MIKROBNA STABILNOST KOBASIČARSKIH PROIZVODA SA SMANJENIM UDJELOM SOLI

Zemljak, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:772346

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Lidija Zemljak

MIKROBNA STABILNOST KOBASIČARSKIH PROIZVODA SA SMANJENIM UDJELOM SOLI

Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Lidija Zemljak

MIKROBNA STABILNOST KOBASIČARSKIH PROIZVODA SA SMANJENIM UDJELOM SOLI

Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

Mentor: Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Specijalistički rad obranjen je dana _____ na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane
pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____

Rad ima _____ stranice

PREDGOVOR

Kao dio svoje nutritivne strategije, Podravka je krenula s izradom receptura kobasičarskih proizvoda sa smanjenim udjelom soli i uvođenjem zamjene za sol. Kao zamjena za kuhinjsku sol koristi se proizvod koji je razvio Podravkin tim stručnjaka – Supisol®. Supisol sadrži 35% manje natrija u odnosu na kuhinjsku sol. Izradom ovog rada, željela sam naglasiti važnost mikrobioloških ispitivanja koja se provode u laboratorijima Kontrole kvalitete u Podravki. Sve mikrobiološke analize koje se provode, neophodne su u ocjeni zdravstvene ispravnosti Podravkinih proizvoda. Svojim radom, Mikrobiološki laboratorij mesnih proizvoda, u svom segmentu, također daje svoj doprinos Strateškom planu za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015.-2019.

Željela bih zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Lidiji Kozačinski, na stručnim savjetima, smjernicama i strpljenju koje mi je pružala kod izrade ovog rada.

Također zahvaljujem Podravki d.d. što mi je omogućila školovanje na poslijediplomskom studiju.

Posebno želim zahvaliti svojoj direktorici, mr. sc. Vesni Popijač koja me na samom početku podržala u mojoj želji da nastavim školovanje i čiju podršku i razumijevanje sam imala tijekom cijelog studija.

Zahvaljujem i kolegama sa kojima svakodnevno surađujem. Svima iz moje službe Kontrola kvalitete, te iz Razvoja i Proizvodnje koji su mi pomogli u odabiru teme završnog rada i njegovoj realizaciji, a najviše kolegici i prijateljici Petri koja mi je bila podrška tijekom cijelog poslijediplomskog studija. Posebno zahvaljujem tehničarima u mikrobiološkom laboratoriju koji sudjelovali u provedbi svih analiza koje su bile potrebne za izradu ovog rada.

Najviše zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji bez čije podrške ne bih mogla završiti ovaj studij. Posebno roditeljima koji su bili uz mene kao i kada sam prije 20 godina upisala prvu godinu Veterinarskog fakulteta. Mojoj najboljoj prijateljici Maji, koja je moja podrška već 30 godina i već odavno moja obitelj. Na kraju, najveća zahvala mojoj djeci, Niki i Filipu, koji su u svemu pa tako i u mom obrazovanju, uvijek moja najveća inspiracija.

Autorica

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog rada je validacija roka trajnosti proizvoda sa smanjenim udjelom soli i korištenjem zamjene za sol, s obzirom na njegovu mikrobiološku stabilnost.

Materijal i metode: Mikrobiološke analize su provedene na Kranjskoj kobasici koja je predstavnik skupine polutrajnih kobasičarskih proizvoda. Kontrolni uzorak je proizvod proizveden prema dosadašnjoj „klasičnoj" recepturi. Deset pakovina kontrolnog uzorka je analizirano odmah nakon vakuumiranja, zatim sredinom deklariranog roka trajanja (35. dan u roku), na dan isteka roka (45 dana od datuma proizvodnje) i 65. dan od datuma proizvodnje. Svi navedeni uzorci su analizirani i dva dana nakon otvaranja pakovina i čuvanja u hladnjaku na propisanoj temperaturi. Na taj se način validira i način konzumacije proizvoda deklariran na pakovini (nakon otvaranja upotrijebiti u roku 2 dana). Na isti način je ispitana i Kranjska kobasica sa smanjenim udjelom soli. Istraživanjem je obuhvaćena pretraga na sljedeće mikroorganizme: aerobne mezofilne bakterije, *Enterobacteriaceae,* koagulaza pozitivne stafilokoke/*S. aureus, Salmonella* spp.*,* bakteriju *Listeria monocytogenes* i sulfitreducirajuće klostridije. U analizi navedenih parametara korištena je ISO metodologija. Osim navedenog, provedena je organoleptička pretraga uzoraka te kemijska analiza količine natrija.

Rezultati: Ispitivanje mikrobne stabilnosti proizvoda sa smanjenim udjelom soli, provedeno je kroz 140 mikrobioloških analiza. U uzorcima sa smanjenim udjelom soli te u kontrolnim uzorcima nisu izolirane bakterije roda *Salmonella, L. monocytogenes*, niti je zabilježen porast ostalih pretraživanih mikroorganizama, osim aerobnih mezofilnih bakterija. Prema dobivenim vrijednostima aerobnih mezofilnih bakterija, tri uzorka (4%) proizvedena prema „klasičnoj" recepturi daju prihvatljiv rezultat, dok se kod pet uzoraka (7%) sa smanjenim udjelom soli rezultati analize tumače prihvatljivima prema odredbama propisa. Analiza svih preostalih uzoraka je zadovoljavajuća te nije dobiven niti jedan nezadovoljavajući rezultat.

Zaključak: Svi analizirani uzorci su zdravstveno ispravni tijekom cijelog roka trajnosti proizvoda. Smanjeni udio soli u proizvodu i korištenje zamjene za sol (Supisol®), nisu utjecali na mikrobnu stabilnost proizvoda. Odsustvo patogenih mikroorganizama u analiziranim uzorcima potvrda je uređenog sustava sigurnosti hrane, poštivanja HACCP principa te kontinuiranog provođenja dobre proizvođačke i dobre higijenske prakse.

Ključne riječi: mikrobna stabilnost, kobasičarski proizvodi, smanjeni udio soli, zamjena za sol, aerobne mezofilne bakterije.

SUMMARY

MICROBIAL STABILITY OF SAUSAGE PRODUCTS WITH REDUCED SALT CONTENT

Objectives: The aim of this paper is to validate the shelf life of products with reduced salt content and usage of salt substitution, given its microbiological stability.

Material and Metods: Microbiological analyzes were carried out on Kranjska Sausage, which are representative of a group of semi-finished sausage products. The control sample is the product produced according to the previous "classical" recipe. Ten packages of the control sample were analyzed immediately after vacuuming, after that in the middle of the declared shelf-life (35th day within the term), on the day of the expiration date (45 days from the date of production) and 65th day from the date of production. All of the above samples were analyzed two days after opening the packages and storing in the refrigerator at the prescribed temperature. In this way, the manner of consumption of the products declared on the packaging is validated (after opening it should be used within 2 days). Examination of Kranjska sausage with reduced salt content was done in the same way. The study included the search for the following microorganisms: aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, coagulase positive staphylococci / *S. aureus, Salmonella* spp., bacterium *Listeria monocytogenes* and sulphite-reducing clostridia. In the analysis of these parameters, methodology that was used was ISO methodology. In addition, organoleptic sampling was performed as well as chemical analysis of the amount of sodium.

Results: The study of microbial stability of products with reduced salt content was carried out through 140 microbiological analyzes. *Salmonella, L. monocytogenes*, and other microorganisms other than aerobic mesophilic bacteria have not been recorded in samples with reduced salt content and in control samples. According to the obtained values of aerobic mesophilic bacteria, three samples (4%) produced according to the "classical" recipe yield an acceptable result, while in five samples (7%) with a reduced salt content, the results of the analysis are interpreted as acceptable according to the provisions of the regulations. The analysis of all remaining samples is satisfactory and no unsatisfactory result has been obtained.

Conclusion: All analyzed samples are health-correct throughout the product's durability period. The reduced salt content in the product and the use of salt substitutes (Supisol®) did not affect the microbial stability of the product. The absence of pathogenic microorganisms in the analyzed samples confirms a well-established food safety system, adherence to the HACCP principle and the continuous implementation of good manufacturing and good hygienic practices.

Keywords: microbial stability, sausage products, reduced salt content, salt substitution, aerobic mesophilic bacteria

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
1.1. Značenje kuhinjske soli 1
1.2. Korištenje kuhinjske soli u industriji 3
1.3. Smanjenje udjela soli u mesnim proizvodima 4
1.4. Deklariranje soli na prehrambenim proizvodima 5
1.5. Mikrobiološki parametri u kobasičarskim proizvodima 6
1.6. Polutrajne kobasice 12
2. CILJ I HIPOTEZA RADA 14
3. MATERIJAL I METODE RADA 15
3.1. Materijal i plan rada 15
3.2. Organoleptička pretraga 16
3.3. Mikrobiološka pretraga 18
3.4. Kemijska pretraga 32
3.5. Statistička obrada rezultata 33
4. REZULTATI 34
4.1. Organoleptička pretraga 34
4.2. Mikrobiološka pretraga 35
4.2.1. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli 35
4.2.2. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka - Kranjska kobasica proizvedena prema „klasičnoj“ recepturi 44
4.3. Kemijska pretraga 55
5. RASPRAVA 56
6. ZAKLJUČAK 62
7. LITERATURA 63
8. ŽIVOTOPIS 67

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Značenje kuhinjske soli

Kuhinjska sol je spoj natrija i klora (NaCl) i potrebna je za normalan rad organizma. Sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, prijenosu električnih impulsa u živcima i mišićima te apsorpciji hranjivih tvari. Sastoji se od 40 % natrija i 60 % klorida.

Natrij je esencijalni makroelement, potreban svim živim organizmima. Ioni natrija su glavni elektroliti u organizmu koji imaju ključnu ulogu u održavanju fizioloških procesa. U organizmu su sastojak izvantjelesne tekućine gdje ioni imaju važnu ulogu u održavanju osmotske ravnoteže. Prijenos natrijevih i kalijevih iona kroz staničnu membranu regulira ionospecifična adenozin-trifosfatazna pumpa koja njihov omjer u organizmu održava stalnim.

Količinu natrija u organizmu reguliraju bubrezi. Pomanjkanje iona Na+ u krvnoj plazmi (hiponatrijemija) dovodi do dehidracije, acidoze i atrofije tkiva te može dovesti organizam u stanje opasno za život. Kod povećanog unosa natrija, kako bi održali ravnotežu, bubrezi povisuju krvni tlak, što dovodi do nastanka arterijske hipertenzije odnosno povišenog krvnog tlaka. Iz tog razloga, prekomjeran unos kuhinjske soli povećava rizik od srčanih, moždanih i bubrežnih bolesti (ANON., 2014 b). Uobičajen unos soli, što znači i unosi natrija, visok je u razvijenim zemljama i premašuje količine potrebne za normalno funkcioniranje organizma. KAIĆ-RAK i sur. (2009.) navode da u prosjeku unosimo oko 200 % više soli u odnosu na preporučene dnevne količine. Procjenjuje se da je u Hrvatskoj prosječan dnevni unos soli od 12-16 g, dok je preporuka Svjetske zdravstvene organizacije <5 grama.

Prekomjeran unos kuhinjske soli jedan je od najvažnijih čimbenika koji značajno narušava ljudsko zdravlje. Spoznaja da je sol glavni uzročnik povišenog krvnog tlaka, temelji se na šest skupina dokaza; epidemiološkoj, migracijskoj, interventnoj, liječenju, pokusima na životinjama te genetičkim studijama (MacGREGOR, 2010.). Isti autor navodi da sve upućuje na zaključak da je uzimanje soli važno u regulaciji krvnog tlaka i da bi smanjeni unos u organizam doveo do smanjivanja tlaka u populaciji, bez obzira liječe li se pacijenti ili ne. Prekomjeran unos kuhinjske soli pridonosi i oštećenju ciljnih organa. Uočena je povezanost s koronarnom bolesti, hipertrofijom lijeve klijetke, moždanim udarom i mikroalbuminurijom; čimbenik je rizika za osteoporozu, nefrolitijazu, karcinom želuca i nazofarinksa (ANON., 2014 a). Korist smanjenog unosa kuhinjske soli nije samo snižavanje arterijskog tlaka i smanjivanje kardiovaskularnih bolesti nego i u poboljšanju cjelokupnog zdravlja. Prepreka smanjivanju unosa kuhinjske soli,

temelji se na činjenici da 75-80% kuhinjske soli unosimo bez znanja, putem tzv. skrivenih izvora. To su najvećim djelom polugotovi i gotovi prehrambeni proizvodi dok manji udio kuhinjske soli dodajemo u hranu sami (REINER i JELAKOVIĆ, 2010.). U tako pripremljenoj hrani koja je bogata natrijem, na prvom mjestu se ističu kruh i pekarski proizvodi, zatim mesni proizvodi, različiti umaci, sušena riba, razni sirevi, brza hrana, konzervirano povrće, gotove juhe i dodaci hrani (DOKO JELINIĆ i sur., 2010.). KAIĆ-RAK i sur. (2009.) navode da su industrijski pripremljeni proizvodi i hrana pripremljena u restoranima izvor 77 % natrija u prehrani, čemu se pridodaje 12 % prirodnog natrija u hrani, 6 % kod dosoljavanja obroka, te 5 % natrija pri pripremi obroka kod kuće.

U Velikoj Britaniji je prije desetak godina pokrenut nacionalni program Consenzus Action on Salt and Health - CASH. CASH ističe problem konzumiranja "skrivenih soli u prehrani" putem polugotove ili gotove hrane. Pojedinac nema utjecaja na ovu kategoriju hrane, osim da ju prestane konzumirati. Program, isto tako, ističe proizvode s najvećim dodatkom soli i poziva potrošače na njihov bojkot, a promovira proizvode sa manjom količinom soli. Velika Britanija je suradnjom sa prehrambenom industrijom, od 2005. do 2012. godine uspjela smanjiti dnevni unos kuhinjske soli s 9,5 na 8,1 gram, što je rezultiralo sa 8500 manje smrti godišnje. CASH je do 2005. g. prerastao u svjetski pokret (World Action on Salt and Health - WASH). WASH apelira na multinacionalne kompanije da smanje količinu soli u proizvodima sukladno preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Na taj bi se način spasili milijuni života širom svijeta (akcija iz 2007.g.).

U Hrvatskoj je Inicijativa za smanjenje kuhinjske soli u prehrani RH započela 2006. godine Deklaracijom o važnosti smanjivanja prekomjernog unosa kuhinjske soli. Spomenutu Deklaraciju je predstavilo Hrvatsko društvo za hipertenziju na Prvom Hrvatskom kongresu o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem. Deklaracija naglašava važnost započinjanja nacionalne kampanje za smanjenje konzumacije kuhinjske soli. Na Kongresu Hrvatskog društva za aterosklerozu 2007. godine predstavljena je hrvatska inicijativa i Nacionalna kampanja za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli putem prehrane - CRASH (Croatian Action on Salt and Health). 2014. godine izrađen je Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015. - 2019. koji za cilj ima postupno smanjenje dnevnog unosa kuhinjske soli u populaciji RH za prosječno 4 % godišnje.

Mesne prerađevine su ovim planom definirane kao jedna od prioritetnih skupina hrane u kojoj je potrebno provoditi smanjenje udjela soli. Jedan od postavljenih ciljeva je i razvoj novih receptura u prehrambenoj industriji.

U odnosu na navedeno, kompanija Podravka d.d. razvila je Nutritivnu strategiju 2014.- 2024.

koja predstavlja sustav upravljanja nutritivnom kvalitetom asortimana i brandova. Strategija ima za cilj potrošaču pružiti proizvode koji su u skladu s njegovim potrebama, koji će im pomoći unaprijediti prehranu te koji će biti u skladu s nacionalnim i globalnim zdravstvenim smjernicama. Kao dio svoje Nutritivne strategije, Podravka je krenula s izradom receptura svojih kobasičarskih proizvoda sa smanjenim udjelom soli i uvođenjem zamjenice za sol. Kao zamjena za kuhinjsku sol predviđa se korištenje proizvoda koji je razvio Podravkin tim stručnjaka – Supisol. Supisol ima 35 % manje natrija u odnosu na kuhinjsku sol i sastoji se od kombinacije triju različitih soli; natrijevog klorida, kalijevog klorida i kalij-magnezij citrata.

1.2. Korištenje kuhinjske soli u industriji

Industrijska proizvodnja hrane je nužno povezana s upotrebom soli koja je polifunkcionalni dodatak. Oblikuje okus proizvoda, pojačivač je okusa (arome). Utječe i na teksturu proizvoda (mekoća, sočnost). Konzervans je i djeluje na sigurnost proizvoda. Soljenjem namirnica, smanjuje se sadržaj vode, što nepovoljno utječe na rast i razmnožavanje najvećeg broja bakterija te tako utječe na mikrobiološku ispravnost proizvoda. Kada je koncentracija soli iznad 10%, usporen je razvoj većine mikroorganizama. Iznimka su halofilni mikroorganizmi koji rastu u okolišu sa koncentracijom soli 15-20 % (JELINIĆ i sur., 2010.).

JELINIĆ i sur. (2010.) navode da osim kuhinjske postoje i druge vrste soli koje sadrže natrij. Primjer je nitritna sol koja može biti kombinacija natrijevog klorida i nitrita ili mješavina natrijevog klorida s natrijevim i kalijevim nitritom. Kod salamurenja koje se koristi u proizvodnji suhomesnatih i kobasičarskih proizvoda i proizvodnji mesnih konzervi kako bi se poboljšala održivost proizvoda i stabilnost boje mišićnog dijela, koriste se smjese soli koje sadrže kuhinjsku sol, nitrate, nitrite, šećere, začine i druge dopuštene sastojke. U industriji se soljenje i konzerviranje namirnica isključivo kuhinjskom soli može primjenjivati u proizvodnji slanine i pršuta.

ŽLENDER (2009.) navodi da kuhinjska sol povećava ekonomičnost proizvodnje jer doprinosi sposobnosti vezanja vode odnosno smanjuje gubitak mase proizvoda. Upravo je to osnovna tehnološka funkcija soli u preradi mesa, topljenje funkcionalnih miofibrilarnih bjelančevina mesa i povećavanje sposobnosti mesa da veže vodu. To smanjuje gubitak mase tijekom procesa toplinske obrade i poboljšava mekoću i sočnost proizvoda. Iz navedenog proizlazi da je sol nužna za oblikovanje teksture mesnih proizvoda. Sa stajališta kemijskog kvarenja, NaCl može ubrzati oksidaciju masti i pojavu užegle arome ako se se upotrebljava zajedno s nitritnom soli.

Zamjena kuhinjske soli sa kalijevim ili magnezijevim kloridom smanjuje katalitički utjecaj soli na oksidaciju.

REDDY i MARTH (1991.) navode da je u preradi mesa, uz samo meso, sol najčešće korišteni sastojak. Uz već navedena svojstva, sol zajedno sa nitritima inhibira rast *C. botulinum*.

1.3. Smanjenje udjela soli u mesnim proizvodima

Smanjenjem udjela soli bez dodatka drugih sredstava s konzervirajućim učinkom, smanjuje se trajnost proizvoda. Razvoj mesnih proizvoda s niskim sadržajem soli nije jednostavan, jer osim na stabilnost i tehnološka svojstva, sol utječe i na aromu proizvoda koju potrošači prepoznaju i očekuju. U preradi mesa je moguće smanjiti udio dodatne soli, zamijeniti kuhinjsku sol drugim kloridnim solima (KCl, $MgCl_2$), zamijeniti dio nekloridnim solima (fosfati), promijeniti tehnološki proces, poboljšati svojstva soli (veličina i oblik kristala) ili pak kombinirati neke od navedenih pristupa (ŽLENDER, 2009). Zamjene za sol su kalcijev klorid, magnezijev klorid, magnezijev sulfat, glutaminska kiselina, kalijev glutaminat, kalijev klorid.

