

Utjecaj *Enterococcus faecalis* 101 na kakvoću trajnih kobasica iz domaćinstva

Čop, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:178:981503>

Rights / Prava: [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

Matea Čop

**UTJECAJ *ENTEROCOCCUS FAECALIS* 101 NA
KAKVOĆU TRAJNIH KOBASICA IZ DOMAĆINSTVA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU
I SIGURNOST HRANE

Predstojnica:

Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić

Mentor:

Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva:

- 1. Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić**
- 2. Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski**
- 3. Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec**
- 4. Izv. prof. dr. sc. Željka Cvrtila (zamjena)**

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1. Tehnologija proizvodnje trajnih kobasica	3
2.2. Proizvodnja trajnih kobasica u domaćinstvu	4
2.3. Starter kulture	6
2.4. Enterokoki i trajne kobasice	7
3. MATERIJAL I METODE	10
3.1. Identifikacija <i>Enterococcus faecalis</i> 101 i njegova antimikrobna aktivnost	10
3.2. Priprema inokuluma <i>Enterococcus faecalis</i> 101 za primjenu u kobasicama	11
3.3. Proizvodnja trajnih kobasica	11
3.4. Uzorkovanje i analize	11
4. REZULTATI	14
5. RASPRAVA	19
6. ZAKLJUČAK	21
7. LITERATURA	22
8. SAŽETAK	26
9. SUMMARY	27
10. ŽIVOTOPIS	28

Zahvala

Želim se zahvaliti svom mentoru doc. dr. sc. Neviju Zdolecu na strpljenju, pomoći i savjetima prilikom pisanja diplomskog rada.

Također se želim zahvaliti svojim roditeljima na velikoj podršci tijekom cijelog studija, kao i cijeloj svojoj obitelji i prijateljima koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom studiranja.

1. UVOD

Trajne kobasice vrlo su cijenjeni mesni proizvodi zbog zahtjevnih procesa proizvodnje, visoko kvalitetnih sastojaka i primamljivih senzornih svojstava. S druge strane, ti se proizvodi mogu razmatrati i kao izvor tvari sa zdravstveno nepoželjnim učincima po potrošače, vezanima uz visok sadržaj soli, zasićenih masti, kolesterola i dr. (POPELKA, 2016.). Mikrobiološki, ti proizvodi rijetko su rizični u smislu patogene mikroflore, no to je ovisno o vrsti proizvoda, fizikalno-kemijskim svojstvima kobasica te eventualnoj naknadnoj kontaminaciji (npr. narezivanje). U posljednje vrijeme preispituje se i pojava prenosivih gena rezistencije u prirodnoj apatogenoj mikroflori kobasica; bakterijama mliječne kiseline ili stafilokokima (ZDOLEC i sur., 2013.; ZDOLEC, 2016.). Smanjenje mikrobioloških rizika može se postići različitim tehnologijama i njihovim kombinacijama, poznatih kao „hurdle concept“ (KAMENIK, 2016.). Najbrojnije i biološki najaktivnije skupine mikroorganizama u nadjevu pojedinih vrsta fermentiranih kobasica su bakterije mliječne kiseline, stafilokoki i mikrokoki, te kvasci i plijesni pa se iste mogu primijeniti i u obliku starter kultura. Svrha dodavanja starter kultura je ujednačavanje kakvoće proizvoda (senzorna svojstva) i ubrzavanje proizvodnog procesa. Jedna od mogućnosti sistiranja nepoželjne mikroflore ili autohtone mikroflore u kobasicama je primjena mikrobnih starter kultura koje pokazuju i antimikrobna svojstva, ili primjena njihovih antimikrobnih metabolita poput bakteriocina. Među bakterijama mliječne kiseline, enterokoki često pokazuju antimikrobno djelovanje sintezom bakteriocina enterocina (FRAQUEZA i sur., 2016.).

Mišljenja o higijenskom i tehnološkom značenju enterokoka u nadjevu fermentiranih kobasica često su oprečna; s jedne strane pripisuje im se utjecaj na senzorna svojstva budući da su fermentacijske bakterije, dok su s druge strane pojedine vrste izazivači kvarenja mesa ali i potencijalni patogeni te nositelji rezistentnih gena. Enterokoki mogu preživjeti i umnažati se tijekom fermentacije u mesnim i mliječnim proizvodima, posebno u proizvodima bez uporabe kompetitivnih starter-kultura (ZDOLEC, 2007.). Enterokoki su prisutni posvuda u okolišu, a u fermentiranoj hrani imaju tehnološki značaj u razvoju senzornih svojstava. Koriste se i kao starter kulture u mljekarstvu, no moraju zadovoljiti preduvjete sigurnosti, poput izostanka gena rezistencije, virulentnih faktora ili produkcije biogenih amina. Antimikrobna aktivnost enterokoka ispoljava se primarno prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama, a najznačajnija je inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* (SPARO i sur., 2008.). Vrlo je malo istraživanja provedeno o primjenjivosti enterokoka u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda, uglavnom kao biozaštitnih kultura (RUBIO i sur., 2013.; CENCI GOGA i sur.,

2016.). Cilj je ovog diplomskog rada ispitati inhibicijski potencijal soja *Enterococcus faecalis* 101 izoliranog iz sirovog mlijeka na *L. monocytogenes in vitro* te isti soj primijeniti kao starter kulturu u tradicionalnoj proizvodnji fermentiranih kobasica u domaćinstvu.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Tehnologija proizvodnje trajnih kobasica

Trajne kobasice su prema Pravilniku o mesnim proizvodima definirane kao proizvodi od mesa, masnog tkiva i dodatnih sastojaka koji se nakon obrade i punjenja podvrgavaju postupcima fermentacije, sušenja i zrenja sa ili bez dimljenja. Trajne kobasice trebaju sadržavati minimalno 16% bjelancevina te maksimalno do 40% vode. Karakteristika proizvodnje trajnih kobasica je što se ne podvrgavaju toplinskoj obradi već procesu fermentacije tj. zrenja. Na tržište se stavljaju pod nazivima kao što su kulen, zimska, čajna, srijemska salama ili pod drugim nazivima (ANONIMNO, 2012.).

Prvi korak u proizvodnji je priprema sirovina odnosno hlađenje polovica, te potom njihovo rasijecanje i iskoštavanje koje se treba obaviti brzo kako bi se meso što prije dovelo u uvjete za cijedenje i usitnjavanje. Postupak cijedenja mesa određeno vrijeme snižava aktivitet vode u mesu što utječe na postizanje boljih svojstava i održivosti gotovog proizvoda. Priprema se meso prve kategorije, čvrsto masno tkivo koje se smrzuje, začini, soli za salamurenje. Slijedeći korak je mljevenje mesa i masnog tkiva i slanine (ako se dodaje) te njihovo usitnjavanje u kuteru uz dodavanje određenog redoslijeda sastojaka nadjeva odnosno začina, soli za suho salamurenje i eventualno starter kultura. Nadjev se miješa u mješalici koja ne smije drobiti i gnječiti meso te ga treba vizualno pregledati prije punjenja kako bi se utvrdilo da li su svi sastojci homogeni umiješani i dostatno povezani. Nakon toga se nadjev puni u ovitke koji mogu biti prirodni i umjetni, automatskim vakuum punilicama. Vrlo važno je istisnuti zrak iz nadjeva da se izbjegne stvaranje šupljina u nadjevu. Nakon nadijevanja slijedi najbitniji korak za proizvodnju trajnih kobasica, a to je priprema za zrenje. Trajne kobasice se smještaju u dimne komore ili klasične pušnice za hladno dimljenje koje traje 5-7 dana na temperaturi od 10-15°C (ŽIVKOVIĆ, 1986.). Proces dimljenja spada u najstarije grane tehnologije mesa jer se na taj način meso konzervira pa mu se produžava održivost i dobiva intenzivnu aromu na dim (RADETIĆ, 1997.). Dimljenje i zrenje tj. fermentacija se provodi u komorama čiji je rad u suvremenim industrijama uglavnom automatiziran putem programa koji su specifični za pojedine vrste kobasica. Zrenje odnosno fermentacija je proces koji počinje već u trenutku punjenja nadjeva u ovitke, a završava u trenutku konzumiranja kobasica. Zrenje je faza koja se smatra presudnom za razvoj poželjnih, svojstvenih senzornih svojstava. Tijekom procesa zrenja se odvijaju složene kemijske, strukturalne, mikrobiološke i fizikalne promjene i dolazi do formiranja boje, povezivanja komponenti nadjeva uz nastanak odgovarajuće konzistencije

