tablica 28**). Broj sulfitoreducirajućih klostridija nije određen ni u oštećenim, niti u neoštećenim uzorcima Slavonske kobasice, nakon tri mjeseca proizvodnje (**Tablica 29**).

### 5.1.3. Kvasci

U uzorcima svježeg mesa s mikrolokaliteta 4 (4A) kvasci nisu određeni, dok su u uzorcima s ostalih mikrolokaliteta određeni u rasponu od  $1,007 \log_{10}$  cfu/g (mikrolokalitet 5) do  $1,932 \log_{10}$  cfu/g (odabrani mikrolokalitet) (**Tablica 23**), što predstavlja zanemariv broj. Kvasci su ubikvitarni organizmi koji se vrlo lako tijekom klanja životinja i manipulacije trupovima iz okoliša prenose na trup, a u rasječenom svježem mesu populacija kvasaca se kreće od  $10^2$  cfu/g do  $10^3$  cfu/g (Kegalj i sur., 2012.).

U uzorcima mljevene paprike korištene u proizvodnji Slavanskog kulena nije utvrđena prisutnost kvasaca (**Tablica 24**).

Nakon tri mjeseca proizvodnje na dva različita mikrolokaliteta (4 i 5) u uzorcima Slavenskog kulena nije određena prisutnost kvasaca, a u uzorcima s ostalih mikrolokaliteta broj kvasaca je bio u rasponu od 1,602  $\log_{10}$  cfu/g (mikrolokalitet 2) do 2,392  $\log_{10}$  cfu/g (mikrolokalitet 3) (**Tablica 25**). Na kraju proizvodnog procesa u uzorcima Slavenskog kulena s mikrolokaliteta 2 (2B) i 3 (3B) broj kvasaca se neznatno smanjio, a u uzorcima s mikrolokaliteta 1 (1B), 4 (4B) i 5 (5B) taj broj se povećao (**Tablica 26**).

U oštećenim uzorcima Slavenskog kulena na odabranom lokalitetu nakon tri mjeseca proizvodnje broj kvasaca je bio 4,462  $\log_{10}$  cfu/g (**Tablica 25**), a na kraju proizvodnog procesa taj broj se smanjio na 3,361  $\log_{10}$  cfu/g. U neoštećenim uzorcima Slavenskog kulena s odabranog mikrolokaliteta na kraju proizvodnog procesa broj kvasaca je bio jednak kao i kod oštećenih uzoraka (**Tablica 26**).

U uzorcima svježeg mesa za proizvodnju Slavenske kobasice s mikrolokaliteta 1 i 3 nisu određeni kvasci, a u uzorcima s ostalih mikrolokaliteta utvrđena vrijednost je iznosila od 1,849  $\log_{10}$  cfu/g (mikrolokalitet 2) do 2,079  $\log_{10}$  cfu/g (mikrolokalitet 5) (**Tablica 27**).

Broj kvasaca u svim uzorcima mljevene paprike korištene u proizvodnji Slavenske kobasice nije određen na niti jednom mikrolokalitetu (**Tablica 28**).

Nakon tri mjeseca proizvodnje u uzorcima Slavenske kobasice s mikrolokaliteta 1 određen je najmanji broj kvasaca, što se može pripisati i sirovinama od kojih su napravljene kobasice, a koje nisu sadržavale kvasce. U uzorcima s ostalih mikrolokaliteta određen je nešto veći broj kvasaca u rasponu od 4,477  $\log_{10}$  cfu/g do 5,322  $\log_{10}$  cfu/g (**Tablica 29**). Na kraju proizvodnog procesa i neoštećeni i oštećeni uzorci Slavenske kobasice s odabranog mikrolokaliteta imale su jednak broj kvasaca (**Tablica 29**).

U proizvodnji fermentiranih kobasica kvasci pridonose konačnim senzorskim svojstvima proizvoda, budući svojim metabolizmom povećavaju količinu amonijaka, smanjuju količinu mliječne kiseline te utječu na proteolitičke aktivnosti (Toldrá, 2007.).

#### 5.1.4. Plijesni

Niti jedan uzorak svježeg mesa za proizvodnju Slavenskog kulena nije sadržavao plijesni (**Tablica 23**).

Uzorci mljevene paprike za proizvodnju Slavenskog kulena s mikrolokaliteta 1 (1A), 4 (4A) i 5 (5A) nisu sadržavali plijesni (**Tablica 24**). U uzorku mljevene paprike, korištene u proizvodnji ovog proizvoda, izoliran je najveći broj plijesni s vrijednošću od 1,929  $\log_{10}$  cfu/g s mikrolokaliteta 3 (3A).

Uzorci Slavenskog kulena s mikrolokaliteta 1 (1A), 4 (4A) i 5 (5A), nakon tri mjeseca proizvodnje, nisu imali prisutne plijesni (**Tablica 25**). U uzorcima Slavenskog kulena s mikrolokaliteta 2 (2A) određen je najveći broj plijesni od 2,341  $\log_{10}$  cfu/g. Upravo tim uzorcima Slavenskog kulena površina je bila gotovo u cijelosti obrasla plijesnima, a budući da se spore plijesni lako šire moguće je i njihovo prodiranje u unutrašnjost Slavenskog kulena.

Nakon šest mjeseci proizvodnje svi uzorci Slavenskog kulena imali su prisutne plijesni (**Tablica 26**), a uzorak s mikrolokaliteta 1 (1B), koji nakon tri mjeseca proizvodnje nije sadržavao plijesni, nakon šest mjeseci proizvodnje imao je najveći broj plijesni od 3,516  $\log_{10}$  cfu/g. Najmanji broj plijesni određen je u uzorcima s mikrolokaliteta 5 (5B) od 1,301  $\log_{10}$  cfu/g, a s tog mikrolokaliteta i uzorci svježeg mesa, kao i mljevene paprike, nisu imali prisutne plijesni.

Oštećeni uzorci s određenog mikrolokaliteta nakon tri mjeseca proizvodnje imali su broj plijesni od 2,999  $\log_{10}$  cfu/g (**Tablica 25**), a nakon šest mjeseci proizvodnje taj je broj porastao na 6,310  $\log_{10}$  cfu/g (**Tablica 26**), što ukazuje da oštećenje površine ovitka ima za posljedicu povećanje broja plijesni u Slavenskom kulenu. Neoštećeni uzorci Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje nisu sadržavali plijesni (**Tablica 26**).

Plijesni nisu određene u niti jednom uzorku svježeg mesa korištenog u proizvodnji Slavenske kobasice (**Tablica 27**).

U uzorcima mljevene paprike korištene u proizvodnji ovog proizvoda najveći broj plijesni određen je u uzorcima s mikrolokaliteta 1D (2,126  $\log_{10}$  cfu/g), najmanji s mikrolokaliteta 2 (1,159  $\log_{10}$  cfu/g), dok u uzorcima s mikrolokaliteta 3 i 4 plijesni uopće nisu izolirane (**Tablica 28**).

Također, u uzorcima Slavenske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje s mikrolokaliteta 5 (5C) nisu određene plijesni, a u ostalim uzorcima je određen broj u rasponu od 1,000  $\log_{10}$  cfu/g na mikrolokalitetu 1 (1C) do 2,301  $\log_{10}$  cfu/g na mikrolokalitetu 4 (4C). Uzorci svježeg

mesa i mljevene paprike na mikrolokalitetu 4 nisu imali prisutne plijesni, dok je u gotovom uzorku Slavonske kobasice s tog mikrolokaliteta zabilježen najveći broj plijesni (**Tablica 29**).

Oštećeni uzorci Slavonske kobasice s jednog odabranog mikrolokaliteta imali su broj plijesni od  $1,292 \log_{10}$  cfu/g, a u neoštećenim uzorcima s tog istog mikrolokaliteta nisu određene plijesni (**Tablica 29**), te se može zaključiti da oštećenje površine ovitka proizvoda može dovesti do lakšeg prodiranja spora plijesni u njegovu unutrašnjost.

Plijesni su prisutne u sirovom nadjevu fermentiranih kobasica, a potječu od sirovina koje se koriste u njihovoj proizvodnji ili iz proizvodnog okruženja, ali se nakon procesa fermentacije i dugotrajnog zrenja, tj. u finalnom proizvodu uglavnom mogu naći na površini ovitka ili u pukotinama i šupljinama nadjeva (Mižáková i sur., 2002.; Kovačević, 2014.). Spore plijesni su uvijek prisutne u okolišu i gotovo ih je nemoguće ukloniti iz hrane. Općenito, uvjeti tijekom procesa proizvodnje trajnih (fermentiranih) kobasica pogoduju razvoju plijesni (Mižáková i sur., 2002.). U istraživanjima provedenim na nekim fermentiranim kobasicama također je utvrđena prisutnost plijesni u finalnom proizvodu ( $<1,0 - 5,1 \log_{10}$  cfu/g) (Ferreira i sur., 2009.); ( $2,0 - 6,81 \log_{10}$  cfu/g) (Santa i sur., 2012.).

## 5.2. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE

Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka Slavonskog kulena nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje te Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje određen je ispitivanjem udjela vode, pepela, bjelančevina, masti te mjerenjem pH vrijednosti i aktiviteta vode ( $a_w$ ).

### 5.2.1. Udio vode

U uzorcima Slavonskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje udio vode kretao se u rasponu od 37,94% u uzorcima s mikrolokaliteta 5 (5A) do 50,43% s mikrolokaliteta 2 (2A) (**Tablica 30**). Nakon šest mjeseci proizvodnje (**Tablica 31**), uzorci s mikrolokaliteta 5 (5B) također su imali najmanji udio vode (29,42%), dok su uzorci s mikrolokaliteta 3 (3B) imali najveći udio vode (40,90%). Najveći gubitak udjela vode imali su uzorci s mikrolokaliteta 4 (4A i 4B) (49% i 36,38%).



Tijekom dugotrajnog zrenja, odnosno sušenja, mesu se oduzima voda pa se tako udio vode smanjuje. U gotovim uzorcima Slavanskog kulena udio vode se kretao u rasponu od 29,42% do 40,90%. Za proizvode iz skupine trajnih kobasica karakterističan je udio vode < 40% (NN 62/2018) i većina uzoraka Slavanskog kulena iz ovog istraživanja imaju navedenu vrijednost. Također, rezultati ovog istraživanja slični su rezultatima istraživanja udjela vode u Slavanskom kulenu koja su objavili Kovačević i sur., (2010.) (31,03% - 39,17%), Karolyi (2011.) (31,7% - 42,8%) i Pleadin i sur. (2013.b) (25,49 ± 1,17% - 30,78 ± 1,29%). *Botillo* – tradicionalna fermentirana španjolska kobasica (Galicija) koja se kao i Slavanski kulen, puni u svinjsko slijepo crijevo, no kraćeg je perioda zrenja, ima viši udio vode, koji prema istraživanju García Fontán i sur., (2007.) iznosi od 35,07% do 58,68%.

Oštećeni uzorci Slavanskog kulena na jednom odabranom lokalitetu, nakon tri mjeseca proizvodnje, imali su udio vode od 50,21%, koji se nakon šest mjeseci proizvodnje smanjio na vrijednost od 29,53% (**Tablica 30**). Neoštećeni uzorci nakon šest mjeseci proizvodnje imali su udio vode od 31,75% (**Tablica 31**), što predstavlja neznatno veći udio nego kod oštećenih uzoraka nakon šest mjeseci proizvodnje.

Udio vode u uzorcima Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje se kretao od najmanje izmjerene vrijednosti 19,87% (mikrolokalitet 1) do 26,83% (mikrolokalitet 2), koja je i najveća utvrđena vrijednost udjela vode u ovom proizvodu (**Tablica 33**). Uspoređujući dobivene vrijednosti s optimalnim vrijednostima za udio vode u Slavanskoj kobasici koje su u provedenom istraživanju predložili Kovačević i sur. (2009.), a iznosi 21,70% - 40,00%, može se zaključiti da su osim uzoraka s mikrolokaliteta 1, svi ostali rezultati dobiveni ovim istraživanjem u okviru navedenih, predloženih odnosno optimalnih vrijednosti.