Kalijev klorid ili magnezijev klorid mogu pojačati gorak okus proizvoda, što je manje izraženo kod njihove djelomične zamjene (25 do 45 %). Fosfati su korisni jer kod mesa poboljšavaju sposobnost vezanja vode. Funkcionalne bjelančevine, prehrambena vlakna, škrobovi i neke druge nadomjesne komponente u proizvodima s malo soli mogu biti sredstva za vezanje.

Pojačivači arome i maskirna sredstva imaju zadaću smanjiti natrij, a opet očuvati slanost u proizvodu, poboljšati i osigurati skladnost arome. Neke od komponenti koje se koriste u navedenu svrhu su ekstrakt kvasca, laktati, mononatrijev glutaminat, nukleotidi, peptidi, aminokiseline. Pojačivači okusa aktiviraju receptore u ustima i ždrijelu i tako kompenziraju smanjenje soli. Kombinacije aminokiselina mogu nadomjestiti sol u pogledu arome, a imaju i antimikrobno i antioksidativno djelovanje. Laktati pomažu očuvati slan okus. Nukleotidi mogu spriječiti gorak okus.

Visok sadržaj natrija u mesnim proizvodima se može smanjiti, ali su te mogućnosti u pojedinim grupama proizvoda različite (ŽLENDER, 2009). Autor navodi da su istraživanja pokazala mogućnost smanjenja udjela soli kod pasteriziranih, kuhanih kobasica. U praksi znači da im je dovoljan dodatak 1,5 % soli, dok je kod fermentiranih kobasica potrebna veća koncentracija soli zbog nižeg sadržaja vode. U suhim kobasicama je za mikrobiološku stabilnost i kvalitetu proizvoda donja granica dodane soli 2,5 %. Kod sušenog mesa smanjenje soli na 4 % nije moguće bez promjene u tehnologiji proizvodnje. Iz svega navedenog, može se zaključiti da je

smanjenje soli u mesnim proizvodima moguće, ali su mogućnosti različite ovisno o skupini proizvoda.

DESMOND (2006.) u svom radu navodi da postoje tri glavna pristupa za smanjenje soli u svim kategorijama prerađene hrane. Prvi i najrašireniji je korištenje zamjena za soli, u prvom redu kalij klorida. Drugi je korištenje pojačivača okusa koji sami po sebi nisu slani, ali pojačavaju slanost proizvoda kada se koriste u kombinaciji sa soli. Posljednji, treći način je promjena fizičkog oblika soli na način da slanost bude biološki jači okus pa će biti potrebna manja količina soli. Pahuljasti oblik soli se pokazao učinkoviti u odnosu na zrnati oblik, u smislu boljeg povezivanja sastojaka, povećavanja pH te pojačavanja otapanja bjelančevina. Isti autor navodi da je pahuljasti oblik soli lakše topljiv, što može biti ključno kod proizvoda gdje se ne dodaje voda, primjerice sušeni proizvodi.

1.4. Deklariranje soli na prehrambenim proizvodima

Neke prehrambene industrije još uvijek pružaju otpor prema smanjenom dodavanju soli u proizvode. No Europska regulativa pokušava i načinom deklariranja promovirati upotrebu manje količine soli kroz odgovarajuće nutricionističke informacije na proizvodu, a javno zdravstvene kampanje trebaju poticati potrošače da koriste proizvode s manjim udjelom soli (DOKO JELINIĆ i sur., 2010.).

Plan i program Europske Unije sadrži odredbe o smanjenju unosa kuhinjske soli i obavezu deklariranja količine na svim prehrambenim proizvodima. Od 13.12.2016., a sukladno odredbama Uredbe EU br. 1169/2011 Europskog Parlamenta i Vijeća, od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani (ANON., 2011 a.), deklariranje soli postaje obavezno, odnosno obvezna nutritivna deklaracija između ostalog mora sadržavati i količinu soli. Sol je ekvivalent sadržaja soli izračunan pomoću jednadžbe:

$$\text{sol} = \text{natrij} \times 2{,}5.$$

Uredba (EZ) br. 1924/2006 Europskog Parlamenta i Vijeća od 20. prosinca 2006. o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani (ANON., 2006.) propisuje i smanjeni sadržaj određene hranjive tvari. Tvrdnja da je sadržaj jedne hranjive tvari ili većeg broja njih smanjen, kao i svaka tvrdnja za koju je vjerojatno da ima isto značenje za potrošača, može se stavljati samo ako to smanjenje sadržaja iznosi najmanje 30 % u odnosu na slične proizvode, osim za mikronutrijente, kod kojih je prihvatljiva i razlika od 10 % u referentnim vrijednostima utvrđenim u Direktivi 90/496/EEZ, te za natrij ili istovjetnu vrijednosti soli, kod

kojih je prihvatljiva razlika od 25 %.

1.5. Mikrobiološki parametri u kobasičarskim proizvodima

Sukladno odredbama Uredbe (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (ANON., 2005), mikrobiološki parametri koji se pretražuju u uzorcima kobasičarskih proizvoda su *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp.. Navedene bakterije su kriteriji sigurnosti hrane za ovu kategoriju proizvoda i obavezni su parametri zdravstvene ispravnosti.

Preporučeni mikrobiološki parametri koji se pretražuju u kobasičarskim proizvodima, sukladno kriterijima Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (ANON., 2011.) a čija provedba je osigurana Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN br. 81/13; ANON., 2013.) su: aerobne mezofilne bakterije, *Enterobacteriaceae*, sulfitreducirajuće klostridije i koagulaza pozitivni stafilokoki / *S. aureus.*

1.5.1. Bakterija *Listeria monocytogenes*

Bakterija *L. monocytogenes* je uzročnik listerioze, zarazne bolesti brojnih vrsta životinja i ljudi. Utvrđena je u 37 sisavaca, 17 vrsta ptica, u ribama i školjkašima (MARINCULIĆ i sur. 2009.) Od domaćih životinja obolijevaju najčešće ovce i goveda, a rjeđe koze, svinje i perad. Pojavljuje se sporadično, u obliku encefalitisa, pobačaja i septikemije. Može uzrokovati i mastitis. Nalazi se u tlu, vodi i na površini biljaka pa je njime često onečišćena hrana biljnog ali i životinjskog podrijetla. U vanjskoj sredini može preživjeti od nekoliko tjedana do više godina, ovisno o materijalu u kojem se nalazi, temperaturi i svim ostalim utjecajima. Vrlo dobro podnosi smrzavanje i soljenje. *L. monocytogenes* se prema svojoj otpornosti na kuhanje, hlađenje i sušenje ubraja među najotpornije nesporogene bakterije. Njena osobitost je da se umnaža i na temperaturi hladnjaka. NAGLIĆ i sur. (2005.) navode da u vlažnoj sredini na temperaturi od 55 °C ugiba za 40 minuta, a pri 85 °C za manje od 20 minuta. Osjetljiva je na aktivni klor, fenol i kvaterne amonijeve spojeve.

Listerioza je zoonoza od koje najčešće obolijevaju djeca, trudnice i imunodeficijentne osobe. Radi se o uvjetovanoj zaraznoj bolesti čijem razvoju pogoduju razni čimbenici koji smanjuju otpornost organizma. Infekcija rjeđe nastaje izravno, od oboljelih životinja, češće se radi o infekciji onečišćenom hranom. Bolest se može javiti i u obliku epidemija. Najveća zabilježena

epidemija je bila 1992. godine u Francuskoj, kada je od 279 oboljelih ljudi 86 umrlo (MARINCULIĆ i sur. 2009.). Nije poznata infekcijska doza, no prema dosadašnjim poznatim slučajevima, pretpostavlja se da 1000 bakterijskih stanica može uzrokovati bolest. U rizičnu hranu se ubrajaju sirovo i nedovoljno pasterizirano mlijeko, sirevi, sladoled, sirovo povrće, fermentirane kobasice, sirova i nedovoljno toplinski obrađena piletina, općenito, sve vrste sirovog mesa te sirova i dimljena riba (MARINCULIĆ i sur. 2009.).

1.5.2. *Salmonella* spp.

Salmonele su uzročnici otrovanja hranom. Spadaju u važne i vrlo učestale zoonoze raširene po cijelom svijetu. Gotovo sve salmonele koje su značajne za humanu i veterinarsku medicinu pripadaju podvrsti *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Prema antigenim svojstvima unutar vrste *Salmonela enterica* otkriveno je više od 2400 serovarova ove bakterije. 69% izolata iz čovjeka pripada serovarovima *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhymurium. Navedena dva serovara, zajedno sa još između 1500 i 2000 različitih serovarova salmonela, uzrokuje netifusne salmoneloze, enterokolitise koji se najčešće prenose hranom. Salmoneloza peradi ima osobito veliko značenje u gospodarstvenom i zdravstvenom smislu. Osim jaja, rizična hrana je sirovo meso, perad, mlijeko i mliječni proizvodi, riba, škampi, žablji bataci, kremasti kolači, kakao i čokolada (MARINCULIĆ i sur. 2009.). Ljudi se mogu zaraziti i kontaktom s inficiranom osobom ili životinjom koja izlučuje salmonele.
Pokusima je ustanovljeno da se znakovi trovanja salmonelama javljaju nakon konzumacije 10^3 do 10^8 stanica uzročnika, no infekcijska doza nije jednaka za sve serovarove. Neki serovarovi uzrokuju tešku kliničku sliku, a drugi u ljudi ne uzrokuju nikakve kliničke znakove. Utjecaj na kliničku sliku bolesti imaju i dob, životinjska vrsta te zdravstveno stanje pacijenta. Osjetljive su sve dobne skupine, no simptomi su ozbiljniji kod djece, starijih i slabih osoba. Smatra se da kod enterokolitisa infekcijska doza iznosi 10^5 do 10^8 bakterijskih stanica. To ne mora značiti da će do oboljenja kod takve infekcije uvijek doći ili da neće doći ukoliko je infekcijska doza manja (10^2 ili 10^3 bakterija), navode NAGLIĆ i sur. (2005.).

1.5.3. Aerobne mezofilne bakterije

Broj aerobnih mezofilnih bakterija je jedan od najkorisnijih pokazatelja mikrobiološkog statusa proizvoda. Njihov povišen broj ukazuje na mogućnost skorog kvarenja proizvoda, pa se kod 10^6 do 10^8 cfu/g počinju uočavati i organoleptičke promjene (SAVIĆ i MILOSAVLJEVIĆ, 1983.). Iako nisu dovoljno pouzdane kao mjera opasnosti za zdravlje potrošača, mogu se

promatrati kao indikator higijenskog statusa. Ovo je parametar koji, između ostaloga, određuje trajnost proizvoda. Ne razlikuje vrstu prisutnih mikroorganizama niti ukazuje na prisustvo patogena. No kada je potrebno ustanoviti razlog kvarenja hrane, daje smjernice za interpretaciju dobivenih rezultata (ANON., 2016.). Kada je broj aerobnih mezofilnih bakterija veći od 10^6 cfu/g, najčešće prevladava jedan mikroorganizam, a kada je njihov broj manji od 10^6 cfu/g, najčešće je prisutna miješana mikroflora. SAVIĆ i MILOSAVLJEVIĆ (1983.) navode da bakterije mliječne kiseline (većinom lactobacilli i streptokoki) dovode do kvarenja hrane kada je njihov broj 10^9 cfu/g (stvaraju mliječnu kiselinu, dobro rastu na temperaturama hladnjaka, to je mikroflora koja prevladava u mesnim proizvodima). Gram negativne bakterije prevladavaju kada je broj aerobnih mezofilnih bakterija 10^7-10^8 cfu/g (najčešće *Pseudomonas* spp.).

Temperatura je jedan od najvažnijih vanjskih parametara koji utječu na rast i preživljavanje mikrobnih stanica (DURAKOVIĆ i sur., 2002.). Mikroorganizmi se prema temperaturama koje su optimalne za njihov rast i prema temperaturnom rasponu u kojem mogu rasti dijele na psihrofilne, mezofilne i termofilne. Psihrofilne bakterije najbolje rastu na nižim temperaturama (20 °C), mezofilne pri temperaturama 20 °C do 40 °C, dok je za termofilne bakterijske vrste optimalna temperatura iznad 40 °C. Također, neke vrste psihrofila mogu rasti i ispod 0 °C ukoliko im je na raspolaganju slobodna voda. Na temperaturi hladnjaka, uzrokuju kvarenje niza namirnica. Uz psihrofile, mezofili imaju najveće značenje u mikrobiologiji hrane. Mnogi predstavnici ove skupine mikroorganizama imaju optimalnu temperaturu rasta oko 37 °C, što je tjelesna temperatura ljudi, a kako su često ljudskog i životinjskog podrijetla ujedno čine skupinu velikog broj patogena koji se nalaze u hrani. Oni u pravilu rastu brže pri svojoj optimalnoj temperaturi, nego psihrotrofi.

DURAKOVIĆ i sur. (2002.) navode da je osmotski tlak još jedan vanjski parametar važan za rast, razmnožavanje i preživljavanje mikroorganizama u namirnicama. Osmotski tlak je proporcionalan koncentraciji otopljenih tvari. Otopine koje sadrže veliku koncentraciju soli izvlače vodu iz stanice, nastaje dehidracija i inhibicija metaboličkih reakcija. Mikroorganizmi koji sudjeluju u kvarenju hrane, većinom ne mogu rasti u otopini s visokim udjelom NaCl. Koncentracija soli iznad 10 % usporava razvoj najvećeg broja proteolitičkih i truležnih mikroorganizama. Samo manji broj mikroorganizama može rasti u mediju s povećanom koncentracijom soli (halofilni mikroorganizmi). Fakultativnim halofilima sol nije nužna za rast i razmnožavanje, za razliku od obligatnih (nefakultativnih) halofila koji za svoje funkcije trebaju sol. Halofilni mikroorganizmi se mogu podijeliti i na slabo, umjereno i izrazito halofilne, te na halotolerantne bakterije i plijesni. Osim halofilnih vrsta (*Halobacterium*) koje podnose koncentraciju 15-20 %, čak i 25 % soli, halotolerantne bakterije iz rodova

Micrococcus, Leuconostoc, Sarcina, Vibrio, Streptococcus, te mnoge vrste kvasaca i plijesni, pokazale su se kao najotpornije na sol. Većina halotolerantnih mikroorganizama je gram-pozitivna. Može rasti u mediju u kojem je koncentracija soli 5% ili veća, kao i u mediju gdje nema soli (NaCl). Radi se o bakterijama iz rodova *Bacillus*, *Micrococcus* i *Corynebacterium*. Može se reći da halofilnim bakterijama ne pogoduju temperature niže od 5 °C, a optimalna pH vrijednost je od 6-10.

Hrana s niskom koncentracijom NaCl, pohranjena na temperaturama do 4 °C, ne mora poticati rast patogenih mikroorganizama. Na povišenim temperaturama, od 4-12 °C, može doći do razvoja patogenih bakterija i tvorbe njihovih toksina. Većina bolesti koje uzrokuju halofilne bakterije, javlja se u toplijem dijelu godine. Oboljenjima pogoduje hrana koja nije dovoljno toplinski obrađena. Zdravlje ljudi najviše ugrožavaju halofilne bakterije iz rodova *Staphylococcus, Pseudomonas, Clostridium, Vibrio, Bacillus* te *Salmonella* (MIOKOVIĆ i ZDOLEC, 2004.).

1.5.4. *Enterobacteriaceae*

Porodica *Enterobacteriaceae* ima 51 rod i više od 100 bakterijskih vrsta. Uzročnici probavnih infekcija i intoksikacija su *Escherichia coli*, te pripadnici rodova: *Salmonella, Shigella, Yersinia, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Citrobacter, Aerobacter, Providencia* i *Serratia* (MARINCULIĆ i sur. 2009.). Enterobakterije su vrlo proširene u prirodi, ima ih u tlu, vodi, na biljkama, čak i u zraku (NAGLIĆ i sur. (2005.). Velik broj je dio normalne crijevne mikroflore. Izmetom dolaze u okoliš gdje mogu dugo opstati i razmnožavati se ako se nađu u povoljnim uvjetima. *E. coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp.* u vodi za piće i hrani biljnog ili životinjskog podrijetla, ukazuju na fekalno onečišćenje. Enterobakterije su osjetljive na povišene temperature, što znači da ne prežive ispravno provedenu pasterizaciju. Brzo ih inaktiviraju i uobičajeni dezinficijensi te sunčeve zrake i isušivanje.

Prema patogenosti ih možemo podijeliti u tri skupine. Prvoj skupini pripadaju primarni uzročnici bolesti koje se većinom uzrokuju upalu probavnog sustava (*E. coli*, salmonele, jersinije, šigele). U drugoj skupini su oportunističke, uvjetno patogene bakterije koje dovode do oboljenja uz pogodovne uvjete, kada je oslabljena otpornost organizma (*Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Serratia, Edwardsiella, Citrobacter* i *Morganella).* Treću skupinu enterobakterija čine vrste za koje nije dokazano da su patogene za životinje. Mogu se naći u uzorcima koji se mikrobiološki pretražuju kao kontaminanti (*Hafnia* i *Erwinia*).

1.5.5. Koagulaza - pozitivni stafilokoki / *Staphylococcus aureus*

Stafilokoki su bakterije vrlo raširene u prirodi a nalaze se na koži i sluznicama ljudi i životinja, uvjetno su patogene pa u određenim uvjetima mogu uzrokovati infekciju. Prisutne su u tlu, vodi, zraku, namirnicama, opremi koja se koristi u pripremi hrane, površinama u okolišu.

Patogenost vrste ili čak i pojedinih sojeva bakterije, ovisi o ekstracelularnim enzimima i toksinima koje tvore stafilokoki. U humanoj medicini, osobito je važan *S. aureus*. Stafilokokno otrovanje hranom je bolest koju ovaj uzročnik uzrokuje svojim enterotoksinima. Enterotoksine većinom tvore humani sojevi, a od životinjskih sojeva ih najčešće tvore ovčji i kozji sojevi (70-80 %), a rjeđe goveđi (0-15 %), (CVETNIĆ, 2013.). Enterotoksini koji uzrokuju alimentarne infekcije su termostabilni, otporni na temperaturu od 100 °C kroz 30 minuta, a ista temperatura će uzrokovati 90 %- tnu redukciju toksina nakon 135 minuta (MARINCULIĆ i sur., 2009.). Sam uzročnik je jedna od najotpornijih nesporogenih bakterija. CVETNIĆ (2013.) navodi kako je *S. aureus* otporan na sušenje i povišenu temperaturu te može preživjeti temperaturu od 60 do 65°C tijekom 30 minuta. Kao što je već spomenuto, ovaj mikroorganizam podnosi i visoke koncentracije soli, a i šećera što mu omogućava razmnožavanje u tako pripremljenoj hrani.

Hrana se najčešće onečisti uslijed nehigijenskog postupanja prilikom njene pripreme, no namirnice mogu biti i primarno onečišćene toksigenogenim stafilokokima, osobito mlijeko i ovčji sir. Smatra se da 10^5 stanica uzročnika i 1 gramu hrane može proizvesti količinu toksina koja je dovoljna za uzrokovanje intoksikacije.