proizvoda, promjene pH i aktiviteta vode (a_w) te promjena mirisa i okusa. Prema duljini zrenja trajne kobasice smo podijelili na suhe to jest sporofermentirane i prosušene odnosno brzofermentirane kod kojih je skraćeno vrijeme zrenja. Trajne kobasice na presjeku trebaju imati izgled mozaika, sastojci trebaju biti međusobno čvrsto povezani i ravnomjerno raspoređeni te na presjeku ne smije biti niti pukotina niti šupljina. Ovitak treba dobro prijanjati uz nadjev, a površina kobasice ne smije biti deformirana (ŽIVKOVIĆ, 1986.).

Kobasicama se ocjenjuje kakvoća na temelju procjene senzornih svojstava (izgled presjeka, nadjev to jest boja mesa i masnog tkiva, konzistencija te miris i okus). Međutim, ti parametri mogu biti promijenjeni ako dođe do grešaka u proizvodnji trajnih kobasica (tehnološke greške). Greške trajnih kobasica se odnose na promjene vanjskog izgleda, nadjeva te mirisa i okusa, a rezultiraju smanjenjem vrijednosti ili čak dovode u pitanje upotrebljivost za ljudsku prehranu. Najčešće greške vanjskog izgleda trajnih kobasica su: naboran ovitak koji može nastati zbog prebrzog sušenja, odvajanje ovitaka zbog visoke relativne vlažnosti zraka u komori za zrenje, promašćenost ovitka koja može nastati uslijed visokog dimljenja i pojava neželjene zelene plijesni na ovitku što može nastati kao posljedica slabe regulacije vlažnosti zraka tijekom zrenja. Greške u promjeni nadjeva se najčešće očituju u promjeni strukture ili boje nadjeva, a mogu biti: taman rub koji može biti posljedica previsoke temperature, a niske relativne vlažnosti u komori za zrenje, šupljikavost i poroznost koje najčešće nastaju zbog nepravilnog nadjevanja i zaostajanja zraka te kao posljedica nedovoljnog zrenja i cijedenja mesa može nastati slaba povezanost nadjeva. Promjene mirisa i okusa trajnih kobasica karakterizira pojava kiselkastog, neugodnog mirisa nadjeva što se otkriva prerezivanjem kobasica. Najčešći oblik kvarenja trajnih kobasica je ranketljivost koja se razvija od površine prema središtu kobasice (MAJIĆ i FILIPOVIĆ, 2005.).

2.2. Proizvodnja trajnih kobasica u domaćinstvu

Trajne fermentirane kobasice imaju značajno mjesto u gastronomiji Republike Hrvatske budući da posjeduju karakterističnu aromu i okus te imaju produžen rok trajanja. Proizvode se od različitih vrsta mesa mada ipak dominira meso obične svinje. Najčešće se proizvode u domaćinstvima prema tradicionalnim recepturama koje su se prenosile godinama s generacije na generaciju i uglavnom bez dodataka starter-kultura pa im organoleptička svojstva i mikrobiološka stabilnost ovise o prisutnoj mikroflori (ŽGOMBA MAKSIMOVIĆ i sur., 2015.) Međutim, prirodna proizvodnja fermentiranih kobasica nije količinski dovoljna za potrebe tržišta, a i ne pruža standardnu kakvoću. Postupci proizvodnje domaćih kobasica svode se na

nekoliko proizvodnih postupaka, a to su: izbor i priprema sirovine, izbor i obrada ovitaka, izrada nadjeva i nadijevanje te dimljenje, zrenje i skladištenje. Trajne se kobasice proizvode za vrijeme svinjokolje odnosno u zimskim mjesecima (BENČEVIĆ i PETRIČEVIĆ, 1999.).

Proizvodnja domaćih trajnih kobasica u našoj zemlji ima jako dugu tradiciju (ŽIVKOVIĆ, 1986.). Tijekom procesa zrenja se odvijaju jako složeni mikrobiološki, biokemijski ali i fizikalno-kemijski procesi koji utječu na sigurnost i na kakvoću proizvoda (HADŽIOSMANOVIĆ i sur., 2005.). Stupanj početne mikrobne kontaminacije će ovisiti o mikrobiološkoj kakvoći sirovine i dodataka kao i o (ne)higijenskom pristupu prilikom proizvodnje (ZDOLEC, 2007.). Tipične fermentirane kobasice su karakteristične za određena područja (npr. slika 1, Prigorje) kako po svojoj tehnologiji proizvodnje i karakterističnim senzornim svojstvima tako i po dominaciji određene vrste mikroorganizama u nadjevu.



Slika 1. Tradicionalne fermentirane kobasice iz domaćinstva (snimio: Nevijo Zdolec)

Istraživanja prirodne mikroflore kobasica temelje se na praćenju promjena populacije pojedinih vrsta mikroorganizama tijekom svih faza zrenja, a vrste i sojevi se određuju molekulskim metodama (URSO i sur., 2006; CVRČILA, 2006.). U istraživanju mikrobioloških promjena tijekom 90-dnevnog zrenja tradicionalnih fermentiranih kobasica proizvedenih u domaćinstvu dokazana je lošija higijenska kakvoća sirovine i nadjeva u odnosu na istraživanja

industrijskih brzofermentirajućih kobasica. Također je dokazan i sporiji proces acidifikacije što ima za posljedicu sporije potiskivanje nepoželjne mikroflore. Najprije je i u mesu i masnom tkivu, kao i u nadjevu dokazano mikrobiološko onečišćenje enterobakterijama, enterokokima, klostridijama i *S.aureus*. U nadjevu se tijekom procesa zrenja povećavao broj bakterija mliječne kiseline sve do 21.dana kada se ustalio, a isto se dogodilo i sa ukupnim brojem bakterija. Nakon 21. dana zrenja se smanjivala populacija enterokoka, a u gotovom proizvodu je bila manja u odnosu na početnu vrijednost. U nadjevu su do 60. dana zrenja utvrđene enterobakterije te *Staphylococcus aureus* do 33.dana. Međutim, na samom kraju proizvodnog procesa u nadjevu nisu utvrđene patogene bakterije odnosno mikrobiološki nalaz je ipak zadovoljavao mikrobiološke standarde (ZDOLEC i sur., 2007.).

