



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Ana Velemir

**UTICAJ DODATKA BILJNOG EKSTRAKTA
NA SVOJSTVA PRIRODNOG OMOTAČA I
ODRŽIVOST DOMAĆE FERMENTISANE
KOBASICE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2022.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF TECHNOLOGY



Ana Velemir

**EFFECT OF HERBAL EXTRACT ADDITION
ON THE PROPERTIES OF THE NATURAL
CASINGS AND VIABILITY OF DOMESTIC
FERMENTED SAUSAGES**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2022.

Mentor: Prof. dr Snježana Mandić, vandredni profesor, Tehnološki fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Naslov doktorske disretacije: „Uticaj dodatka biljnog ekstrakta na svojstva prirodnog omotača i održivost domaće fermentisane kobasice“

SAŽETAK

Osnovni zadatak ovog rada bio je ispitivanje uticaja dodataka biljnog ekstrakta na svojstva prirodnog omotača i održivost domaće fermentisane kobasice (sudžuk).

Ekstrakti biljaka sa antimikrobnim i antioksidativnim djelovanjem zadovoljili bi današnjeg potrošača u potrazi za zdravom hranom bez upotrebe hemijskih konzervanasa. Dodavanjem biljnih ekstrakata u omotače dobija se aktivni jestivi materijal za pakovanje optimalnih svojstava, koji doprinosi očuvanju stabilnosti kvaliteta kobasica i efikasno štiti od neželjenih oksidativnih i mikrobioloških promjena.

Izvršena je procjena antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja etanolnih i vodenih ekstrakata različitih biljaka (trnjina, drenjina, aronija, crvena trešnja), da bi se utvrdilo djelovanje biljnih ekstrakata. Nakon toga, biljni ekstrakti sa pokazanim najboljim antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima, su korišteni, potapanjem prirodnih omotača u optimalne koncentracije, za proizvodnju fermentisanih kobasica. Prirodni biljni ekstrakti predstavljaju dobru alternativu u cilju poboljšanja kvaliteta i bezbjednosti trajnih kobasica.

Ispitivanjem biljnih ekstrakata utvrđeno je da oni imaju različito antioksidativno i antimikrobno djelovanje, i da su etanolni ekstrakti pokazali jaču aktivnost od vodenih. Omotači tretirani rastvorima biljnih ekstrakata pokazali su različito antioksidativno dejstvo, a korištene koncentracije ekstrakata u koje su bili potopljeni omotači, iako su bile više od izmjerениh MIC vrijednosti za pojedine ekstrakte, nisu bile dovoljne da oni pokažu značajnije antimikrobno dejstvo. Efekat primjene biljnih ekstrakata na pokazatelje kvaliteta kobasice ispitana je praćenjem promjena fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara proizvedenih kobasica, kao i mjeranjem lipolitičkih promjena tokom određenog vremena skladištenja. Upotreba omotača tretiranih ekstraktima nije negativno uticala na senzorne osobine ispitivanih fermentisanih kobasica, a imala je uticaj na smanjenje kiselinske vrijednosti, peroksidnog broja i sadržaja MDA, kao i na smanjenja ukupnog broja bakterija u toku skladištenja u odnosu na kontrolni uzorak. To potvrđuje da odabrani omotači posjeduju antioksidativnu aktivnost koja je pokazala pozitivno djelovanje u sprečavanju oksidativnih

promjena u mastima, i antimikrobnu aktivnost koja je uticala na smanjenje ukupnog broja bakterija.

Ključne riječi: fermentisane kobasice, prirodni omotači, biljni ekstrakti, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, lipidne promjene, senzorna ocjena

Naučna oblast: Inženjerstvo i tehnologija

Naučno polje: Ostala inženjerstva i tehnologije

Klasifikaciona oznaka: T-430 – Tehnologija hrane i pića

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo – bez prerade (CC – BY – NC – ND)

Doctoral supervisor: Prof. dr Snježana Mandić, Associate Professor, Faculty od Technology, University of Banja Luka

Title of the doctoral dissertation: „Effect of herbal extract addition on the properties of the natural casings and viability of domestic fermented sausage“

ABSTRACT

The main aim of this dissertation was to examine the influence of plant extract supplements on the properties of the natural casing and the viability of home-fermented sausage (sudzuk). Plant extracts with antimicrobial and antioxidant activity would satisfy today's consumer in search of healthy food without the use of chemical preservatives. By adding plant extracts to the casings, an active edible material is obtained for optimal packaging properties, which contributes to preserving the stability of sausage quality and effectively protects against unwanted oxidative and microbiological changes.

The antimicrobial and antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of various plants (thorns, dogwood, chokeberry, red cherry) was evaluated to determine the effect of plant extracts. After that, plant extracts with best antimicrobial and antioxidant properties shown were used, by immersing natural casings in optimal concentrations, for the production of fermented sausages. Natural plant extracts are a good alternative in order to improve the quality and safety of dry sausages.

Examination of plant extracts showed that they have different antioxidant and antimicrobial activity, and that ethanol extracts showed stronger activity than aqueous ones. Casings treated with plant extract solutions showed different antioxidant effects, and the concentrations of extracts used in which the casings were immersed, although higher than the measured MIC values for individual extracts, were not sufficient to show significant antimicrobial activity. The effect of application of plant extracts on the indicators of sausage quality was examined by monitoring changes in physico-chemical and microbiological parameters of produced sausages, as well as by measuring lipolytic changes during a certain storage time. The use of casings treated with extracts did not negatively affect the sensory properties of the tested fermented sausages, and had the effect of reducing the acid value, peroxide value and MDA content, as well as reducing the total number of bacteria during storage compared to the control sample. This confirms that the selected casings possess antioxidant activity that has shown a positive effect in preventing oxidative changes in fats, and antimicrobial activity that has reduced the total number of bacteria.

Key words: fermented sausages, natural casings, plant extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity, lipid changes, sensory evaluation

Scientific area: Engineering and technology

Scientific field: Another engineering and technology

Classification Code (CERIF Classification): T – 430 – Tehnology of food and drink

Type of selected licence Creative Communities: Authorship – non-commercional – without adaptations (CC – BY – NC – ND)

SADRŽAJ

UVOD	1
1. PREGLED LITERATURE	4
1.1. Meso i proizvodi od mesa.....	4
1.2. Kobasice	4
1.3. Fermentisane kobasice.....	5
1.3.1. Osnovni sastojci u proizvodnji fermentisanih kobasicica.....	5
1.4. Sudžuk	9
1.4.1. Proizvodnja sudžuka	9
1.5. Omotači.....	11
1.6. Greške u proizvodnji fermentisanih kobasicica.....	12
1.7. Mikroflora mesa i nadjeva fermentisanih kobasicica	13
1.8. Oksidativne promjene u fermentisanim kobasicama.....	15
1.9. Antioksidansi	18
1.10. Antimikrobna sredstva.....	19
1.11. Aktivna ambalaža	20
1.12. Antimikrobna i antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata	21
1.13. Bobičasto voće	23
1.13.1. Trnjina.....	24
1.13.2. Drenjina.....	25
1.13.3. Divlja trešnja, crvena	26
1.13.4. Aronija	27
2. ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	29
3. MATERIJAL I METODE RADA	30
3.1. Materijal.....	30
3.1.1. Priprema biljnih ekstrakata	30
3.1.2. Priprema crijeva i potapanje u ekstrakte	31
3.1.3. Proizvodnja kobasica	32
3.2. Metode rada	33
3.2.1. Priprema uzoraka za testiranje antioksidativnih svojstava	33

	<i>Sadržaj</i>
3.2.2. Fizičke metode	38
3.2.3. Fizičko-hemijske metode	39
3.2.4. Hemijske metode	40
3.2.5. Senzorna analiza	42
3.2.6. Metode za ispitivanje antimikrobne aktivnosti	42
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	48
4.1. ANALIZA EKSTRAKATA.....	48
4.1.1. Prinos ekstrakcije ispitivanih biljnih vrsta	48
4.1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata	49
4.1.3. Antibakterijska aktivnost ekstrakata	58
4.1.4. Antifungalna aktivnost ekstrakata.....	62
4.2. ANALIZA TRETIRANIH PRIRODNIH OMOTAČA.....	73
4.2.1. Osobine rastvora korištenih za tretiranje prirodnih omotača	73
4.2.2. Antioksidativne osobine tretiranih prirodnih omotača	74
4.2.3. Antimikrobna aktivnost tretiranih omotača	82
4.3. ANALIZA GOTOVOG PROIZVODA.....	87
4.3.1. pH vrijednosti.....	87
4.3.2. Vrijednosti a_w	89
4.3.3. Sadržaj vode.....	90
4.3.4. Sadržaj ukupnog pepela	91
4.3.5. Sadržaj hlorida	92
4.3.6. Sadržaj proteina	93
4.3.7. Sadržaj ukupnih masti.....	94
4.3.8. Lipidne promjene	95
4.3.9. Tekstura.....	100
4.3.10. Mjerjenje boje	101
4.3.11. Senzorna analiza	108
4.3.12. Antioksidativne osobine omotača	115
4.3.13. Mikrobiološki status gotovog proizvoda	119
5. ZAKLJUČAK.....	126
6. LITERATURA	131
7. PRILOG.....	161

UVOD

Fermentisane kobasice na našim prostorima imaju dugu proizvodnu tradiciju. Dobijaju se od usitnjenog mesa i masnog tkiva, začina, šećera, aditiva, starter kultura i drugih dodataka, koji se poslije punjenja u omotače konzervišu sušenjem, sa ili bez dimljenja, pri čemu kobasice sazrijevaju, dobijaju karakteristične osobine, postaju mikrobiološki i hemijski stabilni proizvodi (Vuković, 2012).

Kvalitet fermentisanih kobasicica kao i promenjene koje nastaju tokom procesa fermentacije, sušenja i zrenja, pored osnovnih komponenata nadjeva, zavise i od dodataka koji utiču na proces prelaska nadjeva u fermentisan proizvod.

Među faktorima koji bitno utiču na formiranje gotovog fermentisanog proizvoda je i izbor omotača (Medić i sar., 2009). Učešće omotača u procesu proizvodnje kobasicica počinje punjenjem, a nastavlja se volumetrijskim, strukturnim i hemijskim promjenama u kobasicama u toku procesa proizvodnje. Omotači služe kao mikrobiološka barijera koja štiti kobasicu u toku proizvodnje, skladištenja i distribucije (Savić i Savić, 2004).

Jedan od najčešćih uzroka smanjenja kvaliteta i kvara proizvoda od mesa je oksidacija masti (Bystricky i sar., 2004; Milanović-Stevanović i sar., 2006). Za vrijeme zrenja i skladištenja fermentisanih kobasicica hidrolizu masti katalizuju lipaze masnog tkiva i mikroorganizama. Lipoliza je intenzivnija u mesu svinja nego u mesu goveda i u nadjevu finije usitnjenih kobasicica. Finijim usitnjavanjem više se oštećuju ćelije mišićnog i masnog tkiva što olakšava lipolizu (Vasilev i sar., 2010). Oksidativne promjene počinju na fosfolipidima ćelijskih membrana. Prilikom smrzavanja, usitnjavanja i mehaničkih postupaka sa mesom, fosfolipidi podliježu djelovanju kiseonika, enzima, hem-pigmenata i metalnih jona (Milanović-Stevanović i sar., 2006).

Razna istraživanja su pokazala da voće, povrće, začinsko i ljekovito bilje, žitarice i druge namirnice biljnog porijekla, kao i njihovi ekstrakti, sadrže prirodne antioksidante (Scalbert i Williamson, 2000), zahvaljujući kojima pokazuju antiinflamatorna, antialergijska i antioksidativna svojstva (Capasso i sar., 2005). Prirodni antioksidanti mogu se naći u dijelovima biljaka kao što su sjemenke, lišće, korijen i kora.

Antioksidanti su materije koji sprečavaju reakcije oksidacije i tako neutrališu slobodne radikale. Najčešće se koristi za sprečavanje užeglosti, a time se utiče na održivosti namirnica. U ekstraktima određenih biljnih vrsta nalazi se veliki broj različitih reaktivnih grupa koje imaju antimikrobno djelovanje. Kako se patogeni mikroorganizmi mogu naći u različitim

vrstama namirnica, korišćenje prirodnih antimikrobnih supstanci, kao što su biljni ekstrakti, mogu biti važni za očuvanje kvaliteta različitih namirnica. Antimikrobne materije pokazuju fiziološku aktivnost prema mikroorganizmima tako da sprečavaju njihov rast ili potpuno zaustavljaju njihov razvoj. Zbog sve češće pojave bakterijske rezistencije, kao i tendencije smanjenja upotrebe soli i hemijskih aditiva, javila se potreba za novim antimikrobnim sredstvima

U posljednje vrijeme, prehrambena industrija je u potrazi za prirodnim, sigurnim, ali i ekonomski isplativim antioksidansima i antimikrobnim agensima u pokušaju da se zamjene postojeći sintetički dodaci. Biljni ekstrakti se uglavnom dodaju da bi se spriječila oksidacija masti i proteina, i/ili inhibirao rast i razvoj bakterija, kvasaca i plijesni, odnosno da bi se spriječilo kvarenje proizvoda. Antimikrobno i antioksidativno djelovanje ovih materija uglavnom se pripisuje visokom sadržaju fenolnih jedinjenja (Botsaris i sar., 2015).

Tokom posljednjih decenija, mnogi istraživači su testirali biljke i biljne ekstrakte, kao što su origano, kadulja, ružmarin, sjeme grožđa (Economou i sar., 1991; Yanishlieva i Marinova, 1995; Man i Jaswir, 2000), timijan, bijeli, crveni i planinski božur, rehmania ili angelika, šaš, mažuran, divlji mažuran, kim, bosiljak, đumbir, šljiva, aloe vera (Namiki, 1990; El-Alim i sar.. 1999; Han i Rhee 2004; Fiorentino i sar.; 2008).

Mnoge biljne vrste su zanimljive jer sadrže hemijska jedinjenja koja mogu uticati na produženje roka trajanja, poboljšavaju otpornost na oksidaciju i usporavaju rast mikroorganizama i plijesni, a time pozitivno djeluju na osobine proizvoda (Shahdidi i sar., 1992; Brannan, 2008; Abdel-Hamied i sar., 2009; Cottone, 2009; Alhijazeen, 2014).

Pošto biljni ekstrakti često imaju jak, prepoznatljiv ukus, pored antioksidativnih sposobnosti veoma je bitno ispitati senzorne karakteristike koje se mogu prenijeti na sam proizvod (Cottone, 2009).

Jasno je, takođe, da prirodne alternative nisu uvijek efikasne kao postojeće hemijske supstance. Začini, aromatično bilje, kao i mnoge druge vrste biljaka, odnosno prirodna antimikrobna jedinjenja izolovana iz ovih biljaka (organske kiseline, fenoli, eterična ulja i sl.) predstavljaju dobro poznate inhibitore rasta bakterija, kvasca i plijesni i tradicionalno nalaze primjenu u očuvanju hrane kao i za medicinske svrhe (Vesković-Moračanin i sar., 2015).

U izradi jestivih filmova radi poboljšanja zaštitnih, nutritivnih i senzornih svojstava proizvoda može se koristiti veliki broj dodataka. Zaštitna svojstva mogu se poboljšati dodatkom antimikrobnih agenasa ili antioksidanasa. Korištenjem vanjskog sloja prevlake sa visokom koncentracijom antimikotičkih ili antioksidativnih agenasa moguće je održati

izvorni integritet hrane ili, kao alternativa, moguće je koristiti manje količine kao dodatak hrani (u odnosu na ukupnu količinu proizvoda). Tehnike u proizvodnji jestivih prevlaka moraju se prilagoditi samim karakteristikama materijala. Jestivi filmovi i prevlake predstavljaju mogućnost za poboljšanje kvaliteta hrane, produžavanje trajanja, sigurnosti i funkcionalnosti. Mogu se koristiti kao pojedinačni ambalažni materijali, prevlake za hranu i kao nosioci aktivnih sastojaka (Galić, 2009).

1. PREGLED LITERATURE

1.1. Meso i proizvodi od mesa

Meso je veoma značajna namirnica u ishrani ljudi. Predstavlja izvor lako svarljivih i biološki i energetski vrijednih sastojaka. Nutritivna vrijednost mesa u najvećoj mjeri se vezuje za visok sadržaj proteina koji sadrže sve esencijalne aminokiseline u optimalnom odnosu, pa ih ljudski organizam može u potpunosti iskoristiti. Pored proteina, masti su najvažnija hranjiva komponenta mesa, pošto pored energetske vrijednosti, posjeduju i biološku vrijednost zbog esencijalnih masnih kiselina (Rede i Petrović, 1997). Sadržaj i vrsta masnih kiselina varira, pa su tako tjelesne masti mnogo mekše od onih unutrašnjih, koje okružuju organe, pošto sadrže veće količine nezasićenih masnih kiselina (Heinz i Hautzinger, 2007; Daley i sar., 2010). Meso i proizvodi od mesa predstavljaju jedan od najbogatijih izvora vitamina B. Vitamini mesa relativno su stabilni i ostaju prisutni i u proizvodima od mesa. Meso je, takođe, vrlo važan izvor željeza (najviše konjsko i govede, a nešto manje svinjsko i pileće meso). Željezo iz mesa ljudski organizam mnogo bolje usvaja od željeza iz biljaka, a potpomaže i usvajanje željeza biljnog porijekla. Pored toga, meso je bogato i drugim bitnim mineralima značajnim za pravilno funkcionisanje organizma (cink, fosfor, selen) (Vuković i sar., 2009).

Danas se na tržištu nalazi veliki broj različitih proizvoda od mesa koji su prema Pravilniku o usitnjrenom mesu, poluproizvodima i proizvodima od mesa (Službeni glasnik BiH, br.82/13) podijeljeni na sljedeće kategorije: proizvodi od svježeg mesa, kobasice, dimljeni proizvodi (polutrajni suvomesnati proizvodi), suvomesnati proizvodi (trajni suvomesnati proizvodi), jela od mesa, konzerve i slanina.

1.2. Kobasice

Kobasice su proizvodi od različitih vrsta i količina mesa, mašinski otkoštanog mesa, iznutrica, krvi, masnog i vezivnog tkiva, različitog stepena usitnjjenosti i drugih dodatnih sastojaka koji se poslije različitih vidova obrade, prerade i punjenja u prirodne ili vještačke omotače ili drugu ambalažu konzervišu odgovarajućim postupcima (Službeni glasnik BiH, br.82/13). Kobasice se prema navedenom Pravilniku dijele na fermentisane kobasice, toplotno obrađene kobasice, kuvane kobasice, ostale toplotno obrađene kobasice i svježe kobasice.

1.3. Fermentisane kobasice

Fermentisane kobasice su proizvodi od različitih vrsta mesa i čvrstog masnog tkiva domaćih papkara i kopitara prve i druge kategorije, mesa peradi prve kategorije i mesa divljači, različitog stepena usitnjjenosti i dodatnih sastojaka, koji se poslije punjenja u odgovarajuće prirodne ili vještačke omotače konzervišu postupcima fermentacije i sušenja, s dimljenjem ili bez dimljenja (Službeni glasnik BiH, br.82/13).

Na svjetskom tržištu nalazi se veliki broj različitih vrsta fermentisanih suvih kobasicica, čija raznovrsnost zavisi od zemlje/regiona, klime, naslijeda i kulture (Toldrá i sar., 2001; Lebert i sar., 2007; Talon i sar., 2007; Roseiro i sar., 2011; Santos i sar., 2011). Za proizvode pod istim imenom često postoji više receptura, a neke od njih se čuvaju u strogoj tajnosti. Na kvalitet gotovog proizvoda često utiču i parametri procesa proizvodnje kao što su vrijeme, temperatura, vlažnost pri sušenju, kao i postupak dimljenja (Ockerman i Basu, 2007; Tabanell i sar., 2012).

1.3.1. Osnovni sastojci u proizvodnji fermentisanih kobasicica

Meso. Za proizvodnju fermentisanih kobasicica češće se koristi meso zrelih životinja, sa većim sadržajem suve materije, intenzivnjom bojom i čvršćom strukturom. Koristi se meso koje potiče od zdravih životinja, čiji premortalni tretman (ishrana, držanje, transport, odmor prije klanja) treba da bude takav da obezbjedi pravilan tok postmortalnih promjena (Rede i Petrović, 1997; Petrović i sar., 2007). Kao posljedica različitog toka, odnosno brzine složenih biohemijskih procesa u mišiću post mortem nastaje meso različitog kvaliteta. Vrsta mesa koje se koristi zavisi od navika, običaja, tipa kobasicice ili od zastupljenosti određenih vrsta i rasa životinja u geografskom području proizvodnje. Kod nas se najčešće koristi svinjsko meso, kojem se ponekad može dodati govede ili ovčije meso u manjem procentu, a rjeđe samo meso goveda (Radetić, 1997; Vuković, 2012; Pećanac, 2013). Za proizvodnju fermentisanih kobasicica prednost ima meso sa nižim vrijednostima pH, u koje soli bolje difunduju, vlaga lako isparava tokom sušenja, povoljni su uslovi za formiranje stabilne boje i povezivanje nadjeva, dok je razmnožavanje nepoželjnih bakterija otežano (Vuković, 2012).

Masno tkivo je tradicionalan i nužan sastojak kobasicica, jer pomaže u vezivanju različitih sastojaka i učestvuje u stvaranju specifičnog ukusa kobasicice. Pored toga, bez određene količine masti, kobasicice se brže suše i postaju pretvrde, posebno ako se skladište više nedjelja radi proizvodnje trajnih kobasicica. Smatra se da je za proizvodnju domaćih kobasicica optimalna količina masnog tkiva od 10% do 20% (Pavičić i Ostović, 2008), ili da odnos mesa

i masnog tkiva u svježem nadjevu većine industrijski izrađenih fermentisanih kobasicu iznosi 2:1 (Fontana i sar., 2005, Lebert i sar., 2007), dok kod tradicionalnih proizvoda ovaj odnos može varirati u zavisnosti od sadržaja masti, koji se kreće u rasponu od 10% do 40%.

Za proizvodnju fermentisanih kobasicu najčešće se koristi svježa i ohlađeno, čvrsto masno tkivo svinja sa vrata, grebena i leđa, tj. zrnasta leđna slanina koja je suva, čvrsta i bogata vezivnim tkivom, dok se u muslimanskim zemljama, gdje se svinjetina ne konzumira, za izradu kobasicu u tipu sudžuka koristi ovčije masno tkivo (Toldrá, 2002; Demeyer, 2004; Lebert i sar., 2007; Ruiz, 2007; Vuković i sar., 2011/a; 2011/b ; Vuković, 2012).

Kvalitet fermentisanih kobasicu kao i promjene koje nastaju tokom procesa fermentacije, sušenja i zrenja ne zavise samo od osnovnih komponenata nadjeva kobasice, već i od dodataka koji utiču na proces prelaska nadjeva u fermentisan proizvod. Kao dodaci proizvodima od mesa najčešće se koriste začini, aditivi, arome, enzimski preparati, šećeri, ugljeni hidrati, vlakna, bjelančevinasti proizvodi i namirnice.

Začini su proizvodi biljnog porijekla, karakterističnog mirisa i ukusa ili boje. Spadaju u osnovne dodatke fermentisanih suvih kobasicu, koriste se u prvom redu radi postizanja karakterističnog ukusa, mirisa i boje fermentisanih proizvoda (Petrović i Tasić, 2012). Kao začini koriste se aromatični dijelovi začinskih biljaka, neki se koriste u prirodnom obliku, dok se drugi pripremaju nakon sušenja, sitnjenja, pretvaranjem u prah i ekstrahovanjem aromatičnih sastojaka. Najznačajnije komponente hemijskog sastava začina pripadaju grupi isparljivih i čvrstih ulja, smola, estera, fenola, terpena, alkohola, organskih kiselina, alkaloida i jedinjenja sa sumporom (Savić i Popović, 2008). U proizvodnji fermentisanih kobasicu začini se koriste ne samo zbog specifičnog ukusa, već i zbog antioksidativnog djelovanja i stimulativnog efekta na fermentaciju. Poznato je da mnogi začini inhibišu mikroorganizme, a pod određenih uslovima neki začini mogu da stimulišu bakterije da stvaraju mlječnu kiselinsku. Pri proizvodnji suvih fermentisanih kobasicu najčešće se koriste crvena mljevena začinska paprika (slatka i ljuta), bijeli luk i biber, kao mješavina u količini od 3 do 5 g/kg (Vuković, 2012).

Aditivi koji se dodaju u proizvode od mesa pripadaju kategoriji konzervanasa, boja, emulgatora i emulgujućih soli, regulatora kiselosti, stabilizatora, zgrušnjivača, pojačivača arome. U proizvodnji fermentisanih kobasicu koriste se kuhinjska so, nitrati i nitriti, začini i starter kulture.

Kuhinjska so (NaCl) se od davnina dodaje u meso pri izradi trajnih proizvoda. Dodatkom soli povećava se rastvorljivost miofibrila i omogućava vezivanje mesa, vode i masti i

formiranje gela poželjne teksture, uvećava se emulgujući kapacitet, produžava održivost snižavanjem aktiviteta vode (a_w vrijednosti). Dodatak soli utiče na ukus i smanjuje gubitak tečnosti u termički obrađivanim proizvodima, čime se povećava ekonomičnost proizvodnje, a postiže se mekoća i sočnost (Žlender i Gašperlin, 2009; Kurćubić i sar., 2011), a postoje dokazi da pozitivno utiče na boju gotovih proizvoda (Perey-Alvares i sar., 1999). So poboljšava i pojačava aromu mesnih proizvoda, a zajedno sa masnoćom pridonosi senzornim svojstvima proizvoda. U više masnim proizvodima povećana količina soli dodatno povećava slan okus u poređenju s manje masnim proizvodima (Žlender i Gašperlin, 2009). Sposobnost vezivanja vode mesa povećava se dodavanjem kuhinjske soli u količinama do 5 %.

Uticaj kuhinjske soli na mikrobiološke procese u kobasici povezan je sa uticajem soli na količinu vode koja je na raspolaganju mikroorganizmima. Dodavanjem kuhinjske soli nadjevu, povećava se osmotski pritisak i snižava vrijednost aktiviteta vode (a_w). Ispod određene a_w vrijednosti mikroorganizmi prestaju da se razmnožavaju, ali ne izumiru potpuno (Heinz i Hautzinger, 2007; Vuković, 2012).

U proizvodnji fermentisanih kobasicica uobičajena praksa je upotreba **nitrita** i/ili **nitrata** u obliku soli za salamurenje (mješavina kuhinjske soli i nitrita/nitrata). Homogena smješa nitrita i kuhinjske soli sadrži 0.5 %–0.6 % nitrita i 99.4 %–99.5 % natrijum-hlorida i naziva se „nitritna so za salamurenje“. Nitriti (kalijumove-E 249 i natrijumove soli-E 250) su jedinjenja koja u reakciji sa mioglobinom stvaraju specifičnu crvenu boju salamurenog mesa, ispoljavaju bakteriostatsko i baktericidno djelovanje i utiču na miris i ukus mesa, odnosno proizvoda od mesa (Honikel, 2008). Nitriti pored uticaja na formiranje i stabilnost boje, predstavljaju bakteriostatske i baktericidne agense, inhibiraju rast truležnih i patogenih bakterija, usporavaju oksidaciju masnih kiselina i utiču na formiranje karakteristične arome salamurenog mesa (Marco i sar., 2006). Dodaje se u salamuru da obezbjedi stvaranje nitrozilmioglobina (NOMb), nosioca prijatne crvene boje salamurenog mesa koja nastaje vezivanjem veoma reaktivnog azot monoksida (NO), koji nastaje iz nitrita, za gvožđe u hemu porfirinskog prstena mioglobina (Freixanet, 2007; Honikel, 2008; Vuković, 2012). U proizvode od mesa, zavisno od vrste, dodaje se 100 do 200 mg nitrita na kg proizvoda (Marco i sar., 2006). Nitriti su vrlo nepostojani, u mesu reaguju sa gotovo svim sastojcima, nastaju brojna jedinjenja, a količina nitrita tokom skladištenja stalno opada i najčešće se nitriti nalaze samo u tragovima (Vuković, 2012). Korištenje nitrita u proizvodima od mesa često dovodi u pitanje štetnost njihove upotrebe po zdravlje ljudi. Prihvatljivi dnevni unos (Acceptable Daily

Intake) za nitrite iznosi 0.2 mg/kg, a za nitrate 5 mg/kg tjelesne mase, što znači da je količina rezidualnog nitrita od 5-40 mg/kg daleko ispod toksične doze (Grujić, 2005).

Šezdesetih godina prošlog vijeka, na osnovu rezultata istraživanja, u SAD-u je došlo do komercijalizacije **starter kultura** i njihove primjene u industriji mesa (Martinović i Vesković-Moračanin, 2006). To su kultivisani sojevi odabranih vrsta bakterija, kvasaca i pljesni, koji učestvuju u zrenju fermentisanih kobasica i utiču na formiranje karakterističnih osobina gotovih proizvoda. Starter kulture se često koriste u proizvodnji trajnih kobasica u cilju dobijanja kvalitetnijeg proizvoda. Upotreboom starter kultura utiče se na snižavanje pH tokom fermentacije, formiranje boje salamurenog mesa, formiranje arome i ukusa trajnih kobasica, poboljšanje teksture gotovog proizvoda, te sprečavanje pojave užeglosti. Starter kulture čine bakterije mlijecne kiseline, i to najčešće predstavnici roda *Lactobacillus* i *Pediococcus*, zatim gram-pozitivni, koagulaza-negativni koki – *Staphylococcus spp.* i *Micrococcus spp.* (López i sar., 2006; Casaburi i sar., 2007; Zdolec i sar., 2007; Nežak i sar., 2011; Danilović i sar., 2011), te kvasci i pljesni (Martinović i Vesković-Moračanin, 2006). Koriste se u cilju upravljanja procesom fermentacije, smanjenja varijabilnosti u kvalitetu proizvoda, sprečavanja rasta patogenih mikroorganizama ubrzavanjem fermentacije i poboljšanja senzornih svojstava fermentisanih proizvoda od mesa (Lembeck, 2009). Koriste se u obliku liofilizovanih i smrznutih kultura.

U proizvodnji fermentisanih kobasica često se koriste **ugljeni hidrati** kako bi se bakterijama mlijecne kiseline obezbijedio odgovarajući supstrat potreban za rast i razvoj. Šećeri se u procesu fermentacije prevode u mlijecnu kiselinu, što dovodi do pada pH vrijednosti. Od vrste upotrijebljenih ugljenih hidrata (dekstroza, glukoza, saharoza, lakoza, kukuruzni sirup, različiti skrobovi, sorbitol) zavisi brzina i količina nastale mlijecne kiseline. Prosti šećeri se brže razlažu i brže dolazi do pada pH vrijednosti, dok je razlaganje složenih šećera sporije, a s tim je sporija i fermentacija (Radetić, 1997; Heinz i Hautzinger, 2007). Količina ugljenih hidrata koja se koristi u zavisnosti od vrste samog šećera, ali i od tipa kobasice koja se proizvodi, odnosno dužine procesa proizvodnje, kreće se od 0.3 % do 0.7 % (Toldrá, 2002; Demeyer, 2004; ; Ruiz, 2007; Vignolo i sar., 2010; Vuković, 2012). Prema Vukoviću (2012), ugljeni hidrati se dodaju u količinama od 0.5 % do 1.0 % u fermentisane polusuve kobasice, odnosno od 0.2% do 0.5 % u fermentisane suve kobasice.

Askorbinska kiselina ili natrijum-askorbat imaju uticaja i na održivost boje fermentisanih kobasica jer sprečavaju okisidaciju mioglobina u met-mioglobin (Vuković, 2012). Askorbinska kiselina se koriste u proizvodnji trajnih kobasica pošto sprečavaju formiranje N-

nitrozamina u proizvodima od mesa (Rywotycki, 2007; Honikel, 2008) Brzina reakcije između mioglobina i nitrita zavisi od pH, temperature i redoks-potencijala (Vuković, 2012). Kako reakcija teče brže pri nižem pH, ona se može ubrzati dodatkom askorbinske kiseline ili od nje stabilnije soli natrijum-askorbata, a količina askorbinske kiseline mora biti mala (0,05 %), tek tolika da obezbijedi blago kisele uslove potrebne za redukciju NaNO₂ u NO.

1.4. Sudžuk

Sudžuk je proizvod od usitnjenoj goveđoj mesa, masnog tkiva goveda, kuhinjske soli ili zamjene za kuhinjsku so, šećera, aditiva, začina ili ekstrakata začina i starter kultura. Nadjev za sudžuk puni se u tanka goveđa crijeva ili u druge goveđe prirodne ili vještačke omotače odgovarajućeg promjera. Sadržaj proteina mesa u proizvodu ne smije biti manji od 16%, a relativan sadržaj proteina vezivnog tkiva u proteinima mesa (sadržaj kolagena) ne smije biti veći od 20 % (Službeni glasnik BiH, br. 82/13).

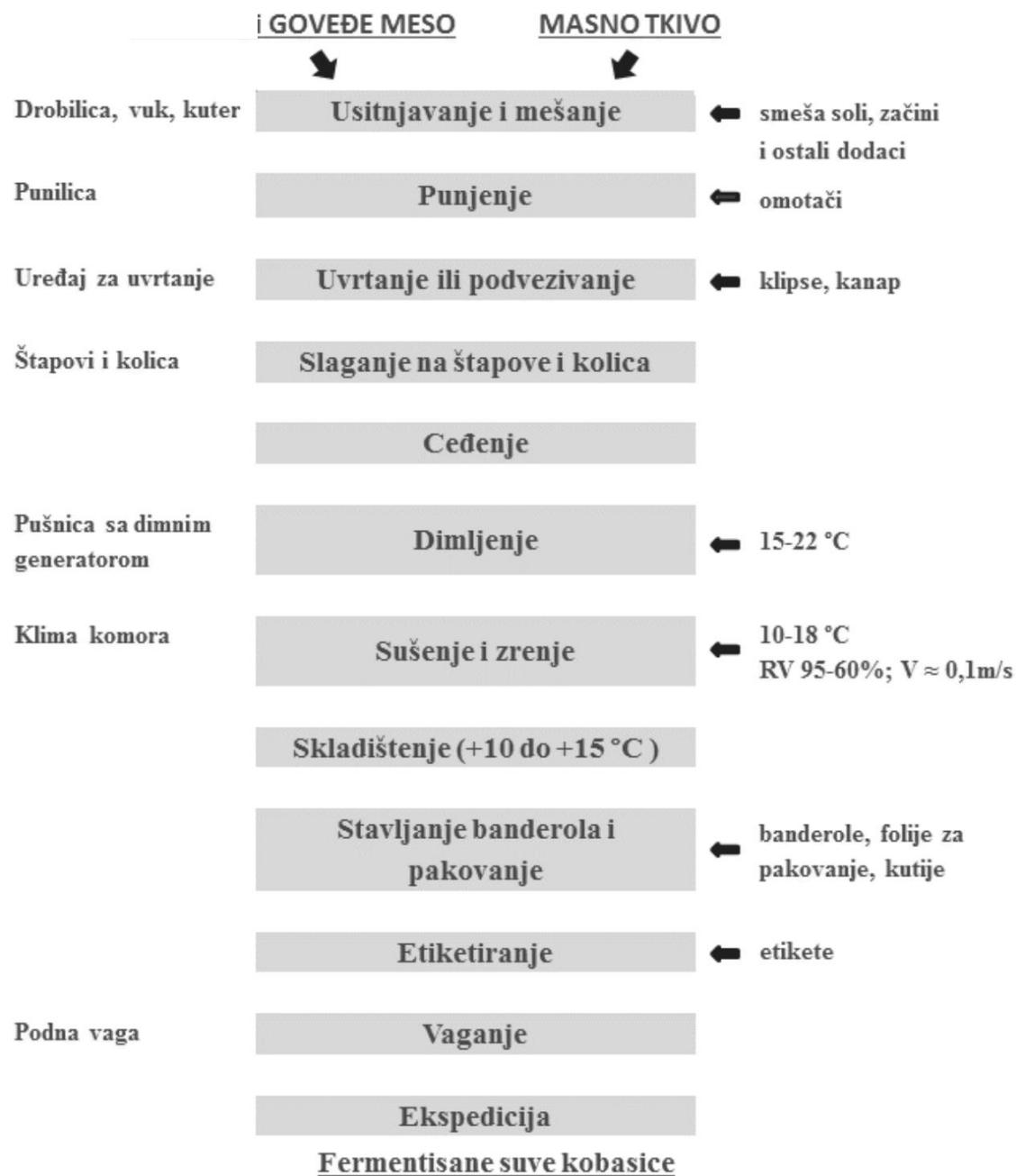
1.4.1. Proizvodnja sudžuka

Sudžuk je fermentisana kobasica koja vodi porijeklo iz Turske, a popularna je i u većini zemalja Srednjeg istoka i Evrope. (Kurćubić i sar., 2016). Tradicija proizvodnje i konzumiranja sudžuka na području Bosne i Hercegovine i šire duga je više od pola vijeka, još od vladavine Otomanskog carstva. Danas u Bosni i Hercegovini proizvodi se kao jedan od autohtonih proizvoda od mesa. Proizvodnja se obavlja na tradicionalan ali i komercijalan način (Operta i sar., 2012). Posljednjih godina samostalne zanatske radnje koje se bave proizvodnjom i prodajom mesa, kao i mesna industrija, daju sve značajnije mjesto bosanskom sudžuku, koji se može kupiti u gotovo svakoj mesnici, kao i u svim velikim tržnim centrima (Jašić i sar., 2012).

Sudžuk se pravi od krupno mljevenog goveđeg mesa, prepoznaje se po specifičnom obliku polukružne potkovice i karakterističnom okusu (Jahić i Pračić, 2018). Bosanski sudžuk proizvodi se isključivo od mesa prezivara, a prvenstveno od goveđeg i ovčijeg mesa. U tradicionalnoj i zanatskoj tehnologiji za proizvodnju bosanskog sudžuka upotrebljava se meso II i III kategorije, sa dodatkom 1 do 3% loja (Jašić i sar., 2012).

Tehnološki proces proizvodnje bosanskog sudžuka, fermentisane suve kobasicice, prikazan je na *Slici 1*. Nakon hlađenja u rashladnoj komori na temperaturi od 4°C u toku 24h, meso se rasijeca na kategorije, usitnjava na manje komade i dodaje od 3 do 5% kuhinjske soli. Meso se stavlja na zrenje, na temperaturu od 4°C u periodu od 24h, a zatim se usitnjava na određenu veličinu. Poslije mljevenja, mesu se dodaje začini, u zavisnosti od recepture.

Pripremljeni nadjev se čvrsto puni u omotače, podvezuje se u kolutove. Potkovice se slažu na okrugle štapove sa dovoljnim razmakom, da ne bi došlo do međusobnog dodirivanja, i cjede se.



Slika 1. Tehnološka šema procesa proizvodnje fermentisanih suvih kobasic
(sudžuka)(Škaljac, 2014)

Slijede dimljenje i zrenje. Za dimljenje se uglavnom koriste strugotine ili komadi tvrdog drveta (bukva, hrast, jasen, grab), ali bez stvaranja plamena. Temperatura hladnog dimljenja se kreće oko 18°C, u trajanju od 21 do 28 dana. Sušenje se odvija pri temperaturi 15-20°C, uz

relativnu vlažnost 80-90% i blagu cirkulaciju vazduha. Sušenje i zrenje sudžuka završeno je kada gubitak mase bude 30-35% od prvobitne mase. Sudžuk se zatim ostavlja na dozrijevanje u trajanju od 10 dana, pri tom konzistencija postaje čvršća (Jašić i sar., 2012).

Pošto se sudžuk svrstava u trajne fermentisane kobasice mora da ispunjava sljedeće zahtjeve:

- a) da površina gotovog proizvoda nije deformisana i da omotač dobro priliježe uz nadjev;
- b) da nadjev na presjeku ima izgled mozaika sastavljenog od približno ujednačenih komadića mišićnog tkiva crvene boje i čvrstog masnog tkiva bjeličaste boje;
- c) da su sastojci nadjeva ravnomjerno raspoređeni i međusobno čvrsto povezani;
- d) da na presjeku kobasica nema šupljina i pukotina;
- e) da imaju stabilnu boju i prijatnu aromu zrelog proizvoda;
- f) da se mogu lako narezivati (Službeni glasnik BiH, br.82/13).

1.5. Omotači

Omotač je proizvod u koji se puni nadjev kobasica, a može biti prirodni ili vještački. Pod prirodnim omotačima podrazumijevaju se: želuci, bešike, crijeva i drugi šupljji dijelovi želudačno-crijevnog trakta goveda, teladi, svinja, ovaca i konja, koji su podvrgnuti obradi, kao što je usoljavanje, zagrijavanje ili sušenje nakon što su očišćeni. Vještački omotači od prirodnih materijala su omotači proizvedeni od kolagena, biljnih vlakana, celuloze i polimernih (plastičnih) materijala (Službeni glasnik BiH, br.82/13).

Prirodni omotači su najčešće čuvaju suvo usoljeni, te se prije punjenja so mora isprati. Ovakvi omotači se prije punjenja potopaju u vodu na nekoliko sati (3-5 sati u mlakoj vodi ili preko noći u hladnoj vodi) čime se uklanja preostala so i vlakna vezivnog tkiva omotača (kolagena vlakna) postanu elastičnija. Ovome doprinosi i dodavanje organskih soli, posebno mliječne kiseline (2%). Drugi način skladištenja prirodnih omotača je u zasićenom slanom rastvoru, i ovako pripremljeni omotači su odmah spremni za punjenje, samo zahtjevaju kratko potapanje (par minuta do jednog sata) i temeljno ispiranje. Veoma važna osobina prirodnih crijeva je elastičnost, dolazi do izražaja za vrijeme sušenja, kada crijevo treba da prati obim kobasice koji se sušenjem postepeno smanjuje (Mitrović, 2016). Prirodni omotači su dovoljno jaki da podnesu pritisak u toku punjenja, propustljivi za vodenu paru, gasove i dim, elastični i čvrsto naliježu na nadjev kobasica, te se mogu podvezivati ili klipovati na krajevima (Heinz i Hautzinger, 2007).

Značaj crijeva u procesu proizvodnje kobasica je veoma složen. Počinje punjenjem nadjeva, zatim učestvuje u volumetrijskim, strukturnim i hemijskim promjenama tokom procesa

proizvodnje i završavaju se konzumacijom kobasica. Pored toga, omotači imaju ulogu mikrobiološke barijere, štiti kobasice tokom proizvodnje, skladištenja i distribucije (Mandić i sar., 2018).

1.6. Greške u proizvodnji fermentisanih kobasica

Najčešće greške u proizvodnji fermentisanih kobasica ispoljavaju se u izgledu, boji, konzistenciji i aromi gotovog proizvoda, umanjuju vrijednost proizvoda ili dovode u pitanje upotrebljivost za ishranu ljudi (Majić i Filipović, 2006).

Do promjena u izgledu najčešće dolazi zbog prebrzog sušenja (nabori na omotaču), visoke relativne vlažnosti (odvajanje omotača od nadjeva), neadekvatnog dimljenja (promašćenost), slabe regulacije vlažnosti vazduha tokom zrenja i neadekvatnog skladištenja (pojave neželjenih pljesni na omotaču) (Majić i Filipović, 2006).

Boja gotovog proizvoda predstavlja jedan od najznačajnijih vizuelnih pokazatelja kvaliteta. Stabilna boja nadjeva fermentisanih kobasica potiče od nitrozilmioglobina (Mb-NO), koji nastaje reakcijom između nitrita i mioglobina (Ikonić, 2013). Upotreba neadekvatnih sirovina u procesu proizvodnje može dovesti do nepoželjnih promjena boje (nedovoljna količina nitrita u solima za salamurenje, upotreba užeglog masnog tkiva dovodi do oksidacije mioglobina, prevelika količina masnog tkiva ili upotreba mesa mlađih životinja dovodi do pojave boje slabijeg intenziteta, upotreba nedovoljno odmašćenih prirodnih crijeva) (Vuković, 2012). Proces proizvodnje, takođe, može da utiče na boju proizvoda. Do izostanka formiranja boje može doći ukoliko je temperatura zrenja suviše niska. Taman rub može biti posljedica previsoke temperature, niske relativne vlažnosti u komori tokom zrenja, neodgovarajućeg dimljenja, razvoja pljesni i drugih mikroorganizama na omotačima. Crvene diskoloracije nastaju uslijed upotrebe velike količine začinske paprike, pri niskoj pH vrijednosti nadjeva u toku zrenja i tokom skladištenja fermentisanih kobasica na višim temperaturama. Do pojave sive i zelene boje u centru kobasica najčešće dolazi uslijed prisustva bakterija koje izazivaju kvar (dodatak male količine kuhinjske soli i nitrita, visok pH korištenog mesa, upotreba dugo skladištenog smrznutog mesa itd.) (Majić i Filipović, 2006; Vuković, 2012).

Najčešća greška u konzistenciji trajnih fermentisanih kobasica je suvi rub. Nastaje uslijed prebrzog sušenja, niske vlažnosti vazduha, visoke temperature i jake cirkulacije tokom procesa proizvodnje. Nastali suvi rub sprečava dalje sušenje proizvoda što dovodi i do razmnožavanja mikroorganizama u unutrašnosti nadjeva koji djeluju na promjenu boje, mirisa, ukusa i konzistencije (Vuković, 2012).

Šupljikavost i poroznost najčešće se javljaju zbog nepravilnog nadjevanja i zbog zaostajanja vazduha, dok se kao posljedica nedovoljnog zrenja i cijeđenja mesa, te veoma visoke pH vrijednosti javlja slaba povezanost nadjeva (Majić i Filipović, 2006; Vuković, 2012).

Do pojave meke konzistencije dolazi zbog slabe povezanosti nadjeva, otežanog sušenja, pojave truležnih procesa, suviše niskog pH ili nedovoljno čvrstog punjenja omotača. Do pojave sluzavosti dolazi uslijed djelovanja mikroorganizama koji saharozu prevode u sluzave dekstrane (bakterije roda *Leuconostos* i neki sojevi *Bacillus subtilis*) (Vuković, 2012).

Trajne fermentisane kobasice treba da imaju priyatnu i karakterističnu aromu pošto miris i ukus predstavljaju veoma značajne senzorne osobine. Neodgovarajuća receptura ili neodgovarajući parametri procesa proizvodnje mogu dovesti do problema i pojave grešaka u mirisu i ukusu.

Upotrebom veće količine šećera i aditiva (glukono-delta-lakton), suviše usitnjjenog mesa, zrenja na visokim temperaturama može se dobiti proizvod veoma kiselog ukusa. Gorčinu kobasicu može izazvati korišćenje veće količine nitrita ili previše Mg u kuhinjskoj soli, dim od vlažne i pljesnjive strugotine, razmnožavanje pljesni na omotaču ili bakterija u nadjevu (Škrinjar i sar., 2010).

Pojava pljesni može da izvazove ukus i miris na buđ i memlu, dok se aroma na trulež javlja kod pokvarenih kobasicu, kao posljedica zrenja na višoj temperaturi i loše higijene u proizvodnji (Vuković, 2012).

Ipak, najčešća greška arome je pojava užeglosti, ranketljivosti. Do ovoga dolazi uslijed fizičkih, hemijskih i mikrobioloških promjena na mastima. Enzimi tkiva i mikroorganizama izazivaju hidrolizu masti koja se pri niskim pH odvija spontano. Usljed oksidacije masti dolazi do promjena u senzornim osobinama proizvoda i mogu biti rizični po zdravlje potrošača (Bystricki i sar., 2004).

Do pojave sapunjavog ukusa dolazi prilikom nakupljanja nižih masnih kiselina (buterna, kapronska, kaprilna). Slobodne masne kiseline se prvo prevode do peroksida, potom do aldehida, i na kraju do ketona (ketonska užeglost je prilično rijetka). Užeglost se javlja pretežno na površini kobasicu, dok se u nadjevu javlja uslijed upotrebe užeglog masnog tkiva (Vuković, 2012).

1.7. Mikroflora mesa i nadjeva fermentisanih kobasicu

Meso koje je proizvedeno u uslovima dobre higijenske prakse na svojoj površini ima veoma mali broj mikroorganizama, dok je unutrašnjost takvog mesa gotovo sterilna. U toku hlađenja, rasjecanja trupa, odvajanja mesa od kostiju i proizvodnje nadjeva, broj

mikroorganizama se povećava (Mitrović, 2016). Prisustvo mikroorganizama u mesu u najvećoj mjeri zavisi od fiziološkog statusa životinja prije klanja, širenja kontaminacije tokom klanja i obrade, kao i uslova čuvanja. Bakterije koje se najčešće prisutne u mesu su *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Sarcina* spp., *Lactobacillus* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Clostridium* spp. i *Bacillus* spp. (Bošković, 2016; Suvajdžić, 2018).

Mikrofloru nadjeva tradicionalnih fermentisanih kobasicama čine različite vrste mikroorganizama koje potiču od životinje, iz sredine proizvodnog pogona, sa ruku radnika, kao i sa upotrebljenih sirovina, tako da u nadjevu može biti prisutan veliki broj različitih vrsta patogenih mikroorganizama, među kojima su koliformi, enterokoke, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* i dr. (Mitrović, 2016; Suvajdžić, 2018).

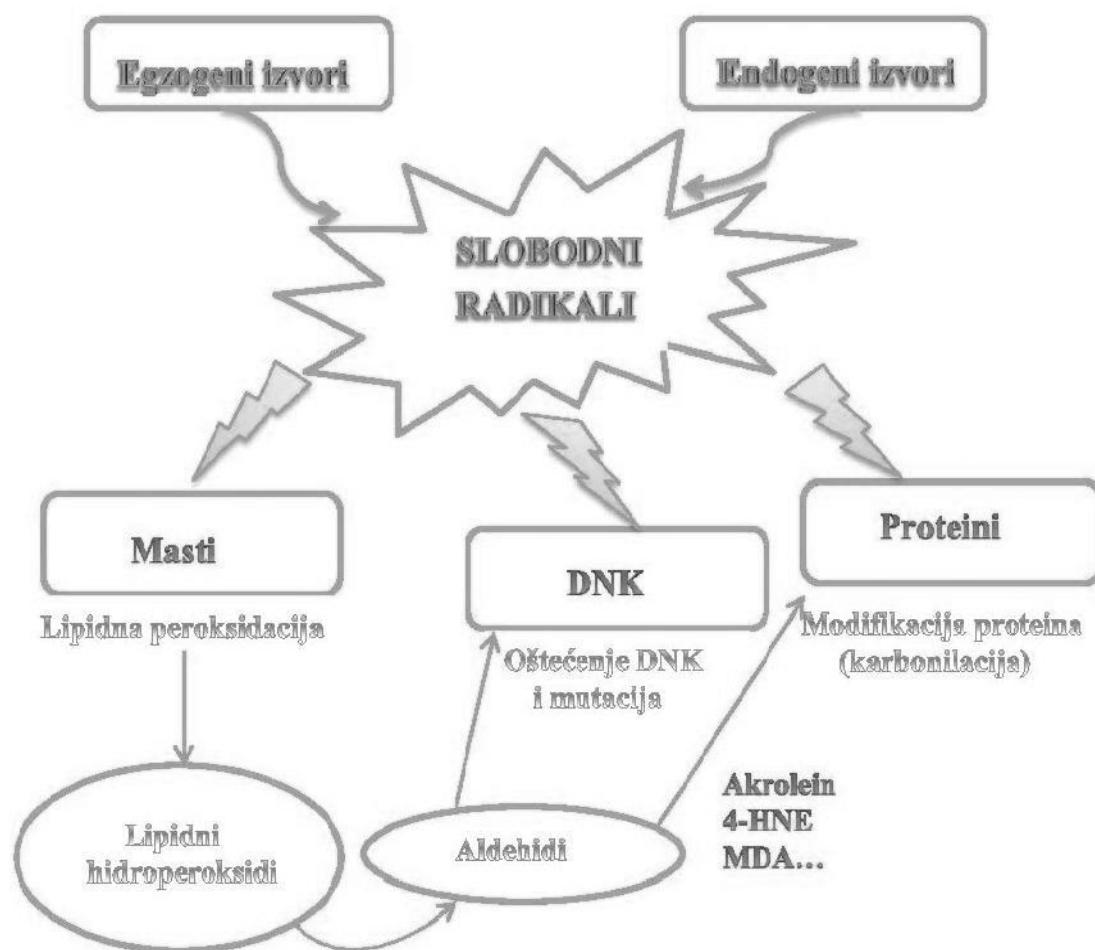
Tokom pripreme nadjeva, u fazi usitnjavanja, dolazi do povećavanja površine dostupne mikroorganizmima i oslobađanja mesnog soka, što dovodi do rasta i razmnožavanje prisutnih mikroorganizama, a miješanjem se već prisutni mikroorganizmi raspoređuju po mesnom tjestu. Rast mikroorganizama u ovom tipu proizvoda odvija se veoma sporo, pošto se zrenje odvija na nižim temperaturama. Tip mikroflore koji će se razviti, dominirati i opstati u proizvodu zavisi od sastava inicialne mikroflore, kao i od faktora tokom zrenja proizvoda (Mitrović, 2016; Suvajdžić, 2018).

Bakterije mliječne kiseline i koagulaza-negativne koke predstavljaju glavne grupe bakterija značajnih za procese fermentacije i zrenja kobasicama (Ikonić, 2013). Pored bakterija značajnih za proces zrenja, u mikroflori nadjeva mogu da se nađu i mikroorganizmi koji kvare nadjev (*Pseudomanadaceae* i *Enterobacteriaceae*), kao i neki patogeni mikroorganizmi (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 i *Staphylococcus aureus*). Poznavanje i kontrola prisutnih mikroorganizama ima izuzetan značaj za mikrobiološki kvalitet, ali i za senzorne osobine kao i bezbjednost gotovih proizvoda (Mitrović, 2016; Suvajdžić, 2018).

Za neke fermentisane kobasicice (mediteranski tip) rast pljesni na površini je poželjan, jer one sprečavaju previše intenzivno sušenje, oksidativne promjene i doprinose razvoju tipičnog ukusa, dok neke pljesni zbog toksičnih metabolita (mikotoksini) mogu imati negativne posljedice na zdravlje čovjeka (Ikonić, 2013).

1.8. Oksidativne promjene u fermentisanim kobasicama

Oksidacija lipida i proteina predstavljaju jedan od velikih problema u industriji mesa. Ove promjene mogu izazvati stvaranje neprijatnih mirisa i ukusa, diskoloracije, smanjenje nutritivne vrijednosti, a s tim i kvaliteta, što utiče na ograničenu održivost proizvoda i dovodi do akumulacije toksičnih jedinjenja (Bošković, 2016). Prilikom smrzavanja, usitnjavanja i nekih drugih mehaničkih postupaka sa mesom, dolazi do narušavanja integriteta ćelijskih membrana koji postaju podložni oksidativnim promjenama (Milanović-Stevanović i sar., 2006).