Enterotoksini najčešće nastaju u hrani bogatoj ugljikohidratima ili bjelančevinama koja je pohranjena u neprikladnim uvjetima koji omogućavaju razmnožavanje stafilokoka. Hrana koja se najčešće povezuje s intoksikacijama nakon konzumacije je meso i mesni proizvodi te proizvodi koji sadrže jaja. Često su to i salate koje sadrže jaja, meso tune, krumpir, tjestenina, slastičarski i čokoladni proizvodi, mlijeko i mliječni proizvodi (MARINCULIĆ i sur. 2009.). Ljudi obično obole nakon konzumacije hrane koja nije bila dovoljno toplinski obrađena (60 °C ili više), ili nije bila čuvana na dovoljno niskoj temperaturi (nižoj od 7,2 °C). Najvažnije mjere za kontrolu i sprečavanje pojave bolesti su pažljivo rukovanje termički obrađenom hranom (najznačajniji izvor stafilokoka koji uzrokuju intoksikacije su ljudi koji rade s hranom), ispravno hlađenje ili brza konzumacija i pohrana svježe pripremljene hrane u hladnjaku.

1.5.6. Sulfitreducirajuće klostridije

Clostridium botulinum

Bakterija *C. botulinum* uzrokuje botulizam. To je u prvom redu alimentarna toksikoza do koje dolazi nakon konzumacije hrane u kojoj je uzročnik prethodno proizveo toksin koji uzrokuje paralizu skeletne muskulature. Ova bakterija je proširena po cijelom svijetu. Njeno prirodno obitavalište su tlo i voda gdje se ponaša kao saprofit. Nakon što sporulira, u obliku spore je vrlo otporna i u nekim materijalima može preživjeti više desetljeća. Temperatura od 121 °C uništi spore tek za 15-20 minuta. Otpornost prema temperaturi je u korelaciji s pH. Vlažna toplina od 100°C ubija spore pri pH 5,2 za 35 minuta, a pri višem pH od 8,8 za 150 minuta. Suha toplina od 180 °C ubija spore za 5 minuta. Kad je u vegetativnom obliku, uzročnik ugiba već za nekoliko minuta na 60 °C (NAGLIĆ i sur., 2005.).

Svaka hrana u kojoj se *C. botulinum* može razmnožavati i pri tome proizvoditi neurotoksin, a koja nije obrađena na način da se neurotoksin inaktivira, a spore uzročnika unište, može biti uzročnik botulizma. Kada je u hrani pH veći od 4,6 i prisutni su anaerobni uvjeti, moguć je rast ove bakterije i tvorba neurotoksina. MARINCULIĆ i sur. (2009.) navode da je neurotoksin dokazan u konzerviranom usoljenom povrću, tuni, pilećem mesu i jetri, jetrenoj pašteti, šunki, kobasicama, dimljenoj i usoljenoj ribi. Isti autori navode i da razmnožavanje *C. botulinum* sprečava čuvanje hrane na temperaturi nižoj od 3,3 °C najduže 10 dana te da se razmnožavanje uzročnika i tvorba toksina može spriječiti ako je pH namirnica niži od 5 ili je koncentracija soli (NaCl) veća od 3,5 %.

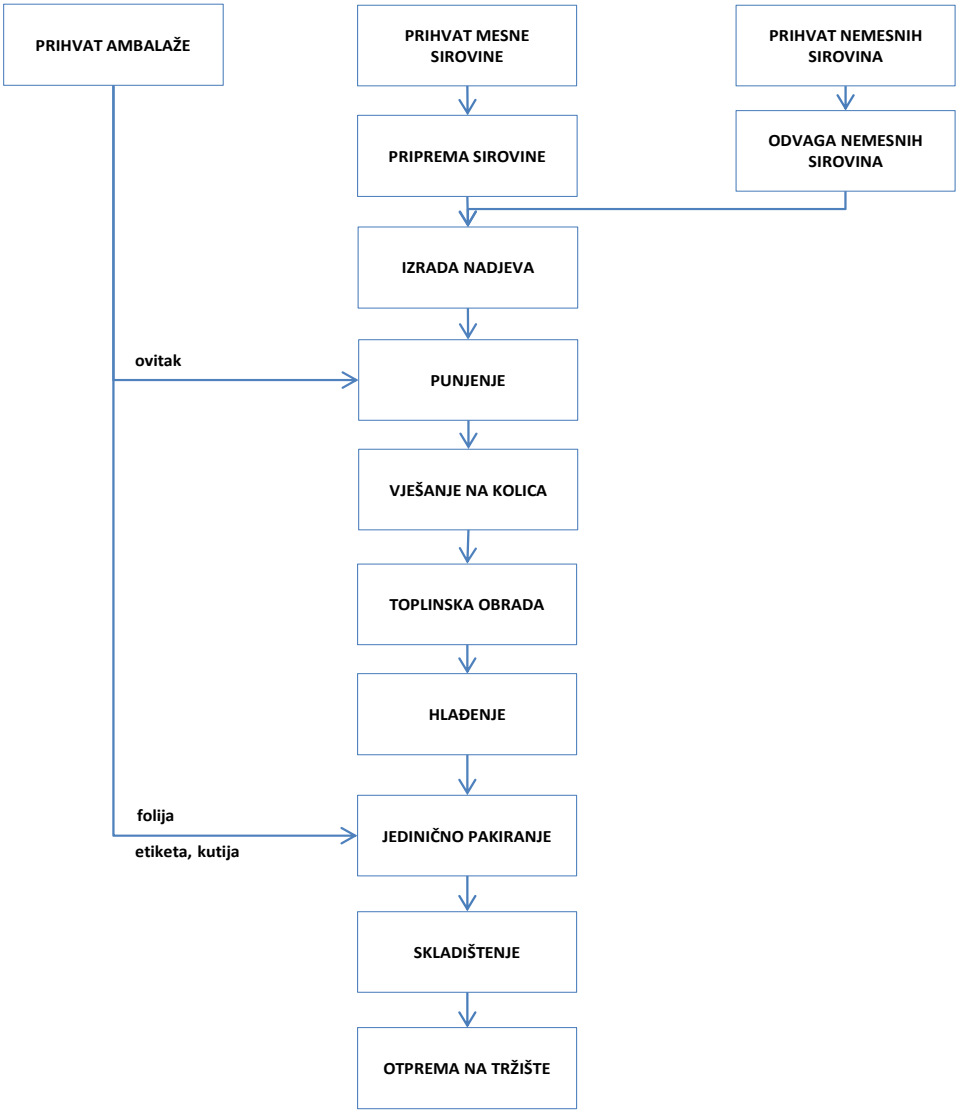
Clostridium perfringens

Clostridium perfringens je bakterija koja se nalazi posvuda u okolišu i u probavnom traktu čovjeka i mnogih životinja. Tvori velik broj toksina pa se prema vrsti toksina koje tvori, dijeli se u tipove označene slovima od A do E. U razvijenim zemljama, otrovanje tipom A bakterije *C. perfringens,* po učestalosti je odmah iza salmoneloza i stafilokoknog trovanja (MARINCULIĆ i sur., 2009.). *C. perfringens* uzrokuje nekrotični enteritis koji se javlja izizetni rijetko. Isti autori navode se simptomi bolesti očituju nakon konzumacije hrane s 10^8 vegetativnih stanica u gramu. Bolest nastane kada se u crijevu stvori dovoljno toksina. U Hrvatskoj se u prosjeku registriraju jedan do dvije epidemije tijekom godine, no vjeruje se da je stvarni broj veći. Ovoj alimentarnoj infekciji su izloženi ljudi koji se hrane u velikim menzama, odnosno mjestima gdje se hrana priprema nekoliko sati prije posluživanja. Uvijek je

potrebno voditi računa da se smanji vrijeme između pripreme i posluživanja hrane. Intoksikacija najčešće nastane jer su spore uzročnika sposobne preživjeti termičku obradu pa tijekom čuvanja hrane do njene konzumacije prokliju i počnu se umnažati. Najčešći izvor intoksikacije su meso, mesni proizvodi i mesni umaci, oko 25% sirovog mesa je kontaminirano klostridijama, što navode MARINCULIĆ i sur. (2009.). Vegetetivne oblike *C. perfringens* ubija temperatura od 59°C kroz 8 minuta, a spore temperatura od 99°C tijekom 32 minute.

1.6. Polutrajne kobasice

Polutrajne kobasice se proizvode od različitih vrsta mesa, masnog i vezivnog tkiva, iznutrica i strojno otkoštenog mesa i dodatnih sastojaka, različitog stupanja usitnjenosti nadjeva (ANON., 2002.). Količina bjelančevina mesa u proizvodima mora biti najmanje 6 %. Polutrajne kobasice se proizvode i stavljaju na tržište pod nazivima: kranjska, tirolska, šunkarica i dr.. Nadijevaju se u umjetne i prirodne ovitke. Podvrgavaju se termičkoj obradi, odnosno kuhanju u vodi ili pari, te nakon toga dimljenju. U suvremenoj proizvodnji polutrajne kobasice se toplo dime na temperaturi koja ovisno o vrsti proizvoda varira od 60 °C do 100 °C. Vrijeme termičke obrade je 3 do 5 sati, kada se odvija i kuhanje na pari koje traje 60 do 100 minuta. Dimljenje se obično prekida kada se u centru kobasice postigne temperatura oko 75 °C. Osnovno obilježje polutrajnih kobasica je da mesno tijesto čvrsto povezuje sve ostale sastojke nadjeva. Glavni sastojak je krupnije ili finije usitnjeno meso koje se salamuri. Drugi važan sastojak je mesno tijesto koje ima ulogu povezivanja usitnjenog mesa i masnog tkiva u nadjevu (ŽIVKOVIĆ, 1986.).



Shema 1: Shematski prikaz dijagrama toka za polutrajnu kobasicu - Kranjska kobasica (ANON., 2017)

2. CILJ I HIPOTEZA RADA

Cilj ovog rada je validirati rokove trajnosti kobasičarskih proizvoda sa smanjenim udjelom soli i korištenjem zamjene za sol, s obzirom na njihovu mikrobiološku stabilnost.

Hipoteza je da će se na proizvodima koji će se proizvoditi prema novim recepturama sa smanjenim udjelom soli i korištenjem zamjene za sol, potvrditi postojeći rokovi trajnosti.

Ukoliko se potvrdi hipoteza i u proizvodima sa smanjenim udjelom soli potvrdimo dosadašnji rok trajnosti, moguće je krenuti s proizvodnjom proizvoda prema novoj recepturi u kojoj je korišten Supisol kao zamjena za sol. Također, rezultati istraživanja će se moći upotrijebiti kao dodatni alat kod obrazloženja bioloških opasnosti u HACCP studiji za ovu kategoriju proizvoda, kao i nadopuna studije procjene rizika za grupu kobasičarskih proizvoda sa smanjenim udjelom soli.

Ujedno, rezultati istraživanja bit će doprinos Strateškom planu za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015.-2019.

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Materijal i plan rada

U okviru ovoga rada obavljene su mikrobiološke analize uzoraka kranjskih kobasica sa smanjenim udjelom soli (u daljnjem tekstu KK-sus) i kranjskih kobasica proizvedenih prema klasičnoj recepturi (kontrolni uzorci; u daljnjem tekstu KK-ku) kako bismo validirali deklarirane rokove trajnosti.

Kobasice su proizvedene na način opisan u shemi 1. Uzorci Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli i kontrolni uzorci proizvedeni su istoga dana. U njihovoj proizvodnji su upotrijebljene iste sirovine, termički su obrađeni zajedno u istoj komori za termičku obradu (jedna proizvodna šarža). Isto tako, vakuumirani su istog dana. Na taj način su proizvedeni proizvodi koji su prošli identičan tehnološki postupak, kako bismo eventualna odstupanja u mikrobiološkoj slici mogli dovesti u vezu s različitim recepturama (smanjen udio soli), a ne razlikama prilikom procesa proizvodnje.

Kontrolni uzorak kobasice proizveden prema dosadašnjoj „klasičnoj“ recepturi ima deklarirani udio soli od 1,9 g. Kranjska kobasica proizvedena prema novoj recepturi ima deklarirani smanjeni udio soli od 1,4 g.

Ukupno je analizirano 80 pakovina kobasica (40 pakovina proizvoda sa smanjenim udjelom soli i 40 pakovina kontrolnih uzoraka). Analize su osim mikrobiološke obuhvatile i organoleptičku i kemijsku pretragu (određivanje količine natrija u uzorcima).

Svi proizvodi su proizvedeni 29.03.2017., a vakuumirani sljedeći dan 30.03.2017.. Deklarirani rok trajnosti je bio 13.05.2017., odnosno 45 dana.

Analize su provedene u četiri navrata. Svakog navedenog datuma je analizirano 10 novih pakovina KK-sus i 10 novih pakovina KK-ku, što je ukupno 40 uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli i 40 uzoraka Kranjske kobasice proizvedene prema dosadašnjoj recepturi.

Prve analize na uzorcima bile su provedene drugog dana nakon proizvodnje (10 pakovina KK-sus i 10 pakovina KK-ku), s početkom analize 31.03.2017.. Sljedeće ispitivanje je bilo sredinom deklariranog roka trajanja (03.05.2017.- 35. dan), zatim po isteku roka trajnosti (15.05.2017.- 45 dana od datuma proizvodnje). Dodatno su 65. dana od datuma proizvodnje (02.06.2017.) provedene analize (tzv. “zaštitni faktor“) koje se provode kao dodatna sigurnost za potrošače jer se analizira proizvod s 30% dužim rokom trajnosti od deklariranog.

Svi navedeni uzorci (osim uzoraka čija analiza je bila 65. dan od datuma proizvodnje) su ponovno analizirani i dva dana nakon otvaranja i čuvanja u hladnjaku na propisanoj temperaturi.

Na taj se način validira i način konzumacije proizvoda deklariran na pakovini (nakon otvaranja, upotrijebiti u roku 2 dana).

Shema uzorkovanja kobasica:

─ drugi dan nakon proizvodnje

─ 35. dan nakon proizvodnje

─ 45. dan nakon proizvodnje

─ 65. dan nakon proizvodnje

3.2. Organoleptička pretraga

Organoleptička pretraga obuhvatila je ocjenu konzistencije, izgleda presjeka, te mirisa i okusa, kobasica. Pretragu je obavio panel od 5 ocjenjivača. Pojedine karakteristike su ocjenjivane prema internom obrascu (ANON., 2016 a) ocjenama od 1-7 pri čemu je pojedino svojstvo tumačeno na sljedeći način:

Ocjena	Tumačenje ocjenjivanog svojstva
1 2	Slabo izraženo svojstvo
3 **4** 5	Poželjno svojstvo
6 7	Preizraženo svojstvo

Dakle, da bi zadovoljili organoleptičku procjenu, ocjena uzoraka trebala bi se kretati u rasponu ocjena 3-5, kada se promatrana svojstva smatraju poželjnima.

Kranjska kobasica je proizvod čvrsto-elastične konzistencije. Ovitak kobasice čvrsto prianja uz nadjev. Na presjeku kobasice vidljivi su komadići mesa jednake veličine, ružičasto crvene boje, jednakomjerno pomiješani s komadićima slanine. Miris i okus proizvoda, karakteristični su za upotrijebljenu sirovinu, začine i dim (ANON., 2017 b).



Slika 1. Pakiranje Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli



Slika 2. Kontrolni uzorak

3.3. Mikrobiološka pretraga

Mikrobiološka ispitivanja validacije roka trajnosti uzoraka kranjskih kobasica, provedena su u Podravkinom laboratoriju za kontrolu kvalitete, Mikrobiološkom laboratoriju mesnih proizvoda.

Uzorci su analizirani sukladno odredbama Uredbe (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (s izmjenama i dopunama) i sukladno preporučenim mikrobiološkim parametrima i kriterijima Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (3. izdanje, MPRiRR, 2011.) čija provedba je osigurana Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN br. 81/13).

Mikrobiološke analize su provedene na predstavniku grupe kobasičarskih proizvoda, kranjskoj kobasici. Ovaj proizvod prema Pravilniku o mesnim proizvodima (NN br. 131/12) spada u skupinu toplinski obrađenih kobasica i to u polutrajne kobasičarske proizvode.

Istraživanje je, sukladno važećem zakonodavstvu RH, obuhvatilo pretraživanje mikroorganizama kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Mikrobiološki parametri koji je pretražuju u uzorcima polutrajnih kobasičarskih proizvoda

Mikrooragnizmi/ njihovi toksini i metabliti	Plan uzorkovanja		Kriteriji
	n	c	
Listeria monocytogenes	5	0	n.n. u 25g
Salmonella spp.	5	0	n.n. u 25g
Aerobne mezofilne bakterije	5	2	$m=10^3$ cfu/g; $M=10^4$ cfu/g
Enterobacteriaceae	5	2	m=10 cfu/g; $M=10^2$ cfu/g
Koagulaza-pozitivni stafiliokok/ *S. aureus*	5	2	m=10 cfu/g; $M=10^2$ cfu/g
Sulfitreducirajuće klostridije	5	2	m=10 cfu/g; $M=10^2$ cfu/g

cfu/g- (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
n = broj elementarnih jedinica uzorka koje čine uzorak
c = broj jedinica uzorka, u kojima se dobivene vrijednosti ispitivanja mogu nalaziti između "m" i "M", pri čemu se uzorak smatra prihvatljivim, ukoliko je dobivena vrijednost ispitivanja u ostalim jedinicama uzorka jednaka "m" ili manja od "m"
m = granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim
M = granična dopuštena vrijednost iznad koje se svi rezultati smatraju nezadovoljavajućim

Mikrobiološke pretrage obavljene su prema predviđenoj shemi uzorkovanja. Nakon otvaranja vakuum pakiranja uzorci su pohranjeni u laboratorijskom hladnjaku na deklariranoj temperaturi čuvanja kobasica, te su analize ponavljane nakon dva dana (osim kod uzorkovanja 65. dana pohrane). Na taj smo način validirali deklarirani postupak čuvanja kobasica nakon otvaranja pakovine.