2.3. Starter kulture

Kakvoća tradicionalnih trajnih kobasica proizvedenih u domaćinstvima proizlazi iz spontane fermentacije djelovanjem autohtonih mikroorganizama u nadjevu. Ova činjenica ukazuje na značajan prikriveni potencijal autohtone mikroflore u razvoju kobasičarske proizvodnje na poljoprivrednim gospodarstvima i/ili obrtima. Naime, praćenjem dinamike razvoja mikrobne ekologije tijekom zrenja tradicionalnih trajnih kobasica moguće je utvrditi koje mikrobne vrste dominiraju i time najviše doprinose razvoju poželjnih svojstava gotovog proizvoda (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.). Laboratorijskom karakterizacijom izolata mogu se pronaći najoptimalniji sojevi za praktičnu primjenu u pokusnoj tradicionalnoj i kontroliranoj (komora za zrenje) proizvodnji. Selekcijom i primjenom autohtonih starter kultura može se očekivati tehnološki pomak u smislu ujednačenosti proizvoda i standardizacije kakvoće, ali i zdravstveni doprinos u smislu smanjenja postojećih mikrobioloških rizika (ZDOLEC i sur., 2013.).

Suvremeno doba je dovelo do razvoja i usavršavanja tehnologije postupaka proizvodnje pa se i zbog toga i prethodno navedenih razloga naturalna proizvodnja pretočila u industrijske okvire. Sve to dovodi do zaključka da se danas proizvode kobasice koje su kvalitetne i zdravstveno ispravne čime se ujedno bolje štite i sami potrošači. Fermentacija, kao što je već prije navedeno je proces koji je ovisan o biološkoj aktivnosti fermentacijskih mikroorganizama. Svaki tip odnosno vrsta kobasica ima karakterističan sastav mikroflore, a to ponajprije ovisi o higijenskoj kakvoći korištene sirovine i dodataka, tehnološkim postupcima i o mikroklimatskim uvjetima zrenja. Budući da se uvidjela uloga i značenje mikroorganizama tijekom procesa zrenja fermentiranih namirnica, uvidjela se i mogućnost primjene selektiranih sojeva i to u

obliku starter kultura (ZDOLEC, 2007.). Mesne starter kulture su preparati koji sadrže aktivne mikroorganizme koji u mesu razvijaju svoju metaboličku aktivnost i uzrokuju promjene senzornih svojstava (HAMMES, 1990.). Primjena starter kultura u proizvodnji fermentiranih kobasica je rezultirala ubrzanjem proizvodnog procesa te unaprijeđenjem kakvoće gotovih proizvoda (ZDOLEC, 2007.). Bakterije mliječne kiseline (BMK) su vrlo rasprostranjene u prirodi pa ih se može nerijetko izolirati iz sline i fecesa i ljudi i životinja. Tijekom procesa proizvodnje fermentiranih kobasica BMK zajedno sa drugim mikroorganizmima iz okoliša i opreme kontaminiraju mješavinu mesa. Bakterije mliječne kiseline sudjeluju u stvaranju poželjnih senzornih svojstava i značajno mogu utjecati i na mikrobiološku kakvoću fermentiranih proizvoda. U suvremenoj proizvodnji se radi selekcija i primjena sojeva bakterija mliječne kiseline kao starter kultura jer može osigurati mikrobiološku kvalitetu krajnjeg proizvoda (ŽGOMBA MASIMOVIĆ i sur., 2015.). Zaštitna uloga nekih starter mikroorganizama, posebice bakterija mliječne kiseline je bitna naročito u kontekstu sigurnosti fermentiranih kobasica, te se očituje antagonističkim djelovanjem prema mikroorganizmima kvarenja i patogenim mikroorganizmima preko antimikrobnih produkata kao što su organske kiseline ili bakteriocina (ZDOLEC, 2007.). Iz svih navedenih razloga, bakterije mliječne kiseline se dugo koriste kao starter kulture u industrijskoj proizvodnji fermentiranih proizvoda (HADŽIOSMANOVIĆ, 1978.). Upotreba starter kultura u Republici Hrvatskoj regulirana je Pravilnikom o mesnim proizvodima (ANONIMNO, 2012.).

Tradicionalne kobasice kroz proces spontane fermentacije imaju široku mikrobnu paletu poželjnih divljih sojeva i veću metaboličku aktivnost u usporedbi s komercijalnim starterima (LEROY i sur., 2006.). U istraživanju FRECE i sur. (2014.) uspoređivao se utjecaj autohtonih sojeva koji su izolirani iz tradicionalnih kobasica sa utjecajem komercijalnih starter kultura na kvalitetu industrijskih kobasica. Utvrđeno je da autohtoni sojevi imaju prednost nad komercijalnim sojevima u pogledu senzornih karakteristika i mikrobiološke stabilnosti kobasica jer imaju sposobnost preživljavanja tijekom industrijske proizvodnje. Iz svega toga je proizašao zaključak da komercijalni starteri nisu isto uspješni u svim tipovima kobasica i da se zbog toga treba pristupiti selekciji prikladnih sojeva koji će u određenoj mješavini mesa i načinu fermentacije moći održati i brojnost i metaboličku aktivnost. ŽGOMBA MAKSIMOVIĆ i sur. (2015.) objašnjavaju da je glavna uloga bakterija mliječne kiseline u proizvodnji kobasica u acidifikaciji smjese odnosno u sniženju pH čime je onemogućen razvoj nepoželjnih mikroorganizama. Laktobacili su najzastupljeniji unutar skupine bakterija mliječne kiseline u proizvodnji tradicijskih fermentiranih kobasica dok komercijalne starter kulture uglavnom čini mješavina rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* sa stafilokokima i/ili mikrokokima.

Otkako se bakterije mliječne kiseline koriste kao starteri, istraživanja su se sve više usmjerila na pronalazak bakteriocinogenih sojeva. Posljednjih godina je jako napredovala selekcija bakteriocinogenih sojeva s ciljem otkrivanja najjačih antagonista i tehnološki prihvatljivih vrsta kako bi se mogli primjenjivati u proizvodnji (HADŽIOSMANOVIĆ i sur., 2005; JAY i sur., 2005.). Svrha dodavanja mikrobnih starter kultura i bakteriocinogenih kultura bakterija mliječne kiseline u fermentirane kobasice jest potiskivanje bakterija kvarenja kao i eventualno prisutnih patogenih mikroorganizama (ZDOLEC, 2007.).

2.4. Enterokoki i trajne kobasice

Bakterije iz roda *Enterococcus* (enterokoki) su nekada bile uvrštene u rod *Streptococcus* pa se u veterinarskoj praksi još i danas znaju nazivati Streptokokima. U suvremenoj mikrobiologiji rod *Enterococcus* (grč. énteron, crijevo; kókkos, zrno) pripada porodici *Enterococcaceae*. Enterokoki su vrlo prošireni u okolišu, kako ljudi tako i životinja, u koji dospiju uglavnom izmetinama kralježnjaka. Kuglasta su ili jajolika oblika, boje se Gram pozitivno, nemaju mikroskopski vidljivu kapsulu i uglavnom nisu glibljivi. Enterokoki su fakultativni anaerobi s fermentacijskim tipom metabolizma, a tijekom razgradnje ugljikohidrata uglavnom tvore L(+) mliječnu kiselinu te ne tvore katalazu. Rastu na temperaturama od 10°C do 45°C i pri pH od 9.6. Premda rod *Enterococcus* sadrži više različitih vrsta bakterija, za higijenu hrane najveći značaj imaju fekalni enterokoki odnosno serološka D grupa (*E. faecalis*). *Enterococcus faecalis* (lat. faex, izmetine; sin *Streptococcus faecalis*) je bakterija koja se nalazi posvuda, a redovito u crijevu čovjeka i životinja, u otpadnim vodama, na biljkama ali i u namirnicama. Kod ljudi može uzrokovati čitav niz oboljenja, kao npr. mokraćno-spolne infekcije, enteritis, endokarditis, meningitis, septikemiju te infekcije kože i rana. *E. faecalis* u svinje, konja, kunića i zamoraca može uzrokovati endokarditis. Vrlo lako postaje otporan na antimikrobne pripravke, a etiološka dijagnoza se postavlja na temelju bakteriološke pretrage. Premda *E. faecalis* nije dokazani patogen, mliječni proizvodi i proizvodi od mesa koji su kontaminirani ovom bakterijom su uključeni u neke slučajeve bolesti (NAGLIĆ i sur., 2005.).