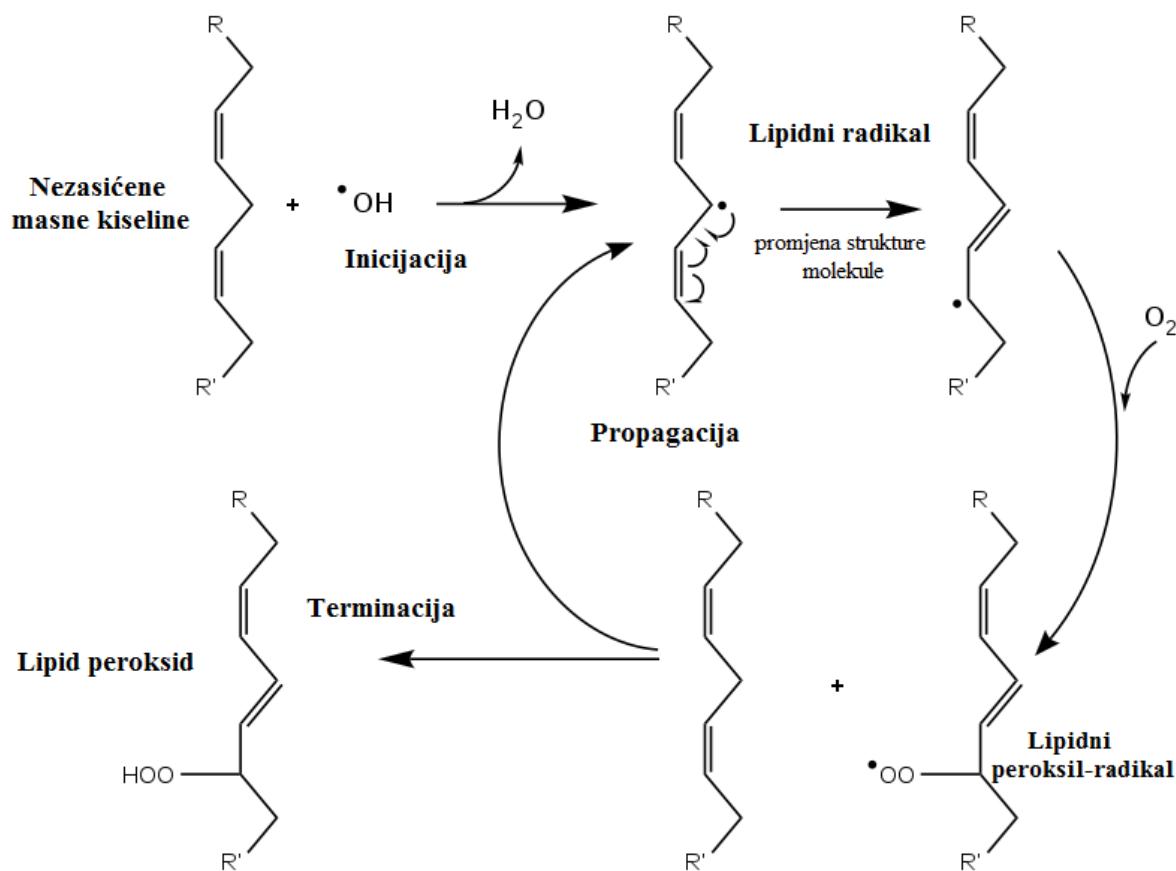


Slika 2. Mehanizam oksidativnog stresa (Jaganjac, 2012)

Hemijska jedinjenja koja u različitim biološkim i hemijskim sistemima uzrokuju ili ubrzavaju reakcije oksidacije nazivaju se prooksidansi. Djeli se na slobodnoradikalna i neradikalna jedinjenja (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Ćelije aerobnih

organizama stalno su izložene dejstvu prooksidanata što ima za posljedicu razaranje lipida, proteina i DNK (*Slika 2.*) (Šojić, 2013).

Slobodni radikali su vrlo nestabilne čestice, u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona zbog čega su veoma reaktivni (Šojić, 2013). Slobodni radikali u reakciji sa lipidima dovode do lipidne peroksidaze, odnosno oksidativne destrukcije nezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. U biološkim sistemima lipidna peroksidacija se može odigravati enzimskim (pod dejstvom lipooksigenaza) i neenzimskim putem, ili uslijed djelovanja atmosferskog kiseonika (autooksidacija) (Mišan, 2009).



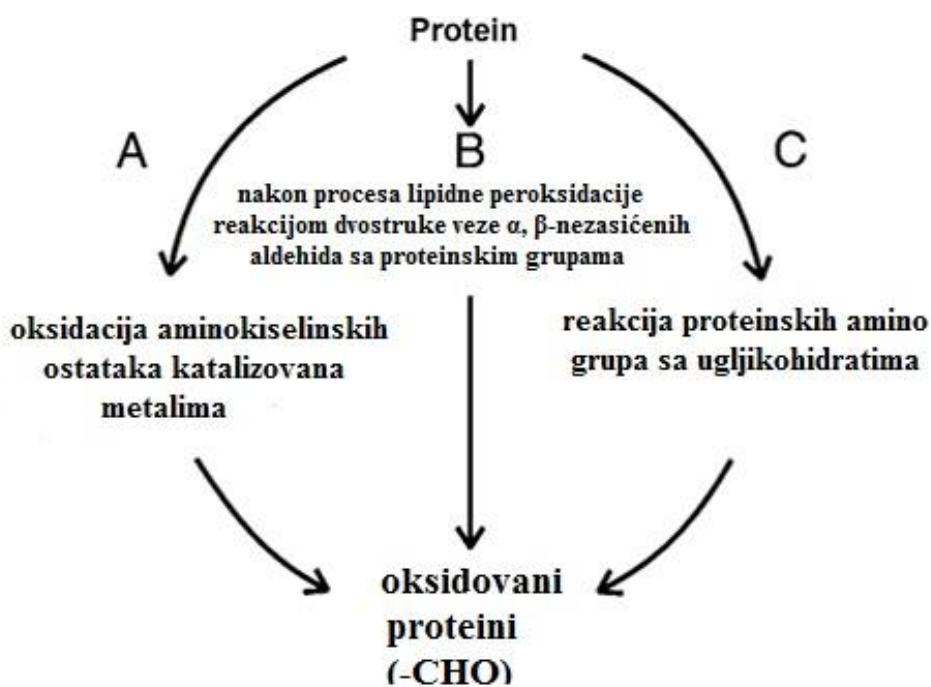
Slika 3. Mehanizam lipidne peroksidacije (By Abylinn - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=95283595>)

Opšti mehanizam lipidne peroksidacije (*Slika 3.*) se sastoji od tri faze (Yanishlieva-Maslarova, 2001):

- (1) inicijacije, formiranja slobodnih radikala;
- (2) propagacije, lančanih reakcija sa slobodnim radikalima; i
- (3) terminacije, formiranje neradikalinskog proizvoda. Primarni proizvodi lipidne peroksidacije (lipidni peroksiidi), dalje podliježu oksidativnim promjenama uz nastajanje sekundarnih

produkata oksidacije lipida (malondialdehid (MDA), heksanal, pentanal i dr). Nastali sekundarni produkti oksidacije lipida su nosioci užeglosti proizvoda (Šojić, 2013).

Oksidacija proteina je znatno sporiji proces od peroksidacije lipida. Oksidacija proteina može dovesti do modifikacije aminokiselina, fragmentacije peptidnih lanaca i agregacija umreženih produkata reakcije. Oksidovani蛋白 su osjetljiviji i mogu uticati na njihovu funkcionalnost i hranjive i senzorne osobine (Manal Azat Aziz i sar. 2019). Promjene fizičko-hemijskih osobina proteina ogledaju se i u smanjenju termičke stabilnosti i promjeni viskoznosti (Zovko, 2017). Druge promjene koje izaziva oksidacija proteina mogu smanjiti bioraspoloživost aminokiselinskih ostataka i modifikovati probavljivost proteina, što negativno utiče na prehrambene vrijednosti proteina mesa (Križanović, 2017).



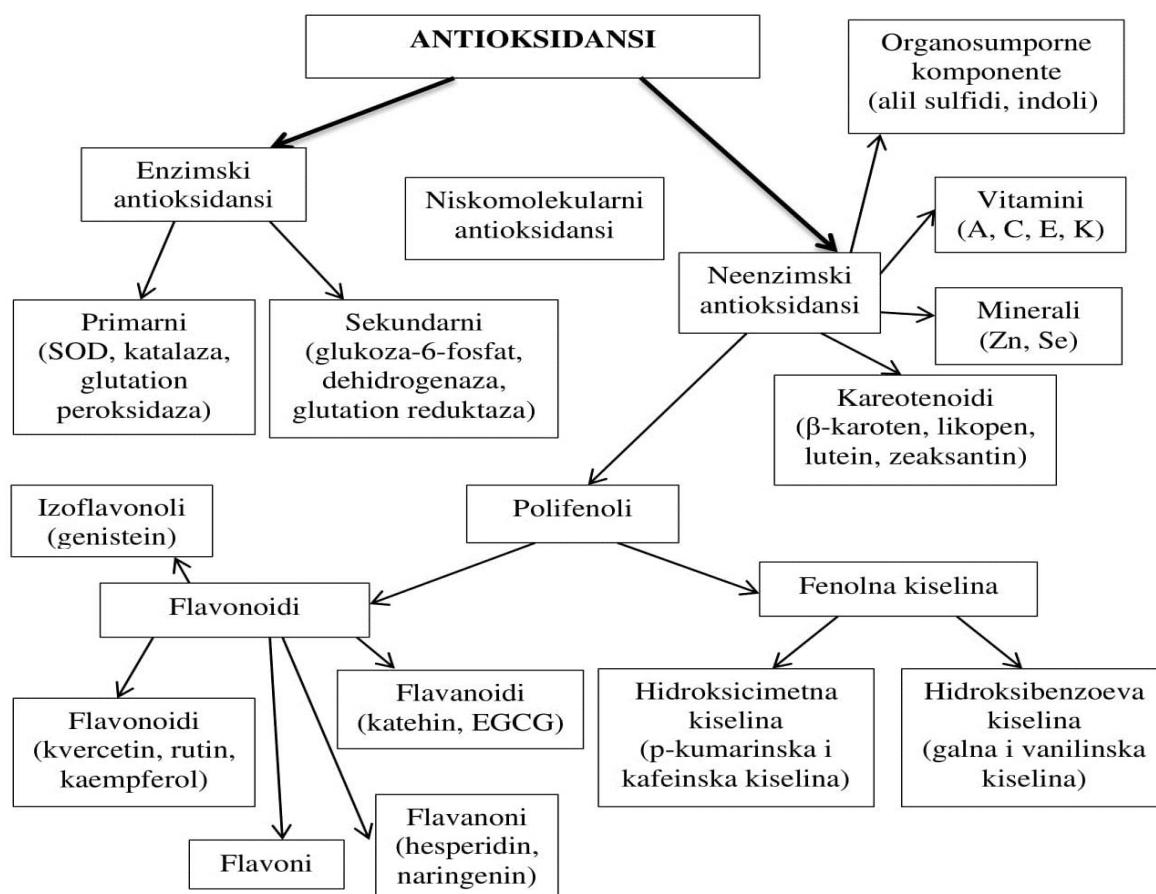
Slika 4. Mehanizam procesa karboksilacije proteina (Frank i sar., 2002)

Do oksidacije proteina može doći prirodnim putem tokom skladištenja u hladnjачama ili uslijed starenja mesa. Glavni proces oksidacije proteina odvija se Fentonovom reakcijom, gdje se prelazni metal spaja sa specifičnim aminokiselinskim ostatkom, i tako omogućava stvaranje hidroksilnog radikala u prisustvu vodonikovog peroksida. Nakon procesa lipidne peroksidacije, reakcijom dvostrukе veze α, β-nezasićenih aldehida sa amino, sulfhidrilnom i imidazolnom skupinom u proteinima ili reakcijom proteinskih amino grupa sa ugljikohidratima, reakcijama glikacije i glikoksidacije, kao produkti oksidacije proteina nastaju karbonilni derivati, čija količina ukazuje na stepen oksidativnog oštećenja (Slika 4.) (Frank i sar., 2002; Fellenberg i Speisky, 2006). Karbonilacija je proces u kojem dolazi do

ireverzibilne modifikacije proteina što dovodi do nastanka proteinских karbonila, aldehida i ketona, koji najčešće nastaju direktnom oksidacijom podložnih bočnih lanaca amino kiselina (Estevez i Heinonen, 2010). Proizvodi s oksidovanim proteinima imaju smanjenu nutritivnu vrijednost uslijed promjene profila amino kiselina, pošto formiranje proteinских karbonila dovodi do irreverzibilne oksidativne modifikacije esencijalnih amino kiselina kao što su lizin, arginin i treonin (Estevez, 2011; Križanović, 2017).

1.9. Antioksidansi

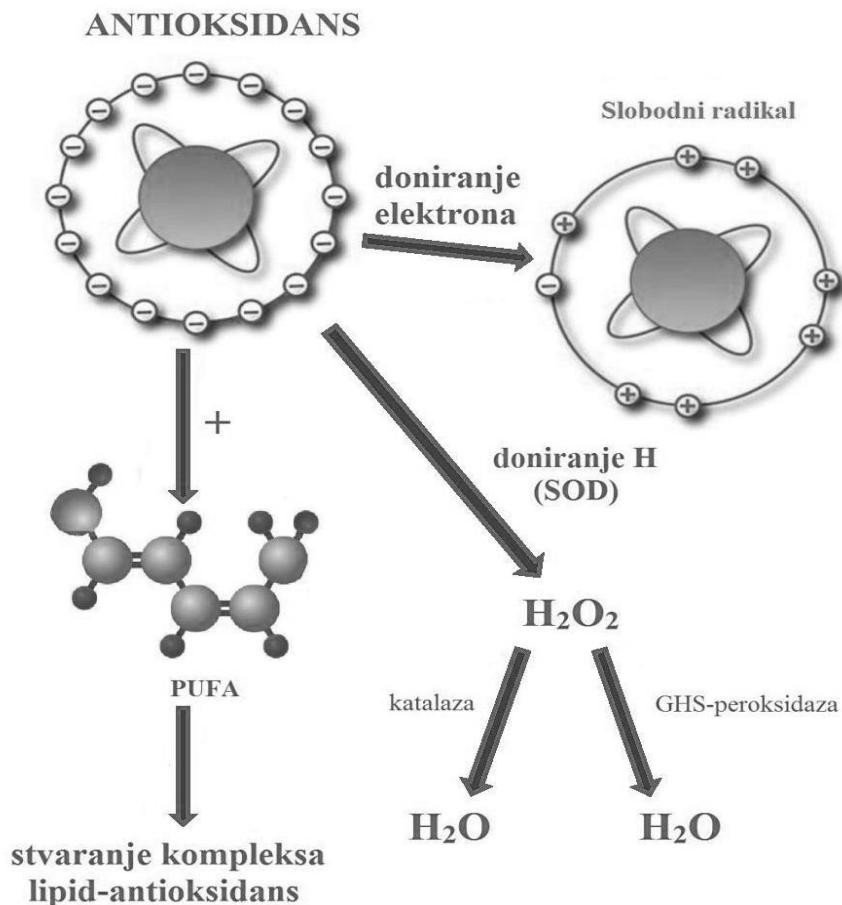
Antioksidansi su supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat koji je podložan oksidaciji (lipidi, proteini, ugljeni hidrati, DNK), značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju njihovu oksidaciju (Mišan, 2009).



Slika 5. Podjela antioksidanasa (Mehta i Gowder, 2015)

Američka uprava za hranu i lijekove (US FDA – *United States Food and Drug Administration*) i Pravilniku o prehrambenim aditivima (Pravilnik o prehrambenim aditivima, Službeni glasnik BiH, broj 33/18, Pravilnik o izmjenama Pravilnika o prehrambenim

aditivima, Službeni glasnik BiH, broj 6/21) definiše antioksidanse kao prehrambene aditive, koji produžavaju rok trajanja hrane štiteći je od kvarenja uzrokovanih oksidacijom, kao što su užeglost masti i promjena boje (Savanović, 2019).



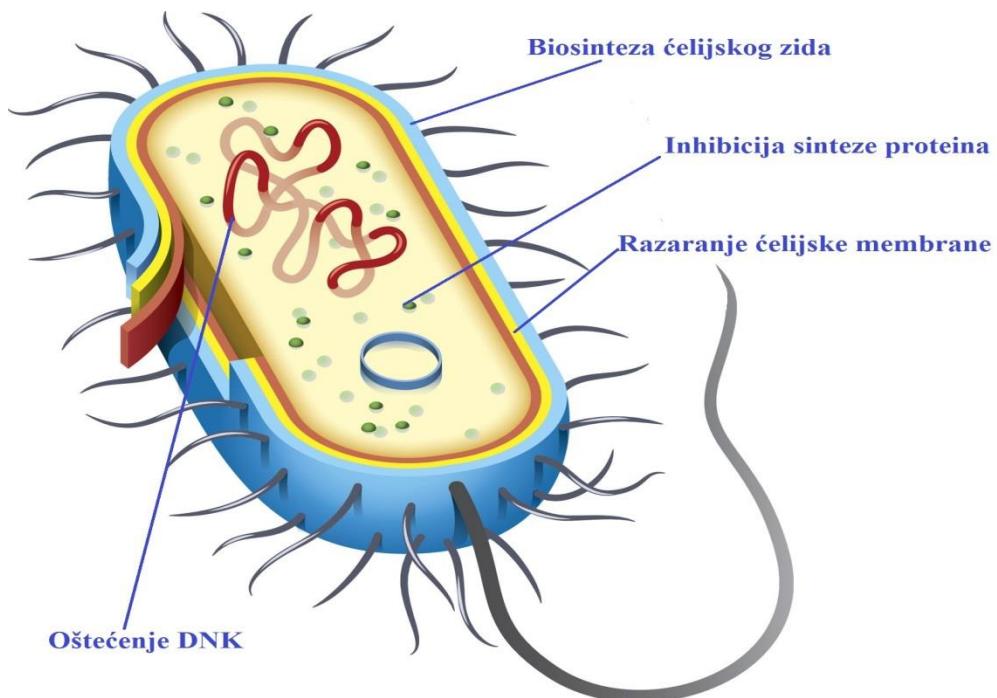
Slika 6. Mehanizam djelovanja antioksidanasa (Bošnjaković, 2017)

Antioksidansi se razlikuju po hemijskoj strukturi i različitom mehanizmu djelovanja. Glavna uloga antioksidanasa je uklanjanje slobodnih radikala i njihovo pretvaranje u manje reaktivne vrste. Mehanizam sprečavanja oksidacije makromolekula može se odvijati antioksidativnom donacijom vodonika, antioksidativnom donacijom elektrona ili vezanjem lipida na antioksidans pri čemu se formira kompleks lipid-antioksidans (*Slika 6.*) (Mijatović, 2019).

1.10. Antimikrobna sredstva

Antimikrobna sredstva koriste se za sprečavanje rasta mikroorganizama u nekoj sredini. Efekat ovih sredstava u najvećoj mjeri zavisi od veličine početne populacije mikroorganizama i njihove raznovrsnosti, intenziteta antimikrobnog sredstva, dužine tretmana i faktora okoline.

Mehanizam djelovanja antimikrobnih sredstava na mikroorganizme sastoji se u razaranju ćelijske ovojnica, denaturaciji proteina, inhibiciji enzima i oštećenju DNK (*Slika 7.*).



Slika 7. Djelovanje antimikrobnih sredstava na bakterijske ćelije (Khameneh i sar. 2019)

Razarajanjem ćelijskog zida ili sprečavanjem sinteze uništava se osmotska barijera što dovodi do lize ćelije. Razaranje lipida i denaturacija membranskih proteina, kao i enzima uključenih u biosintezu komponenti membrane je efikasan mehanizam antimikrobnog djelovanja koji dovodi do uginuća ćelije (Topalić-Trivunović i Žabić, 2015).

1.11. Aktivna ambalaža

Pod pojmom “aktivna” ambalaža, definiše se material koji je dizajniran da otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbuje iz hrane sa ciljem produženja održivosti hrane, kao i održavanja ili poboljšanja uslova pakovanja. U posljednje vrijeme pojačana je upotreba jestivih premaza i filmova koji bi pomogli u očuvanju kvaliteta hrane (Hromiš i sar., 2013; Ozvural i sar., 2016). Ovi premazi djeluju kao prepreka tranzitu kiseonika i vode, usporavaju reakcije oksidacije i zadržavaju vlagu (Tyburcy i sar., 2010). To su prehrambene suspenzije koje se nanose prskanjem ili potapanjem, koje nakon sušenja formiraju prozirni tanki sloj preko površine hrane. Premazi su poseban oblik filmova koji se direktno nanose na površinu materijala i smatraju se dijelom gotovog proizvoda (Sánchez-Ortega i sar., 2014). Tanki sloj materijala se može konzumirati, film može potpuno da prekrije proizvod ili da se primjenjuje

kao sloj između komponenti hrane. Materijali koji se koriste imaju dobra jestiva svojstva, topivi su u vodenom ili uljnom mediju, fleksibilni su i ne smiju pucati prilikom prerade ili skladištenja (Tkalec i sar., 2018). Najpoznatije i najčešće korišćene tehnologije aktivnog pakovanja u industriji hrane su emiteri (antimikrobnih agenasa, antioksidativnih agenasa, etilena i CO₂) i apsorberi (vezuju etilen, vlagu, CO₂ i O₂). Aktivne komponente: emiteri ili apsorberi se mogu primjeniti u obliku kesice/kapsule koja se ubacuje u ambalažu ili se mogu inkorporirati u sam ambalažni materijal (Hromiš, 2015).

Rastvarači koji se prvenstveno koriste za proizvodnju jestivih filmova sadrže vodu, etanol ili kombinaciju oboje. Poznato je da mnoge prirodne supstance, posebno fenolne strukture poput katehina, prisutne u biljnim tkivima, imaju antimikrobno djelovanje. Postoji trend odabira antimikrobnih sredstava iz prirodnih izvora tako da bi se zadovoljila potrebe potrošača za zdravom hranom bez hemijskih dodataka. Antimikrobna sredstva koja se najčešće koriste su organske kiseline, polisaharid hitozan, neki polipeptidi kao nisin, sistem laktoperoksidaze, te neki biljni ekstrakti i njihova eterična ulja. U razvoju antimikrobnih jestivih filmova i prevlake široku upotrebu imaju eterična ulja od začinskog bilja i začina (Campos i sar., 2010). Dodavanjem biljnih ekstrakata ili nekih prirodnih bio konzervanasa, mogu se dobiti filmovi koji posjeduju antimikrobna i antioksidativna svojstva (Krkić i sar., 2012a; Adzaly i sar., 2015; Raesi i sar., 2016; Król i sar., 2017).

1.12. Antimikrobna i antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata

Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata se, često, povezuje sa prisustvom frakcija eteričnog ulja ili prisustva sumpornih jedinjenja u vodenoj fazi. Sastav i struktura funkcionalnih grupa u uljima igraju važnu ulogu u određivanju njihove antimikrobne aktivnosti. Rezultati različitih studija pokazuju da biljni bioaktivni spojevi mogu djelovati kao dobra zamjena za sintetičke antioksidanse i konzervanse (Sahari i Asgari, 2013; Mäkinen i sar., 2020).

Ugradnja antioksidativnih bioaktivnih jedinjenja u formulaciju proizvoda, na površinu u obliku filma ili u materijal za pakovanje, može uticati na inhibiranje rasta nepoželjnih mikroorganizama, kao i na smanjenje oksidacije lipida i proteina u hrani. U tu svrhu se provode mnoga istraživanja da bi se pronašla nova prirodna jedinjenja koja bi očuvala senzorni i mikrobiološki kvalitet proizvoda od mesa.

Prirodni antioksidansi imaju veliki potencijal primjene u mesnoj industriji. Biljni ekstrakti mogu biti veoma korisni u prehrambenoj industriji zbog antimikrobnog i antioksidativnog potencijala, jer su prepoznati kao sigurni (GRAS, Generally Recognized as Safe). Biljni ekstrakti bi trebali ispuniti slijedeće zahtjeve (Nikmaram i sar., 2018):

1. ne bi trebali imati negativan uticaj na senzorna svojstva (npr. boju, miris ili aromu);
2. pokazati efikasnost pri niskim koncentracijama (0.001–0.01%) i biti jednostavni za upotrebu;
3. zadržati stabilnost tokom obrade i skladištenja;
4. trebaju biti ekonomski isplativi.

Da bi se spriječio rast patogenih mikroorganizama i smanjilo mikrobiološko kvarenje, uvodi se nova alternativa - biokonzervisanje, koje je zasnovano na upotrebi mikroorganizama i/ili njihovih metaboličkih proizvoda sa ciljem inhibiranja rasta mikroorganizama u hrani.

U Brazilu je odobrena primjena nizina, metaboličkog proizvoda mlijeko-kiselinskih bakterija, potapanjem ili prskanjem površine hrenovki nakon termičke obrade, u koncentraciji od 200 mg/L u 0.1% rastvoru fosforne kiseline. Istraživanja su pokazala da nizin u koncentraciji od 5.0 mg/L, koji je inkorporiran u prirodna crijeva prije punjenja, utiče na smanjenje broja neželjenih bakterija mlijeko-kiseline u vakuum pakovanim kobasicim skladištenim na niskim temperaturama (Barros i sar., 2010). Kombinacija nizina sa kuhijskom solju znatno inhibira rast *L. monocytogenes* u prirodnim crijevima ovaca (Hammou i sar., 2010).

U posljednje vrijeme javlja se sve veća potreba za prirodnim antioksidativnim i/ili antimikrobnim sredstvima kao efikasne alternative u sprečavanju kvarenja i oksidativnih promjena hrane. Prirodni antioksidanti koji se nalaze u biljkama imaju značajnu ulogu u sprečavanje autooksidacije ulja i masti koje sadrže prehrambeni proizvodi.

Antioksidativna svojstva biljaka često se povezuju sa sadržajem fenola, što ukazuje na antioksidativno djelovanje sličano djelovanju sintetičkih antioksidanata. Biljke se smatraju važnim prirodnim izvorima prirodnih antioksidanasa i/ili antimikrobnih sredstava (Ibrahim i sar., 2011). Najvažnije grupe prirodnih antioksidanata u voću i povrću su tokoferoli, flavonoidi, fenolne kiseline, terpenoidi i kateronoidi. Pored prirodnih, postoje i sintetički antioksidansi, za koji su tačno određeni uslovi pod kojima se mogu dodati nekom prehrambenom proizvodu. To su BHT (butil hidroksitoluen) i BHA (butil hidroksianizol), te galati, koji se u hranu dodaju u vrlo malim količinama (Burdock, 1997) i njihova upotreba u zadnje vrijeme sve više se osporava.

Mnoge biljne vrste kao aktivni biološki izvori sadrže fitohemikalije sa antimikrobnim, antioksidativnim, antimutagenim i antikancerogenim djelovanjem. Fitohemikalije koje pokazuju antioksidativna i antimikrobna svojstva mogu se koristiti za očuvanje i produženje roka trajanja namirnica. Pored antimikrobnog djelovanja, biljke i začini bogati fenolnim

jedinjenjima, koji imaju značajnu antioksidativnu aktivnost, mogu uticati na očuvanje hrane, smanjenjem oksidacije lipida. U mnogim slučajevima bioaktivna jedinjenja se mogu dobiti korištenjem poljoprivrednog otpada ili nusproizvoda u biljnoj proizvodnji, i kao takvi mogu pružiti ekonomsku isplativost (Sahari i sar., 2013).

Zbog činjenice da slobodni radikali mogu biti odgovorni za pojavu raznih bolesti, a učestvuju i u procesu starenja, interes za antioksidativnu aktivnost biljnih ekstrakata su postali veći. Biljni ekstrakti ili esencijalna ulja nekih biljaka klasifikovani su kao sigurni (GRAS- Generally Recognized as Safe), bez negativnih uticaja na ljudsko zdravlje i u velikoj mjeri se proučava njihov uticaj i primjena u raznim namirnicama, naročito u mesu i proizvodima od mesa (svinjetina, govedina, jagnjetina) (Ibrahim i sar., 2011). U proizvodnji i preradi mesa kao potencijalni prirodni dodaci često se koriste neki začini (origano, ružmarin), voće (šljive, borovnice, nar).

Kombinacija prirodnih antimikrobnih i antioksidativnih supstanci: hitozana i etarskih ulja biljaka može dati odlične rezultate. Inkomporiranjem etarskih ulja u hitozanski omotač usporava se isparavanje aktivnih komponenti, a hidrofobna priroda ulja može doprinijeti pobošanju mehaničkih i barijernih karakteristika omotača.

Jedan od mogućih pristupa u rješavanju pitanja očuvanja kvaliteta u toku skladištenja fermentisanih kobasicica je prirodno, ekološki prihvatljivo rješenje u vidu upotrebe jestivog, biorazgradivog aktivnog filma na bazi hitozana, uz dodatak etarskih ulja biljaka (Krkić i sar., 2012b). Dodatkom etarskih ulja origana i kima, kao i pčelinjeg voska, dobija se aktivni jestivi ambalažni materijal optimalnih svojstava. koji doprinosi očuvanju boje presjeka kobasice, i efikasno štiti od nepoželjnih oksidativnih promjena (Hromiš, 2015).

1.13. Bobičasto voće

U posljednje vrijeme samoniklo šumsko voće, pretežno bobičasto, predstavlja jednu od najomiljenijih i najzastupljenijih grupa jestivih divljih biljaka. Pored uloge u ishrani, za ove darove prirode zainteresovani su i prehrambena i farmaceutska industrija. Upotrebljavaju se listovi, cvjetovi, plodovi i kora pošto je dokazano da posjeduju antimikrobne i antioksidativne osobine (Bajić-Ljubičić, 2018). Od fitohemikalija prisutnih u bobičastom voću, najznačajnije mesto zauzimaju polifenolna jedinjenja koja pokazuju snažnu antioksidativnu, a pored toga i značajnu antimikrobnu aktivnost (Šarić, 2016; Tarik i sar., 2016).

1.13.1. Trnjina



Carstvo:	Biljke
Divizija:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Red:	<i>Rosales</i>
Porodica:	<i>Rosaceae</i>
Potporodica:	<i>Prunoideae</i>
Rod:	<i>Prunus</i>
Vrsta:	<i>P. spinosa</i>

Slika 8. Trnjina (<https://www.plantea.com.hr/trnina/>)

Trnjina je višegodišnja biljka iz porodice ruža (Rosaceae), rod *Prunus* (Slika 8.), pripada grupi listopadnih grmolikih biljaka, sa veoma gustom i granatom krošnjom i trnjem. Dostiže visinu od 1 do 5 m. Najčešće se može naći uz rubove šuma, na neplodnim zemljištima i pašnjacima, rasprostranjena je vrsta u pojasu hrastovih šuma. Može se naći i do 1500 m nadmorske visine, a podnosi temperature i do -30°C. Cvjeta početkom proljeća, cvjetovi dvoljni, petočlani, rastu pojedinačno na kratkim drškama i bjele su boje. Sazrijeva u perodu juli-avgust, a plod je tamnoplava, okrugla košutnica, veličine oko 1.5 cm, oporog i kiselog ukusa.

Trnjina se, zbog svojih ljekovitih osobina, ubraja u ljekovite biljke. Koristi za pravljenje soka, sirupa, vina, ali i kao ukrasna biljka za žive ograde i za sprečavanje erozije tla.

Trnjina sadrži vitamine (C, A, B1, B2, B6, E), ugljene hidrate (glukozu, fruktozu, saharozu), fenolna jedinjenja (antocijane, tanine) i organske kiseline (jabučnu i dr.) i vodu. Od mineralnih materija zastupljeni su natrijum, kalijum, kalcijum, magnezijum, gvožđe i fosfor. U plodu i kori ima tanina i gorkih materija (Milenković, 2013; <https://hr.wikipedia.org/wiki/Trnina>).

Trnjina kao bogat izvor fenola, uključujući fenolne kiseline, antocijane i flavanole, je prepoznata u literaturi kao izvor antioksidanata. Pored toga, trnjina pokazuje selektivnu inhibiciju rasta nekih potencijalno patogenih sojeva bakterija. Smatra se da trnjina ima značajnu biološku važnost kao antioksidans i mikrobiološko sredstvo, te lako može naći različitu primjenu u prehrabrenoj i farmaceutskoj industriji (Veličković, 2013; Ruiz-Rodriguez i sar., 2014; Tahirović i sar., 2018; Pozzo i sar., 2019).

1.13.2. Drenjina

Crveni drijen (tvrdi drijen, drijenak, lat. *Cornus mas*) je vrsta cvjetnica u porodici *Cornaceae* (Slika 9.). To je samonikla jestiva biljka, a u posljednje vrijeme se uzgaja i u voćnjacima u različitim zemljama južne i istočne Evrope i centralne i jugozapadne Azije. Uglavnom raste u šumi, a najčešće se sreće na nadmorskim visinama od 100 do 1000, pa i do 1300 m. Najbolje mu odgovaraju topliji tereni i položaji, kao i otvorene visoravni. Često se javlja i po obodu kotlina. To je listopadni grm ili nisko drvo, 5 do 12 m visine, sa zaobljenom gustom krošnjom. Cvjetovi su žuti. Javlju se rano, prije listanja, sakupljeni u štitasti cvat, pravilni su i četvoročlani. Cvijeta u kasnu zimu. Drenjine su plod drijenka, duguljastog su oblika duga 2 cm, dijametra 1.5 cm, sadrži jednu sjemenku. Zrele drenjine su tamnocrvene boje i vrlo ukusne za jelo. Spadaju pod jesenske plodove. Drenjine se koriste kao suvo voće, za pravljenje pekmeza i soka (https://hr.wikipedia.org/wiki/Crveni_drijen).



Carstvo:	Biljke
Divizija:	<i>Magnoliophyta</i>
Klasa:	<i>Magnoliopsida</i>
Red:	<i>Cornales</i>
Porodica:	<i>Cornaceae</i>
Rod:	<i>Cornus</i>
Podrod:	<i>Cornus</i>
Vrsta:	<i>Cornus mas</i>

Slika 9. Drenjina (<https://www.narodnilijek.com/web/dren-biljka/>)

Dren je od davnina poznat kao ljekovita biljka, još u starom vijeku je korišćen kao lijek protiv mnogih bolesti u vidu čajeva, obloga i melema, ali i kao poslastica (Bijelić i sar., 2011).

Svježa drenjina sadrži mnogo nutritivnih i bioaktivnih spojeva. Pored visoke količine vitamina C (106.3 mg/100 g), bogata je šećerima (7.2-8.5%), organskim kiselinama, celulozom (0.75-1.00%), pektinom (0.5-1.12%) i taninom (Petkova i Ognyanov, 2018).

Drenjina je prepoznata kao izvor polifenola, tanina, antocijanina i iridoida. Takođe, smatra se prirodnim izvorom protuupalnih i antitoksičnih sredstava za uklanjanje prirodnih radikala (Cornescu i Cosmulescu, 2017). Primarne supstance identifikovane i obilježene u plodovima

kornelijkske trešnje (koje su odgovorne za njihovo biološko djelovanje) su vitamin C, antocijani, flavonoidi i iridoidi (Szczepaniak i sar., 2019).

Zbog svog sastava posljednjih godina istraživanja su se uglavnom fokusirala na antioksidativnu aktivnost drenjka i njegovu upotrebu kao potencijalnog izvora prirodnih antioksidansa (Stanković i sar., 2014; Yigit, 2018). Neke studije su potvrdile da drenjak ima antimikrobno, antiparazitsko, protuupalno i antioksidativno dejstvo (Jaćimović i sar., 2020). U Evropi je zabilježeno da plodovi drenjka nalaze primjenu kao prirodni aditiv u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Moldovan i David, 2014; Piryaei i sar., 2019).

1.13.3. Divlja trešnja, crvena

Divlja trešnja (lat. *Prunus avium*), listopadna je vrsta drveća iz porodice *Rosaceae* (*Slika 10.*). Drvo raste visine od 15 do 32 m, prečnika do 1.5 m. Bijeli cvjetovi se formiraju gusto zbijeni, rastu prije listanja, na prošlogodišnjim izbojcima. Plodovi su sitniji i malibrojniji nego kod pitomih sorti trešnje, bobica je 1-2 cm promjera, svijetlo crvene do tamno ljubičaste boje kad sazrije usred ljeta. Imaju kiselo-slatko-gorak ukus. Sadrži 80% vode, celuloze, pektina, organskih kiselina (jabučna, limunska, vinska), vitamina C, B i karotena, bogata je kalijem. Plodovi divlje trešnje (*Prunus avium* L.) posebno su bogati polifenolima (posebno flavonoidima, antocijaninima i hidroksicinaminskim kiselinama), i sadrže visok nivo askorbinske kiseline i kalijuma (Commissio i sar., 2017; Gonçalves i sar., 2019).



Carstvo:	Biljke
Divizija:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Red:	<i>Rosales</i>
Porodica:	<i>Rosaceae</i>
Potporedica:	<i>Prunoideae</i>
Rod:	<i>Prunus</i>
Vrsta:	<i>Prunus avium</i>

Slika 10. Divlja crvena trešnja (<http://bioekokozlinger.hr>)

Poznato je da divlja trešnja sadrži značajne količine antocijanina i drugih polifenolnih jedinjenja koji utiču na ukupnu antioksidativnu aktivnost (González-Gómez i sar., 2010; Serra i sar., 2011; Hayaloğlu i Demir, 2015; Iglesias-Carres i sar., 2019). U poslednje vrijeme došlo se i do saznanja o efikasnosti ekstrakata trešnje na rast mikroorganizama (G(+)) i G(-))

bakterija), odnosno o saznanju da pored antioksidativnog, trešnja ima i antimikrobna svojstva (Hanbali i sar., 2012). Divlja trešnja može da se smatra perspektivnom funkcionalnom hranom za ljudsko zdravlje (Serra i sar., 2011), ali i da se koristi u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka i drugih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Krstić, 2018).

1.13.4. Aronija

Aronija je grmovita listopadna biljka koja pripada porodici *Rosaceae*, porijeklom s istoka Sjeverne Amerike. Najpoznatija i najviše uzgajana je *Aronia melanocarpa* tzv. crnoplodna aronija čiji grm doseže visinu oko 1 metra (*Slika 11.*). Zbog visokog stepena otpornosti na mraz, izdrži zimu i do -47°C. Zato je mnogi nazivaju sibirска боровница. Cvjetanje bijelih cvjetova počinje u maju i traje 10-ak dana. Ljubičasto-crveni plodovi dozrijevaju polovinom avgusta, sitni su, jabučastog oblika, težine 1.0-1.5 g. Ima kiseo i opor ukus (Križić, 2016; <https://hr.wikipedia.org/wiki/Aronija>).



Carstvo:	Biljke
Divizija:	<i>Angiospermae</i>
Red:	<i>Rosales</i>
Porodica:	<i>Rosaceae</i>
Potporodica:	<i>Amygdaloideae</i>
Tribus:	<i>Maleae</i>
Rod:	<i>Aronia</i>
Vrste:	<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott

Slika 11. Aronija (<https://hipokrat.com.hr/aronija/>)

Zahvaljujući ljekovitom djelovanju hemijskih komponenti (antioksidativna aktivnost, antikancerogenost, antibakterijsko djelovanje, kardioprotektivnost, hepatoprotektivnost, neuroprotektivnost itd.), aronija se danas sve više koristi u prehrambenoj industriji u proizvodnji sokova, čajeva, džemova, vina i kao prirodna boja za prehrambene proizvode (Mijatović, 2019).

Plod i sok od aronije dobri su izvori vitamina C, organskih kiselina, karotenoida, tanina, a sadrže i prirodne šećere i pektine, vitamine B grupe i minerale (kalijum, cink, magnezijum, natrijum, gvožđe) (Ćujić, 2017). U poslednje vrijeme mnoge studije potvrđuju pozitivno

djelovanju aronije. Aronija ima veliki sadržaj bioaktivnih jedinjenja poput antocijanina, karotenoida, masnih kiselina, flavonoida, fenolnih jedinjenja, vitamina, što se odražava na antioksidativno djelovanje. *Aronia melanocarpa* može da se primjenjuje kao antimikrobeno sredstvo, a također može biti korisna kao funkcionalni materijal u prehrabenoj industriji.

Pored toga, plod aronije i njen ekstrakt imaju blagotvorne efekate na ljudsko zdravlje (Liepiņa i sar., 2013; Kim i sar., 2018; Milutinović i sar., 2019). Brojne studije su pokazale da ekstrakti aronije iz zrelih plodova imaju antikancerogena, antidijabetička i protuupalna svojstva, utiču na smanjenje krvnog pritiska i ublažavaju toksičnost teških metala (Gralec, 2019; Shahin i sar., 2019).

2. ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja dodataka biljnih ekstrakata na svojstva prirodnog omotača i održivost fermentisane kobasice tipa „sudžuk“.

U tu svrhu postavljene su pomoćne (H1-H4) i glavna hipoteza (H).

- H1: Biljni ekstrakti imaju različito antioksidativno djelovanje,
- H2: Biljni ekstrakti imaju različito antimikrobno djelovanje,
- H3: Prirodni omotači potopljeni u biljne ekstrakte imaju različito antioksidativno djelovanje,
- H4: Prirodni omotači potopljeni u biljne ekstrakte imaju različite antimikrobno djelovanje,
- H: Upotreba omotača tretiranog biljnim ekstraktom utiče na očuvanje kvaliteta i produkciju trajnosti fermentisanih kobasicica tokom skladištenja.

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Materijal

Za potrebe ovog rada, testirane su sljedeće biljne vrste: trnjina (*Prunus spinosa*), drenjina (*Cornus mas*), crvena divlja trešnja (*Prunus avium*) i aronija (*Aronia melanocarpa*). Zreli plodovi ispitivanih biljnih vrsta su prikupljeni u vrijeme njihove pune zrelosti. Svježi plodovi su odmah nakon branja smješteni u plastične vrećice i obilježeni prema vrsti. Svjež materijal je transportovan u laboratoriju u prenosivom frižideru i preko noći smješten u frižideru, da bi sutradan bio sortiran (odbačeni su oštećeni, nagnječeni plodovi) i očišćen od sjemenki nakon čega se pristupilo proceduri ekstrakcije.

Nakon analize antioksidativnih i antimikrobnih svojstava ekstrakata i omotača tretiranih rastvorima ekstrakata, izabrani ekstrakti su korišteni za inkorporiranje na prirodne omotače (potapanje, 24h) u koje su punjene fermentisane kobasice, tipa sudžuk.

3.1.1. Priprema biljnih ekstrakata

Plodovi su isprani, a peteljke i sjemenke uklonjene. Uzeto je 40 g plodova i homogenizovano sa 160 ml rastvarača (80% (v/v) etanol, destilovana voda). Homogenizacija je obavljena pomoću homogenizatora (Polytron PT 3100, Kinematica AG, Switzerland), 10 minuta pri 8000 rpm, zatim 30 minuta u ultrazvučnom kupatilu WUC-A03H (Witeg, Germany), i 30 minuta na magnetnoj mješalici (ARE, Velp Scientifica, Usmate, Italy). Smjesa je filtrirana i dobiveni filtrat je uparen do suva, prvo na vakuum uparivaču (Devarot, Elektromedicina, Ljubljana, Slovenia), a zatim u suvom sterilizatoru (VIMS elektrik, Republika Srbija) na 50°C.

Tabela 1. Biljni ekstrakti

biljka	sredstvo za ekstrakciju	ekstrakt
trnjina	80% (v/v) etanol	TE
	voda	TV
drenjina	80% (v/v) etanol	DE
	voda	DV
aronija	80% (v/v) etanol	AE
	voda	AV
crvena trešnja	80% (v/v) etanol	TrE
	voda	TrV

Pripremljeni su biljni ekstrakti prikazani u *Tabeli 1*. Ovako pripremljeni suvi ekstrakti čuvani su na tamnom mjestu do momenta analize.

Nakon toga, vršena su antioksidativna i antimikrobna testiranja pripremljenih ekstrakata, radi utvrđivanja najboljeg antioksidacionog sredstva kao i određivanje koncentracije koja ima najbolje antimikrobno djelovanje potrebne za dalje analize. Uporedo sa ekstraktima vršeno je testiranje vitamina C, kao standardnog antioksidacionog sredstva i etanola kao antimikrobnog sredstva. Za potrebe određivanjivanja antimikrobne aktivnosti pripremljeni suvi biljni ekstrakti su rastvoreni u 80% (v/v) etanolu i u destilovanoj vodi te su dobijeni rastvori biljnih ekstrakata prikazani u *Tabeli 2*.

ekstrakt	rastvarač	rastvor
TE	80% (v/v) etanol	TEE
	voda	TEV
TV	80% (v/v) etanol	TVE
	voda	TVV
DE	80% (v/v) etanol	DEE
	voda	DEV
DV	80% (v/v) etanol	DVE
	voda	DVV
AE	80% (v/v) etanol	AEE
	voda	AEV
AV	80% (v/v) etanol	AVE
	voda	AVV
TrE	80% (v/v) etanol	TrEE
	voda	TrEV
TrV	80% (v/v) etanol	TrVE
	voda	TrVV

3.1.2. Priprema crijeva i potapanje u ekstrakte

Prirodna usoljena goveda crijeva (Mesnica „Kod Laze“, Banja Luka), potopljena su u vodu i isprana od soli. Za potrebe mikrobioloških analiza, crijevo je sjećeno na komade površine 3.5x2.4 cm, i prije potapanja u ekstrakte izloženo djelovanju UV zraka (na 254nm), 30 minuta. U sterilnim uslovima komadi crijeva su potopljeni u ekstrakte i držani 24h na tresilici (SHO-2D, Witeg, Germany), pri 120 o/min. Nakon 24h trešenja, crijeva su izvađena iz ekstrakta i osušena

na sobnoj temperaturi, u sterilnim uslovima. Ovako pripremljeni crijeva korištena su za mikrobiološku analizu.

Za antioksidacione testove crijeva su isječena na komade dužine 5 cm, te potopljena u ekstrakte na isti način, kao i kod pripreme za mikrobiološke metode. Ostatak postupka je isti kao i kod pripreme za mikrobiološke analize.

3.1.3. Proizvodnja kobasica

Suvo fermentisana goveđa kobasica, tipa „sudžuk“ korišćena je u eksperimentu kao model-proizvod. Uzorci su proizvedeni u industrijskim uslovima (MI „Njam-njam“, Banja Luka), prema specifikaciji proizvođača (*Tabela 3*).

Tabela 3. Proizvođačka specifikacija za izradu sudžuka

Komponente u nadjevu	%
juneće meso II kategorije	80
govedi loj	16
nitritna so	2.5
začini	
-crni biber	0.3
-bijeli biber	0.15
-granule bijelog luka	0.35
-aditiv - komposal P3*	0.6
-starter kulture	0.01

*Komposal P3 –dekstroza, so, saharoza, askorbinska kiselina, konzervans E252 (2.5%)

Smrznuto goveđe meso i goveđa mast rezani su na manje komade. Nakon usitnjavanja i miješanja u kuteru, uz dodatak svih komponenti, nadjev je punjen u prirodna juneća crijeva.

Tretman crijeva prije punjenja sastojao se od pripreme crijeva (ispiranje soli) i potapanja (24h) u izabrane ekstrakte, i to:

C1 - kontrolni uzorak, crijeva potopljena u vodu,

C2 - kontrolni uzorak, crijeva potopljena u rastvor vitamina C, koncentracije 5 mg/mL,

C3 - kontrolni uzorak, crijeva potopljena u rastvor etanola, koncentracije 6 vol%,

DEE - uzorak, crijeva potopljena u rastvor etanolnog ekstrakta drenjine, koncentracije 22.5 mg/mL, u 6 vol% etanolu,

AEE - uzorak, crijeva potopljena u rastvor etanolnog ekstrakta aronije, koncentracije 45 mg/mL, u 6 vol% etanolu.

Kondicioniranje kobasica je vršeno na 18-20°C 8h, nakon čega slijedi dimljenje u trajanju od 3 dana, na 23°C i 92-95% RH, i sušenje, u trajanju od tri dana (18-20°C, 84-88% RH). Nakon toga slijedi zrenje i sušenje (8 dana) pri temperaturi od 16-18°C i 77-82% RH.

Gotove kobasice pakovane su u vakuumu, a upakovani uzorci su čuvani na temperaturi od +4°C, što je uobičajena temperatura za skladištenja ove vrsta proizvoda. Rok trajanja ovog proizvoda je šest mjeseci i analize su vršene u tom periodu. Fizičke, fizičko-hemiske i hemijske analize, senzorna analiza, antioksidativne analize, kao i promjene na mastima (kiselinski stepen, peroskidni broj i TBARS test) rađene su u nadjevu i neposredno nakon proizvodnje, te nakon 3 i 6 mjeseci, dok su mikrobiološke analize rađene u nadjevu, nakon proizvodnje i svaki mjesec do isteka roka trajanja od 6 mjeseci.

Kobasice su usitnjene na mašini za mljevenje mesa (“Lupo Marshall”), provlačenjem svakog uzorka dva puta kroz mašinu. Iz zbirnog uzorka uzimano je 300 ± 10 g za analize.

Crijeva skinuta sa 5 kobasicama korištena su u ispitivanju antioksidativnih osobina.

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema uzorka za testiranje antioksidativnih svojstava

Pripremljeni suvi ekstrakti rastvarani su u metanolu, u koncentraciji 10 mg/mL i korišteni za analize (ukupni fenoli, neflavonoidi, flavonoidi, flavonoli, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonil)) i FRAP (ferric reducing antioxidant power)).

Crijeva potopljena u ekstrakt nakon sušenja se važu (~5g), preliju sa 25mL 80% etanola, stave u ultrazvučnu kadu (15 minuta), a zatim se vrši ekstrakcija kuhanjem uz povratno hladilo, 10 minuta od trenutka ključanja. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, uzorci se filtriraju u tikvicu (50 ml), a preostali talog zajedno sa filter papirom vraća nazad u tikvicu, uz dodatak 25 ml 80% tñog rastvora etanola i ekstrahuje još 10 minuta. Filtrira se u tikvicu u kojoj se nalazi prvi filtrat i dopuni 80% tñim rastvorom etanola do oznake. Ovako pripremljen ekstrakt se koristi za određivanje ukupnih fenola, DPPH, ABTS i FRAP.

Za svaki uzorak vršena je priprema tri ekstrakta i rezultati su dati kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tih mjerjenja.

Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ukupni fenoli (TPC) određuju se spektrofotometrijski, modifikovanom metodom Folin-Ciocalteu (Wolfe i sar., 2003), koja se zasniva na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteau reagensom, te mjerjenjem nastalog inteziteta obojenja na $\lambda = 765$ nm.

Kvantifikacija se vrši na osnovu kalibracione krive standarnog rastvora galne kiseline (20-200 mg/L). Rezultat se izražava kao miligram-ekvivalenata galne kiseline po gramu uzorka (mg GAE/g) (Naveena i sar., 2008).

Određivanje neflavonoida

Sadržaj neflavonoida (TN) se određuje prema formaldehidskoj metodi Alberto i sar. (2006). Za taloženje flavonoidnih jedinjenja primjenjuje se formaldehid, koji reaguje s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metiol derivat, koji dalje reaguju s drugim flavonoidnim spojem takođe na C-6 ili C-8 položaju itd. U epruvetu se otpipetira 1 mL uzorka, 1 mL 1:4 hlorovodonične kiseline (HCl) i 0.5 mL rastvora formaldehida koncentracije 8 mg/mL. Rastvor se ostavi 24 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se filtracijom odstrane kondenzovane molekule. Preostali fenolni spojevi (neflavonoidi) u filtratu se određuju Folin-Ciocalteu metodom (Wolfe i sar., 2003), a rezultati se izražavaju u mg GAE/g.

Određivanje ukupnih flavonoida

Udio flavonoida (TF) se računa iz razlike sadržaja ukupnih fenola i neflavonoida, prema formuli vodeći računa o faktoru razrjeđenja i načinu pripreme reakcijske smjese.

$$TF \text{ (mg GAE/g)} = TPC - TN$$

Određivanje ukupnih flavonola

Sadržaj ukupnih flavonola se određuje spektrofotometrijski pomoću aluminijevog hlorida, prema metodi Kumaran i Karunakaran (2007). Pomiješa se 1 mL rastvora uzorka, 1 mL $AlCl_3$ i 1.5 mL natrijum acetata, ostaviti da stoji 2.5 sata na sobnoj temperaturi i mjeri apsorbancija na

$\lambda=440$ nm uz slijepu probu (destilovana voda i reagensi). Kvantifikacija se vrši na osnovu kalibracione krive standarnog rastvora kvercetina, a rezultati se izražavaju kao mg kvercetina/g uzorka.

Određivanje antocijana (ukupni i monomerni)

Za određivanje antocijana koristi se pH diferencijalna i „singl“ pH metoda (Sun i sar., 1998). U rastvor za ekstrakciju (85 mL 95%-tnog rastvora etanola i 15 mL 1.5 M rastvora HCL) doda se uzorak u odnosu 1:1 i ostavi 24h na temperaturi 0°C. Smjesa se filtrira i dobijeni rastvor koristiti za dalju analizu. Odmjerena zapremina od 0.25 mL ekstrakta prenijeta je u dva odmjerna suda od 10 mL, koji su zatim dopunjeni puferom pH 1, odnosno pH 4.5. Nakon 15 minuta izmjerene su apsorbancije na $\lambda=515$ nm i $\lambda=700$ nm (zbog korekcije zamućenja).

Koncentracija monomernih i ukupnih antocijana (C_{mon} i C_{uk}) u ekstraktima računa se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/g uzorka) prema formuli:

$$A_{\text{mon}} = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

$$C_{\text{mon}} = (A_{\text{mon}} \times M \times F \times 1000) / \epsilon \times l \text{ (mg/L)}$$

$$A_{\text{uk}} = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1}$$

$$C_{\text{uk}} = (A_{\text{uk}} \times M \times F \times 1000) / \epsilon \times l \text{ (mg/L)}$$

gde je:

$M = 449.2$ g/mol (molekulska masa cijanidin-3-glukozida)

F = faktor razblaženja ekstrakta

$\epsilon = 34300$ Lmol $^{-1}$ cm $^{-1}$ (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida)

$l = 1$ cm (debljina kivete)

Određivanje ukupne antioksidativne vrijednosti FRAP metodom

Određivanje ukupne antioksidativne vrijednosti FRAP (ferric reducing antioxidant power) metodom se vrši po metodi koju su razvili Benzie i Strain (1996). Metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje

plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3.6 kako bi se zadržala dobra topivost željeza.

Uzorak (koncentracije 500 µg/mL) zapremine 0.2 mL se pomiješa sa 1.8 mL FRAP radnog reagensa, inkubira 10 min na 37°C i mjeri se apsorbancija na $\lambda=593$ nm uz slijepu probu. Kao slijepa proba koristi se 1.8 mL FRAP radnog rastvora i 0.2 mL destilovane vode.

Na osnovu izmјerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija standardnih rastvora FeSO₄·7H₂O (0.1-1 mM) se konstruiše kalibraciona kriva. Iz jednačine pravca se očita koncentracija FeSO₄, koja odgovara apsorpciji ispitivanog antioksidansa (uzorka). Nakon toga vrši se preračun antioksidativnog kapaciteta na početnu masu uzorka, a rezultati se predstavljaju kao µmol Fe²⁺/g uzorka.