U mikrobiološkoj pretrazi uzoraka korištene su sljedeće ISO metode:

1. Određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija

HRN EN ISO 4833-1:2013. Mikrobiologija lanca hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30°C tehnikom zalijevanja podloge (ISO 4833-1:2013; EN ISO 4833-1:2013)

2. Određivanje broja enterobakterija

HRN ISO 21528-2:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae -- 2. dio: Metoda određivanja broja kolonija (ISO 21528-2:2004)

3. Određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococus aureus)*

HRN EN ISO 6888-1:2004. 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 (ISO 6888-1:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6888-1:1999+A1:2003)

4. Određivanje prisutnosti bakterija *Salmonella* vrsta

HRN EN ISO 6579:2005/ Ispr.1:2008 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp (ISO 6579:2002/Cor 1:2004; EN ISO 6579:2002/AC:2006)

5. Određivanje prisutnosti bakterije *Listeria monocytogenes*

HRN EN ISO 11290- 1:1999/ A1:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* -- 1. dio: Metoda dokazivanja -- Amandman 1: Modifikacija podloge za izolaciju, test hemolize i uključivanje podataka o točnosti (ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004; EN ISO 11290-1:1996/A1:2004)

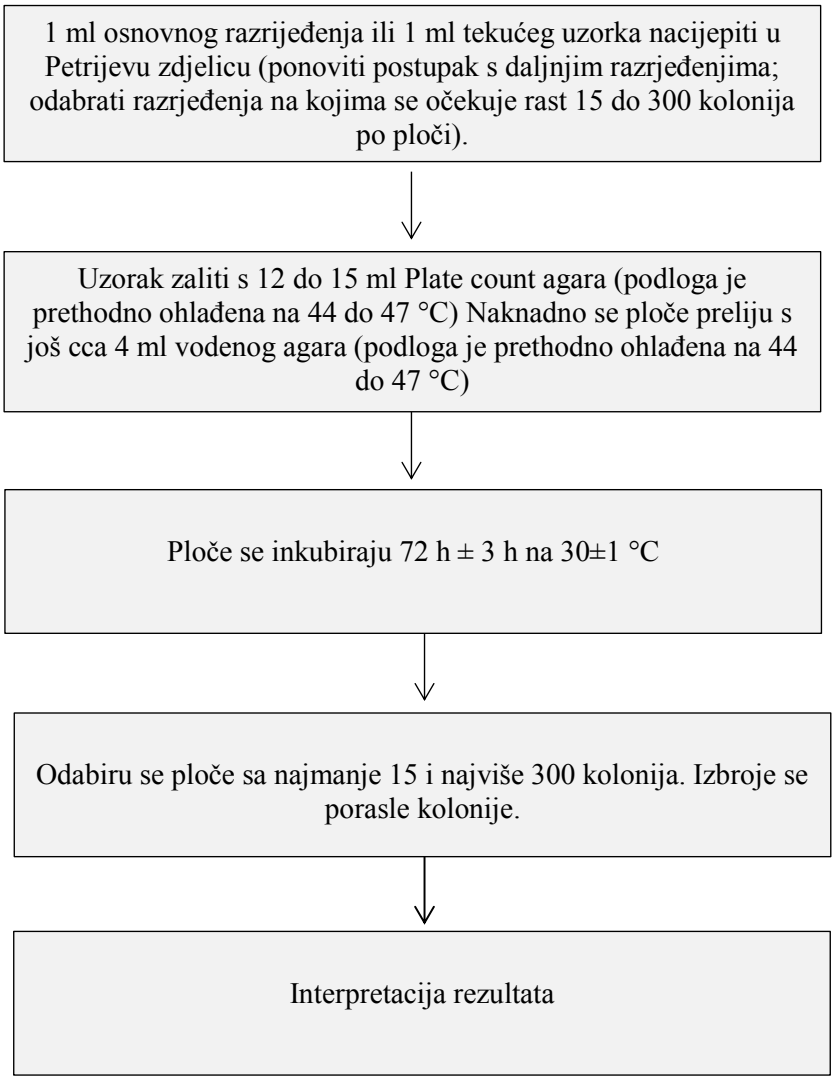
6. Određivanje broja sulfitreducirajućih klostridija

HRN ISO 15213:2004. Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za brojenje

sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima (ISO 15213:2003)

Postupak određivanja broja aerobnih mezofilnih bakterija

Princip metode je omogućiti porast kolonija bakterija iz svake prisutne bakterijske stanice u ispitivanom uzorku pri aerobnim uvjetima i temperaturi podesnoj za rast mezofilnih bakterija – inokulirati potrebnu/odabranu količinu uzorka u neselektivnu hranjivu podlogu i termostatirati 72 ± 3 sata na 30ºC ± 1°C. Uzorak se priprema na način da se 10 g uzorka zalije sa 90 ml fiziološke otopine (temperirane na 45,5°C) i homogenizira. Dobiveno je osnovno, prvo razrjeđenje. 1 ml osnovnog razrjeđenja se nacijepi u epruvetu sa 9 ml fiziološke otopine, te se na taj način dobije potrebno drugo razrjeđenje. 1 ml odabranog razrjeđenja (za ovu kategoriju uzoraka, odabrano je prvo i drugo razrjeđenje) zalije se sa 12 do 15 ml podloge Plate Count Agar i pažljivo promiješa. Malo kasnije se ploče preliju s oko 4 ml vodenog agara. Hranjive podloge su također temperirane na 45,5°C. Nakon što se skrutnu, ploče se okrenu i inkubiraju na 30°C ± 1°C/72 h ± 3 h. Rezultati se nakon termostatiranja očitavaju na način da se broje sve porasle kolonije, a odabiru se ploče s manje od 300 kolonija. Da bi se izrazio rezultat, broj poraslih kolonija u spitanom razrjeđenju se preračuna na broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1 g uzorka (ANON., 2017 a).



Shema 2. Shematski prikaz metode HRN EN ISO 4833-1:2013

za određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija

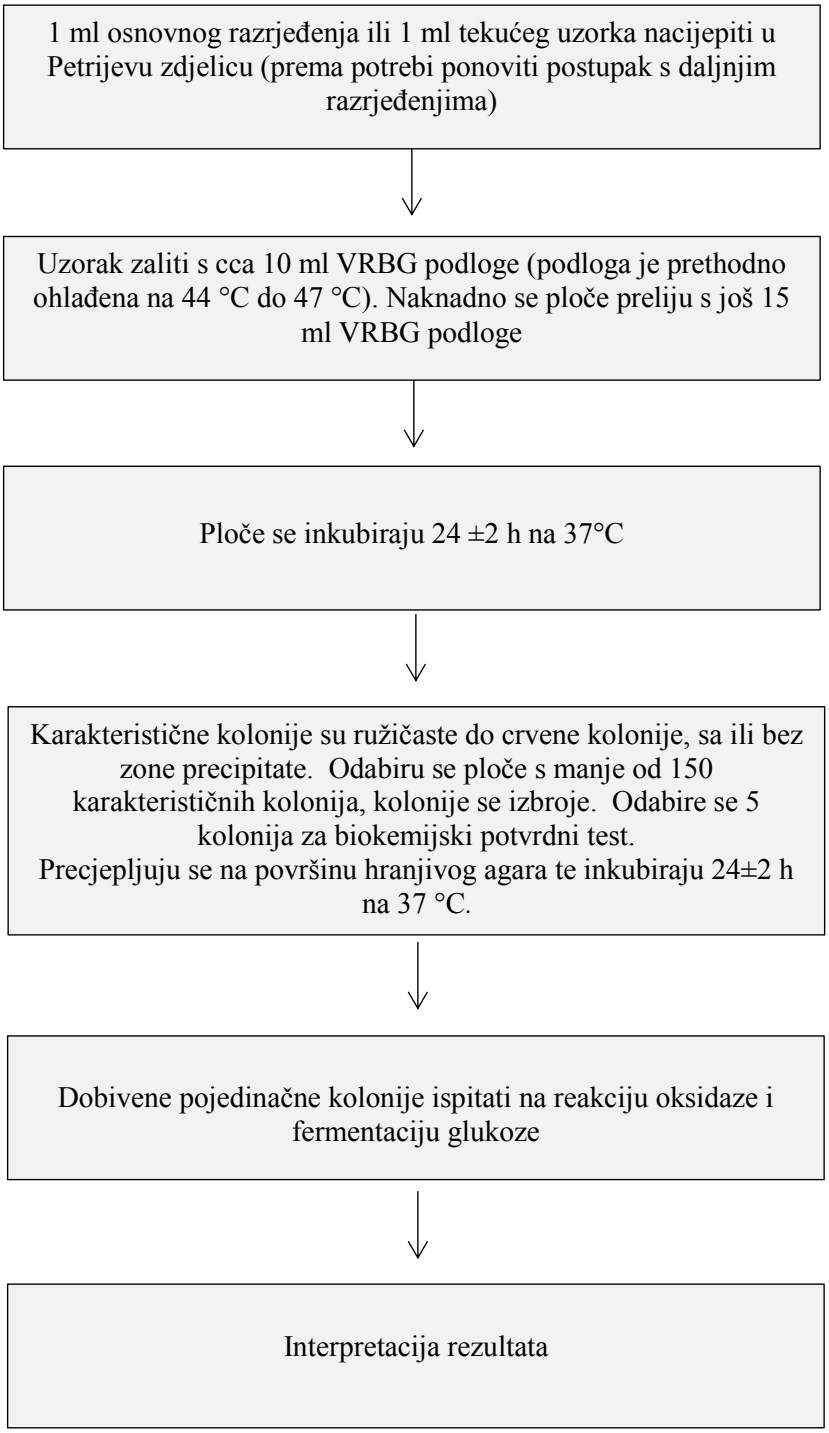
Postupak određivanja broja *Enterobacteriaceae*

Princip metode je omogućiti porast kolonija enterobakterija iz svake prisutne bakterijske stanice u ispitivanom uzorku pri aerobnim uvjetima i temperaturi podesnoj za rast enterobakterija – inokulirati potrebnu/odabranu količinu uzorka u selektivnu hranjivu podlogu koja sadrži inhibitore rasta za ostale bakterije prisutne u uzorku i indikator za dokazivanje fermentacije glukoze stanicama enterobakterija prisutnim u uzorku i termostatirati 24 ± 2 sata na 37 ºC. 1 ml uzorka iz osnovnog razrjeđenja se zalije s oko 10 ml Violet Red Bile Glucose Agara (VRBG; temperiran na 45,5 °C) i pažljivo promiješa. Nakon što se agar skrutne, prelije se s još oko 15 ml istog hranjivog agara i inkubira na 37 °C/24 ± 2 h. Tipične kolonije enterobakterija su ružičaste do crvene ili ljubičaste boje, sa ili bez zone precipitacije. Rezultat analize se izračuna na način da se preračuna broj poraslih kolonija u ispitanom razrjeđenju (na ploči koja sadrži manje od 150 kolonija na 1 Petri ploči) na broj enterobakterija u 1 g uzorka (ANON., 2017 a) .



Slika 3. Kolonije *Enterobacteriaceae*

na VRBG agaru (ANON., 2017 a)

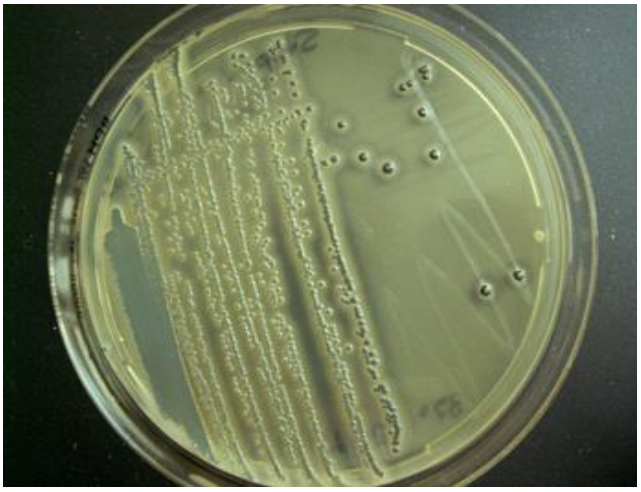


Shema 3. Shematski prikaz metode HRN ISO 21528-2:2008

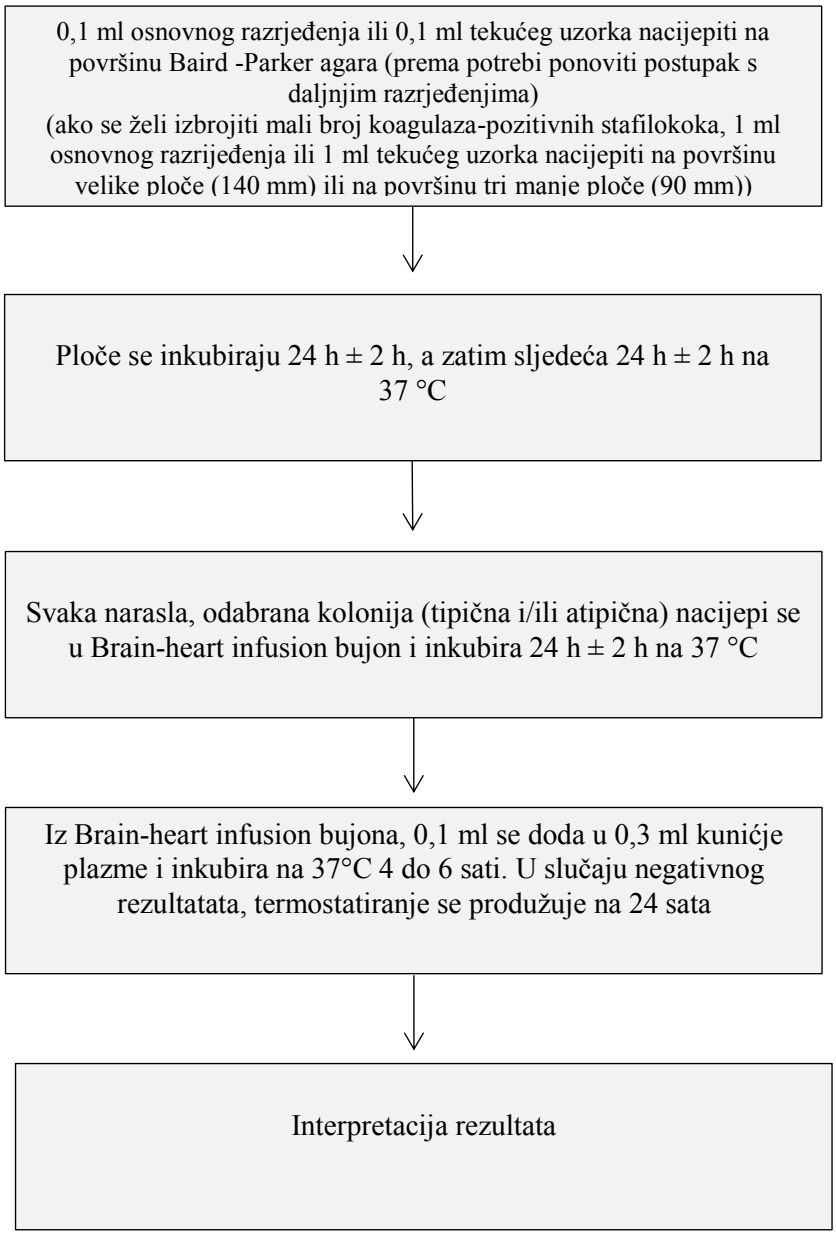
za određivanje broja enterobakterija

Postupak određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococus aureus)*

Princip određivanja je omogućiti porast kolonija *S. aureus* iz svake prisutne bakterijske stanice u ispitivanom uzorku pri aerobnim uvjetima i temperaturi podesnoj za njihov rast – inokulirati potrebnu/odabranu količinu uzorka na selektivnu hranjivu podlogu koja sadrži inhibitore rasta za ostale bakterije prisutne u uzorku i žumanjak jajeta za dokazivanje lipazne i proteolitičke aktivnosti stanicama *S. aureus* prisutnim u uzorku i termostatirati 48 sata na 37ºC. 1 ml osnovnog razrjeđenja se nacijepi na površinu 3 ploče sa Baird-Parker Agarom- BP (kada se želi izbrojiti mali broj koagulaza pozitivnih stafilokoka) i razmaže. Ploča se inkubiraa na 37°C / 48 h (pregled nakon 24 h i nakon 48 h). Tipične kolonije porasle na BP agaru su crne ili sive boje, sjajne i konveksne, promjera 1,5 do 2,5 mm, okružene prozirnom zonom. Tipične kolonije porasle na BP agaru se precijepe ezom u 5 ml Brain-heart Infusion bujona i inkubiraju na 37°C/24 ± 2 h. 0,1 do 0,3 ml uzorka iz Brain-heart Infusion bujona, prenese se u kunićju plazmu i inkubira na 37°C / 4 – 24 h. Za izražavanje rezultata je potrebno preračunati broj poraslih kolonija u ispitanom razrjeđenju (na ploči koja sadrži manje od 300 kolonija na 1 Petri ploči) na broj bakterija *Staphylococcus aureus* u 1 g uzorka (ANON., 2017 a) .



Slika 4. Kolonije *S. aureus* na BP agaru (ANON., 2017 a)



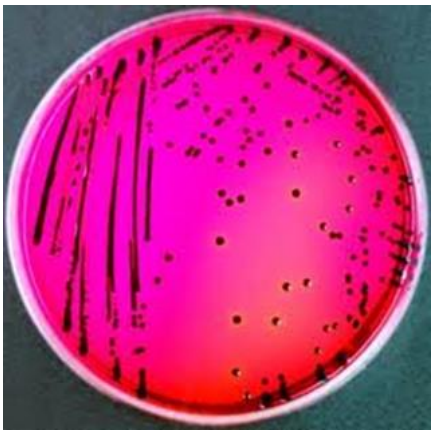
Shema 4. Shematski prikaz metode HRN EN ISO 6888-1:2004

za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka/ *Staphylococus aureus*

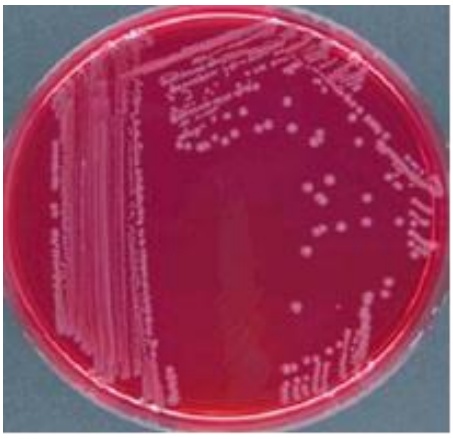
Postupak određivanja prisutnosti bakterija *Salmonella* spp.

Princip ove metode je ispitati prisutnost bakterija *Salmonella* vrste u zadanoj količini uzorka pri aerobnim uvjetima i temperaturi podesnoj za njezin rast, u 4 sukcesivne faze: pred obogaćivanje u neselektivnom bujonu, obogaćivanje u dva selektivna bujona paralelno, izolacija iz selektivnih bujona površinskim precjepljivanjem na po dvije selektivne agar ploče i na kraju ako je to potrebno, potvrdni postupak za dokazivanje prisutnosti *Salmonella* vrste.