Unatoč navedenim potencijalnim patogenim svojstvima, određeni sojevi *E. faecalis* ne pokazuju virulentna svojstva, ne tvore biogene amine niti su otporni na antibiotike. To ih čak čini potencijalno primjenjivima u nadjevu kao starter kultura. Nadalje, brojni enterokoki produciraju bakteriocine, enterocine koji mogu poslužiti kao zaštitne kulture posebno prema bakteriji *L. monocytogenes*. U istraživanju koje su proveli SPARO i sur. (2005.) korišten je soj iz okoliša *E. faecalis* CEC7121 u proizvodnji fermentiranih kobasica te su dokazali da nudi

svojsta biozaštite. CALLEWAERT i sur. (2000.). Koristili su dva soja enterokoka kao starter kulture tijekom fermentacije kobasica te su dokazali da snažno inhibiraju rast bakterija *Listeria* spp.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Identifikacija *Enterococcus faecalis* 101 i njegova antimikrobna aktivnost

Enterococcus faecalis 101 izdvojen je iz sirovog mlijeka primjenom Enterococcus Compass agara (Bio-Kar, Francuska) u prijašnjem istraživanju (DOBRANIĆ i sur., 2016.). Identifikacija soja provedena je pomoću MALDI-TOF MS nakon ekstrakcije etanolom/formic kiselinom prema preporukama proizvođača (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka). Kolonije su otopljene u 300 µL vode (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i potom je dodano 900 µL etanola (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska). Supernatant je odbačen nakon centrifugiranja na 13 000 *g* tijekom 2 minute. Talog je potom pomiješan s 10 µL 70 %-tne mravlje kiseline (v/v) (Sigma-Aldrich, SAD) te je dodana ista količina acetonitrila (Sigma-Aldrich, SAD) i ponovno je centrifugiran. 1 µL supernatanta je nanesen na ploču, osušen na sobnoj temperaturi i potom pokriven s 1 µL MALDI matriksa (zasićena otopina α -cyano-4-hidroksicinamične kiseline (HCCA, Bruker Daltonik, Njemačka) u 50 % acetonitrila i 2.5 % trifluorooctene kiseline (Sigma-Aldrich, SAD) te ponovno sušen na sobnoj temperature. Maseni spektri su automatski određivani primjenom microflex LT MALDI TOF masenog spektrometra (Bruker Daltonik, Njemačka) u the linear positive mode u rasponu masa od 2 000-20 000 Da. Instrument je kalibriran primjenom Bruker bakterijskih standarda. Zabilježeni spektri masa obrađeni su pomoću MALDI Biotyper 3.0 kompjuterskog programa (Bruker Daltonik, Njemačka). Rezultat MALDI Biotyper-a izražen je kao logaritamska vrijednost u rasponu 0–3.0 što predstavlja vjerojatnost točne identifikacije izolata, temeljem usporedbe proteinskih profila nepoznatog izolata s referentnim spektrom u bazi podataka. Izolat je također identificiran biokemijski pomoću API Strep sustava (bioMerieux, Francuska).

Antimikrobna aktivnost izolata testirana je agar difuzijskim testom primjenom bakterije *L. monocytogenes* ATCC 7644 kao indikatorskog mikroorganizma. Soj je namnažan u MRS bujonu (Merck, Darmstadt, Njemačka) tijekom 24 h na 37 °C. Potom je aktivna kultura centrifugirana na 10000 *g* tijekom 10 minuta na 4 °C. Supernatant je izdvojen te neutraliziran s 1M NaOH. Brain Heart Infusion agar je prekriven s mekim (0,8 % agara) BHI agarom u koji je dodano 0,1 ml kulture *L. monocytogenes*. Potom su načinjene jažice u koje je dodano 100 µl kulture *E. faecalis* 101, supernatanta kulture te neutraliziranog supernatanta. Ploče su potom ostavljene 1 sat u hladnjaku i zatim inkubirane 24 h na 37 °C. Po inkubaciji provjerena je pojava zone inhibicije rasta *L. monocytogenes*. Pojava zone inhibicije oko jažice s neutraliziranim supernatantom smatra se posljedicom djelovanja inhibitora koji nije organska kiselina.

3.2. Priprema inokuluma *Enterococcus faecalis* 101 za primjenu u kobasicama

Enterococcus faecalis 101 namnažan je u MRS bujonu tijekom 24 h na 37 °C nakon čega je provjeren broj stanica u 1 ml na MRS agaru. Postupak namnažanja je ponovljen i provedeno je centrifugiranje kulture nakon čega su stanice isprane dvaput u fiziološkoj otopini te potom otopljene u sterilnoj destiliranoj vodi. Ponovno je provjeren broj stanica u ml otopine na MRS agaru. Dan prije pripreme nadjeva pripremljen je inokulum na način da je odabrano razrjeđenje koje je inokulirano u 5 kg nadjeva čime je postignut broj stanica *E. faecalis* od 10^5 po gramu nadjeva kobasica.

3.3. Proizvodnja trajnih kobasica

U pripremi nadjeva korišteno je 10 kg svinjske vratine s pripadajućim masnim tkivom koja je kupljena u jednom supermarketu gdje je i usitnjena strojem za mljevenje mesa. U domaćinstvu je u sirovinu dodano 2 % kuhinjske soli te komercijalna smjesa začina i aditiva (Derma, Varaždin). Nadjev je podijeljen u dva jednaka dijela (5 kg svaki) nakon čega je jedan dio inokuliran kulturom *E. faecalis* 101. Nakon miješanja nadjev je punjen ručnom punilicom u svinjska tanka crijeva (38-42 mm; Derma, Varaždin). Kobasice su ovješene u pušnicu gdje su dimljene pet puta svaki drugi dan po nekoliko sati korištenjem hladnog dima bukve i graba. Nakon faze dimljenja kobasice su ostavljene na sušenju i zrenju u tavanskim prostorijama do 40. dana od dana nadijevanja.

3.4. Uzorkovanje i analize

Dvije skupine kobasica uzorkovane su 0., 7., 14., 30. i 40. dana proizvodnje te je određivan ukupni broj bakterija na Plate Count Agar (PCA, bioMerieux, Francuska) inkubiranjem 72 h na 30 °C, broj bakterija mliječne kiseline na MRS agaru (Merck, Njemačka) inkubiranjem 48 h na 30 °C, broj enterokoka na Compass Enterococcus agar (Bio-Kar, Francuska) inkubiranjem 24 h na 37 °C, broj kvasaca i plijesni na Yeast Glucose Chloramphenicol agaru (Merck) tijekom 5 dana na 25 °C, broj *Pseudomonas* spp. na Cetrimide agaru (Oxoid, UK) inkubiranjem 24 h na 25 °C, *Staphylococcus aureus* na Baird-Parker agaru (Merck, Njemačka) te *Listeria monocytogenes* na ALOA agaru (Oxoid, UK) inkubiranjem 24-48 h na 37 °C i *Yersinia enterocolitica* na CIN agaru (bioMerieux, Francuska) tijekom 24 h na 30 °C. U uzorcima je određivana aktivnost vode (HigroPalm AW1, Rotronic, Švicarska),

količina NaCl po Mohru te pH u iscrpini digitalnim pH-metrom (pH 510 Eutech Instruments, Nizozemska). Kobasice su na kraju istraživanja ocijenjene organoleptički od strane 7 ocjenjivača prema protokolu (ZDOLEC, 2007.):

1. Prije kušanja:

a) ocjena boje

loše (1 do 10) dobro

b) ocjena izgleda presjeka

loše (1 do 10) dobro

c) ocjena povezanosti nadjeva (povezanost masnog i mišićnog tkiva)

loše (1 do 10) dobro

2. Ocjena mirisa proizvoda

Postoji li neugodan miris?