Razlika u udjelu vode kod oštećenih i neoštećenih uzoraka Slavanske kobasice je također neznatna, budući kod oštećenih uzoraka iznosi 23,38%, a kod neoštećenih 21,45% (**Tablica 33**).

### 5.2.2. Udio pepela

Udio pepela u uzorcima Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje kretao se u rasponu od 4,04% do 5,35% (**Tablica 30**). Nakon šest mjeseci proizvodnje u uzorcima Slavanskog kulena sa svih mikrolokaliteta, udio pepela je porastao i kretao se u rasponu od

4,18% do 6,31% (**Tablica 31**). Pleadin i sur. (2013.b) su u uzorcima domaćeg kulena dobili vrijednosti udjela pepela od 5,34% - 5,36%, Pleadin i sur. (2015.d) vrijednost od 5,65%, a te vrijednosti su podjednake gore navedenim vrijednostima utvrđenim u ovom radu.

U oštećenim uzorcima Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje određen je udio pepela od 4,04% (**Tablica 30**), dok je nakon šest mjeseci proizvodnje iznosio 4,18%. U neoštećenim uzorcima Slavenskog kulena s odabranog mikrolokality određen je udio pepela od 4,41% (**Tablica 30**).

U uzorcima Slavenske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje udio pepela je iznosio od 3,52% - 5,52% (**Tablica 33**), a sličan raspon za udio pepela u Slavenskoj kobasici od  $3,84 \pm 0,50$  do  $4,93 \pm 0,67\%$  te domaćoj salami od  $3,56 \pm 0,66$  do  $4,08 \pm 0,83\%$ , dobili su Pleadin i sur. (2013.b).

Oštećeni i neoštećeni uzorci Slavenske kobasice na odabranom mikrolokality imali su podjednak udio pepela (**Tablica 33**).

### 5.2.3. Udio bjelančevina

Sušenjem Slavenskog kulena udio vode se smanjuje, a posljedično raste udio bjelančevina i ostalih sastojaka, pa je tako nakon šest mjeseci proizvodnje Slavenskog kulena udio bjelančevina iznosio od 28,27% (mikrolokality 2) do 38,16% (mikrolokality 5). Najveći udio bjelančevina određen je u uzorcima s mikrolokality 5, koji imaju i najveći udio masti, a najmanji udio vode. Kovačević i sur. (2010.) (26,21% – 53,03%) Pleadin i sur. (2013.b) (47,17% – 47,90%) i Pleadin i sur. (2014.c) (40,99%) u svojim istraživanjima dobili su znatno veće vrijednosti udjela bjelančevina u Slavenskom kulenu, dok su rezultati Karolyi (2011.) (30,3% - 39,6%) slični rezultatima iz ovog istraživanja.

Nakon tri mjeseca proizvodnje oštećeni uzorci Slavenskog kulena imali su udio bjelančevina od 28,94% (**Tablica 30**), a na kraju proizvodnog procesa, u trajanju od šest mjeseci, udio je iznosio 35,96%. Neoštećeni uzorci s odabranog lokality imali su udio bjelančevina od 35,17%, što je podjednako udjelima određenim u oštećenim uzorcima. Na kraju proizvodnog procesa utvrđen je visoki udio bjelančevina (30,45%), što ukazuje na visoku hranjivu vrijednost Slavenskog kulena, što je istaknuto i u brojnim ranijim istraživanjima (Kovačević i sur., 2010.; Karolyi, 2011.; Pleadin i sur., 2013.b).

Najveći udio bjelančevina određen je u uzorcima s mikrolokaliteta 1 (32,82%), koji ujedno imaju najmanji udio vode. Najmanji udio bjelančevina određen je u uzorcima s mikrolokaliteta 5 (24,94%) (**Tablica 33**). Sličan raspon udjela bjelančevina (od  $28,37 \pm 3,47$  do  $36,29 \pm 1,43\%$ ) u Slavonskoj kobasici utvrdili su Pleadin i sur. (2013.b).

Uspoređujući s optimalnim vrijednostima za udio bjelančevina u Slavonskoj kobasici, koje predlažu Kovačević i sur. (2009.), a iznose 22,00% – 35,00%, dobiveni rezultati iz ovog istraživanja se nalaze unutar predloženih optimalnih vrijednosti.

Kod oštećenih i neoštećenih uzoraka Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta dobivene su nešto veće razlike u udjelu bjelančevina (oštećeni uzorak 30,85%; neoštećeni uzorak 25,91%) (**Tablica 33**).

#### 5.2.4. Udio masti

Udio masti u uzorcima Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje iznosio je od 17,50% do 30,50% (**Tablica 30**). Smanjenjem udjela vode tijekom proizvodnog procesa, povećavao se i udio masti u uzorcima Slavanskog kulena. U gotovim uzorcima Slavanskog kulena, nakon šest mjeseci proizvodnje, udio masti kretao se između 20,65% - 27,05% (**Tablica 31**), što je unutar raspona koji su za udio masti u Slavanskom kulenu objavili Kovačević i sur. (2010.) (14,05% - 28,84%), Karolyi (2011.) (16,4% - 31,0%), Pleadin i sur. (2013.b) (12,89% - 24,88%). U odnosu na neke druge trajne (fermentirane) kobasice, Slavanski kulen sadrži manji udio masti (Lorenzo i sur. 2000.; Ambrosiadis i sur. 2004.; Comi i sur. 2005.). Oštećeni uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje na odabranom mikrolokalitetu imali su udio masti 16,78% (**Tablica 30**), a nakon šest mjeseci proizvodnje udio masti je porastao na 30,15%. U neoštećenim uzorcima s odabranog mikrolokaliteta, nakon šest mjeseci proizvodnje, udio masti iznosio je 28,45% (**Tablica 31**).

Mast kao sastavni dio fermentiranih (trajnih) kobasica služi kao značajni izvor energije, esencijalnih masnih kiselina i vitamina topljivih u mastima. Osim toga, pridonosi punoći okusa, teksturi i mekoći, što je vrlo važno za kvalitetu i prihvatljivost finalnog mesnog proizvoda (Olivares i sur., 2010.).

U uzorcima Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje udio masti je iznosio od 38,85% do 49,44% (**Tablica 33**). Uspoređujući ove vrijednosti s optimalnim vrijednostima za

udio masti u Slavonskoj kobasici, koje su objavili Kovačević i sur. (2009.), a koje iznose 24,00% - 45,00%, vidljivo je da su gornje vrijednosti rezultata dobivene u ovom istraživanju nešto veće.

Oštećeni uzorci s odabranog mikrolokality imali su udio masti od 30,15%, a neoštećeni uzorci 28,45% (**Tablica 33**).

Veće vrijednosti udjela masti u uzorcima Slavanskog kulena i Slavanske kobasice mogu se pripisati razlici u recepturi među proizvođačima koji koriste različite omjere mesa i masnog tkiva (Karolyi, 2011.).

### 5.2.5. pH vrijednost

Nakon tri mjeseca proizvodnje u uzorcima Slavanskog kulena izmjerena je pH vrijednost koja je iznosila od 4,92 – 5,50. Na kraju proizvodnog procesa, nakon šest mjeseci proizvodnje, pH vrijednost u svim uzorcima Slavanskog kulena s pet različitih mikrolokality je porasla i bila je u rasponu od 5,16 – 5,78 (**Tablica 31**). Dobiveni rezultati se nalaze u okviru pH vrijednosti koje su dobili i Kovačević i sur. (2010.) (5,06 – 5,58) i Karolyi (2011.) (5,07 – 5,75) za Slavanski kulen. Podjednake pH vrijednosti izmjerene su i u *Sobrasadi* s Majorke (Rosello i sur., 1995.) te u *Botillo* - španjolskoj, fermentiranoj kobasici (García Fontán i sur., 2007.). Slavanski kulen ima veću pH vrijednost od *Chorizo* salame (Gimeno i sur., 2000.) i *Salchion* salame (Rubio i sur., 2007.), što se može pripisati dužem periodu zrenja Slavanskog kulena.

Oštećeni uzorci Slavanskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje s odabranog mikrolokality imali su pH vrijednost 5,60 (**Tablica 30**), nešto veću nego kod neoštećenih uzoraka s pet različitih mikrolokality. Nakon šest mjeseci proizvodnje i kod oštećenih uzoraka Slavanskog kulena pH vrijednost je porasla. Kod neoštećenih uzoraka Slavanskog kulena s odabranog mikrolokality nakon šest mjeseci pH vrijednost je iznosila 5,85 (**Tablica 31**).

pH vrijednost predstavlja indikator fermentacije i zrenja mesnog proizvoda (Salgado i sur., 2005.; Revilla i Quintana, 2005.; Pleadin i sur., 2013.b). Tijekom fermentacije pH vrijednost najjeva pada zbog glikolizne aktivnosti BMK i KNS te nastanka mliječne kiseline. Snižavanje pH vrijednosti na početku procesa fermentacije je neophodno za inhibiciju nepoželjnih patogenih mikroorganizama te za snižavanje sposobnosti vezanja vode što osigurava

uspješan proces sušenja (Varnam i Sutherland, 1995.). Nakon fermentacije, zbog proteolize i razvoja kvasaca koji za rast troše mliječnu kiselinu, pH vrijednost sirove kobasice kontinuirano raste (Revilla i Quintana, 2005; Kovačević, 2014.).

Europske fermentirane kobasice se općenito mogu podijeliti na mediteranske ili južnoeuropske koje karakterizira dugotrajno zrenje i spori pad pH vrijednosti, koji na kraju proizvodnog procesa ima vrijednost veću od 5, te na sjevernoeuropske koje karakterizira brza acidifikacija, kratak period zrenja te konačni pH manji od 5 (Zanardi i sur., 2004.). S obzirom na navedeno, sagledavajući dobivene rezultate, može se zaključiti da Slavonski kulen pripada skupini mediteranskih fermentiranih kobasica.

U uzorcima Slavonske kobasice na kraju proizvodnog procesa, tj. nakon tri mjeseca proizvodnje izmjerena je pH vrijednost između 5,26 – 5,81 (**Tablica 33**), što je u skladu s predloženim optimalnim vrijednostima za pH Slavonske kobasice (5,0 – 5,8) koje su objavili Kovačević i sur. (2009.). Slavonska kobasica, isto kao i Slavonski kulen, pripada skupini mediteranskih fermentiranih kobasica.

U oštećenim i neoštećenim uzorcima Slavonske kobasice na odabranom mikrolokalitetu, nakon tri mjeseca proizvodnje, izmjerene su približno podjednake pH vrijednosti (**Tablica 33**), koje su također bile u rasponu predloženih optimalnih vrijednosti (5,0 – 5,8) (Kovačević i sur. 2009.).

Plijesni mogu rasti u vrlo širokom rasponu pH vrijednosti i to od 1,7 do 10 (Asefa i sur. 2011.; Kovačević, 2014.), a u tom rasponu se nalazi i pH vrijednost koja je karakteristična za trajne (fermentirane) kobasice. Tijekom procesa zrenja pH vrijednost uzoraka Slavenskog kulena i Slavonske kobasice bila je u rasponu od 4,92 do 6,72. Dobivene pH vrijednosti u ovom istraživanju su u rasponu pH u kojem može doći do rasta različitih vrsta plijesni koje mogu utjecati na kvalitetu i zdravstvenu ispravnost finalnog proizvoda.

#### 5.2.6. Aktivitet vode ( $a_w$ )

Nakon tri mjeseca proizvodnje na pet različitih mikrolokaliteta izmjereni  $a_w$  uzoraka Slavenskog kulena bio je u rasponu od 0,95 do 0,99. Tijekom proizvodnog procesa, zbog sušenja i smanjenja udjela vode, došlo je i do smanjenja  $a_w$  u svim uzorcima Slavenskog kulena te je nakon šest mjeseci proizvodnje  $a_w$  bio u rasponu od 0,82 – 0,92 (**Tablica 31**).