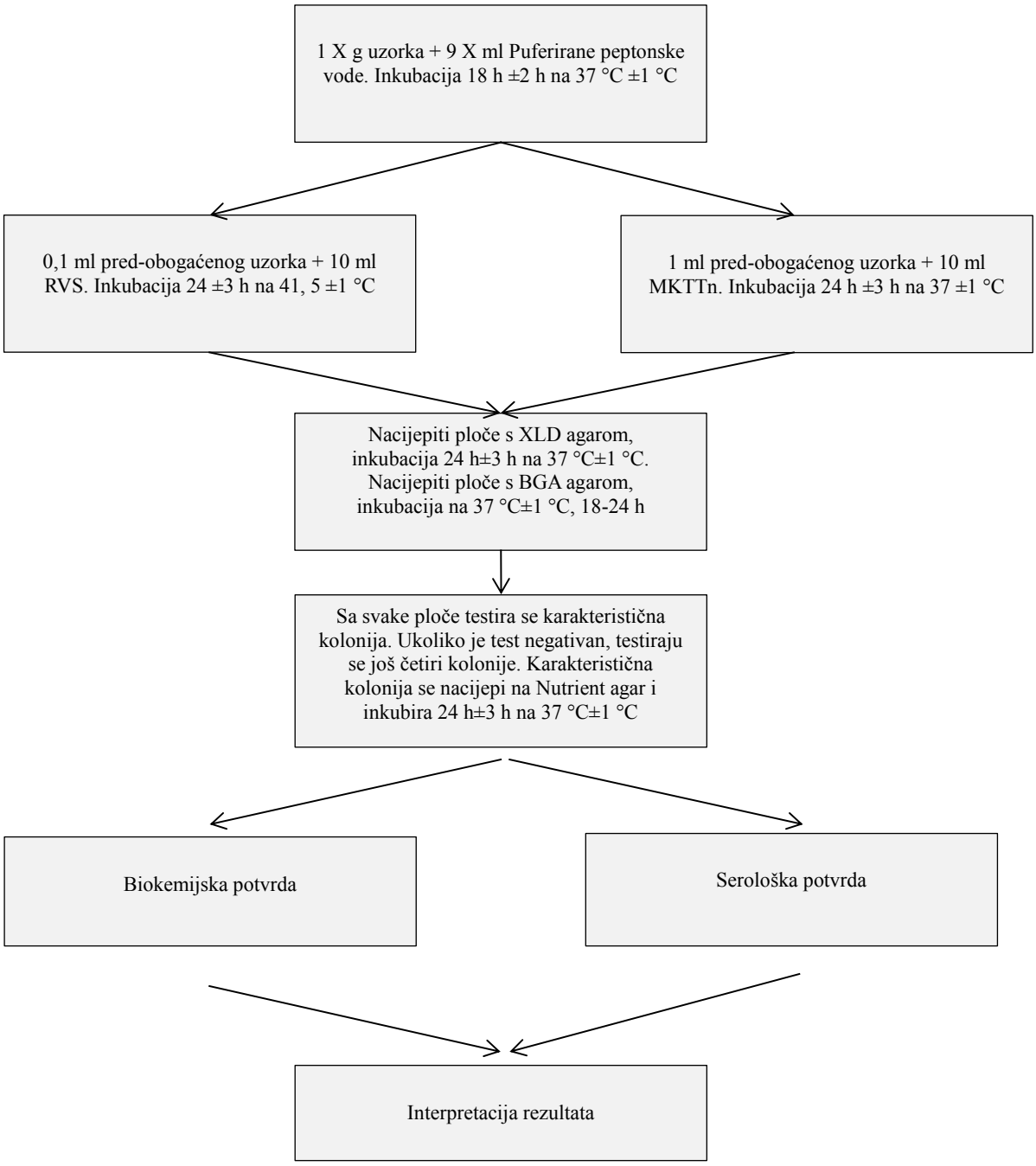
Prvi korak u analizi je neselektivno pred obogaćivanje u Buffered Peptone Water (BPW) u omjeru 1:10 na 37°C±1°C. Nakon pred obogaćivanja, uzorak je, nacijepljen na dva selektivna hranjiva bujona (obogaćivanje: 0,1 ml uzorka u 10 ml Rappaport-Vassiliadis Medium (RVS) uz inkubaciju 41,5°C±1°C/ 24±3h i 1 ml uzorka u 10 ml Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MKTTn) uz inkubaciju 37°C±1°C/ 24±3h). Slijede daljnji koraci u ISO normi (selektivna izolacija na površinu Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) uz inkubaciju 37°C±1°C/ 24±3h i Brilliant green agaru (BGA) uz inkubaciju 37°C±1°C/ 18-24h). Tipične kolonije na XLD agaru imaju crni centar i transparentnu zonu crvenkaste boje. Tipične kolonije na BGA agaru su roza boje veličine 1-2 mm. Sa svake ploče testira se karakteristična kolonija. Ukoliko je test negativan, testiraju se još četiri kolonije. Karakteristična kolonija se nacijepi na Nutrient agar i inkubira 24 h±3 h na 37°C±1°C. Izolirani bakterijski soj se ispituje biokemijski i serološki, te šalje na identifikaciju/ serotipizaciju u Hrvatski veterinarski institut (ANON., 2017 a) .



Slika 5. Kolonije bakterija *Salmonella* spp. na XLD agaru (ANON., 2017 a)



Slika 6. Kolonije bakterija *Salmonella* spp. na BGA agaru (ANON., 2017 a)

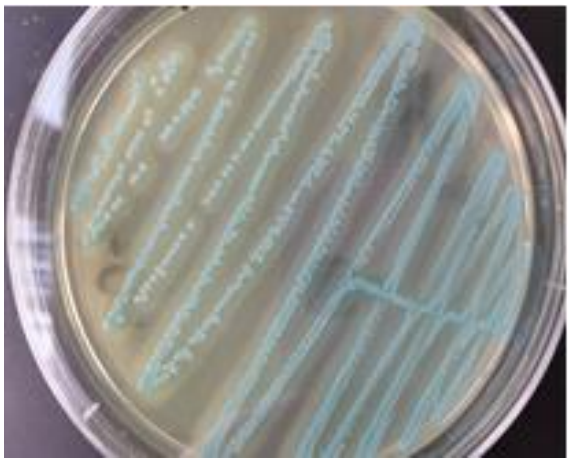


Shema 5. Shematski prikaz metode HRN EN ISO 6579:2005/ Ispr. 1:2008

za određivanje prisutnosti *Salmonella* vrsta

Postupak određivanja prisutnosti bakterije *Listeria monocytogenes*

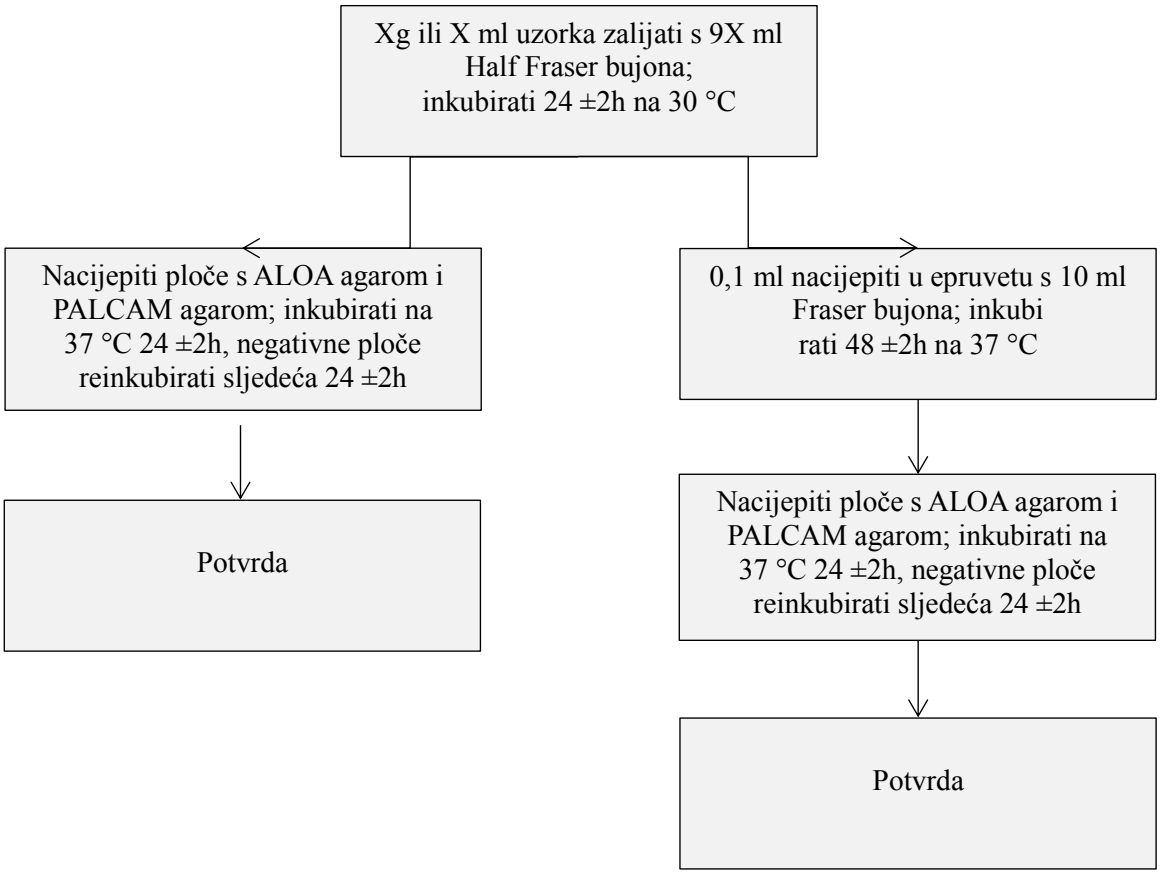
Cilj metode je omogućiti porast kolonija bakterije *L. monocytogenes* iz svake prisutne bakterijske stanice u ispitivanom uzorku pri aerobnim uvjetima i temperaturi podesnoj za njezin rast – površinski inokulirati potrebnu/odabranu količinu uzorka na selektivnu hranjivu podlogu koja sadrži kromogeni supstrat za detekciju aktivnosti enzima β-glukozidaze, karakterističnog za sve *Listeria* vrste. Svaki uzorak je ispitan na način da je prvi korak u analizi predobogaćivanje u Half Fraser Broth (HFB) u omjeru 1:10 na 30°C/ 24±2h. Nakon predobogaćivanja, uzorak je nacjepljen na dva selektivna hranjiva agara, ALOA agar i PALCAM agar koji se inkubiraju na 37°C/ 24-48h. Uzorak se paralelno, nakon predobogaćivanja nacjepljuje na drugi bujon za obogaćivanje (0,1 ml uzorka u 10 ml Fraser Broth (FB) uz inkubaciju 37°C/ 48±2h). Slijede daljnji koraci u ISO normi, selektivna izolacija na površinu ALOA agara i PALCAM agara koji se dalje inkubiraju na 37°C/ 24-48h. Tipične kolonije porasle na ALOA agaru su plavo - zelene boje okružene mutnom zonom. Tipične kolonije porasle na PALCAM agaru su sivo zelenkaste ili maslinasto zelene, ponekad s crnim centrom, ali uvijek s crnom zonom. Ploče sa poraslim tipičnim kolonijama, šalju se na identifikaciju u Hrvatski veterinarski institut/ Veterinarski zavod Križevci (ANON., 2017 a) .



Slika 7. Kolonije bakterije *Listeria monocytogenes* na ALOA agaru (ANON., 2017 a)



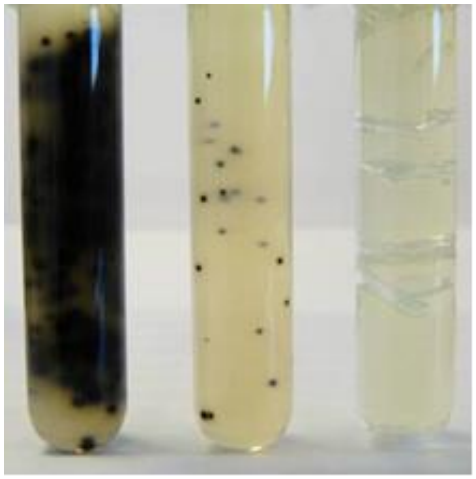
Slika 8. Kolonije bakterije *Listeria monocytogenes* na PALCAM agaru (ANON., 2017 a)



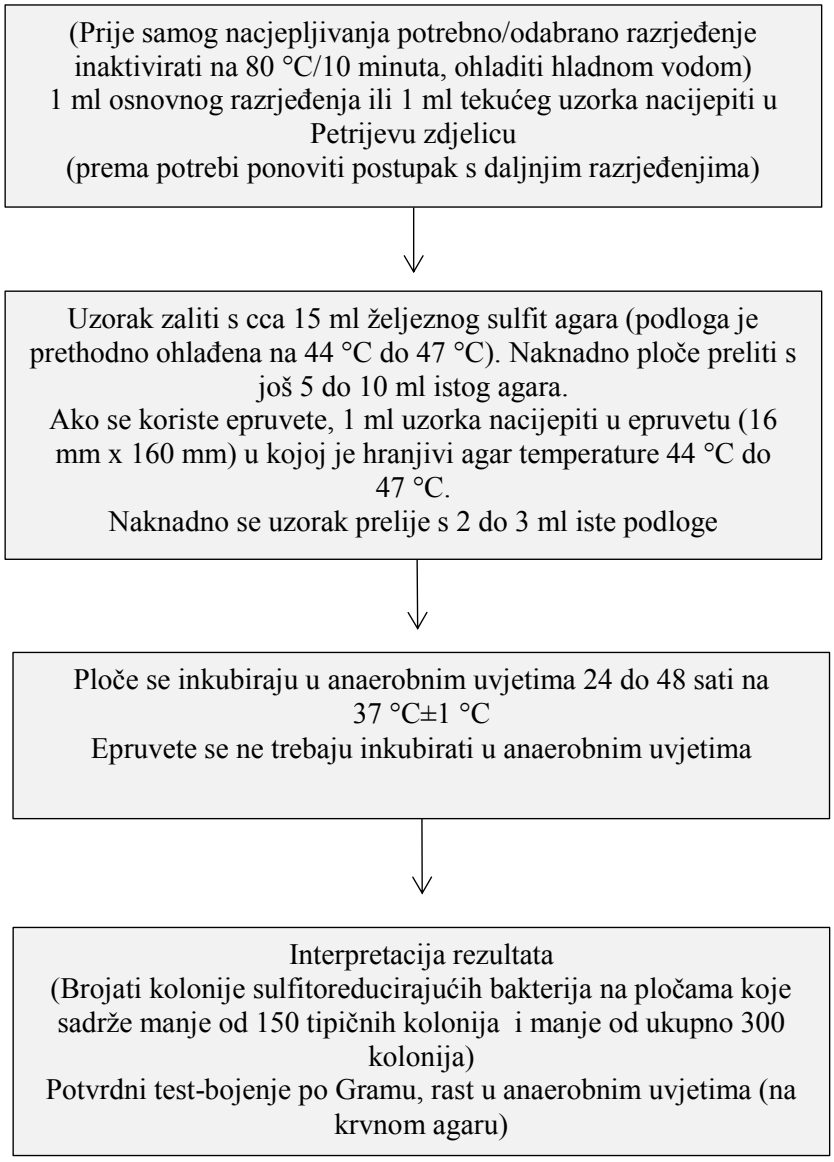
Shema 6. Shematski prikaz metode HRN EN ISO 11290-1:1999/ A1:2008 za određivanje prisutnosti bakterije *Listeria monocytogenes.*

Postupak određivanja broja sulfitreducirajućih klostridija

Princip određivanja je omogućiti porast kolonija sulfitreducirajućih klostridija iz svake prisutne stanice u ispitivanom uzorku pri anaerobnim uvjetima i temperaturi podesnoj za njihov rast – inokulirati potrebnu/odabranu količinu uzorka dubinski u selektivnu hranjivu podlogu koja sadrži inhibitore rasta za ostale bakterije prisutne u uzorku i sulfit za dokazivanje sulfitoreducirajuće aktivnosti klostridija prisutnih u uzorku i termostatirati do 24-48 sati na 37 ^{o}C. 1 mL osnovnog razrjeđenja uzorka se inaktivira u vodenoj kupelji na 80 °C kroz 10 minuta i ohladi hladnom vodom. 1 mL inaktiviranog uzorka se nacijepi u Petrijevu zdjelicu i zalije sa cca 15 mL Iron sulfite agara (ISA), s tim da je podloga prethodno ohlađena na 44 °C do 47 °C. Naknadno se ploče preliti s još 5 do 10 mL istog agara. Uzorak se može nacijepiti i u epruvete, tako da nacijepimo 1 mL uzorka u epruvetu (16x160 mm) u kojoj je hranjivi agar temp. 44-47°C. Nakon što s podloga skrutne uzorak preliti s 2-3 mL iste podloge. Inkubacija uzoraka je u anaerobnim uvjetima na 37 °C ± 1 °C/24-48h. Epruvete se ne trebaju inkubirati u anaerobnim uvjetima. Tipične kolonije porasle na ISA agaru su crne boje. Broje se kolonije sulfitoreducirajućih bakterija na pločama koje sadrže manje od 150 tipičnih kolonija i manje od ukupno 300 kolonija. Kod interpretacije rezultata je potrebno preračunati broj poraslih kolonija u ispitanom razrjeđenju na broj sulfitoreducirajućih klostridija u 1 g uzorka (ANON., 2017 a) .



Slika 9. Kolonije sulfitreducirajućih bakterija (ANON., 2017 a)



Shema **7.** Shematski prikaz metode HRN ISO 15213:2004

za određivanje broja sulfitreducirajućih klostridija

3.4. Kemijska pretraga

Određivanje sadržaja natrija

Metoda se primjenjuje za određivanje sadržaja natrija u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima gdje je sadržaj natrija (Na) do 40%. Analizator natrija je posebno dizajniran instrument za određivanje sadržaja natrija u hrani. Princip ove metode se temelji na metodi standardnog dodatka - ionske otopine standarda natrija.

Laboratorijski uzorak se odvagne s točnošću 0,5 ±0,001 g. Uzorak se prenese u odmjernu tikvicu obujma 100 ml, dopuni do oznake s vodom i dobro primiješa. 20 ml pripremljene otopine se otpipetira u titracijsku posudu obujma 100 ml i doda 20 ml ISA otopine (ISA otopina (DIPA-HCL-ISA), c(ISA) = 1,0 mol/l). U titracijsku posudu se prije početka tiracije stavi magnetić. Elektrode se urone u ispitivanu otopinu, aktivira se metoda te uz kontinuirano miješanje i bez diranja elektrode, započne se titracija standardnom otopinom natrija od 5000 mg Na. Titracija se automatski zaustavlja kod završne točke ili kod određenog potencijala koji je izražen kao funkcija dodatnog volumena.

Sadržaj natrija u ispitivanom uzorku očita se na zaslonu instrumenta, a izražava se u miligramima po kilogramu uzorka ili gramima na 100 grama uzorka (ANON., 2017 a).

3.5. Statistička obrada rezultata

Nakon provedenog istraživanja eksperimentalni podaci su obrađeni deskriptivnom statistikom.

4. REZULTATI

4.1. Organoleptička pretraga

U tablicama 2. i 3. prikazani su rezultati organoleptičke ocjene uzoraka proizvoda koji su testirani tijekom roka trajnosti. Uzorci su ocjenjivani istih datuma kada je obavljena i mikrobiološka analiza. Organoleptička pretraga je obavljena tijekom deklariranog roka trajanja (drugi dan po proizvodnji, 35. i 45. dan), te po isteku roka, 65. dana ("zaštitini faktor").
Svi proizvodi (osim uzoraka čija analiza je bila 65. dan od datuma proizvodnje) su ponovno ocijenjeni i dva dana nakon otvaranja pakovine i čuvanja u hladnjaku na propisanoj temperaturi. Promatrani parametri ocjenjivani su visokim ocjenama koje označavaju poželjna svojstva proizvoda.

Tablica 2. Organoleptička ocjena Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli

Datum ocjenjivanja	Dan u roku trajnosti	Izgled	Okus	Konzistencija	Miris
31.03.17.	2.	4	4	4	4
03.05.17.	35.	4	4	4	4
05.05.17.	35 + 2	4	4	4	4
13.05.17.	45.	4	3,5	4	4
15.05.17.	45 + 2	4	3,2	4	4
02.06.17.	65.	4	3	4	3

Tablica 3. Organoleptička ocjena kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice

Datum ocjenjivanja	Dan u roku trajnosti	Izgled	Okus	Konzistencija	Miris
31.03.17.	2.	4	4	4	4
03.05.17.	35.	4	4	4	4
05.05.17.	35 + 2	4	4	4	4
13.05.17.	45.	4	4	4	4
15.05.17.	45 + 2	4	4	4	4
02.06.17.	65.	4	3	4	3

4.2. Mikrobiološka pretraga

Mikrobiološkom pretragom obuhvaćeni su uzorci Kranjske kobasice proizvedeni sa smanjenim udjelom soli te, kao kontrola, uzorci Kranjske kobasice prema uobičajenoj recepturi. Rezultati su prikazani u Tablicama 4.-21. te Grafikonima 1.-5. Analize su obavljene u predviđenim terminima (drugi, 35. i 45. dan pohrane) tijekom deklariranog roka održivosti kobasica, te dva dana nakon otvaranja pakovine kobasica po svakom terminu (četvrti, 37. i 47. dan). Tako smo validirali deklaraciju o načinu konzumacije proizvoda (nakon otvaranja, upotrijebiti u roku 2 dana). Posljednja je mikrobiološka pretraga bila ujedno i potvrda „zaštitnog faktora" za potrošače (65. dan).