Određivanje antioksidativnih osobina DPPH metodom (Trolox ekvivalent)

Određivanje antioksidativnih osobina DPPH metodom vrši se po metodi Liyanapathiranan i Shahidi (2005). Metoda se temelji na upotrebi stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) za određivanje antioksidativnog kapaciteta u hrani. DPPH posjeduje nespareni elektron koji postiže apsorpcijski maksimum na 517 nm i ljubičaste je boje. Rezultat sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala sa vodonikom antioksidansa je prelaz ljubičaste boje u žutu, te stvaranje redukovanih DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu sa brojem sparenih elektrona (Lisica, 2016).

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta u epruvetu se otpipetira 2 mL pripremljenog razrjeđenog ekstrakta, 2 mL metanola i 1 mL 0.5 mM rastvora DPPH. U drugu epruvetu otpipetira se 4 mL metanola i 1 mL 0.5 mM rastvora DPPH, što predstavlja kontrolni uzorak. Epruvete sa sadržajem se ostavljaju da stoje 20 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorpcija na $\lambda=517$ nm, uz metanol kao slijepu probu. Koristeći baždarni pravac očitava se koncentracija Troloxa koja odgovara apsorpciji ispitivanog antioksidansa (uzorka). Nakon toga vrši se preračunavanje antioksidativnog kapaciteta na početnu masu uzorka. Rezultati se izražavaju kao µmol Trolox-a/g.

Određivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH metoda) Ic50%

Pomiješa se 2 mL uzorka (rastvor ekstrakta u metanolu, koncentracije od 10 do 80 µg/mL) sa 2 mL 0.135 mM DPPH u čistom metanolu. Kontrolni uzorak priprema se mješanjem 2 mL

metanola i 2 mL 0.135 mM DPPH. Nakon miješanja stoje na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi 30 min. Apsorpcija se mjeri na 515 nm uz slijepu probu (2 mL metanola + 2 mL uzorka).

Antiradikalska aktivnost za pojedinačne koncentracije ekstrakta, (I%), izračunava se pomoću jednačine:

$$I\% = \frac{(A_{kontrol} - A_{uzorak})}{A_{kontrol}} \times 100$$

gdje je:

I% - postotak inhibicije DPPH radikala

$A_{kontrol}$ - apsorbancija DPPH radnog rastvora + metanol,

A_{uzorak} - apsorbancija DPPH radnog rastvora + uzorak (ili standardni rastvor).

Na osnovu rezultata za I% za različite koncentracije uzorka (ili referentnog jedinjenja) konstruiše se baždarni pravac i određuje $Ic50\%$. Vrijednosti $Ic50\%$ predstavljaju koncentraciju ekstrakta ili referentne supstance koja je potrebna za inhibiranje 50% DPPH radikala.

Određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS metodom (Trolox ekvivalent i $Ic50\%$)

ABTS metoda se u literaturi naziva i TEAC metoda (engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), a njen mehanizam je sličan mehanizmu DPPH metode. Kod ABTS metode se koristi plavo-zeleno obojeni radikal 2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazoline-6-sulfonske kiseline ABTS2-) (Mišković, 2016).

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ABTS+ radikal katjonskom metodom se zasniva na kolorimetrijskom mjerenu stepena obezbojavanja ABTS+ radikala u prisustvu antioksidanasa. ABTS+ radikalni katjon se dobija oksidacijom ABTS sa $K_2S_2O_8$ (kalijum persulfat) prije dodavanja antioksidanasa. Relativno stabilan ABTS+ radikal je zelene boje i određuje se spektrofotometrijski na $\lambda=734$ nm. ABTS test se radi po metodi koju su prvo bitno opisali Re i sar. (1999).

Pomiješa se 2mL uzorka (rastvor ekstrakta u metanolu koncentracija od 10 do 80 $\mu\text{g/mL}$) sa 2 mL radnog rastvora ABTS, ostavi da reaguje 7 minuta u tami, na sobnoj temperaturi i mjeri se njegova apsorbancija na $\lambda=734$ nm.

Za svaku novu koncentraciju uzorka potrebno je imati novu slijepu probu tj. 2 mL metanola i 2 mL uzorka te koncentracije.

Procenat inhibicije slobodnog radikala se računa prema formuli:

$$I\% = \frac{Ak - Auzorak}{Ak} \times 100$$

Na osnovu izmjerena vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija troloxa, konstruiše se kalibraciona kriva na osnovu koje se vrši proračun. Rezultati se predstavljaju kao µmol Trolox-a/g (Trolox ekvivalent antioksidativne aktivnosti).

Na osnovu rezultata za I% za različite koncentracije uzorka (ili referentnog jedinjenja) crta se baždarni pravac i određuje Ic50%. Vrijednosti Ic50% predstavlja koncentraciju ekstrakta ili referentne supstance koja je potrebna za inhibiranje 50% ABTS radikala.

Analize odabralih parametara kvaliteta domaćih fermentisanih kobasicu vršene su na dan uzorkovanja. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

3.2.2. Fizičke metode

Instrumentalno određivanje boje

Za određivanje parametara boje korišćen je spektrofotometar Konica Minolta CM 2600d (Osaka, Japan) (*Slika 12.*).



Slika 12. Spektrofotometar Minolta CM 2600d

Spektrofotometar je opremljen sa standardnim izvorom svjetlosti D₆₅, sa standardnim uglom zaslona od 10°. Kalibracija se vrši korišćenjem bijele kalibracione ploče. Instrumentalni parametri boje mjeru se po CIE L*, a*, b* sistemu (L* = intenzitet svjetlosti, a* = udio crvene

boje, b^* = udio žute boje). Vrijednosti se prikazuju numerički i opisuju sve boje koje može razlikovati ljudsko oko. Mjerenja su vršena na površini omotača (6 mjerenja) i na svežem presjeku uzoraka kobasica (10 mjerenja).

Određivanje tvrdoće/mekoće

Tvrdoća/mekoća kobasica se određuje uglavnom mehanički, pomoću univerzalnog teksturometra, Texture Analyser TA.XT plus Texsture Analyser Stable Micro Systemsn (Godalming, UK), određivanjem sile (kg) potrebne za presijecanje uzorka fermentisanih kobasic. Prilikom testiranja korišten je aparat Warner-Blatzler sa čelijom za sječenje (knife blade HDP/ BSK). Opterećenje čelije je 25 kg, a brzina noža tokom testa 4,0 mm/s, rastojanje 20,0 mm. Uzorci za ispitivanje pripremani su tako što se iz svake kobasice pomoću kalupa isječeno po osam pravougaonih oblika (1×1 cm dužine oko 5 cm) na kojima je obavljeno mjerenje (12 mjerenja).

3.2.3. Fizičko-hemijske metode

Određivanje pH vrijednosti

Određivanje pH vrijednosti vrši se prema referentnoj metodi ISO 2917:1999. Mjerenja su vršena pomoću digitalnog pH-metra sa ubodnom kombinovanom elektrodom za proizvode od mesa (HANNA HI 99161, Cluj-Napoca, Romania), nakon kalibracije standardnim fosfatnim puferima (pH=7.00 i pH=4.00 na 20°C) i podešavanja na izmjerenu temperaturu uzorka. Izvršeno je po 10 mjerenja svakog uzorka.

Određivanje aktiviteta vode – a_w

Aktivitet vode (a_w), u ispitivanim uzorcima određuje se pomoću higrometra NOVASINA labMASTER- aw (Switzerland), pri konstantnoj temperaturi od 25°C. Mjerenje je vršeno na usitnjjenim, homogenizovanim uzorcima (3 mjerenja po uzorku).

3.2.4. Hemijske metode

Određivanje sadržaja vode

Sadržaj vode u kobasicama određuje se referentnom metodom ISO 1442:1997. Princip određivanja se sastoji u potpunom miješanju dijela homogenizovanog uzorka za ispitivanje sa kvarcnim pijeskom i sušenju do konstantne mase na $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sadržaj vlage u uzorcima kobasica je izražen u g/100g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja ukupne masti

Sadržaj ukupnih masti određuje se referentnom metodom, ISO 1443:1973. Princip određivanja zasniva se na hidrolizi uzorka sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom i na filtriranju dobijene mase uz ispiranje vrućom destilovanom vodom do neutralne reakcije. Nakon završenog filtriranja zaostale masti na filter papiru se suše i zatim ekstrahuju petroletrom u aparaturi po Soxhlet-u u trajanju od 5h. Po završetku procesa ekstrakcije obavljeno je sušenje ekstrahovanog uzorka do konstantne mase u sušioniku na temperaturi $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sadržaj ukupne masti u uzorcima kobasica izražen je u g/100g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja ukupnih proteina

Sadržaj proteina utvrđuje se na osnovu sadržaja ukupnog azota, određenog metodom po *Kjeldahl-u* ISO 937:1992, i množenjem sa faktorom 6.25. Princip određivanja se sastoji u digestiji uzorka koncentrovanim sumpornom kiselinom, uz katalizator, kako bi se ukupni azot preveo u amonijum jone ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Zatim slijedi alkalizacija sa natrijum-hidroksidom, destilacija oslobođenog amonijaka u višak rastvora borne kiseline i titracija hlorovodoničnom kiselinom da bi se odredio amonijak vezan za bornu kiselinu. Sadržaj proteina u uzorku je izražen u g/100g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja ukupnog pepela

Sadržaj ukupnog pepela u uzorcima kobasica, određuje se referentnom metodom ISO 936:1998. Princip metode sastoji se u sušenju uzorka za ispitivanje, zatim ugljenisanju i na kraju žarenju na $550 \pm 25^{\circ}\text{C}$, dok suvi ostatak ne postane sivo-bijele boje. Poslije hlađenja odredi se masa ostatka. Sadržaj ukupnog pepela u uzorcima kobasica je izražen u g/100g, odnosno u procentima (%).

Određivanje sadržaja natrijum hlorida

Sadržaj hlorida određuje se referentnom metodom po Volhard-u, JUS ISO 1841-1:1996. Ova metoda zasniva se na ekstrakciji uzorka vrućom vodom i taloženju proteina. Po završetku filtracije i zakišljavanja, ekstraktu se dodaje rastvor srebro nitrata u višku, koji se titrira rastvorom kalijum tiocijanata. Sadržaj hlorida je izražen kao sadržaj natrijum hlorida u uzorcima kobasica i to u g/100g, odnosno u procentima (%).

Sve hemijske analize vršene su u tri ponavljanja.

Određivanje kiselinske vrijednosti

Kiselinska vrijednost se određuje ekstrakcijom lipida iz uzorka i daljim određivanjem po metodi SRPS ISO 660 (2000). Kiselost se određuje na osnovu zapremine 0.1 M NaOH potrebne za neutralizaciju uzorka pomiješanog sa neutralisanim etanolom, uz dodatak fenolftaleina. Rezultati su izraženi kao mg NaOH u 1 gramu uzorka.

Peroksidni broj

Određivanje peroksidnog broja zasniva se na metodi ISO 3960 (2001). Oko 5 g uzorka odvaje se u Erlenmajer tikvicu sa brušenim čepom od 250 mL i grijе u vodenom kupatilu na 60°C 3 min. da se otope masti, zatim dobro izmješa sa 30 ml smjese sirčetne kiseline i hloroform-a (3:2 v/v), oko 3 min. Uzorak se filtrira. Doda se 0.5 mL zasićenog rastvora kalijum jodid. Ostavi da reaguje 1 minut, doda se oko 30 mL destilovane vode i 1 mL rastvora skroba (1%). Titrira se 0.01 M standardnim rastvorom natrijum tiosulfata do nestanka plave boje.

Određivanje oksidacije lipid-a tiobarbiturnim (TBARS) testom

TBARS vrijednost određuje se spektrofotometrijskom metodom (Botsoglou i sar., 1994; Mandić, 2007) koja se zasniva na mjerenu apsorbancije kompleksnog obojenog jedinjenja nastalog reakcijom malondialdehida (MDA) i tiobarbiturne kiseline (TBA).

Za pripremu uzorka oko 10 g uzorka sa 97.5 mL destilovane vode i 2.5 mL HCl (1:2) predestiliše se u tikvicu od 50 mL. U epruvetu se otpipetira 2.5 mL alikvota (serije standarda ili vode za slijepu probu), doda 1.5 mL vodenog rastvora TBA 0.8% i stavi na vodeno kupatilo na 70°C, 30 minuta. Nakon toga se ohladi pod hladnom vodom i mjeri se apsorbancija na $\lambda=521.5$ nm u

odnosu na slijepu probu. Kalibraciona kriva se konstruiše na osnovu zavisnosti koncentracije MDA i očitanih vrijednosti apsorbancija. Koncentracija MDA se računa prema formuli:

$$\text{MDA (mg/kg)} = 80 \cdot c / f \cdot OK$$

gdje je:

c- vrijednost očitana sa krive ($\mu\text{g/mL}$)

f- razblaženje

OK-odvaga uzorka (g)

3.2.5. Senzorna analiza

Ukupan senzorni kvalitet fermentisanih kobasicica vrši se po metodi kvantitativne deskriptivne analize (ISO 6564:1985) kako bi se identifikovao nivo kvaliteta odabranih svojstava proizvoda.

Svaka vrsta kobasicica je isječena pomoću mašine za sječenje na kolutiće debljine 4 mm i poslužena ocjenjivačima. Vršeno je ocjenjivanje spoljnog izgleda, izgleda presjeka, boje presjeka, mirisa, arome i ukusa, te konzistencija kobasicica, kao i ukupna prihvatljivost na skali od 1 (minimalna ocjena) do 5 (maksimalna ocjena), prema prethodno pripremljenom Uputstvu za senzornu ocjenu domaćih fermentisanih kobasicica.

Spoljašnji izgled, boja, miris, ukus i boja omotača kobasicica ispitani su i korišćenjem „difference-from-control“ testa. Ova metoda pokazuje da li postoji razlika između ispitivanih uzoraka i kontrole i kolika je ta razlika (Whelan, 2017).

3.2.6. Metode za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Podloge:

Mueller Hinton agar (MHA); Mueller Hinton bujon (MHB)

Hranjivi agar (HA); Hranjivi bujon (HB)

Sabouraud agar (SA)

Ljubičasto crveni žučni agar (VRBGA)

Slani bujon (SLB)

Baird-Parker(RPF) agar

Sulfitni agar (B)

Kulture:

Za eksperimente su korištene četiri kulture bakterija i jedna kultura pljesni.

Bakterije:

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Salmonella enterica* ATCC 13076
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Bacillus cereus* ATCC 7004

Pljesan:

Penicillium expansum izolat sa jabuka, Tehnološki fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Priprema kultura

Bakterijske kulture za testiranje su pripremane iz logaritamske faze rasta i direktnom suspenzijom kolonija (Ortez, 2005; Wiegand i sar. 2008).

a) Priprema standardnog inokuluma iz logaritamske faze rasta (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*)

Kulture se nasijavaju na agarne ploče (MHA) sa kosog agara (HA) i stavljuju na inkubaciju 24h na 37°C. Nakon inkubacije, sa agarne ploče ezom je preneseno 3-5 izolovanih kolonija (sa svake po malo) u epruvetu sa 5 mL Mueller Hinton bujona (MHB). Epruvete sa nasijanim bakterijama se zatim ostavljaju na inkubaciju 2-6h. Kod svakog eksperimenta vrijeme inkubacije kulture u MHB je isto.

b) Priprema standarnog inokuluma - direktno (*Staphylococcus aureus*)

Kultura *S. aureus* se sa kosog agara nasjava ezom na hranljivi agar (HA). Agarne ploče se zatim stavljuju na inkubaciju 24h na 37°C. Nakon inkubacije pukute se dvije-tri kolonije direktno u Mueller-Hinton bujon (MHB).

Priprema razrjeđenja bakterijskih kultura za nasijavanje

Nakon inkubacije od 3h ili nakon pripreme suspenzije kolonija (za stafilokoke), gustina kultura se određuje spektrofotometrijski (na 625 nm), u poređenju sa 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 cfu/mL). Kulture se zatim razrjeđuju i gustina im se podešava na 1.5×10^6 cfu/mL i koriste za testiranja.

Priprema kulture *Penicillium expansum*

Petrijevke sa SA su nasijavane kulturom *P. expansum* i stavljujaju se na inkubaciju (na 25°C, 7-10 dana), dok se ne razviju kolonije sa sporama. Za testiranje antimikrobne aktivnosti ekstrakata, preko inhibicije rasta micelijuma, kultura se precjepljuju na petrijevke prečnika 90 mm sa novom sterilnom podlogom (SA), koje su inkubirane na 25°C, 48 do 72h dok se ne razvije bijeli micelijum bez spora. Za testiranje antimikrobne aktivnosti omotača priprema se suspenzija spora tako što se na površinu petrijevke, na kojima je kultura *P. expansum* razvila spore, dodava 5 mL sterilne destilovane vode sa 1% TWEEN 20 (Aberkane i sar., 2002). Spore se lagano stružu sterilnim staklenim štapićem u pripremljenu sterilnu erlermajer tikvicu. Tikvica se ostavi pola sata da se izdvoji tečnost sa sporama, a zatim se filtrira kroz sterilnu gazu. Gustina spora se određuje brojanjem pod mikroskopom u Thoma komorici i gustina spora se podešava na 5×10^4 cfu/mL.

Antimikrobna aktivnost ekstrakata (određivanje MIC i MBC za bakterije)

Za određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata koristi se metoda razrjeđivanja u agaru, da bi se dobole minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije (EUCAST, 2000; Wiegand i sar., 2008; Balouri i sar., 2016).

Pravi se serija dvostrukih razrjeđenja u agaru tako što se u otopljenu, i na 45°C ohlađenu podlogu (MHA), dodaje odgovarajuća količina ekstrakta da bi konačna koncentracija ekstrakta u podlozi bila u rasponu od 3.75 do 120 mg/mL (3.75; 7.5; 15; 30; 60 i 120). Podloge sa ekstraktima se dobro promiješaju i izlivaju u sterilne petrijevke. Nakon sticanja podloge, kulture se nasijavaju na površinu agarnih ploča u kapima po 10 µL i stavljuju na inkubaciju 24h na 37°C. Nakon inkubacije posmatra se rast kultura na podlozi sa ekstraktima. Najniža koncentracija ekstrakta u podlozi (najveće razrjeđenje ekstrakta), na kojoj nije bilo golim okom vidljivog rasta kulture, je određena kao MIC. Sa svih petrijevki na kojima nije bilo vidljivog rasta kultura vrši se precjepljivanje, lagano prelaženje sterilnom ezom nekoliko puta preko mjesta na kojima su nasijane kulture i precjepljivanje na hranjivi agar. Petrijevke sa hranjivim agarom ponovo se stavljuju na inkubaciju 24h na 37°C. Najniža koncentracija ekstrakta na kojoj nije bilo izrasta presijanih kolonija je određena kao MBC. Kao pozitivna kontrola koristi se podloga bez

ekstrakta, a kao negativna rastvarač (etanol) u koncentraciji koja se nalazi u ekstraktu i antibiotik diskovi (erythromycin 15 µg; gentamicin 10 µg; ciprofloxacin 5 µg, ampicillin 10 µg).

Antimikrobnna aktivnost ekstrakata (inhibicija rasta micelijuma)

Za testiranje inhibicije rasta micelijuma plijesni *Penicillium expansum* koristi se metoda razrjeđivanja u agaru (Poisoned food method) (Balouiri i sar., 2016). Određena količina ekstrakta doda se u otpoljeni i na 45°C ohlađeni SA. Konačna koncentracija ekstrakta u podlozi je slijedila dvostruko razrjeđenje u rasponu od 7.5 do 120 mg/mL. Sterilnim borerom, prečnika 5 mm, isjecaju se diskovi bijelog micelijuma i u izvrnutom položaju stavljuju na sredinu petrijevki sa podlogom u koju je dodan ekstrakt. Kao pozitivna kontrola koristi se podloga bez ekstrakta i podloga sa rastvaračem (etanol) u koncentraciji koja se nalazi u ekstraktu. Petrijevke se stavljaju na inkubaciju na 25°C i svaki dan (5 dana) se mjeri prečnik izraslih kolonija. Inhibicija rasta micelijuma se određuje prema formuli:

$$IM (\%) = Dc-Dt/Dc \times 100$$

gdje je: IM (%) - procenat inhibicije rasta micelijuma

Dc - prečnik kolonija na kontrolnoj podlozi (podloga bez ekstrakta koja se poredi sa podlogom sa rastvaračem (etanol) i sa tretmanom ekstrakata rastvorenih u vodi) i podloga sa rastvaračem u koncentraciji kao u ekstraktu koja se poredi sa odgovarajućim ekstraktom).

Dt - prečnik kolonija u podlozi sa ekstraktom ili prečnik kolonija u podlozi sa rastvaračem (etanol).

Antimikrobnna aktivnost omotača (crijeva) sa inkorporiranim ekstraktom

Crijeva su isjecana na komade dimenzija 3.5x2.4cm, osušena i sterilisana UV lampom u trajanju od 30 minuta.

Za testiranje antimikrobne aktivnosti omotača sa ekstraktom korist se metoda difuzije u agaru, prema modifikovanom ISO 20645 standardu (Pinho i sar., 2011). Uzorci omotača se stavljaju između dva sloja podloge koja sadrži oko 6×10^5 ćelija bakterija ili oko 5×10^4 spora *P. expansum*. Prvi sloj podloge (10 mL) izlijeva se u sterilnu petrijevku i ostavi da se stegne. Na površinu stegnute podloge sa određenom kulturom stavljuju su uzorci omotača, preko kojih se nalijeva novih 10 mL podloge sa kulturom iste koncentracije kao i u prvom sloju. Petrijevke se stavljaju

na inkubaciju za bakterije na 37°C, a za *P. expansum* na 25°C. Nakon inkubacije od 24h (bakterije) i 48h (*P. expansum*) mjere se zone inhibicije oko uzorka omotača. Kao kontrola koriste se uzorci omotača bez inkorporiranog ekstrakta. Modifikacija ISO 20645 standarda je samo u segmentu gornjeg sloja (zapremine) podloge sa kulturom (10 mL), koja je prema ovom standardu 5 mL.

Mikrobiološka kontrola mesa (sirovina) i kobasica u omotaču sa ekstraktom

U testovima mikrobiološke kontrole mesa i kobasica radi se analiza broja aerobnih mezofilnih bakterija (AMB), enterobakterija (BE), aerobnih sporogenih bakterija (ASB), kvasaca i pljesni (KiP) i prisustvo (odsustvo) suflitoredukujućih klostridija (SRK) i koagulaza pozitivnih stafilokoka (SK⁺).

Priprema uzorka mesa

Odvaže se 10 g mesa i stavlja u 90 mL sterilnog fiziološkog rastvora. Uzorak se usitjava u homogenizatoru BagMixer 400P blender (Interscience, France). Iz dobijenog rastvora pravi se serija odgovarajućih razrjeđenja. Za određivanje broja ASB i prisustva suflitoredukujućih klostridija 2 mL osnovnog razrjeđenja zagrijava se 10 minuta na 80°C, hlađi, i iz ohlađenog rastvora se pravi serija razrjeđenja.

Priprema uzorka kobasica

Kobasice se lagano obrišu vatom natopljenom u 70% etanol i ostave da se osuše. Oštrim sterilnim nožem skida se sloj debljine 1mm sa površine kobasice sa omotačem. Za uzorkovanje se uzima sloj od 4-5 mm kobacica ispod omotača. Odvaže se 10 g tako isječene kobasice u 90 mL sterilnog fiziološkog rastvora i usitni u homogenizatoru BagMixer 400P blender (Interscience, France). Od dobijenog rastvora priprema se serije razrjeđenja. Za određivanje broja ASB i prisustva suflitoredukujućih klostridija postupa se kao kod uzorka mesa.

Mikrobiološka analiza

Broj bakterija određuje se nasijavanjem 10 kapi određenog razrjeđenja na HA (AMB i ASB), VRBG agar (enterobakterije), SA (kvasci i pljesni). Podloge se stavljam na inkubaciju 24h

(bakterije) i 48 do 72h (KiP), nakon čega se vrši brojanje kolonija izraslih u nasijanim kapima. Kapi sa brojem kolonija ispod 3 i iznad 30 se ne broje. Izračuna se prosječan broj kolonija po kapima izražen kao log cfu/g mesa ili kobasice (Herigstad i sar.. 2001)

Za određivanje prisustva koagulaza pozitivnih stafilokoka, 1mL osnovnog razjređenja se dodaje u Slani bujon i inkubira 24h na 37°C, a zatim se vrši precjepljivanje na Baird-Parker (RPF) agar. Nakon inkubacije, očitava se prisustvo crnih kolonija sa određenom prozirnom zonom.

Za određivanje prisustva sulfitoredukujućih klostridija 1mL osnovnog razrjeđenja (predhodno zagrijanog na 80°C i ohlađenog) dodaje se u epruvetu u koju se zatim, 1cm do vrha, dodaje sulfitni agar (B). Epruvete se stavljaaju na inkubaciju na 37°C, 48 do 72h. Posmatra se pojava crnih kolonija, kao i pucanje podloge.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja su podijeljeni na slijedeće dijelove:

- ✓ Analiza ekstrakata – antioksidativa i antimikrobna aktivnost.
- ✓ Analiza prirodnih omotača – antioksidativna i antimikrobna aktivnost prirodnih omotača tretiranih ekstraktima.
- ✓ Analiza fizičkih, hemijskih, fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara gotovog proizvoda, antioksidativni testovi, praćenje lipidnih promjena na mastima i senzorna ocjena odabralih osobina fermentisanih kobasica.

4.1. ANALIZA EKSTRAKATA

U ovom poglavlju su predstavljeni rezultati antioksidativnog i antimikrobnog ispitivanja ekstrakata. U ispitivanjima antioksidativnih osobina korišteni su suvi biljni ekstrakti (T-trnjina, D-drenjak, A-aronija i Tr-trešnja) pripremljeni ekstrakcijom u 80% (v/v) etanolu (E) i u vodi (V). Za ispitivanje antimikrobnih osobina, pripremljeni suvi ekstrakti određenih koncentracija su rastvoreni u 80% (v/v) etanolu (E) i u vodi (V). Kao kontrolni uzorci korišteni su destilovana voda (C1), vitamin C - kao kontrola antioksidativnih osobina (C2) i etanol - kao kontrole antimikrobine aktivnosti rastvarača (C3)

Rezultati istraživanja su statistički analizirani kako bi se što bolje uporedile osobine ispitivanih ekstrakata i izabrali biljni ekstrakti za dalju primjenu.

4.1.1. Prinos ekstrakcije ispitivanih biljnih vrsta

Za ekstrakciju biljnih fenolnih materija i drugih antioksidanata, koriste se različite tehnike (ekstrakcija rastvaračima, ekstrakcija na čvrstoj fazi, superkritična ekstrakcija itd.). Prinos ekstrakcije zavisi od načina ekstrakcije, temperature i vremena ekstrakcije, tipa i polarnosti rastvarača, hemijskog sastava i fizičkih karakteristika uzorka.

Jedan od najstarijih načina ekstrakcije je klasična maceracija, miješanje rastvarača sa biljnim materijalom uz stalno miješanje, sa ili bez zagrijavanja. Najčešće korišćeni rastvarači za ekstrakciju fenolnih materija iz biljnih materijala su: metanol, etanol, aceton, etil-acetat i njihove kombinacije sa različitim udjelom vode. Izbor pravog rastvarača (polarnost, pH vrijednost, sposobnost za stvaranje vodoničnih veza itd.) utiče na količinu i brzinu ekstrakcije, u zavisnosti

od tipa biljnog materijala. Izbor rastvarača zavisi i od dalje upotrebe ekstrahovanih polifenola, pa se često koristi etanol jer je bezbjedan za ljudsku ishranu (Đurović i sar., 2018).

Nove tehnike ekstrakcije, poput ekstrakcije ultrazvukom, privlače sve više pažnje zbog brzine i efikasnosti ekstrakcije. Ova metoda je i ekološki prihvatljivija, u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije, jer koristi manju količinu ekstrakcionih rastvarača (Đurović i sar., 2018; Dadi i sar., 2019).

U ovom radu izbor rastvarača za ekstrakciju, voda i smješte etanol:voda (80:20, v/v), je obavljen prvenstveno zbog mogućnosti primjene u prehrabenoj industriji.

U *Tabeli 4.1.* prikazani su dobijeni prinosi ispitivanih ekstrakata. Dobijene vrijednosti su se kretale od 10 do 19%. Veličković i sar. (2020) u svom radu navode korištenje rastvarača različite polarnosti za ekstrakciju trnjine, pri čemu su dobijeni prinosi od 18.45% za voden i 11.09% za etanolni ekstrakt, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Simić (2018), koristeći različite koncentracije etanola, navodi prinos ekstraktivnih supstanci iz aronije u opsegu od 11.1% do 20.3%, što se slaže sa vrijednostima dobijenim u ovom istraživanju.

Tabela 4.1. Prinosi ekstrakcije ispitivanih biljnih ekstrakata izraženi u %

	rastvarač	
	voda	80% etanol
trnjina	18.73	11.86
drenjina	13.82	11.62
aronija	10.62	15.83
crvena trešnja	13.05	15.57

Prinos ekstrakcije i kvalitet ekstrakta u najvećoj mjeri zavise od osobina rastvarača, od načina ekstrakcije, kao i od vrste rastvorljivih materija prisutnih u biljnom materijalu. Uobičajena ekstrakcija se obično provodi na temperaturama od 20-50°C, dok temperature iznad 70°C nisu poželjne i mogu dovesti do brze razgradnje antocijana (Brglez Mojzer i sar., 2016).

4.1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata

Sadržaj ukupnih fenola (TPC), ukupnih neflavonoida (TN) i ukupnih flavonoida (TF) predstavljeni su u *Tabeli 4.2.* Na osnovu prikazanih rezultata, vidi se da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) između ispitivanih biljnih ekstrakata.

TPC u ispitivanim biljnim ekstraktima kretao se od 14.83 do 31.87 mg GAE/g suvog ekstrakta (s.e.) u vodenim, i 38.34-54.11 mg GAE/g s.e u etanolnim ekstraktima. U etanolnim ekstraktima

dobijen je veći sadržaj TPC kod svih ispitivanih biljaka, što je rezultat bolje rastvorljivosti polifenolnih komponenti u razblaženom etanolu u odnosu na vodu, zbog selektivne ekstrakcije pojedinih fenolnih jedinjenja (Veličković, 2013).

Tabela 4.2. Sadržaj ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida u vodenim (V) i etanolnim (E) ekstraktima izražen u mg GAE/g suvog ekstrakta (s.e.)

mg GAE/g s.e.	TPC		TN		TF	
	V	E	V	E	V	E
trnjina	14.83 ^a ±0.38	54.11 ^a ±5.14	14.08 ^a ±0.17	17.28 ^a ±6.05	0.75 ^a ±0.26	33.21 ^a ±5.43
drenjina	23.01 ^b ±1.00	41.77 ^b ±0.44	21.11 ^{bc} ±1.88	32.87 ^b ±1.12	1.90 ^a ±0.88	8.91 ^b ±0.81
aronija	26.10 ^{bc} ±0.07	51.30 ^a ±1.79	25.25 ^c ±0.57	26.75 ^{ab} ±0.97	0.69 ^a ±0.69	24.55 ^{ac} ±2.32
crvena trešnja	31.87 ^c ±1.55	38.34 ^b ±1.43	18.74 ^{ab} ±1.80	20.91 ^a ±3.22	13.13 ^b ±1.02	17.43 ^{bc} ±1.15

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Neki autori za TPC u trnjini navode vrijednosti od 8 do 20 mg GAE/g svježeg ploda (Radovanović i sar., 2013; Bajić-Ljubačić, 2018). Mnogi autori kao glavne fenolne komponente u trnjini navode rutin, galnu kiselinu, kvercetin, prokatehinsku i kofeinsku kiselinu (Pinacho i sar. 2015; Pozzo i sar., 2019; Veličković i sar., 2020). Analizom ekstrakata trnjine pomoću HPLC identifikovani su galna kiselina kao dominantna, kao i kofeinska kiselina (Ruiz-Rodriguez, 2014).

U literaturi se mogu naći razni podaci za drenjinu: TPC za suvi drenjak iznosio je 4.35-5.78 mg/g (Petkova i Ognyanov, 2018), za svježi drenjak 8.6 mg/g (Radovanović i sar., 2013) i 3.68 mg/g (Bajić-Ljubačić, 2018). Yigit (2018) je dobio vrijednosti od 17 mg GAE/g za vodeni ekstrakt drenjine i 45 mg GAE/g za etanolni ekstrakt drenjine, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

U istraživanju koje su proveli Cosmulescu i sar. (2018), među pojedinačnim fenolnim jedinjenjima drenjine, galna kiselina je bila dominantna (14.49 mg/100g), a potom su slijedile kumarska kiselina (13.79 mg/100g), elaginska kiselina (5.71 mg/100 g), salicilna kiselina (1.43 mg/100 g) i ferulinska kiselina (1.25 mg/100g). Milenković-Anđelković i sar. (2015) navode da je elaginska kiselina bila dominantna fenolna kiselina u plodu drenjine i ekstraktu lišća, a prisutne su bile i hlorogenska i galna kiselina.

Shahin i sar. (2019) su mjerili TPC u ekstraktima aronije i ustanovili da se kreće oko 78.5 mg GAE/g, dok su se te vrijednosti u zavisnosti od vrste korištenih rastvarača kretale od 20 do 110 mg GAE/g s.e. (Simić, 2018). Simić (2018) je, uz primjenu mikrotalasne ekstrakcije, ustanovio da se TPC za aroniju kretao oko 32-39 mg GAE/g s.e., a uz primjenu iste metode ekstrakcije D'Alessandro i sar. (2012) su ustanovili da se TPC kretao od 600 do 1000 mg GAE/L s.e. U ekstraktima *A. melanocarpa* i *A. xprunifolia* pokazalo se da su dominantne dvije fenolne kiseline: hlorogena i neohlorogena (Szopa i sar., 2017). U ovom radu dobijena vrijednosti TPC za vodeni ekstrakt aronije je iznosila 26.10 mg GAE/g s.e, dok su za etanolni ekstrakt imale vrijednost 51.3 mg GAE/g s.e, što je u skladu sa rezultatima koje u svom radu navodi Simić (2018).

Na TPC divlje trešnje vrsta rastvarača nije imala previše uticaja, što se može zaključiti na osnovu rezultata prikazanih u *Tabeli 4.2*. Kim i sar. (2005) navode vrijednosti za TPC divlje trešnje od 92.1 do 146.8 mg GAE/100 g svježeg ploda. Praćenjem različitih faza zrenja divlje trešnje, Serradila i sar. (2011) dolaze do podataka za TPC od 9.05 do 117.00 mg galne kiseline/100g svježeg ploda, na početku i u poslednjoj fazi zrenja. Isti autori smatraju da se najveći dio fenolnih jedinjenja nalazi u pokožici divlje trešnje. U sastav polifenola trešnje ulaze flavonoidi (antocijani, flavan-3-oli i flavonoli), hidroksicimetna i hidroksibenzojeva kiselina, a ukupan sadržaj TPC se kreće od 440 do 1300 mg/100g suve materije (Serra i sar. 2011), što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Gonzalez-Gomez i sar. (2010) su analizom fenolnih jedinjenja šest različitih sorti slatke trešnje, kao dominantne identifikovali pet jedinjenja, i to p-kumaroilhinu, hlorogenu i neohlorogenu kiselinsku (derivati flavonoida), epikatehin (derivati flavanola) i kvercetin-3O-rutinozid (derivati flavanola).

Viši sadržaj ukupnih fenola u trešnji pripisuje se višim koncentracijama antocijana i hidroksicimetne kiseline (Ferretti i sar., 2010). U svojoj studiji Iglesias-Carres i sar. (2019) navode nekoliko hidroksicimetnih kiselina u visokim koncentracijama, što je u skladu s činjenicom da je koštičavo voće bogata ovom vrstom fenolnih jedinjenja. Oni su, takođe, utvrdili prisustvo rutina u većoj koncentraciji, i premda se smatra da je rutin glavni flavonol u slatkim trešnjama, dominantan je kod samo nekoliko sorti (Iglesias-Carres i sar, 2019).

Mnogi autori se slažu da korištenje polarnih rastvarača za ekstrakciju pozitivno utiče na visoku koncentraciju fenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima (Zhou i Yu, 2004; Mohsen i Ammar,

2008). Različite koncentracije etanola (smjesa etanol-voda) pokazuju sinergističko dejstvo koje omogućava bolju ekstrakciju fenolnih jedinjenja (D'Alessandro i sar. 2012; Ćujić 2017).

Razlika između rezultata ovog istraživanja i rezultata koje su dobili drugi autori su, vjerovatno, rezultat primjene različitih metoda ekstrakcije, korištenih rastvarača, kao i razlika koje postoje između ispitivanih biljnih vrsta (Tolić i sar. 2017).

Iz dobijenih rezultata za TN i TF, može se zaključiti da vrsta rastvarača u velikoj mjeri utiče na rastvorljivost flavonoida, odnosno da je smjesa etanol-voda mnogo bolji ekstragens kod ekstrakcije flavonoida. TN u ispitivanim uzorcima se kretao od 14.08 do 25.25 mg GAE/g s.e. u vodenim ekstraktima, i od 17.28 do 32.87 mg GAE/g s.e. u etanolnim ekstraktima. Vrijednosti TF za vodene ekstrakte su se kretali od 0.69 do 13.13 mg GAE/g s.e., a za etanolne od 8.91 do 33.21 mg GAE/g s.e. ispitivanih biljnih vrsta.

Različite koncentracije TN i TF mogu se objasniti značajnim uticajem različitih faktora (lokacija i tehnika gajenja biljke, genotip, zrelost biljke, uticaj spoljašnje sredine, klimatskih uslova, temperatura, svjetlost) na sadržaj ovih supstanci u biljci (Simić, 2018).

Sadržaj flavonola u ispitivanim biljnim ekstraktima, prikazan je u *Tabeli 4.3*. U vodenim ekstraktima vrijednosti su se kretale od 1.1 do 7 mg QE/g s.e., a u etanolnim ekstraktima od 1.3 do 10.37 mg QE/g s.e. Najveći sadržaj flavonola nađen je u trnjini, u oba ekstrakta, a najmanji u drenjini, u oba ekstrakta. Na osnovu prikazanih podataka, vidi se da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) između ispitivanih biljnih ekstrakata. Poredeći ove rezultate sa literaturnim podacima, može se uočiti da razni autori navode različite vrijednosti, nešto niže vrijednosti za trnjinu i drenjinu ($>1\text{mg QE/g}$) (Radovanović i sar., 2013), ili više vrijednosti za drenjinu, oko 4.2 mg/g suve materije (Milenković-Andelković i sar., 2015). Ruiz-Rodriguez (2014) je u zavisnosti od godine berbe dobio vrijednosti od 0.9 do 2.3 mg rutina/g svežeg uzorka trnjine, a HPLC-DAD-ESI-MS analizom trnjine, Pinacho i sar. (2015) su identificovali šest flavonola, derivata kvercetina ili kempferola.

Analizom ploda aronije, Serradilla i sar. (2011) i Jurikova i sar. (2017) navode niže vrijednosti sadržaja flavonola. Jurikova i sar. (2017) su za aroniju utvrdili prisustvo četiri različita flavonola (kvercetin-3-galaktozida (hiperozid), kvercetin-3-glukozida (izokvercetin), kvercetin-3-rutinozid (rutin) i kvercetin-3-robinobiozid), dok su kvercetin 3-vicianozid i kempferol bili prisutni u znatno manjoj količini. Proučavanjem ekstrakata različitih vrsta aronije, Szopa i sar. (2017) navode samo prisustvo kvercetina.

Dobijeni sadržaj flavonola u divljoj trešnji u poređenju sa literaturnim podacima je nešto viši (Serra i sar., 2011; Goncalves i sar., 2019). Kim i sar. (2005) navode kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-galaktozid i kempferol 3-rutinozid kao flavonole prisutne u slatkim i kiselim trešnjama.

Tabela 4.3. Sadržaj flavonola u vodenim (V) i etanolnim (E) ekstraktima izražen u mg QE/g suvog ekstrakta (s.e.)

mg QE/g s.e.	Flavonoli	
	V	E
trnjina	7.00 ^a ±0.97	10.37 ^a ±0.38
drenjina	1.10 ^b ±0.06	1.30 ^b ±0.07
aronija	2.58 ^b ±0.05	4.33 ^c ±0.09
crvena trešnja	1.47 ^b ±0.56	1.45 ^b ±0.51

* Vrijednosti parametara a-d, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana, kao i indeks degradacije predstavljeni su u Tabeli 4.4. U vodenim ekstraktima sadržaj monomernih antocijana kretao se od 1.06 do 54.66 mg/g s.e., a za ukupne antocijane od 2.51 do 69.76 mg/g s.e. U etanolnim ekstraktima sadržaj monomernih antocijana je veći i kretao se od 3.62 do 177.88 mg/g s.e., a ukupnih antocijana od 12.96 do 229.17 mg/g s.e. Najveći sadržaj antocijana nađen je u aroniji, u oba ekstrakta. Na osnovu dobijenih rezultata, vidi se da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) između ispitivanih biljnih ekstrakata.

Indeks degradacije (ID), odnosno stepen razgradnje pigmenata kretao se od 1.28 do 3.75 u vodenim, i od 1.29 do 4.50 u etanolnim ekstraktima. Najnižu vrijednost stepena razgradnje pigmenata ima aronija, u oba ekstrakta.

Antocijani se u plodovima trnjine mogu naći u visokim koncentracijama, a najveća količina antocijaninskih jedinjenja nalazi se u epikarpu ploda. Analizom profila antocijana u plodovima *P. spinosa*, utvrđeno je da su najzastupljenini cijanidin 3-rutinozid i peonidin 3-rutinozid (Leichtweis, 2019), kao i cijanidin-3-glukozid (Fraternale i sar., 2009).

Tabela 4.4. Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana u vodenim (V) i etanolnim (E) ekstraktima izražen u mg cijanidin-3--glukozida/g suvog ekstrakta i vrijednosti indeksa degradacije (ID)

mg/g s.e.	Antocijani					
	V			E		
	mon.	ukupni	ID	mon.	ukupni	ID
trnjina	2.45 ^a ±0.66	3.65 ^a ±0.54	1.67 ±0.67	8.33 ^a ±0.02	37.48 ^a ±0.59	4.50 ±0.08
drenjina	1.06 ^a ±0.00	2.51 ^a ±0.75	2.37 ±0.00	3.62 ^a ±2.64	15.39 ^b ±0.79	4.25 ±1.36
aronija	54.66 ^b ±2.81	69.76 ^b ±3.10	1.28 ±0.01	177.88 ^b ±5.64	229.17 ^c ±6.46	1.29 ±0.00
crvena trešnja	1.53 ^a ±0.35	5.57 ^a ±0.45	3.75 ±0.54	6.43 ^a ±0.93	12.96 ^b ±1.00	2.04 ±0.14

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Pinacho i sar. (2015) smatraju da sadržaj antocijana u različitim ekstraktima trnjine zavisi od polariteta upotrebljenog rastvarača, a vrijednosti se kreću od 165 do 180 mg malvidin glukozid ekvivalenta/g. Slične vrijednosti navode i Ruiz-Rodríguez i sar. (2014), a primjenom ultrazvučne ekstrakcije i razblaženog etanola moguće je ekstrahovati veće količine antocijana (Leichtweis i sar., 2019).

Analizom etanolnih i acetonskih ekstrakta trnjine Veličković i sar. (2020) navode cijanidin kao najdominantniji, te delfinidin, malvidin i pelargonidin, dok je u vodenom ekstraktu trnjine pelargonidin izostao.

Drenjina sadrži antocijane, među kojima su najzastupljeniji cijanidin i derivati pelargonidina. Sorta, regija rasta biljaka i period berbe imaju veliki uticaj na sastav aktivnih jedinjenja u voću (Kucharska i sar., 2015; Milenković-Anđelković i sar, 2015). U svojim radovima Milenković-Anđelković i sar. (2014; 2015) navode sadržaj od 1383.2 mg/kg svježeg ploda, a u dvogodišnjoj studiji taj sadržaj se kretao od 15.5 do 16.1 mg/g s.m mjereno spektrofotometrijski, odnosno 13.86-14.03 mg/g s.m mjereno pomoću HPLC (Milenković- Anđelković, 2014). U zavisnosti od vrste korištenog rastvarača, vrijednosti za antocijane u drenjini kreću se od 145 do 282 mg/100g s.m. Najbolji prinos daje ekstrakcija sa 80% etanolom (Dumitrašcu i sar., 2019).

Analizom aronije došlo se do zaključka da bobice aronije imaju veći sadržaj antocijana od većine ostalih vrsta voća. Analizom su identifikovani 3-galaktozid, 3-glukozid, 3-arabinozid, i 3-ksilozid, dok je najzastupljeniji cijanidin-3-galaktozid. Ukupni sadržaj antocijana u aroniji je otprilike oko 4000 mg/kg (Mohr, 2018; Wathon i sar., 2019; Banach i sar. 2020). U zavisnosti od

vrste, sorte, položaja, kao i od metode ekstrakcije Meng i sar. (2019) navode vrijednosti 380 mg/100g svježeg ploda. Smatra se da se najveći dio prisutnih antocijana nalazi u pokožici ploda aronije (Wathon i sar., 2019).

Trešnja predstavlja jedan od bogatijih izvora antocijana. U raznim istraživanjima mogu se naći različite vrijednosti sadržaja antocijana, što je vjerovatno uzrokovano, pored razlike u geografskom položaju, različitim faktorima nakon branja plodova, uključujući uslove skladištenja i metode ekstrakcije, a vrijednosti se kreću od 24 do 225 mg/100g (Blachhall i sar., 2018). Ukupan sadržaj antocijana u trešnji, zavisno od lokacije na kojoj je ubrana, kretao se od 0.6 do 6.8 mg/g (Rimpapa i sar., 2007). Antocijani u divljim trešnjama odgovorni za crvenu boju su cijanidin-3-O-glukozid i cijanidin-3-O-rutinozid, dok su peonidin-3-O-rutinozid i pelargonidin-3-O-rutinozid prisutni u manjim količinama (Milinović i sar., 2016).

Razlike u vrijednostima indeksa degradacije (ID), Pliszka i sar. (2013) pripisuju razlikama među voćnim vrstama, kao i različitim načinima ekstrakcije koje imaju veliki uticaj na stabilnost antocijana.

Rezultati antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata dati su u *Tabeli 4.5*. Vodeni ekstrakti su, u svim ispitivanim uzorcima, pokazali slabiju antioksidativnu aktivnost od etanolnih ekstrakata. Na osnovu prikazanih rezultata, vidi se da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) između ispitivanih biljnih ekstrakata.

Tabela 4.5. Antioksidativna aktivnost vodenih (V) i etanolnih (E) ekstrakata u $\mu\text{g/mL}$ za ABTS, mg/mL za DPPH i $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g suvog ekstrakta za FRAP}$

	ABTS Ic50%		DPPH Ic50%		FRAP $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g s.e.}$	
	V	E	V	E	V	E
trnjina	276.48 ^a ±6.67	30.45 ^a ±1.33	1571.63 ^a ±22.93	142.85 ^a ±7.69	107.51 ^a ±10.29	512.22 ^a ±9.80
drenjina	103.14 ^b ±3.23	46.62 ^b ±2.59	506.67 ^b ±46.43	209.54 ^b ±19.88	219.29 ^b ±5.13	351.80 ^b ±8.62
aronija	76.20 ^c ±3.33	37.15 ^a ±3.25	262.60 ^b ±1.04	136.66 ^a ±9.93	267.63 ^c ±9.84	677.17 ^c ±80.61
crvena	431.29 ^d	187.26 ^c	2588.14 ^c	950.32 ^c	58.97 ^d	216.59 ^d
trešnja	±14.97	±2.93	±157.03	±25.73	±13.07	±5.32

* Vrijednosti parametara a-d, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Vrijednosti Ic50% za ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonil)) su se kretale od 30.45 do 187.26 mg/mL u etanolnim, i 76.20-431.29 mg/mL u vodenim ekstraktima. Najslabiju

aktivnost prema ABTS, u oba rastvarača, pokazao je voden ekstrakt trešnje, a najjaču etanolni ekstrakt trnjine.

Vrijednosti Ic50% prema DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) su se kretale od 136.66 do 950.32 mg/mL u etanolskim i od 262.60 do 2588.14 mg/mL u vodenim ekstraktima. Najslabiju aktivnost prema DPPH u oba rastvarača pokazao je ekstrakt trešnje, a najjaču ekstrakt aronije.

Vrijednosti za FRAP (ferric reducing antioxidant power) su se kretale od 216.59 do 677.17 µmol Fe⁺²/g s.e. u etanolnim, i od 58.97 do 267.63 µmol Fe⁺²/g s.e. u vodenim ekstraktima. Najslabiju aktivnost prema FRAP u oba rastvarača pokazao je ekstrakt trešnje, a najjaču ekstrakt aronije.

Voden ekstrakt trnjine pokazao je prilično slabu antioksidativnu aktivnost u svim izvedenim testovima, vjerovatno zbog nedovoljnog rastvaranja polifenolnih materija u vodenom mediju.

Veličković i sar. (2014) su uz upotrebu različitih rastvarača (voden ratvori etanola i metanola, voda) dobili vrijednost aktivnost prema DPPH radikalu od 0.86 do 5.24 mg QE/100g svježeg ploda. Korištenjem istih rastvarača na suvim trnjinama, Tahirović i sar. (2018) navode vrijednosti za DPPH od 140.80 µmol TE/g, za ABTS od 223.98 µmol TE/g i za FRAP 249.13 µmol TE/g. Prema istim autorima, kao najbolje sredstvo za ekstrakciju pokazao se 50% etanol, dok su najslabiju aktivnost imali voden rastvori. Vrijednosti za Ic%50 za etanolski ekstrakte trnjine koje Veličković i sar. (2020) navode za DPPH kreću se oko 258 µg/mL, za ABTS oko 184 µg/mL, dok se vrijednost za FRAP 0.10 µmol Fe⁺²/g suve materije. Isti autori za vodene ekstrakte trnjine navode vrijednosti za DPPH oko 490 µg/mL, za ABTS oko 217 µg/mL i za FRAP oko 0.01 µmol Fe⁺²/g suve materije.

Ispitivanjem šest sorti drenjine, Cosmulesku i sar. (2018) navode vrijednosti za DPPH od 1.24 do 2.71 mmol TE/100g svježeg uzorka. Antioksidativna aktivnost za poljske sorte drenjine, kretala se za DPPH od 10.85 do 20.72 µmol TE/g s.m., za ABTS 18.87-38.96 µmol TE/g s.m i za FRAP 21.17-41.08 µmol TE/g s.m. (Kazimierski i sar., 2019). Poredeći sredstva za ekstrakciju, Yigit (2018) navodi da je aktivnost uklanjanja radikala DPPH bila veća u vodenom ekstraktu (36.6%) od metanolnog ekstrakta (30.6%). U poređenju sredstava za ekstrakciju, vrijednosti za DPPH Ic50% su se kretale od 11.06 µg/mL za etil acetat, do 518.47 µg/mL za vodu (Stanković i sar., 2014).

Mjereći Ic50% prema DPPH radikalu, Milenković-Anđelković i sar. (2014) smatraju da drenjina ima jaku aktivnost, od 0.94-1.09 mg/mL. U ispitivanju svježe i sušene drenjine, pokazalo se da svježa drenjina ima bolju antioksidativnu aktivnost, 97.21 mM TE/g s.m. (DPPH test) i 94.64

mM TE/g s.m. (FRAP test) (Petkova i Ognyanov, 2018). Poredeći metode ekstrakcije, maceracija je dala bolje rezultate od ekstrakcije ultrazvukom (Piryaei i sar., 2019).

Analizirani parametri antioksidativne aktivnosti pokazali su značajne razlike između sorti aronije, prema FRAP i DPPH testovima najjaču aktivnost pokazuje ekstrakt ploda *A. arbutifolia*, dok je aktivnost plodova *A. xprunifolia* i *A. melanocarpa* nešto niža (Szopa i sar., 2017). Milutinović i sar. (2019) navode da je koncentracija aronije koja je inhibirala 50% DPPH slobodnih radikala (Ic50%) iznosila 1.25 mg/ml, što je nešto više od rezultata koji su dobijeni ispitivanjem etanolnih i vodenih ekstrakata koji su korišteni u ovom ispitivanju. Ispitivanjem 4 različita kultivara aronije za Ic50% DPPH dobijene su vrijednosti 16.2-35.7 µg/mL pri korištanju 80% etanola kao sredstva za ekstrakciju, i 33.2-61.4 µg/mL pri korištanju zakišljenog metanola (Bräunlich i sar., 2014).

Pri ispitivanju proizvoda od aronije (sok, kapsule, prah, čaj i sušena aronija) dobijeni rezultati su pokazali da ovi proizvodi posjeduju visok antioksidativni kapacitet (od 12.09 do 40.19 mmol TE/L i od 58.49 do 191.31 mmol TE/100 g s.m.) i redukcionu snagu (od 38.71 do 79.86 mmol Fe²⁺/L i od 13.50 do 68.60 mmol Fe²⁺/100 g s.m) (Tolić i sar., 2015). U zavisnosti od sezone, DPPH za sok od aronije se kretao od 12.9 do 14.6 mM Troloxa/L, a FRAP od 128.2 do 179.5 mmol Fe²⁺/L (Tolić i sar., 2017).

Rezultati raznih ispitivanja i većeg broja antioksidativnih testova ukazuju na jaku antioksidativnu aktivnost aronije (Meng i sar., 2019; Banach i sar., 2020), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

Mnogi autori smatraju da sadržaj polifenolnih jedinjenja (fenoli, antocijani) doprinosi ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti divljih trešnja (González-Gómez i sar., 2010; Ferretti i sar., 2010; Serradilla i sar., 2011), dok Serra i sar. (2011) navode da su, kod metanolskih ekstrakata trešnje, najaktivnije supstance sa najboljim antioksidativnim svojstvima flavonoidi (uključujući katehin, epikatehin, kvercetine i antocijanine) i derivati kininske kiseline (hlorogena kiselina, neohlorogena kiselina).

Analiza trešanja iz Španije dala je vrijednosti za DPPH 242 µmol TE/100 g svježeg ploda, za ABTS 640 µmol TE/100 g svježeg ploda i za FRAP 763 µM Fe²⁺/100 g svježeg ploda (Ruiz-Torralba i sar., 2018). Različite faze zrenja, takođe, utiču na antioksidativnu aktivnost, tako da se vrijednosti za ABTS kreću od 317.92 mg TE/100g svježeg ploda, za početnu fazu zrenja, do 439.10 mg TE/100g svježeg ploda, za završnu fazu zrenja (Serradilla i sar., 2011). Analizom

antioksidativne aktivnosti tamnih i svijetlih trešanja iz Turske, Hayaloğlu i Demir (2015) ističu da trešnje tamnije boje imaju jaču aktivnost, što se može povezati sa sadržajem antocijana u uzorcima. Isti autori navode vrijednosti za ABTS od 4.5-6.15 mg TE/g svježeg ploda, DPPH od 4.5-6.02 mg TE/g svježeg ploda i FRAP od 0.44-1.61 mg TE/g svježeg ploda. Istraživanja su pokazala da se bioaktivna jedinjenja mogu razlikovati zavisno od stepena zrelosti i da se sa povećanjem intenziteta boje voća povećava i antioksidativna aktivnost (Ağlar i sar., 2019).