Najveće vrijednosti  $a_w$  imali su uzorci s mikrolokaliteta 2 i 3, koji su također imali i najveći udio vode, dok je u uzorcima s mikrolokaliteta 5 izmjeren najmanji  $a_w$  (0,82) u kojima je i udio vode također bio najmanji. Vrijednosti dobivene u ovom istraživanju su nešto veće od vrijednosti koje su dobili Kovačević i sur. (2010.) (0,82 – 0,89) i Karolyi (2011.) (0,79 – 0,85) za Slavonski kulen. U oštećenim uzorcima nakon tri mjeseca proizvodnje na odabranom mikrolokalitetu  $a_w$  je iznosio 0,96, a nakon šest mjeseci proizvodnje 0,86. Kod neoštećenih uzoraka na odabranom mikrolokalitetu nakon šest mjeseci proizvodnje,  $a_w$  je iznosio 0,89 (**Tablica 31**).

Aktivitet vode u uzorcima Slavonske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje bio je u rasponu od 0,71 – 0,82 (**Tablica 33**). Kovačević i sur. (2009.) su predložili vrijednost koja je manja od 0,9 kao optimalnu vrijednost  $a_w$  u Slavonskoj kobasici, a i svi uzorci u ovom istraživanju bili su u skladu s predloženim optimalnim vrijednostima, dakle manji od 0,9.

I oštećeni i neoštećeni uzorci Slavonske kobasice s odabranog mikrolokaliteta nakon tri mjeseca proizvodnje imaju gotovo jednake  $a_w$  (**Tablica 33**).

Aktivitet vode u mesu predstavlja dio vode koji je dostupan za biokemijske reakcije i rast mikroorganizama. Uz temperaturu i pH, predstavlja ključni čimbenik održivosti mesa i mesnih proizvoda. Različite skupine mikroorganizama imaju različite vrijednosti  $a_w$  za svoj rast, a smatra se da su plijesni općenito najtolerantnije prema niskim  $a_w$  razinama (Karolyi, 2004.). Aktivitet vode koji je potreban za rast većine plijesni kreće se u rasponu od 0,80 do 0,95, no postoje i određene vrste, tzv. kserofili, koji mogu rasti i pri znatno nižim vrijednostima  $a_w$ .

Vrijednosti  $a_w$  dobivene u ovom istraživanju za uzorke Slavonskog kulena su vrijednosti pri kojima može doći do rasta različitih vrsta plijesni.

### **5.3. SENZORSKA ANALIZA UZORKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE**

Rezultati testa bodovanja za Slavonski kulen prikazani su u **Tablici 35**. Ukupna ocjena senzorske kvalitete dobivena je zbrajanjem bodova za svako pojedino svojstvo, a iznosi maksimalno 100 bodova. Uzorak je ocjenjivalo pet djelatnika Veterinarskog zavoda Vinkovci i

bodovi su se kretali od 77 (ocjenjivač 1) do 85 (ocjenjivač 4). Četiri od pet ocjenjivača je uzorku Slavanskog kulena dalo maksimalan broj bodova za teksturu (max. 10), a samo je jedan ocijenio s 9 bodova, pa je tako tekstura senzorsko svojstvo koje je najbolje ocijenjeno za uzorke Slavanskog kulena. Okus je svojstvo kojeg su ocjenjivači ocijenili s najmanjim brojem bodova. Maksimalan broj bodova za okus, koji uzorak može dobiti je 25, a uzorak Slavanskog kulena je ovim ocjenjivanjem dobio bodove za okus u rasponu od 7 – 16.

Za uzorak Slavonske kobasice, rezultati testa bodovanja prikazani su u **Tablici 36**. Kod ocjenjivanja uzorka Slavonske kobasice, u odnosu na Slavonski kulen, uočena su veća odstupanja pri ocjenjivanju među ocjenjivačima. S najmanjim brojem bodova ocijenjen je izgled presjeka, dok je tekstura, kao i za uzorke Slavanskog kulena, ocijenjena s najvećim brojem bodova i najmanjim odstupanjima pri bodovanju. Vanjska površina, okus i miris su senzorska svojstva koja su imala najveću razliku pri ocjenjivanju, točnije, jedan ocjenjivač je u odnosu na ostale imao veliku razliku prilikom bodovanja. Maksimalan broj bodova za Slavonsku kobasicu je iznosio 100, a ocjenjivači su uzorku dali bodove koji su bili u rasponu od 75 do 85, gotovo jednako kao i za Slavonski kulen.

Prekomjerno obrastanje trajnih (fermentiranih) kobasica površinskim plijesnima negativno utječe na izgled proizvoda te uzrokuje neugodan okus i miris po plijesni, posebice neposredno ispod ovitka (Kovačević, 2014.). Za uklanjanje plijesni, ukoliko su već kontaminirale površinu trajnih (fermentiranih) kobasica, potrebno je plijesni ukloniti četkanjem ili brisanjem suhom krpom (Kovačević i sur., 2014.a).

Kod neoštećenog uzorka Slavanskog kulena, nakon šest mjeseci proizvodnje, površinske plijesni porasle su samo u naborima proizvoda, a njihov porast nije negativno utjecao na senzorsku ocjenu ovog uzorka (**Tablica 35**). Kod oštećenog uzorka Slavanskog kulena, nakon šest mjeseci proizvodnje, plijesni su s površine proizvoda (**Slika 35**) difundirale i u unutrašnjost uzorka (**Slika 36**) te takav proizvod nije bio pogodan za senzorsku analizu, što ukazuje na to da oštećenje površine ovitka pogoduje difuziji plijesni s površine u unutrašnjost proizvoda i posljedično tome negativno utječe na senzorska svojstva proizvoda.

Kod oštećenog uzorka Slavonske kobasice, nakon tri mjeseca proizvodnje, površina proizvoda je bila mjestimično obrasla plijesnima (**Slika 37**), no za razliku od uzorka Slavanskog kulena, plijesni nisu difundirale u unutrašnjost Slavonske kobasice (**Slika 38**), vjerojatno zbog njezinog značajno kraćeg perioda zrenja (3 mjeseca).

## 5.4. MIKOTOKSINI U SIROVINAMA I UZORCIMA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE

Budući da AFB<sub>1</sub> predstavlja najpotentniji karcinogen jetre u sisavaca, te je klasificiran od strane Međunarodne organizacije za istraživanje raka u grupu 1, dokazanih ljudskih karcinogena (IARC, 2002.), a OTA je svrstan u grupu 2B, mogućih ljudskih karcinogena (IARC, 1993.) te oba predstavljaju česte kontaminante mesnih proizvoda (Iacumin i sur., 2009.; Frece i sur., 2010.; Rodríguez i sur., 2012.; Markov i sur., 2013.; Pleadin i sur., 2015.c.; Pleadin i sur., 2017.) u ovom radu analizirani su spomenuti mikotoksini kao potencijalni produkti plijesni prisutni na trajnim (fermentiranim) kobasicama.

U određivanju koncentracije mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub> u sirovom mesu i mljevenoj paprici te uzorcima Slavenskog kulena i Slavonske kobasice korištene su validirane imunoenzimske ELISA metode.

U niti jednom uzorku sirovog mesa i mljevene paprike koji su korišteni u proizvodnji Slavenskog kulena i Slavonske kobasice nisu određene koncentracije niti OTA, a niti AFB<sub>1</sub> veće od limita detekcije (LOD) primijenjenih analitičkih metoda (**Tablice 37, 38, 41 i 42**). Rezultati potvrđuju da proizvođači odabrani za ovo istraživanje svoju proizvodnju temelje na načelima HACCP sustava i vode brigu o zdravstvenoj ispravnosti sirovina i u konačnici samih proizvoda.

### 5.4.1. Aflatoksin B<sub>1</sub>

U uzorcima Slavenskog kulena s pet različitih mikrolokaliteta nakon šest mjeseci proizvodnje nije određena koncentracija AFB<sub>1</sub>, što je sukladno rezultatima Pleadin i sur. (2016.) za Slavonski kulen u istom periodu proizvodnje. Frece i sur. (2010.) su u Slavenskom kulenu dokazali prisutnost AFB<sub>1</sub> u koncentraciji od 0,1 – 0,5 µg/kg, što predstavlja vrijednosti LOD primijenjene analitičke metode. U oštećenom uzorku Slavenskog kulena, nakon šest mjeseci proizvodnje određena je koncentracija AFB<sub>1</sub> u vrijednosti od 2,36 µg/kg. Do kontaminacije ovim mikotoksinom došlo je vjerojatno uslijed oštećenja površine proizvoda.

Prisutnost AFB<sub>1</sub> nije određena niti u oštećenim niti u neoštećenim uzorcima Slavonske kobasice (**Tablica 43**). Markov i sur. (2013.) su utvrdili i prisutnost AFB<sub>1</sub> u Slavenskoj kobasici



u koncentraciji < 1 – 1,2 µg/kg, manjom u odnosu na OTA, a i u ovom istraživanju su vrijednosti bile uglavnom niže ili podjednake LOD primjenjene analitičke metode.

AFB<sub>1</sub> nije detektiran u niti jednom neoštećenom uzorku Slavanskog kulena i Slavanske kobasice, što ukazuje na zanemarivu kontaminaciju analiziranih trajnih (fermentiranih) kobasica ovim mikotoksinom.

Kod koncentracije mikotoksina AFB<sub>1</sub> i u uzorcima Slavanskog kulena i u uzorcima Slavanske kobasice nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) u odnosu na promatrane mikrolokalitete (**Tablica 44**).

#### 5.4.2. Okratoksin A

Nakon tri mjeseca proizvodnje u niti jednom uzorku Slavanskog kulena s pet različitih mikrolokaliteta nisu određene koncentracije OTA. U oštećenim uzorcima Slavanskog kulena s odabranog mikrolokaliteta nakon tri mjeseca proizvodnje određena je koncentracija OTA od 6,35 µg/kg (**Tablica 39**).

Koncentracija OTA je određena u uzorcima Slavanskog kulena s mikrolokaliteta 1 (2,20 µg/kg), 2 (2,59 µg/kg) i 3 (3,55 µg/kg), dok u uzorcima s mikrolokaliteta 4 i 5 nije utvrđena prisutnost OTA ni nakon šest mjeseci proizvodnje (**Tablica 40**).

Pleadin i sur. (2016.) su u uzorcima Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje odredili koncentraciju OTA od 1,91 do 2,43 µg/kg, dok su Vulić i sur. (2014.) odredili nešto veću koncentraciju OTA u Slavanskom kulenu od 5,17 µg/kg.

Nakon šest mjeseci proizvodnje u oštećenim uzorcima Slavanskog kulena s odabranog mikrolokaliteta dokazana je prisutnost OTA u koncentraciji 8,07 µg/kg (**Tablica 40**), što je sukladno rezultatima Pleadin i sur. (2015.) prema kojima oštećenje površine ovitka tijekom dužeg perioda zrenja proizvoda može uzrokovati njegovu kontaminaciju. U neoštećenim uzorcima Slavanskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje s odabranog mikrolokaliteta nije određena prisutnost OTA.

U uzorcima Slavanske kobasice na pet različitih mikrolokaliteta nakon tri mjeseca proizvodnje nije utvrđena prisutnost OTA (**Tablica 43**).

Na odabranom mikrolokalitetu nakon tri mjeseca proizvodnje u oštećenim i neoštećenim uzorcima Slavonske kobasice određena je koncentracija OTA i to kod oštećenih uzoraka 4,09  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a kod neoštećenih 5,10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Primjenom ANOVA testa utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji mikotoksina OTA i u uzorcima Slavanskog kulena i u uzorcima Slavonske kobasice u odnosu na promatrane mikrolokalitete ( $p < 0,05$ ) (**Tablica 44**).

Ranijim istraživanjima koja su provedena na Slavonskoj kobasici određene su koncentracije OTA i to u rasponu od 2,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 6,68  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Markov i sur., 2013.; Vulić i sur., 2014.).