4.2.1. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli

Rezultati mikrobiološke analize uzoraka kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli prikazani su u Tablicama 4. – 12. i Grafikonima 1. i 2.

Tablica 4. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli - 2. dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$1{,}1x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$2{,}2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$1{,}6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$1{,}4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	50	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$1{,}2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	60	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$1{,}0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	80	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$1{,}0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g- (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

S obzirom na dobivene rezultate, svi ispitani uzorci odgovaraju odredbama Uredbe (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu i sukladni su preporučenim mikrobiološkim parametrima i kriterijima Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2011.).

Dva dana po otvaranju pakovine i pohrane u hladnjaku obavljena je bakteriološka pretraga a rezultati prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli (otvoreno pakiranje, 4. dan roka trajnosti)

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$1,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$1,5x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$1,9x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$1,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$1,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$1,3x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$1,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$1,3x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$1,3x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g- (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Uzorci također udovoljavaju propisima o mikrobiološkim kriterijima za hranu. U osam uzoraka uočen je porast broja aerobnih mezofilnih bakterija, što je očekivano, s obzirom da su pakovine bile otvorene a proizvodi više nisu bili čuvani u vakuumu.

Sljedeće ispitivanje uzoraka bilo je sredinom deklariranog roka trajanja, odnosno 35. dan u roku.
Datum početka analize je bio 03.05.2017., a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli - 35. dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$1,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$1,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$1,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$2,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	80	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$1,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$1,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$1,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$1,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g- (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Rezultati prikazani u Tablici 6. ukazuju da uzorci udovoljavaju propisima o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

Deset pakovina na kojima je provedena analiza 35. dan deklariranog roka trajnosti, čuvano je u laboratorijskom hladnjaku te je na istim, otvorenim uzorcima nakon 2 dana ponovljena analiza. Datum početka analize je bio 05.05.2017., a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli (otvoreno pakiranje, 37. dan roka trajnosti)

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$5,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$3,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$9,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	**$2,1x10^3$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$4,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$8,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$3,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$9,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g- (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Rezultati i dalje ukazuju na sukladnost broja utvrđenih mikroorganizama. Možemo se osvrnuti na rezultate utvrđenog broja aerobnih mezofilnih bakterija u uzorku broj 6 koji iznosi $2,1x10^3$ cfu/g. Prema odredbama propisa uzorak se tumači kao prihvatljiv jer se vrijednost nalazi ispod maksimalne dopuštene vrijednosti (između "m" i "M").

Sljedeće ispitivanje uzoraka bilo je na isteku roka trajanja proizvoda, odnosno 45. dan od datuma proizvodnje. Datum početka analize je bio 13.05.2017. Svi dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli - 45. dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$3,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$7,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$1,0x10^3$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$3,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$3,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	**$2,4x10^3$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$3,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$1,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Rezultati i dalje ukazuju na sukladnost u odnosu na mikrobiološke kriterije. To se odnosi i na uzorak broj 8 i utvrđeni ukupni broj bakterija od $2,4x10^3$ cfu/g koji tumačimo kao prihvatljivu vrijednost.

Kobasice iz pakovina analiziranih 45. dan od datuma proizvodnje, čuvane su u laboratorijskom hladnjaku te je na tim istim, otvorenim uzorcima nakon 2 dana ponovljena analiza.
Datum početka analize je bio 15.05.2017., a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli (otvoreno pakiranje, 47. dan roka trajnosti)

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$1,0x10^3$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$5,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$1,0x10^3$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$1,0x10^3$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$4,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$5,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	**$5,6x10^3$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	**$4,8x10^3$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$4,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$2,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Na uzorcima 7 i 8, dobiveni broj aerobnih mezofilnih bakterija se nalazi između "m" i "M" vrijednosti (navedeno u Tablici 1), stoga ako sve ispitane uzorke promatramo kao 2 uzorka, pri čemu se svaki sastoji od 5 elementarnih jedinica, drugi uzorak zbog dobivenih vrijednosti za aerobne mezofilne bakterije smatramo prihvatljivim, a ne zadovoljavajućim.

Posljednja provedena analiza provedena je kao dodatna sigurnost za potrošače jer se analizira proizvod s 30% dužim rokom trajnosti od deklariranog, 65. dan od datuma proizvodnje. To je "zaštitni faktor", koji je ujedno i interna kontrola proizvodnje i sigurnosti samog proizvoda. Datum početka posljednjeg ciklusa analiza je bio 02.06.2017., a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 10.

Tablica 10. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli s rokom trajnosti 30% dužim od deklariranog - 65. dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$1,0x10^3$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	**$1,0x10^4$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$3,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$3,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$2,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$2,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$1,0x10^3$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$8,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$4,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$4,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

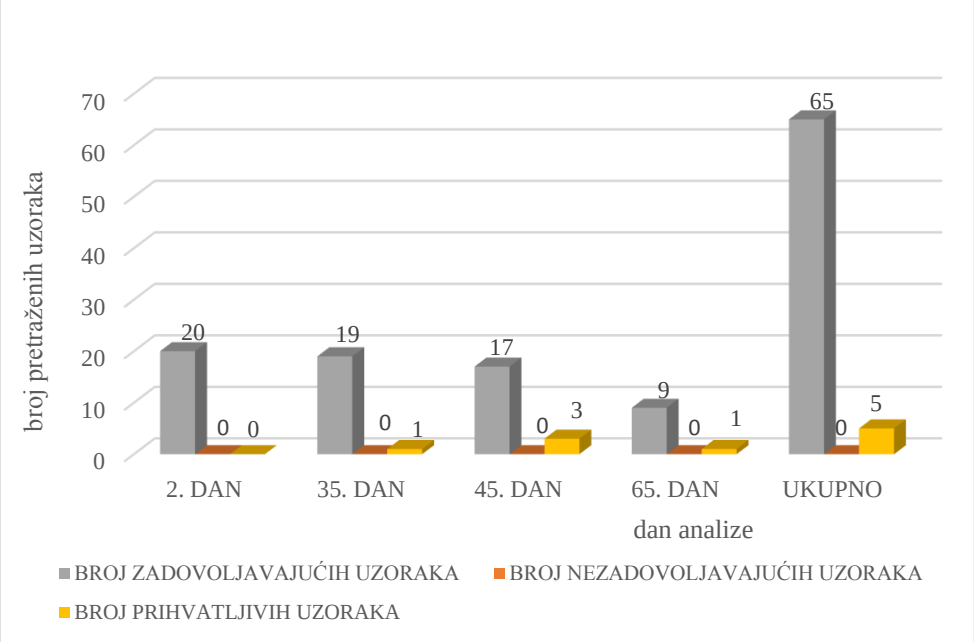
U uzorku br. 2, dobiveni broj aerobnih mezofilnih bakterija se nalazi između "m" i "M" vrijednosti, stoga i u ovoj fazi ispitivanja, ako sve ispitane uzrake promatramo kao 2 uzorka, pri čemu se svaki sastoji od 5 elementarnih jedinica, prvi uzorak zbog dobivenih vrijednosti za aerobne mezofilne bakterije smatramo prihvatljivim, a ne zadovoljavajućim.

U Tablici 11. izdvojene su vrijednosti samo za aerobne mezofilne bakterije ($\log_{10}$ cfu/g) na uzorcima proizvoda sa smanjenim udjelom soli koje su dobivene tijekom ovog ispitivanja. Izdvojen je samo ovaj mikrobiološki parametar jer ostali mikroorganizmi nisu izolirani tijekom analiza.

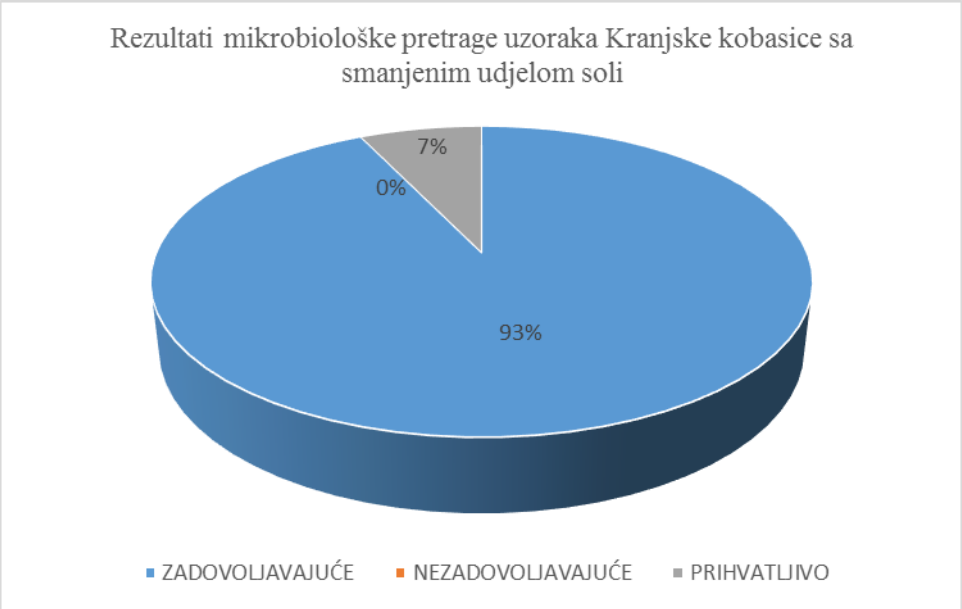
Tablica 11. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli (log_{10} cfu/g)

Datum početka analize	Dan u roku trajnosti	Aerobne mezofilne bakterije, log_{10} cfu/g									
		Redni broj uzorka									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
31.03.17.	2.	2,04	2,34	2,20	2,14	1,69	2,07	1,77	2,00	1,90	2,00
02.04.17.	2 + 2	2,30	2,07	2,17	2,27	2,00	2,25	2,11	2,17	2,11	2,11
03.05.17.	35.	2,07	2,00	2,25	2,34	1,90	2,14	2,20	2,07	2,14	2,30
05.05.17.	35 + 2	2,73	2,30	2,30	2,50	2,98	**3,32**	2,60	2,91	2,53	2,96
13.05.17.	45.	2,47	2,30	2,85	3,00	2,53	2,57	2,30	**3,38**	2,47	2,25
15.05.17.	45 + 2	3,00	2,74	3,00	3,00	2,68	2,73	**3,74**	**3,68**	2,64	2,38
02.06.17.	65.	3,00	**4,00**	2,53	2,55	2,41	2,38	3,00	2,94	2,66	2,62

U grafikonu 1. je prikazan broj zadovoljavajućih, prihvatljivih i nezadovoljavajućih uzoraka s obzirom na dobivene vrijednosti aerobnih mezofilnih bakterija, a u grafikonu 2 njihov udio.



Grafikon 1. Broj zadovoljavajućih, prihvatljivih i nezadovoljavajućih uzoraka Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli s obzirom na nalaz broja aerobnih mezofilnih bakterija



Grafikon 2. Ukupni udio zadovoljavajućih, prihvatljivih i nezadovoljavajućih rezultata mikrobiološke pretrage u uzorcima Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli

Iz prikazanih je grafikona vidljivo da je u uzorcima KK-sus utvrđeni broj aerobnih mezofilnih bakterija bio u granicama prihvatljivosti u čak 65 pretraženih uzoraka, te su uzorci zadovoljavajuće (93% pretraženih uzoraka), odnosno prihvatljive (7% pretraženih uzoraka) mikrobiološke čistoće.

4.2.2. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka - Kranjska kobasica proizvedena prema „klasičnoj“ recepturi

Rezultati bakteriološke pretrage uzoraka KK-ku prikazani su u Tablicama 13.-20. i Grafikonima 3. i 4.

Početak analiza prvih 10 pakovina gotovog proizvoda je bio 31.03.2017.

Tablica 13. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice – drugi dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$1,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	80	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	90	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$1,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$1,9x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$1,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$1,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$1,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	80	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$2,1x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Pretraženi uzorci bili su zadovoljavajuće mikrobiološke kvalitete prema kriterijima Uredbe (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu (s izmjenama i dopunama) i sukladni preporučenim mikrobiološkim parametrima i kriterijima Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2011.).

U skladu s uputama na deklaraciji (nakon otvaranja, upotrijebiti u roku 2 dana), uzorci na kojima je provedena ulazna analiza, čuvani su u laboratorijskom hladnjaku te je nakon dva dana ponovljena analiza, a rezultati su prikazani u Tablici 14..

Tablica 14. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice (otvoreno pakiranje, 4. dan roka trajnosti)

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$1,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$7,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$2,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$2,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$1,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$1,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$1,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$3,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$2,1x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

U osam od deset uzoraka je povećan broj aerobnih mezofilnih bakterija, što je očekivano, s obzirom da su pakovine bile otvorene i proizvodi više nisu bili čuvani u vakuumu.

Sljedeće ispitivanje uzoraka bilo je sredinom deklariranog roka trajanja, odnosno 35. dan. Datum početka analize je bio 03.05.2017., a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice - 35. dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	**$1{,}0x10^4$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	**$1{,}2x10^3$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$2{,}4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$1{,}6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$2{,}1x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$1{,}6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$1{,}4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$1{,}2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$2{,}4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$3{,}2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

U uzorcima broj 1 i 2 utvrđeni broj aerobnih mezofilnih bakterija se nalazi između "m" i "M" vrijednosti (navedeno u Tablici 1.). Uzorke smatramo prihvatljivim s obzirom na propisane mikrobiološke kriterije.

Deset pakovina na kojima je provedena analiza 35. dan u roku trajnosti, čuvano je u laboratorijskom hladnjaku te je na istim, otvorenim uzorcima nakon 2 dana ponovljena analiza. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 16.

Tablica 16. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice (otvoreno pakiranje, 37. dan roka trajnosti)

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	**$2{,}1x10^3$**	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$6{,}0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$2{,}1x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$1{,}0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$3{,}6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$3{,}2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$4{,}6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$2{,}4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$4{,}2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$7{,}4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Uzorak broj 1 ponovno tumačimo kao prihvatljiv jer broj aerobnih mezofilnih bakterija iznosi $2{,}1x10^3$ cfu/g, koji je kriterij između "m" i "M“ vrijednosti.

Sljedeće ispitivanje uzoraka bilo je na isteku roka trajanja, odnosno 45. dan od datuma proizvodnje. Analiza je bila započela 13.05.2017. Svi dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 17.

Tablica 17. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice - 45. dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$2,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$2,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$3,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$7,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$3,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$3,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$2,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$4,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$2,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$3,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Iz podataka prikazanih u Tablici 17., vidljivo je da po isteku roka trajanja proizvoda da su svi rezultati zadovoljavajući.

Deset pakovina na kojima je provedena analiza 45. dan u roku trajnosti, također je čuvano u laboratorijskom hladnjaku te je na tim istim uzorcima nakon 2 dana ponovljena analiza. Datum početka ovih analiza bio je 15.05.2017., a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 18.

Tablica 18. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice (otvoreno pakiranje, 47. dan roka trajnosti)

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$4,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$5,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$4,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$5,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$6,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$5,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$3,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$4,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$6,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$5,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Iz Tablice 18. vidljivo je da su rezultati analiza za sve pretraživane parametre zadovoljavajući.

Posljednja provedena analiza je "zaštitni faktor", analiza koja se provodi kao dodatna sigurnost za potrošače jer se analizira proizvod sa 30% dužim rokom trajnosti od deklariranog, 65. dan od datuma proizvodnje. Datum početka posljednjeg ciklusa analiza bio je 02.06.2017., a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 19.

Tablica 19. Rezultati mikrobiološke analize kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice s rokom trajnosti 30% dužim od deklariranog - 65. dan roka trajnosti

Ispitivani uzorci	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	SA (cfu/g)	SRK (cfu/g)	S (cfu/25g)	LM (cfu/25g)
uzorak 1	$6,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 2	$5,6x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 3	$2,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 4	$4,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 5	$3,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 6	$6,0x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 7	$5,4x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 8	$2,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 9	$3,2x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.
uzorak 10	$5,8x10^2$	<10	<10	<10	n.n.	n.n.

cfu/g - (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu
n.n. = nije nađeno
AMB = Aerobne mezofilne bakterije; E = *Enterobacteriaceae*: SA = *Staphylococcus aureus* ; SRK = sulfitreducirajuće klostridije; S = *Salmonella* spp.; LM = *Listeria monocytogenes*

Dobiveni rezultati analiza za sve pretraživane parametre su i 65. dan od datuma proizvodnje bili zadovoljavajući.

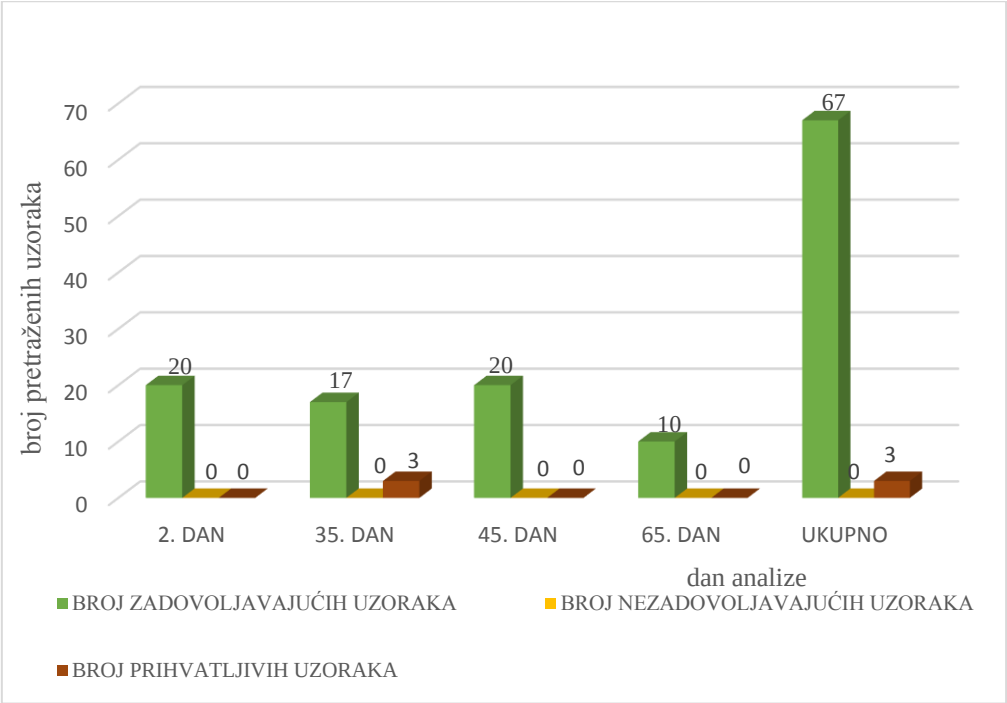
U Tablici 20. izdvojene su vrijednosti broja aerobnih mezofilnih bakterija u kontrolnim uzorcima proizvoda. Izdvojen je samo ovaj mikrobiološki parametar jer ostali mikroorganizmi nisu izolirani prilikom analiza.