4.1.3. Antibakterijska aktivnost ekstrakata

Sovi ekstrakti ispitivanih biljnih vrsta (T-trnjina, D-drenjak, A-aronija i Tr-trešnja) pripremljeni su ekstrakcijom u 80% (v/v) etanolu (E) i u vodi (V)), za mikrobiološka ispitivanja, u određenim koncentracijama, rastvoreni u 80% (v/v) etanolu (E) i u vodi (V). Kao kontrolni uzorci korišteni su destilovana voda (C1), vitamin C - kao kontrola antioksidativnih osobina (C2) i etanol - kao kontrole antimikrobne aktivnosti rastvarača (C3). Rezultati istraživanja su statistički analizirani kako bi se što bolje uporedile osobine ispitivanih ekstrakata i izabrali biljni ekstrakti za dalju primjenu.

Za određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata na odabrane G(+) i G(-) bakterije (MIC i MBC vrijednosti), korištena je metoda razrjeđivanja u agaru. Za testiranje inhibicije rasta micelijuma pljesni *Penicillium expansum* korištena je metoda razrjeđivanja u agaru i praćen je prečnik rasta pljesni (5 dana).

U *Tabeli 4.6.* prikazani su rezultati testiranja antibakterijske aktivnosti ekstrakata, etanola (kontrola), vitamina C (antioksidativno sredstvo) i antibiotika, na odabrane G(+) bakterije *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* (Prilog, *Slika A.*). Mjerenje antibakterijske aktivnosti vršeno je metodom razrjeđivanja u agaru, pri čemu su određene minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije. Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da se MIC vrijednost analiziranih ekstrakta trnjine kretala od 7.5 do 30 mg/mL i da su mnogo bolju aktivnost pokazali etanolni ekstrakti (EE i EV). Vrijednosti MBC za ekstrakte trnjine su se kretale od 15 do >120 mg/mL, a kao najslabiji se pokazao vodeni ekstrakt trnjine (VV).

Kod ekstrakta drenjine, vrijednosti MIC su bile 15 mg/mL za *S. aureus* za sve analizirane ekstrakte, a za *B. cereus* od 7.5 (EE) do 15 mg/mL za ostale ekstrakte. Vrijednosti MBC, za sve ekstrakte drenjine, bile su 15 mg/mL za obe vrste bakterija, osim vodenog ekstrakta rastvorenog u etanolu (VE), koji je prema *S. aureus* imao MBC vrijednost 30 mg/mL. Oba etanolska

ekstrakta aronije pokazala su jaku aktivnost prema izabranim G(+) bakterijama, sa MIC vrijednostima od 7.5 mg/mL prema *B. cereus* i 15 mg/mL prema *S. aureus*. Kod vodenih ekstrakata aronije MIC vrijednost se kretala od 30 do 60 mg/mL, s tim da je malo jaču aktivnost pokazao ekstrakt rastvoren u etanolu. Vrijednosti za MBC za *S. aureus* su se kretale od 15 (AEV) do >120 mg/mL (AVV), i od 7.5 (etanolski ekstrakti aronije) do 60 mg/mL (AVV) za *B. cereus*.

Tabela 4.6. Antibakterijska aktivnost ispitivanih ekstrakata na odabrane G(+) bakterije

		Trnjina				Drenjina				Aronija				Crvena trešnja										
		EE	EV	VV	VE	EE	EV	VV	VE	EE	EV	VV	VE	EE	EV	VE	VV							
<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	MIC (mg/mL)	7.5	30	30	15	15	15	15	15	15	15	60	>30	30	>30	30	120							
	MBC (mg/mL)	30	>30	>120	30	15	15	15	30	30	15	>120	>30	>30	>30	>30	>120							
<i>Bacillus cereus WDCM 00151</i>	MIC (mg/mL)	7.5	15	30	15	7.5	15	15	15	7.5	7.5	60	30	30	30	30	60							
	MBC (mg/mL)	15	15	60	15	15	15	15	15	7.5	7.5	60	>30	30	>30	>30	120							
		<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>								<i>Bacillus cereus WDCM 00151</i>														
		MIC				MBC				MIC				MBC										
C2	2.5 mg/mL				5.0 mg/mL				2.5 mg/mL				2.5 mg/mL											
C3	6%				6%				6%				6%											
Ampicillin 10 mg (mm)	34.40±1.50								11.50±2.32															
Ciprofloxacin 5 mg (mm)	30.00±5.90								29.10±4.41															
Erytromycin 15 mg (mm)	28.20±3.66								25.60±2.94															
Gentamicin 10 mg (mm)	28.60±2.94								23.30±2.14															

*EE – suvi etanolni ekstrakt rastvoren u etanolu , EV- suvi etanolni ekstrakt rastvoren u vodi , VV - suvi vodenii ekstrakt rastvoren u vodi , VE – suvi vodenii ekstrakt rastvoren u etanolu

Ekstrakti crvene trešnje su pokazali najslabiju antibakterijsku aktivnost prema odabranim G(+) bakterijama. Vrijednosti MIC su se kretale od 30 do 120 mg/mL za *S. aureus* i od 30 do 60 mg/mL za *B. cereus*. Vrijednosti MBC su bile od >30 do >120 mg/mL za *S. aureus* i od 30 do 120 mg/mL za *B. cereus*. Posmatrajući vrstu ekstrakta, kao i rastvarač u kojem je rastvoren, najbolji efekat prema izabranim bakterijama imali su etanolni ekstrakti rastvoreni u etanolu (EE), dok su najlošiji efekat pokazali vodeni ekstrakti rastvoreni u vodi (VV).

Uzorak C2, koji je korišten kao kontrola antioksidativnog sredstva, imao je vrijednosti MIC 2.5 mg/mL i MBC 5 mg/mL, za obe G(+) bakterije.

Uzorak C3 u koncentraciji koja je korištena za pripremu rastvora ekstrakata korišen je kao kontrola, a izmjerene su vrijednosti za MIC i MBC od 6%.

U *Tabeli 4.7.* prikazani su rezultati testiranja antibakterijske aktivnosti ekstrakata, etanola kao kontrole, vitamina C kao antioksidativnog sredstva, i antibiotika (provjera kulture) za izabrane G(-) bakterije *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* (Prilog, *Slika A.*) Na osnovu ovih rezultata vidi se da su se MIC vrijednosti analiziranih ekstrakta trnjine kretale od 15 do 60 mg/mL, dok su se MBC vrijednosti kretale od 30 do 120 mg/mL. Najslabiju aktivnost pokazao je vodeni ekstrakt trnjine rastvoren u vodi. Za ekstrakt drenjine vrijednosti MIC su se kretale od 15 do 30 mg/mL, a malo bolju aktivnost pokazuju ekstrakti rastvoreni u etanolu. MBC vrijednosti za ekstrakte drenjine kretale su od 30 do 60 mg/mL za *E. coli*, i od 15 do 30 mg/mL za *S. enterica*.

Ekstrakti aronije i crvene trešnje nisu pokazali značajniju antibakterijsku aktivnost prema izabranim G(-) bakterijama. Vrijednosti za MIC su se kretale od 30 do 120 mg/mL, a za MBC od 30 do >120 mg/mL. Etanolni ekstrakti rastvoreni u etanolu su i kod G(-) bakterija pokazali jače dejstvo, dok su vodeni ekstrakti rastvoreni u vodi imali najslabije dejstvo.

Uzorak C2, koji je korišten kao kontrola antioksidativnog sredstva, imao je vrijednosti MIC 2.5 mg/mL za obe G(-) bakterije i MBC vrijednosti 5 mg/mL za *E. coli* i >5 mg/mL za *S. enterica*.

Uzorak C3 je korišten kao kontrola, pri čemu su izmjerene vrijednosti za MIC i MBC bile >6%.

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su analizirani ekstrakti pokazali jače dejstvo na G(+), nego na G(-) bakterije, što je u skladu sa literaturnim podacima (Radovanović i sar., 2013; Milenković-Andđelković i sar., 2015).

Veličković (2013) i Radovanović i sar. (2013) su ustanovili da etanolski ekstrakti trnjine pokazuju značajno dejstvo na bakterije, kao što su *Salmonella abony*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Na etanolski ektrakt trnjine otpornost je

pokazala bakterija *Bacillus subtilis* (Veličković i sar., 2014). Ekstrakti trnjine imaju značajnu biološku važnost i kao antioksidansi i kao antimikrobnia sredstva, što je potvrdio veliki broj autora (Kumarasamy i sar., 2004; Radovanović i sar., 2013; Veličković i sar., 2014; Veličković i sar., 2020).

Tabela 4.7. Antibakterijska aktivnost ispitivanih ekstrakata na izabrane G(-) bakterije

		Trnjina				Drenjina				Aronija				Crvena trešnja										
		EE	EV	VV	VE	EE	EV	VV	VE	EE	EV	VV	VE	EE	EV	VE	VV							
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	MIC (mg/ mL)	15	>30	60	15	15	30	30	15	30	>30	>120	>30	30	>30	30	120							
	MBC (mg/ mL)	>30	>30	120	30	30	>30	60	30	>30	>30	>120	>30	>30	>30	>30	>120							
<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> WDCM 00030	MIC (mg/ mL)	15	>30	60	15	15	30	30	15	30	>30	>120	>30	30	>30	30	120							
	MBC (mg/ mL)	30	>30	60	30	15	30	30	30	30	>30	>120	>30	30	>30	>30	>120							
		Escherichia coli WDCM 00013								Salmonella enterica WDCM 00030														
		MIC				MBC				MIC				MBC										
C2	2.5 mg/mL				>5.0 mg/mL				2.5 mg/mL				5.0 mg/mL											
C3	>6%				-				6%				6%											
Ampicillin 10 mg (mm)	16.50±6.00								22.20±2.64															
Ciprofloxacin 5 mg (mm)	32.60±3.32								36.60±5.43															
Erytromycin 15 mg (mm)	9.00±1.26								8.20±1.17															
Gentamicin 10 mg (mm)	23.00±5.06								24.60±3.38															

Mnogi autori su ustanovili snažno antibakterijsko dejstvo drenjine na neke G(+) i G(-) bakterije (Milenković-Andelković i sar., 2015; Yigit, 2018; Kazimierski i sar., 2019). Etanolnih ekstrakti drenjina pripremljeni topлом i hladnom ekstrakcijom (50°C, 12h i sobna temperatura, 12h),

pokazali su malu ili umjerenu aktivnost (7-9.3 mm mjereno disk-difuzionom metodom) prema *S. aureus* i još nekim bakterijama i veoma malu aktivnost (7.1-7.4 mm mjereno disk-difuzionom metodom) prema *E. coli* (Turker i sar., 2012). Ispitujući metanolni ekstrakt drenjine, Krisch i sar. (2008) su utvrdili snažnu inhibiciju prema *E. coli*, dok su ispitivani vodeni ekstrakti pokazali veoma malu osjetljivost. Isti autori navode da ekstrakti drenjine posjeduju prilično dobar kapacitet inhibicije. Smatra se da su iridoidi glavna jedinjenja odgovorna za protivupalna i antimikrobna svojstva drenjine (Nizioł-Łukaszewska i sar., 2018). Metanolni i etanolni ekstrakti voća, sjemena, lišća i peteljke drenjine pokazuju značajnu aktivnost prema *S. aureus*, *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, a upotrebom smjese rastvarača (zakišljeni metanol) dobije se ekstrakt koji aktivnost pokazuje protiv 13 vrsta bakterija i pljesni (Milenković-Andđelković i sar., 2015; Dinda i sar., 2016).

Veći broj autora je ustanovio da ekstrakti aronije pokazuju bakteriostatsku aktivnost *in vitro* prema *S. aureus* i *E. coli* (Shahin i sar., 2019; Jurendić i Ščetar, 2021). Liepiņa i sar. (2013) navode da su vodeni i etanolni ekstrakti aronije, pripremljeni od svježeg voća, inhibirali sve testirane bakterije (*B. cereus*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*). Isti autori za ekstrakte sušenog ili smrznutog voća potvrđuju uticaj samo na G(+) bakterije, dok ti ekstrakti prema *E. coli* ne pokazuju nikakvu aktivnost. Denev i sar. (2019) smatraju da je za antimikrobne osobine aronije zaslužno djelovanje proantocijanidina.

Prilikom ispitivanja vodenih i etanolnih ekstrakata trešnje na čisti i klinički soj *E. coli*, Rovčanin i sar. (2015) su zapazili veće zone inhibicije rasta *E. coli* (čisti soj) kod etanolnih ekstrakata, kao i niže koncentracije ekstrakta neophodne za inhibiciju ovog soja u poređenju sa kliničkim sojem. Hanbali i sar. (2012) takođe smatraju da se kod ekstrakata divlje trešnje primjećuje antimikrobna aktivnost.

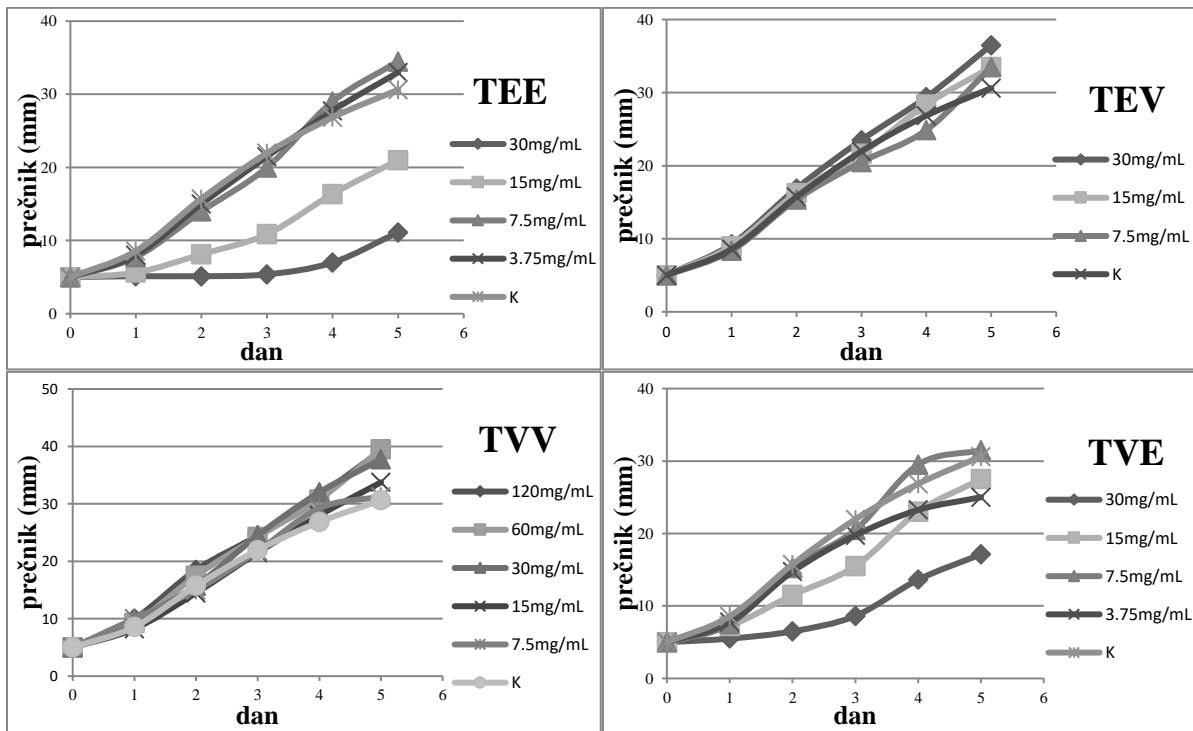
Ispitivanja su dokazala da ekstrakti divljeg voća pokazuju antibakterijsku aktivnost na većinu ispitivanih G(+) i G(-) bakterija (Radovanović i sar., 2013; Veličković 2013). Smatra se da su G(+) bakterije podložnije inhibitornom dejstvu biljnih ekstrakata nego G(-), najvjerojatnije zbog razlika u strukturi njihovih ćelijskih zidova (Turker i sar., 2012).

4.1.4. Antifungalna aktivnost ekstrakata

Za testiranje antifungalne aktivnosti odabrana je pljesan *Penicillium expansum*, a korištena je metoda razrjeđivanja u agaru (Prilog, *Slika B*). Na *Grafiku 4.1.* predstavljena je promjena

prečnika rasta pljesni tokom 5 uzastopnih dana mjerena za različite koncentracije ekstrakata i za kontrolni uzorak (K).

Kao što se može vidjeti iz dijagrama A, rastvori ekstrakata trnjine rastvoreni u vodi ne pokazuju nikakvo inhibitorno dejstvo na pljesan *P. expansum*. Što se tiče rasvora ekstrakata u etanolu, može se primijetiti da samo najviša koncentracija (u oba slučaja) pokazuje značajnije inhibitorno dejstvo.



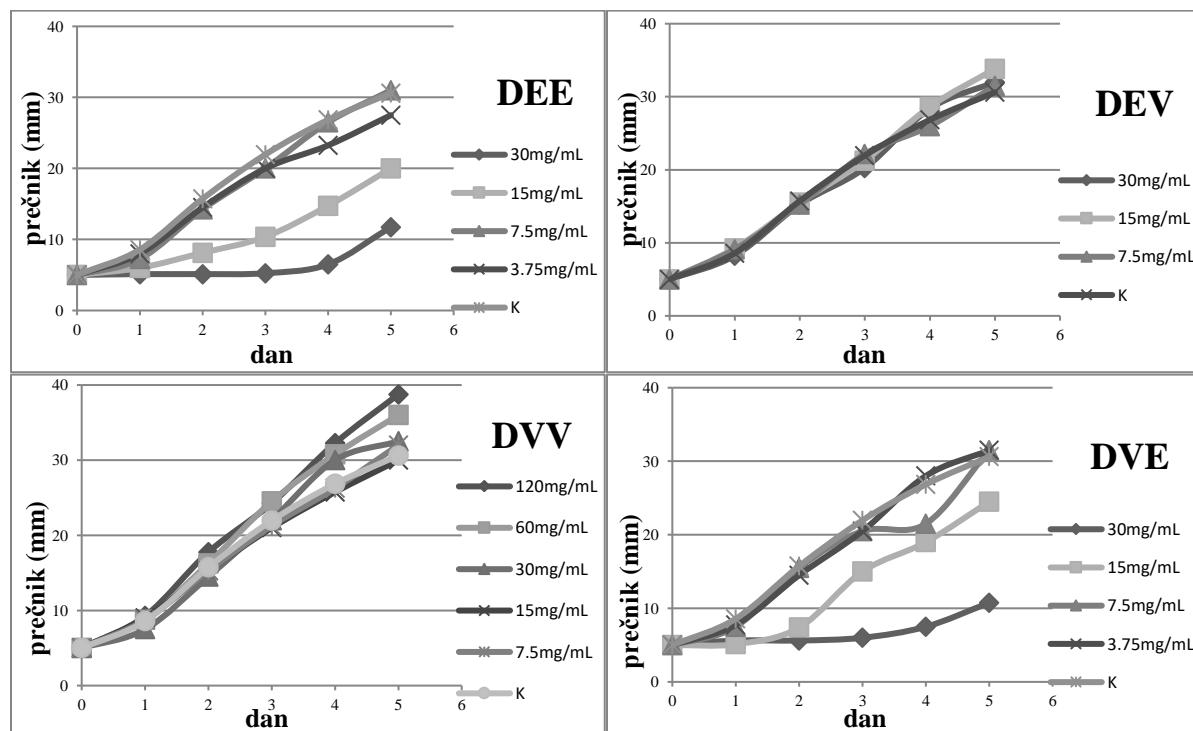
*K-kontrola, rast pljesni bez dodanih ekstrakata

Grafik 4.1. Antifungalno dejstvo ekstrakata trnjine na pljesan *Penicillium expansum*

Ekstrakt trnjine TEE je pokazao dejstvo pri koncentracijama 15 i 30 mg/mL, a izmjereni prečnici rasta pljesni nakon 5 dana mjerena bili su: 11.12 mm za koncentraciju 30 mg/mL i 21 mm za koncentraciju 15 mg/mL, dok je za kontrolu izmjeren prečnik 30.62 mm. Inhibicija rasta micelijuma (IM) je 63.7% i 31.4%, pojedinačno. Takođe, kad su u pitanju ove dvije koncentracije, može se primijetiti da je kod koncentracije 30 mg/mL tek od 4 dana mjerena došlo do povećanja prečnika rasta pljesni. Pri koncentraciji od 15 mg/mL već nakon prvog dana vidi se blag, ali konstantan porast prečnika rasta pljesni. Što se tiče dvije najniže koncentracije (3.75 i 7.5 mg/mL), one nisu pokazale nikakvo inhibitorno dejstvo na pljesan *P. expansum*.

Ekstrakt TVE pokazuje djelovanje pri koncentraciji od 30 mg/mL (17.125 mm), ali se primijeti blag, ali konstantan rast već od 3 dana mjerena, sa IM 44.1%. Ostale koncentracije nisu pokazale značajnije djelovanje na testiranu pljesan, promjene tokom 5 dana mjerena slične su kontrolnom uzorku.

Ekstrakti TEV i TVV nemaju nikakvo inhibitorno djelovanje, čak se može primijetiti da porastom koncentracije raste i prečnik (od 33.50-36.50 mm za TEV i 31.25-39.50 mm za TVV). Veličković (2020) navodi da je vodeni ekstrakt trnjine posjedovao nešto bolja antifungalna svojstva od etanolnog ekstrakta, ali je to dejstvo bilo znatno slabije od komercijalno korištenih antimikotika, dok Gegiu i sar. (2015) navode da ekstrakti trnjine nemaju nikakvo antifungalno djelovanje.



*K-kontrola, rast pljesni bez dodanih ekstrakata

Grafik 4.2. Antifungalno dejstvo ekstrakata drenjine na pljesan *Penicillium expansum*

Na Grafiku 4.2., koji pokazuju antifungalno djelovanje ekstrakata drenjine, može se vidjeti da ekstrakti rastvoren u vodi (DEV i DVV) ne pokazuju aktivnost prema pljesni *Penicillium expansum*. Ekstrakti rastvoren u etanolu (DEE i DVE) pri koncentraciji 30 mg/mL pokazuju inhibitorno djelovanje.

Ekstrakt drenjine DEE je pokazao dejstvo pri koncentracijama 15 i 30 mg/mL. Izmjereni prečnici rasta pljesni nakon 5 dana mjerena za ovaj ekstrakt bili su: 11.75 mm za koncentraciju 30 mg/mL i 20 mm za koncentraciju 15 mg/mL, dok je prečnik za kontrolu, nakon 5 dana mjerena, iznosio 30.62 mm. IM za ove koncentracije je iznosio 61.6% i 34.7%, pojedinačno. Primjećuje se da je kod koncentracije 30 mg/mL do povećanja prečnika došlo tek nakon 4 dana mjerena, a pri koncentraciji od 15 mg/mL rast je bio usporen ali konstantan. Niže ispitivane koncentracije nisu pokazale nikakvo inhibitorno dejstvo (27.5-30.61 mm).

Ekstrakt DVE pokazuje značajno inhibitorno djelovanje pri koncentraciji od 30 mg/mL, sa porastom prečnika nakon 5 dana od 10.75 mm, sa IM vrijednosti od 64.9%. Blagi porast se primjećuje tek 4-og dana mjerena. Isti ekstrakt u koncentracija 15 mg/mL pokazuje konstantan porast prečnika (24.5 mm), uz IM od 20%, dok niže koncentracije ne pokazuju djelovanje na izabranu pljesan (30.61 mm).

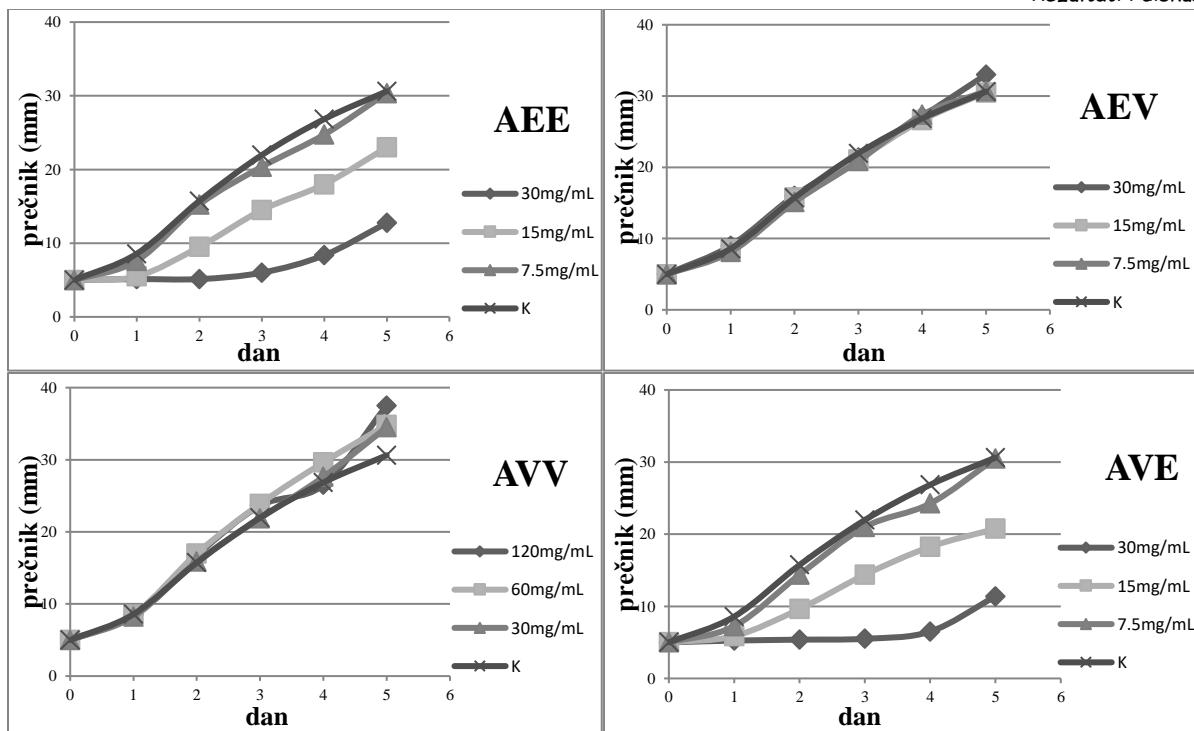
Kod ekstrakata drenjine DEV i DVV ustanovljeno je, kao i kod trnjine, da porastom koncentracije raste i prečnik pljesni, što dovodi do zaključka da ovi ekstrakti stvaraju pogodnu sredinu za razvoj izabrane pljesni (31.50-33.83 mm i 30-38.75 mm, pojedinačno).

Ispitivanjem ekstrakata raznih dijelova drenjka, Krzyściak i sar. (2011) dokazuju da oni nemaju dejstvo na izabrane pljesni.

Na *Grafiku 4.3.* prikazana je aktivnost ekstrakata aronije na pljesan *Penicillium expansum*, i može se vidjeti da ekstrakti rastvoren u vodi (AEV i AVV) nemaju antifungalno dejstvo, dok ekstrakti rastvoren u etanolu pokazuju djelovanje u koncentracijama 15 i 30 mg/mL.

Ekstrakt aronije AEE pokazuje dejstvo u višim koncentracijama (15 i 30 mg/mL). Izmjereni prečnici rasta pljesni nakon 5 dana mjerena za ovaj ekstrakt bili su 12.75 mm za 30 mg/mL i 23 mm za 15 mg/mL, ili izraženo preko IM 54.4% i 41.2%, pojedinačno. Do povećanja prečnika kod koncentracije 30 mg/mL dolazi 3 dan, a pri koncentraciji od 15 mg/mL rast je usporen ali konstantan. Najniža ispitivana koncentracija nije pokazale nikakvo inhibitorno dejstvo (30.61 mm).

Kod ekstrakta AVE primjetno je značajno inhibitorno djelovanje pri koncentraciji od 30 mg/mL, sa porastom prečnika nakon 5 dana od 11.375 mm, a blagi porast se primjećuje tek 4 dana mjerena. IM za ovu koncentraciju ekstrakta aronije je 62.8%. Koncentracija 15 mg/mL pokazuje manje inhibitorno djelovanje (IM 32.2%) uz konstantan porast prečnika (20.75 mm). Najniža koncentracije ovog ekstrakte ne pokazuju djelovanje na izabranu pljesan (30.61).



*K-kontrola, rast plijesni bez dodanih ekstrakata

Grafik 4.3. Antifungalno dejstvo ekstrakata aronije na plijesan *Penicillium expansum*

Ekstrakti aronije, AEV i AVV, kao u prethodna dva slučaja, predstavljaju pogodnu sredinu za razvoj izabrane plijesni, te su prečnici veći nego kod kontrole (30.5-33.00 mm i 34.50-37.5 mm, pojedinačno).

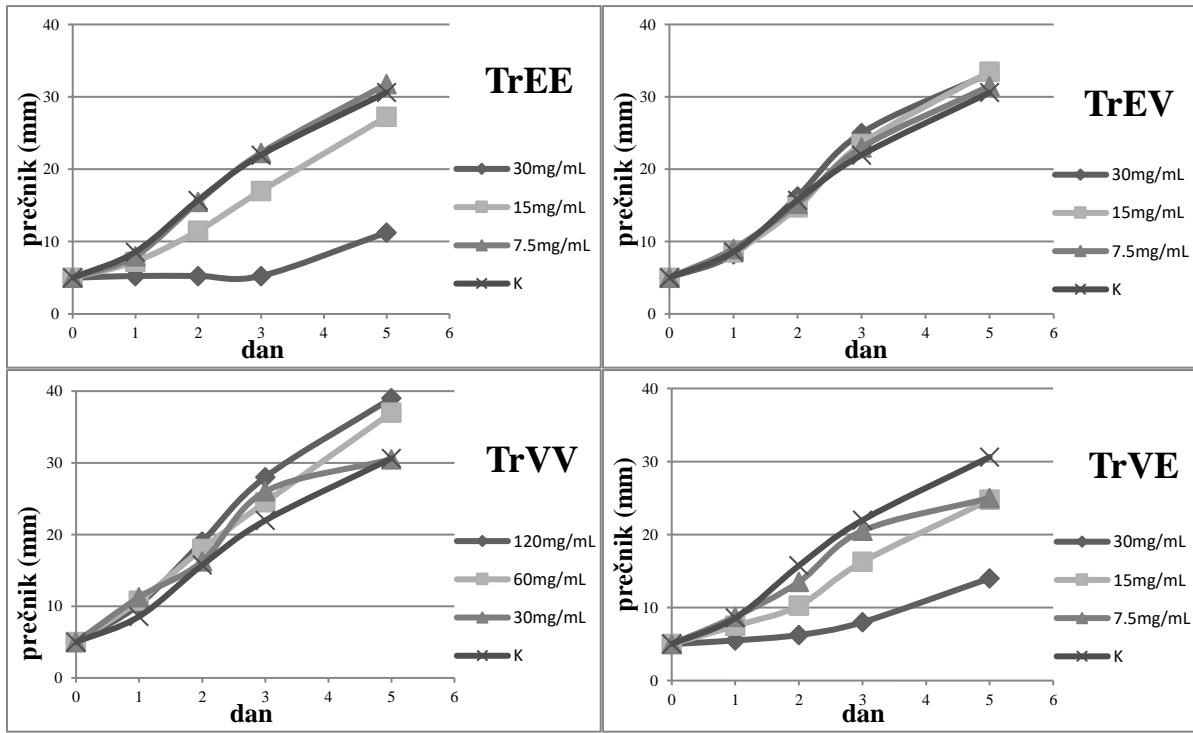
U većini istraživanja navodi se da vodeni i etanolski ekstrakti nisu imali nikakvo antifungalno dejstvo na ispitivanim plijesnima (Liepina i sar., 2013; Kim i sar., 2018; Denev i sar., 2019).

Na Grafiku 4.4. prikazano je dejstvo ekstrakata crvene trešnje na plijesan *Penicillium expansum*. Ekstrakti TrEE i TrVE imaju dejstvo u koncentraciji od 30 mg/mL, dok ostale analizirane koncentracije nisu pokazale nikakvu aktivnost prema izabranoj plijesni. Ekstrakti rasvorenici u vodi takođe nisu pokazali aktivnost bez obzira na koncentraciju.

Ekstrakt crvene trešnje TrEE je pokazao inhibitorno djelovanje (IM od 63.3%) u koncentraciji 30 mg/mL sa prečnikom nakon 5 dana mjerena od 11.25 mm. Koncentracija od 15 mg/mL ima konstantan porast i veoma slabo djelovanje, a koncentracija od 7.5 mg/mL nije pokazala nikakvo inhibitorno dejstvo.

Ekstrakt TrVE pokazuje značajno inhibitorno djelovanje pri koncentraciji od 30 mg/mL, sa porastom prečnika nakon 5 dana od 10.75 mm (IM od 54.3%). Blagi porast se primjećuje tek 4

dana mjerjenja. Niže koncentracije, 15 i 7.5 mg/mL pokazuju konstantan rast prečnika (25 mm), i veoma slabo djelovanje na izabranu pljesan.



*K-kontrola, rast pljesni bez dodanih ekstrakata

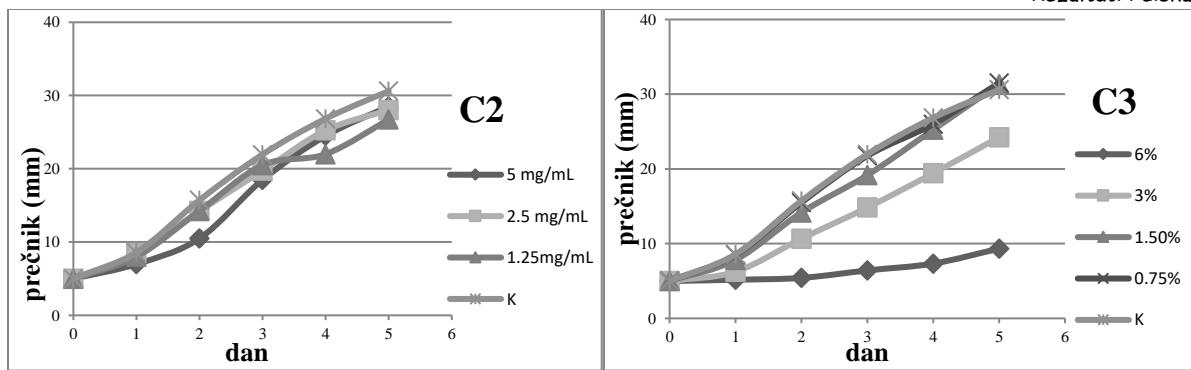
Grafik 4.4. Antifungalno dejstvo ekstrakata crvene trešnje na pljesan *Penicillium expansum*

Kod ekstrakata crevene trešnje, TrEV i TrVV, ponovo se može primjetiti da sa porastom koncentracije raste i prečnik, te i ovi ekstrakti čine pogodnu sredinu za razvoj pljesni *Penicillium expansum* (31.50-33.50 mm i 31.5-39.00 mm, pojedinačno).

Rezultati koje su dali Hanbali i sar. (2012) u svom radu potvrđuju mjerljivi uticaj ekstrakata *P. avium* na *C. albicans*, što je u saglasnosti sa ovim istaživanjem.

Na Grafiku 4.5. prikazano je djelovanje različitih koncentracija rastvora etanola i vitamina C na *Penicillium expansum*.

Ispitivanja različitih koncentracija vitamina C nisu pokazale nikakvu aktivnost na *Penicillium expansum*, što je bilo i očekivano, pošto se vitamin C uglavnom koristi kao antioksidativno a ne antimikrobičko i antifungalno sredstvo. Uz konstantan rast tokom cijelog perioda mjerjenja, prečnici su se kretali od 26.75-28.50 mm.



Grafik 4.5. Antifungalno dejstvo vitamina C i etanola na plijesan *Penicillium expansum*

Iz dijagrama se vidi da etanol u koncentraciji 6% ima značajno inhibitorno djelovanje na plijesan, rast prečnika je znatno usporen, i 5-og dana mjerena iznosio je 9.33 mm (IM 69.51%). Rasvor etanola u koncentraciji 3% djeluje u manjoj mjeri uz konstantan rast prečnika tokom perioda mjerena (24.25 mm), sa IM od 20.79%. Ostale ispitivane koncentracije, 1.5 i 0.75%, nisu pokazale nikakvu aktivnost na *Penicillium expansum*.

Posmatrajući trend rasta ekstrakata rastvorenih u etanolu (EE i VE) i etanola u različitim koncentracijama, vidi se da je u velikoj mjeri sadržaj etanola zaslužan za inhibitorno djelovanje, ali značajan udio ima i količina rastvorenog ekstrakta, što se više primjećuje kod koncentracija od 15 mg/mL.

U Tabeli 4.8. prikazan je uticaj EE rastvora ekstrakata na promjenu prečnika rasta plijesni *P. expansum* nakon 5 dana mjerena (izražen u mm).

Iz prikazanih rezultata se vidi prečnik rasta plijesni *P. expansum* za testirane ekstrakte različitih koncentracija i kontrolnog uzorka. Svi testirani rastvori ekstrakata u koncentracijama 30 mg/mL i 15 mg/mL, bez obzira na biljni vrstu od koje su dobijeni, su pokazali inhibitorno dejstvo na testiranu plijesan, dok koncentracije od 3.75 mg/mL i 7.5 mg/mL nisu pokazale djelovanje.

Tabela 4.8. Uticaj koncentracije etanolnih rastvora ekstrakata na prečnik rasta plijesni *Penicillium expansum* (u mm)

Δ 2r	30mg/mL	15mg/mL	7.5mg/mL	3.75mg/mL
TEE	6.50 ^b	16.16 ^{bc}	29.50 ^b	28.00 ^b
DDE	6.33 ^b	14.83 ^b	26.00 ^a	22.50 ^c
AEE	7.33 ^b	17.33 ^{bc}	25.16 ^a	-
TrEE	6.25 ^b	22.25 ^{ac}	26.75 ^{ab}	-
K	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Najjače dejstvo pokazao je rastvor trešnje u koncentraciji od 30 mg/mL (izmjerena razlika prečnika rasta od 6.25 mm), dok je najslabije dejstvo pokazao rastvor trnjine u koncentraciji od 7.5 mg/mL (29.50 mm).

Posmatrajući ekstrakte u koncentracijama od 30 mg/mL, može se primjetiti da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) u odnosu na kontrolni uzorak, ali između njih pojedinačno nema statistički značajne razlike ($p>0.05$). Najmanji porast prečnika imaju najkoncentrovaniji ispitivani rastvori (30 mg/mL), sa smanjenjem koncentracije dolazi do povećanja prečnika.

U *Tabeli 4.9.* prikazan je uticaj vodenih ekstrakata rastvorenih u etanolu (VE) na promjenu prečnika rasta pljesni *P. expansum* nakon 5 dana mjerena (izražen u mm).

Dobijeni rezultati ukazuju da testirani rastvori ekstrakata VE u zavisnosti od koncentracije pokazuju antifungalno djelovanje i utiču na prečnik rasta pljesni *P. expansum*. Testirani rastvori ekstrakata u koncentracijama 30 mg/mL pokazali su značajno inhibitorno dejstvo na testiranu pljesan. Rastvori u koncentraciji od 15 mg/mL imaju slabiji uticaj na inhibiciju pljesni, a najniže koncentracije ne pokazuju djelovanje prema pljesni *P. expansum*. Najjače dejstvo pokazao je rastvor drenjine u koncentraciji od 30 mg/mL (izmjerena razlika prečnika rasta od 5.66 mm), a najslabije dejstvo imali su rastvor trnjine i drenjine u nižim koncentracijama (26.50 mm).

Posmatrajući rastvore VE u koncentraciji 30 mg/mL, vidi se da najjače djelovanje, odnosno najmanji porast prečnika, imaju drenjina i aronija (5.66 i 5.83 mm, pojedinačno). Takođe, može se primjetiti da između njih pojedinačno nema statistički značajne razlike ($p>0.05$), dok statistički značajna razlika ($p<0.05$) postoji u odnosu na kontrolni uzorak.

Rastvori u koncentraciji od 15 mg/mL pokazuju statistički značajnu razliku i međusobno i u odnosu na kontrolu ($p<0.05$).

Tabela 4.9. Uticaj koncentracije vodenih ekstrakata rastvorenih u etanolu na prečnik rasta pljesni *Penicillium expansum* (u mm)

$\Delta 2r$	30mg/mL	15mg/mL	7.5mg/mL	3.75mg/mL
TVE	12.16 ^b	22.5 ^b	26.50 ^a	20.00 ^b
DVE	5.66 ^b	19.5 ^c	26.50 ^a	26.50 ^a
AVE	5.83 ^b	16.00 ^d	25.50 ^a	-
TrVE	9.00 ^b	19.75 ^c	20.00 ^b	-
K	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Rastvori ekstrakata u koncentracijama od 3.75 mg/mL i 7.5 mg/mL nisu pokazale djelovanje. Statistički značajnije se razlikuju u svojim grupama TrVE 7.5 mg/mL, i TVE 3.75 mg/mL.

Iz prikazanih rezultata, može se vidjeti da etanolni rastvori ekstrakata u većim koncentracijama imaju značajno dejstvo, što potvrđuju i Othman i sar. (2019). Krzysciak i sar. (2011) navode da metanolni i etanolni ekstrakti drenjine pored značajnog antibakterijskog djelovanja, pokazuju dejstvo i na testirane gljivice (*Candida albicans* i *Aspergillus fumigata*). Ispitivanjem etanolnih ekstrakata raznih biljnih vrsta, Mostafa i sar. (2018) potvrđuju njihovo dejstvo na mikroorganizme, što potvrđuje rezultate ovog istraživanja.

U *Tabeli 4.10.* prikazan je uticaj rastvora etanolnih ekstrakata rastvorenih u vodi (EV) na promjenu prečnika rasta pljesni *P. expansum* nakon 5 dana mjerena (izražen u mm).

Prikazani podaci pokazuju da rastvori ekstrakata bez obzira na koncentraciju, nemaju nikakvog uticaja na inhibiciju testirane pljesni. Primjetno je da su sve vrijednosti više od kontrolnog uzorka (osim aronije 7.5 i 15 mg/mL, 25.67 i 25.50 mm, pojedinačno), pa se može zaključiti da ovi rastvori pogoduju rastu i razvoju pljesni, naročito u višim koncentracijama. Promjene prečnika kod koncentracija 30 mg/mL su se kretale od 27.00-31.50 mm. Smanjenjem koncentracije i promjena prečnika se neznatno smanjuje, pa je kod koncentracije od 15 mg/mL ta vrijednost iznosila 25.50-28.83 mm, a kod 7.5 mg/mL iznosila je 25.67-28.50 mm.

Tabela 4.10. Uticaj koncentracije etanolnih ekstrakata rastvorenih u vodi (EV) na prečnik rasta pljesni *Penicillium expansum* (u mm)

Δ 2r	30mg/mL	15mg/mL	7.5mg/mL
TEV	31.50 ^a	28.50 ^a	28.50 ^a
DEV	27.00 ^a	28.83 ^a	26.50 ^a
AEV	28.00 ^a	25.50 ^a	25.67 ^a
TrEV	28.25 ^a	28.50 ^a	26.50 ^a
K	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a

* Vrijednosti parametara a, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Primjetno je da među ispitivanim ekstraktima, bez obzira na koncentraciju, nema statistički značajne razlike ($p>0.05$).

Djelovanje rasvora vodenih ekstrakata rastvorenih u vodi (VV) na promjenu prečnika rasta pljesni *P. expansum* nakon 5 dana mjerena prikazan je u *Tabeli 4.11.*

Kao što se može vidjeti iz prikazanih rezultata, VV rastvori ekstrakata ne pokazuju nikakvo inhibitorno djelovanje na *P. expansum*. I pored prilično visokih koncentracija korištenih u

ispitivanju, svi rastvori su pokazali da više djeluju na rast i razvoj plijesni, nego kao inhibitori. Smanjenjem koncentracije ovaj efekat se malo smanjuje ali su vrijednosti promjene prečnika i dalje više od kontrole (izuzetak su trešnja 30 mg/mL sa 25.50 mm, i aronija 15 mg/mL sa 25.00 mm).

Posmatrajući koncentraciju 120 mg/mL, promjene prečnika su se kretale od 32.50 mm kod aronije, do 34.16 kod trnjine. U ovoj grupi primjeti se da su svi rastvori imaju statistički više vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak.

Kod koncentracije od 60 mg/mL, vrijednosti su malo niže, i kretale su se od 29.83 mm kod aronije, do 34.50 mm kod trnjine. Primjeti se statistički značajna razlika između uzoraka.

Tabela 4.11. Uticaj koncentracije vodenih ekstrakata rastvorenih u vodi (VV) na prečnik rasta plijesni *Penicillium expansum* (u mm)

$\Delta 2r$	120mg/mL	60mg/mL	30mg/mL	15mg/mL	7.5mg/mL
TVV	34.16 ^b	34.50 ^b	32.75 ^b	28.75 ^a	26.25 ^a
DVV	33.75 ^b	31.00 ^{ab}	27.50 ^a	25.00 ^a	27.00 ^a
AVV	32.50 ^b	29.83 ^{ab}	29.50 ^{ab}	-	-
TrVV	34.00 ^b	32.00 ^{ab}	25.50 ^a	-	-
K	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a	26.04 ^a

* Vrijednosti parametara a-b, unutar iste kolone su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Kod rastvora koncentracije 30 mg/mL vrijednosti su se kretale od 25.50 mm (crvena trešnja) do 32.75 mm (trnjina). Postoji statistički značajna razlika između ispitivanih ekstrakata.

Što se tiče najnižih koncentracija, nema statistički značajne razlike ($p>0.05$).

I pored potvrđene antibakterijske aktivnosti, vodeni rastvori ekstrakata nisu pokazali antifungalno dejstvo. Sa dobijenim rezultatima slažu se i Kim i sar. (2018), a Othman i sar. (2019) tvrde da vodeni ekstrakti pokazuju veoma malo ili uopšte ne pokazuju nikakvo djelovanje.

Uticaj različitih koncentracija etanola i vitamina C na promjenu prečnika rasta plijesni *P. expansum* nakon 5 dana mjerena, prikazan je u Tabeli 4.12.

Ispitivanjem različitih koncentracija etanola kao inhibitora rasta plijesni *P. expansum*, pokazalo se da koncentracija od 6% ima najbolji uticaj i najmanju promjenu rasta prečnika od 4.33 mm (IM od 69.51%). Smanjenjem koncentracije dolazi do rasta ovih vrijednosti, tako da je za 3% etanol ova vrijednost 19.25 mm, a niže koncentracije (1.5 i 0.75%) imaju vrijednosti niže od kontrole (K).

Tabela 4.12. Uticaj koncentracije rastvora etanola i vitamina C na prečnik rasta pljesni *Penicillium expansum* (u mm)

vitamin C	5 mg/mL	2.5 mg/mL	1.25mg/mL
	23.50	23.00	21.75
Et	6%	3%	1.50%
	4.33	19.25	26.33
kontrola	26.04		26.50

Etanol u koncentraciji od 50-90% ima veoma široku upotrebu kako za dezinfekciju tako i kao sredstvo protiv bakterija, gljivica i virusa. U prehrambenoj industriji pokazalo se da etanol inhibira rast pljesni koje izazivaju kvarenje pekarskih proizvoda (rodovi *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cladosporium*) (Rogawansamy i sar., 2015).

U zavisnosti od vrste pljesni, Dao i Dantigny (2011) smatraju da koncentracije do 12% etanola imaju inhibitorno dejstvo. Za pljesni *Penicillium* koncentracije do 4% nemaju nikakav uticaj, dok je koncentracija od 8% imala inhibitorni efekat. Isti autor smatra da je za *Penicillium expansum* inhibitorna koncentracija etanola 5-5.5%, što se slaže sa rezultatima ovog istaživanja. Smatra se da djelovanje etanola na pljesni u velikoj mjeri zavisi od stepena hidratacije spora (Dao i Dantigny, 2011).

Kad je u pitanju rastvor vitamina C, nema značajnijih promjena bez obzira na korištenu koncentraciju. Vrijednosti su malo niže od kontrolnog uzorka i kretale su se od 21.75-23.50 mm, što je zanemarivo u pogledu inhibitorne aktivnosti. Pošto je vitamin C korišten kao antioksidativno sredstvo, ove vrijednosti su i očekivane.

U velikoj mjeri se antimikrobnog djelovanje ispitivanih ekstrakata povezuje sa količinom i strukturom ekstrahovanih spojeva. Antimikrobnog djelovanje biljnih ekstrakta često se povezuje sa polifenolnim jedinjenjima koja imaju i antioksidativno djelovanje. Mnogi autori smataju da su upravo fenolna jedinjenja, antocijani, iridiodi, tanini i mnoga druga jedinjenja zaslužni za dobre antimikrobne osobine (Radulović i sar., 2013; Veličković i sar., 2014; Milenković-Andđelković i sar., 2015; Denev i sar., 2019; Pozzo i sar., 2019).

4.2. ANALIZA TRETIRANIH PRIRODNIH OMOTAČA

U ovom poglavlju su predstavljeni rezultati antioksidativnog i antimikrobnog ispitivanja prirodnih omotača tretiranih ekstraktima trnjine, aronije, drenjine i crvene trešnje. U ispitivanjima antioksidativnih i antimikrobnih osobina korišteni su prirodni omotači tretirani rastvorima ekstrakata određenih koncentracija. Kao kontrolni uzorci korišteni su omotači tretirani vodom (C1), vitaminom C u koncentraciji od 5 mg/mL (C2) kao antioksidativnim sredstvom i 6% etanolom (C3) kao antimikrobnim sredstvom.

Rezultati istraživanja su statistički analizirani kako bi se što bolje uporedile osobine ispitivanih tretiranih prirodnih omotača i izabrali najpogodniji za dalju primjenu.

4.2.1. Osobine rastvora korištenih za tretiranje prirodnih omotača

Na osnovu rezultata dobijenih analizom ekstrakata, izabrane su koncentracije koje su korištene za tretiranje omotača.

Tabela 4.13. Koncentracije i pH vrijednost ispitivanih rastvora

	koncentracija	pH
C1	-	5.63 ^a ±0.05
C2	5mg/mL	2.84 ^c ±0.07
C3	6%	4.46 ^b ±0.58
TEE	22.5 mg/mL	3.67 ^{defghA} ±0.05
TEV	45 mg/mL	3.55 ^{defgB} ±0.00
TVV	90 mg/mL	3.69 ^{defghA} ±0.02
TVE	22.5 mg/mL	3.68 ^{defghA} ±0.03
DEE	22.5 mg/mL	3.42 ^{defA} ±0.05
DEV	45 mg/mL	3.23 ^{cdb} ±0.02
DVV	45 mg/mL	3.39 ^{deA} ±0.03
DVE	22.5 mg/mL	3.44 ^{defA} ±0.06
AEE	45 mg/mL	3.92 ^{fghA} ±0.02
AEV	45 mg/mL	3.85 ^{efghA} ±0.04
AVV	120 mg/mL	3.91 ^{fghA} ±0.01
AVE	45 mg/mL	3.85 ^{efghA} ±0.01
Tree	30 mg/mL	4.16 ^{bhC} ±0.00
TrEV	30 mg/mL	4.04 ^{bghB} ±0.01
TrVV	120 mg/mL	3.98 ^{bghA} ±0.01
TrVE	30 mg/mL	4.18 ^{bhC} ±0.01

* Vrijednosti parametara a-h, su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu, vrijednosti parametara A-B su statističke značajnosti u okviru jedne biljne vrste

U *Tabeli 4.13.* prikazane su koncentracije koje su korištene za tretiranje omotača a koji su potom korišteni za ispitivanje antibakterijske i antifungalne aktivnosti, kao i pH vrijednost tih rastvora. Iz prikazanih podataka može se vidjeti da su svi rastvori kiseli, a vrijednosti su se kretale od 2.84 za C2, do 5.63 za C1. Što se tiče rastvora ekstrakata najniže vrijednosti imali su rastvori drenjine (3.23-3.44), zatim slijedi trnjina (3.55-3.69), aronija (3.85-3.92) i na kraju crvena trešnja (3.98-4.18). Takođe može da se primjetiti značajna razlika kako među rastvorima, tako i unutar pojedinih biljnih vrsta ($p<0.05$).

Poredeći svježu, suvu i smrznutu aroniju, Liepiņa i sar. (2013) za vodene ekstrakte navode niže vrijednosti (3.2-3.8), dok se rezultati za etanolne ekstrakte slažu sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Petkova i Ognyanov (2018) u svom istraživanju pH vrijednosti drenjine, navode vrijednosti od 3.19-3.46, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

Liepiņa i sar. (2013) smatraju da nema povezanosti između pH vrijednosti i antibakterijskog djelovanja, te da pH nije odlučujući faktor za antimikrobnu aktivnost ekstrakata. U literaturi nema dostupnih podataka za trnjinu i divlju trešnju.

4.2.2. Antioksidativne osobine tretiranih prirodnih omotača

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) ispitivanih prirodnih omotača tretiranih ekstraktima predstavljeni su u *Tabeli 4.14.* Na osnovu prikazanih rezultata, može se vidjeti da se sadržaj ukupnih fenola kretao od 0.304 mg GAE/g (TrEV) do 6.861 mg GAE/g (AEE).

Kod tretmana omotača sa rastvorima ekstrakata trnjine, TEE je imao najviši sadržaj ukupnih fenola (3.074 mg GAE/g), a najniži TVE (1.019 mg GAE/g). TVV i TEV imali su približno jednake vrijednosti, oko 2 mg GAE/g, iako su korištene različite koncentracije za tretiranje omotača (90 i 45 mg/mL, pojedinačno).

Što se tiče omotača tretiranih rastvorima ekstrakata drenjine, DEV je imao najviši TPC od 2.689 mg GAE/g uz korištenu koncentraciju od 45 mg/mL. Za istu korištenu koncentraciju, DVV je imao TPC od 1.637 mg GAE/mL. Za DVE i DEE su korištene koncentracije od 22.5 mg/mL, i vrijednosti TPC su iznosile 1.659 i 1.085 mg GAE/g, pojedinačno.

Najviša vrijednost TPC nađena je u omotačima tretiranim ekstraktima aronije, što je i bilo očekivano s obzirom da je i suvi ekstrakt aronije imao znatno više vrijednosti TPC od drugih biljnih vrsta. Iako su korištene iste koncentracije (45 mg/mL), najvišu vrijednost pokazao je

omotač tretiran AEV (7.75 mg GAE/g), malo nižu vrijednost je imao AEE (6.86 mg GAE/g), dok je najnižu koncentraciju TPC imao AVE (5.15 mg GAE/g). Omotači tretirani AVV, u koncentraciji od 120 mg/mL, imali su vrijednost TPC od 5.6 mg GAE/g. Posmatrajući ove vrijednosti vidi se da je TPC za omotače tretirane ekstraktima aronije veoma sličan vrijednostima za C2, koji je korišten kao kontrola antioksidativnog sredstva.