U istraživanju koje su proveli Iacumin i sur. (2009.) u oko 45% analiziranih talijanskih trajnih kobasica određena je prisutnost OTA. Najmanja koncentracija OTA na površini proizvoda iznosila je 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a najveća 18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dok su Dall'Asta i sur. (2010.), u fermentiranim kobasicama (Felino-vrsta) odredili koncentraciju OTA od 0,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 3,32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem isključuju mogućnost kontaminacije proizvoda indirektnim putem (*carry over* efekt), te putem sirovina korištenih u proizvodnji, budući da su sirovine prethodno ispitane na prisutnost OTA i AFB<sub>1</sub>. Ovim istraživanjem je utvrđena direktna kontaminacija proizvoda plijesnima koje su u periodu procesa zrenja porasle na površini proizvoda te u određenim uvjetima producirale mikotoksine. Literaturni podaci pokazuju da su aktivitet vode ( $a_w$  min 0,8 – 0,85), temperatura u komorama za vrijeme proizvodnog procesa ( $T_{\text{optimum}} < 20$  °C), te pH vrijednost (pH<sub>optimum</sub> 5 – 7) ključni čimbenici koji utječu na produkciju mikotoksina, a navedene vrijednosti parametara su tipične za komore i tradicionalne uvjete višemjesečnog zrenja te fizikalna svojstva trajnih (fermentiranih) kobasica ( $a_w < 0,9$ ; pH < 6) (Asefa i sur., 2011.; Kovačević, 2014.; Pleadin i sur., 2015.a). U finalnim uzorcima Slavanskog kulena u kojima je određena koncentracija OTA (1B, 2B, 3B) izmjerene su vrijednosti  $a_w$  i pH koje pogoduju produkciji ovog mikotoksina.

Uz navedeno, oštećenje površine ovitka proizvoda tijekom duljeg perioda procesa zrenja također može uzrokovati kontaminaciju trajnih (fermentiranih) kobasica putem difuzije mikotoksina s površine proizvoda u njegovu unutrašnjost (Pleadin i sur., 2015.a). Ranije utvrđeno je potvrđeno i u ovom radu, budući su u svim oštećenim uzorcima Slavanskog kulena i Slavonske kobasice određene koncentracije analiziranih mikotoksina. Razina kontaminacije finalnog proizvoda ovisi i o higijeni komore za zrenje, o stupnju kontaminacije

sirovog mesa i začina koje se koriste u proizvodnji te neodgovarajućem procesu proizvodnje (Mižáková i sur., 2002.; Battilani i sur., 2007.; Dall'Asta i sur., 2010.).

## 5.5. PLIJESNI NA POVRŠINI UZORAKA SLAVONSKOG KULENA I SLAVONSKE KOBASICE

Tijekom procesa zrenja, površinu trajnih (fermentiranih) kobasica često obrastaju plijesni koje uglavnom pripadaju rodovima *Penicillium* i *Aspergillus* (Comi i sur., 2004.; Tabuc i sur., 2004.; Sørensen i sur., 2008.; Iacumin i sur., 2009.; Asefa i sur., 2010.; Rodríguez i sur., 2012.). Neke vrste navedenih rodova, u određenim uvjetima, mogu producirati mikotoksine. Kako bi se identificirale plijesni koje obrastaju površinu Slavenskog kulena i Slavonske kobasice i koje bi mogle biti odgovorne za produkciju OTA i AFB<sub>1</sub> kao mikotoksina od najvećeg javnozdravstvenog značaja, koji su stoga i analizirani u ovom radu, identifikacija plijesni provedena je tradicionalnom i molekularnom metodom.

### 5.5.1. Identificirani rodovi i vrste plijesni

U **Tablici 45** prikazani su rezultati identifikacije plijesni koje su porasle na uzorcima Slavenskog kulena nakon tri mjeseca proizvodnje i to prema zastupljenosti pojedine vrste na različitim mikrolokalitetima.

Nakon tri mjeseca proizvodnje ukupno je izolirano 7 vrsta plijesni iz roda *Penicillium* (*Penicillium commune*, *Penicillium solitum*, *Penicillium rubens*, *Penicillium echinulatum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium verrucosum* i *Penicillium chrysogenum*), od kojih je *Penicillium commune* vrsta koja je najviše puta izolirana u uzorcima s mikrolokaliteta 1 (1A), 2 (2A), 3 (3A), 5 (5A), i odabranog mikrolokaliteta (2D-3O). Iznimku predstavljaju uzorci s mikrolokaliteta 4 (4A), gdje je najviše puta izolirana plijesan *Penicillium verrucosum*, koja se u literaturi navodi kao učestali producent OTA (Pitt i Hocking, 2009.; El Khoury i Atoui, 2010.; Ostry i sur., 2013.). Također, pored plijesni koje pripadaju rodu *Penicillium*, izolirane su i vrste koje pripadaju rodu *Mucor*, uključujući *Mucor plumbeus* u uzorcima 2A i *Mucor racemosus* u uzorcima 3A. U uzorcima 4A izolirana je i vrsta *Aspergillus flavus* koja je mogući producent mikotoksina AFB<sub>1</sub>. Nakon tri mjeseca proizvodnje u uzorcima Slavenskog kulena

su uz *Penicillium* vrste, koje su dominantne, izolirane i vrste *Cladosporium cladosporioides* (uzorci 3A) i *Alternaria alternata* (uzorci 5A).

*Penicillium verrucosum* kao mogući producent mikotoksina OTA izoliran je u uzorcima 3A, 4A i u oštećenom uzorku s jednog odabranog mikrolokalityta 2D-30.

Na kraju proizvodnog procesa, nakon šest mjeseci proizvodnje, na svim uzorcima Slavenskog kulena dominiraju plijesni roda *Penicillium*, što je u skladu s većinom prethodno provedenih istraživanja na trajnim (fermentiranim) proizvodima (López-Díaz i sur., 2001.; Comi i sur., 2004.; Battilani i sur., 2007.; Papagianni i sur., 2007.; Sørensen i sur., 2008.; Asefa i sur., 2009.; Iacumin i sur., 2009.; Pleadin i sur., 2017.). U ovom istraživanju izolirano je ukupno 10 vrsta plijesni roda *Penicillium* (*P. commune*, *P. solitum*, *P. rubens*, *P. echinulatum*, *P. polonicum*, *P. verrucosum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. roqueforti* i *P. nalgiovense*), dvije vrste roda *Aspergillus* (*A. flavus* i *A. proliferans*), dvije vrste roda *Mucor* (*M. plumbeus* i *M. racemosus*) i jedna vrsta roda *Eurotium* (*E. repens*) (**Tablica 46**).

*Penicillium commune* je i nakon šest mjeseci proizvodnje najviše puta izolirana vrsta plijesni. Ova vrsta plijesni je uobičajena u hrani, a njezino primarno stanište je sir te se smatra glavnim uzročnikom njegova kvarenja (Pitt i Hocking, 2009.). Kao najzastupljenija, *Penicillium* vrsta, izolirana je i na Istarskom pršutu (Comi i sur., 2004.), a također je izolirana kao dominantna vrsta i na španjolskoj fermentiranoj kobasici „Chorizo de Cantimpalos“ (López-Díaz i sur., 2001.) te tradicionalnim grčkim kobasicama (Papagiani i sur., 2007.). *P. commune* vrlo brzo raste pri temperaturi hladnjaka, optimalna temperatura za rast joj je oko 25 °C, a maksimalna oko 35 °C, te je sposobna rasti ispod  $a_w$  od 0,85 (Pitt i Hocking, 2004.). Većina sojeva *P. commune* može producirati i mikotoksin ciklopiazoničnu kiselinu (López-Díaz i sur., 2001.; Pitt i Hocking, 2009.).

U **Tablici 47** prikazane su izolirane vrste plijesni na kraju proizvodnog procesa Slavenske kobasice, tj. nakon tri mjeseca proizvodnje na različitim mikrolokalitytima. Također, kao i kod uzoraka Slavenskog kulena, na uzorcima Slavenske kobasice dominiraju plijesni roda *Penicillium*. Osim plijesni roda *Penicillium* izolirane su i plijesni roda *Aspergillus* (*A. flavus*) te *Mucor* (*M. racemosus*).

U svim uzorcima Slavenskog kulena i Slavenske kobasice ukupno je identificirano 322 izolata, od toga 251 u Slavenskom kulenu i 71 izolat u Slavenskoj kobasici (**Tablica 48**). Od ukupnog

broja izolata, molekularnom metodom identificirano je ukupno 18 različitih vrsta plijesni među kojima dominiraju plijesni roda *Penicillium*, što je i u skladu s drugim provedenim istraživanjima na trajnim mesnim proizvodima (Papagianni i sur., 2007.; Sørensen i sur., 2008.; Asefa i sur., 2009.; Iacumin i sur., 2009.; Castellari i sur., 2010.; Sonjak i sur., 2011.; Pleadin i sur., 2017.). Osim 11 *Penicillium* vrsta, izolirane su još i dvije vrste roda *Aspergillus*, dvije vrste roda *Mucor*, te po jedna vrsta roda *Alternaria*, *Cladosporium* i *Eurotium*. Slični rodovi, a i vrste, izolirani su i na tradicionalnim grčkim kobasicama Papagianni i sur. (2007.).

Vrste roda *Aspergillus* su česti kontaminanti hrane u subtropskim i tropskim područjima i stoga su u trajnim (fermentiranim) kobasicama, čija se proizvodnja (zrenje) uglavnom odvija pri nižim temperaturama, *Aspergillus* vrste mnogo rjeđe izolirane od *Penicillium* vrsta (Castellari i sur., 2010.; Sonjak i sur., 2011.; Pleadin i sur., 2017.), što je dokazano i u ovom radu. *Aspergillus flavus* i *Aspergillus proliferans* su dvije vrste roda *Aspergillus* koje su izolirane u ovom radu, i to *Aspergillus flavus* na kraju proizvodnog procesa u uzorcima Slavenskog kulena i Slavonske kobasice, a *Aspergillus proliferans* samo u uzorcima Slavonske kobasice.

Plijesni roda *Mucor* su također široko rasprostranjene u prirodi, a na mesnim proizvodima ne predstavljaju dominantnu mikofloru. Plijesni roda *Mucor* se moraju uklanjati s površine proizvoda jer ne dopuštaju homogeno sušenje proizvoda u prvoj fazi proizvodnje, zbog svoje hidrofilne prirode (Berni, 2015.). U ovom radu su izolirane tek dvije vrste ovog roda, *Mucor racemosus* i *Mucor plumbeus*. Obje vrste su izolirane i u uzorcima Slavenskog kulena i Slavonske kobasice, a u Slavenskom kulenu u nešto većem broju u odnosu na Slavonsku kobasicu. Prema istraživanju koje su na fermentiranim kobasicama proveli Bruna i sur. (2000.), *Mucor racemosus* je vrsta plijesni koja može povoljno utjecati na senzorska svojstva fermentiranih kobasica.

Vrste roda *Eurotium*, poput *Eurotium repens*, koji je izoliran u uzorcima Slavenskog kulena nakon šest mjeseci proizvodnje, obično se nalaze u unutrašnjim, zatvorenim prostorima te hrani s niskim aktivitetom vode (Samson i sur., 2004.). Rod *Eurotium* izoliran je na prirodno fermentiranim kobasicama (Andersen, 1995.; Sørensen i sur., 2008.) i suhomesnatim proizvodima (Comi i sur., 2004.; Asefa i sur., 2009.; Sonjak i sur., 2011.; Comi i sur., 2013.). *Eurotium repens* može pozitivno djelovati na zrenje šunki (Huerta i sur., 1987.; Comi i sur., 2004.). Pretpostavlja se da tipična aroma šunki može biti posljedica rasta ove vrste plijesni na

mišićnom dijelu te da je njezina prisutnost na površini dobar pokazatelj za procjenu zrenja (Comi i sur., 2004.).

Mnoge vrste roda *Cladosporium* su široko rasprostranjene te su uobičajene u zatvorenim prostorima i zraku (Pitt i Hocking, 2009.). Češće se javljaju u proizvodnom okruženju nego u završnom proizvodu, a kao i plijesni roda *Mucor*, ne predstavljaju dominantnu mikofloru na trajnim (fermentiranim) kobasicama. U ovom radu *Cladosporium* vrsta je izolirana u početnoj fazi proizvodnje (nakon tri mjeseca) u uzorcima Slavenskog kulena, dok u kasnijoj fazi ove vrste nisu izolirane, što se može objasniti na način da su ih prerastle više kserotolerantne vrste, kako je utvrđeno i u istraživanju Sonjak i sur. (2011.). *Cladosporium* spp. može uzrokovati crno obojenje površine šunki i fermentiranih kobasica (Sørensen i sur., 2009.).