DA

NE

Ako DA:

Opiši

Prekini ocjenjivanje

Ako NE, ocijeni

loše (1 do 10) dobro

3. Kušaj proizvod i ocijeni:

a) užeglost

loše (1 do 10) dobro

b) kakvoća masti

loše (1 do 10) dobro

c) kiselost

loše (1 do 10) dobro

d) sočnost

loše (1 do 10) dobro

e) nježnost

loše (1 do 10) dobro

f) okus općenito

loše (1 do 10) dobro

4. Ocjena proizvoda 10 minuta nakon kušanja

loše (1 do 10) dobro

5. Ocjena ukupnog dojma senzorskih svojstava

loše (1 do 10) dobro

Na slikama 2-4 prikazane su kobasice iz istraživanja, prema fazama zrenja (0.-40. dan), te presjek kobasica (40. dan)



Slika 2. Kontrolne i eksperimentalne kobasice prema danima zrenja (s lijeva na desno od 0., 7., 14., 30. i 40. dan). Snimila: Matea Čop



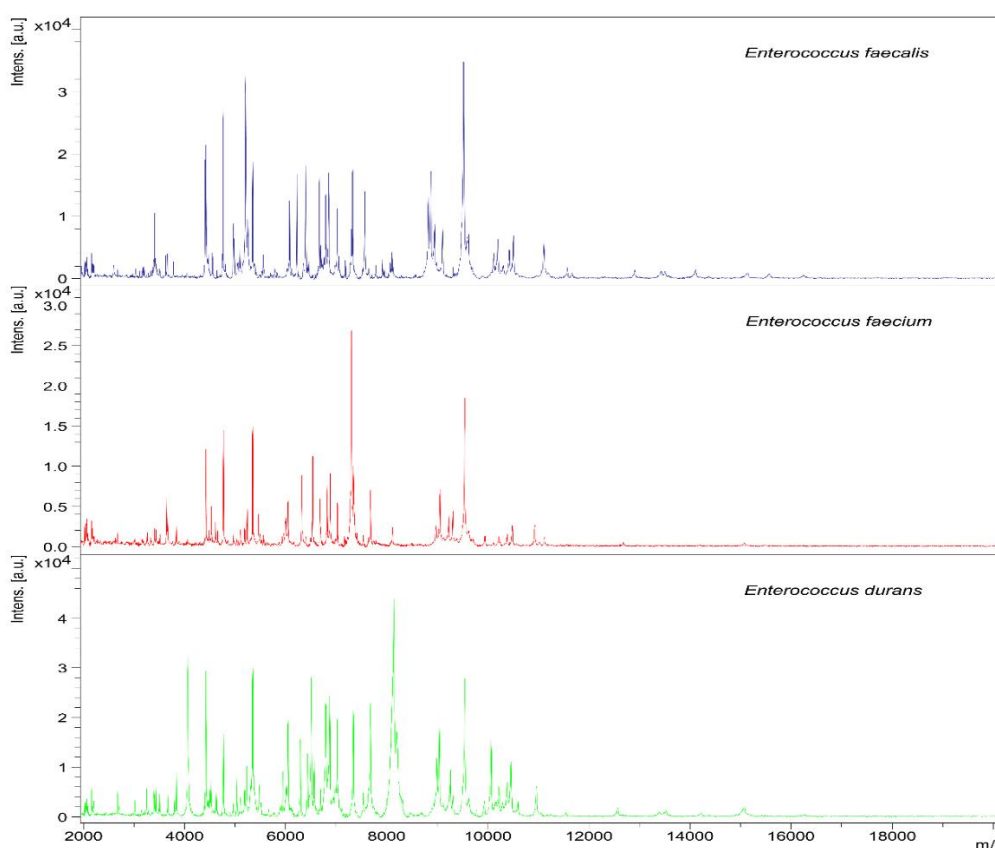
Slika 3 i 4. Presjek kobasica na kraju zrenja. Snimila: Matea Čop

4. REZULTATI

MALDI – TOF MS identifikacijom utvrđeno je da soj pripada vrsti *Enterococcus faecalis*. Na slici 5 prikazani su spektri masa pojedinih vrsta enterokoka, uključujući *E. faecalis* iz ovog istraživanja.

Tablica 1. Prikaz rezultata MALDI-TOF MS identifikacije izolata enterokoka iz mlijeka

AnalyteID		Organism(best match)	ScoreValue
101		Enterococcus faecalis	2.163
F9	101	Enterococcus faecalis 20247_4 CHB	2,163
		Enterococcus faecalis ATCC 7080 THL	2,082
		Enterococcus faecalis ATCC 29212 CHB	2,076
		Enterococcus faecalis 104575 LDW	2,028
		Enterococcus faecalis DSM 6134 DSM	1,813
		Enterococcus faecalis 105652 LDW	1,765
		Enterococcus faecalis DSM 2570 DSM	1,765
		Enterococcus faecalis DSM 20478T JUG	1,764



Slika 5. Spektri masa odabranih vrsta enterokoka (MALDI-TOF MS; snimila: dr.sc. Snježana Kazazić, Institut Ruđer Bošković)

Testiranjem inhibicijskog djelovanja *E. faecalis* 101 prema *L. monocytogenes* preliminarno smo utvrdili zone inhibicije rasta patogena aktivnom kulturom i neutraliziranim supernatantom što može upućivati na moguću produkciju enterocina.

Tablica 2. Broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU/g) tijekom zrenja kobasica sa i bez dodatka kulture *Enterococcus faecalis* 101

	Dan zrenja				
	0	7	14	30	40
Kontrolne kobasice	$6,3 \times 10^4$	$2,58 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
Kobasice s <i>E. faecalis</i>	$6,3 \times 10^5$	$4,7 \times 10^6$	$8,16 \times 10^6$	$1,75 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$

Rezultati iz Tablice 2. pokazuju da je broj aerobnih mezofilnih bakterija u kontrolnim kobasicama bio manji za približno 1 log u odnosu na kobasice s dodatkom *E. faecalis* do 30. dana zrenja, da bi u gotovom proizvodu bio podjednak u obje skupine kobasica. U kobasicama s kulturom *E. faecalis* broj aerobnih mezofilnih bakterija se povećavao do 14. dana (8×10^6 CFU/g) te potom smanjivao za 1 log prema kraju zrenja. U kontrolnim se kobasicama broj značajno povećavao u ranijoj fazi fermentacije (do 14. dana).