Tabela 4.14. Sadržaj ukupnih fenola (TPC) testiranih prirodnih omotača tretiranih ispitivanim ekstraktima u mg GAE/g

TPC (mg GAE/g)							
TEE	3.074 ^f ±0.319	DEE	1.085 ^{abde} ±0.197	AEE	6.861 ^h ±0.407	TrEE	0.335 ^e ±0.084
TEV	1.936 ^{abcd} ±0.058	DEV	2.689 ^{cf} ±0.044	AEV	7.746 ^h ±0.096	TrEV	1.882 ^{abcd} ±0.181
TVV	2.067 ^{abc} ±0.051	DVV	1.637 ^{abd} ±0.007	AVV	5.600 ^g ±0.144	TrVV	2.346 ^{bef} ±0.131
TVE	1.019 ^{de} ±0.210	DVE	1.659 ^{abd} ±0.119	AVE	5.147 ^g ±0.524	TrVE	0.304 ^e ±0.051
C2	5.354 ^g ±0.692						

* Vrijednosti parametara a-h, su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Kod omotača tretiranih rastvorima crvene trešnje u koncentraciji od 30 mg/mL, najniže vrijednosti TPC izmjerene su kod TrVE i TrEE (0.304 i 0.335 mg GAE/g, pojedinačno), a nešto višu vrijednost pokazao je TrEV (1.882 mg GAE/g). Najvišu vrijednost imao je TrVV (2.346 mg GAE/g) uz korištenu najveću koncentraciju od 120 mg/mL.

Posmatrajući prikazane rezultate vidi se da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) između ispitivanih biljnih ekstrakata.

Iako su ispitivanja o pozitivnom djelovanju prirodnih polifenolna dobijenih iz raznog biljnog materijala prilično brojna, veoma je malo informacija o efektima jestivih filmova koji sadrže prirodne biljne ekstrakte (Mohd Azman i sar., 2016). Aktivne materije biološkog porijekla imaju snažno antioksidativno i antimikrobno djelovanje, kao i nisku toksičnost i smatraju se efikasnim sredstvom za aktivno pakovanje koje može da se koristiti za čuvanje i konzervisanje hrane (Dobrucka i Cierpiszewski, 2014).

Nazmi i Sarbon (2019) u svom radu navode da se TPC u zaštitnim premazima ili kompozitima (filmovima) povezuje sa sadržajem fenola u korištenim ekstraktima i na primjeru biljnog ekstrakta *C. asiatica* pokazali su jaku vezu između fenolnog spoja i antioksidativne aktivnosti.

Isti autor smatra da se količina ukupnih fenola u filmu povećava sa povećanjem koncentracije ekstrakta, a s tim se slažu i Shojaee-Aliabadi i sar. (2013).

U *Tabeli 4.15.* prikazani su izmjerene vrijednosti DPPH (mg GAE/g) prirodnih omotača tretiranih ispitivanim ekstraktima i vitaminom C. Iz prikazanih rezultata vidi se da se vrijednosti za DPPH kreću od 0.028 mg GAE/g (TVE), do 1.259 mg GAE/g (AEV) i 1.262 mg GAE/g (C2). Kod tretmana omotača sa rastvorima ekstrakata trnjine, može se primijetiti da su sve vrijednosti dosta niske. Rastvor TVE je imao najnižu vrijednost od 0.028 mg GAE/g, dok je rastvor TEE za istu korištenu koncentraciju imao vrijednost DPPH od 0.129 mg GAE/g, što je vjerovatno rezultat upotrebe različitih rastvora za ekstrakciju, odnosno različitih količina ekstrahovanih materija. Rastvor TEV imao je vrijednost DPPH od 0.160 mg GAE/g za nešto višu korištenu koncentraciju, dok je rastvor TVV, iako je korišten u visokoj koncentraciji, imao vrijednosti od 0.085 mg GAE/g.

Omotači tretirani sa rastvorima ekstrakata drenjine imali su nešto više vrijednosti od rastvora ekstrakata trnjine. Vrijednosti za rastvore DEE, DVV i DVE bile su veoma bliske i kretale su se u rasponu od 0.234 do 0.247 mg GAE/g. Malo višu vrijednost pokazao je rastvor DEV (0.457 mg GAE/g) uz nešto višu korištenu koncentraciju.

Tabela 4.15. DPPH testiranih prirodnih omotača tretiranih ispitivanim ekstraktima u mg GAE/g

DPPH mgGAE/g						
TEE 0.129 ^{bc} ±0.014	DEE 0.234 ^{df} ±0.040	AEE 0.944 ^{ge} ±0.020	TrEE 0.168 ^{cdf} ±0.002			
TEV 0.160 ^{bc} ±0.021	DEV 0.457 ^e ±0.030	AEV 1.259 ^h ±0.016	TrEV 0.134 ^{bc} ±0.020			
TVV 0.085 ^a ±0.006	DVV 0.242 ^d ±0.004	AVV 0.897 ^g ±0.036	TrVV 0.148 ^{bc} ±0.016			
TVE 0.028 ^a ±0.005	DVE 0.247 ^d ±0.007	AVE 0.983 ^e ±0.043	TrVE 0.035 ^a ±0.002			
C2 1.262 ^h ±0.000						

* Vrijednosti parametara a-h, su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Najviša vrijednost za DPPH, kao i kod ukupnih fenola, nađena je u omotačima tretiranim rastvorima ekstrakata aronije, što je i bilo očekivano s obzirom na osobine suvog ekstrakta aronije, kao i na korištene koncentracije za tretman. Uz korištenje iste koncentracije (45 mg/mL), najvišu vrijednost DPPH pokazao je omotač tretiran AEV (1.259 mg GAE/g), dok su nešto nižu

vrijednost je imali AEE i AVE (0.944 i 0.983 mg GAE/g, pojedinačno). I pored visoke koncentracije korištene u tretmanu, AVV je pokazao najnižu vrijednost među rastvorima aronije, koja je iznosila 0.897 mg GAE/g.

Za omotače tretirane rastvorima crvene trešnje u koncentraciji od 30 mg/mL, najniža vrijednost DPPH je izmjerena kod TrVE (0.035 mg GAE/g), višu vrijednost imali su TrEV i TrEE (0.134 i 0.168 mg GAE/g, pojedinačno). Rastvor TrVV i pored visoke koncentracije korištene za tretman (120 mg/mL) kao i visokog sadržaja ukupnih fenola imao je vrijednost DPPH od 0.148 mg GAE/g.

Posmatrajući prikazane rezultate za DPPH može se primjetiti da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) između ispitivanih rastvora biljnih ekstrakata.

U svom radu sa filmovima na bazi želatina i dodatkom ekstrakta *C.asiatica*, Nazmi i Sarbon (2020) navode jaku DPPH aktivnost, i smatrajući da su za to zaslužni fenolni spojevi uključujući flavonoide, fenolnu kiselinu i tanine. Pires i sar. (2013) su analizom raznih eteričnih ulja dodanih u filmove došli do podatka da dolazi do povećanja DPPH vrijednosti, naročito u slučaju filmova s dodatkom ulja korijandera i citronele.

Peighambaroust i sar. (2021) navode da dodaci antioksidanasa u filmove značajno utiču na povećanje njihove DPPH vrijednosti, iako smatraju da su antioksidativna aktivnost i termička stabilnost antioksidansa različita, što potvrđenuju analizom različitih kompozitnih filmova sa dodatkom sintetičkih antioksidanasa (BHT, BHA, sorbinska kiselina).

Uticaj povećanja koncentracije dodatih antioksidanasa (esencijalno ulje) na povećanje DPPH vrijednosti potvrđuju mnogi autori (Shojaee-Aliabadi i sar., 2013; Gómez-Estaca i sar., 2014; Salarbashi i sar., 2014).

Teixeira i sar. (2014) smatraju da do povećanja DPPH aktivnosti u filmovima od proteina ribe dolazi ugradnjom eteričnih ulja. Ovi autori takođe navode i razlike u antioksidativnom djelovanju filmova s različitim eteričnim uljima, za koje smatra da su posljedica interakcija između komponenti filmova i eteričnih ulja koja više nije mogla biti dostupna za interakciju u reakcijama antioksidativnog djelovanja, ili gubitka isparljivih jedinjenja eteričnih ulja tokom procesa sušenja filmova. Poredeći koncentraciju antioksidansa (kvercetin, katehin) u filmu (etilen vinil alkohol) i koncentraciju koja je inicialno dodata filmu uočavaju su značajne razlike, a smatra se da je jedan od glavnih razloga gubici do kojih dolazi u toku proces proizvodnje (Gómez-Estaca i sar., 2014).

Vrijednosti ABTS (mg GAE/g) prirodnih omotača tretiranih ekstraktima i vitaminom C prikazani su u *Tabeli 4.16*. Kao što se vidi iz prikazanih rezultata vrijednosti za ABTS su se kretale od 0.054 mg GAE/g (TVE) do 0.796 mg GAE/g (AEE), odnosno 0.888 mg GAE/g (C2).

Što se tiče omotača tretiranih rastvorima ekstrakata trnjine, može se primjetiti da su sve vrijednosti veoma niske. Rastvor TVE je imao najnižu vrijednost od 0.054 mg GAE/g. Omotač sa TVV imao je nešto višu vrijednost ABTS, 0.106 mg GAE/g, dok su TEV i TEE imali vrijednosti od 0.133 i 0.134 mg GAE/g, pojedinačno.

Kod omotača tretiranih rastvorima ekstrakata drenjine vrijednosti su nešto više od rastvora ekstrakata trnjine. Najnižu ABTS vrijednost imao je DEE, 0.135 mg GAE/g. Vrijednosti za rastvore DVE i DVV su veoma slične, 0.162 i 0.167 mg GAE/g, pojedinačno. Najvišu vrijednost pokazao je rastvor DEV (0.220 mg GAE/g).

Omotači tretirani sa rastvorima aronije pokazali su najveće vrijednosti za ABTS. AVE je kod rastvora aronije pokazao najnižu vrijednost ABTS, koja je iznosila 0.431 mg GAE/g. Nešto višu vrijednost su imali AVV i AEV (0.450 i 0.5163 mg GAE/g pojedinačno), dok je najvišu vrijednost za ABTS pokazao je omotač tretiran AEE (0.796 mg GAE/g), a ova vrijednost je najpribližnija vrijednosti za C2.

Tabela 4.16. ABTS testiranih prirodnih omotača tretiranih ispitivanim ekstraktima u mg GAE/g

	ABTS mgGAE/g						
TEE	0.134 ^{abcd} ±0.015	DEE	0.135 ^{abcd} ±0.023	AEE	0.796 ^f ±0.033	TrEE	0.175 ^{bcd} ±0.031
TEV	0.133 ^{abcd} ±0.010	DEV	0.220 ^d ±0.008	AEV	0.516 ^e ±0.078	TrEV	0.130 ^{abcd} ±0.026
TVV	0.106 ^{abc} ±0.018	DVV	0.167 ^{bcd} ±0.022	AVV	0.450 ^e ±0.052	TrVV	0.182 ^{cd} ±0.042
TVE	0.054 ^a ±0.007	DVE	0.162 ^{abcd} ±0.018	AVE	0.431 ^e ±0.015	TrVE	0.067 ^{ab} ±0.001
C2	0.888 ^f ±0.008						

* Vrijednosti parametara a-f, su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Kod omotača tretiranih rastvorima crvene trešnje najniža vrijednost za ABTS je izmjerena kod TrVE, 0.067 mg GAE/g. Omotač tretiran TrEV imao je vrijednost od 0.130 mg GAE/g. Omotači TrEE i TrVV imali su približne vrijednosti za ABTS, 0.175 i 0.182 mg GAE/g, pojedinačno.

Na osnovu prikazanih rezultata, može se vidjeti da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) među uzorcima.

Mnogi autori se slažu da dodatak antioksidanasa (razna esencijalna ulja ili ekstrakti) povećava ABTS aktivnost filmova (hitozan, želatin, riblji proteini) na koji su primjenjeni što se uglavnom dovodi u vezu sa prisustvom fenola, flavonoida i jedinjenja koja sadrže sumpor (Tongnuanchan i sar., 2012; Jahani i sar., 2014).

U *Tabeli 4.17.* dat je prikaz rezultata za FRAP za analizirane prirodne omotače tretirane ispitivanim ekstraktima i vitaminom C. Iz rezultata se vidi da se vrijednosti za FRAP kreću od $2.414 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, koja je očitana za TVE, do $38.131 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ za AEE. Vrijednost za kontrolni uzorak C2 je $27.471 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$.

Posmatrajući biljne vrste, može se primjetiti da su omotači tretirani trnjinom imali veoma niske vrijednosti za FRAP. Najnižu vrijednost je imao TVE, dok se kod ostalih omotača tretiranih trnjinom ove vrijednosti kreću od $6.144-7.239 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (TEV, TVV, TEE).

Kod omotača tretiranih rastvorima ekstrakata drenjine vrijednosti su malo više nego kod trnjine. Najnižu izmjerenu vrijednost za FRAP imao je uzorak DEE, $4.876 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, zatim DVE sa $6.652 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ i DVV sa $7.971 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, dok je najvišu vrijednost imao DEV, $12.624 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$.

Tabela 4.17. FRAP testiranih prirodnih omotača tretiranih ispitivanim ekstraktima u $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$

FRAP $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$							
TEE	7.239^{bcd} ± 0.456	DEE	4.876^{abc} ± 0.532	AEE	38.131^{g} ± 2.514	TrEE	10.081^{de} ± 1.647
TEV	6.144^{abc} ± 0.012	DEV	12.624^{e} ± 0.546	AEV	37.226^{g} ± 0.810	TrEV	7.886^{cd} ± 0.941
TVV	6.149^{abc} ± 0.588	DVV	7.971^{cd} ± 0.101	AVV	28.609^{f} ± 0.329	TrVV	9.982^{de} ± 1.293
TVE	2.414^{a} ± 0.445	DVE	6.652^{bcd} ± 0.432	AVE	25.318^{f} ± 1.030	TrVE	3.883^{ab} ± 1.035
C2	27.471^{f} ± 1.015						

* Vrijednosti parametara a-h, su statističke značajnosti ($p<0.05$) prema Tukey testu

Aronija je, očekivano, pokazala najviše vrijednosti i za FRAP. Među omotačima tretiranim aronijom, najnižu FRAP vrijednost imao je AVE, $25.318 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. AVV je imao nešto višu vrijednost, $28.609 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Omotači AEV i AEE imali su veoma visoke vrijednosti, 37.226 i $38.131 \text{ } \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, pojedinačno.

Kod omotača tretiranih rastvorima crvene trešnje vrijednost za FRAP bile su niske. Najniža vrijednost izmjerena je kod TrVE, $3.883 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Omotač tretiran TrEV imao je vrijednost od $7.886 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, dok su omotači TrEE i TrVV imali približne vrijednosti za FRAP, 9.982 i $10.081 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, pojedinačno.

Iz prikazanih rezultata, može da se vidi da postoji statistički značajna razlika ($p<0.05$) među uzorcima.

Kao što je već pomenuto, a i analiza FRAP vrijednosti potvrđuje da dodatak antioksidanasa pojačava aktivnost filmova i smatra se da je količina dodanih antioksidanasa proporcionalna stepenu antioksidativne aktivnosti jestivih filmova (Nazmi i sar., 2019).

Eca i sar. (2014) navode razne primjere značajnog povećanja antioksidativne aktivnosti filmova (želatin od riblje kože, hitozan i sl.) sa dodatkom antioksidanasa (razna eterična ulja) izraženih preko DPPH i FRAP vrijednosti.

U *Tabeli 4.18.* dat je prikaz Pearson-ovog koeficijenta korelacije za analizirane parametre. Kao što može da se vidi iz podataka, postoji veoma jaka korelacija sa stepenom značajnosti 0.01 nivoa između mjerenih parametara.

Tabela 4.18. Korelacija između antioksidativnih testova

		TPC	DPPH	ABTS	FRAP
TPC	Pearson Correlation	1	.924**	.855**	.947**
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.000
	N	51	51	51	51
DPPH	Pearson Correlation	.924**	1	.906**	.938**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.000
	N	51	51	51	51
ABTS	Pearson Correlation	.855**	.906**	1	.898**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		.000
	N	51	51	51	51
FRAP	Pearson Correlation	.947**	.938**	.898**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	
	N	51	51	51	51

**Korelacija je značajna na nivou od 0.01 (2-tailed).

Iako su sve vrijednosti bile prilično visoke, najbolju korelaciju su pokazali TPC i FRAP vrijednosti (0.947). Nešto niža korelacija bila je između DPPH i FRAP (0.938) i DPPH i TPC (0.924). Najnižu vrijednost korelacije imao je ABTS sa TPC (0.855), zatim sa FRAP (0.898) i DPPH (0.906).

Smatra se da je antioksidativna aktivnost ekstrakata uglavnom rezultat prisutva fenolnih spojeva i njihovog sinergističkog djelovanja. Određivanje antioksidativne aktivnosti pomaže u procjeni statusa antioksidativnog potencijala ispitivanog materijala, što je funkcija vrste i količine bioaktivnih spojeva koji su u tom materijalu prisutni (Eça i sar., 2014).

Ambalaža koja sadrži prirodne konzervanse i antioksidante nesumnjivo ima veliki potencijal. Razvoj antioksidativnih aktivnih sistema pakovanja je nova alternativna tehnologija pakovanja zasnovana na ugrađivanju antioksidativnih agenasa u pakovanje kao način poboljšanja stabilnosti prehrambenih proizvoda osetljivih na oksidaciju (Skurlys i sar., 2010; Dobrucka i Cierpiszewski, 2014; Gómez-Estaca i sar., 2014). Takvi prirodni antioksidansi prisutni su u začinima, flavonoidima, listovima i stabljikama nekih grmova i mogu biti ugrađeni u polimerne materijale koji se koriste kao aktivni materijali za pakovanje hrane (Nwakaudu i sar., 2015).

Antioksidansi se koriste za sprečavanje kvarenja hrane putem fizičkih ili hemijskih mehanizama. Glavni mehanizam djelovanja je smanjenje brzine prijenosa kisika, kao i mogućnost ugradnje antioksidativnih spojeva u jestivi film ili matricu premaza. Ugradnja prirodnih antioksidansa u filmove i jestive obloge može modifikovati njihovu strukturu, poboljšavajući njihovu funkcionalnost. Filmovi i premazi koji sadrže dodane antioksidante mogu pomoći u očuvanju ili čak poboljšanju senzornih svojstva hrane, ublažiti oksidaciju i uticati na produženje njihovog roka trajanja (Eça i sar., 2014; Gómez-Estaca i sar., 2014; Nwakaudu i sar., 2015)

Oslobađanje prirodnih antioksidansa iz pakovanja u hranu tokom komercijalizacije proizvoda je od velikog interesa za prehrambene tehnologe, jer ovaj proces može smanjiti oksidaciju lipida (Gómez-Estaca i sar., 2014).

Poslednjih godina radi se na razvoju pakovanja koja uklanjaju neugodan miris, kao i pakovanja sa antioksidansima i kiseoničkim „hvatačima“ impregniranim u pakovanje (najčešće vitamin E) (Velebit i Petrović 2012). Uvođenje jestivih filmova i premaza takođe može uticati na smanjenje oksidacije i kvarenja hrane (Gómez-Estaca i sar., 2014), a dodatak prirodnih antioksidansa (eterična ulja i biljni ekstrakti, askorbinska kiselina, kvercetin, α-tokoferol) u takve filmove još više poboljšava njihove antioksidativne osobine (Eça i sar., 2014; Peighambardoust i sar., 2021)

Prirodni antioksidativni aktivni polimerni filmovi pokazali su se efikasnim u usporavanju hidrolize lipida uklanjanjem slobodnih radikala i povećanjem oksidativne stabilnosti hrane bogate lipidima (Nwakaudu i sar., 2015).

Mesna industrija posebnu pažnju posvećuje aktivnom pakovanju kao novoj tehnologiji, bez potrebe za dodavanjem sintetičkih aditiva direktno u proizvode. Antioksidativno aktivno pakovanje predstavlja obećavajući budući pravac razvoja ambalaže za meso jer je dokazalo svoju djelotvornost u produženju roka trajanja svježeg mesa i proizvoda od mesa (Domingez, 2018).

4.2.3. Antimikrobna aktivnost tretiranih omotača

Prije testiranja antimikrobne aktivnosti, omotači su sterilisani UV lampom i tretirani rastvorima ekstrakata, određene koncentracije (*Tabela 4.13*). Kao kontrolni uzorci korišteni su destilovana voda (C1), vitamin C - kao kontrola antioksidativnih osobina (C2) i etanol - kao kontrole antimikrobne aktivnosti rastvarača (C3). Za određivanje antibakterijske aktivnosti tretiranih omotača odabrane su G(+) (*S. aureus* i *B. cereus*) i G(-) (*E. coli* i *S. enterica*) bakterije, dok je za antifungalnu aktivnost korištena plijesan *Penicillium expansum*. Za testiranje antimikrobne aktivnosti tretiranih omotača korištena je metoda difuzije u agaru (Prilog, *Slike C, D i E.*).

U *Tabeli 4.19.* prikazani su rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti omotača tretiranih ekstraktima trnjine na odabранe G(+) i G(-) bakterije i plijesan *P. expansum*. Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da ni jedan rastvor ekstrakta trnjine nije pokazao aktivnost na G(+) *S. aureus* i *B. cereus*. Što se tiče G(-) bakterija, TVV, TVE i TEE su pokazale kontaktну inhibiciju (K.I.) na *S. enterica*, dok je na *E. coli* djelovanje (kontaktna inhibicija) pokazao samo omotač tretiran TVV. Na plijesan *P. expansum* ni jedan omotač nije imao nikakvu aktivnost (n.a.). Iako su u svim omotačima korištene koncentracije više od izmjerениh MIC vrijednosti za pojedine ekstrakte, pretpostavka je da je omotač zadržao manju količinu od potrebne za djelovanje na izabrane sojeve.

Tabela 4.19. Antimikrobna aktivnost omotača tretiranih ekstraktima trnjine

	mg/mL	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. expansum</i>
TVV	90	n.a.	n.a.	K.I.	K.I.	n.a.
TEV	45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TVE	22.5	n.a.	n.a.	K.I.	n.a.	n.a.
TEE	22.5	n.a.	n.a.	K.I.	n.a.	n.a.

n.a.- nema aktivnosti, K.I. – kontaktana inhibicija

U *Tabeli 4.20.* prikazani su rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti omotača tretiranih ekstraktima drenjine na odabranе G(+) i G(-) bakterije i plijesan *P. expansum*. Prikazani rezultati pokazuju da je kontaktну inhibiciju na izabranoj bakteriji *S. aureus* imao samo omotač tretiran

DEV rastvorom ekstrakta, dok ostali omotači tretirani rastvorima drenjine nisu pokazali nikakvu aktivnost. Dejstvo na bakteriju *B. cereus* nije pokazao ni jedan omotač, jedino je primjećen prorjeđen rast kulture kod testiranja omotača tretiranog DEE rastvorom ekstrakta (*). Što se tiče djelovanja na bakteriju *S. enterica*, inhibiciju (I) su pokazali omotači tretirani rastvorima DVV i DVE, a kontaktnu inhibiciju omotači tretirani DEV i DEE rastvorima ekstrakta.

Tabela 4.20. Antimikrobna aktivnost omotača tretiranih ekstraktima drenjine

	mg/mL	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. expansum</i>
DVV	45	n.a.	n.a.	I	K.I.	n.a.
DEV	45	K.I.	n.a.	K.I	n.a.	n.a.
DVE	22.5	n.a.	n.a.	I	n.a.	n.a.
DEE	22.5	n.a.	n.a.*	K.I.	n.a.	n.a.

n.a.- nema aktivnosti, K.I. – kontaktana inhibicija, I - inhibicija

Dejstvo na bakteriju *E. coli* pokazao je omotač tertian DVV rastvorom ekstakta u vidu kontaktne inhibicije, a ostali omotači nisu pokazali nikakvu aktivnost prema ovoj bakteriji.

Na plijesan *P. expansum* ni jedan od omotača tretiran rastvorima drenjine nije pokazao nikakvu aktivnost.

U Tabeli 4.21. prikazani su rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti omotača tretiranih ekstraktima aronije na odabrane G(+) i G(-) bakterije i plijesan *P. expansum*.

Iz prikazanih rezultata vidi se da ni jedan od omotača tretiranih rastvorima aronije nije pokazao nikakvu aktivnost na odabrane G(+) bakterije (*S. aureus*, *B. cereus*). Što se tiče G(-) bakterija, takođe ni jedan od omotača tretiranih rastvorima aronije nije pokazao nikakvu aktivnost prema *S. enterica*, dok je prema *E. coli* kontaktnu inhibiciju pokazao samo AVV, koji je korišten u koncentraciji od 120 mg/mL. Aktivnost prema plijesni *P. expansum*, takođe nije pokazao ni jedan od omotača tretiranih aronijom. Iako su se polazni ekstrakti aronije pokazali kao veoma snažna antioksidativna sredstva, po pitanju antimikrobnog uticaja nisu se pokazali kao efikasni.

Tabela 4.21. Antimikrobna aktivnost omotača tretiranih ekstraktima aronije

	mg/mL	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. expansum</i>
AVV	120	n.a.	n.a.	n.a.	K.I.	n.a.
AEV	45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AVE	45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AEE	45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.- nema aktivnosti, K.I. – kontaktana inhibicija

U Tabeli 4.22. prikazani su rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti omotača tretiranih ekstraktima crvene trešnje na odabране G(+) i G(-) bakterije i plijesan *P. expansum*. Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, niti jedan omotač tretiran rastvorima ekstakata crvene trešnje nije pokazao nikakvu aktivnost, ni prema G(+), ni prema G(-) bakterijama, kao ni prema testiranju plijesni *P. expansum*.

Tabela 4.22. Antimikrobna aktivnost omotača tretiranih ekstraktima crvene trešnje

mg/mL	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. expansum</i>
TrVV	120	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TrEV	30	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TrVE	30	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TrEE	30	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.- nema aktivnosti

Iako su u svim omotačima korištene koncentracije više od izmjerena MIC vrijednosti za pojedine ekstrakte, pretpostavka je da je omotač zadržao manju količinu aktivnih materija od potrebne za djelovanje na izabrane sojeve. Dobijeni rezultati nisu u skladu sa rezultatima mjerjenja antioksidativnog dejstva ekstrakata, gdje je ustanovljeno da omotači tretirani biljnim ekstraktima imaju pozitivan uticaj na antioksidativna svojstva. Odavde proizilazi da se antimikrobne osobine biljnih ekstrakta mogu pripisati individualnim ili sinergijskim efektima različitih faktora, a ne samo sadržaju fenolnih materija. Nedostatak metode difuzije u agar je prilično dugo vrijeme inkubacije neophodno da se otkrije zona inhibicije, što može dovesti do gubitka isparljivih ili razgradnje termički nestabilnih agenasa, što je vjerovatno i uzrokovalo izostanak antibakterijskog dejstva testiranih uzoraka. Takođe, nije moguće kvantifikovati količinu antimikrobnog agensa koji difunduje u agar medijum, zbog gradijenta i matriksne mreže agara koji se koristi za test (Balouiri et al., 2016). Pošto je agar voden preparat, nepolarna jedinjenja neće difundovati tako dobro kao polarna jedinjenja. Kotze i Eloff (2002) i Eloff i sar. (2017) pokazali su da jedinjenja srednjeg polariteta imaju najveću antimikrobnu aktivnost. Metoda agar-difuzije može biti veoma korisna kada se koristi kod jedinjenja sa poznatim polaritetom, pa čak i u tom slučaju ako se polaritet pozitivne kontrole mnogo razlikuje od polariteta ovih jedinjenja, poređenja može neće biti validna (Eloff, 2019).

U Tabeli 4.23. prikazani su rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti omotača tretiranih kontrolnim rastvorima na odabranе G(+) i G(-) bakterije i plijesan *P. expansum*. Posmatrajući aktivnosti omotača tretiranih kontrolnim rastvorima, vidi se da na odabranе sojeve G(+) i G(-) ni

jedan od omotačanije imao nikakav uticaj. Na izabranu plijesan *P. expansum* aktivnost je pokazao samo omotač tretiran rastvorom vitamina C, i to u vidu kontaktne inhibicije. Pretpostavlja se da je koncentracija etanola od 6 vol%, koja je korištena za potapanje omotača, preniska da bi pokazala antimikrobnog dejstvo.

Tabela 4.23. Antimikrobnna aktivnost kontrolnih uzoraka

	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. expansum</i>
	C1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5 mg/mL	C2	n.a.	n.a.	n.a.	K.I.
6%	C3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.- nema aktivnosti, K.I. – kontaktana inhibicija

Dobrucka i Cierpiszewski (2014) smatraju da etanol kao antimikrobnog sredstvo može inhibirati rast kvasca i bakterija, a da je posebno je efikasan protiv pljesni. Lucera i sar. (2012) smatraju da vitamin C može pozitivno uticati na produženje roka trajanja proizvoda od mesa, kao i da utiče na stabilnost boje.

U Tabeli 4.24. dat je prikaz dejstva antibiotika koji su korišteni u svrhu testiranja upotrebljenih kultura. Prikazani rezultati su u skladu sa očekivanim.

Tabela 4.24. Provjera aktivnosti kulture

	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. expansum</i>
GEN	28.00±3.51	22.64±2.68	23.33±3.09	22.14±4.61	Ny22.33±0.47
ERY	28.50±2.87	25.57±2.82	8.83±1.77	8.29±1.48	F 0
CIP	27.50±3.20	28.50±4.23	35.00±4.32	32.57±3.11	
AP	33.00±3.83	12.93±1.66	22.00±3.56	18.21±5.76	

Aktivni sistemi pakovanja koji su zasnovani na primjeni ambalažnih materijala sa ugrađenim antimikrobnim agensima predstavljaju jedan od obećavajućih trendova u preradi hrane, pri čemu antimikrobnia ambalaža smanjuje, inhibira ili usporava rast mikroorganizama kvarenja koji mogu biti prisutni na površinama pakovne hrane čime se doprinosi produženju roka trajanja, održavanju kvaliteta i poboljšanju stabilnosti skladištenja upakovanih namirnica (Hanušová i sar., 2009). Antimikrobnii materijali za pakovanje hrane trebali bi da utiču na produženje lag faze i smanjenje brzine rasta mikroorganizama (Suppakul i sar., 2003)

Hanušová i sar. (2009) su u svom istraživanju aktivnih sistema pakovanja zasnovanih na oslobođanju antimikrobnih agenasa (nisin, natamycin) iz polimernog i celofanskog filma došli do zaključka da ne dolazi do inhibicije broja mikroorganizma na ispitivanim prehrambenim proizvodima.

Suppakul i sar. (2003) navode da je analiza aktivnog pakovanja koje sadrži 1% (w/w) ekstrakta sjemenki grejpfruta, pokazala da dolazi do smanjenja rasta aerobnih bakterija i kvasca, dok koncentracije od 0,1% nisu pokazale nikakav uticaj na smanjenje broja mikroorganizama.

Kraśniewska i Gniewosz (2012) navode da filmovi sa nisinom efikasno inhibiraju rast bakterija *L. monocytogenes* i *S. aureus*. Takođe, isti autor navodi da jaka baktericidna svojstva pokazuju između ostalog: ulja majčine dušice, origana i karanfilića, te biljni ekstrakti koštica grožđa i grejpfruta, te da su efikasni prema većem broju bakterija (*E. coli*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *L. plantarum*, *S. aureus*, *B. subtilis*), kvasaca i pljesni.

Malhotra i sar. (2015) u svom radu navode da filmovi koji sadrže ekstrakt origana utiču na redukciju *E.coli*.

Mnogi autori smatraju da su antimikrobno najefikasnija jedinjenja sa fenolnim grupama, kao što su ulja karanfilića, origana, ruzmarina, timijana, žalfije i vanilina, te da su više inhibitorni protiv G(+) (*S. aureus*) nego G(-) bakterija (*E. coli*), zbog kompleksnije građe ćelijskog zida (Lucera i sar. 2012; Aziz i Almasi, 2018). Aziz i Almasi (2018) još ističu da je antimikrobna aktivnost ekstrakta inkapsulisanog u film znatno niža od aktivnosti samog ekstrakta. To se najvjerovalnije posljedica veza koje nastaju inkapsulacijom što dovodi do smanjenja migracije ekstrakta sa filma pa je samim tim i njegova antimikrobna aktivnost smanjena.

U svojoj disertaciji o jestivim filmovima na bazi hitozana, Hromiš (2015) dolazi do podataka o njihovoj efikasnosti kao antimikrobnih agensa protiv bakterija *E. coli* i *S. aureus*. S tim se slažu i Kargozari i Hamedi (2019), koji smataju da se dodakom ekstrakata citrusa antimikrobna aktivnost hitozana prema *E. coli* i *S. enterica* povećava.

Pires i sar. (2013) navode da je različita antimikrobna aktivnost agenasa posljedica raznolikosti aktivnih materija u samim agensima (eterična ulja, biljni ekstrakti), interakcija između spojeva agenasa i korištenih filmova (soja, alginat-jabuka pire, alginat i protein surutke), kao i razlika u količini korištenog agensa po površini filma. Smatra se da moguće objašnjenje može biti manja debljina uzorka filma, te se ne uspijeva osloboditi dovoljna količina agensa za inhibiciju rasta mikroorganizama. S ovim navodima slažu se i Teixeira i sar. (2014) i Peighambardoust i sar. (2021). Shojaee-Aliabadi i sar. (2013) smatraju da je antibakterijska aktivnost direktno proporcionalna koncentraciji korištenog agensa, što je u saglasnosti sa našim istraživanjima i dobijenim rezultatima.

4.3. ANALIZA GOTOVOG PROIZVODA

Za potrebe istraživanja proizvedene su suvo fermentisane govede kobasice tipa „sudžuk“. Nadjev kobasica punjen je u prirodna juneća crijeva, prethodno tretirana izabranim ekstraktima, i na taj način je pripremljeno 5 različitih uzoraka: C1 - kontrolni, crijeva potopljena u vodu, C2 - crijeva potopljena u rastvor vitamina C koncentracije 5 mg/mL, C3 - crijeva potopljena u rastvor etanola koncentracije 6 vol%, DEE - crijeva potopljena u rastvor etanolnog ekstrakta drenjine koncentracije 22.5 mg/mL u 6 vol% etanolu, AEE - crijeva potopljena u rastvor etanolnog ekstrakta aronije koncentracije 45 mg/mL u 6 vol% etanolu.

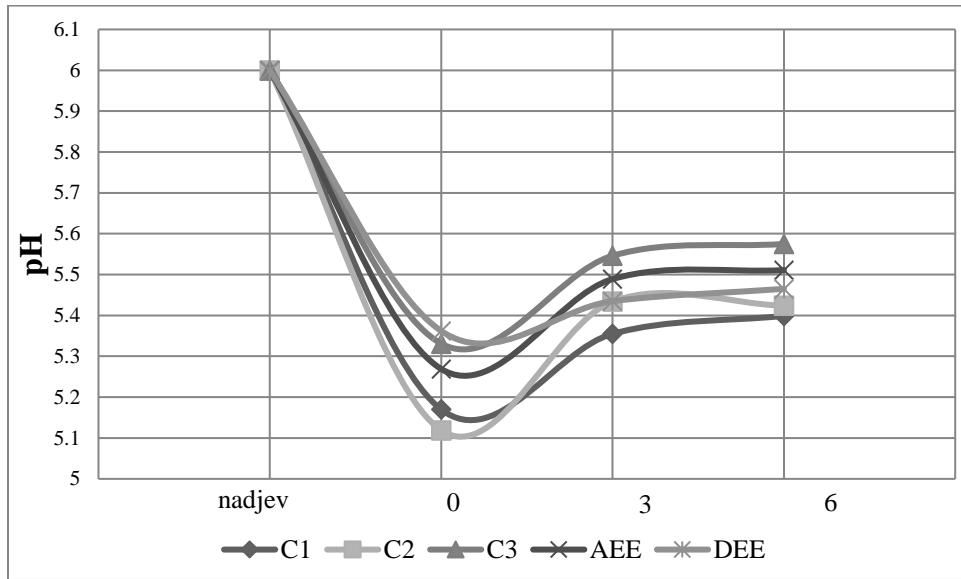
U ovom poglavlju su predstavljeni rezultati analize gotovog proizvoda (fizičke, hemijske, fizičko-hemijske i mikrobiološke analize gotovog proizvoda, antioksidativni testovi, praćenje lipidnih promjena na mastima i senzorna ocjena odabranih osobina fermentisanih kobasic). Rezultati istraživanja su statistički obrađeni.

4.3.1. pH vrijednosti

Promjena pH vrijednosti je osnovna fizičko-hemijska promjena koja se dešava tokom zrenja fermentisanih kobasic, i utiče na održivost proizvoda, stvaranje stabilne boje, povezivanje nadjeva i formiranje konzistencije i arome kobasic. Opadanje pH vrijednosti je posljedica fermentacije šećera do mlječne kiseline, dok u kasnijim fazama zrenja može doći do postepenog povećanja pH vrijednosti uslijed nakupljanja produkata proteolize (Hromiš, 2015). Promjene pH vrijednosti nadjeva i ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja i tokom skladištenja, prikazane su na *Grafiku 4.6*.

Vrijednosti pH su se u toku zrenja naglo smanjile kod svih uzoraka i nakon zrenja te vrijednosti su se kretale u intervalu 5.12-5.36 (Prilog, *Tabela 7.1*). Bozkurt i Erkmen (2002) navode nešto niže vrijednosti pH nakon zrenja i tokom skladištenja sudžuka. Takođe, oni navode da Turski institut za standarde smatra da visokokvalitetne zrele kobasice treba da imaju pH vrijednosti između 4.7 i 5.2. Operta i sar. (2012) navode vrijednosti pH na kraju zrenja slične rezultatima prikazanim u ovom radu (5.06-5.32). Analizirajući uticaj veličine omotača, Ivanović i sar. (2015) zaključuju da su kod kobasica šireg dijametra na kraju proizvodnog procesa utvrđene niže pH vrijednosti u odnosu na kobasicu užeg dijametra.

Tokom skladištenja došlo je do porasta pH vrijednosti u svim uzorcima uz isti trend porasta, da bi se vrijednosti pH na kraju ispitivanja, u šestom mjesecu, kretale od 5.40 u kontrolnom uzorku, do 5.58 u uzorku C3.



Grafik 4.6. Promjena pH vrijednosti u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Mnogi autori za slične kobasice navode dosta niže pH vrijednosti koje se tokom skladištenja kreću od 4.5-4.8 (Coskuner i sar., 2008; Arslan i Soyer, 2018; Demirok Soncu i sar. 2018), dok drugi autori navode vrijednosti u skladu sa rezultatima dobijenima u ovom radu (Wojciak i sar., 2013; Pleadin i sar., 2020; Karwowska i sar., 2021).

Analizirajući kobasice sa prirodnim omotačima od kisele surutke i nekih biljnih ekstrakata (ruzmarin, kleka, sjeme gorusice), Wojciak i Dolatowski (2016) navode pH vrijednosti 4.87-5.16 nakon proizvodnje (0 dana) i od 5.04 do 5.37 nakon 180 dana skladištenja. Iste vrijednosti navode Dučić i sar. (2018) za industrijski proizveden sudžuk, i ističu da se takve kobasice mogu svrstati u visoko kisele fermentisane kobasice ($\text{pH} < 5.3$), ili nisko-kiselinske fermentisane kobasice ($\text{pH} 5.3$).

Dodaci poput brašna od sjemenki grejpfruta (Kurt, 2016) ili hitozanski premazi sa dodacima eteričnih ulja (Hromiš, 2015) nisu pokazali značajan uticaj na promjenu pH vrijednosti fermentisanih kobasica.

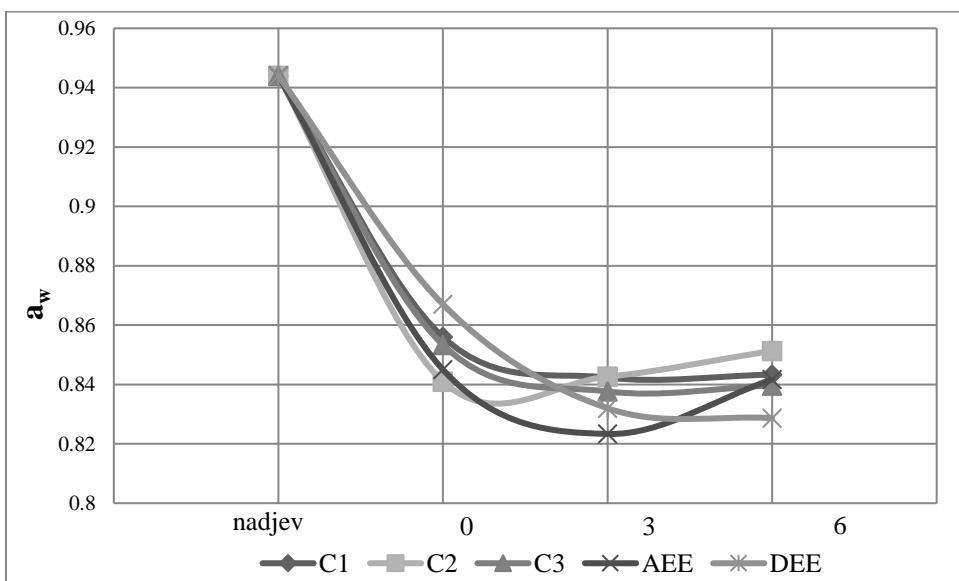
Promjene pH vrijednosti vakuumiranih kobasica tokom skladištenja, vjerovatno, su rezultat procesa koji se dešavaju unutar pakovanja. Porast vrijednosti pH tokom skladištenja je,

najverovatnije, posljedica razgradnje mlijecne kiseline do koje dolazi nakon što se potroše šećeri, i/ili izraženoj proteolitičkoj aktivnosti prisutne mikroflore. Sa druge strane, do pada pH vrijednosti najverovatnije dolazi zbog povećanja broja psihrofilnih laktobacila u kobasicama skladištenim u ambalaži pod vakuumom na temperaturi +4°C (Hromiš, 2015; Król i sar., 2017).

4.3.2. Vrijednosti a_w

Aktivnost vode predstavlja mjeru slobodne, fizički i hemijski nevezane vode. Tokom zrenja, kao posljedica sušenja, dolazi do smanjenja aktivnost vode (vrijednost a_w) fermentisanih kobasica, a stepen smanjenja a_w vrijednosti zavisi od sastava kobasica, temperature, relativne vlažnosti vazduha i dužine zrenja.

Promjene vrijednosti a_w nadjeva i ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja i tokom skladištenja, prikazane su na *Grafiku 4.7*. U toku zrenja fermentisanih kobasica dolazi do opadanja vrijednosti a_w kod svih uzoraka, što je direktna posljedica sušenja i uslova zrenja. Nakon završenog zrenja, vrijednosti a_w su se kretale od 0.841 (C2) do 0.867 (DEE) (Prilog, *Tabela 7.2.*).



Grafik 4.7. Promjena vrijednosti aktiviteta vode u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Operta i sar. (2012) za sudžuk na kraju zrenja navode vrijednost a_w od 0.836 do 0.850, dok Arslan i Soyer (2018) navode nešto više vrijednosti (0.88-0.89). Analizom industrijski proizvedenog sudžuka, Dučić i sar. (2018) navode vrijednosti a_w od 0.86-0.88, te zaključuju da

kobasice sa vrijednosti $a_w < 0.9$ mogu biti kategorizovne kao mikrobiološki stabilni proizvodi s dugim vijekom trajanja.

U toku skladištenja primjećuje se sličan trend kretanja vrijednosti a_w kod uzoraka, koji se nastavlja do kraja perioda ispitivanja, osim kod uzorka C2 i AEE kod kojih se primjeti porast ove vrijednosti do 6-og mjeseca skladištenja.

Wojciak i sar. (2012, 2016) u svojim radovima navode da tokom skladištenja dolazi do laganog opadanja vrijednosti a_w , uz povećanje pH vrijednosti, što je potvrđeno i u ovom radu, vjerovatno zbog proizvodnje niskomolekularnih jedinjenja azota nastalih razgradnjom bjelančevina mesa tokom skladištenja.

Lešić i sar. (2020) u ispitivanju hrvatskih domaćih kobasicu navode a_w vrijednosti ispod 0.85, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu, dok drugi autori navode prilično visoke vrijednosti a_w za fermentisane kobasice od goveđeg mesa (0.910-0.924) (Coskuner i sar., 2008; Karwowska i sar., 2021). Analizirajući sudžuk sa omotačem od hitozana uz dodatak esenijalnih ulja, Demirok Soncu i sar. (2018) takođe navode veoma visoke vrijednosti a_w (0.93).

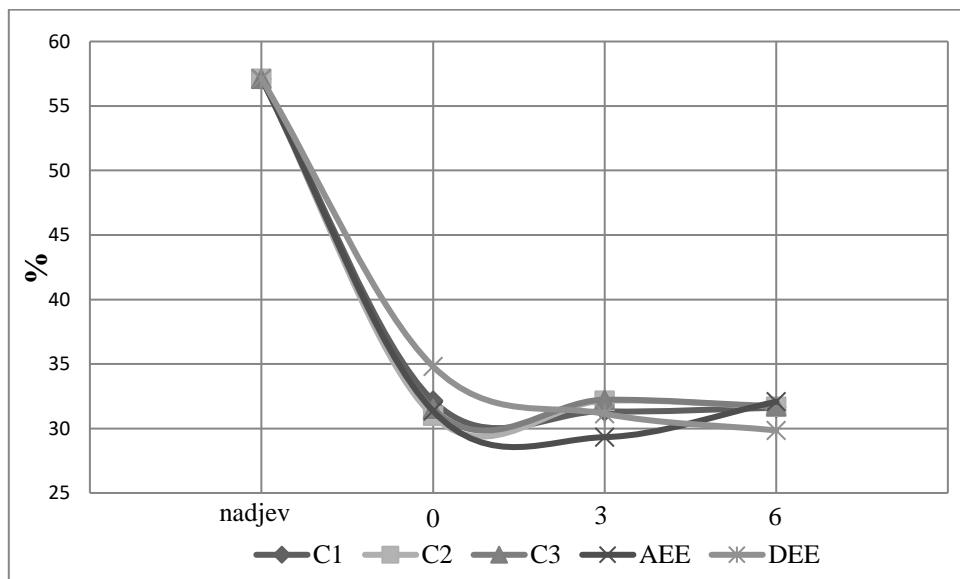
4.3.3. Sadržaj vode

Osnovna fizička promjena za vrijeme zrenja fermentisanih kobasicu je sušenje, kad dolazi do postepenog uklanjanja slobodne i labavo vezane vode. Smanjenjem sadržaja vode, usporava se aktivnost tkivnih enzima, konzistencija kobasicu postaje čvršća, a produžava se održivost proizvoda.

Promjena sadržaja vode u nadjevu, nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci) prikazana je u *Grafiku 4.8*. Kako se može vidjeti iz prikazanih rezultata, sadržaj vode se tokom zrenja znatno smanjuje, kao posljedica sušenja. Vrijednosti su se kretale od početnih 57.11% u nadjevu, do 30.98% u uzorku C2 i 34.81% u uzorku DEE (Prilog, *Tabela 7.3.*). Svi uzorci prate sličan trend smanjenja sadržaja vode i tokom skladištenja. Na kraju skladištenja sadržaj vode se kretao u intervalu 29.85-32.07%.

Ispitujući industrijski proizvedene fermentisane kobasicice tipa sudžuk, Dučić i sar. (2018) navode vrijednosti sadržaja vode od 23.5% do 32%, što je u skladu sa važećim propisima srpskog zakonodavstva (Sl. glasnik Republike Srbije, br 50/2019), koji propisuje sadržaj vode <35%. Slične vrijednosti sadržaja vode za sudžuk navode i Operta i sar. (2012) i Coskuner i sar. (2008). Vrijednosti sadržaja vode u tradicionalnim hrvatskim fermentisanim kobasicama kreće se od

22% do 32.3% (Lešić i sar., 2020; Pleadin i sar., 2020), dok je kulen imao nešto više vrijednosti sadržaja vode od 35% do 38.8% (Parunović i sar., 2014). Liguori i sar. (2015) smatraju da veličina omotača utiče na sadržaj vode, tako "salsiccia" kobasica sa užim omotačima ima 27-30% vode, dok "soppressata" i "spianata" koje se pune u omotače šireg dijametra imaju znatno viši sadržaj vode (37.5-41.2%).



Grafik 4.8. Promjena sadržaja vode (%) u ispitivanim uzorcima kobasicica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

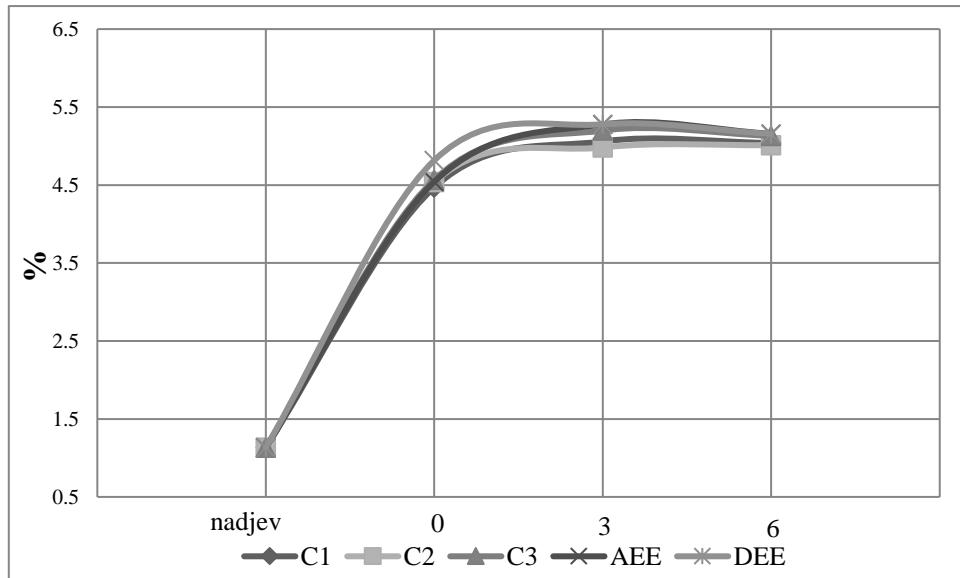
U svojim istraživanjima o primjeni kombinovanih hitozanskih premaza i eteričnih ulja (timijan, ruzmarin, kim) na fermentisanim kobasicama, Hromiš (2015) dolazi do zaključka da nema promjene u sadržaju vode, a do istih podataka došli su i Demirok Soncu i sar. (2018). Rezultati dobijeni u ovom radu su saglasni sa rezultatima koje su dobili Hromiš (2015) i Demirok Soncu i sar. (2018).

4.3.4. Sadržaj ukupnog pepela

U *Grafiku 4.9.* prikazan je sadržaj ukupnog pepela u nadjevu i ispitivanim uzorcima kobasicica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

U toku zrenja, uslijed sušenja, dolazi do povećanja sadržaja ukupnog pepela. U nadjevu je sadržaj pepela bio 1.13%, da bi se nakon zrenja sadržaj pepela kretao od 4.47% (C1) do 4.82% (DEE) (Prilog, *Tabela 7.4.*). Trend promjene bio je isti kod svih uzoraka i nakon zrenja i tokom

skladištenja. U šestom mjesecu sadržaj ukupnog pepela u svim uzorcima je bio prilično ujednačen i kretao se od 5.01% u uzorku C2, do 5.16% u uzorku AEE.



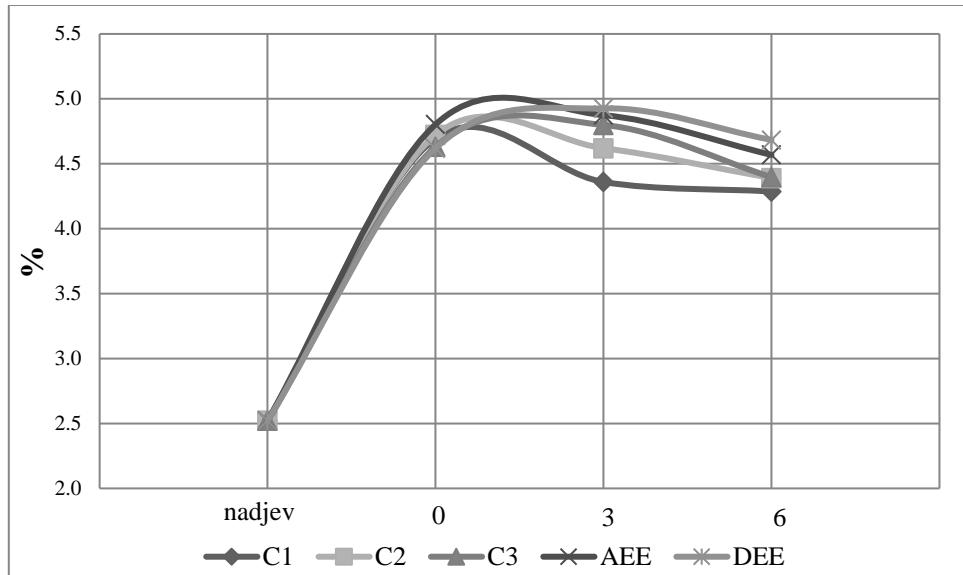
Grafik 4.9. Promjene sadržaja ukupnog pepela (%) u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Analizom industrijskog sudžuka Operta i sar. (2012) dobili su vrijednosti sadržaja pepela od 5.5% do 5.8%, što je nešto više u odnosu na rezultate prikazane u ovom radu. Mnogi autori navode slične vrijednosti sadržaja pepela za fermentisane kobasice, 4.5-5.9% (Parunović i sar., 2013; Dučić i sar., 2018; Lešić i sar. 2020; Pleadin i sar., 2020). Niže vrijednosti sadržaja pepela za sudžuk navode Coskuner i sar. (2008) (2.55-4%) i Demirok Soncu i sar. (2018) (2.8-3.5%).

4.3.5. Sadržaj hlorida

Jedan od najstarijih oblika konzervisanja hrane je soljenje. U proizvode od mesa, so (NaCl) se koristi zbog višestrukog uticaja na teksturu, aromu i održivost. U *Grafiku 4.10.* prikazani su rezultati dobijeni određivanjem sadržaja hlorida u nadjevu i ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

Sadržaj soli u nadjevu bio je 2.52%, i u toku zrenja došlo je do povećanja ove vrijednosti. Nakon završenog zrenja, u gotovom proizvodu vrijednosti za sadržaj hlorida su se kretale u rasponu od 4.62% (uzorak DEE), do 4.80% (uzorak AEE) (Prilog, *Tabela 7.5.*). Tokom skladištenja dolazi do laganog opadanja sadržaja soli u svim uzorcima, i kao što se vidi na grafiku, sličan trend imali su svi uzorci, a vrijednosti su se kretale od intervalu od 4.29% (C1) do 4.68% (DEE).



Grafik 4.10. Promjene sadržaja soli (%) u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Vrijednosti slične prikazanim navode Operta i sar. (2012), za industrijski proizveden sudžuk. Mnogi autori navode niže vrijednosti sadržaja soli u sličnim proizvodima (Coskuner i sar., 2008; Dučić i sar., 2018; Lešić i sar., 2020; Pleadin i sar., 2020).