U uzorcima Slavenskog kulena plijesni koje su najveći broj puta izolirane su *Penicillium commune* (30,28%), *Penicillium solitum* (17,93%) i *Penicillium verrucosum* (13,15%), u uzorcima Slavenske kobasice *Penicillium polonicum* (33,80%), *Penicillium commune* (25,35%) i *Penicillium verrucosum* (16,90%). *Penicillium commune* (29,19%) i *Penicillium polonicum* (14,29%) su dvije vrste plijesni koje su najviše puta izolirane na svim uzorcima trajnih (fermentiranih) kobasica u ovom radu.

### 5.5.2. Pojavnost toksikotvornih vrsta plijesni i mikotoksina

Prisutnost određenih vrsta plijesni nije uvijek popraćena i produkcijom toksina jer su uvjeti (osobito  $a_w$ ) koji omogućavaju njihovu produkciju više restriktivni od onih koji omogućavaju sam rast plijesni (Karolyi, 2011.).

Nakon tri mjeseca proizvodnje, u uzorcima Slavenskog kulena s mikrolokaliteta 4 (4A) izolirana je vrsta *Aspergillus flavus* koja je mogući producent mikotoksina AFB<sub>1</sub>, no u tim uzorcima nije detektiran navedeni mikotoksin, što se može objasniti na način da nisu postignuti uvjeti koji su potrebni da bi ova vrsta plijesni producirala AFB<sub>1</sub>.

Nakon tri mjeseca proizvodnje, *Penicillium verrucosum* kao mogući producent mikotoksina OTA, izoliran je u uzorcima 3A, 4A i u oštećenom uzorku s jednog odabranog mikrolokaliteta 2D-3O, a samo je u oštećenom uzorku detektiran mikotoksin OTA, što ukazuje na činjenicu

da oštećenje površine ovitka potiče kontaminaciju proizvoda, što je potvrđeno i istraživanjem Pleadin i sur. (2015.a).

Nakon šest mjeseci proizvodnje, *Penicillium verrucosum* izoliran je u uzorcima s mikrolokaliteta 1 (1B), 2 (2B), 3 (3B), 4 (4B) i oštećenom uzorku 2D-6O. U uzorcima s mikrolokaliteta 4 (4B) nije detektiran mikotoksin OTA, dok je u uzorcima s mikrolokaliteta 1 (1B), 2 (2B), 3 (3B) i odabranog mikrolokaliteta (2D-6O) detektiran. U oštećenom uzorku 2D-6O je i detektirana najveća koncentracija OTA od 8,07 µg/kg. Uz OTA, u oštećenom uzorku Slavenskog kulena detektiran je i AFB<sub>1</sub> u koncentraciji nešto većoj od limita detekcije primijenjene analitičke metode. Jedino u uzorcima s mikrolokaliteta 5 (5A i 5B) nisu izolirani mogući producenti OTA i AFB<sub>1</sub>, niti su u uzorcima navedeni mikotoksini detektirani. Uzorci s mikrolokaliteta 5 (5B) na kraju proizvodnog procesa na površini nisu imali vidljive plijesni.

U uzorcima Slavonske kobasice s mikrolokaliteta 1 (1C), 4 (4C), 1D-N te oštećenim uzorcima 1D-O s odabranog mikrolokaliteta izoliran je mogući producent mikotoksina OTA, *Penicillium verrucosum*, a samo je u oštećenim uzorcima 1D-O i neoštećenim uzorcima 1D-N s odabranog mikrolokaliteta detektiran i mikotoksin OTA (**Tablica 43**). U neoštećenom uzorku 1D-N s odabranog mikrolokaliteta je određena nešto veća koncentracija OTA, nego u oštećenom, što se može objasniti time da je u neoštećenom uzorku, mogući producent mikotoksina OTA, *Penicillium verrucosum*, izoliran u nešto većem broju nego u oštećenom.

U uzorcima s mikrolokaliteta 1 (1C), 3 (3C) i 5 (5C) je izoliran mogući producent mikotoksina AFB<sub>1</sub>, *Aspergillus flavus*, no navedeni mikotoksin nije detektiran, što se može objasniti time da se tijekom procesa zrenja uzoraka Slavonske kobasice nisu postigli uvjeti koji omogućuju ovoj vrsti plijesni produkciju AFB<sub>1</sub>.

U svim uzorcima Slavenskog kulena (1B, 2B, 3B, 2D-3O, 2D-6O) i Slavonske kobasice (1D-3O i 1D-3N) u kojim je određena koncentracija mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub>, s površine proizvoda izolirani su i njihovi mogući producenti, *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus flavus*.

## **6. ZAKLJUČCI**



Na osnovu rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Svi uzorci svježeg mesa i mljevene paprike koji su se koristili za proizvodnju Slavanskog kulena i Slavanske kobasice bili su mikrobiološki ispravni, tj. sve vrijednosti za analizirane mikroorganizme bile su u skladu s MDK vrijednostima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu. Također, i svi uzorci Slavanskog kulena nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje, te uzorci Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje, bili su mikrobiološki ispravni.
2. Analizom fizikalno-kemijskih svojstava, odnosno sastava Slavanskog kulena nakon tri i nakon šest mjeseci proizvodnje te Slavanske kobasice nakon tri mjeseca proizvodnje, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u odnosu na promatrana svojstva i mikrolokalitete. Uzorci su u skladu s vrijednostima za određene parametre koji su karakteristični za ovu vrstu mesnih proizvoda. Utvrđene razlike posljedica su neujednačenosti tehnologije proizvodnje, odnosno recepture i tehnoloških parametara.
3. Neoštećeni uzorci Slavanskog kulena i Slavanske kobasice s odabranog mikrolokaliteta, na kojima nije bilo prekomjerne pojave površinske plijesni, nisu imali značajnija odstupanja pri određivanju senzorskih svojstava, tj. pojava površinske plijesni nije negativno utjecala na sensoriku ispitanih uzoraka. No, pojava plijesni na površini oštećenog uzorka Slavanskog kulena, kojeg karakterizira i dugi period zrenja, dovela je do promjene senzorskih svojstava. Naime, oštećenje ovitka proizvoda je omogućilo prodiranje spora plijesni u njegovu unutrašnjost što je negativno djelovalo na senzorska svojstva.
4. S površine uzoraka Slavanskog kulena i Slavanske kobasice izolirane su toksikotvorne plijesni, *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus flavus*, mogući producenti mikotoksina OTA i AFB<sub>1</sub>, a navedeni mikotoksini su i određeni u uzorcima i to u uzorcima Slavanskog kulena na kraju proizvodnog procesa (OTA = 2,20 – 3,55 µg/kg) te oštećenim uzorcima Slavanskog kulena (OTA = 6,35 - 8,07 µg/kg i AFB<sub>1</sub> = 2,36 µg/kg) i Slavanske kobasice (OTA = 4,09 µg/kg). Stoga se može zaključiti da je došlo do izravne kontaminacije proizvoda površinskim plijesnima koje mogu producirati ove mikotoksine.

5. U uzorcima Slavanskog kulena i Slavanske kobasice kojima je oštećena površina ovitka određene su značajno povećane koncentracije OTA (4,09 µg/kg – 8,07 µg/kg) te u Slavanskom kulenu AFB<sub>1</sub> (2,36 µg/kg) što upućuje na zaključak da je oštećenje površine ovitka jedan od primarnih razloga kontaminacije trajnih (fermentiranih) kobasica ovim mikotoksinima.
6. U neoštećenim uzorcima Slavanske kobasice nisu određeni mikotoksini OTA i AFB<sub>1</sub>, a razlog tome može biti i kraći period zrenja ove vrste trajne (fermentirane) kobasice u kojem se nisu postigli uvjeti u kojima bi izolirane toksikotvorne plijesni producirale navedene mikotoksine.
7. Dominantnu mikofloru na uzorcima trajnih (fermentiranih) kobasica analiziranih u ovom istraživanju predstavlja rod *Penicillium*. Na uzorcima Slavanskog kulena dominantna vrsta plijesni je *Penicillium commune*, dok je na uzorcima Slavanske kobasice *Penicillium polonicum*. Stoga ove dvije vrste plijesni predstavljaju dominantne vrste na uzorcima trajnih (fermentiranih) kobasica, analiziranih u ovom radu.
8. Prekomjerna pojava plijesni na površini proizvoda te njezino ne uklanjanje tijekom proizvodnog procesa, osim što može negativno utjecati na sensoriku proizvoda, može dovesti i do kontaminacije proizvoda mikotoksinima koje su producirale toksikotvorne plijesni, što je i potvrđeno u ovom radu.
9. Budući rezultati istraživanja ukazuju na moguću kontaminaciju finalnih mesnih proizvoda toksikotvornim plijesnima, te posljedično mikotoksinima, potrebno je pridržavati se načela dobre proizvođačke prakse, te kontrolirati sve faze proizvodnog procesa na prisutnost mikotoksina, kao značajnih kontaminanata hrane, ujedno i mesnih proizvoda. Također, uklanjanjem plijesni s površine proizvoda tijekom proizvodnog procesa te očuvanjem površine ovitka, može se smanjiti rizik od navedene kontaminacije finalnog mesnog proizvoda.

## **7. LITERATURA**

- Abrunhosa L, Paterson RR, Venâncio A: Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* 2: 1078-1099, 2010.
- Adams MR, Moss MO: *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
- Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA): Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final, 2009.
- Aguirrezábal MM, Mateo J, Dominguez MC, Zumalacárregui JM: The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat science* 54: 77-81, 2000.
- Amaike S, Keller NP: *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology* 49: 107-133, 2011.
- Ambrosiadis J, Soutos N, Abraham A, Bloukas JG: Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Science* 66:279-287, 2004.
- Amézqueta S, González-Peñas E, Murillo-Arbizu M, de Cerain AL: Ochratoxin A decontamination: A review. *Food control* 20: 326-333, 2009.
- Andersen SJ: Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *Journal of Food Protection* 58: 426-429, 1995.
- Asefa DT, Gjerde RO, Sidhu MS, Langsrud S, Kure CF, Nesbakken T, Skaar I: Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. *International journal of food microbiology* 128: 435-439, 2009.
- Asefa DT, Kure CF, Gjerde RO, Langsrud S, Omer MK, Nesbakken T, Skaar I: A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. *Food Control* 22: 831-837, 2011.
- Asefa DT, Kure CF, Gjerde RO, Omer MK, Langsrud S, Nesbakken T, Skaar I: Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International journal of food microbiology* 140: 131-135, 2010.
- Aymerich T, Martin B, Garriga M, Hugas M: Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and environmental microbiology* 69: 4583-4594, 2003.
- Babić I, Markov K, Kovačević D, Trontel A, Slavica A, Đugum J, Čvek D, Svetec IK, Posavec S, Frece J: Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian "brand" product "Slavonski kulen". *Meat science* 88: 517-524, 2011.
- Babić I: Karakterizacija mikrobnih kultura iz autohtonog slavonskog kulena u svrhu njihove primjene kao starter kultura. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2011.

- Bailly JD, Guerre P: Mycotoxins in meat and processed meat products. U *Safety of meat and processed meat*. Springer, New York, 83-124, 2009.
- Battilani P, Pietri A, Giorni P, Formenti S, Bertuzzi T, Toscani T, Virgili R, Kozakiewicz Z: *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Journal of Food Protection* 70: 975-980, 2007.
- Bbosa GS, Kitya D, Odda J, Ogwal-Okeng J: Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health* 5: 14-34, 2013.
- Benčević K, Petričević A: *Slavonski domaći kuleni i kobasice*. Hrvatski farmer, Zagreb, 1999.
- Bennett J, Klich M: Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews* 16: 497-516, 2003.
- Bennett JW: An overview of the genus *Aspergillus*. U *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, 1-17, 2010.
- Berni E: Molds. U *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Wiley Blackwell, New Jersey, 147-153, 2015.
- Bonomo MG, Ricciardi A, Zotta T, Parente E, Salzano G: Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science* 80: 1238-1248, 2008.
- Boorman G: *Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A*. National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, Washington, 358; 1-142, 1989.
- Bosco F, Mollea C: Mycotoxins in food. U *Food Industrial Processes-Methods and Equipment*. InTech, 169-200, 2012.
- Bruna JM, Fernández M, Hierro EM, Ordóñez JA, De la Hoz L: Improvement of the sensory properties of dry fermented sausages by the superficial inoculation and/or the addition of intracellular extracts of *Mucor racemosus*. *Journal of Food Science* 65: 731-738, 2000.
- Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G: Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins* 2: 1111-1120, 2010.
- Cano-García L, Flores M, Belloch C: Molecular characterization and aromatic potential of *Debaryomyces hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages. *Food research international* 52: 42-49, 2013.
- Castano A, Fontán MG, Fresno JM, Tornadijo ME, Carballo J: Survival of *Enterobacteriaceae* during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. *Food Control* 13: 107-115, 2002.
- Castellari C, Quadrelli AM, Laich F: Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *International journal of food microbiology* 142: 149-155, 2010.