Tablica 3. Broj kvasaca i plijesni (CFU/g) tijekom zrenja kobasica sa i bez dodatka kulture *Enterococcus faecalis* 101

	Dan zrenja				
	0	7	14	30	40
Kontrolne kobasice	<100	<100	<100	<100	5×10^2
Kobasice s <i>E. faecalis</i>	<100	$6,8 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$	6×10^2	5×10^2

Rezultati iz Tablice 3 pokazuju da je broj kvasaca i plijesni u kontrolnim kobasicama bio ispod granica detekcije metode brojenja (< 100 CFU/g), i tek neznatno veći od tog 40. dana zrenja. U

kobasicama s kulturom *E. faecalis* broj kvasaca i plijesni se povećavao do 14. dana ($2,9 \times 10^4$ CFU/g) te potom smanjivao na neznatnih 5×10^2 CFU/g.

Tablica 4. Broj enterokoka (CFU/g) tijekom zrenja kobasica sa i bez dodatka kulture *Enterococcus faecalis* 101

	Dan zrenja				
	0	7	14	30	40
Kontrolne kobasice	<100	<100	<100	<100	<100
Kobasice s <i>E. faecalis</i>	$4,05 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5$	$2,79 \times 10^5$	$3,7 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$

Rezultati iz Tablice 4. pokazuju da je broj enterokoka u kontrolnim kobasicama bio ispod 100 CFU/g što govori o dobroj higijenskoj praksi u proizvodnji. U kobasicama s kulturom *E. faecalis* broj enterokoka bio je na razini 10^5 CFU/g tijekom zrenja, bez značajnih odstupanja.

Tablica 5. Broj bakterija mliječne kiseline (CFU/g) tijekom zrenja kobasica sa i bez dodatka kulture *Enterococcus faecalis* 101

	Dan zrenja				
	0	7	14	30	40
Kontrolne kobasice	2×10^3	$3,2 \times 10^3$	10^4	3×10^3	$8,5 \times 10^4$
Kobasice s <i>E. faecalis</i>	$1,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$8,4 \times 10^5$

Rezultati iz Tablice 5. pokazuju da je broj bakterija mliječne kiseline u kontrolnim kobasicama bio za 1 – 2 log manji u odnosu na kobasice s kulturom *E. faecalis* u pojedinim fazama zrenja. Porast populacije je zabilježen u kontrolnim kobasicama, dok je primjenom kulture enterokoka broj bakterija mliječne kiseline bio na razini 5 log.

Tablica 6. Aktivnost vode (a_w) tijekom zrenja kobasica sa i bez dodatka kulture *Enterococcus faecalis* 101

	Dan zrenja				
	0	7	14	30	40
Kontrolne kobasice	0,959	0,936	0,908	0,776	0,770
Kobasice s <i>E. faecalis</i>	0,955	0,936	0,924	0,780	0,780

Aktivnost vode (Tablica 6.) se kontinuirano smanjivala tijekom zrenja kobasica. Do 14. dana nije se razlikovala između dvije skupine kobasica. U drugoj fazi zrenja aktivnost vode je bila veća u kobasicama s primijenjenom kulturom *E. faecalis* 101.

Tablica 7. Količina soli (NaCl) tijekom zrenja kobasica sa i bez dodatka kulture *Enterococcus faecalis* 101

	Dan zrenja				
	0	7	14	30	40
Kontrolne kobasice	3,36	4,58	5,8	5,8	5,85
Kobasice s <i>E. faecalis</i>	3,13	4,29	5,8	5,8	5,9

Količina soli (Tablica 7.) se kontinuirano povećavala tijekom zrenja kobasica, znatnije u prvim fazama procesa. Nije bilo značajnih razlika u količini soli u skupinama kobasica.

Tablica 8. pH tijekom zrenja kobasica sa i bez dodatka kulture *Enterococcus faecalis* 101

	Dan zrenja				
	0	7	14	30	40
Kontrolne kobasice	5,69	5,44	5,49	5,67	5,9
Kobasice s <i>E. faecalis</i>	5,67	5,35	5,38	5,44	5,6

Iz Tablice 8. vidljivo je da je pH vrijednost bila niža za 0,2 – 0,3 jedinice u kobasicama s dodatkom kulture *E. faecalis*. pH se u obje skupine kobasica smanjivao do 14. dana i potom blago rastao prema kraju zrenja.

Tablica 9. Senzorska ocjena* kobasica proizvedenih s *Enterococcus faecalis*

Pokazatelj	Kontrolne Kobasice	Kobasice s <i>Enterococcus faecalis</i>
Boja	8,71	8,57
Presjek	8,57	8,71
Povezanost nadjeva	9,00	9,00
Neugodan miris		
Da		
Ne	Ne	Ne
Miris	8,71	8,85
Ranketljivost	9,71	/
Kakvoća masti	9,28	/
Kiselost	8,42	/
Sočnost	7,85	/
Nježnost	7,14	/
Okus općenito	9,00	/
Dojam nakon kušanja	8,57	/
Ukupni dojam	9,00	9,00

* skala ocjena od 1 do 10

Senzornom ocjenom kontrolnih kobasica najbolje su ocijenjena svojstva kvalitete masti, okusa, mirisa, a najslabijim ocjenama svojstva nježnosti i sočnosti što je vjerojatno posljedica presušenosti kobasica. Kobasice s kulturom *E. faecalis* su ocjenjivane bez kušanja i nisu pokazale nikakva odstupanja u kvalitetu ocjenjivanih svojstava u odnosu na kontrolne kobasice.

5. RASPRAVA

Enterokoki su bakterije koje se često istražuju kao potencijalne zaštitne kulture u proizvodnji hrane budući da brojni sojevi produciraju bakteriocine, peptide s antimikrobnim aktivnošću prema patogenim bakterijama i bakterijama kvarenja (LAUKOVA, 2012.). U našem testiranju soja *E. faecalis* 101 utvrđena je inhibicija rasta *L. monocytogenes* što može biti rezultat djelovanja enterocina, no za tu tvrdnju je potrebna daljnja karakterizacija soja koja je u tijeku. Budući je soj *E. faecalis* 101 izoliran iz sirovog mlijeka (DOBRANIĆ i sur., 2016; ZDOLEC i sur., 2016.) zanimljivo bi bilo istraživanje i njegova antimikrobna djelovanja na patogenu floru iz vimena (mastitis). Svrha pak ovog istraživanja bila je primijeniti navedeni soj iz mlijeka u mesnom supstratu tj. nadjevu trajne kobasice. Enterokoki su dio uobičajene mikroflore fermentiranih kobasica, no znatno variraju s obzirom na brojnost populacije u različitim tipovima kobasica (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.).

U mikroflori fermentiranih kobasica dominiraju bakterije mliječne kiseline i stafilocoki/mikrokokci. U početku fermentacije, u nadjevu nalazimo brojne kontaminante uključujući enterobakterije, *Pseudomonas* spp. i dr. koji daljnjom fermentacijom i acidifikacijom propadaju (PARAMITHIOTIS i DROSINOS, 2016.). U našem istraživanju na početku fermentacije nisu utvrđeni kontaminanti poput *E. coli*, enterokoka te patogena *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*. Razlozi dobre mikrobiološke slike sirovine su u optimalnoj higijenskoj praksi u proizvodnji svinjetine koja je za potrebe istraživanja nabavljena u supermarketu. Suprotni su rezultati dobiveni istraživanjem mikroflore nadjeva kobasica dobivenih iz sirovine iz domaćinstva (ZDOLEC i sur., 2007.) pri čemu je u mesu, masnom tkivu te pripremljenom nadjevu zabilježeno značajno mikrobiološko onečišćenje enterobakterijama ($3,47\text{--}3,54 \log_{10}$ CFU/g), enterokokima ($2,00\text{--}4,43 \log_{10}$ CFU/g), klostridijama ($1\text{--}2 \log_{10}$ CFU/g) i *S. aureus* ($2,6\text{--}3,47 \log_{10}$ CFU/g). U nadjevu kobasica tijekom zrenja broj se bakterija mliječne kiseline višestruko povećao do 21. dana i ostao ustaljen ($8 \log_{10}$ CFU/g) do kraja proizvodnog procesa. Promjene ukupnog broja bakterija pratile su trend promjena bakterija mliječne kiseline. Populacija enterokoka se nakon 21. dana zrenja smanjivala progresivno i u gotovom proizvodu bila za 1,7 log manja u odnosu na početni broj. Populacija kvasaca ($>5 \log_{10}$ CFU/g) i koagulaza negativnih koka ($3,5 \log_{10}$ CFU/g) nije se značajno mijenjala tijekom zrenja. Enterobakterije su utvrđene u nadjevu do 60. dana, *S. aureus* do 33. dana, a sulfitreducirajuće klostridije do osmog dana zrenja. Autori stoga zaključuju da tradicionalno proizvedene kobasice u domaćinstvu pokazuju lošiju higijensku kakvoću sirovine i pripremljenog nadjeva, te polaganiji proces acidifikacije s posljedičnim sporijim