Tablica 20. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u svim analiziranim kontrolnim uzorcima Kranjske kobasice (log_{10} cfu/g)

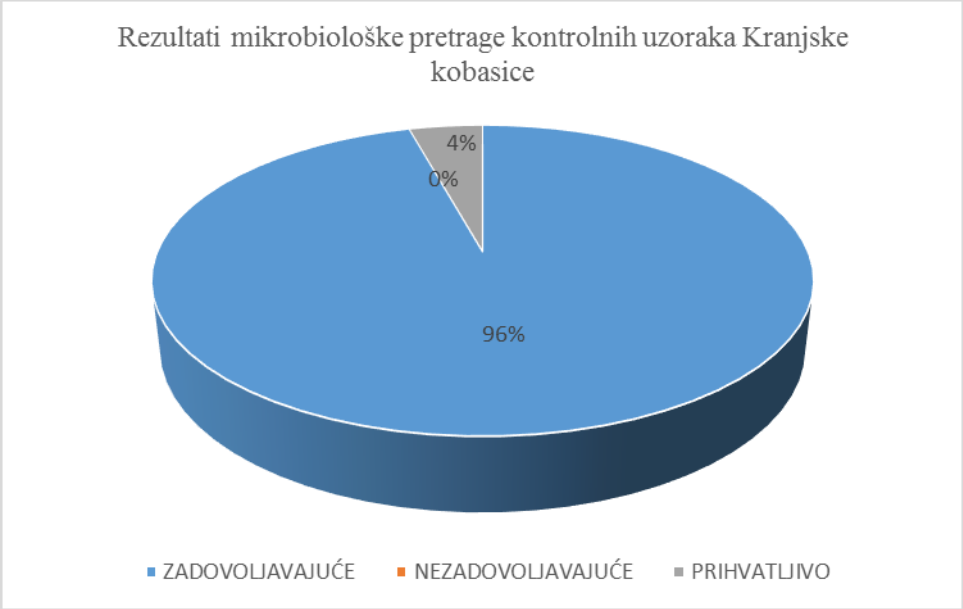
Datum početka analize	Dan u roku trajnosti	Aerobne mezofilne bakterije, log_{10} cfu/g									
		Redni broj uzorka									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
31.03.17.	2.	2,07	1,9	1,95	2,07	2,27	2,00	2,00	2,20	1,90	2,32
02.04.17.	2 + 2	2,30	2,25	2,84	2,41	2,34	2,00	2,20	2,25	2,47	2,32
03.05.17.	35.	**4,00**	**3,07**	2,38	2,20	2,32	2,20	2,14	2,07	2,38	2,50
05.05.17.	35 + 2	**3,32**	2,77	2,32	2,00	2,55	2,50	2,66	2,38	2,62	2,89
13.05.17.	45.	2,30	2,34	2,50	2,88	2,53	2,57	2,44	2,64	2,38	2,55
15.05.17.	45 + 2	2,68	2,69	2,68	2,71	2,79	2,74	2,55	2,66	2,77	2,73
02.06.17.	65.	2,80	2,74	2,34	2,64	2,47	2,77	2,73	2,44	2,50	2,76

U pretraženim uzorcima KK-ku u samo dvije pakovine prilikom analize 35. dana u roku trajnosti utvrđen je povećani broj aerobnih mezofilnih bakterija (4 log_{10} cfu/g, odnosno 3,07 log_{10} cfu/g). U istoj pakovini u uzorku 1 nakon dva dana pohrane u hladnjaku te ponovne analize utvrđen također veći broj bakterija (3,32 log_{10} cfu/g).

U Grafikonu 3. je prikazan broj zadovoljavajućih, prihvatljivih i nezadovoljavajućih rezultata s obzirom na utvrđeni broj aerobnih mezofilnih bakterija, a u Grafikonu 4 njihov udio.



Grafikon 3. Broj zadovoljavajućih, prihvatljivih i nezadovoljavajućih rezultata kontrolnih uzoraka Kranjske kobasice s obzirom na nalaz broja aerobnih mezofilnih bakterija



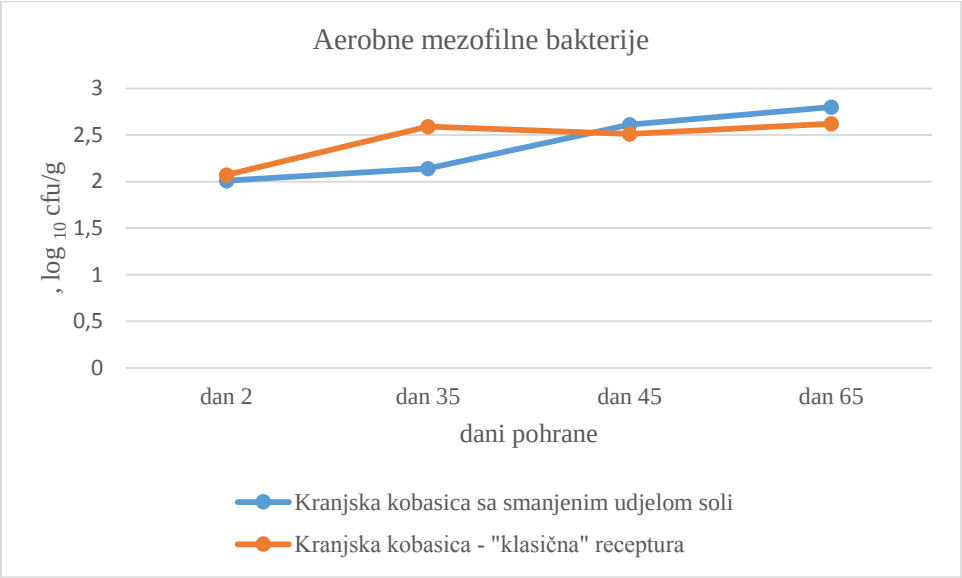
Grafikon 4. Ukupni udio zadovoljavajućih, prihvatljivih i nezadovoljavajućih rezultata mikrobiološke pretrage u kontrolnim uzorcima Kranjske kobasice

Skupni rezultati broja aerobnih mezofilnih bakterija u svim pretraženim uzorcima KK-sus i KK-ku tijekom promatranog razdoblja od 65 dana prikazani su u Tablici 21. Dobivene usporedne prosječne vrijednosti ukupnog broja bakterija utvrđenih tijekom 4 analitička perioda prikazane su u Grafikonu 5.

Tablica 21. Ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli i u kontrolnim uzorcima Kranjske kobasice (log_{10} cfu/g)

Dan u roku trajnosti	Aerobne mezofilne bakterije, log10 cfu/g										
	Redni broj uzorka										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$
Kranjska kobasica sa smanjenim udjelom soli											
2.	2,04	2,34	2,2	2,14	1,69	2,07	1,77	2,00	1,9	2,00	2,01
35.	2,07	2	2,25	2,34	1,9	2,14	2,20	2,07	2,14	2,30	2,14
45.	2,47	2,3	2,85	3	2,53	2,57	2,30	**3,38**	2,47	2,25	2,61
65.	3,00	**4,00**	2,53	2,55	2,41	2,38	3,00	2,94	2,66	2,62	2,81
Kranjska kobasica „klasična“ receptura – kontrolni uzorak											
2.	2,07	1,90	1,95	2,07	2,27	2,00	2,00	2,20	1,90	2,32	2,07
35.	**4,00**	**3,07**	2,38	2,20	2,32	2,2	2,14	2,07	2,38	2,50	2,59
45.	2,30	2,34	2,50	2,88	2,53	2,57	2,44	2,64	2,38	2,55	2,51
65.	2,80	2,74	2,34	2,64	2,47	2,77	2,73	2,44	2,50	2,76	2,62

Prosječni je ukupni broj bakterija u KK-sus na kraju roka trajnosti bio zadovoljavajuće mikrobiološke kakvoće i iznosio 2,81 log_{10} cfu/g . Nešto je manji broj utvrđen u KK-ku (2,62, log_{10} cfu/g).



Grafikon 5. Prosječni broja aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima kranjskih kobasica sa smanjenim udjelom soli i u kontrolnim uzorcima tijekom promatranog razdoblja od 65 dana

4.3. Kemijska pretraga

Prilikom izrade nutritivne tabele za Kranjsku kobasicu, provedene su analize natrija različitih zamjesa proizvoda. Prosječna vrijednost ispitivanih uzoraka iznosila je 1,87 g soli (što se podudara s teoretskim izračunom) te je temeljem dobivenih rezultata definiran udio soli u proizvodu od 1,9 g.

Tijekom procesa razvoja Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli, uključujući i prvu proizvodnju proizvoda prema novoj recepturi, provedene su analize uzoraka u Podravkinim laboratorijima kontrole kvalitete. U analiziranim uzorcima je dobivena prosječna vrijednost od 1,52 g soli. Na taj način, rezultati provedenih analiza natrija, potvrđuju nutritivnu deklaraciju na proizvodu sa smanjenim udjelom soli (1,4 g soli). Zbog prirode same sirovine i prirodnog odstupanja udjela natrija u sastavu mesa, prilikom utvrđivanja udjela soli u proizvodu moguća su odstupanja. Za proizvod koji u nutritivnoj tabeli sadrži ≥1,25 g soli na 100 g dozvoljeno je odstupanje od ±20% (ANON., 2012 a).

5. RASPRAVA

Za potvrdu mikrobne stabilnosti proizvoda Kranjska kobasica sa smanjenim udjelom soli, provedeno je 140 mikrobioloških analiza. Polovica analiza provedena je na uzorcima proizvoda koji je proizveden prema „klasičnoj“ recepturi, a 70 analiza na uzorcima proizvoda koji su proizvedeni prema novoj recepturi sa smanjenim udjelom soli i uz korištenje zamjene za sol (Supisol®). Svi uzorci su analizirani sukladno odredbama Uredbe (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (ANON., 2005) i sukladno preporučenim mikrobiološkim parametrima i kriterijima Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (ANON., 2011.).

Kranjska kobasica, prema Pravilniku o mesnim proizvodima (NN br. 131/12) spada u skupinu toplinski obrađenih kobasica i to u polutrajne kobasičarske proizvode (ANON., 2012.). Za ovu kategoriju uzoraka, preporučeni parametri i kriteriji iz Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2011.) u Podravki d.d. prihvaćeni su i kao interni mikrobiološki standard te su svi uzorcima pretraženi na nalaz sljedećih mikroorganizama: aerobne mezofilne bakterije, *Enterobacteriaceae,* koagulaza pozitivni stafilokoki / *S. aureus, Salmonella* spp.*, Listeria monocytogenes* i sulfitreducirajuće klostridije.

Kao što je vidljivo iz Tablice 4. prve analize na početku roka trajnosti pokazale su da pretraženi uzorci proizvoda sa smanjenim udjelom soli (n=10) odgovaraju odredbama Uredbe 2073/2005 i preporučenim mikrobiološkim parametrima i kriterijima Vodiča (ANON., 2011.). Potrebno je istaknuti da nisu utvrđene bakterije roda *Salmonella, L. monocytogenes*, dok je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka, sulfitreducirajućih klostridija i enterobakterija bio manji od 10 i ispod razine detekcije podloga.

Analiza ovih uzoraka je provedena i nakon čuvanja u hladnjaku te su dobiveni isti, zadovoljavajući rezultati (Tablica 5.).

Sredinom roka trajanja (35. dan), analizirano je novih 10 uzoraka iste proizvodne serije (Tablica 6.). Najniža vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija je u ovoj fazi ispitivanja iznosila 80 cfu/g (1,90 $\log_{10}$ cfu/g) do najviše $2{,}2 \times 10^2$ cfu/g (2,34 $\log_{10}$ cfu/g). Rezultati ukazuju i dalje na besprijekornu mikrobilošku sliku i sukladnost s mikrobiološkim kriterijima. Međutim, u uzorku pakovine broj 6 koja je analizirana dva dana nakon otvaranja vakuum pakiranja (Tablica 7.) ukupnu broj aerobnih mezofilnih bakterija je porastao na $2{,}1 \times 10^3$ cfu/g (3,07 $\log_{10}$ cfu/g). Zbog ovakvog nalaza, u ovoj fazi ispitivanja, rezultat analize tumačen je kao prihvatljiv a ne zadovoljavajući. Naime, prema odredbama propisa, kao što je to prikazano u Tablici 1., uzorak se tumači prihvatljivim jer se vrijednost ukupnog broja bakterija nalazi ispod maksimalne

dopuštene „M“, ali je veći od granične „m“ vrijednosti (između vrijednosti "m" i "M").

Na kraju roka trajnosti proizvoda, 45. i 47. dana ponovljeno je 20 analiza na 10 novih pakovina proizvoda sa smanjenim udjelom soli (Tablica 8 i Tablica 9.). Najniža dobivena vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima 45. dana u roku trajnosti je $1,8x10x10^2$ cfu/g (2,25 $\log_{10}$ cfu/g), a najviša $2,4x10^3$ cfu/g (3,38 $\log_{10}$ cfu/g) u uzorku broj 8 (Tablica 8.). Ta se vrijednost tumači kao prihvatljivi mikrobiološki kriterij (svaki se uzorak sastoji od 5 elementarnih jedinica, pa ukoliko je jedna vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija između “m“ i “M“ uzorak se smatra prihvatljivim).

Nakon analize 45. dana, otvoreni uzorak je pohranjen u hladnjaku i analiza je ponovljena za dva dana (Tablica 9.). U uzorcima broj 7 utvrđen je ukupni broj bakterija od $5,6x10^3$ cfu/g (3,74 $\log_{10}$ cfu/g), a u uzorku broj 8 taj je broj iznosio $4,8x10^3$ cfu/g (3,68 $\log_{10}$ cfu/g). Ti se nalazi također smatraju prihvatljivima.

Rezultati mikrobiološke analize uzoraka 65. dana od datuma proizvodnje prikazani su u Tablici 10. Na kraju ispitivanja grupe uzoraka KK-sus, najniža dobivena vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija je iznosila $2,4x10^2$ cfu/g (2,38 $\log_{10}$ cfu/g), a najviša $1x10^4$ cfu/g (4 $\log_{10}$ cfu/g). Upravo zbog posljednjeg rezultata i u ovom koraku ispitivanja, dobiven je jedan rezultat koji zbog dobivene vrijednosti aerobnih mezofilnih bakterija, tumačimo kao prihvatljiv.

Ukoliko pogledamo samo rezultate broja aerobnih mezofilnih bakterija u KK-sus prikazane u Tablici 11. i Tablici 21., kroz promatrano je razdoblje 5 uzoraka sadržavalo veći broj bakterija koji se procjenjuje još uvijek prihvatljivim kriterijem a proizvodi korektne mikrobiološke kakvoće. U većini promatranih uzoraka opažamo porast broja bakterija tijekom roka trajnosti, pa je on najmanji 2. dan, a očekivano najveći 65. dana (izvan roka roka trajnosti). Također, uzorci koji su nakon otvaranja pohranjeni u hladnjaku dva dana, što je deklarirani rok za konzumaciju kobasica (Uputa: nakon otvaranja konzumirati u roku od 2 dana) imaju povećani broj bakterija, ali za manje od 1 log što nije utjecalo na procjenu mikrobiološke kvalitete proizvoda.

Kod uzoraka proizvoda sa smanjenim udjelom soli (KK-sus), 5 od 70 uzoraka (7 %) daju prihvatljiv rezultat, dok je kod preostalih 65 dobiven zadovoljavajući rezultat analize (Grafikon 1.).

U uzorcima KK-sus je zabilježen rast aerobnih mezofilnih bakterija tijekom pohrane kroz 65 dana a prosječno je iznosio od 2,01 $\log_{10}$ cfu/g do 2,81 $\log_{10}$ cfu/g (Tablica 21, Grafikon 5).

Ulazna analiza 10 uzoraka kontrolnog uzorka (Kranjske kobasice proizvedene prema „staroj“ recepturi, KK-ku), pokazala je da svi uzorci odgovaraju odredbama Uredbe 2073/2005 o

mikrobiološkim kriterijima za hranu i kriterijima Vodiča o mikrobiološkim kriterijima za hranu (ANON., 2011.) odnosno svi su zdravstveno ispravni (Tablica 13.). Isti rezultat je dobiven na uzorcima koji su nakon otvaranja čuvani u hladnjaku 2 dana te ponovno postavljeni na mikrobiološku analizu.

Ovakvo tumačenje rezultata je zajedničko za sve analizirane uzorke u ovom ispitivanju. Odsustvo patogenih bakterija je nalaz kod svih 140 analiza koje su provedene tijekom ovog ispitivanja.

U uzorcima nije izolirana *Salmonella* spp*., L. monocytogenes*, niti zabilježen porast ostalih pretraživanih mikroorganizama, osim aerobnih mezofilnih bakterija (Tablice 13.-20.).

Isti mikrobiološki nalaz za ove parametre, dobiven je na Podravkinoj Kranjskoj kobasici i 2007.g. kada je Hrvatska udruga za zaštitu potrošača, provela Usporedne testove proizvoda uzetih sa polica različitih trgovina, (ANON., 2011.). Provedena je kontrola parametara zdravstvene ispravnosti u Zavodu za javno zdravstvo grada Zagreba. Odabrana je upravo Kranjska kobasica iz razloga što pripada kategoriji prehrambenih proizvoda s najširom potrošnjom u Republici Hrvatskoj. U navedenom ispitivanju u uzorku Podravkine Kranjske kobasice, kao i u uzorcima koji su analizirani u ovom ispitivanju bakterije *Salmonella* spp*. i L. monocytogenes* nisu izolirane, a dobivene vrijednosti za *S. aureus, Enterobacteriaceae* i sulfitreducirajuće klostridije su manje od njihovih dozvoljenih maksimalnih koncentracija.

Najniža vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija je na početku ispitivanja roka trajnosti kontrolnih uzoraka iznosila 80 cfu/g (1,90 $\log_{10}$ cfu/g), a najviša $7x10^2$ cfu/g (2,84 $\log_{10}$ cfu/g). Najviša vrijednost je dobivena na uzorku koji je nakon otvaranja čuvan u hladnjaku (Tablica 14.). Ovakav nalaz je očekivan i prisutan na većini uzoraka i u kasnijim fazama ispitivanja. U pakovinama nakon otvaranja, proizvodi više nisu u vakuumu te prisustvo kisika pogoduje razvoju aerobnih bakterija.

Sredinom roka trajanja, 35. dana, te nakon 2 dana po otvaranju pakovina, analizirano je novih 10 uzoraka na kojima je po istom principu provedeno 20 analiza (Tablica 15. i 16.). Najniža vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija je u ovoj fazi ispitivanja iznosila $1,0x10^2$ cfu/g ili 2 $\log_{10}$ cfu/g (Tablica 16.), a najviša $1x10^4$ cfu/g ili 4 $\log_{10}$ cfu/g (Tablica 15.). U ovoj fazi ispitivanja, tri uzorka imaju rezultat viši od $1x10^3$ cfu/g. Radi se o uzorcima KK-ku broj 1 i 2 (Tablica 15.) te o uzorku broj 1 (Tablica 16.) kod kojih se utvrđeni broj aerobnih mezofilnih bakterija nalazi između "m" i "M" vrijednosti (tumačenje u Tablici 1.) stoga se navedeni uzorci obzirom na preporučene mikrobiološke kriterije, smatraju prihvatljivim.

Kako je u svim uzorcima (n=70) proizvedenima prema „klasičnoj recepturi“, samo u ovom koraku dobiven prihvatljiv rezultat, moguće je da je razlog povećanog broja bakterija slučajni

propust, odnosno naknadna kontaminacija uzoraka od strane analitičara prilikom analize. Pogotovo, iz razloga što u kasnijim analizama kada je rok trajnosti proizvoda duži i očekuje se nešto viši broj aerobnih mezofilnih bakterija, nije ponovno dobiven niti jedan prihvatljiv rezultat. Osim navedenog, najviša dobivena vrijednost za aerobne mezofilne bakterije uzoraka 35. dan u roku trajnosti bila je $3,2x10^2$ cfu/g ("m"= 10^3 cfu/g; Tablica 15.).

Na kraju deklariranog roka trajanja proizvoda, 45. dan, analizirano je 10 novih pakovina te je na njima i u ovom koraku provedeno 20 analiza (Tablice 17. i 18.). Najniža dobivena vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija je iznosila $2,0x10^2$ cfu/g ili 2,30 $\log_{10}$ cfu/g, a najviša $7,6x10^2$ cfu/g (2,88 $\log_{10}$ cfu/g) (Tablica 17.).