- Cleveland TE, Yu J, Fedorova N, Bhatnagar D, Payne GA, Nierman WC, Bennett JW: Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in biotechnology* 27: 151-157, 2009.
- Cocolin L, Urso R, Rantsiou K, Cantoni C, Comi G: Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research* 6: 692-701, 2006.
- Comi G, Orlic S, Redzepovic S, Urso R, Iacumin L: Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International journal of food microbiology* 96: 29-34, 2004.
- Comi G, Urso R, Iacumin L, Rantsiou K, Cattaneo P, Cantoni C, Cocolin L: Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science* 69: 381-392, 2005.
- Coppola S, Mauriello G, Aponte M, Moschetti G, Villani F: Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science* 56:321-9, 2000.
- Creppy EE: Human ochratoxicosis. *Journal of Toxicology Toxin Reviews* 18: 277-293, 1999.
- Dall'Asta C, Galaverna G, Bertuzzi T, Moseriti A, Pietri A, Dossena A, Marchelli R: Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food chemistry* 120: 978-983, 2010.
- Delaš F: Mikrobni toksini. U *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 31-49, 2010.
- Dirheimer G, Creppy EE: Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC scientific publications* 115: 171-186, 1991.
- Drosinos EH, Mataragas M, Xiraphi N, Moschonas G, Gaitis F, Metaxopoulos J: Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science* 69: 307-317, 2005.
- Ducic M, Blagojevic B, Markov S, Velicanski A, Buncic S: General patterns of background microbiota and selected bacterial pathogens during production of fermented sausages in Serbia. *Food control* 43: 231-237, 2014.
- Duraković S, Duraković L: *Mikologija u biotehnologiji*. Kugler, Zagreb, 2003.
- Duraković S, Duraković L: *Mikrobiologija namirnica: osnove i dostignuća. Knjiga druga*. Kugler, Zagreb, 2001.
- Duraković S, Duraković L: *Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju: I. dio-knjiga druga*. Durieux, Zagreb, 1998.
- Duraković S: *Primijenjena mikrobiologija*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

- Duran RM, Cary JW, Calvo AM: Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 1158-1168, 2007.
- Dutton, MF: Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews* 52: 274-295, 1988.
- El Khoury A, Atoui A, Rizk T, Lteif R, Kallassy M, Lebrihi A: Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *Journal of food science* 76: 247-253, 2011.
- El Khoury A, Atoui A: Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins* 2: 461-493, 2010.
- Encinas JP, López-Díaz TM, García-López ML, Otero A, Moreno B: Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54: 203-208, 2000.
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B<sub>1</sub> as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal* 39: 1-27, 2004.
- Ferreira V, Barbosa J, Silva J, Gibbs P, Hogg T, Teixeira P: Microbiological profile of Salpicão de Vinhais and Chouriça de Vinhais from raw materials to final products: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Innovative food science & emerging technologies* 10: 279-283, 2009.
- Flores M, Corral S, Cano-García L, Salvador A, Belloch C: Yeast strains as potential aroma enhancers in dry fermented sausages. *International journal of food microbiology* 212: 16-24, 2015.
- Food and Agriculture Organization: *Animal feeding and food safety*. FAO, Rome, 1997.
- Frazier WC: *Food Microbiology*. McGraw-Hill Book Company, New York, 1958.
- Frece J, Markov K, Kovačević D: Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso* 12: 92-99, 2010.
- Frisvad JC, Samson RA: Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology* 49: 1-174, 2004.
- Frisvad JC, Thrane U: Mycotoxin production by common filamentous fungi. U *Introduction To Food-and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 321-331, 2000.
- Frisvad JC: Rationale for a polyphasic approach in the identification of mycotoxigenic fungi. U *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 279-297, 2011.

- Fung F, Clark RF: Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 42: 217-234, 2004.
- Gareis M, Scheuer R: Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51: 102-104, 2000.
- Gareis M, Wolff J: Relevance of mycotoxin contaminated feed for farm animals and carryover of mycotoxins to food of animal origin. *Mycoses* 43: 79-83, 2000.
- Gareis M: Fate of ochratoxin A on processing of meat products. *Food Additives and Contaminants* 13: 35-37, 1996.
- García Fontán MC, Lorenzo JM, Martínez S, Franco I, Carballo J: Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LWT-Food Science and Technology* 40: 1610-1622, 2007.
- Geisen R: Molecular monitoring of environmental conditions influencing the induction of ochratoxin A biosynthesis genes in *Penicillium nordicum*. *Molecular nutrition & food research* 48: 532-540, 2004.
- Gimeno O, Ansorena D, Astiasarán I, Bello J: Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. *Food Chemistry* 69: 195-200, 2000.
- Giovannacci I, Queguiner S, Ragimbeau C, Salvat G, Vendeuvre JL, Carlier V, Ermel G: Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *Journal of Applied Microbiology* 90: 131-147, 2001.
- Habrun B: *Klinička veterinarska bakteriologija*. Hrvatski veterinarski institut Zagreb i Medicinska naklada Zagreb, Zagreb, 2014.
- Hajsig D, Delaš F: *Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije*. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, 99-109, 2016.
- Hammes WP, Bantleon A, Min S: Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 7: 165-173, 1990.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692, 2007.
- Herzallah SM: Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry* 114: 1141-1146, 2009.
- Horn BW, Moore GG, Carbone I: Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* 101: 423-429, 2009.
- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni – 1. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode većim od 0,95*. HRN ISO 21527-1: 2012.



- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni – 2. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode manjim ili jednakim 0,95*. HRN ISO 21527-2: 2012.
- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (Staphylococcus aureus i druge vrste) – 1.dio: Postupak primjene Baird-Parkerove hranjive podloge na agaru*. HRN EN ISO 6888-1: 2004.
- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti, određivanje broja i serotipizaciju Salmonella – 1. dio: Dokazivanje prisutnosti Salmonella spp*. HRN EN ISO 6579-1: 2017.
- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja Enterobacteriaceae – 2. dio: Postupak određivanja broja kolonija*. HRN EN ISO 21528-2: 2017.
- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Horizontalna metoda za brojenje sulfitoreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima*. HRN ISO 15213: 2004.
- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja Listeria monocytogenes i drugih Listeria spp. – 1. dio: Metoda dokazivanja prisutnosti*. HRN EN ISO 11290-1: 2017.
- Hrvatski zavod za norme: *Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja Listeria monocytogenes i drugih Listeria spp. – 2. dio: Metoda određivanja broja*. HRN EN ISO 11290-2: 2017.
- Hrvatski zavod za norme: *Meso i mesni proizvodi – Određivanje količine dušika (Referentna metoda)*. HRN ISO 937: 1999.
- Huerta T, Sanchis V, Hernandez J, Hernandez E: Mycoflora of dry-salted Spanish ham. *Microbiology, foods and feeds, nutrition* 5: 247-252, 1987.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich T, Monfort JM: Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International journal of food microbiology* 18: 107-113, 1993.
- Hussein HS, Brasel JM: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134, 2001.
- Iacumin L, Chiesa L, Boscolo D, Manzano M, Cantoni C, Orlic S, Comi G: Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology* 26: 65-70, 2009.
- Iacumin L, Manzano M, Comi G: Prevention of *Aspergillus ochraceus* growth on and Ochratoxin a contamination of sausages using ozonated air. *Food microbiology* 29: 229-232, 2012.

- International Agency for Research on Cancer (IARC): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Monographs on the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, IARC 56, Lyon, 1993.
- International Agency for Research on Cancer (IARC): *Aflatoxins*. IARC monographs 100F: 225-248, Lyon, 2012.
- International Standards Organisation: *Meat and meat products – Determination of total ash*. ISO 936:1998.
- International Standards Organisation: *Meat and meat products – Determination of moisture content (Reference method)*. ISO 1442:1997.
- International Standards Organisation: *Meat and meat products – Determination of total fat content*. ISO 1443:1973.
- Jakšić D: Citotoksičnost nekih furofuranskih prekursora biosinteze aflatoksina. *Seminarski rad*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2009.
- Janeš K: Rast *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Jørgensen K: Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15: 550-554, 1998.
- Kalenić S, Mlinarić-Missoni E: *Medicinska bakteriologija i mikologija*. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.
- Karolyi D: Fizikalno-kemijska, higijenska i organoleptička karakterizacija slavonskog kulena. *Meso* 13: 423-429, 2011.
- Karolyi D: Importance of  $a_w$  for meat freshness. *Meso* 6: 9-13, 2004.
- Katušić Hećimović S: Analiza DNA i RNA uporabom lančane reakcije polimerazom (PCR): Osnovna metoda PCR. U *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 361 – 362, 2007.
- Kegalj A, Krvavica M, Ljubičić I: Raznolikost mikroflore u mesu i mesnim proizvodima. *Meso*, 14: 234-245, 2012.
- Klich MA: *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology* 8: 713-722, 2007.
- Kőszegi T, Poór M: Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* 8: 111, 2016.
- Kovačević D, Pleadin J, Mastanjević K, Frece J: Opasnosti od površinske kontaminacije plijesnima u tradicionalnoj proizvodnji kulena. *Meso* 16: 162-168, 2014.a.

- Kovačević D, Pleadin J, Mastanjević K, Frece J: Utjecaj tehnoloških operacija na smanjenje koncentracije okratoksina A tijekom proizvodnje Slavenskog kulena. *Meso* 16: 232-237, 2014.b.
- Kovačević D, Suman K, Šubarić D, Mastanjević K, Vidaček S: Investigation of homogeneity and physicochemical characterisation of the Homemade Slavonian Sausage. *Meso* 11: 338-344, 2009.
- Kovačević D, Mastanjević K, Šubarić D, Jerković I, Marijanović Z: Physico-chemical, colour and textural properties of Croatian traditional dry sausage (Slavonian Kulen). *Meso* 12: 270-275, 2010.
- Kovačević D: *Tehnologija kulena i ostalih fermentiranih kobasica*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2014.
- Kovačević D: *Kemija i tehnologija šunki i pršuta*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2017.
- Kozakiewicz Z, Smith D: Physiology of aspergillus. U *Aspergillus*. Springer, Boston, 23-40, 1994.
- Leggieri MC, Decontardi S, Bertuzzi T, Pietri A, Battilani P: Modeling Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi Signaled in Cheese under Different Temperature and Water Activity Regimes. *Toxins* 9: 1-17, 2017.
- López-Díaz TM, Santos JA, García-López ML, Otero A: Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 68: 69-74, 2001.
- Lorenzo JM, Michinel M, López M, Carballo J: Biochemical characteristics of two Spanish traditional dry-cured sausage varieties: Androlla and Botillo. *Journal of food composition and analysis* 13: 809-817, 2000.
- Lücke FK: Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56: 105-115, 2000.
- Madsen A, Mortensen HP, Hald B: Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs: I. Influence on pig performance and residues. *Acta Agriculturae Scandinavica* 32: 225-239, 1982.
- Magan N, Aldred D: Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International journal of food microbiology* 119: 131-139, 2007.
- Marin DE, Tăranu I, Tabuc C, Burgehelea M: Ochratoxin: nature, origin, metabolism and toxic effects in pigs. *Archiva Zootech*, 2009; 12 (1): 5-17, 2009.
- Markov K, Pleadin J, Bevardi M, Vahčić N, Sokolić-Mihalak D, Frece J: Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* 34: 312-317, 2013.