potiskivanjem nepoželjne mikroflore u odnosu na industrijske brzofermentirane kobasice. S druge strane, proizvodnjom kobasica u kontroliranim uvjetima i bržom fermentacijom postiže se brža eliminacija nepoželjnih bakterija iz nadjeva (ZDOLEC i sur., 2008.).

Trend rasta u nadjevu fermentiranih kobasica pokazuju bakterije mliječne kiseline i aerobne mezofilne bakterije, ponajviše u početnoj fazi fermentacije (KOZAČINSKI i sur., 2006.; ZDOLEC i sur., 2008.). Prema GIRAFFA-i (2002.) i HUGAS i sur. (2003.) enterokoki mogu preživjeti i umnažati se tijekom fermentacije u mesnim proizvodima, posebno u proizvodima bez uporabe kompetitivnih starter kultura (tradicionalni fermentirani mesni proizvodi). Istraživanjem autohtonih hrvatskih fermentiranih kobasica zabilježen je kontinuiran porast populacije enterokoka za 1,53 log (ZDOLEC i sur., 2008.). U ovom našem istraživanju enterokoka nije bilo u kontrolnim kobasicama. Inokulacijom kulture *E. faecalis* 101 iz mlijeka u nadjev kobasica (10^5 CFU/g) broj se enterokoka nije značajno mijenjao tijekom zrenja. Budući se populacija održala stabilnom, možemo pretpostaviti da se soj dobro prilagodio uvjetima fermentacije mesa, no potrebna su daljnja istraživanja i pokusne proizvodnje. RUBIO i sur. (2013.) istraživali su primjenjivost tri bakteriocinogena soja enterokoka u slabo kiselim fermentiranim kobasicama s ciljem smanjivanja populacije *L. monocytogenes* i *S. aureus*. Sva tri soja uspješno su prerasla prirodnu mikrofluoru enterokoka, a dva su soja potpuno inhibirala rast *L. monocytogenes* tijekom zrenja kobasica, no ne i *S. aureus*. Zanimljivo je istraživanje SPAROA i sur. (2008.) koji su koristili kulturu *Enterococcus faecalis* mliječnog podrijetla u proizvodnji fermentiranih kobasica. Autori nisu našli statistički značajnih razlika između kontrolne i kobasica u koje je inokulirana kultura *E. faecalis* CECT7121 s obzirom na proizvodnju mliječne kiseline, pH oscilacije, postizanja minimalne vrijednosti pH od 5,1 i senzoričke analize u obje serije. Kobasice s inokuliranom *E. faecalis* CECT7121 su imale manji broj populacije enterobakterija, *S. aureus* i drugih Gram⁺ koka na kraju fermentacije.

Nadalje, iz rezultata našeg istraživanja može se naglasiti povoljan utjecaj dodane kulture na senzorna svojstva koja su u najmanju ruku na razini kvalitete kontrolnih kobasica. Da bi se mogla provesti potpuna ocjena svojstava kobasica s dodatkom *E. faecalis* 101 potrebno je ispitati potencijalno štetna svojstva soja, poput produkcije biogenih amina, antimikrobne rezistencije i čimbenika virulencije.

6. ZAKLJUČAK

Enterococcus faecalis 101 izoliran iz mlijeka pokazuje antilisterijsku aktivnost *in vitro*, nakon neutralizacije supernatanta, što može biti rezultat djelovanja bakteriocina.

Populacija *Enterococcus faecalis* 101 inokulirana u nadjev ($10^5/\text{g}$) je tijekom zrenja ostala stabilna, odnosno broj se enterokoka nije značajno mijenjao, što može značiti dobru prilagodbu soja u mesnom supstratu.

Kultura *Enterococcus faecalis* 101 nije utjecala nepovoljno na senzorička svojstva kobasica.

Potrebna su daljnja laboratorijska istraživanja kako bi se isključio patogeni potencijal soja, u smislu njegove otpornosti na antibiotike, virulentnosti i sinteze biogenih amina.

7. LITERATURA

1. ANONIMNO (2012): Pravilnik o mesnim proizvodima. Narodne novine 131/2012
2. BENČEVIĆ, K., K. PETRIČEVIĆ (1999): Slavonski domaći kuleni i kobasice. Zagreb:Hrvatski farmer d.d.
3. CALLEWAERT, R., M. HUGAS, LD. VUYST (2000): Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*57, 33-42.
4. CENCI-GOGA, B.T., M. KARAMA, P. SECHI, M.F. IULIETTO, S. NOVELLI, R. SELVAGINNI, S. BARBERA (2016): Effect of a novel starter culture and specific ripening conditions on microbiological characteristics of nitrate-free dry-cured pork sausages. *Ital. J. Anim. Sci* 15, 358-374.
5. CHEN, Y., R. SHAPIRA, M. EISENSTEIN, T. MONTVILLE (1997): Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of protein receptor and its relationships to a predicted tertiary structure. *Appl.Environ. Microbiol.*63, 524-531.
6. CVRTILA, Ž. (2006): Identifikacija laktobacila tijekom zrenja trajnih kobasica pomoću lančane reakcije polimerazom. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet Zagreb.
7. DANILOVIĆ, B., D. SAVIĆ (2016): Microbial ecology of fermented sausages and dry-cured meats. U: *Fermented meat products: health aspects*. N. Zdolec (ur.). Taylor&Francis, Boca Raton, USA, 127-166.
8. DROSINOS, E.H., S. PARAMITHIOTIS (2016): Foodborne pathogens of fermented meat products. U: *Fermented meat products: health aspects*. N. Zdolec (ur.). Taylor&Francis, Boca Raton, USA, 196-227.
9. DOBRANIĆ, V., S. KAZAZIĆ, I. FILIPOVIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2016): Composition of raw cow's milk microbiota and identification of enterococci by MALDI-TOF MS – short communication. *Vet. arhiv* 86, 4, 581-590.
10. FRAQUEZA, M.J., L. PATARATA, A. LAUKOVÀ (2016): Protective cultures and bacteriocins in fermented meats. U: *Fermented meat products: health aspects*. N. Zdolec (ur.). Taylor&Francis, Boca Raton, USA, 228-269.
11. FRECE, J., D. KOVAČEVIĆ, S. KAZAZIĆ, J. MRVČIĆ, N. VAHČIĆ, F. DELAŠ, D. JEŽEK, M. HRUŠKAR, I. BABIĆ, K. MARKOV (2014): Comparison of sensory properties, shelf life and microbiological safety of industrial sausages produced with