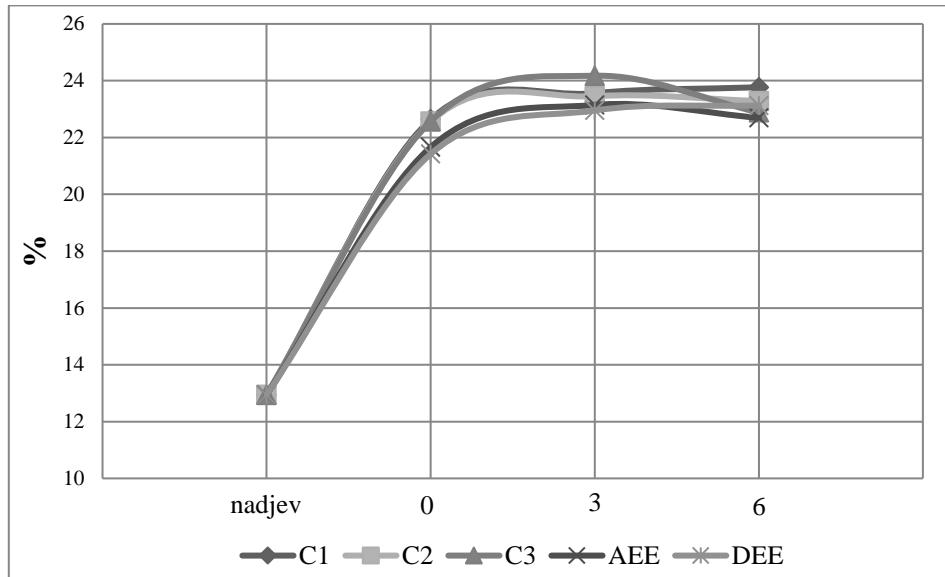
4.3.6. Sadržaj proteina

Sadržaj proteina u fermentisanim kobasicama zavisi od kvaliteta i količine mišićnog tkiva kao polazne sirovine. U *Grafiku 4.11.* prikazan je sadržaj ukupnih proteina u nadjevu, u ispitivanim uzorcima nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

Tokom procesa sušenja, uslijed izdvajanja vode došlo je do porasta relativnog sadržaja suve materije u kobasicama, pa tako i do povećanja sadržaja proteina. U nadjevu je sadržaj proteina bio 12.94%, a u gotovim fermentisanim kobasicama, nakon zrenja, kretao se od 21.42% u uzorku DEE, do 22.64% u uzorku C1 (Prilog, Tabela 7.6.). Tokom skladištenja nije bilo većih promjena, nakon 3 mjeseca došlo je do blagog povećanja vrijednosti kod svih uzoraka, kao posljedica isušivanja, a na kraju ispitnog perioda vrijednosti su se veoma malo promijenile i kretale su se od 22.69% (AEE) do 23.77% (C1).

Prikazani rezultati se slaže sa navodima Dučić i sar. (2018). Znatno više vrijednosti (26-39%) za sadržaj proteina u fermentisanim kobasicama navode mnogi autori (Coskuner i sar., 2008; Operta i sar., 2012; Parunović i sar., 2013; Liguori i sar., 2015; Kononiuk i Karwowska, 2020; Lešić i

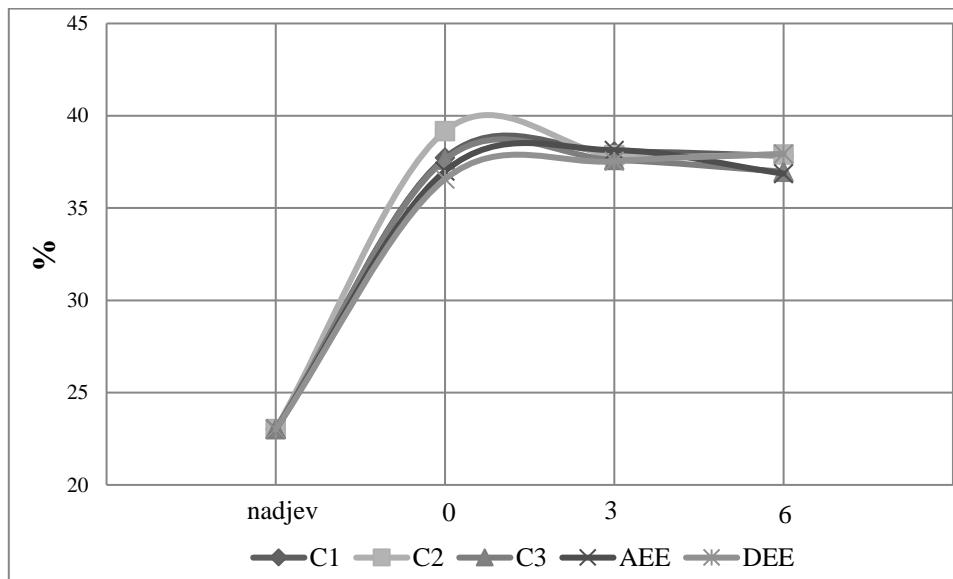
sar., 2020; Pleadin i sar., 2020). Demirok Soncu i sar. (2018) za sudžuk sa omotačem od hitozana i eteričnih ulja navodi niže vrijednosti sadržaja proteina, od 17.25 do 19.44%.



Grafik 4.11. Promjene sadržaja ukupnih proteinica (%) u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

4.3.7. Sadržaj ukupnih masti

U Grafiku 4.12. su prikazani rezultati dobijeni određivanjem sadržaja ukupnih masti za nadjev i ispitivane uzorke nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).



Grafik 4.12. Promjene sadržaja ukupnih masti (%) u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Početni sadržaj ukupnih masti u nadjevu bio je 23.02%. Tokom zrenja fermentisanih kobasicica, uslijed promjene hemijskog sastava, smanjenja sadržaja vode, sadržaj ostalih sastojaka se proporcionalno povećava, te se u gotovim prozvodima nakon zrenja sadržaj masti kretao od 36.57% u uzorku DEE do 39.17% u uzorku C2 (Prilog, *Tabela 7.7.*). Prilično velik raspon sadržaja masti najviše zavisi od homogenosti uzorka, pošto fermentisane kobasicice sadrže krupnije komade masnog tkiva u svom sastavu. Tokom skladištenja dolazi do blagog pada sadržaja ukupnih masti, a vrijednosti su prilično ujednačene, što se može povezati sa minimalnim promjenama u sadržaju vode uslijed vakuum pakovanja ispitivanih uzoraka.

U dostupnoj literaturi mogu se naći podaci da se sadržaj masti u gotovom proizvodu kreće u veoma širokom rasponu, što u prvom redu zavisi od polazne recepture. Parunović i sar. (2013) za tradicionalni kulen navode veoma niske vrijednosti sadržaja masti, od 15 do 21%. Nešto viši sadržaj masti od 23% do 30% za slične proizvode navode Coskuner i sar. (2008), Operta i sar. (2012), Liguori i sar. (2015), Pasini i sar. (2018) i Kononiuk i Karwowska (2020). Neki autori navode prilično veliki raspon u sadržaju masti u fermentisanim kobasicama, od 28 do 50% (Šojić i sar., 2014; Dučić i sar., 2018; Lešić i sar., 2020).

Demirok Soncu i sar. (2018) navode da se sadržaj masti u sudžuku sa kombinovanim hitozanskim premazom i eteričnim uljima kretao od 40% do 45.5%. Velike varijacije u sastavu proizvoda ukazuju na upotrebu sirovina različitog kvaliteta, kao i različitih receptura i postupaka proizvodnje.

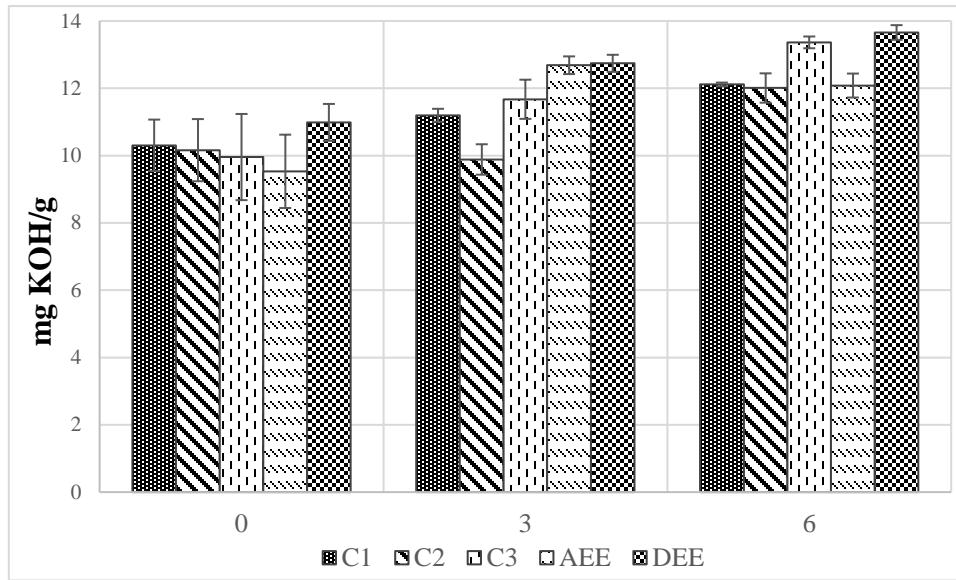
4.3.8. Lipidne promjene

Slobodne masne kiseline

U *Grafiku 4.13.* dat je prikaz rezultata sadržaja slobodnih masnih kiselina za ispitivane uzorke nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

U gotovim fermentisanim kobasicama, nakon završenog zrenja, sadržaj slobodnih masnih kiselina je bio prilično ujednačen i kretao se od 9.53 mg KOH/g u uzorku AEE, do 10.99 mg KOH/g u uzorku DEE (Prilog, *Tabela 7.8.*). Šojić i sar. (2014) za Petrovsku kobasicu navode da se sadržaj slobodnih masnih kiselina na kraju procesa sušenja kretao od 7.11 do 14.62 mg KOH/g, što je slično rezultatima prikazanim u ovom radu. Dosta niže vrijednosti sadržaja

slobodnih masnih kiselina navode Glišić i sar. (2019) u fermentisanim kobasicama u koje je dodana biljna mast.



Grafik 4.13. Prosječan sadržaj slobodnih masnih kiselina (mg KOH/g) u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Nakon 3 mjeseca skladištenja došlo je do porasta sadržaja slobodnih masnih kiselina u svim uzorcima, osim u uzorku C2 (9.88 mg KOH/g). Vrijednosti kod ostalih uzoraka su se kretnale od 11.20 mg KOH/g u uzorku C1, do 12.74 mg KOH/g u uzorku DEE.

U šestom mjesecu skladištenja vrijednost slobodnih masnih kiselina se povećala kod svih uzoraka, osim AEE, koji je imao za ~5% nižu vrijednost od prethodnog mjerena (12.08 mg KOH/g).

Vrijednosti sadržaja slobodnih masnih kiselina koje navode Saičić i sar. (2011) za tradicionalni kulen su u skladu sa prikaznim rezultatima.

Mnogi autori navode da tokom skladištenja dolazi do povećanja sadržaja slobodnih masnih kiselina u sličnim proizvodima, što je vjerovatno rezultat aktivnosti endogenih enzima i enzima mikroorganizama (Coskuner i sar., 2008; Wojciak i sar. 2012; Šojić i sar., 2014). Sličan trend promjene sadržaja slobodnih masnih kiselina prijavljuju Wojciak i sar. (2013), a vrijednosti tokom skladištenja se kreću od 7.87 do 21.90 mg KOH/g.

Kurt (2016) navodi da dodatak brašna od sjemenki grejpfruta utiče na smanjenje sadržaja slobodnih masnih kiselina u sudžuku, te da se ta vrijednost tokom skladištenja povećava. Isti autor smatra da nivo slobodnih masnih kiselina u suvim fermentisanim kobasicama zavisi od

hidrolitičke aktivnosti lipaze (pad pH vrijednosti povećava njihovu aktivnost), mikrobnih metaboličkih procesa kao i oksidativnih reakcija koji se odvijaju tokom proizvodnje i skladištenja.

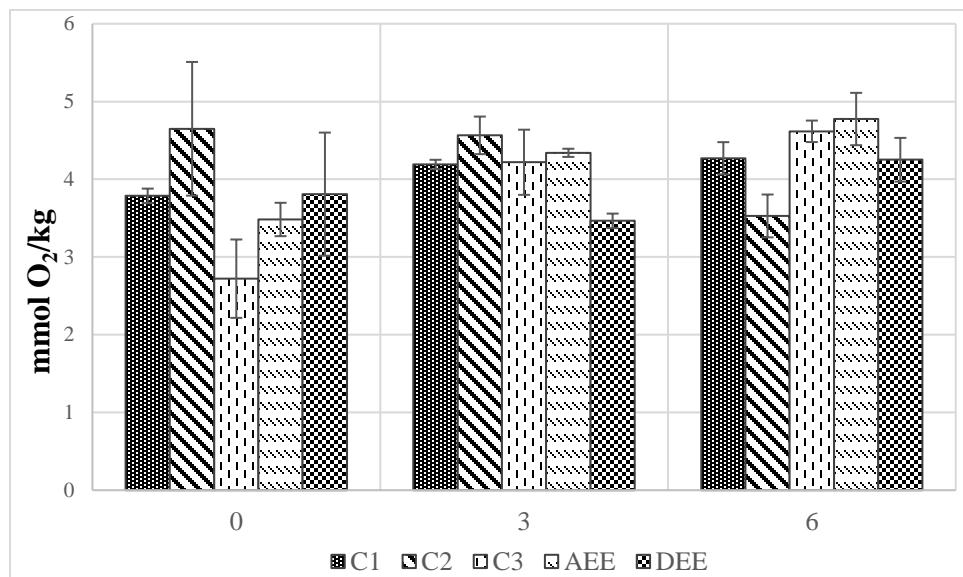
Istraživanja koja su proveli Demirok Soncu i sar. (2018) o uticaju primjene kombinacije različitih koncentracija hitozanskih premaza i eteričnih ulja na fermentisane kobasice (sudžuk), nisu pokazala značajnu razliku u pogledu sadržaja slobodnih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima.

Peroksidni broj

U *Grafiku 4.14.* su prikazani rezultati dobijeni određivanjem peroksidnog broja za ispitivane uzorce nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da se peroksidna vrijednost nakon zrenja kreće u intervalu od 2.72 mmolO₂/kg koliko je izmjereno u uzorku C3, do 4.65 mmolO₂/kg u uzorku C2 (Prilog, *Tabela 7.9.*).

Pasini i sar. (2018) navode da su vrijednosti peroksidnog broja za fermentisane kobasice nakon zrenja iznosile 13.72-14.45 meqO₂/kg masti, dok su Glišić i sar. (2019) za modifikovane kobasice dobili vrijednosti peroksidog broja od 0.06-0.31 mmolO₂/kg.



Grafik 4.14. Prosječne vrijednosti peroksidnog broja (mmol O₂/kg) u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Poslije 3 mjeseca skladištenja vrijednosti peroksidnog broja su bile prilično ujednačene, a najniža vrijednost je izmjerena kod uzorka DEE, do 3.47 mmolO₂/kg, što je za 17% niže u odnosu na kontrolni uzorak.

Poslije 6 mjeseci skladištenja, vrijednosti peroksidnog broja kod uzorka C2 se značajno smanjila, vjerovatno zbog antioksidativnog uticaja vitamina C, iako je kod uzorka AEE, koji se smatra dobrom antioksidativnim sredstvom, došlo do porasta ove vrijednosti.

Sličan trend promjene peroksidnog broja navode mnogi autori (Coskuner i sar., 2008; Wojciak i sar., 2012), kod kojih tokom skladištenja prvo dolazi do smanjenja vrijednosti peroksidnog broja, a zatim se ta vrijednost povećava. Coskuner i sar. (2008) smatraju da prooksidativna jedinjenja u toku proizvodnje stimulišu oksidativne reakcije, dok dalja razgradnja hidroperoksida dovodi do smanjenja peroksidne vrijednosti, vjerovatno zbog autooksidativnih reakcija koje uzrokuje zaostali kiseonika u vakuum pakovanju. Hromiš (2015) navodi da je dodatak hitozana svježoj svinjskoj kobasici u koncentraciji 1%, uticao na smanjenje peroksidnog broja.

Pasini i sar. (2018) navode prilično visoke vrijednosti peroksidnog broja, a smatraju da je to rezultat procesa dobijanja proizvoda, pošto mljevenje i miješanje mesa povećava površinu izloženu kiseoniku i oksidacijskim katalizatorima. Takođe, oni ističu da su vrijednosti peroksidnog broja <25 meq O₂/kg masti granica prihvatljivosti za masnu hranu, dok Wojciak i sar. (2012) smatraju da je proizvod kvalitetan ukoliko je nivo peroksida ispod 4.0 meqO₂/kg kobasice.

TBARS test (sadržaj malondialdehida)

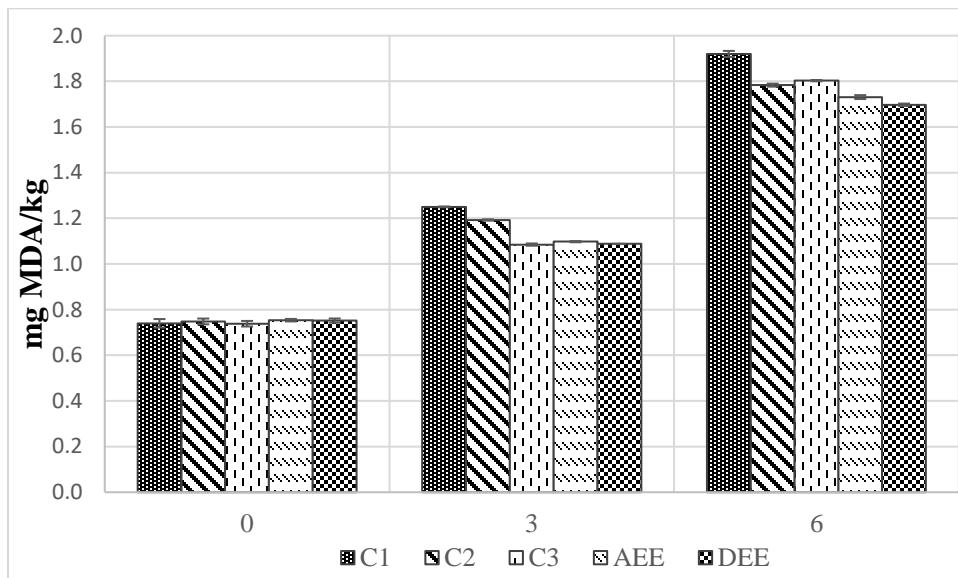
MDA test (određivanje sadržaja malondialdehida) je jedan od najčešće korišćenih testova za praćenje napredovanja oksidacionog procesa u mesu i proizvodima od mesa.

Na *Grafiku 4.15.* su prikazane su prosječne vrijednosti sadržaja MDA za ispitivane uzorke nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci). Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, sadržaj MDA nakon zrenja kod svih uzoraka je bio veoma ujednačen i iznosio je 0.74-0.75 mg/kg (Prilog, *Tabela 7.10.*). Saičić i sar. (2011) navode niže vrijednosti MDA u kulenu nakon zrenja, 0.21 mg/kg. Šojić i sar. (2014) na kraju procesa sušenja u kobasicama, proizvedenim na tradicionalan način i u industrijskim uslovima, su ustanovali da se sadržaj MDA kretao od 0.79 do 1.25 mg/kg. Analizom fermentisanih kobasicica sa omotačem od alginata, Krol i sar. (2017) su

nakon zrenja dobili vrijednosti od 0.30 mg/kg, dok su Hromiš i sar. (2013) za kobasicice sa hitozanom i uljem kima dobili vrijednost 0.34 mg/kg.

U trećem mjesecu skladištenja, vrijednosti MDA su bile malo više i kretale su se od 1.08 mg/kg koliko je izmjereno u uzorku C3, do 1.25 mg/kg u kontrolnom uzorku C1. Uzorci sa DEE i AEE su imale vrijednosti niže od kontrolnog za 12-13%.

U šestom mjesecu skladištenja vrijednosti sadržaja MDA su još veće, i kretale su se od 1.70 mg/kg u uzorku DEE, do 1.92 mg/kg u kontrolnom uzorku C1.



Grafik 4.15. Prosječne vrijednosti sadržaja MDA (mg/kg) u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Iz prikazanih rezultata možemo vidjeti da je tokom cijelog perioda skladištenja vrijednost sadržaja MDA za uzorce AEE i DEE niže od kontrolnih uzoraka (11-12%).

Vrijednosti slične prikazanim u ovom radu (od 0.67 do 2.24 mg MDA/kg) navode Wojciak i sar. (2012), dok Glišić i sar. (2019) navode nešto više vrijednosti sadržaja MDA (3.01-3.38 mg/kg).

Analizom sudžuka, sa i bez dodatih aditiva (α -tokoferol, askorbinska kiselina, fosfati), Bozkurt i Erkmen (2002) zaključuju da mnogo veće vrijednosti sadržaja MDA imaju uzorci bez aditiva. Arslan i sar. (2018) takođe smatraju da su kontrolni uzorci znatno osjetljiviji na oksidaciju lipida, što je potvrđeno višim vrijednostima sadržaja MDA, u odnosu na kobasicice tretirane rastvorima hitozana. Sa ovim zaključkom se slažu i Wojciak i Dolatowski (2012), koji su ustanovili da uzorci sa dodanim antioksidansima imaju niže vrijednosti MDA (za 0.5-1 mg/kg) od kontrolnih uzoraka. Pozitivan uticaj dodatka ekstrakta matičnjaka prijavljuju i de Ciriano i sar. (2012) u vidu smanjenog sadržaja MDA u odnosu na kontrolne uzorke. Cunha i sar. (2018) smatraju da

upotreba ekstakata ruzmarina i đumbira u koncentraciji 0.05g/100g smanjuje sadržaj MDA u proizvodima od mesa za 55-65%. Pozitivan uticaj dodavanja raznih biljnih ekstrakta i prirodnih antioksidanasa, bilo da su dodati u nadjev ili u obliku premaza i filmova na površini proizvoda, potvrdili su mnogi autori (Bozkurt, 2006; Wojciak i sar., 2015; Kurt, 2016; Glišić i sar., 2019; Efenberger-Szmechtyk i sar., 2020).

Hromiš (2015) navodi da tokom skladištenja dolazi do različitog trenda promjene sadržaja MDA u kontrolnoj i kobasici sa slojem hitozana. U kontrolnoj kobasici sadržaj opada, dok u kobasici sa zaštitnim slojem dolazi do porasta ove vrijednosti. Takođe, ističe da su kombinacija hitozana i pčelinjeg voska uticale na smanjenje sadržaja MDA tokom cijelog perioda skladištenja.

Šojić i sar. (2014) navode da tokom skladištenja može doći i do opadanja sadržaja MDA, što objašnjavaju interakcijom MDA sa raznim jedinjenjima kao što su: šećeri, nitriti i aminokiseline. Coskuner i sar. (2008) su analizirajući sudžuk prijavili dosta niže vrijednosti sadržaja MDA (0.1-0.38 mg/kg), ističući da se ove vrijednosti tokom skladištenja povećavaju. Krol i sar. (2017) takođe uočavaju povećanje vrijednosti MDA za sve ispitivane uzorke u toku skladištenja. Isti autori smatraju da je oksidacija lipida u mesu tokom skladištenja prirodan proces koji dovodi do smanjenja kvaliteta mesa.

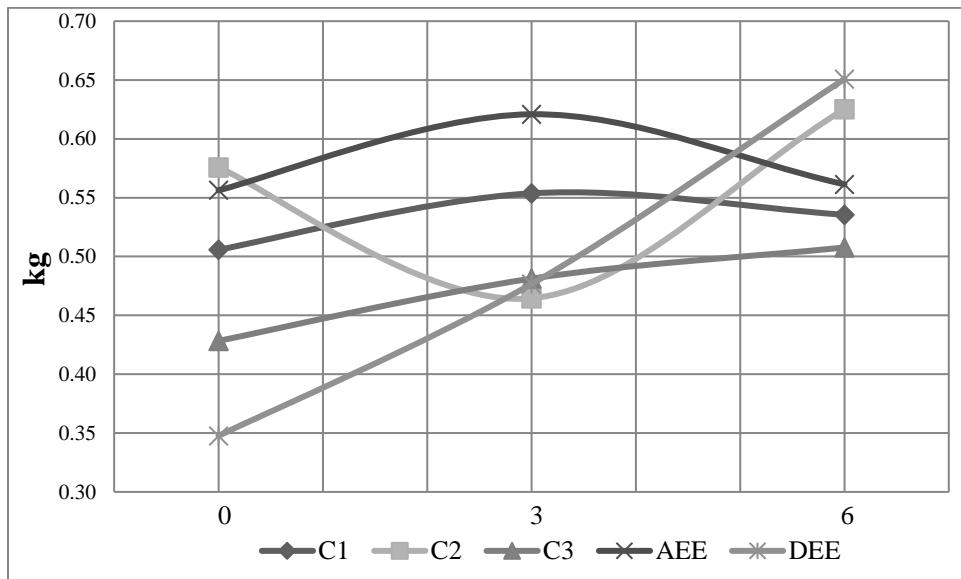
Estévez i sar. (2021) smatraju da su proizvodi od mesa posebno osjetljivi na oksidaciju lipida zbog pojave prooksidanata među mišićnim komponentama (hem željezo) kao i primjene raznih tehnologija koje povećavaju izlaganje kiseoniku (mljevenje), ali i stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (zagrijavanje, soljenje, visoki pritisak,...). Takođe smatraju da su glavne posljedice oksidativne razgradnje nezasićenih masnih kiselina (UFA) u prerađenim mesnim proizvodima pojava užeglosti i neugodnog okusa, uz gubitak esencijalnih nutrijenata (masnih kiselina i vitamina).

4.3.9. Tekstura

Tekstura ima veliki uticaj na percepciju potrošača o kvalitetu proizvoda, a predstavlja senzorni utisak o strukturi hrane ali i način kako ta struktura reaguje na djelovanje sile. Na čvrstinu fermentisanih kobasicica utiču: koagulacija proteina na niskim pH, količina masti, kao i smanjenje sadržaja vlage tokom procesa proizvodnje. Pored toga, na teksturu mogu da utiču i razni dodaci, zamjene za mast, vlakna, proteini i slično (Vasilev i sar., 2009; Vesković-Moračanin i sar., 2013). Svojstvo tvrdoće, mekoće ili teksture mesa, predstavlja mjeru sile koju čovjek treba upotrijebiti

kako bi pregrizao komad mesa. Na *Grafiku 4.16.* su prikazane srednje vrijednosti tvrdoće (kg) mjerene nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da su se vrijednosti za tvrdoću nakon zrenja kretale od 0.35 kg, u uzorku DEE, do 0.58 kg, u uzorku C2 (Prilog, *Tabela 7.11.*). Nakon 3 mjeseca skladištenja dolazi do laganog porasta vrijednosti tvrdoće kod uzoraka C1, C3 i AEE, koji imaju sličan trend rasta, dok je kod uzorka C2 primjetna niža vrijednost.



Grafik 4.16. Prosječna tvrdoća/mekoća (kg) ispitivanih uzoraka kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Poslije šest mjeseci skladištenja vrijednosti za tvrdoću su malo niže kod uzoraka C1, C3 i AEE, dok je kod C2 i DEE došlo do značajnog porasta tvrdoće.

Slične vrijednosti navode Ozturk i sar. (2021) za tradicionalno proizveden sudžuk, dok mnogi autori navode više vrijednosti za tvrdoću sličnih proizvoda (Stajić i sar., 2017; Franco i sar., 2020; Yan i sar. 2022). Na teksturu fermentisanih kobasicama u velikoj mjeri utiče sadržaj vlage i masti, tako da njihov veći sadržaj dovodi do manje tvrdoće i žvakljivosti proizvoda, koja se tokom skladištenja povećava (Stajić i sar., 2017).

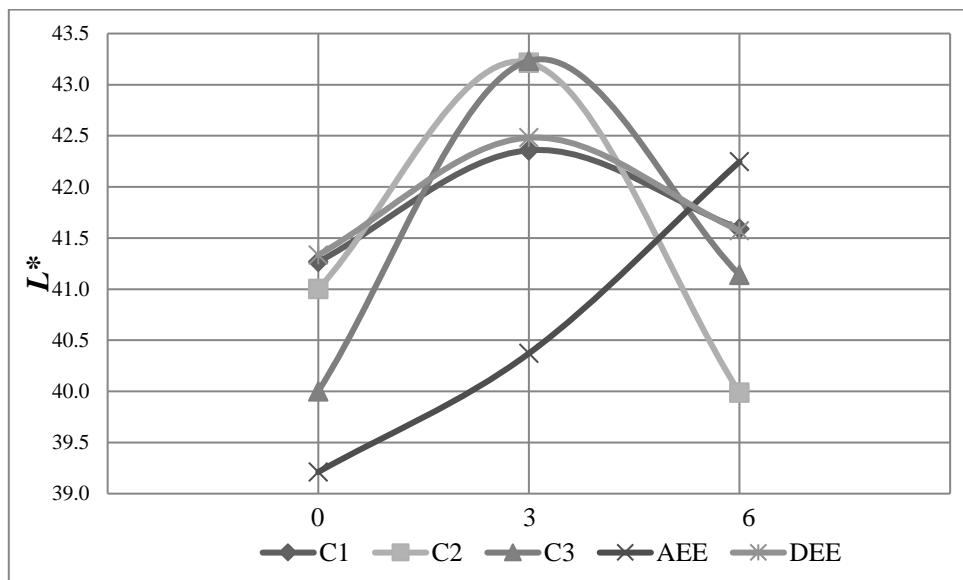
4.3.10. Mjerenje boje

Boja je jedan od važnih pokazatelja kvaliteta trajnih kobasicama. Proces formiranja boje je veoma kompleksan, naročito kod ove vrste proizvoda. Hemijske reakcije koje dovode do stvaranja karakteristične boje su veoma složene, i u velikoj mjeri zavise od pH vrijednosti, koncentracije

pigmenata, distribucije soli za salamurenje i uslova zrenja (Savanović, 2011). Promjene instrumentalnih pokazatelja boje izražene su preko prosječnih vrijednosti: svjetloće (L^*), udjela crvene boje (a^*) i udjela žute boje (b^*).

4.3.10.1. Vrijednost L^* površine omotača

Boja površine predstavlja važan pokazatelj kvaliteta, te je kao sastavni dio izgleda kobasice, izuzetno relevantna u smislu prihvatljivosti potrošača (Stajić i sar., 2017). Na *Grafiku 4.17.* prikazane su srednje vrijednosti promjene instrumentalnih pokazatelja svjetloće (L^*) utvrđenih na površini omotača ispitivanih uzoraka, nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).



Grafik 4.17. Prosječne vrijednosti L^ izmjerene na površini omotača ispitivanih uzoraka kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)*

Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da su nakon zrenja prosječne vrijednosti svjetloće (L^*) utvrđene na površini bile veoma ujednačene, i kretale su se u intervalu od 39.21 za uzorak AEE, do 41.34 za uzorak DEE (Prilog, *Tabela 7.12.*). Tokom skladištenja sličan trend se javlja kod svih uzoraka (osim AEE), gdje prvo dolazi do povećanja L^* vrijednosti kod svih uzoraka (40.37-43.23), a zatim do smanjenja (39.99-41.59). Kod uzorka AEE vrijednost L^* tokom skladištenja raste (sa 39.21 na 42.25).

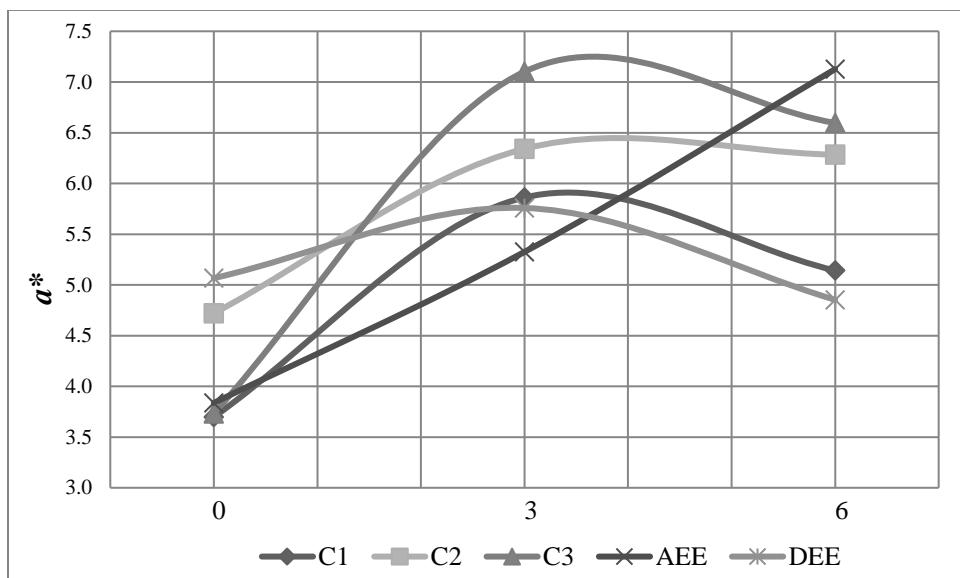
Nešto niže vrijednosti svjetloće površine fermentisanih kobasicama (30-33) navode u svom radu Ozturk i sar. (2021). Stajić i sar. (2017) potvrđuju da nakon zrenja i tokom skladištenja nije bilo

većih odstupanja u parametru svjetloće L^* , a vrijednosti koje su dobili bile su malo niže nego vrijednosti prikazane u ovom radu.

Kada je u pitanju boja površine, Hromiš (2015) ističe da se kod kobasicice sa slojem hitozana i uljem origana parametar L^* se mijenja tokom vremena, postepeno se smanjujući. Isti autor navodi sa kombinacijom hitozana i ulja kima dovodi značajnog povećanja svjetloće površine kobasicice, a ta promjena je izraženija a novonastala boja površine je stabilnija. Autor smatra da razlog ove razlike u boji može biti priroda eteričnog ulja, kao i upotrebljena koncentracija.

4.3.10.2. Vrijednost a^* površine omotača

Na *Grafiku 4.18..* su prikazane vrijednosti instrumentalnih pokazatelja udjela crvene boje (a^*) utvrđenih na površini omotača kobasicice, nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).



Grafik 4.18. Prosječne vrijednosti a^* izmjerene na površini omotača ispitivanih uzoraka kobasicice tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

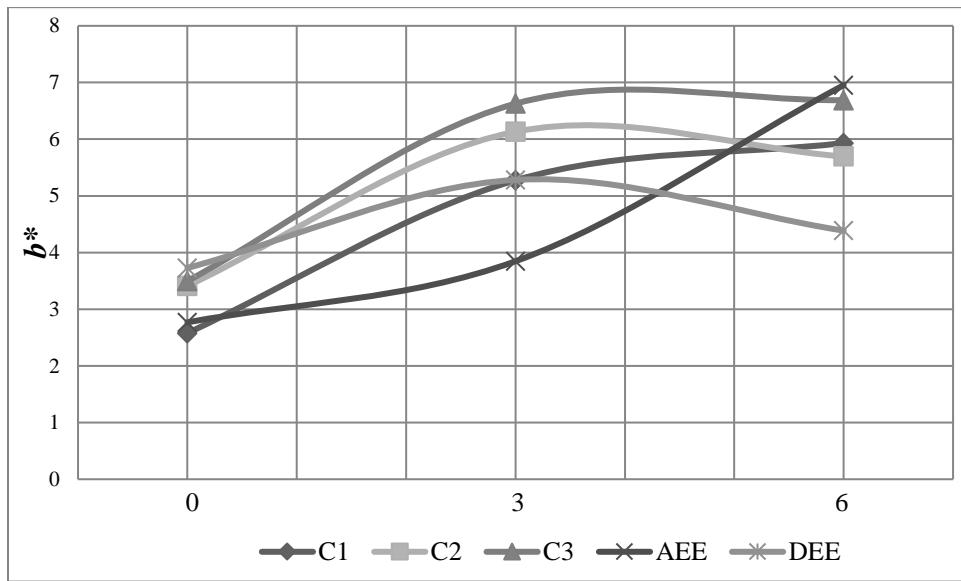
Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da su se, u gotovom proizvodu, prosječne vrijednosti udjela crvene boje (a^*) utvrđene na površini omotača uzorka, kretale u intervalu od 3.70 (uzorak C1), do 5.07 (uzorak DEE) (Prilog, Tabela 7.13.). Slična promjena, tokom skladištenja, može se primjeti kod svih uzoraka (osim kod uzorka AEE), vrijednost prvo raste a zatim lagano opada. Kod uzorka AEE, vrijednost parameta a^* tokom skladištenja raste.

Upotrebom premaza od hitozana sa dodacima (eterična ulja origana i kima) prilikom proizvodnje fermentisanih kobasicica, Hromiš (2015) ne uočava promjenu udjela crvene boje tokom

skladištenja, a vrijednosti su se kretale od 7 do 8. Nešto više vrijednosti za udio crvene boje (12-17.5) u sremskoj kobasici tokom skladištenja navode Stajić i sar. (2017), a u tradicionalnom sudžuku Ozturk i sar. (2021).

4.3.10.3. Vrijednost b^* površine omotača

Promjene instrumentalnih pokazatelja udjela žute boje (b^*) izmjerениh na površini omotača uzorka, nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci) prikazane su na *Grafiku 4.19.*



Grafik 4.19. Prosječne vrijednosti b^* izmjerene na površini omotača ispitivanih uzoraka kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Iz prikazanih rezultata možemo vidjeti da nije bilo većih odstupanja vrijednosti udjela žute boje b^* nakon zrenja, te da su se vrijednosti kretale u rasponu od 2.58 u uzorku C1, do 3.73 u uzorku AEE (Prilog, Tabela 7.14.). Tokom skladištenja prvo se kod svih uzorka se uočava rast vrijednosti b^* (3.85-6.63), da bi tokom daljeg skladištenja ta vrijednost malo varirala (4.39-6.69). Kod uzorka AEE se, i u slučaju ovog parametra boje, primjeti rast vrijednosti tokom skladištenja.

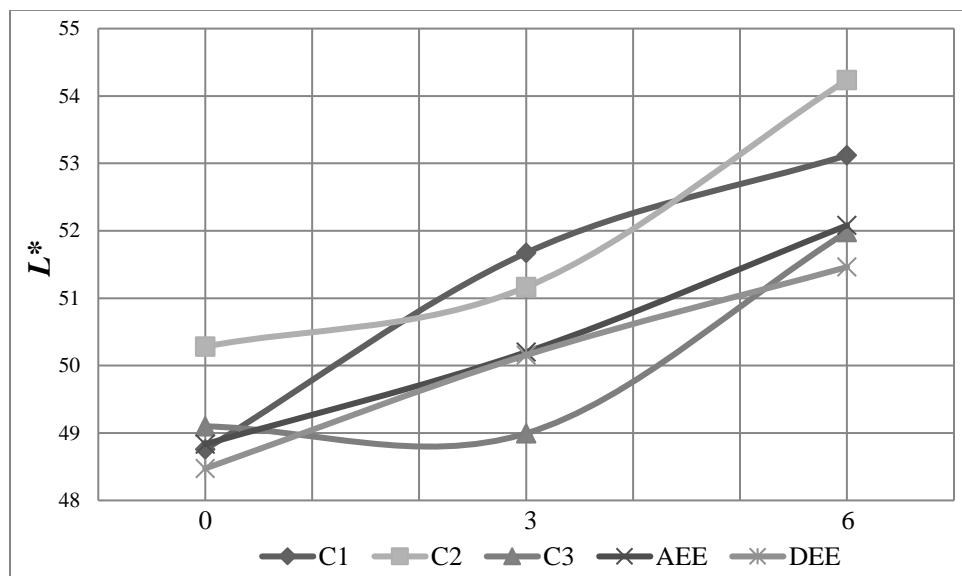
Vrijednosti za udio žute boje na površini fermentisanih kobasicica, ali nešto niže od prikazanih u ovom radu, prijavljuju Ozturk i sar. (2021), dok Stajić i sar. (2017) navode više vrijednosti (13.2-17). Hromiš (2015) navodi da se parametar boje b^* spoljne površine nije mijenjao u toku skladištenja ni kod jedne ispitivane grupe kobasica sa hitozanskim omotačem, a vrijednosti su se kretale od 6 do 7.5.

4.3.10.4. Vrijednost L^* na presjeku

Na *Grafiku 4.20.* prikazane su srednje vrijednosti promjene instrumentalnih pokazatelja svjetloće (L^*) utvrđenih na presjeku ispitivanih uzoraka, nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

Iz prikazanih rezultata vidi se da su, nakon zrenja, prosječne vrijednosti svjetloće (L^*), utvrđene na presjeku, bile veoma ujednačene, i kretale su se u intervalu od 48.47 kod uzorka DEE, do 50.28 kod uzorka C2 (Prilog, *Tabela 7.15.*).

Poslije skladištenja od 3 mjeseca kod svih uzoraka dolazi do povećanja vrijednosti L^* , osim kod uzorka C3. Prosječna vrijednost L^* su se kretale u intervalu od 48.99 (uzorak C3) do 51.67 (uzorak C1).



Grafik 4.20. Prosječne vrijednosti $L^* \pm SD$ izmjerene na presjeku ispitivanih kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Nakon 6 mjeseci skladištenja vrijednosti L^* su bile više kod svih uzoraka. Najvišu vrijednost od 54.24 imao je uzorak C2, a najniža L^* vrijednost nađena je u uzorku AEE (51.46).

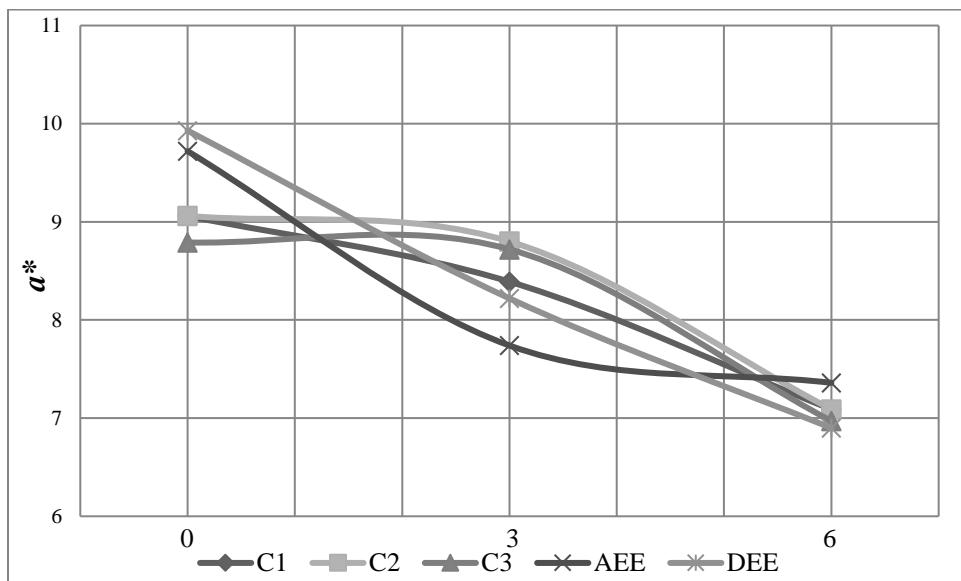
Lešić i sar. (2020) smatraju da u slučaju suvih fermentisanih kobasica, boja zavisi od niza faktora, kao što su: sastav kobasice, količina i vrsta primijenjenih začina i aditiva, kao i tehnoloških postupaka. Nešto više vrijednosti svjetloće navode (53.81-56.77) u svom radu Krol i sar. (2017) i smatraju da je upotreba alginata uticala na parametre boje, dok Bozkurt (2006) navodi da upotreba ekstrakata zelenog čaja i eteričnog ulja *Thymbra spicata* u sudžuku ne dovodi

do promjena vrijednosti parametra boje L^* . Kod većine autora vrijednost parametra L^* je znatno niža, i kreće se od 26 do 42 (Hromiš, 2015; Stajić i sar., 2017; Lešić i sar., 2020).

Stajić i sar. (2017) ističu da, tokom skladištenja fermentisanih kobasicica, nije bilo značajnih razlika vrijednosti parametra L^* . Analizom sudžuka sa premazom od hitozana i eteričnih ulja, Demirok Soncu i sar. (2018) nisu primjetili promjenu L^* vrijednosti boje. Do sličnih zaključaka dolazi i Hromiš (2015) u svom radu sa hitozaniskim omotačima. Isti autor, takođe, objašnjava da na smanjenje vrijednosti svetloće boje (L^*) na preseku fermentisanih suvih kobasicica utiče smanjenje sadržaja vode, dok zbog smanjenja pH vrijednosti, koje dovodi do umrežavanja miofibrila i istiskivanja dijela vode, dolazi do veće refleksije svjetlosti, a samim tim i do povećanja L^* vrijednosti.

4.3.10.5. Vrijednost a^* na presjeku

Na *Grafiku 4.21.* prikazane su vrijednosti instrumentalnih pokazatelja udjela crvene boje (a^*) utvrđenih na presjeku kobasicica, nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 meseci).



Grafik 4.21. Prosječne vrijednost $a^* \pm SD$ izmjerene na presjeku ispitivanih uzoraka kobasicica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da su vrijednosti udjela crvene boje (a^*) u gotovom proizvodu ujednačene kod svih uzoraka. Najniža vrijednost izmjerena je kod uzorka C3 u vrijednosti od 8.79, a najvišu vrijednost imao je uzorak DEE (9.93) (Prilog, Tabela 7.16.).

Tokom skladištenja sličan trend opadanja vidi se kod svih uzoraka, a vrijednosti su se kretale u rasponu od 6.90 kod uzorka DEE, do je najviše vrijednosti 7.36 izmjerene kod uzorka AEE..

Lešić i sar. (2020) navode vrijednosti udjela crvene boje slične prikazanim u ovom radu, dok mnogi autori navode više vrijednosti za udio crvene boje (Kamenik i sar., 2012; Krol i sar., 2017). U eksperimentima sa hitozanskim omotačima i upotrebom eteričnih ulja nije bilo promjene a^* vrijednosti tokom skladištenja (Hromiš, 2015; Demirok Sonku i sar., 2018). Kurt (2016) navodi da dodatak brašna od sjemenki grejpfruta dovodi do smanjenja udjela crvene boje u fermentisanim kobasicama tokom perioda zrenja i u toku skladištenja, vjerovatno zbog sadržaja pigmenta boje u upotrebljenom dodatku.

Lešić i sar. (2020) smatraju da niži sadržaj proteina dovodi do smanjenja a^* vrijednost, zbog razrjeđenja mioglobina, ali se rezultati ovog istraživanja takođe mogu dovesti u vezu sa dodatkom začinske paprike za koja utiče do smanjenja L^* vrijednosti i povećanje vrijednosti a^* i b^* . Drugi autori navode smanjenje udjela crvene boje tokom skadištenja kao rezultat denaturacije nitrozomioglobina (Bozkurt, 2006; Stajić i sar., 2017).

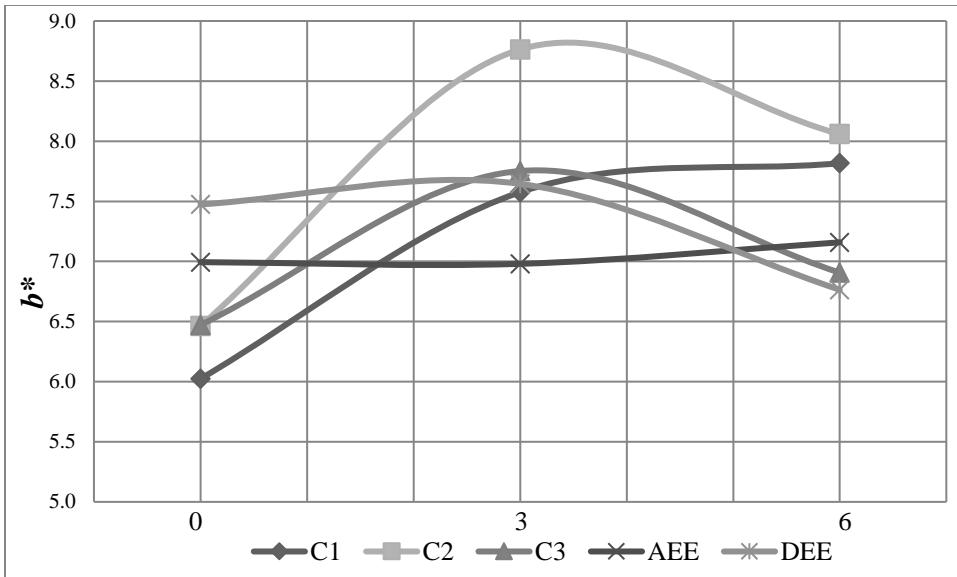
Smatra se da karakteristična tamno crvena boja presjeka fermentisanih kobasicice uglavnom potiče od crvene začinske paprike, kao i komponenata dima, a kao najverovatniji razlog opadanja vrijednosti a^* navodi se oksidacija komponenti crvene začinske paprike (Hromiš, 2015). Ozturk i sar. (2021) smatraju da je smanjenje udjela crvene boje sudžuka proizведенog sa dodanim mliječno-kiselinskim bakterijama, najvjerojatnije, uzrokovana mliječnom kiselinom koja izaziva denaturaciju mioglobina.

4.3.10.6. Vrijednost b^* na presjeku

Na *Grafiku 4.22.* prikazane su promjene instrumentalnih pokazatelja udjela žute boje (b^*) izmjerениh na presjeku uzorka, nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci).

Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da se vrijednosti udjela žute boje b^* , nakon zrenja, kreću u intervalu od 6.02 kod uzorka C1, do 7.47 kod uzorka DEE (Prilog, *Tabela 7.17.*).

Tokom skladištenja prvo je došlo do porasta b^* vrijednosti (osim kod uzorka AEE), da bi nakon 6 mjeseci došlo do opadanja vrijednosti udjela žute boje kod uzorka C2, C3 i DEE, a kod C1 i AEE ova vrijednost se neznatno povećala. Vrijednosti za b^* su se kretale u rasponu od 6.76 (DEE) do 8.06 (C2).



Grafik 4.22. Prosječne vrijednosti b^* izmjerene na presjeku ispitivanih uzoraka kobasicica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Slične podatke u istraživanjima navode Ozturk i sar. (2021). Bozkurt (2006) navodi da dodatak prirodnih i vještačkih antioksidanasa u fermentisane kobasicice nije imao uticaj na udio žute boje, a vrijednosti prikazane u njegovom istraživanju su nešto više od prikazanih u ovom radu. Takođe, on je ustanovio da tokom skladištenja dolazi do opadanja ove vrijednosti, a kao razlog navodi smanjenje sadržaja oksimoglobina koji doprinosi žutoj boji, zbog potrošnje kiseonika od strane mikroorganizama. S ovom tvrdnjom slaže se i Kurt (2016), koji navodi da dodatak brašna od sjemenki grejpfruta dovodi do smanjenja b^* vrijednosti tokom perioda zrenja i skladištenja, uslijed uticaja komponenti boje sjemenki grožđa (polifenoli). On, takođe, ističe da smanjenje udjela žute boje tokom zrenja može biti uzrokovan sušenjem fermentisanih kobasicica. Hromiš (2015) smatra da uzrok smanjenja vrijednosti parametra b^* može biti povećanje sadržaja soli, do koga dolazi zbog smanjenja sadržaja vlage u fermentisanim kobasicama.

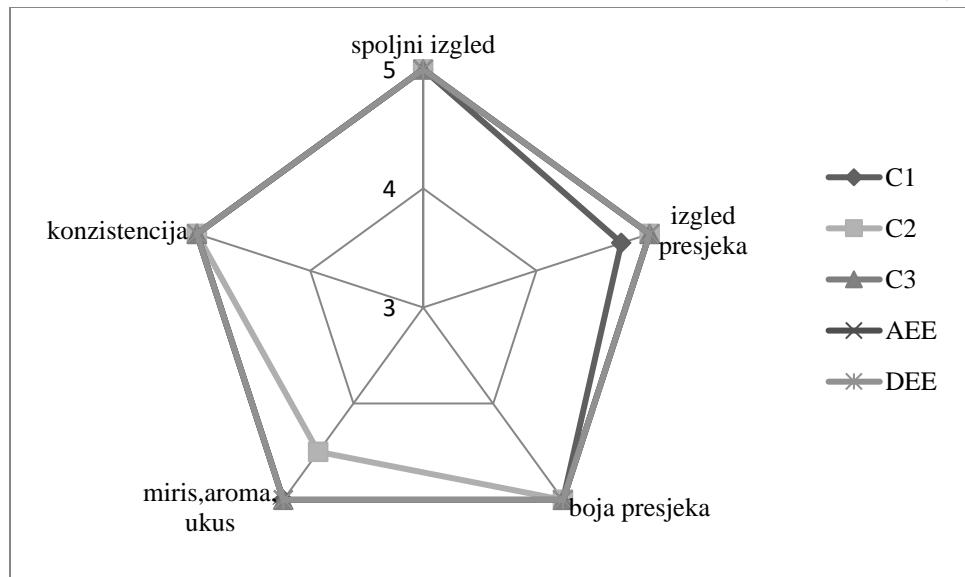
4.3.11. Senzorna analiza

Senzorna analiza ispitivanih uzoraka kobasicica je obuhvatala ocjenjivanje: spoljnog izgleda i stanja omotača, izgleda presjeka, boje presjeka, mirisa, ukusa i arume, te konzistencije ispitivanih grupa kobasicica nakon završenog zrenja i tokom skladištenja. Ocjenjivači su ispitivali svako senzorno svojstvo kvaliteta posebno i rezultate upisivali u ocjenjivačke listiće. Prilikom ocjenjivanja spoljnog izgleda proizvoda, posmatra se izgled omotača, oblik i čvrstoća proizvoda (koeficijent važnosti 2). Prilikom ocjene izgleda presjeka (koeficijent važnosti 5), posmatra se

raspored i veličina komadića mesa i masnog tkiva. Presjek treba da ima izgled mozaika, komadići mesa i masnog tkiva da su ravnomjerno raspoređeni; nadjev da je dobro povezan, bez vidljivih pukotina i šupljina, da nema izdvajanja masti ni pojave suvih rubova. Kod ocjene boje na presjeku (koeficijent važnosti 3) posmatra se boja komadića mesa i masnog tkiva u nadjevu, kao i promjene boje unutar poprečnog presjeka. Ujednačena crvena boja mišićnog tkiva i bijeličasta boja čestica masnog tkiva ocjenjuju se najvišom ocjenom. Zajedno sa ukusom, miris je veoma bitan u formiranju arome i prihvatljivosti ocjenjivanih proizvoda (koeficijent važnosti 7). Za fermentisane kobasice karakterističan je prijatan miris dimljenih proizvoda i priyatna, karakteristična aroma. Čvrstoća trajnih kobasicu zavisi od sastava proizvoda, od količine mesa i masnog tkiva, i dužine zrenja (koeficijent važnosti 2). Konzistencija treba da je postojana, čvrsto elastična, da je masa kompaktna i da se može sjeći u tanke listiće.