- Mašek T, Šerman V: Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme* 48: 19-31, 2006.
- Metaxopoulos J, Samelis J, Papadelli M: Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. *Italian Journal of Food Science (Italy)* 13: 3-18, 2001.
- Ministarstvo poljoprivrede: *Pravilnik o mesnim proizvodima*. Narodne novine 62/18, 2018.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje*, Zagreb, 2011.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i vodnoga gospodarstva: *Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*. Narodne novine 2/05, 2005.
- Mižáková AD, Pipová MO, Turek PE: The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech J Food Sci.* 20: 89-94, 2002.
- Moss MO: Mycotoxin review-1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* 16: 116-119, 2002.
- Mycobank Database. "*Penicillium verrucosum*" Dierckx":  
<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=1468261600000063&Rec=14971&Fields=All> (pristupljeno 28.03.2018.).
- Naglić T, Hajsig D, Madić J, Pinter L: *Veterinarska mikrobiologija: specijalna bakteriologija i mikologija*. Veterinarski fakultet, Zagreb, 2005.
- Neely WC, West AD: Spectroanalytical parameters of fungal metabolites. 3. Ochratoxin A. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 55: 1305-1309, 1972.
- Northolt MD, Bullerman LB: Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection* 45: 519-526, 1982.
- Núñez F, Diaz MC, Rodriguez M, Aranda E, Martin A, Asensio MA: Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *Journal of food protection* 63: 231-236, 2000.
- Núñez F, Westphal CD, Bermudez E, Asensio MA: Production of secondary metabolites by some terverticillate penicillia on carbohydrate-rich and meat substrates. *Journal of food protection* 70: 2829-2836, 2007.
- Nyongesa BW, Okoth S, Ayugi V: Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya. *Advances in Microbiology* 5: 205-229, 2015.
- Olivares A, Navarro JL, Salvador A, Flores M: Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat science* 86: 251-257, 2010.
- Ostry V, Malir F, Ruprich J: Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins* 5: 1574-1586, 2013.

- Ožegović L, Pepeljnjak S: *Mikotoksikoze*. Školska knjiga, Zagreb, 1995.
- Pala TR, Sevilla A: Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant. *Journal of food protection* 67: 1624-1629, 2004.
- Papagianni M, Ambrosiadis I, Filiouis G: Mould growth on traditional Greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat science* 76: 653-657, 2007.
- Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P: Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science* 65: 859-867, 2003.
- Pascale M, Visconti A: Overview of detection methods for mycotoxins. U *Mycotoxins Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, 171-183, 2008.
- Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M: Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 754-766, 1999.
- Perši N, Pleadin J, Kovačević D, Scortichini G, Milone S: Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat Science* 96: 203-210, 2014.
- Perši N: Ostaci okratoksina A u sirovinama i proizvodima od svinjskog mesa nakon subkroničnog tretmana. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.
- Petričević A, Benčević K, Kušec G: *Slavonski domaći kulen i kobasice*. II. Dopunjeno i izmijenjeno izdanje. EU Agro Hrvatska, Osijek, 2010.
- Petrik J, Žanić-Grubišić T, Barišić K, Pepeljnjak S, Radić B, Ferenčić Ž, Čepelak I: Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Archives of toxicology* 77: 685-693, 2003.
- Petzinger E, Weidenbach A: Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock production science* 76: 245-250, 2002.
- Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA: Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research* 51: 61-99, 2007.
- Pitt JI: *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 266-269, 1987.
- Pitt JI, Spotts RA, Holmes RJ, Cruickshank RH: *Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit. *Phytopathology* 81: 1108-1112, 1991.
- Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York, 2009.
- Pleadin J, Frece J, Markov K: Aflatoxins-pollution, effects and methods of reduction. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 9: 75-82, 2014.b.

- Pleadin J, Kovačević D, Perković I: Impact of casing damaging on aflatoxin B<sub>1</sub> concentration during the ripening of dry-fermented meat sausages. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 36: 655-666, 2015.a.
- Pleadin J, Krešić G, Barbir T, Petrović M, Milinović I, Kovačević D: Promjene u osnovnom nutritivnom i masno-kiselinskom sastavu tijekom proizvodnje Slavenskog kulena. *Meso* 16: 487-492, 2014.c.
- Pleadin J, Perši N, Kovačević D, Vahčić N, Scortichini G, Milone S: Ochratoxin A in traditional dry-cured meat products produced from sub-chronic-exposed pigs. *Food Additives & Contaminants* 30: 1827-1836, 2013.a.
- Pleadin J, Staver MM, Vahčić N, Kovačević D, Milone S, Saftić L, Scortichini G: Survey of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food control* 52: 71-77, 2015.c.
- Pleadin J, Vahčić N, Perši N, Kovačević D: Varijabilnost fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava autohtonih mesnih proizvoda između proizvodnih domaćinstava. *Meso* 15: 122-131, 2013.b.
- Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž: Aflatoxin B<sub>1</sub> occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* 40: 286-291, 2014.a.
- Pleadin J, Vulić A, Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž: Annual and regional variations of aflatoxin B<sub>1</sub> levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food control* 47: 221-225, 2015.b.
- Pleadin J, Zadavec M, Brnić D, Perković I, Škrivanko M, Kovačević D: Moulds and mycotoxins detected in the regional speciality fermented sausage 'slavonski kulen' during a 1-year production period. *Food Additives & Contaminants: Part A* 34: 282-290, 2017.
- Pleadin J: Perzistentnost ostataka klenbuterola u tjelesnim tekućinama i tkivima svinja nakon subkronične izloženosti anaboličnoj dozi. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2006.
- Pleadin J, Vasilj V, Petrović D: *Mikotoksini; pojavnost, prevencija i redukcija*. Sveučilište u Mostaru, Mostar, 2018.
- Pohland AE, Nesheim S, Friedman L: Ochratoxin A: a review (technical report). *Pure and Applied chemistry* 64: 1029-1046, 1992.
- Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni C, Cattaneo P, Comi G, Cocolin L: Culture-dependent and-independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1977-1986, 2005.
- Revilla I, Quintana AM: The effect of different paprika types on the ripening process and quality of dry sausages. *International journal of food science & technology* 40: 411-417, 2005.

- Ribeiro JM, Cavaglieri LR, Fraga ME, Direito GM, Dalcero AM, Rosa CA: Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. *Letters in Applied Microbiology* 42: 179-184, 2006.
- Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y: Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions* 159: 18-46, 2006.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Martín A, Nuñez F, Córdoba JJ: Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* 27: 118-126, 2012.
- Romano P, Capece A, Jespersen L: Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. U *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlin, 13-53, 2006.
- Rosselló C, Barbas JI, Berna A, López N: Microbial and chemical changes in 'Sobrasada' during ripening. *Meat science* 40: 379-385, 1995.
- Rubio B, Martínez B, Sánchez MJ, García-Cachán MD, Rovira J, Jaime I: Study of the shelf life of a dry fermented sausage "salchichon" made from raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and stored under modified atmospheres. *Meat science* 76: 128-137, 2007.
- Salgado A, Fontán MC, Franco I, López M, Carballo J: Biochemical changes during the ripening of Chorizo de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chemistry* 92: 413-424, 2005.
- Samelis J, Metaxopoulos J, Vlassi M, Pappa A: Stability and safety of traditional Greek salami—a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* 44: 69-82, 1998.
- Samelis J, Sofos JN: Yeasts in meat and meat products. U *Yeasts in food*. Behr's Verlag, Hamburg, 234-265, 2003.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC: *Introduction to food-and airborne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, 2004.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J: Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology* 78: 141-173, 2014.
- Santa OR, Alvarez DC, Santa HS, Zanette CM, Freitas RJ, Macedo RE, Terra NN: Microbiota of sausages obtained by spontaneous fermentation produced in the South of Brazil. *Food Science and Technology* 32: 653-660, 2012.
- Schmidt-Heydt M, Graf E, Stoll D, Geisen R: The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food microbiology* 29: 233-241, 2012.
- Sonjak S, Ličen M, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N: The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food microbiology* 28: 373-376, 2011.

- Sørensen LM, Frisvad JC, Nielsen PV, Lametsch R, Koch AG, Jacobsen T: Filamentous fungi on meat products, their ability to produce mycotoxins and a proteome approach to study mycotoxin production. *Disertacija*. Tehničko sveučilište u Danskoj, 2009. <http://orbit.dtu.dk/files/5022914/Marie%20S%C3%B8rensen%20til%20tryk..pdf> (pristupljeno 13.4.2018.)
- Sørensen LM, Jacobsen T, Nielsen PV, Frisvad JC, Koch AG: Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International journal of food microbiology* 124: 58-64, 2008.
- Sosa MJ, Cordoba JJ, Diaz C, Rodriguez M, Bermudez E, Asensio MA, Núñez F: Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *Journal of food protection* 65: 988-992, 2002.
- Sweeney MJ, Dobson AD: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International journal of food microbiology* 43: 141-158, 1998.
- Tabuc C, Bailly JD, Bailly S, Querin A, Guerre P: Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue de medecine veterinaire* 156: 287-291, 2004.
- Talon R, Lebert I, Lebert A, Leroy S, Garriga M, Aymerich T, Drosinos EH, Zanardi E, Ianieri A, Fraqueza MJ, Patarata L: Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science* 77: 570-579, 2007.
- Toldrá F: *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Blackwell Publishing Professional, Iowa, 2007.
- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA: Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta* 632: 168-180, 2009.
- Urso R, Comi G, Cocolin L: Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 671-680, 2006.
- Valenta H: Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A* 815: 75-92, 1998.
- Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ: Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205: 1112-1113, 1965.
- Varga J, Baranyi N, Chandrasekaran M, Vágvölgyi C, Kocsubé S: Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biologica Szegediensis* 59: 151-167, 2015.
- Varnam A, Sutherland JM, Sutherland JP: The composition and nutritional value of meat. U *Meat and meat products: technology, chemistry and microbiology*. Chapman & Hall, London, 6-7, 1995.



- Vulić A, Perši N, Vahčić N, Hengl B, Gross-Bošković A, Jurković M, Kovačević D, Pleadin J: Procjena moguće izloženosti okratoksinu A putem konzumacije kontaminiranih mesnih proizvoda. *Meso* 16: 106-112, 2014.
- Walker R, Larsen JC. Ochratoxin A: Previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants* 22: 6-9, 2005.
- Wang Y, Wang L, Liu F, Wang Q, Selvaraj JN, Xing F, Zhao Y, Liu Y: Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins* 8: 83, 2016.
- Webster J, Weber R: *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, New York, 2007.
- Wheeler KA, Hurdman BF, Pitt JI: Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International journal of food microbiology* 12: 141-149, 1991.
- White TJ, Bruns T, Lee SJ, Taylor JL: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315-322, 1990.
- Wild CP, Turner PC: The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17: 471-481, 2002.
- Wilson MD, Mubatanhema W, Jurjevic Z: Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Advances in experimental medicine and biology* 504: 3-17, 2002.
- Yu J, Payne GA, Campbell BC, Guo B, Cleveland TE, Robens JF, Keller NP, Bennett JW, Nierman WC: Mycotoxin production and prevention of aflatoxin contamination in food and feed. U *The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*. CRC Press, Boca Raton, 457-472, 2008.
- Yu J, Mohawed SM, Bhatnagar D, Cleveland TE: Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of applied microbiology* 95: 1334-1342, 2003.
- Yu J: Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins* 4: 1024-1057, 2012.
- Zanardi E, Ghidini S, Battaglia A, Chizzolini R: Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat science* 66: 415-423, 2004.
- Zdolec N, Hadžiosmanović M, Kozačinski L, Cvrtila Ž, Filipović I, Leskovar K, Vragović N, Budimir D: Fermentirane kobasice proizvedene u domaćinstvu-mikrobiološka kakvoća. *Meso* 9: 318-324, 2007.
- Zheng MZ, Richard JL, Binder J: A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161: 261-273, 2006.