- autochthonous and commercial starter cultures (Starter cultures for sausages production). *Food Technol. Biotechnol.* 52, 307–316.
12. GASPARIK-REICHARDT, J., SZ. TOTH, L. COCOLIN, G. COMI, E. H. DROSINOS, Ž. CVRTILA, L. KOZAČINSKI, M. SMAJLOVIĆ, S. SAIČIĆ, B. BOROVIĆ (2005): Technological, physicochemical and microbiological characteristics of traditionally fermented sausages in Mediterranean and Central European countries. *Tehnologija mesa* 46, 143-153.
 13. GIRAFFA, G. (2002): Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 744, 1-9.
 14. HADŽIOSMANOVIĆ, M. (1978): Utjecaj mikrokoka na lipolitičke promjene u nadjevu trajnih kobasica. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet Zagreb.
 15. HADŽIOSMANOVIĆ, M., J. GASPARIK-REICHARDT, M. SMAJLOVIĆ, S. VESKOVIĆ-MORAČANIN, N. ZDOLEC (2005): Possible use of bacteriocins and starter cultures in upgrading of quality and safety of traditionally fermented sausages. *Tehnologija mesa* 46, 197-211.
 16. HAMMES, W. P. (1990): Bacterial starter cultures in food production. *Food Biotechnol.* 4, 383-397.
 17. HUGAS, M., M. GARRIGA, M. T. AYMERICH (2003): Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 223-233.
 18. JAY, J. M., M. J. LOESSNER, D. A. GOLDEN (2005): Food Protection with Chemicals, and by Biocontrol. U: *Modern Food Microbiology*, Springer, 301-350.
 19. KAMENIK, J. (2016): Hurdle technologies in fermented meat production. U: *Fermented meat products: health aspects*. N. Zdolec (ur.). Taylor&Francis, Boca Raton, USA, 95-126.
 20. KOZAČINSKI, L., N. ZDOLEC, M. HADŽIOSMANOVIĆ, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ, T. MAJIĆ (2006): Microbial flora of the Croatian traditionally fermented sausage. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 57, 9/10, 141-147.
 21. LAUKOVA, A. (2012): Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing enterococci and their bacteriocins. U: S. Lahtinen, A.C. Ouwehand, S. Salminen, A. von Wright (UR.). *Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 39-61.
 22. LEROY, F., J. VERLUYTEN, L. DE VUYST (2006): Functional meat starter cultures for improved fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270-285.
 23. MAJIĆ, S., I. FILIPOVIĆ (2006): Greške kobasica. *Meso*. Vol VIII, str.6-8.

24. NAGLIC, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija. Zagreb: Veterinarski fakultet u Zagrebu.
25. POPELKA, P. (2016): Fermented meats composition – health and nutrition aspects. U: Fermented meat products: health aspects. N. Zdolec (ur.). Taylor&Francis, Boca Raton, USA, 389-416.
26. RADETIĆ (1997): Sirove kobasice. Beograd.
27. RUBIO, R., S. BOVER-CID, B. MARTIN, M. GARRIGA, T. AYMERICH (2013): Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. Food Microbiol. 33, 158-165.
28. SPARO, M., G. G. NUÑEEZ, M. GASTRO, M. L. CALCAGNO, M. A. GARCIA ALLENDE, M. CECI, R. NAJLE, M. MANGHI (2008): Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as -additive on craft dry-fermented sausages. Food Microbiol. 25, 607-615.
29. URSO, R., G. COMI, L. COCOLIN (2006): Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. Syst. Appl. Microbiol. 29, 671-680.
30. ZDOLEC, N. (2007): Utjecaj zaštitnih kultura i bakteriocina na sigurnost i kakvoću fermentiranih kobasica. Disertacija. Veterinarski fakultet Zagreb.
31. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRČILA, I. FILIPOVIĆ, K. LESKOVAR, N. VRAGOVIĆ, D. BUDIMIR (2007): Fermentirane kobasice proizvedene u domaćinstvu-mikrobiološka kakvoća. Meso. Vol IX, str. 318-324.
32. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRČILA FLECK, I. FILIPOVIĆ, K. LESKOVAR, P. POPELKA, S. MARCINČAK (2008): Pобољшanje sigurnosti i kakvoće fermentiranih kobasica. Meso. Vol X, str. 203-206.
33. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, A. HORVATIĆ, S. VUČINIĆ (2013): Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages. Int. Food Res. J. 20, 1, 1-6.
34. ZDOLEC, N. (2016): Antimicrobial resistance of fermented food bacteria. U: Fermented Foods: Part 1. Biochemistry and Biotechnology. D. Montet i R.C Ray (ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA, 264-282.

35. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. MEDVID (2016): Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder. Vet. arhiv 86, 2, 163-172.
36. ŽGOMBA MAKSIMOVIĆ, A., N. HULAK, M. VUKO, V. KOVAČEVIĆ, I. KOS, M. MRKONJIĆ FUKA (2015): Bakterije mliječne kiseline u proizvodnji tradicionalnih trajnih kobasica. Meso. Vol XVII, str. 545-550.
37. ŽIVKOVIĆ, J. (1986): Higijena i tehnologija mesa, II. dio. Zagreb: Sveučilišna naknada.

8. SAŽETAK

Enterococcus faecalis 101 izoliran je iz sirovog mlijeka i primijenjen u proizvodnji trajnih kobasica od svinjskog mesa u domaćinstvu. Soj pokazuje inhibicijsko djelovanje prema bakteriji *L. monocytogenes in vitro*. Tijekom zrenja kobasica praćen je broj aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija mliječne kiseline, enterokoka, kvasaca i plijesni, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp. i *Yersinia enterocolitica*. Patogene bakterije nisu izolirane, a broj enterokoka u inokuliranoj kobasici ostao je nepromijenjen tijekom zrenja (5 log CFU/g). Kultura *E. faecalis* 101 nije utjecala nepovoljno na senzorna svojstva kobasica. Potrebna su dodatna istraživanja sigurnosti soja s obzirom na virulentnost, rezistenciju i biogene amine.

Ključne riječi: *Enterococcus faecalis*, trajne kobasice, zaštitna kultura

9. SUMMARY

QUALITY OF HOME-MADE FERMENTED SAUSAGES PRODUCED WITH ENTEROCOCCUS FAECALIS 101

Enterococcus faecalis 101 has been isolated from raw milk and inoculated to home-made pork fermented sausages. The culture shows antilisterial activity *in vitro*. Total viable count, lactic acid bacteria, enterococci, yeasts and moulds, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp. and *Yersinia enterocolitica* were monitored during the ripening. Foodborne pathogens were absent, while enterococci count in inoculated sausages remain constant during the ripening (5 log CFU/g). Culture of *E. faecalis* 101 did not influenced negatively to sensorial properties of sausages. Further studies are needed to evaluate virulence factors, resistance and biogenic amines production of culture.

Key words: *Enterococcus faecalis*, dry sausages, protective culture

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 12. travnja 1989. u Slavonskom Brodu. 2003. godine sam završila Osnovnu školu „Bogoslav Šulek“ u Slavonskom Brodu, a 2007. maturirala u srednjoj školi „Gimnazija Matija Mesić“ –opća gimnazija. Slijedeće godine, 2008. sam upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Prvu godinu fakulteta sam bila član studentskog vijeća, a zimski semestar 2014. godine sam volontirala na Klinici za porodništvo na Veterinarskom fakultetu. Aktivno se koristim engleskim jezikom, a njemački jezik trenutno pohađam u školi stranih jezika. Tijekom studija sam obavljala poslove preko studentskog servisa.