Posljednjeg, 65. dana od datuma proizvodnje, na novih 10 uzoraka je provedena mikrobiološka analiza (Tablica 19.). Na kraju ispitivanja kontrolnih uzoraka najniža dobivena vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija je iznosila $2,2x10^2$ cfu/g (2,34 $\log_{10}$ cfu/g), a najviša $6,4x10^2$ cfu/g (2,80 $\log_{10}$ cfu/g). Napominjemo još jednom da su svi uzorci kao i u ranijim fazama ispitivanja zdravstveno ispravni te u uzorcima nije izolirana *Salmonella* spp.*, Listeria monocytogenes*, niti zabilježen porast ostalih pretraživanih mikroorganizama.

Iz svega navedenog je vidljivo da kod ove grupe uzoraka 3 od 70 uzoraka (4 %) daju prihvatljiv rezultat, a kod svih preostalih analiza, njih 67, dobiven je zadovoljavajući rezultat analize (Grafikoni 3. i 4.).

Prosječna vrijednost broja aerobnih mezofilnih bakterija u KK-ku kretala se od 2,07 $\log_{10}$ cfu/g drugog dana i rasla sve do 2,62 $\log_{10}$ cfu/g posljednjeg, 65. dana roka trajnosti proizvoda. (Tablica 21).

Prosječni broj aerobnih mezofilnih bakterija povećavao se s odmicanjem roka trajnosti u pretraženim uzorcima KK-sus i KK-ku. Prosječni ukupni broj bakterija bio je u ulaznoj analizi nešto niži u KK-sus, no posljednjeg je dana ukupni broj bio nešto veći od onoga utvrđenoga u KK-ku. Međutim, svi rezultati su zadovoljavajući, ispod minimalne dopuštene granične vrijednosti od 3 $\log_{10}$ cfu/g.

ZELENAKOVA i sur. (2011) se u procjeni mikrobiološke kvalitete kuhanih kobasičarskih proizvoda tijekom roka trajnosti, također baziraju primarno na broj na aerobnih mezofilnih bakterija, a zatim i prisutnost enterobakterija i koliformnih bakterija. Radi usporedbe, navedeni autori su u svom istraživanju dobili prosječnu vrijednost aerobnih mezofilnih bakterija u gramu proizvoda 5 $\log_{10}$ cfu/g, odnosno 4,86 $\log_{10}$ cfu/g u uzorcima drugih vrsta proizvoda, u analizama uzoraka na sam datum proizvodnje. Ove vrijednosti su veće od prosječnih vrijednosti koje su dobivene u našem ispitivanju.

Na koncu treba istaknuti da neovisno o kretanju broja aerobnih mezofilnih bakterija u pojedinim uzorcima kobasica (KK-sus i KK-ku) tijekom ispitivanog razdoblja, dobivene prosječne vrijednosti u našem istraživanju ne premašuju najveći dopušteni broj bakterija (m) prema odredbama propisa. Jednako tako, prosječni broj bakterija bio je unutar dopuštenih granica u uzorcima koji su analizirani dva dana nakon otvaranja (potvrda navoda na deklaraciji).

Kao što je prethodno navedeno, u proizvodima sa smanjenim udjelom soli korišten je Supisol®. Ovaj proizvod kao zamjena za sol sastoji se od kombinacije triju različitih soli; natrijevog klorida, kalijevog klorida i kalij-magnezij citrata. Korištenjem Supisola, na deklaraciji proizvoda je moguće dodatno istaknuti navod 25% - 40% manje natrija/soli, u odnosu na konvencionalne proizvode (proizvedene s običnom soli) i u ovisnosti o ostalim sastojcima u proizvodu.

REDDY i MARTH (1991.) su u svom radu koji je napisan prije gotovo tri desetljeća, a govori o smanjenju sadržaja soli u hrani, naveli da se u svim proizvodima pa tako i mesnim, kao zamjena za sol najčešće i najuspješnije koristi kalij klorid. Još se u studijama FDA (US Food and Drug Administration) iz 1978. godine nalazi podatak da meso i riba u prehrani njihovih građana doprinose s 13 % soli, a da upravo mesna industrija koristi najviše soli u preradi svojih proizvoda. Rezultati istraživanja koje su objavili ALINO i sur. (2010), kao i naše istraživanje, potvrđuju da je u svrhu smanjenja udjela soli moguća djelomična zamjena NaCl s drugim kloridnim solima (KCl, $CaCl_2$ and $MgCl_2$) bez opasnosti za sigurnost proizvoda. Navedeno potvrđuju i GELABERT i sur. (2003) koji nakon provedenog istraživanja zaključuju da djelomična zamjena NaCl u fermentiranim kobasicama s kalijevim kloridom, kalijevim laktatom i glicinom, imaju mali utjecaj na mikrobnu stabilnost. BIDLAS i LAMBERT (2008.) uspoređuju antimikrobni učinak NaCl i KCl te zaključuju da je moguća djelomična ili potpuna zamjena ove dvije soli kada je funkcija soli pomoć kod „zaštite“ proizvoda.

RUUSENEN i POULANNE (2005.) navode da je sadržaj soli do 1,4 % u kuhanim kobasicama dovoljan da se u proizvodu dobije toplinski stabilan gel, čvrstoća i vezanje vode. Upravo je navedeni udio soli od 1,4 g sadrži Kranjska kobasica koja je proizvedena prema novoj recepturi sa smanjenim udjelom soli. Deklarirani udio soli u novim proizvodima, potvrđen je analizama uzoraka proizvoda u Podravkinim laboratorijima Kontrole kvalitete ali i u vanjskom, ovlaštenom laboratoriju. Analize uzoraka tijekom procesa razvoja novog proizvoda, uključujući i prvu proizvodnju prema recepturi sa smanjenim udjelom soli, daju prosječnu vrijednost od 1,5 g soli u svim analiziranim uzorcima. Dobivene vrijednosti za natrij, odnosno udio soli, potvrđuju nutritivnu deklaraciju na proizvodu (uračunato je dozvoljeno odstupanje od ±20 % za proizvod koji sadrži ≥1,25 g soli).

Provedena usporedna organoleptička testiranja uzoraka sa smanjenim udjelom soli i kontrolnih uzoraka, potvrđuju da nova receptura za Kranjsku kobasicu sa smanjenim udjelom soli uz korištenje zamjene za sol, daje proizvod koji se svojim organoleptičkim karakteristikama ne razlikuje od proizvoda koji je proizveden prema prijašnjoj, „klasičnoj" recepturi. Prosječna ocjena svih ispitivanih uzoraka KK-sus je 3,86, a prosječna ocjena ispitivanih kontrolnih uzoraka je 3,91. Niti jedna promatrana karakteristika nije ocijenjena izvan raspona ocjena od 3 do 5 (interni standard za organoleptičku ocjenu uzoraka propisuje da su ocjene u rasponu od 3 do 5 odgovarajuće, što znači da je ocjenjivana karakteristika zadovoljavajuća i u skladu s proizvođačkom specifikacijom i opisom izgleda, okusa, mirisa i konzistencije proizvoda).

LIEM i sur. (2011.) navode da kalijev klorid kao zamjena za natrijeve soli, smanjuje slanost hrane, a u velikim koncentracijama može rezultirati metalnim ili gorkim okusom proizvoda. Usprkos navedenom, zamjena soli natrija, kalijevim solima, svakako je jedan je od načina smanjenja soli u proizvodima. Isto u svom radu navodi i KEAST (2010.); iako su natrij i litij (koji se zbog svoje toksičnosti ne koristi u prehrani) jedini poznati kationi koji daju čisti slani okus hrani, i kalij utječe na slanost. Stoga se korištenjem kalijevih soli može smanjiti udio natrija u namirnicama, i to na način da potrošači ne osjete smanjeni udio soli, odnosno manju slanost proizvoda.

Rezultati prikazani u ovom radu, potvrdili su mikrobnu stabilnost proizvoda sa smanjenim udjelom soli i korištenjem zamjene za sol te su potvrđeni dosadašnji rokovi trajnosti na ovoj vrsti proizvoda. Drugačije rezultate istraživanja mikrobiološke ispravnosti i potvrdu roka trajanja termički obrađenih kobasičarskih proizvoda pakiranih u vakuumu objavili su MANTIS i sur. (2006.). Dobiveni rezultati nisu bili zadovoljavajući te su ukazali na potrebu skraćivanja roka trajnosti te nekih preinaka u provedbi HACCP sustava. Navedeni autori u analiziranim proizvodima nisu izolirali bakterije *Salmonella* spp*, L. monocytogenes* i sulfitreducirajuće klostridije, no za razliku od našeg ispitivanja, u svojim su uzorcima izolirali *Enterobacteriaceae* i *Staphylococcus* spp.

DESMOND (2006.), objavljuje članak o izazovima u mesnoj industriji kada je u pitanju smanjenje soli. Autor navodi da studije pokazuju da smanjenje NaCl za 50 %, na udio od 1,25 % ili zamjena sa KCl ili MgCl u mljevenoj svinjetini, ne znači značajnu razliku u ukupnom broju mikroorganizama. Ipak, važno je ispitati rok trajnosti i sigurnost mesnih proizvoda prije nego što se smanjuje udio soli, odnosno kada se umjesto NaCl uvode zamjene za sol, što je ovim radom i učinjeno.

6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenih mikrobioloških ispitivanja i obrade dobivenih rezultata analiza, zaključci ovog rada su sljedeći:

- Svi analizirani uzorci Kranjske kobasice sa smanjenim udjelom soli, kao i kontrolni uzorci zdravstveno su ispravni sukladno važećem zakonodavstvu RH i Europske Unije.

- U uzorcima nisu izolirani patogeni mikroorganizmi: *Salmonella* spp*., L. monocytogenes, Enterobacteriaceae*, koagulaza pozitivni stafilokoki/ S. *aureus* i sulfitreducirajuće klostridije što je potvrda uređenog sustava sigurnosti hrane, poštivanja HACCP principa te kontinuiranog provođenja dobre proizvođačke i dobre higijenske prakse u proizvodnji kobasičarskih proizvoda.

- Utvrđene vrijednosti aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima Kranjskih kobasica sa smanjenim udjelom soli u odnosu na kontrolnu skupinu ne pokazuju velika odstupanja. Dobivene prosječne vrijednosti ukupnog broja bakterija manje su od preporučenih dopuštenih vrijednosti za ovu vrstu proizvoda.

- Smanjeni udio soli u proizvodu uz korištenje Podravkinog proizvoda Supisol®, koji je zamjena za sol, nije utjecao na mikrobnu stabilnost.

- Potvrđeni su postojeći rokovi trajnosti za proizvod Kranjska kobasica proizveden prema novoj recepturi sa smanjenim udjelom soli (45 dana).

7. LITERATURA

ALINO, M., R. GRAU, F. TOLDRA, E. BLESA, M. J. PAGAN, J. M. BARAT (2010): Physicochemical properties and microbiology of dry-cured loins obtained by partial sodium replacement with potassium, calcium and magnesium. Meat Sci 85 (2010) 580–588

ANONIMNO (2012): Veterinarski priručnik. VI. izdanje. Herak-Perković, Vlasta; Grabarević, Željko; Kos, Josip (ur.). Zagreb, Medicinska naklada, 2012

ANONIMNO (2003): Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima (ISO 15213:2003)

ANONIMNO (2004): 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 (ISO 6888- 1:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6888-1:1999+A1:2003)

ANONIMNO (2004 a): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja Listeria monocytogenes -- 1. dio: Metoda dokazivanja -- Amandman 1: Modifikacija podloge za izolaciju, test hemolize i uključivanje podataka o točnosti (ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004; EN ISO 11290 1:1996/A1:2004)

ANONIMNO (2005) Uredba (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu

ANONIMNO (2006): Uredba (EZ) br. 1924/2006 od 20. prosinca 2006. o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama

ANONIMNO (2007): Usporedni testovi proizvoda. Hrvatska udruga za zaštitu potrošača

ANONIMNO (2008) Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae -- 2. dio: Metoda određivanja broja kolonija (ISO 21528-2:2004)

ANONIMNO (2008 a): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti Salmonella spp (ISO 6579:2002/Cor 1:2004; EN ISO 6579:2002/AC:2006)

ANONIMNO (2011): Vodič o mikrobiološkim kriterijima za hranu (3. izdanje, MPRiRR, 2011)

ANONIMNO (2011 a): Uredba EU br. 1169/2011 od 25. listopada 2011. informiranju potrošača

o hrani

ANONIMNO (2012): Pravilnik o mesnim proizvodima (NN br. 131/12)

ANONIMNO (2012 a): Smjernice za nadležna tijela za provjeru usklađenosti sa sljedećim zakonodavstvom EU-a: Uredbom (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani, izmjeni uredbi (EZ) br. 1924/2006 i (EZ) br. 1925/2006 Europskog parlamenta i Vijeća te o stavljanju izvan snage Direktive Komisije 87/250/EEZ, Direktivom Vijeća 90/496/EEZ, Direktivom Komisije 1999/10/EZ, Direktivom 2000/13/EZ Europskog parlamenta i Vijeća, Direktivom Komisije 2002/67/EZ i 2008/5/EZ i Uredbe Komisije (EZ) br. 608/2004 i Direktivom Vijeća 90/496/EEZ od 24. lipnja 1990. o označivanju hranjive vrijednosti hrane i Direktivom 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 10. lipnja 2002. o usklađivanju zakona država članica u odnosu na dodatke prehrani u pogledu utvrđivanja dopuštenih odstupanja za vrijednosti hranjivih tvari navedenih na etiketi. Europska komisija

ANONIMNO (2013): Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN br. 81/13)

ANONIMNO (2013 a): Mikrobiologija lanca hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijevanja podloge (ISO 4833-1:2013; EN ISO 4833-1:2013)

ANONIMNO (2014): Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015.-2019.

ANONIMNO (2014 a): Znanstveno mišljenje o učinku smanjenog unosa kuhinjske soli u prehranu ljudi. HAH

ANONIMNO (2014 b): letak Manje soli – više zdravlja. HAH, Ministarstvo zdravlja, Ministarstvo poljoprivrede, HZJZ, Hrvatsko društvo za hipertenziju, Hrvatsko društvo za aterosklerozu, Hrvatsko kardiološko društvo

ANONIMNO (2016): Guidance Note No. 3 Guidelines for the Interpretation of Results of Microbiological Testing of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market (Revision 2). Food Safety Authority of Ireland

ANONIMNO (2016 a): Radna uputa Razvoj proizvoda. Podravka, Razvoj proizvoda

ANONIMNO (2017): HACCP studija 05- Polutrajni kobasičarski i suhomesnati proizvodi. Podravka, tvornica Danica

ANONIMNO (2017 a): Katalog metoda ispitivanja. Podravka, Kontrola kvalitete

ANONIMNO (2017 b): Specifikacija proizvoda - Kranjske kobasice. Podravka, Razvoj mesnih proizvoda

BIDLAS, E., R. J. W. LAMBERT (2008): Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. Int J Food Microbiol, 124, 98–102

CVETNIĆ, Ž. (2013): Bakterijske i gljivične zoonoze. Medicinska naklada Zagreb

DESMOND, E. (2006): Reducing salt: A challenge for the meat industry. Meat Sci 74, 188–196

DOKO JELINIĆ, J., A. NOLA, D. ANDABAKA (2010): Prehrambena industrija – utjecaj soli na potrošače, Znanstveni skup Kardiovaskularno zdravlje. Prehrana i sol. Zagreb, 21. studenoga 2008. Knjiga sažetaka radova 11-12

DURAKOVIĆ, S., F. DELAŠ, B. STILINOVIĆ, L. DURAKOVIĆ (2002): Moderna mikrobiologija namirnica, knjiga prva, Zagreb, 2002. Udžbenici sveučilišta u Zagrebu

GELABERT, J., P. GOU, L. GUERRERO, J. ARNAU (2003): Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages. Meat Sci 65, 833–839

JELAKOVIĆ, B., I. VUKOVIĆ, Ž. REINER (2010): Arterijska hipertenzija i kuhinjska sol. Acta Med Croatica, 64, 105-110

KAIĆ-RAK A., J. PUCARIN – CVETKOVIĆ, I. HEIM, B. SKUPNJAK (2009): Razlozi za smanjenje soli u prehrani i potencijalni učinak na zdravlje populacije – preporuke svjetske zdravstvene organizacije. Acta Med Croatica, 64, 129-132

KEAST, R (2010): Salt; Health; Functionality and Flavor Nu-Tek Products. Literature Review Salt Taste, June 1. http://www.malabarsuperspice.com/docs/salt_DrKeast _Literature_ Review .pdf (pristupljeno 10.9.2017.)

LIEM, D. G., F. MIREMADI, R. S. J. KEAST (2011): Reducing Sodium in Foods: The Effect on Flavor. Nutrients, 3, 694-711

MacGREGOR, G. (2010): Sol - od dokaza do primjene. Acta Med Croatica, 64, 75-77

MANTIS, F. N., I. TSACHEV, O. SABATAKOU, A. R. BURRIEL, A. VACALOPOULOS, S. B. RAMANTANIS (2005): Safety and shelf-life of widely distributed vacuum packed, heat treated sausages. Bulg J Vet Medicine, 8, 245-254

MARINCULIĆ, A., B. HABRUN, LJ. BARBIĆ, R. BECK (2009): Biološke opasnosti u hrani. Hrvatska agencija za hranu HAH

MIOKOVIĆ, B., N. ZDOLEC (2004): Značenje halofilnih bakterija u preradi mesa i ribe. Meso,

VI, 36-42

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija, specijalna bakteriologija i mikologija. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu

REINER, Ž., B. JELAKOVIĆ (2010): Manje soli – više zdravlja: mogućnosti prevenciji u Hrvatskoj. Acta Med Croatica, 64, 79-81

REDDY, K. A., E. H. MARTH (1991): Reducing the Sodium Content of Foods: A Review. J Food Protect 54, 138-150

RUUSUNEN, M., E. POULANNE (2005): Reducing sodium intake from meat products. Meat Sci 70, 531-41

SAVIĆ, I., Ž. M. MILOSAVLJEVIĆ (1983): Higijena i tehnologija mesa. Privredni pregled. Beograd

ZELENAKOVA, L., S. KUNOVA, L. LOPAŠOVSKY (2011): Evaluation of microbiological quality of cooked meat products during their shelf life. Maso International Brno 1,15-20

ŽIVKOVIĆ, J (1986): Higijena i tehnologija mesa, II dio, Kakvoća i prerada. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Veterinarski fakultet

ŽLENDER, B (2009): Smanjenje koncentracije soli u mesnim proizvodima. Meso XI, 189-195

8. ŽIVOTOPIS

Lidija Zemljak, dr. med. vet., rođena je u Koprivnici 17.11.1978. godine, gdje je završila osnovnu školu i opću gimnaziju. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 1997. godine, a diplomirala je u rujnu 2004. godine. Sljedeće godine se zapošljava u prehrambenoj industriji Podravka, u mikrobiološkom laboratoriju mesnih proizvoda. Nastavlja raditi u mikrobiološkom laboratoriju te je od 2008. godine voditelj laboratorija. Početkom 2015. godine, da bi nadogradila i usavršila stečena znanja, upisuje poslijediplomski specijalistički studij "Mikrobiologija i epizootiologija" na Veterinarskom fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od početka radnog vijeka, član je Hrvatskog mikrobiološkog društva, Sekcije za mikrobiologiju hrane.