## **8. PRILOZI**

## 8.1. PRILOG 1 - Dobivene sekvence za svaku vrstu plijesni nakon sekvencioniranja i obrade

### a) *Penicillium commune*

TTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCC  
GAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCA  
ACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGC  
AAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG  
TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCTCCGGGGGA  
CGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTC  
TGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAT

### b) *Penicillium polonicum*

GGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACC  
CCCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGAT  
CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGT  
GAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGT  
CATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATTCCGGGGGACGGGCCCGAA  
AGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCG  
GCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTT

### c) *Penicillium verrucosum*

ACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCC  
GCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTT  
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAAT  
TGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGC  
CTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATTCCGGGG  
GACGGGCCCAAAA

### d) *Penicillium solitum*

AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGC  
TTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGAC  
ACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACG  
GATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTC

AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG  
CGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATTTCCGGGGGACGGGCC  
CGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGG  
CCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAAACCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC  
CGCTGAACTTAAGCATAT

**e) *Penicillium echinulatum***

ACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCC  
CCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATA  
AATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
ATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTAT  
TCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGT  
CTCCGATTTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGG  
GGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAA

**f) *Penicillium brevicompactum***

ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCCACCCGTGTTTATTTTAC  
CTTGTGCTTCGGCGAGCCTGCCTTTTGGCTGCCGGGGGACGTCTGTCCCCGGGTCCGCGCTCGCCG  
AAGACACCTTAGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGATTAATATAAATTATTTAAACTTTCAA  
CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA  
GAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGT  
CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGTCTCCTTCCGGGGGACGGG  
CCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCAAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTTTGTAG  
GACTGGCCGGCGCCTGCCGATCAACCAAATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC  
CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG

**g) *Mucor plumbeus***

TTGACGTTTGAGGGATGTTCCAATGTTATAAGGATAGACATTGGAATGTTAACCGAGTCATAATCA  
GGTTTAGGCCTGGTATCCTATTATTATTACCAAATGAATTCAGAATTAATATTGTAACATAGACCTAA  
AAAATCTATAAAACAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGT  
GCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTCATTGG  
TATTCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAACAAACCCTCTATTCAACTTTTGTGTATAGGATTA  
TTGGGGGCCTCTCGATCTGTATAGATCTTGAACCCCTTGAATTTACTAAGGCCTGAACTTGTTTAAAT  
GCCTGAACTTTTTTTTAAATATAAAGGAAAGCTCTTGAATTGACTTTGATGGGGCCTCCCAAATAAAT  
CTCTTTTAAATTTGAACTGAAATCAGGTGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG

GAAGAAGGATCATTAAATAATCAATAATCTGGGCTTGCCATTATCATCTATCTACCGTGAACCTGTAT  
AATTATTTGACGTTTGAGGGATGTTCCAATGTTATAAGGATAGACTTTGGAAATGTTAACCGAGTCAT  
AATCA

**h) *Penicillium chrysogenum***

GTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATT  
TTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGC  
CCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAAC  
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGA  
ATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT  
GCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTCCGATCCCGGG  
GGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCG  
CTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCAAATTTTTATCCAGGTGACCTCGGATCAG

**i) *Aspergillus flavus***

CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGT  
ACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCC  
GCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAA  
ACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGT  
GAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG  
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTGTCCTCTCC  
GGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGT  
CACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGA  
TCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT

**j) *Mucor racemosus***

AACTGTATTATTATTGACATTTGAGGGATGTTCCAATGTTATAAGGATAGACATTGGAAATGTTAAC  
CGAGTCATAATCAGGTTTAGGCCTGGTATCCTATTATTATTTACCAAATGAATTCAGAATTAATATTGT  
AACATAGACCTAAAAAATCTATAAAACAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG  
AACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAA  
CTTGCGCTCATTGGTATTCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAACAAACCCTCTATCCAACCTTT  
GTTGTATAGGATTATTGGGGGCTCTCGATCTGTATAGATCTTGAAATCCCTGAAATTTACTAAGGCC  
TGAACCTGTTTAAATGCCTGAACTTTTTTTTT

**k) *Penicillium roqueforti***

GTAGGGGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTT  
TATTACCTTATTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGTTTACACCCCCGGGCCCGC  
GCCCCCGAAGACACCCCGAACTCTGTCTGAAGAATGCAGTCTGAGAACAAATATAAATTATTTAAA  
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGT  
GAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC  
ATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCTCGTCCTCCGATTCTG  
GAGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGCACCGCGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACC  
CGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAG  
GTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCTGGAGGAAA

**l) *Penicillium citrinum***

CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCTCGGGGCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCCGAAC  
CTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCT  
GAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA  
TTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT  
GTGTTGGG

**m) *Penicillium nalgioense***

GTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCG  
GGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAAT  
TATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA  
CGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC  
GGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTC  
CGATCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGC  
TTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAA

**n) *Alternaria alternata***

CTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGaACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGA  
ATTATTCACCCTTGCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTGGTGGGTTCCGCCACCACTAGGACAAACAT  
AAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT  
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA  
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT  
TGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGT  
AATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAG

CATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA  
TCA

**o) *Eurotium repens***

ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCATCCGTGTCTATCTGTAC  
CCTGTTGCTTCGGCGTGGCCACGGCCCGCGAAGACTAACATTTGAACACTGTCTGAAGTTTGCAGT  
CTGAGTTTTAGTTAAACAATAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA  
CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCT  
TGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGTAACGGGGACGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTG  
GTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCCCGTAGGTCCAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCA  
ATCTTTTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

**p) *Cladosporium cladosporioides***

CCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTaACCACCGGGATGTTCATAACCCTTTGTTGTCCG  
ACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGC  
GTAACCTTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTA AAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG  
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT  
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACACTC  
AAGCCTCGTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGT  
CCCCTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGTGTTCCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAAACCCAT  
TTCTAAGGTtGACCTCGGATCAGgTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

**q) *Aspergillus proliferans***

GAAGACTAACATTTGAACACTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTAGTTAAACAATAATTA AAACT  
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAA  
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT  
GCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGTAACGG  
GGACGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCG  
CTCCCGTAGGTCCAAGCTGGCAAGCTAGCCTCGCAACCAATCTTTTTAACCAGGTTGACCTCGGATCA

**r) *Penicillium rubens***

GAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCCGTGTTTATTTT  
ACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCTTA ACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCC  
GCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCT  
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAAT

---

TGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGC  
CTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCGGGG  
GACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGC  
TCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTA  
GGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCCTA



## 8.2. PRILOG 2 – Ocjenjivački listić za senzorsku analizu uzoraka Slavenskog kulena

### OCJENJIVANJE KAKVOĆE KULENA OCJENJIVAČKI LISTIĆ

UZORAK – šifra: \_\_\_\_\_

OCJENJIVAČ – šifra: \_\_\_\_\_

POTPIS OCJENJIVAČA: \_\_\_\_\_

<b>IZGLED VANJSKE POVRŠINE</b> (max. 10 bodova)	<b>ODUZETI BODOVI</b>	<b>OCJENA</b> 10 – ukupno oduzeti bodovi =
<i>odstupanje:</i>		
- jako naborani ovitak		
- ovitak se odvaja od nadjeva		
- mrlje (uključivo od masti i paprike) i oštećenja na ovitku		
- pretjerano pljesniv ovitak ili postoje tragovi plijesni		
- crni ovitak zbog prekomjernog ili neadekvatnog dimljenja		
- neadekvatni ovitak ili povež za kulen		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
<b>TEKSTURA</b> (max. 20 bodova)	<b>ODUZETI BODOVI</b>	<b>OCJENA</b> 20 – ukupno oduzeti bodovi =
<i>odstupanje:</i>		
- mekana, tjestasta, neelastična		
- previše tvrda (presušen kulen)		
- očito odmrznut		
- drobi se, mrvlji se, nije pogodan za narezivanje		
- rub tvrd, a sredina mekana		
- druga odstupanja (npr. pretjerano gumenasta)		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
<b>IZGLED PRESJEKA</b> (max. 30 bodova)	<b>ODUZETI BODOVI</b>	<b>OCJENA</b> 30 – ukupno oduzeti bodovi =
<i>odstupanje:</i>		
- izražen tamni rub		
- pukotine i šupljine		
- nesvojstvena boja ili nesvojstvena kombinacije više boja		
- nehomogeniziran, loše raspoređen sastav nadjeva		
- pretjerano uočljivo masno tkivo		
- pretjerano uočljivo vezivno tkivo		
- crne ili tamnosmeđe točke u presjeku		
- druga odstupanja od uobičajenog izgleda presjeka		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
<b>OKUS</b> (max. 25 bodova)	<b>ODUZETI BODOVI</b>	<b>OCJENA</b> 25 – ukupno oduzeti bodovi =
<i>odstupanje:</i>		
- previše kisel		
- izražena užeglost		
- gorak		
- po plijesni		
- jednostrano prezačinjen		
- nedovoljno začinjen		
- druga odstupanja od svojstvenog okusa (npr. intenzivan okus papra, nesvojstvenih začina i drugih dodataka i dr.)		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
<b>MIRIS</b> (max. 15 bodova)	<b>ODUZETI BODOVI</b>	<b>OCJENA</b> 15 – ukupno oduzeti bodovi =
<i>odstupanje:</i>		
- po užeglosti		
- po plijesni		
- na kvarenje		
- preintenzivan miris po dimu		
- druga odstupanja od svojstvenog mirisa (npr. po gumi)		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
<b>UKUPNA OCJENA</b> (max. 100 bodova)	<b>UKUPNO ODUZETI BODOVI</b>	<b>UKUPAN BROJ BODOVA</b>

### 8.3. PRILOG 3 – Ocjenjivački listić za senzorsku analizu uzoraka Slavonske kobasice

#### OCJENJIVANJE KAKVOĆE SLAVONSKE KOBASICE OCJENJIVAČKI LISTIĆ

UZORAK - šifra: \_\_\_\_\_

Ocjenjivač - šifra: \_\_\_\_\_

Potpis ocjenjivača \_\_\_\_\_

IZGLED VANJSKE POVRŠINE (max. 10 bodova)	ODUZETI BODOVI	OCJENA (10 – ukupno oduzeti bodovi)
<i>odstupanje:</i>		
- jako naborani ovitak		
- ovitak se odvaja od nadjeva		
- crni ovitak zbog prekomjernog dimljenja		
- ovitak nije od svinjskog tankog crijeva		
- ovitak pljesniv		
- mrlje, oštećenja i druga odstupanja		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
TEKSTURA (max. 20 bodova)	ODUZETI BODOVI	OCJENA (20 – ukupno oduzeti bodovi)
<i>odstupanje:</i>		
- previše mekana, tjestasta, neelastična		
- previše tvrda (presušena)		
- drobi se, mrvi se i nije pogodno za narezivanje		
- druga odstupanja (napr. pretjerano gumenasta)		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
IZGLED PRESJEKA (max. 30 bodova)	ODUZETI BODOVI	OCJENA (30 – ukupno oduzeti bodovi)
<i>odstupanje:</i>		
- izražen tamni rub		
- sredina ima boju sirovog nadjeva		
- nesvojstvena boja ili kombinacija više nesvojstvenih boja		
- komadići mesa i slanine nisu ravnomjerno raspoređeni		
- pretjerano uočljivo masno tkivo		
- pretjerano uočljivo vezivno tkivo		
- pukotine i šupljine		
- druga odstupanja od uobičajenog izgleda presjeka		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
OKUS (max. 25 bodova)	ODUZETI BODOVI	OCJENA (25 – ukupno oduzeti bodovi)
<i>odstupanje:</i>		
- previše kisela		
- užegla		
- gorka		
- okus po plijesni		
- jednostrano prezačinjena (preljuta i/ili preslana)		
- nije dovoljno ljuta i/ili slana		
- nema svojstven okus (okus odstupa zbog nestandardnih dodataka ili grešaka u tehnologiji proizvodnje)		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
MIRIS (max. 15 bodova)	ODUZETI BODOVI	OCJENA (15 – ukupno oduzeti bodovi)
<i>odstupanje:</i>		
- po užeglosti		
- po plijesni		
- na kvarenje		
- ostali nesvojstveni mirisi		
<b>Ukupno oduzeti bodovi:</b>		
UKUPNA OCJENA (max. 100 bodova)	UKUPNO ODUZETI BODOVI	UKUPNA OCJENA