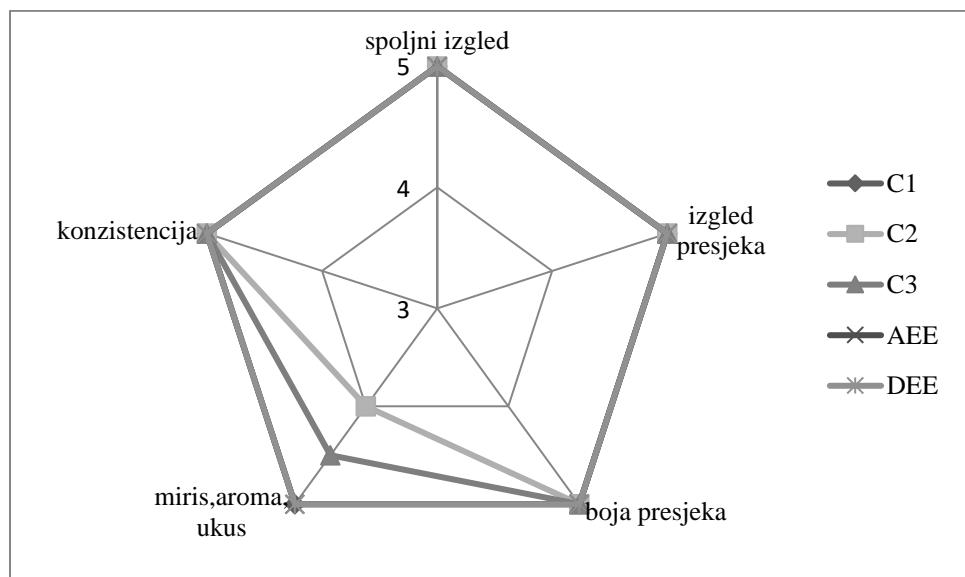
Prosječne ocjene za senzorne osobine ispitivanih uzoraka nakon zrenja (0) prikazane su na *Grafiku 4.23*. Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, spoljašnji izgled svih kobasicu na kraju procesa proizvodnje, nakon zrenja, bio je zadovoljavajući. Omotač je bio blago naboran, nije se odvajao od nadjeva i nije bilo prisutnih deformacija i oštećenja. Svi uzorci su dobili najvišu ocjenu. Kod uzorka AEE primjećena je intenzivnija boja omotača, koja je posljedica intenzivne boje korištenog ekstrakta u tretmanu omotača. Ovakav izgled ocjenjen je kao pozitivan, a sam proizvod je djelovao privlačnije.

Presjek proizvoda nakon zrenja imao je izgled mozaika, sastavni dijelovi su bili dobro povezani a unutar proizvoda nisu bile vidljive pukotine, sa izuzetkom uzorka C1 kog kojeg su primjećene male šupljine pa je samim tim dobio nižu ocjenu (4.5). Izgled presjeka ostalih kobasicu je dobio najvišu ocjenu. Boja presjeka nakon završenog zrenja bila je odgovarajuća za sve uzorke, komadići mesa bili su crvene boje, a čestice masnog tkiva bjeličaste boje. Svi uzorci su dobili najvišu ocjenu. Senzorna osobina kod kojih su se javile promjene su miris, ukus i aroma. Kod uzorka C2 pojavio se manje izražen miris dima i nespecifičan strani miris, a aroma dimljenih proizvoda je bila za nijansu manje izražena. Ovaj uzorak je ocjenjen ocjenom 4.5, dok su ostali uzorci dobili najvišu ocjenu (5). Konzistencija kobasicu nakon zrenja bila je zadovoljavajuća kod svih uzoraka. Prilikom rezanja, masa je bila kompaktna, a žvakljivost odgovarajuća. Svi uzorci su dobili najvišu ocjenu.



Grafik 4.23. Rezultati senzorne ocjene ispitivanih kobasica nakon zrenja

Ispitujući fermentisane kobasice sa omotačima od alginata, Krol i sar. (2017) nisu uočili značajne razlike u ispitivanim senzornim parametrima kod kontrolnih ili eksperimentalnih uzoraka. Senzorna ocjena provedena u finalnom proizvodu sa hitozanskim omotačima, koju su obavili Arslana i sar. (2018) pokazala je značajne varijacije samo za ukus, pri čemu su kobasice tretirane rastvorom hitozana 0.5% (w/w) imale značajno niže ocjene od ostalih. Hromiš (2015) navodi da prisustvo hitozanskog omotača bez ili sa etarskim uljem nije negativno uticalo na senzornu ocjenu, iako su ocjenjivači primetili prisustvo stranog mirisa i ukusa.



Grafik 4.24. Rezultati senzorne ocjene ispitivanih kobasica nakon 3 mjeseca skladištenja

Prosječne ocjene za senzorne osobine ispitivanih uzoraka nakon tri mjeseca skladištenja date su na *Grafiku 4.24*. Kao što se može primjetiti, i nakon tri mjeseca skladištenja izgled svih kobasic je bio zadovoljavajući. Nije bilo promjena u izgledu omotača i nije bilo prisutnih deformacija niti oštećenja. Svi uzorci su imali najvišu ocjenu (5).

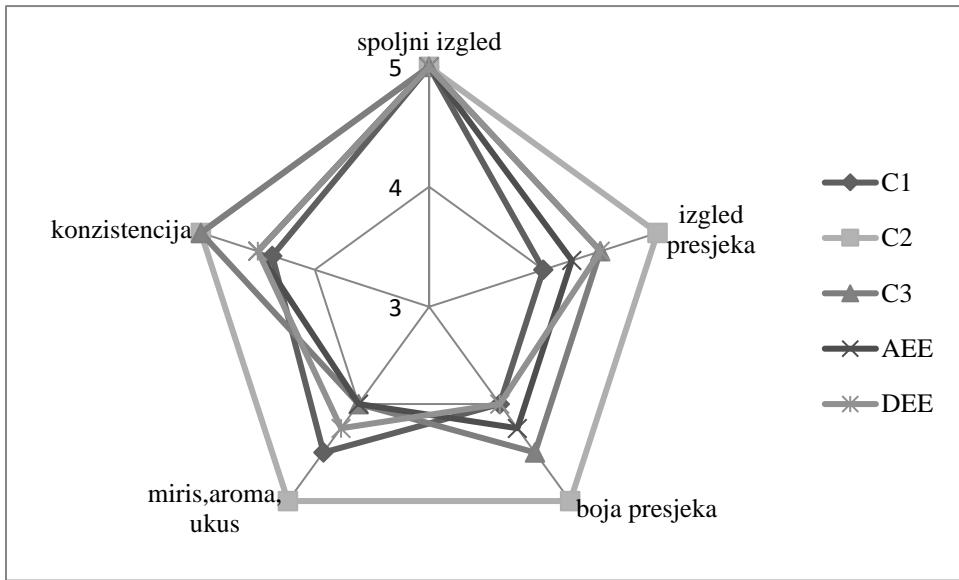
Na presjeku proizvoda nakon tri mjeseca skladištenja nije bilo vidljivih pukotina i svi uzorci su dobili najvišu ocjenu. Što se tiče boje presjeka nakon tri mjeseca skadištenja, nije bilo nikakvih promjena, boja je bila odgovarajuća za sve uzorce, i oni su imali najvišu ocjenu. Senzorna osobina kod koje su vidne promjene i nakon tri mjeseca skadlištenja su miris, ukus i aroma. Ponovo se izdvaja uzorak C2, kod kog se ponovo javlja nespecifičan strani miris, i kiseliji ukus, pa je uzorak dobio ocjenu 4.0. Kod uzorka C3 došlo je do pojave stranog mirisa, te je ocjenjen sa 4.5. Ostali uzorci su za miris, ukus i aromu dobili najvišu ocjenu, 5. Konzistencija kobasica se nije mijenjala nakon 3 mjeseca skladištenja, bila je zadovoljavajuća kod svih uzoraka (ocjena 5). Hromiš (2015) navodi nešto niže ocjene mirisa i ukusa za fermentisane kobasice sa omotačem od hitozana i eteričnog ulja origana, pošto je detektovan blag nekarakterističan miris. Isti autor navodi da je hitozanski premaz sa pčelinjim voskom imao minimalan uticaj na profil mirisa i ukusa ispitivanih kobasic.

Grafik 4.25. prikazuje prosječne ocjene za senzorne osobine ispitivanih uzoraka nakon 6 mjeseci skladištenja. Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, ocjene za spoljni izgled su i dalje visoke kod svih uzoraka, a ocjenjivači nisu imali komentar na promjene u izgledu i boji omotača. Ocjene za izgled presjeka kretale su se od 4 do 5. Uzorak C1 dobio je ocjenu 4, pošto sadržaj na presjeku nije bio kompaktan i u središtu su se pojavile vidljive pukotine.

Uzorak C2, imao je ocjenu 5, iako su primjećene jedva vidljive rupice, promjera $<1\text{mm}$. Kod uzorka C3 ocjenjivači prijavljuju vidljive pukotine, a ocjena za ovaj uzorak bila je 4.5, a isto je zaključeno i za uzorak DEE. Uzorak AEE dobio je ocjenu 4.25, takođe, zbog pojave pukotina na površini presjeka.

Posmatrajući boju presjeka, ocjene su se kretale od 4 do 5. Kontrolni uzorak C1 dobio je ocjenu 4, jer mu je boja presjeka bila neujednačena, izmjenjena uslijed pojave pukotina u središnjem dijelu. Uzorak C2 je najbolje ocjenjen (5), nije bilo promjena u boji (ravnomjerna). Kod uzorka C3, koji je dobio ocjenu 4.5, takođe je došlo do promjene u središnjem dijelu, zbog pojave pukotina. Uzorak DEE dobio je ocjenu 4, zbog pojave sive nijanse na površini presjeka. Slično je

i sa uzorkom AEE, samo što je nijansa sive nešto manje uočljiva nego kod uzorka DEE, a ocjena je 4.25.



Grafik 4.25. Rezultati senzorne ocjene ispitivanih kobasicama nakon 6 mjeseca skladištenja

Posmarajući promjene mirisa, ukusa i arome, ocjene su se kretale od 4 do 5. Uzorak C1 dobio je ocjenu 4.5, zbog pojave gorčine nakon gutanja. Uzorak C2 je i za ovu osobinu dobio najvišu ocjenu 5, bez ikakvih komentara od strane ocjenivača. Kod uzorka C3 javlja se kiseo ukus, kao i gorčina, i zato je dobio ocjenu 4. Kod uzorka DEE i AEE javlja se kiseo ukus različitog intenziteta, a ocjene su 4.25 i 4.0, pojedinačno.

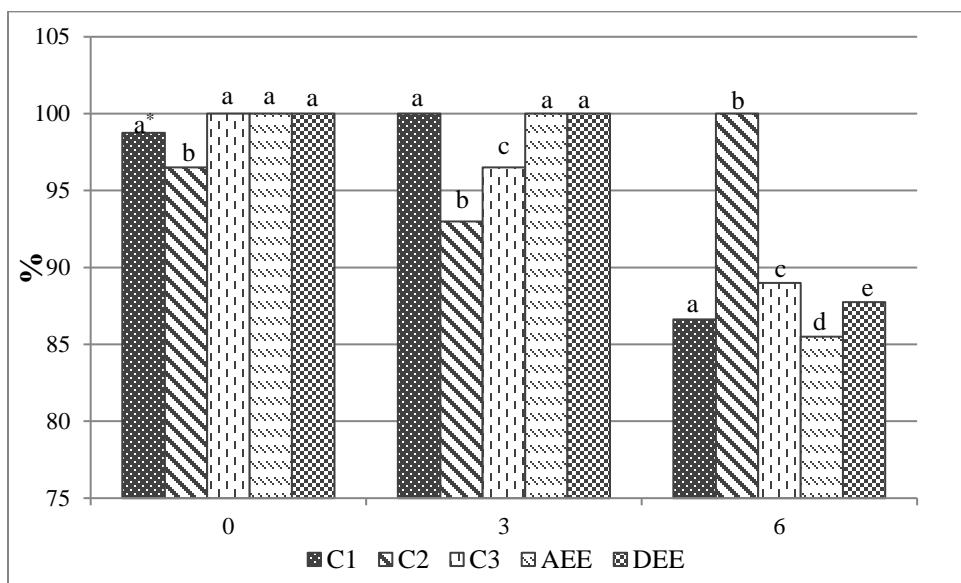
Ocjene za konzistenciju, se nakon 6 mjeseci skladištenja, su se kretale od 4.5 do 5. Uzorci C2 i C3 dobili su ocjenu 5; imali su kompaktnu masu i zadovoljavajuću žvakljivost. Kod uzorka C1, AEE i DEE ocjena je 4.5, pošto povezanost sastojaka nije zadovoljavajuća.

Hromiš (2015) navodi da toku skladištenja dolazi do pogoršanja senzornih svojstava, ali da nema značajne razlike između kontrolne kobasice i kobasice sa hitozanom. Kurt (2016) smatra da na senzorne osobine mogu uticati komponente dodatih antioksidanasa (tanini), navodi mnoga fenolna jedinjenja karakterišu pojava gorčine i trpkosti. Cunha i sar. (2018) su u svojim istraživanjima primijetili da dodatak praha ruzmarina u fermentisane kozje kobasice dovodi do poboljšanja senzornih osobina, te da ovaj dodatak ima uticaj na gubitak crvenila a sprečava i stvaranje neugodnog ukusa.

Grafik 4.26. prikazuje rezultate ocjena ukupnog senzornog kvaliteta ispitivanih kobasicama nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti

da je ukupni kvalitet svih uzoraka bio je prilično visok tokom cijelog perioda ispitivanja, kretao se od 85.5-100%, pri čemu nije bilo velikih odstupanja od maksimalnih pokazatelja kvaliteta.

Nakon zrenja najniži ukupni senzorni kvalitet imao je uzorak C2, zatim C1, dok su uzorci C3, AEE i DEE imali maksimalne ocjene (100%). Ocjene nakon 3 mjeseca skladištenja su i dalje veoma visoke. Najniže ocjene imao je, ponovo, uzorak C2, zatim C3, dok su ostali, opet, imali maksimalnih 100%. Na kraju ispitnog perioda, nakon 6 mjeseci skladištenja ocjene su nešto niže za sve uzorke (85.5-89%), osim za uzorak C2 koji je imao maksimalnih 100%.



Grafik 4.26. Rezultati ocjene ukupnog senzornog kvaliteta ispitivanih kobasicama tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Arslan i sar. (2018) navode da ocjenjivači nisu prijavili nikakve negativne promjene senzornog kvaliteta, koje bi mogle biti uzrokovane visokom koncentracijom hitozana korištenog na fermentisanim kobasicama, kao i da nema statistički značajnih razlika u ukupnoj prihvatljivosti, a s tim se slaže i Hromiš (2015). Demirok Soncu i sar. (2018) smatraju da rastvor hitozana u kombinaciji s timijanom ili ruzmarinom, nema značajnog uticaja na senzorne osobine turskih fermentisanih kobasicica, ali može da pozitivno utiče na sprečavanje površinskog rasta gljivica na njima. Ekstrakti nekih biljaka mogu uticati na poboljšanje boje mesa i proizvoda od mesa (Efenberger-Szmechtyk i sar., 2020).

U Tabeli 4.25. dati su rezultati ocjene senzornog kvaliteta ispitivanih uzoraka „difference from control“ - DFC testa (Whelan, 2017) nakon zrenja.

Tabela 4.25. Rezultati senzorne ocjene DFC testom za ispitivane uzorke kobasica nakon zrenja

	spoljni izgled	boja omotaca	boja	miris	ukus
C2	0*	0	0	-1	-1
C3	0	0	0	0	0
AEE	+2	+2	0	0	0
DEE	0	0	0	0	0

*0-nema razlike, 1-veoma mala razlika, 2- veoma mala do umjerena razlika

Korišćenjem „difference-from-control“ testa (DFC) neposredno nakon proizvodnje (0), u pogledu boje presjeka nije bilo razlike među uzorcima. Veoma mala razlika javlja se kod uzorka C2 u pogledu mirisa i ukusa, koji je bio malo lošiji nego kod kontrolnog uzorka. Veoma malo do umjerena razlika primjećena je kod uzorka AEE u pogledu boje omotača, omotač je imao intenzivniju crvenu boju te je davao ljepši izgled proizvodu.

Nakon tri mjeseca skladištenja (*Tabela 4.26.*), DFC test je pokazao da u spoljašnjem izgledu i boji presjeka nije bilo razlike između uzoraka i kontrole. Što se tiče mirisa, veoma malu razliku pokazao je uzorak C3, a uzorak C2 veoma malu do umjerenu razliku, odnosno bili su lošiji u odnosu na kontrolni uzorak. Ova dva uzorka, C2 i C3, su imali veoma malu razliku (negativnu) i po pitanju ukusa. Za boju omotača, uzorak AEE imao je veoma malu pozitivnu razliku, dok je uzorak DEE imao veoma malu negativnu razliku u odnosu na kontrolu.

Tabela 4.26. Rezultati senzorne ocjene DFC testom za ispitivane uzorke kobasica nakon 3 mjeseca skladištenja

	spoljni izgled	boja omotaca	boja	miris	ukus
C2	0*	0	0	-2	-1
C3	0	0	0	-1	-1
AEE	0	+1	0	0	0
DEE	0	-1	0	0	0

*0-nema razlike, 1-veoma mala razlika, 2- veoma mala do umjerena razlika

U *Tabeli 4.27.* prikazani su rezultati DFC testa za šesti mjesec skladištenja. Prema ovom testu, u pogledu spoljašnjeg izgleda i boje omotača nije bilo razlike između uzoraka i kontrole.

Boja presjeka kod uzorka C2 imala je umjerenu pozitivnu razliku, a kod uzorka C3 veoma malu pozitivnu razliku. Uzorak DEE imao je veoma malu negativnu razliku u boji presjeka. Za miris, veoma malu do umjerenu razliku (pozitivnu) pokazao je uzorak C2, dok ostali uzorci nisu imali razliku u odnosu na kontrolni uzorak.

Tabela 4.27. Rezultati senzorne ocjene DFC testom za ispitivane uzorke kobasica nakon 6 mjeseca skladištenja

	spoljni izgled	boja omotaca	boja	miris	ukus
C2	0*	0	+3	+2	+2
C3	0	0	+1	0	-2
AEE	0	0	0	0	-2
DEE	0	0	-1	0	-1

*0-nema razlike, 1-veoma mala razlika, 2- veoma mala do umjerena razlika, 3-umjerena razlika

Što se tiče ukusa, uzorak C2 je imao pozitivnu veoma malu do umjerenu razliku, dok su uzorci C3 i AEE imali negativnu veoma malu do umjerenu razliku. Uzorak DEE je pokazao veoma malu negativnu razliku u odnosu na kontrolu.

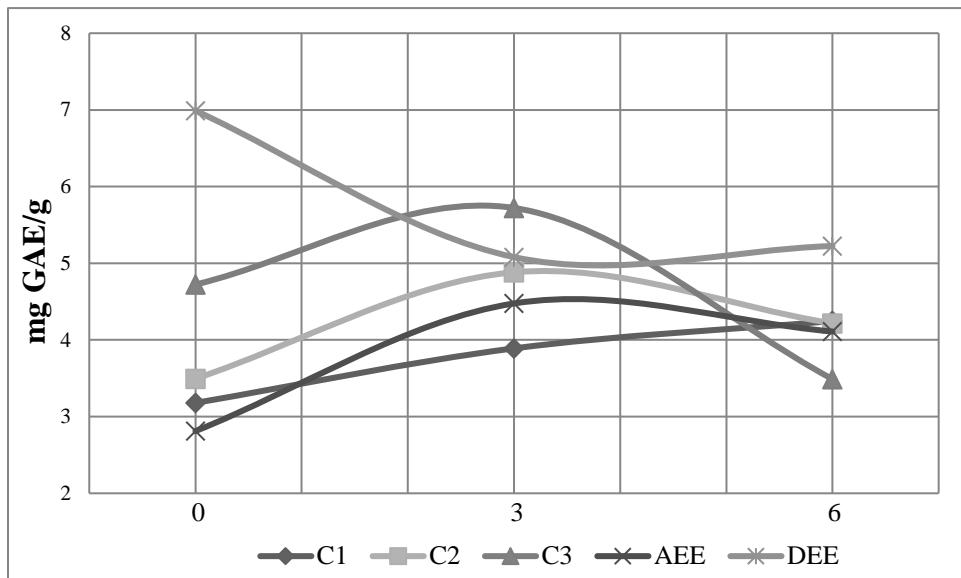
Zamuz i sar. (2018) navode da dodatkom biljnih ekstrakata dolazi do promjene boje uzorka, dok se miris i ukus ne mijenjaju. Arslan i sar. (2018) navode da je kod kobasica sa hitrozanskim omotačem razlike senzornih osobina prisutne samo u pogledu ukusa, dok Hromiš (2015) smatra da hitozanski premaz sa pčelinjim voskom minimalno utiče na profil mirisa i ukusa ispitivanih kobasic. U svom istaživanju fermentisanih kobasic prekrivenih natrijum alginatom, Krol i sar. (2017) nalaze da su razlike u boji, između uzorka, bile su vrlo malene i nisu bile vizuelno uočljive.

4.3.12. Antioksidativne osobine omotača

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) u omotačima nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci) prikazan je na *Grafičku 4.27*. Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, sadržaj TPC nakon zrenja se kretao od 2.812 mg GAE/g koliko je izmjereno u uzorku AEE, do 6.99 mg GAE/g u uzorku DEE (Prilog, *Tabela 7.18*). Iako je, na osnovu rezultata ispitivanja antioksidativnih osobina i ekstrakta aronije i omotača tretiranih rastvorima ekstrakta aronije, bilo očekivano da uzorak AEE ima visok TPC, analizom su ustanovljene prilično niske vrijednosti TPC.

Tokom 3 mjeseca skladištenja ustanovljeno je povećanje TPC vrijednosti kod svih uzoraka, osim kod uzorka DEE kod kojeg je sadržaj TPC opao. Vrijednosti su se kretale od 3.80 m GAE/g koliko je imao uzorak C1, do 5.721 mg GAE/g u uzorku C3. Daljim skladištenjem kod uzoraka C2,C3 i AEE TPC opada, dok kod C1 i DEE ta vrijednost raste. Sa grafika se može vidjeti da je uzorak DEE tokom cijelog perioda skladištenja imao znatno viši sadržaj TPC od kontrolnog

uzorka (18-50%). Na kraju perioda ispitivanja najvišu vrijednost TPC imao je uzorka DEE (5.225 mg GAE/g).

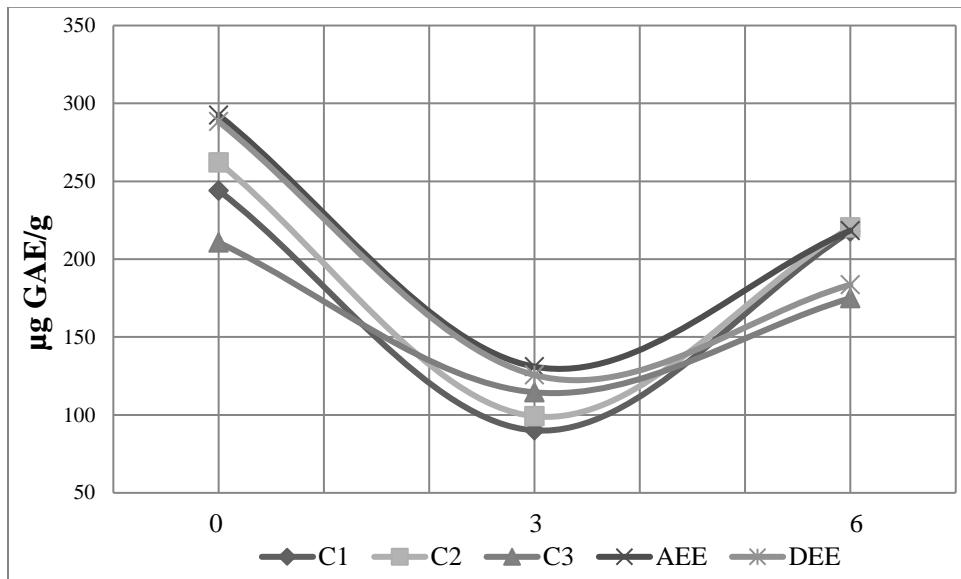


Grafik 4.27. Sadržaj TPC (mg GAE/g) u omotačima ispitivanih fermentisanih kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

Na sadržaj fenolnih jedinjenja, u raznim vrstama omotača koji se koriste za kobasice različitog tipa, može da utiče vrsta omotača. Lee i Kim (2020) su u svojim istraživanjima došli do saznanja da „yuba“ filmovi (od sojinog mlijeka) imaju veći sadržaj fenola od kolagenskih omotača. Takođe su zaključili da dodatak ekstrakata u filmove značajno povećava sadržaj fenola u njima. Poznato je i da brojne komponente dima imaju antioksidativno dejstvo, zbog sadržaja fenola (pirogalol, gvajakol i siringol i njihovi derivati), čije je antioksidativno dejstvo jednako ili veće od nekih sintetskih antioksidansa (BHT, BHA) (Sikorski, 2016). Antioksidativna svojstva dima potvrđuju mnogi autori (Holck i sar., 2017; Suvajdžić, 2018).

Vrijednost DPPH u omotačima nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci) prikazana je na *Grafiku 4.28*. Kao što se vidi iz rezultata, vrijednost DPPH nakon zrenja (0) se kretala od 0.211 µg GAE/g koliko je nađeno u uzorku C3, do 0.292 µg GAE/g u uzorku AEE (Prilog, *Tabela 7.19.*). Tokom skladištenja primjeti se sličan trend kod svih uzoraka (vrijednost prvo opada a zatim raste). Poslije tri mjeseca skladištenja najvišu izmjerenu vrijednost DPPH imali su uzorci DEE i AEE, 0.126 i 0.131 µg GAE/g, pojedinačno. Tokom daljeg skladištenja vrijednost za DPPH su porasle kod svih uzoraka i kretale su se od 0.175 µg GAE/g koliko je izmjereno u uzorku C3, do 0.220

$\mu\text{g GAE/g}$ u uzorku C2. Za uzorak DEE je izmjerene vrijednost od $0.184 \mu\text{g GAE/g}$, dok su uzorci AEE i C1 imali iste vrijednosti od $0.218 \mu\text{g GAE/g}$.



Grafik 4.28. Vrijednost DPPH ($\mu\text{g GAE/g}$) u omotačima ispitivanih uzoraka kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

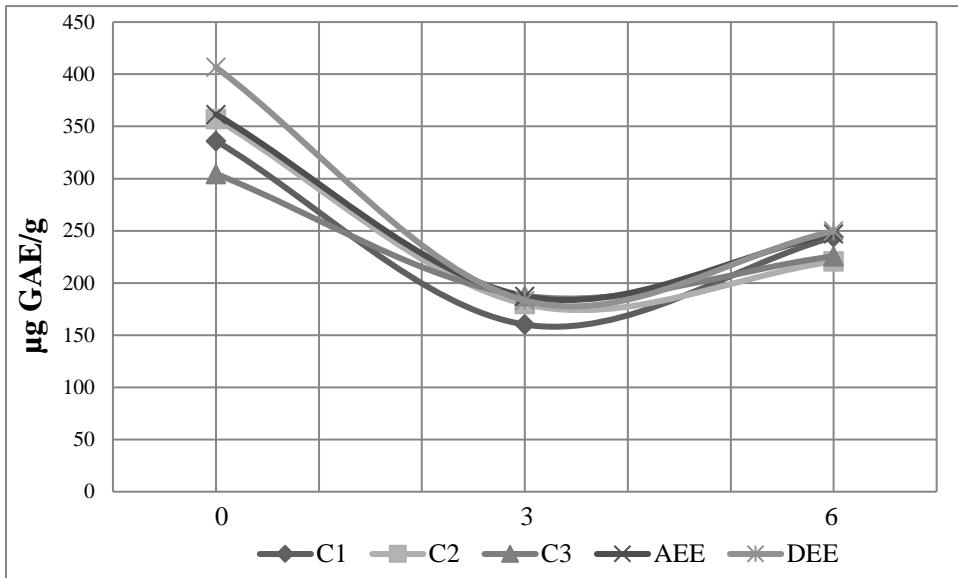
Krol i sar. (2017) su, analizirajući kobasicu sa omotačima od alginata, naveli vrijednosti DPPH od 7.61 do 8.62 mmol Trolox Eq./kg nakon zrenja i 5.54–5.97 mmol Trolox Eq./kg nakon 28 dana skladištenja, dok je u prikazanim rezultatima do primjetnijeg opadanja ove vrijednosti došlo u trećem mjesecu ispitivanja.

Lee i Kim (2020) smatraju da vrijednost DPPH, kao i kod TPC, zavisi od vrste ispitivanog omotača, te da su „yuba“ omotači pokazala 3.8-5.9 puta veću aktivnost prema DPPH. Mnogi autori se slažu da dodatak prirodnih antioksidanasa kao što su biljni ekstrakti utiče na povećanje antioksidativne aktivnosti omotača (Hromiš, 2015; Lee i Kim, 2020).

Prikaz rezultata vrijednosti ABTS u omotačima nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci) dat je na Grafiku 4.29. Kao što se može vidjeti iz rezultata, vrijednost ABTS se nakon zrenja kretala u intervalu od $0.305 \mu\text{g GAE/g}$ koliko je izmjereno za uzorak C3, do $0.407 \mu\text{g GAE/g}$, koliko je nađeno u uzorku DEE. Tokom skladištenja, kod svih uzoraka vrijednosti prvo opadaju, a zatim lagano rastu.

Vrijednost ABTS su se u trećem mjesecu skladištenja kretale od $0.160 \mu\text{g GAE/g}$ (C1) do $0.188 \mu\text{g GAE/g}$ (C3) (Prilog, Tabela 7.20.). Sadržaj ABTS nakon šest mjeseci skladištenja je bio prilično ujednačen i kretao se od $0.221 \mu\text{g GAE/g}$ koliko je izmjereno u uzorku C2, do $0.250 \mu\text{g GAE/g}$ (DEE).

GAE/g, koliko je izmjereno u uzorku DEE. Uzorci sa omotačima tretiranim biljnim ekstraktima tokom cijelog vremena skladištenja imali su vrijednosti više od kontrolnog uzorka.

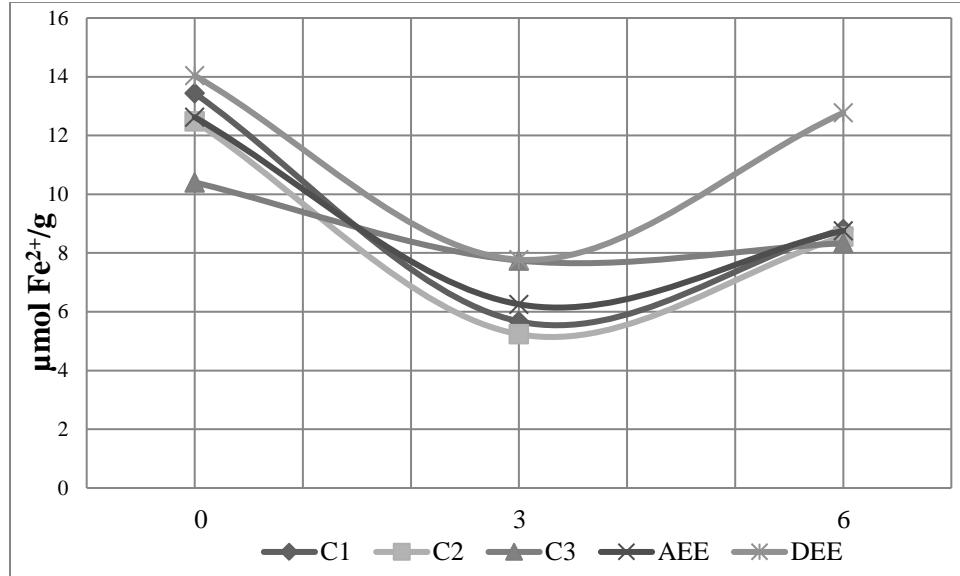


Grafik 4.29. Vrijednost ABTS ($\mu\text{g GAE/g}$) u omotačima ispitivanih uzoraka kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

U literaturi nema dostupnih podataka o ispitivanju antioksidativne aktivnosti omotača ABTS testom. Ipak, postoji snažna korelacija između DPPH, ABTS i FRAP testova (vrijednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije su u rasponu od 0.688 do 0.805), što pokazuje da su korišteni antioksidativni testovi efikasni i međusobno komplementarni za procjenu antioksidativnih aktivnosti ispitivanih uzoraka. Generalno, mnogi autori se slažu da dodatak ekstrakata ili eteričnih ulja utiče na poboljšanje antoksidativne aktivnosti upotrebljenih omotača ili premaza (Hromiš, 2015; Qiu i Chin, 2020; Lee i Kim, 2020).

Na *Grafiku 4.30.* prikazani su rezultati vrijednosti FRAP u omotačima ispitivanih fermentisanih kobasica nakon zrenja (0) i u toku skladištenja (3 i 6 mjeseci). Na osnovu prikazanih rezultata, može se vidjeti da je nakon zrenja vrijednost FRAP bila u intervalu 10.402-14.036 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (uzorci C3 i DEE, pojedinačno) (Prilog, *Tabela 7.21.*). Kod svih uzoraka primjećen je isti trend, prvo opadanje a zatim porast vrijednosti FRAP.

Tokom šestog mjeseca skladištenja najnižu vrijednost za FRAP imao je uzorak C3, 8.335 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, a najviša vrijednost izmjerena je u uzorku DEE, 12.771 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Tokom cijelog perioda skadištenja uzorak DEE imao je primjetno više vrijednosti od ostalih uzoraka, a oko 30% veću vrijednost za FRAP od kontrolnog uzorka C1.



Grafik 4.30. Vrijednost FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) u omotačima ispitivanih fermentisanih kobasica tokom skladištenja (0, 3, 6 mjeseci)

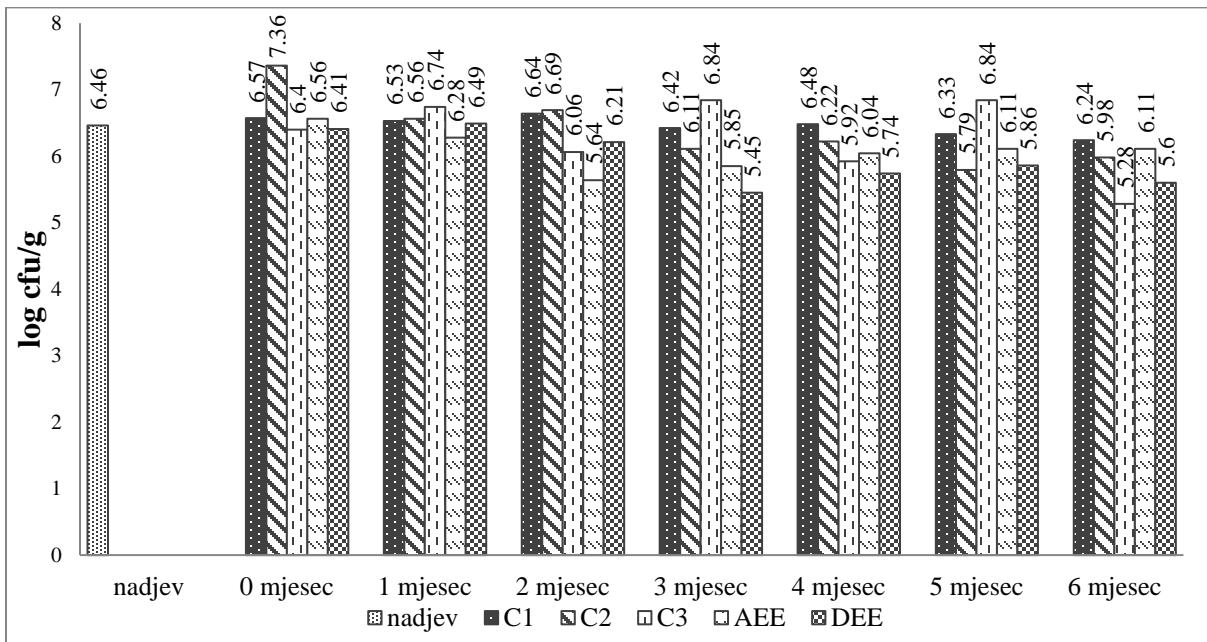
Ispitivanjem kobasica sa omotačima od alginata, Krol i sar. (2017) prijavljuju različite rezultate za FRAP, pri čemu navode više vrijednosti neposredno nakon zrenja nakon čega dolazi do opadanja vrijednosti tokom skladištenja.

Dominguez i sar. (2018) ističu da, iako se primjećuje da antioksidativni filmovi poboljšavaju vijek trajanja mesa, nema dovoljno informacija o uticaju metoda proizvodnje takvih filmova na njihov antioksidativni kapacitet. Takođe, oni smatraju da upotreba različitih antioksidansa, polimera i mesnih matrica u istraživanjima otežava njihovo poređenje.

4.3.13. Mikrobiološki status gotovog proizvoda

Ukupan broj bakterija, odnosno ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija, u nadjevu i u ispitivanim uzorcima nakon zrenja (0) i tokom 6 mjeseci skladištenja prikazan je na *Grafiku 4.31*. Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, ukupan broj bakterija u nadjevu bio je 6.46 log cfu/g. Dučić (2015) je u svom ispitivanju fermentisanih kobasica ustanovio da je u nadjevu sremske kobasice i sudžuka ukupan broj bakterija bio 5.9-6.0 log cfu/g. Slične vrijednosti navodi Kurt (2016) za fermentisane kobasice sa dodatkom brašna od sjemenki grejpfruta. Nešto više vrijednosti ukupnog broja bakterija (6.81 log cfu/g) za nadjev fermentisanih kobasica navode u svom radu Demirok Soncu i sar. (2018), Arslan i sar. (2018) navode vrijednosti ukupnog broja

bakterija od 7.19-7.34 log cfu/g u nadjevu turksog sudžuka, dok su Bozkurt i Erkmen (2002) za isti proizvod dobili vrijednosti ukupnog broje bakterija od 7.54 log cfu/g.



Grafik 4.31. Ukupan broj bakterija u nadjevu i u ispitivanim uzorcima kobasica tokom skladištenja

U gotovom proizvodu, nakon zrenja, ukupan broj bakterija se kretao u intervalu od 6.40 do 7.36 log cfu/g. Vrijednosti od 6.40 i 6.41 log cfu/g imali su uzorci C3 i DEE, pojedinačno, 6.56 i 6.57 log cfu/g uzorci AEE i C1, pojedinačno, dok je uzorak C2 imao najvišu vrijednost ukupnog broja bakterija od 7.34 log cfu/g. Analizirajući sudžuk sa premazom od hitozana i eteričnih ulja, Demirok Soncu i sar. (2018) navode da je na kraju zrenja ispitivanih fermentisanih kobasicama, sudžuka, došlo do povećanja ukupnog broja bakterija, a vrijednosti su se kretale od 7.83 do 8.81 log cfu/g. Capita i sar. (2006) smatraju da razlike u vrijednostima ukupnog broja bakterija zavise i od vrste mesa koje se koristi za dobijanje kobasicama (svinja, jelen...).

Nakon mjesec dana skladištenja, ukupan broj bakterija se kretao od 6.28 log cfu/g za uzorak AEE, do 6.74 log cfu/g za uzorak C3. Iz prikazanih rezultata vidi se da su omotači tretirani ekstraktima imali manji ukupan broj bakterija od kontrolnih uzoraka. Krol i sar. (2017) su, analizirajući fermentisane kobasicice sa omotačima od alginate, ustanovili da je došlo do porasta ukupnog broja bakterija nakon 28 dana skladištenja, s tim da je taj porast u kontrolnim uzorcima izraženiji a vrijednosti više za oko 25%.

Poslije dva mjeseca skladištenja, ukupna broj bakterija se kretao od 5.64 log cfu/g u uzorku AEE, do 6.69 log cfu/g u uzorku C2. Bozkurt i Erkmen (2002) su nakon skladištenja sudžuka ustanovili da je ukupna broj bakterija bio 6.3-6.7 log cfu/g. Nešto više vrijednosti navodi Kurt (2016) za fermentisane kobasicice sa dodatkom brašna od sjemenki grejpfruta.

Ukupan broj bakterija nakon tri mjeseca skladištenja kretao se od 5.45 log cfu/g, koliko je očitano za uzorak DEE, do 6.84 log cfu/g za uzorak C3, a uzorci sa omotačima tretiranim biljnim ekstraktima imali su niže vrijednosti od kontrolnih uzoraka. Kurt (2016) je ustanovio da dodatak brašna od sjemenki grejpfruta u sudžuk, u količini od 1.5 i 3%, dovodi do smanjenja ukupnog broja bakterija tokom skladištenja. Isti autor navodi da je, najvjerovaljnije, razlog za to sadržaj flavonoida u korištenom dodatku, pošto se antimikrobno dejstvo povezuje sa sadržajem flavonoida i njegovih derivata.

Poslije 4 mjeseca skladištenja, ukupan broj bakterija se kretao od 5.74 log cfu/g za uzorak DEE, do 6.48 log cfu/g za kontrolni uzorak C1.

Ukupan broj bakterija se nakon 5 mjeseci skladištenja kretao od 5.79 do 6.84 log cfu/g. Najnižu vrijednost imao je uzorak C2, a najvišu C3. Savanović (2019) je, analizirajući fermentisane kobasicice sa dodatkom različitih koncentracija etaričnih ulja kima, kleke i žalfije, ustanovio da se ukupan broj bakterija, nakon 150 dana skladištenja, kretao od 4.30 do 6.85 log cfu/g.

Nakon šest mjeseci skladištenja, ukupan broj bakterija se kretao od 5.28 log cfu/g u uzorku C3 do 6.24 log cfu/g za uzorak C1. Takođe, može se vidjeti da uzorak DEE na kraju perioda ispitivanja ima za oko 10% manji broj bakterija u odnosu na kontrolni uzorak. Veliki uticaj na razvoj mikroorganizama ima a_w vrijednost, a većina bakterija ne može rasti ispod vrijednosti a_w od 0.87 (Vuković, 2012; McNeil, 2019), što se slaže sa rezultatima mjerena aktiviteta vode koji su dobijeni u ovom istraživanju (*Grafik 4.7.*).

Savanović (2019) je ustanovio da je, nakon skladištenja od 225 dana, ukupan broj bakterija u fermentisanim kobasicama bio 4.38-7.38 log cfu/g. Kurt (2016) u svom istraživanju navodi da se tokom skladištenja smanjuje broj bakterija, te da smanjenje broja ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija može biti povezano sa načinom pakovanja (vakuum) i uslovima skladištenja u frižideru. Iz prikazanih rezultata, takođe, može se vidjeti da je, tokom cijelog perioda skladištenja, manji ukupan broj bakterija kod uzorka sa omotačima tretiranim biljnim ekstraktima, nego kod kontrolnog uzorka. Nikmaram i sar. (2018) navode da se upotrebom filmova sa antimikrobnim svojstvima početni broj bakterija može značajno smanjiti, kako na sobnoj temperaturi, tako i na

temperaturi skladištenja ($+4^{\circ}\text{C}$). Efenberger-Szmechtyk i sar. (2020) navode da biljni ekstrakti bogati polifenolima mogu produžiti rok trajanja mesa i mesnih proizvoda, tako što inhibiraju rast patogene mikroflore. Demirok Soncu i sar. (2018) zaključuju da ugradnja eteričnih ulja u hitozanski premaz i nanošenje na površinu kobasice, može, ali ne mora, uticati na prirodnu mikrofloru kobasica.

Enterobakterije su uobičajeni kontaminenti mesa i, samim tim se mogu naći u nadjevu u količinama koje zavise od inicijalnog opterećenja sirovina, tipa kobasice i faze zrenja. Početni broj *Enterobacteriaceae* u fermentisanim kobasicama smatra se pokazateljem sanitarnih uslova proizvodnje, a može da potiče od materijala za punjenje, radnog osoblja, opreme i alata koji se koriste u preradi ili iz atmosfere prostorije za zrenje (Krol i sar., 2017; Arslan i sar., 2018). U *Tabeli 4.28.* prikazan je ukupan broj enterobakterija u nadjevu i u ispitivanim uzorcima, nakon zrenja (0) i tokom 6 mjeseci skladištenja. Kao što se vidi iz *Tabele 5.28*, sadržaj enterobakterija u nadjevu je bio $<2 \log \text{cfu/g}$. Nakon zrenja i nakon mjesec dana skladištenja u svim ispitivanim uzorcima ukupan broj enterobakterija je bio $<2 \log \text{cfu/g}$.

Smjernicom/vodičem o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013) preporučeni su mikrobiološki kriterijumi za trajne kobasice, sa graničnom vrijednošću za enterobakterije $1-2 \log \text{cfu/g}$, te se može smatrati da ispitivani uzorci zadovoljavaju odredbe ove Smjernice.

Tabela 4.28. Ukupan broj enterobakterija u nadjevu i u ispitivanim uzorcima

log cfu/g	enterobakterije		nadjev			<2	
	0 mjesec	1 mjesec	2 mjesec	3 mjesec	4 mjesec	5 mjesec	6 mjesec
C1	<2	<2	\emptyset	<2	<2	\emptyset	\emptyset
C2	<2	<2	\emptyset	<2	<2	\emptyset	\emptyset
C3	<2	<2	\emptyset	<2	<2	\emptyset	\emptyset
AEE	<2	<2	\emptyset	<2	<2	\emptyset	\emptyset
DEE	<2	<2	\emptyset	<2	<2	\emptyset	\emptyset

Demirok Soncu i sar. (2018) za sadržaj enterobakterija u nadjevu sudžuka navode vrijednost 4.81 log cfu/g, i da tokom zrenja dolazi do značajnog opadanja ove vrijednosti, koje je više izraženo u uzorcima sa hitozanom i eteričnim uljima. Wojciak i Dolatowski (2012) slažu se da upotreba antioksidanasa, koji pokazuju neka bakteriostatska svojstva, mogu inhibirati razmnožavanje bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*.

Krol i sar. (2017) navode vrijednosti ukupnih enterobakterija ispod granice detekcije za fermentisane kobasice sa omotačima od alginata. Do istih podataka za fermentisane kobasice

došli su i Ivanović i sar. (2015), te smatraju da se eliminacija enterobakterija na kraju fermentacije može pripisati procesu acidifikacije, povećanoj količini soli, smanjenju vrijednosti i prisustvu bakterija mlijecne kiseline, odnosno njihovih produkata (bakteriocini). Analizirajući fermentisane kobasicice (sremska kobasica, sudžuk), Dučić (2015) je ustanovio da u gotovim proizvodima enterobakterije nisu prisutne.

Arslan i sar. (2018) su, u kobasicama sa hitozanskim omotačima, ustanovili značajno smanjenje ukupnog broja enterobakterija u početnim fazama prerađe, što su povezali sa visokom kiselošću i velikim sadržajem bakterija mlijecne kiseline, koji se smatraju dominantnom florom u ovim proizvodima.

Prisustvo enterobakterija u uzorcima nije ustanovljeno tokom daljeg skladištenja. Rezultati prikazani u ovom radu slažu se sa rezultatima koje su dobili Kurt (2016) i Savanović (2019). Efenberger-Szmechtyk i sar. (2020) ističu da upotreba biljnih ekstrakta utiče na smanjenje ukupnog broja entrobakterija u proizvodnji fermentisanih kobasicica.

U *Tabeli 4.29.* prikazan je ukupan broj koagulaza (+) stafilocoka u nadjevu i u ispitivanim uzorcima, nakon zrenja (0) i tokom šest mjeseci skladištenja.

Kao što se može vidjeti iz prikazanih rezultata, u nadjevu i u svim uzorcima tokom perioda skladištenja, ukupan broj koagulaza bio je ispod <2 log cfu/g. Smjernice/vodič o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013), kao granične vrijednosti za koagulazu (+) stafilocoka navodi 1-2 log cfu/g, pa se iz prikazanih rezultata može zaključiti da su ispitivani uzorci u skladu sa preporučenim vrijednostima.

Tabela 4.29. Ukupan broj koagulaza (+) stafilocoka u nadjevu i u ispitivanim uzorcima

log cfu/g	koagulaza (+) stafilocoka		nadjev				\emptyset
	0 mjesec	1 mjesec	2 mjesec	3 mjesec	4 mjesec	5 mjesec	
C1	\emptyset	<2	\emptyset	<2	\emptyset	\emptyset	\emptyset
C2	\emptyset	<2	\emptyset	<2	\emptyset	\emptyset	\emptyset
C3	\emptyset	<2	\emptyset	<2	\emptyset	\emptyset	\emptyset
AEE	\emptyset	<2	\emptyset	<2	\emptyset	\emptyset	\emptyset
DEE	\emptyset	<2	\emptyset	<2	\emptyset	\emptyset	\emptyset

Wojciak i Dolatowski (2016) su, za kobasicice sa prirodnim omotačima od kisele surutke i nekih biljnih ekstrakata (ruzmarin, kleka, sjeme gorušice), dobili rezultate koji su u skladu sa rezultatima ovog rada.

Kvasci i pljesni se veoma često mogu naći, u manjem ili većem broju, na površini ili u unutrašnjosti proizvoda, kao što su fermentisane kobasice. U *Tabeli 4.30.* prikazani je ukupan broj kvasaca i pljesni u nadjevu i u ispitivanim uzorcima, nakon zrenja (0) i u toku šest mjeseci skladištenja.

Tabela 4.30. *Ukupan broj kvasaca i pljesni u nadjevu i u ispitivanim uzorcima tokom 6 mjeseci skladištenja*

log cfu/g	Kvasci i pljesni		nadjev			<3.70	
	0 mjesec	1 mjesec	2 mjesec	3 mjesec	4 mjesec	5 mjesec	6 mjesec
C1	<2	<2	<3	<3	<3	<3	<3
C2	<2	<2	<3	<3	<3	<3	<3
C3	<2	<2	<3	<3	<3	<3	<3
AEE	<2	<2	<3	<3	<3	<3	<3
DEE	<2	<2	<3	<3	<3	<3	<3

Iz prikazanih rezultata vidi se da je ukupan broj kvasaca i pljesni u nadjevu bio manji od 3.7 log cfu/g. Nakon zrenja, kao i tokom cijelog perioda skladištenja, ukupan broj kvasaca i pljesni bio je <2 log cfu/g za sve ispitivane uzorke. Demirok Soncu i sar. (2018) navode da je u nadjevu sudžuka ukupan broj kvasaca i pljesni bio 5.39 log cfu/g, kao i da se tokom zrenja ova vrijednost malo smanjila. Takođe, oni navode da primjena hitozana i eteričnih ulja u proizvodnji sudžuka nije pokazala značajan uticaj na promjenu broja kvasaca i pljesni. Ispitivanja Bozkurta i Erkmena (2002) pokazuju da se na početku zrenja ukupan broj kvasaca i pljesni povećavao, da bi se do kraja zrenja i tokom skladištenja taj broj značajno smanjio. Krol i sar. (2017) prijavljuju porast ukupnog broja kvasaca i pljesni tokom skladištenja na kontrolnim uzorcima, dok je kod uzoraka sa alginatom kvasci i pljesni nisu detektovani. Savanović (2019) je analizom 60 varijanti fermentisanih kobasicica, sa dodatkom raznih eteričnih ulja, pronašao da je ukupan broj pljesni tokom skladištenja svih uzoraka ispod granice detekcije (<10 cfu/g). Ispitivanjem različitih vrsta fermentisanih kobasicica, Capita i sar. (2006) navode da je ukupan broj kvasaca i pljesni bio 3.8-4.0 log cfu/g. Lilić i sar. (2013) smatraju da je jedan od faktora koji utiče na pojavu pljesni i kvasaca dijametar kobasicice, jer je veći broj nađen je u kobasicama užeg dijametra, uslijed većeg prisutva kiseonika. Takođe ističu i uticaj dima, jer su kvasci osjetljivi na proces dimljenja.

Još neki od nepoželjnih mikroorganizama koji se mogu naći u fermentisanim kobasicama a koji predstavlja veliki rizik po zdravlje ljudi su sulfitoredučajuće klostridije. Smjernicom/vodičem o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013), preporučena je granična vrijednost za sulfitoredučajuće klostridije od 1-2 log cfu/g. U Tabeli 4.31. prikazan je ukupan broj sulfitoredučujućih klostridija u nadjevu i u ispitivanim uzorcima, nakon zrenja i u toku šest mjeseci skladištenja.

Tabela 4.31. Ukupan broj sulfitoredučujućih klostridija u nadjevu i u ispitivanim uzorcima

log cfu/g	Sulfitoredučujuće klostridije		nadjev			\bar{x}	
	0 mjesec	1 mjesec	2 mjesec	3 mjesec	4 mjesec	5 mjesec	6 mjesec
C1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
C2	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
C3	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
AEE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
DEE	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, ni u nadjevu, niti u uzorcima tokom skladištenja nisu registrovani ovi mikroorganizmi. Dobijeni rezultati su u skladu sa dozvoljenim vrijednostima datim u Smjernicama/vodiču o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013). Iste vrijednosti dobio je i Savanović (2019), ispitujući veći broj uzoraka sa dodatkom raznih eteričnih ulja, ali i mnogi drugi autori za različite vrste fermentisanih kobasica (Drosinos i sar., 2005; Gonzalez-Fandos i sar., 2021). Kako bi se opasnost od sulfitoredučujućih klostridija svela na minimum, za fermentisane proizvode od mesa se preporučuje dodatak nitrita/nitrata u minimalnoj količini od 100 ppm, uz minimalno 2.5% soli (<https://inspection.canada.ca>). Na smanjenje nepoželjnih bakterija u fermentisanim kobasicama utiču i prirodno prisutne bakterije mliječne kiseline. Njihove metaboličke aktivnosti imaju konzervišući efekat, jer djeluju na patogene mikroorganizme i mikroorganizme koji uzrokuju kvarenje hrane (Kröckel, 2013). Ovakvo dejstvo bakterija mliječne kiseline na sulfitoredučajuće klostridije, ustanovili su Hospital i sar. (2016).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata, dobijenih ispitivanjem antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja ekstrakata trnjine, drenjine, aronije i crvene trešnje, može se zaključiti sljedeće:

- Biljni ekstrakti su pokazali različito antioksidativno djelovanje. Etanolni ekstrakti su pokazali jaču antioksidativnu aktivnost od vodenih ekstrakata, u svim ispitivanim uzorcima, što je rezultat bolje rastvorljivosti polifenolnih komponenti u razblaženom etanolu u odnosu na vodu. Sadržaj ukupnih fenola (TPC) u ispitivanim biljnim ekstraktima kretao se 14.83-31.87 mg GAE/g s. e. u vodenim, i 38.34-54.11 mg GAE/g s.e u etanolnim ekstraktima. Redoslijed biljnih vrsta po opadajućem sadržaju ukupnih fenola u vodenim ekstraktima je sljedeći: crvena trešnja > aronija > drenjina > trnjina, a u etanolnim: trnjina > aronija > drenjina > crvena trešnja. Sadržaj ukupnih flavonoida (TF) je manji od sadržaja neflavonoida (TN) u vodenim ekstraktima kod svih uzoraka, dok je kod etanolnih ekstrakata TN veći samo kod drenjine.

U vodenim ekstraktima sadržaj flavonola kretao se od 1.1 do 7 mg QE/g s.e., a u etanolnim ekstraktima od 1.3 do 10.37 mg QE/g s.e. Najveći sadržaj nađen je u trnjini, u oba ekstrakta, a najmanji u drenjini, u oba ekstrakta.

Najveći sadržaj antocijana (>20 puta veći od ostalih biljnih vrsta) nađen je u aroniji, u oba ekstrakta. U vodenim ekstraktima sadržaj monomernih antocijana kretao se od 1.06 do 54.66 mg/g s.e., a za ukupne antocijane od 2.51 do 69.76 mg/g s.e. U etanolnim ekstraktima sadržaj monomernih antocijana je bio veći nego u vodenim ekstraktima i kretao se od 3.62 do 177.88 mg/g s.e., a ukupnih antocijana od 12.96 do 229.17 mg/g s.e.

Najbolju antioksidativnu aktivnost, mjerenu testovima (ABTS, DPPH i FRAP) pokazao je ekstrakt aronije (vodeni i etanolni) (izuzetak je ABTS kod etanolnog ekstakta). Vodeni ekstrakti su, u svim ispitivanim uzorcima, pokazali slabiju antioksidativnu aktivnost od etanolnih ekstrakata.

- Biljni ekstrakti pokazali su različito antimikrobo djelovanje. Vrijednost minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) prema *S. aureus* kretale su se od 7.5 mg/mL (TEE), do 120 mg/mL (TrVV). Najniže vrijednosti minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) imali su rastvori drenjine (EE, EV, VV) i aronije (EV).

Prema *B. cereus* vrijednost MIC kretale su se od 7.5 mg/mL (TEE, DEE, AEE, AEV), do 120 mg/mL (TrVV), a najnižu vrijednost MBC od 7.5 mg/mL imali su rastvori aronije (EE i EV).

Vrijednost MIC prema *E. coli* kretale su se od 15 mg/mL kod ekstrakata trnjine i drenjine (EE i VE), do >120 mg/mL (AVV). Najniže vrijednosti MBC imali su rastvori trnjine (VE) i drenjine (EE, VE).

Prema *S. enterica* vrijednost MIC kretale su se od 15 mg/mL (TEE, TVE, DEE, DVE), do >120 mg/mL (AVV), a najnižu vrijednost MBC od 15 mg/mL imao je rastvor drenjine (EE).

Antifungalnu aktivnost, prema pljesni *P. expansum* pokazali su jedino EE rastvori u najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 30 mg/mL, a do povećanja prečnika rasta pljesni dolazi tek nakon 4 dana. Ostali rastvori nisu pokazali antifungalnu aktivnost.

Nakon ispitivanja antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja omotača, tretiranih rastvorima ekstrakata trnjine, drenjine, aronije i crvene trešnje, može se zaključiti sljedeće:

- Prirodni omotači potopljeni u biljne ekstrakte pokazali su različite antioksidativno djelovanje. TPC u ispitivanim omotačima kretao se od 0.304 mg GAE/g (TrEV) do 6.861 mg GAE/g (AEE). Najviša vrijednost TPC nađena je u omotačima tretiranim ekstraktima aronije, i veoma su slični vrijednostima za uzorak sa vitaminom C (C2), koji je korišten kao kontrola antioksidativnog sredstva.

Vrijednosti za DPPH kretale su se od 0.028 mg GAE/g (TVE) do 1.259 mg GAE/g (AEV). Najviša vrijednost za DPPH nađena je u omotačima tretiranim rastvorima ekstrakata aronije.

Vrijednosti za ABTS kretale su se od 0.054 mg GAE/g (TVE) do 0.796 mg GAE/g (AEE), a najveće vrijednosti su pokazali omotači tretirani sa rastvorima aronije.

Vrijednosti za FRAP kretale su se od 2.414 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (TVE), do 38.131 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (AEE), a najveće vrijednosti su pokazali omotači tretirani sa rastvorima aronije (veoma visoke vrijednosti).

- Prirodni omotači, potopljeni u biljne ekstrakte, pokazali su različito antimikrobrovno djelovanje. Dejstvo prema *S. aureus*, u vidu kontaktne inhibicije (K.I.) pokazao samo DEV. Prorjeđen rast kulture *B. cereus* pokazao je omotač tretiran DEE rastvorom

ekstrakta. Dejstvo prema *S. enterica* u vidu inhibicije (I) su pokazali omotači tretirani rastvorima drenjine (DVV i DVE), a K.I. omotači tretirani rastvorima drenjine (DEV i DEE) i trnjine (TVV, TVE, TEE). Na *E. coli* K.I. su pokazali omotači TVV, DVV i AVV. Dobijeni rezultati ukazuju da korištene koncentracije ekstrakata u koje su bili potopljeni omotači, iako su bile više od izmjerениh MIC vrijednosti za pojedine ekstrakte, nisu bile dovoljne da oni pokažu značajnije antimikrobno dejstvo, iako je ustanovljeno da ispitivani omotači imaju pozitivan uticaj na antioksidativna svojstva. Pretpostavka je da je omotač zadržao manju količinu od potrebne za djelovanje na izabrane sojeve. Odavde proizilazi da se antimikrobne osobine biljnih ekstrakta mogu pripisati individualnim ili sinergijskim efektima različitih faktora, a ne samo sadržaju fenolnih materija.

Pregledom rezultata fizičkih, fizičko-hemijskih, hemijskih i senzornih promjena u toku zrenja i skladištenja tradicionalnih fermentisanih kobasicica, kao i lipolitičkih promjena i mikrobiološkog statusa, može se zaključiti sljedeće:

- Upotreba omotača tretiranog biljnim ekstraktom uticala je na očuvanje kvaliteta i održivost fermentisanih kobasicica tokom skladištenja. Primjena omotača tretiranih biljnim ekstraktima nije uticala na promjene pH i a_w vrijednosti, i dobijene vrijednosti nisu se razlikovale od kontrolnog uzorka.

Na sadržaj vode, pepela, soli, proteina i ukupnih masti u kobasicama, tretirani omotači nisu imali nikakav uticaj i nisu se razlikovali od kontrolnog uzorka.

- Praćenjem lipolitičkih promjena, može se zaključiti da je tokom skladištenja došlo do povećanja sadržaja slobodnih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima kobasicica, osim za AEE, kod koga je u toku zadnja tri mjeseca skladištenja došlo do smanjenja vrijednost za približno 5%.

Rezultati analize vrijednosti peroksidnog broja pokazali su da je tokom skladištenja došlo do njenog porasta, osim kod uzorka C2. Uzorak DEE je pokazao niže vrijednosti od kontrolnog uzorka.

Praćenjem napredovanja oksidacionog procesa MDA testom, vrijednosti tokom skladištenja su porasle u svim ispitivanim uzorcima i kretale su se od 0.74 do 1.90 mg/kg. U uzorcima sa tretiranim omotačima (AEE i DEE) tokom skladištenja su izmjereni manji sadržaji MDA, u odnosu na kontrolni uzorak, za približno 12%.

- Ispitivanjem teksture dolazi se do zaključka da je kod uzorka DEE došlo do povećanja tvrdoće tokom skladištenja. Uzorak AEE se tokom skladištenja ponašao slično kontrolnom uzorku, uz neznatno veću tvrdoću.

Posmatrajući boju površine kobasica, dolazi se do zaključka da je upotreba ekstrakta aronije imala uticaj na parametre boje. Tokom skladištenja došlo je do porasta svjetloće (L^*) i udjela crvene boje (a^*), a lagani porast je primijećen i kod udjela žute boje (b^*).

Kod parametara L^* i a^* na presjeku kobasica nije bilo većih promjena, a sličan trend je prisutan kod svih uzoraka. Udio žute boje (b^*) na presjeku nije se mijenjao samo kod uzorka AEE.

- Senzornim ispitivanjem uzorka kobasica, nakon zrenja i tokom 3 mjeseca skladištenja, ustanovljeno je da nije bilo razlike između ispitivanih uzoraka. Nakon šestog mjeseca skladištenja u uzorcima AEE i DEE je došlo do pojave kiselog ukusa različitog intenziteta, ali ocjene za ukupnu prihvatljivost su i dalje bile veoma visoke.

Rezultati „different from control“ - DFC testa pokazali su da je uzorak AEE vizuelno bio prihvatljiviji i imao ljepšu boju površine, što je potvrđeno i rezultatima ispitivanja boje omotača.

- Rezultati TPC dobijeni analizom omotača fermentisanih kobasic pokazali su da je uzorak DEE tokom cijelog perioda skladištenja imao znatno viši sadržaj TPC od kontrolnog uzorka (18-50%). Rezultati mjerjenja antioksidativne aktivnosti primijenjenim testovima (ABTS, DPPH, FRAP), takođe su pokazali da su vrijednosti mjernih parametara bile više kod uzorka AEE i DEE u odnosu na kontrolni uzorak.
- Ispitivanjem ukupnog broja bakterija došlo se do zaključka da su tokom cijelog perioda skladištenja uzorci AEE i DEE imali manji ukupan broj bakterija od kontrolnog uzorka. U pogledu ispitivanja prisustva drugih testiranih mikroorganizama (enterobakterija, koagulaza (+) stafilocoka, sulfitoredučujućih klostridija, kvasaca i plijesni), nisu ustanovljena odstupanja uzorka AEE i DEE u odnosu na kontrolni uzorak, a svi ispitivani uzorci su bili mikrobiološki ispravni.

Na osnovu svih rezultata istraživanja, generalno se može zaključiti sljedeće:

- upotreba omotača tretiranih ekstraktima pozitivno je uticala na smanjenje kiselinske vrijednosti, peroksidnog broja i sadržaja MDA, kao i na smanjenje ukupnog broja

bakterija u toku skladištenja u odnosu na kontrolni uzorak, a nije negativno uticala na senzorne osobine ispitivanih fermentisanih kobasicica.

- odabrani omotači pokazali su antioksidativnu aktivnost i pozitivno djelovanje u sprečavanju oksidativnih promjena u mastima, kao i antimikrobnu aktivnost koja je uticala na smanjenje ukupnog broja bakterija u kobasicama.
- pošto su razlike ispitivanih parametara u odnosu na kontrolu male, ali primjetne, u pogledu daljih istraživanja trebala bi se razmotriti upotreba viših koncentracija ekstrakata u tretmanu prirodnih omotača.

6. LITERATURA

1. Abdel-Hamied, A.A., Nassar, A.G., & El-Badry, N. (2009). Investigations on antioxidant and antimicrobial activities of some natural extracts. *World J. Dairy Food Sci.*, 4(1): 1-7.
2. Aberkane, A., Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Petrikou E., Mellado E., Monzon A., & Rodriguez-Tudela J.L. (2002). Comparative evaluation of two different method of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50. 719-722.
3. Adzaly, N.Z., Jackson, A., Villalobos-Carvajal, R., Kang, I., & Almenar, E. (2015). Development of a novel sausage casing. *Journal of Food Engineering*, 152. 24-31.
4. Ağlar, E., Saraçoğlu, O., Karakaya, O., Ozturk, B., & Gün, S. (2019). The relationship between fruit color and fruit quality of sweet cherry (*Prunus avium* L. cv. '0900 Ziraat'), *Turkish Journal of Food and Agriculture Sciences*, 1 (1). 1-5.
5. Alberto, M., Rinsdahl Canavosio, M., & Manca de Nadra, M. (2006). Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology*, North America.
6. Alhijazeen, M. (2014). Effect of oregano essential oil and tannic acid on storage stability and quality of ground chicken meat. Graduate Theses and Dissertations. Paper 13966.
7. Aminzare, M., Hashemi, M., Ansarian, E., Bimkar, M., Azar, H.H., Mehrasbi, M.R., Daneshamooz, S., Raeisi, M., Jannat, B., & Afshari, A. (2019). Using natural antioxidants in meat and meat products as preservatives: a review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 7(5). 417-426. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.5.417.426>.
8. Arslan, B., & Soyer, A. (2018). Effects of chitosan as a surface fungus inhibitor on microbiological, physicochemical, oxidative and sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat science*, 145. 107-113. doi:10.1016/j.meatsci.2018.06.012.
9. Aziz, M.A., Diab, A.S., & Mohammed, A.A. (2019). Antioxidant Categories and Mode of Action. In book edited by Emad Shalaby: Antioxidants. doi: 10.5772/intechopen.83544.
10. Aziz, S.G.G., & Almasi, H. (2018). Physical Characteristics, Release Properties, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Whey Protein Isolate Films Incorporated with Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Extract-Loaded Nanoliposomes. *Food Bioprocess Technol.*, 11. 1552-1565. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2121-6>.

11. Bajić-Ljubičić, J.. (2018). Varijabilnost sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova pet šumskih drvenastih vrsta sa različitim staništa u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Biološki Fakultet.
12. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.
13. Banach, M., Wiloch, M.Z., Zawada, K., Cyplik, W., & Kujawski, W. (2020). Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Anthocyanin-Rich Water-Soluble Aronia Dry Extracts. *Molecules*, 25.
14. Barros, J. R., Kunigk, L., & Jurkiewicz, C.H. (2010). Incorporation of nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. *Brazilian Journal of Microbiology* 41. 1001-1008. doi:10.1590/S1517-838220100004000019
15. BAS ISO 1443:2007 Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja ukupne masti.
16. BAS ISO 1841-1:2007 Meso i proizvodi od mesa – Određivanje sadržaja hlorida – Dio 1: Volhard metoda.
17. BAS ISO 936:2007 Meso i proizvodi od mesa - Određivanje ukupnog pepela.
18. BAS ISO 937:2007 Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja nitrogena (Referentna metoda).
19. Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239. 70-76.
20. Bijelić, S., Gološin, B., Ninić-Todorović, J., Cerović, S., & Bogdanović, B. (2011). Gajenje drena (*Cornus mas L.*) – šansa razvoja ruralnih područja i organske proizvodnje voća u Srbiji. *EnE11 – Sedma regionalna konferencija*. 23-27.
21. Blackhall, M.L., Berry, R., Davies, N.W., & Walls, J.T. (2018). Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits' *Prunus avium* 'Lapins' cherries, *Food Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.137>.
22. Bor, T., Aljaloud, S.O., Gyawali, R., & Ibrahim, S.A. (2016). Antimicrobials from herbs, spices, and plants. *Fruits, Vegetables, and Herbs*. 551-578. doi: 10.1016/B978-0-12-802972-5.00026-3.
23. Bošković, M. (2016). Ispitivanje uticaja odabranih etarskih ulja na rast *Salmonella* spp. u mesu svinja pakovanog u vacuum i modifikovanu atmosferu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine.

24. Bošnjaković A., (2017). Antioksidansi i njihov doprinos zdravlju i ljepoti kože (Završni rad). <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:147121>.
25. Botsaris, G., Orphanides, A., Yiannakou, E., Gekas, V., & Goulas, V. (2015). Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L. Extracts in Pork Sausages. *Food Technol. Biotechnol.*, 53 (4). 472–478.
26. Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., & Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42 9. 1931-1937.
27. Bozkurt, H. (2006). Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. *Meat Science* 73. 442-450, doi:10.1016/j.meatsci.2006.01.005.
28. Bozkurt, H., & Erkmen, O. (2002). Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). *Meat Science* 61(2). 149-156. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00176-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00176-0).
29. Brannan, R.G. (2008). Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *J. Food Sci.* 73(1). C36-C40.
30. Bräuñlich, M., Økstad, O., Slimestad, R., Wangensteen, H., Malterud, K., & Barsett, H. (2013). Effects of *Aronia melanocarpa* Constituents on Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. *Molecules*, 18. 14989 - 14999.
31. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21(7). 901. doi:10.3390/molecules21070901.
32. Burdock, G.A. (1997). Encyclopedia of Food and Color Additives. CRC Press. London
33. Bystrický, P., Marcinčák, S., Dičáková, Z., & Šulej, P. (2004). Dynamics of antioxidant activity during manufacturing of meat products and antioxidant activity prediction. *Meso*, VI, 2. 31–43.
34. Camo, J., Beltrán, J.A., & Roncalés, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat science*, 80, 4. 1086-91. doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.031.

35. Campos, C.A., Gerschenson, L.N., & Flores, S.K. (2010). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol.* 1-27. doi: 10.1007/s11947-010-0434-1.
36. Capasso, F., Gaginella, T.S., Grandolini, G., & Izzo, A.A. (2005). Fitoterapija- Priručnik biljne medicine. Prometej. Novi Sad.
37. Capita, R., Llorente-Marigómez, S., Prieto, M., & Alonso-Calleja, C. (2006). Microbiological profiles, pH, and titratable acidity of chorizo and salchichón (two Spanish dry fermented sausages) manufactured with ostrich, deer, or pork meat. *Journal of food protection*, 69, 5. 1183-9. doi: 10.4315/0362-028x-69.5.1183.
38. Casaburi, A., Aristoy, M.C., Cavella, S., Di Monaco, R, Ercolini, D., Toldrá, F., & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures, *Meat Science* 76, 2. 295-307.
39. Ciriano, M.G., Larequi, E., Berasategi, I., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2012). A lyophilized water extract of *Melissa officinalis* L. as an effective natural antioxidant during the storage of dry fermented sausages high in α-linolenic acid and DHA. *Journal of Food Science and Engineering*, 2. 56-63. doi:10.17265/2159-5828/2012.01.008.
40. Commisso, M, Bianconi, M, Di Carlo, F, Poletti, S, Bulgarini, A, Munari, F, Negri, S, Stocchero, M, Cealdo, S, Avesani, L, Assfalg, M, Zoccatelli, G, & Guzzo, F. (2017). Multi-approach metabolomics analysis and artificial simplified phytocomplexes reveal cultivar-dependent synergy between polyphenols and ascorbic acid in fruits of the sweet cherry (*Prunus avium* L.). *PLoS ONE* 12(7) e0180889, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180889> doi: 10.1371/journal.pone.0180889.
41. Cornescu, F., & Cosmulescu, S. (2017). Morphological and Biochemical Characteristics of Fruits of Different Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Genotypes from Spontaneous Flora. *Notulae Scientia Biologicae*. 9. 577. doi:10.15835/nsb9410161.
42. Coşkuner, Ö., Ertaş, A.H., & Soyer, A. (2010). The effect of processing method and storage time on constituents of Turkish sausages (sucuk). *Journal of Food Processing and Preservation*, 34. 125-135. doi:10.1111/j.1745-4549.2008.00328.x.

43. Cosmulescu, S., Trandafir, I., Cornescu, F. (2018). antioxidant capacity, total phenols, total flavonoids and colour component of Cornelian cherry (*Cornus mas L.*) wild genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-napoca*, 47. 390-394.
44. Cottone, E. (2009). Use of natural antioxidants in dairy and meat products: A review of sensory and instrumental analyses, Kansas State University.
45. Ćujić, N.M. (2017). Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott*, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet
46. Cunha, L.C.M., Monteiro, M.L.G., Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Muchenje, V., de Carvalho, F.A.L., Conte-Junior, C.A. (2018). Natural antioxidants in processing and storage stability of sheep and goat meat products. *Food Research International*, 111. 379–390. doi:10.1016/j.foodres.2018.05.041.
47. Dadi, D.W., Emire, S.A., Hagos, A.D., & Eun, J.B. (2019). Evaluation of Ultrasonic-Assisted Extraction of *Moringa stenopetala* Leaves on Bioactive Compounds and Antioxidant Effect. *Food Technology and Biotechnology*, 57(1). doi:10.17113/ftb.57.01.19.5877.
48. D'Alessandro, L.G., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Separation and Purification Technology*, 93. 42-47.
49. Daley, C.A., Abbott, A., Doyle, P.S., Nader, G.A., & Larson, S. (2010). A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition Journal*, 9:10. doi:10.1186/1475-2891-9-10.
50. Danilović, B., Joković, N., Petrović, L., Veljović, K., Tolinački, M., & Savić D. (2011). The characterisation of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovska Klobasa), *Meat Sci* 88(4). 668-74.
51. Dao, T., & Dantigny, P., (2011) Control of food spoilage fungi by ethanol, *Food Control* 22. 360-368. doi:10.1016/j.foodcont.2010.09.019.
52. Demeyer, D. (2004). Chapter 20: Meat fermentation: Principles and applications. In: *Handbook of Food & Beverage Fermentation Technology* (353–368). Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Hansen, A.S., Josephsen, J., Nip, W.K., Stanfield, PS., & Toldrá, F., eds., New York: Marcel Decker Inc.

53. Demirok Soncu, E., Arslan, B., Ertürk, D., Küçükkaya, S., Özdemir, N., & Soyer, A. (2018). Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Turkish fermented sausages (sucuk) coated with chitosan-essential oils. *LWT-Food Science and Technology*. doi: 10.1016/j.lwt.2018.06.049.
54. Denev, P., Číž, M., Kratchanova, M., & Blazheva, D. (2019). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities, *Food Chem.* 284. 108-117. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.108.
55. Dinda, B., Kyriakopoulos, A., Dinda, S., Zoumpourlis, V., Thomaidis, N., Velegraki, A., Markopoulos, C., & Dinda, M. (2016). *Cornus mas L.* (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. *Journal of ethnopharmacology* 193. 670-690.
56. Dobrucka, R., & Cierpiszewski, R. (2014). Active and intelligent packaging food - Research and development - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 64, 1. doi:10.2478/v10222-012-0091-3.
57. Domínguez, R., Barba, F.J., Gómez, B., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Pateiro, M., Santos, E.M., & Lorenzo, J.M. (2018). Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2018.06.073.
58. Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science* 69, (2). 307–317. doi:10.1016/j.meatsci.2004.07.012.
59. Dučić, M. (2015). Opšti higijenski parametri i odabrani bakterijski patogeni u proizvodnji fermentisanih suvih kobasica u Srbiji uz ispitivanje efekata termičkih tretmana, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
60. Ducic, M., Vranic, D., & Baltic, M. (2018). Selected physico-chemical properties of Serbian dry fermented sausages in different meat industries. *Scientific Journal "Meat Technology"* 59(2). 120-126. <https://doi.org/10.18485/meattech.2018.59.2.7>
61. Dumitrașcu, L., Enachi, E., Stănciuc, N., & Aprodu, I. (2019). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from cornelian cherry fruits using response

- surface methodology. *CyTA-Journal of Food*, 17:1. 814-823.
doi:10.1080/19476337.2019.1659418.
62. Đurović, S., Šorgić, S., Popov, S., Radojković, M., & Zeković, Z. (2018). Isolation and GC Analysis of Fatty Acids: Study Case of Stinging Nettle Leaves. Carboxylic Acid - Key Role in Life Sciences. doi:10.5772/intechopen.73533
63. Eça, K.S., Sartori, T., & Menegalli, F.C. (2014). Films and edible coatings containing antioxidants - a review. *Brazilian Journal of Food Technology* 17, 2. 98-112. <https://doi.org/10.1590/bjft.2014.017>.
64. Economou, K.D., Oreopoulou, V., & Thomopoulos, C.D. (1991). Antioxidant properties of some plant extract of the labiatate family. *JOACS* 68. 109-113.
65. Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., & Czyzowska, A. (2020). Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, doi:10.1080/10408398.2020.1722060
66. El-Alim, S.L.A., Lugasi, A., Hóvári, J., & Dworschák, E. (1999). Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *J Science Food Agric* 79. 277–85.
67. Eloff, J.N., Angeh, I.E., & McGaw, L.J. (2017). Solvent-solvent fractionation can increase the antifungal activity of a *Melianthus comosus* (Melianthaceae) acetone extract to yield a potentially useful commercial antifungal product. *Ind Crop Prod.* 110:103–12.
68. Eloff, J.N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19:106.
69. Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* 89, 259-279.
70. Estévez, M. (2021). Critical overview of the use of plant antioxidants in the meat industry: Opportunities, innovative applications and future perspectives. *Meat Science* 181. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108610>.
71. Estévez, M., & Heinonen, M. (2010). Effect of phenolic compounds on the formation of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron and myoglobin. *J.Agric. Food Chem.* 58. 4448-4455.
72. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCXMID). Determination of

- minimim inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9). 509-515.
73. Fellenberg, M.A., & Speisky, H. (2006). Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal*, 62. 53-70.
74. Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., & Neri, D. (2010). Cherry Antioxidants: From Farm to Table. *Molecules* 15. 6993 - 7005.
75. Fiorentino, A., Ricci, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Golino, A., Letizia, M., Piccolella, S., & Monaco, P. (2008). Potential food additives from Carex distachya roots: identification and in vitro antioxidant properties. *J Agric Food Chem* 56. 8218–25.
76. Fontana, P., Cocconcelli, S., & Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages, *Int. J. Food Microbiol*, 103. 131-142.
77. Franco, D., Martins, A.J., López-Pedrouso, M., Cerqueira, M.A., Purriños, L., Pastrana, L.M., Vicente, A.A., Zapata, C., & Lorenzo, J. (2019). Evaluation of linseed oil oleogels to partially replace pork backfat in fermented sausages. *Journal of the science of food and agriculture*. doi:10.1002/jsfa.10025.
78. Frank, J., Pompella, A., & Biesalski, H.K. (2002). Immunohistochemical Detection of Protein Oxidation. In: Armstrong, D. (eds) *Oxidants and Antioxidants. Methods in Molecular Biology™*, vol 196, Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-274-0:35>.
79. Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Sestili, P., Paolillo, M., & Ricci, D. (2009). *Prunus spinosa* fresh fruit juice: antioxidant activity in cell-free and cellular systems, *Natural Product Communications*, 4.
80. Freixanet, L. (2007). Additives and ingredients in the manufacture of whole muscle cooked meat products, Girona, Spain, www.metalquimia.com
81. Galić, K. (2009). Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 4, No. 1-2. 23-31.
82. Gegiu G., Branza A., Bucur L., Grigorian M., Tache T., Badea V., (2015), Contributions to the antimicrobial and antifungal study of the aqueous extract of *Prunus spinosa* L., Farmacia, Vol. 63, 2, pp. 275-279.
83. Glisic, M., Boskovic, M., Baltic, M., Trbovic, D., Suvajdzic, B., Vasilev, D. (2019). Fat replacement and PUFA enrichment challenges in fermented sausage production. *IOP*

- Conference Series: Earth and Environmental Science. 333. 012061. doi:10.1088/1755-1315/333/1/012061.
84. Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging, *Trends in Food Science & Technology* 35, Issue 1. 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.008>.
85. Gonçalves, J., Ramos, R., Luís, Â., Rocha, S., Rosado, T., Gallardo, E., & Duarte, A.P. (2019). Assessment of the bioaccessibility and bioavailability of the phenolic compounds of *Prunus avium* L. by in Vitro Digestion and Cell Model. *ACS Omega* 4 (4). 7605-7613. doi: 10.1021/acsomega.8b03499.
86. Gonzalez-Fandos, E., Vazquez de Castro, M., & Martinez-Laorden, A. (2021). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and natural microflora during the manufacture of Riojano Chorizo (Spanish dry cured sausage). *Microorganisms*, 9(9). 1963. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091963>.
87. González-Góme, D., Lozano, M., Fernández-León, M. F., Bernalte, M.J., Ayuso, M.C., & Rodríguez, A.B. (2010). Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 6. 533-539. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.02.008>.
88. Gralec, M., Wawer, I., & Zawada, K. (2019). *Aronia melanocarpa* berries: Phenolics composition and antioxidant properties changes during fruit development and ripening. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31. 214-221. doi:10.9755/ejfa.2019.v31.i3.1921.
89. Grujić, S. (2005). Prehrambeni aditivi – Funkcionalna svojstva i primjena, Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet
90. Hammou, F.B., Skali, S.N., Idaomar, M., & Abrini, J. (2010). Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (8). 1190-1195.
91. Han, J., & Rhee, K.S. (2004). Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cooked meat. *Meat Sci* 70. 25-33.
92. Hanbali, L.B., Amiry, J.G., Ghadieh, R.M., Hasan, H.A., Koussan, S.S., Nakhal, Y.K., Tarraf, A.M., Haddad, J.J. (2012). The antimicrobial activity of sweet cherry (*Prunus*

- avium)* extracts: II. Measurement of sensitivity and attenuation of gram-positive and gram-negative bacteria and *C. albicans* in culture. *Curr. Nutr. Food Sci.* 8. 292-303.
93. Hanušová, K., Dobiáš, J., & Klaudisová, K. (2009). Effect of Packaging Films Releasing Antimicrobial Agents on Stability of Food Products. *Czech Journal of Food Sciences*, 27. S347-S349. doi:10.17221/958-CJFS.
94. Hayaloğlu, A., & Demir, N. (2015). Physicochemical characteristics, antioxidant activity, organic acid and sugar contents of 12 sweet cherry (*Prunus avium L.*) cultivars grown in Turkey. *Journal of Food Science* 80, 3. C5. 64-70.
95. Heinz, G., & Hautzinger, P. (2007). Meat processing technology for small- to medium-scale producer, *Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional office for Asia and Pacific*. RAP Publication, Bangkok.
96. Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Method*, 44. 121-129.
97. Holck, A., Axelsson, L., McLeod, A., Rode, T.M., & Heir, E. (2017). Health and Safety Considerations of Fermented Sausages. *Journal of Food Quality*. 1-25. doi:10.1155/2017/9753894
98. Honikel, K.O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science* 78, 1-2. 68-76.
99. Hospital, X.F., Hierro, E., Stringer, S., Fernández, M. (2016). A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 218. 66-70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.009.
100. Hromiš, N. (2015). Razvoj biorazgradivog aktivnog ambalažnog materijala na bazi hitozana: sinteza, optimizacija svojstava, karakterizacija i primena, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
101. Hromiš, N.M., Šojić, B.V., Škaljac, S.B., Lazić, V.L., Džinić, N.R., Šuput, D.Z., Popović, S.Z. (2013). Effect of chitosan-caraway coating on color stability and lipid oxidation of traditional dry fermented sausage, *Acta periodica technologica*. 57-65.
102. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=95283595>.
103. <http://bioekokozlinger.hr/eko-proizvodi/divlja-tresnja/prunus-avium/>
104. <https://hipokrat.com.hr/aronija/>
105. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Aronija>.

- 106.https://hr.wikipedia.org/wiki/Crveni_drijen.
- 107.<https://hr.wikipedia.org/wiki/Trnina>.
- 108.<https://inspection.canada.ca/preventive-controls/meat/fermented-and-dried/eng/1522951036924/1522951037158#control>.
- 109.<https://www.narodnilijek.com/web/dren-biljka/>
- 110.<https://www.plantea.com.hr/trnina/>
- 111.Ibrahim, H.M., Abou-Arab, A.A., & Abu Salem, F.M. (2011). Antioxidant and antimicrobial effects of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. *Grasas y Aceites* 62, 2. 139-148. doi: 10.3989/gya.066510.
- 112.Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Bravo, F., Mulero, M., Muguerza, B., Arola-Arnal, A. (2019). Optimization and characterization of Royal Dawn cherry (*Prunus avium*) phenolics extraction. *Scientific Reports*, 9.
- 113.Ikonić, P. (2013). Razvoj procesa sušenja i zrenja tradicionalne fermentisane kobasice (Petrovská klobása) u kontrolisanim uslovima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
- 114.ISO 1442:1997 Meat and meat products — Determination of moisture content (Reference method) Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja vlage (Referentna metoda).
- 115.ISO 20645:2004 standard, Agar diffusion plate test.
- 116.ISO 2917:1999 pH BAS ISO 2917:2007 Meso i proizvodi od mesa - Mjerenje pH - Referentna metoda.
- 117.ISO 3960 (2001) peroxidni broj SRPS ISO 3960:2001, Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje peroksidnog broja
- 118.ISO 6564:1985 senzorika Sensory analysis — Methodology — Flavour profile methods
- 119.Ivanović, J., Pećanac, B., Janjić, J., Glišić, M., Đorđević, V., Stanišić, M., Glamočlija, N., Baltić, M. (2018). Uticaj izbora omotača na odabrane parametre bezbednosti i kvaliteta fermentisanih kobasicica. *Scientific Journal "Meat Technology"*, 56(2). 144-153.
- 120.Jaćimović, V., Božović, D., Ercisli, S., Bosančić, B., & Necas, T. (2020). Sustainable Cornelian Cherry Production in Montenegro: Importance of Local Genetic Resources. *Sustainability* 12(20). 8651. <https://doi.org/10.3390/su12208651>.

- 121.Jaganjac, M., Cacev, T., Čipak, A., Kapitanovic, S., Trošelj, K.G., & Žarković, N. (2012). Even stressed cells are individuals: second messengers of free radicals in pathophysiology of cancer. *Croatian Medical Journal*, 53. 304-309.
- 122.Jahani, S., Shakiba, A., & Azami, M. (2014). Functional properties, antibacterial and antioxidant activities of zataria multiflora encapsulated in geltin nanofilms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 04. 88-92. doi:10.15414/jmbfs.2014.4.2.88-92.
- 123.Jahić, S., & Pračić, N. (2018). The influence of raw materials and different fermentation intervals on quality parameters of the traditionally produced bosnian sudžuk, *Technologica Acta* 11, 1. 11-16.
- 124.Jašić, M., Spahić, E., Sarvan, E., Bašić, M., Vilušić, M., Suljkanović, A., Mujkanović, S., Hećimović, E., & Arnautović, N. (2012). Priručnik za proizvođače tradicionalnih prehrambenih proizvoda, *Nezavisni biro za razvoj, Gradačac/Modriča*. http://www.nbrudruzenje.org/images/publikacije/Prirucnik_za_proizvodj_%20tradic_%20pr_ _proizvoda_bs.pdf.
- 125.Jurendić, T., & Ščetar, M. (2021). *Aronia melanocarpa* products and By-Products for Health and Nutrition: A Review. *Antioxidants* 10. 1052. <https://doi.org/10.3390/antiox10071052>.
- 126.Jurikova, T., Mlček, J., Skrovankova, S., Sumczynski, D., Sochor, J., Hlaváčová, I., Snopek, L., & Orsavová, J. (2017). Fruits of Black Chokeberry Aronia melanocarpa in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22.
- 127.Kargozari, M., & Hamedi, H. (2019). Incorporation of essential oils (EOs) and nanoparticles (NPs) into active packaging systems in meat and meat products: A review. *Food & Health*, 2(1). 16-30.
- 128.Karwowska, M., Kononiuk, A.D., Borrajo, P., & Lorenzo, J.M. (2021) Comparative Studies on the Fatty Acid Profile and Volatile Compounds of Fallow Deer and Beef Fermented Sausages without Nitrite Produced with the Addition of Acid Whey. *Applied Sciences*. 11(3). 1320. <https://doi.org/10.3390/app11031320>

- 129.Kazimierski, M., Regula, J., & Molska, M. (2019). Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) – characteristics, nutritional and pro-health properties. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 18(1). 5–12. <http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0628>.
- 130.Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V. Fazly Bazzaz, B.S. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control* 8. 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>.
- 131.Kim, D.H., Kim, H., Kim, J., Bae, D., Song, K.Y., Chon, J.W., Lee, J.M., Kim, S.H., Lim, H.W., & Seo, K.H. (2018). Antibacterial activity of crude *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) extracts against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, and *Salmonella Enteritidis* in various dairy foods: Preliminary study. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 36. 155–163. doi: 10.22424/jmsb.2018.36.3.155.
- 132.Kim, D.O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S., & Lee, C.Y. (2005). Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J Agric Food Chem.* 28;53(26). 9921-7. doi: 10.1021/jf0518599. PMID: 16366675.
- 133.Kononiuk, A., & Karwowska, M. (2020). Bioactive Compounds in Fermented Sausages Prepared from Beef and Fallow Deer Meat with Acid Whey Addition. *Molecules* 25. 2429. doi: 10.3390/molecules25102429.
- 134.Kotze, M., & Eloff, J.N. (2002). Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *S Afr J Bot.* 68:62–7.
- 135.Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2012). Substances with Antibacterial Activity in Edible Films – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(4). 199-206. <https://doi.org/10.2478/v10222-12-0059-3>.
- 136.Krisch, J., Galgóczy, L., Tölgyesi, M., Papp, T., & Vágvölgyi, C. (2008). Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Acta Biologica Szegediensis* 52(2). 267-270.
- 137.Križanović, R. (2017). Utjecaj dimljenja na proteolitičke procese i oksidaciju proteina u suhoj šunki, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
- 138.Križić, I. (2016). Kemijski sastav i funkcionalna svojstva aronije, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno – tehnološki fakultet

- 139.Krkić, N., Lazić, V., Savatić, S., Šojić, B., Petrović, Lj., & Šuput, D. (2012a). Application of chitosan coating with oregano essential oil on dry fermented sausage, *Journal of Food and Nutrition Research* 51 (1). 60-68.
- 140.Krkić, N., Šojić, B., Lazić, V., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., & Tomovic, V. (2012b). Lipid oxidative changes in chitosan-oregano coated traditional dry fermented sausage Petrovska klobasa. *Meat science*. 93. 767-770. doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.043.
- 141.Kröckel, L. (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products" In Lactic Acid Bacteria: R & D for Food, Health and Livestock Purposes, edited by Marcelino Kongo. London: IntechOpen, doi:10.5772/51117.
- 142.Król, Ż., Kulig, D., Marycz, K., Zimoch-Korzycka, A., & Jarmoluk, A. (2017). The Effects of Using Sodium Alginate Hydrosols Treated with Direct Electric Current as Coatings for Sausages. *Polymers* 9, 11. 602. <https://doi.org/10.3390/polym9110602>.
- 143.Krstić, T. (2018). Antimikrobnno dejstvo ceđenih sokova i ekstrakata plodova odabranog voća porodice rosaceae, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet
- 144.Krzyściak, P., Krosniak, M., Gąstoł, M., Ochońska, D., & Krzyściak, W. (2011). Antimicrobial activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Postępy Fitoterapii*. 227-231.
- 145.Kucharska, A.Z., Szumny, A., Sokół-Łętowska, A., Piórecki, N., & Klymenko, S. (2015). Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 40. 95-102.
- 146.Kumaran, A., & Karunakaran, R.J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India, *Food Science and Technology*, vol. 40 (2). 344–352.
- 147.Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspar, M., Nahar, L., & Sarker, S.D. (2004). Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. *Fitoterapia*. 75(1). 77-80.
- 148.Kurćubić, V., Bogosavljević-Bošković, S., Petrović, M., & Mašković, P. (2011). Sadržaj natrijum-hlorida i natrijuma u proizvodima od mesa različitih grupa, *Tehnologija mesa* 52, 2. 225-233.
- 149.Kurćubić, V., Mašković, P., & Lilić, S. (2016). Senzorni i hemijski kvalitet sudžuka proizvedenog različitim tehnološkim postupcima. "XXI savetovanje o biotehnologiji" *Zbornik radova*, Vol. 21.(24).

- 150.Kurt, S. (2016). The Effects of Grape Seed Flour on the Quality of Turkish Dry Fermented Sausage (Sucuk) during Ripening and Refrigerated Storage. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 36(3). 300-308. doi:10.5851/kosfa.2016.36.3.300.
- 151.Lashgari, S.S., Noorolah, Z., Sahari, M.A., & Ahmadi Gavighi, H. (2020). Improvement of oxidative stability and textural properties of fermented sausage via addition of pistachio hull extract. *Food Sci Nutr.* 8. 2920– 2928. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1594>.
- 152.Lebert, I., Leroy, S., & Talon, R. (2007) Microorganisms in Traditional Fermented Meats, In: Handbook of fermented meat and poultry (113-124), Toldrá, F., Hui, Y.H., Astiasar'an, I., Nip, W.K., Sebranek, J.G., Silveira, E.T.F., Stahnke, L.H., & Talon, R. (Eds.), Iowa, USA: Blackwell Publishing
- 153.Lee, J., & Kim, Y. (2020). Application of soymilk skin as sausage wrapping for improving lipid oxidation. *Journal of Texture Studies* 51. 948-954. doi:10.1111/jtxs.12554.
- 154.Leichtweis, M.G., Pereira, C., Prieto, M., Barreiro, M., Baraldi, I., Barros, L., & Ferreira, I. (2019). Ultrasound as a Rapid and Low-Cost Extraction Procedure to Obtain Anthocyanin-Based Colorants from *Prunus spinosa* L. Fruit Epicarp: Comparative Study with Conventional Heat-Based Extraction. *Molecules*, 24.
- 155.Lembeck, L.G. (2009). Untersuchungen zur Produktionsqualität traditionellhandwerklich hergestellter Rohwürste unter Berücksichtigung von *Listeria monocytogenes*, Inaugural-Dissertation, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Giessen.
- 156.Lešić, T., Vahčić, N., Kos, I., Zadravec, M., Sinčić Pulić, B., Bogdanović, T., Petričević, S., Listeš, E., Škrivanko, M., & Pleadin, J. (2020). Characterization of Traditional Croatian Household-Produced Dry-Fermented Sausages. *Foods* 9(8). 990. <https://doi.org/10.3390/foods9080990>
- 157.Liepiņa, I., Nikolajeva, V., Jākobsone, I. (2013) Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*, *Environmental and Experimental Biology* 11. 195–199.
- 158.Liguori, A., Belsito, E.L., Gioia, M.L., Leggio, A., Malagrinò, F., Romio, E., Siciliano, C., & Tagarelli, A. (2015). GC/MS Analysis of Fatty Acids in Italian Dry Fermented Sausages. *The Open Food Science Journal*, 9. 5-13. doi:10.2174/1874256401509010005.

- 159.Lilić, S., Borović, B., & Vranić, D. (2013). Uticaj smanjenog sadržaja natrijum-hlorida na proces fermentacije i kvalitet suvih fermentisanih kobasica. *Tehnologija mesa*, 54(2). 150-159. <https://doi.org/10.5937/tehmesa1302150L>.
- 160.Lisica, P. (2016). Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- 161.Liyana-Pathirana, C.M., & Shahidi, F. (2005). Antioxidant Activity of Commercial Soft and Hard Wheat (*Triticum aestivum L.*) as Affected by Gastric pH Conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (7). 2433-2440.
- 162.López, C., Medina, L. M., Priego, R., & Jordano, R. (2006). Behaviour of the constitutive biota of two types of Spanish dry/sausages ripened in a pilot/scale chamber. *Meat Science* 73. 178-180.
- 163.Lucera, A., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M.A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in microbiology*, 3. 287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>.
- 164.Majić, S., & Filipović I. (2006). Greške kobasice, *Meso* 8, 1. 6-8.
- 165.Mäkinen, S., Hellström, J., Mäki, M., Korpinen, R., & Mattila, P.H. (2020) Bilberry and Sea Buckthorn Leaves and Their Subcritical Water Extracts Prevent Lipid Oxidation in Meat Products, *Foods* 9, 265. 1-14. doi:10.3390/foods9030265.
- 166.Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. *Frontiers in microbiology*, 6, 611. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00611>.
- 167.Man, Y., & Jaswir, I. (2000). Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refind, bleached and deodorized plam olein during deep-fat frying, *Food Chem.* 69. 301-307.
- 168.Mandić, A. (2007). Antioksidativna svojstva ekstrakata semena sorti belog grožđa. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- 169.Mandic, S., Savanovic, D., Velemir, A., Kalaba, V., Savanovic, J., & Jokanovic, V. (2018). Effect of incorporating blackthorn fruit *Prunus spinosa L.* extract in natural casing on quality of Kranjska sausage. *Meat Technology* 59, 2. 80-90. <https://doi.org/10.18485/meattech.2018.59.2.2>.

170. Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausages. *Meat Science* 73. 660-673.
171. Martinović, A., & Vesković-Moračanin, S. (2006). Primjena starter kultura u industriji mesa. *Tehnologija mesa* 47, 5–6. 216–230.
172. McNeil, J.M. (2019). The evaluation of pathogen survival in dry cured charcuterie style sausages, Theses and Dissertations - Animal and Food Sciences. 102. https://uknowledge.uky.edu/animalsci_etds/102. <https://doi.org/10.13023/etd.2019.074>.
173. Medić, H., Vidaček, S., Nežak, J., Marušić, N., & Šatorić, V. (2009). Uticaj ovitka i starter kulture na kvalitetu fermentisanih kobasica, *Meso XI*, 2. 113-122.
174. Mehta, S.K., & Gowder, S.J.T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. In Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. InTech. <https://doi.org/10.5772/61884>
175. Meng, L., Zhu, J., Ma, Y., Sun, X., Dongnan, L., Li, L., Bai, H., Guang, X., & Meng, X. (2019). Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* cultivated in Haicheng, Liaoning, China. *Food bioscience*, 30. 100413.
176. Mijatović, E. (2019). Antioksidativni sinergizam cijeđenog soka aronije i mješavine crnog vina triju sorti grožđa s područja Bujštine. Završni rad. Sveučilište u Rijeci. Medicinski fakultet.
177. Milanović-Stevanović, M., Vuković, I., Kočovski, T., & Marković, K. (2006). Uticaj začinskog bilja na promene masti tokom zrenja i skladištenja fermentisanih kobasica, *Tehnologija mesa*, 47, 1-2. 38-44.
178. Milenković, M. (2013) Fenolni sastav, antioksidativna i antimikrobnna aktivnost delova ploda i lišća *Prunus spinosa* L. iz Jugoistočne Srbije. Master rad. Univerzitet u Nišu. Prirodno-matematički fakultet. Departman za hemiju.
179. Milenkovic-Andjelkovic, A., Radovanović, B., Andjelković, M., Radovanović, A., Nikolić, V., & Randjelović, V. (2015). The anthocyanin content and bioactivity of cornelian cherry (*Cornus mas*) and wild blackberry (*Rubus fruticosus*): Fruit extracts from the Vlasina region. *Advanced technologies* 4(2). 26-31.

- 180.Milenković-Andjelković, S.A., Andjelković, Z., Radovanović, N., Radovanović, C.B., Nikolić, V. (2014). Phenol composition, DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts, *Hemisjska Industrija*, 69. 331-337.
- 181.Milinović, B., Dragović-Uzelac, V., Kazija, D.H., Jelačić, T., Vujević,, P., Čiček, D., Biško, A., & Čmelik, Z. (2016). Influence of four different dwarfing rootstocks on phenolic acids and anthocyanin composition of sweet cherry (*Prunus avium L.*) cvs. ‘Kordia’ and ‘Regina’, *Journal of applied botany and food quality*, 89. 29-37. doi:10.5073/JABFQ.2016.089.004.
- 182.Milutinović, M., Branković, S., Šavikin, K., Zdunić, G., Kostić, M., Miladinović, B., & Kitić, D. (2019). Hypothensive and antioxidant effects induced by polyphenol rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliott) juice. *Acta Medica Medianae*, 58(2). 70-76. doi:10.5633/amm.2019.0212.
- 183.Mišan, A. (2009). Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet. Departman za hemiju.
- 184.Mišković, A. (2016) Antioksidacijske metode: Metoda Orac. Diplomski rad. Sveučilište u Splitu. Kemijsko-Tehnološki fakultet.
- 185.Mitrović, R. (2016) Ispitivanje mogućnosti inaktivacije *Yersinia Enterocolitica* u fermentisanim kobasicama. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Fakultet Veterinarske Medicine.
- 186.Mohd Azman, N.A., Gallego, M.G., Segovia, F., Abdullah, S., Shaarani, S.M., Almajano, & Pablos, M.P. (2016). Study of the Properties of Bearberry Leaf Extract as a Natural Antioxidant in Model Foods. *Antioxidants* 5(2):11. <https://doi.org/10.3390/antiox5020011>
- 187.Mohr, T. (2018). Characterization of Anthocyanins in Aronia. Electronic Theses and Dissertations. 2441. <https://openprairie.sdsstate.edu/etd/2441>.
- 188.Mohsen, S.M., & Ammar, A.S.M. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry* 112, 3. 595-598. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.014>.
- 189.Moldovan, B, & David, L. (2014). Influence of temperature and preserving agents on the stability of cornelian cherries anthocyanins. *Molecules* 19(6). 8177-8188. doi:10.3390/molecules19068177.
- 190.Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N., & Bakri, M.M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing

- food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25. 361-366. doi:10.1016/j.sjbs.2017.02.004.
- 191.Namiki, M. (1990). Antioxidant antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29. 273-300.
- 192.Naveena, B.M., Sen, A.R., Vaithiyanathan, S., Babji, Y., & Kondaiah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science* 80, 4. 1304-1308.
- 193.Nazmi, N.N.M., & Sarbon, N. (2019). Characterization on antioxidant and physical properties of gelatin based composite films with incorporation of *Centella asiatica* (pegaga) extract. *Food Research* 4. 224-233. doi: 10.26656/fr.2017.4(1).243.
- 194.Nežak, S.J., Zdolec, N., Vidaček, S., Marušić, N., & Medić, H. (2011). Primjena starter kultura *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus* u proizvodnji kulena. *Meso XIII*, 2. 89–95.
- 195.Nikmaram, N., Budaraju, S., Barba, F.J., Lorenzo, J., Cox, R.B., Mallikarjunan, K., & Roohinejad, S. (2018). Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat science* 145. 245-255. doi:10.1016/j.meatsci.2018.06.031.
- 196.Nizioł-Łukaszewska, Z., Wasilewski, T., Bujak, T., Gaweł-Bęben, K., Osika, P., & Czerwonka, D. (2018). *Cornus mas L.* extract as a multifunctional material for manufacturing cosmetic emulsions, *Chinese journal of natural medicines* 16, 4. 284-292.
- 197.Nwakaudu, A., Nwakaudu, S., Owuamanam, C.I, & Iheaturu, N. (2015). The Use of Natural Antioxidant Active Polymer Packaging Films for Food Preservation. *Applied Signals Reports* 2. 38-50.
- 198.Ockerman, H.W., & Basu, L. (2007). Handbook of Fermented Meat and Poultry. In Fidel Toldrá (Edt.), Production and Consumption of Fermented Meat Products. 9-15. Blackwell Publishing.
- 199.Operta, S., Dževdetbegović, M., Čorbo, S., Tahmaz, J., & Šehović, A. (2012). Fizičko-hemijska i senzorna svojstva bosanskog sudžuka proizvedenog u kontrolisanim uslovima od svežeg ohlađenog i zamrznutog goveđeg mesa. *Tehnologija mesa* 53(2). 148-156. <https://doi.org/10.5937/tehmesa1202148O>.
- 200.Ortez, H.J. (2005). Disk diffusion Testing. In. Coyle B.M. ed. Manual of Antimicrobial susceptibility testing. 35-43.

- 201.Othman, L., Sleiman, A., & Abdel-Massih, R.M. (2019) Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Frontiers in Microbiology* 10:911. doi: 10.3389/fmicb.2019.0091.
- 202.Ozvural, E.B., Huang, Q., & Chikindas, M.L. (2016). The comparison of quality and microbiological characteristic of hamburger patties enriched with green tea extract using three techniques: Direct addition, edible coating and encapsulation. *LWT-Food Sci. Technol.* 68. 385-390.
- 203.Parunović, N., Petrović, M., Matekalo-Sverak, V., Radojković, D., & Radović, Č. (2014). Quality of Fermented Dry Kulen Sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38. 2061-2068. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12184>.
- 204.Pasini, F., Soglia, F., Petracci, M., Caboni, M.F., Marziali, S., Montanari, C., Gardini, F., Grazia, L., & Tabanelli, G. (2018). Effect of Fermentation with Different Lactic Acid Bacteria Starter Cultures on Biogenic Amine Content and Ripening Patterns in Dry Fermented Sausages. *Nutrients* 10(10). 1497. <https://doi.org/10.3390/nu10101497>.
- 205.Pavičić, Ž., Ostović, M. (2008). Proizvodnja kobasica u kućanstvu za vlastite potrebe. *Meso X*, 5. 369-373.
- 206.Pećanac, B. (2013). Uticaj izbora omotača na kvalitet tradicionalnih fermentisanih kobasica. Doktorska disertacija. Univerzitet u Banjoj Luci. Tehnološki fakultet.
- 207.Peighambardoust, S.H., Fasihnia, S.H., Peighambardoust, S.J., Pateiro, M., Domínguez, R., & Lorenzo, J.M. (2021). Active Polypropylene-Based Films Incorporating Combined Antioxidants and Antimicrobials: Preparation and Characterization. *Foods* 10. 722. <https://doi.org/10.3390/foods10040722>.
- 208.Perey-Alvares, J.A., Sazas-Barbera, M.E., Fernandes-Lopey, J., & Aranda-Catala, V. (1999). Physicochemical characteristic of Spanish-type dry-cured sausages. *Food Research International* 32. 599-607.
- 209.Petkova, N.Tr., & Ognyanov, M.H. (2018). Phytochemical characteristics and in vitro antioxidant activity of fresh, dried and processed fruits of Cornelian cherries (*Cornus mas* L.). *Bulgarian Chemical Communications, Volume 50*, Special Issue C. 302-307.
- 210.Petrović, Lj., Džinić, N., Tomović, V., Ikonić, P., & Tasić, T. (2007). Tehnološki elaborate o načinu proizvodnje i specifičnim karakteristikama proizvoda Petrovská klobása (Petrovačka kobasica), Rešenje o registraciji oznake geografskog porekla Petrovská klobása (Petrovačka

- kobasica) kao imena porekla za suvomesnati proizvod fermentisanu kobasicu, broj: 9652/06 G-03/06, 21.05.2007. godine, Republika Srbija, Zavod za intelektualnu svojinu.
- 211.Petrović, Lj., & Tasić, T. (2012) Organska i tradicionalna proizvodnja i prerada mesa. *Organska prerada*. Novi Sad. Srbija.
- 212.Pinacho, R., Caverio, R.Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., & Calvo, M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa L.*) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods* 19. 49-62. doi:10.1016/j.jff.2015.09.015.
- 213.Pinho, E., Magalhaes, L., Henriques, M., & Oliveira, R. (2011). Antimicrobial activity assessment of textiles: standard methods comparison. *Annals of Microbiology* 61. 493-498.
- 214.Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M.L., & Marques, A. (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids* 30, 1. 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.019>.
- 215.Piryaei, M., Babashpour-Asl, M., Abolghasemi, M. (2019). The effect of freezing and drying *Cornus mas L.* from phenols, flavonoids, anthocyanins, and total content of ascorbic acid and antioxidant activity in two methods. *Biologija* 65. doi:10.6001/biologija.v65i3.4087.
- 216.Pleadin, J., Lešić, T., Kresic, G., Bogdanović, T., Malenica, M., Kos, I., Pulić, B.S., Petricevic, S., Kušec, G., & Vahcić, N. (2020). Quality of istrian and slavonian dry-fermented sausages. *Italian Journal of Food Science*. 32. 605-621. doi: 10.14674/IJFS-1805.
- 217.Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., Januszewicz, E., & Warmińska-Radyko, I. (2013). Stability, microbiological quality and antioxidant properties of extract from berry fruits. *Acta Aliment.* 42(2). 256–263. doi: 10.1556/AAlim.42.2013.2.13.
- 218.Pozzo, L., Russo, R., Frassinetti, S., Vizzarri, F., Árvay, J., Vornoli, A., Casamassima, D., Palazzo, M., Della Croce, C.M., Longo, V. (2019). Wild Italian *Prunus spinosa L.* fruit exerts in vitro antimicrobial activity and protects against in vitro and in vivo oxidative stress. *Foods* 9(1). 5. doi:10.3390/foods9010005.
- 219.Pravilnik o izmjenama Pravilnika o prehrabnenim aditivima, Službeni glasnik BiH, broj 6/21.
- 220.Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za hranu, Službeni glasnik BiH, broj 11/13.
- 221.Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu, Službeni glasnik BiH, broj 79/16.

222. Pravilnik o prehrambenim aditivima, Službeni glasnik BiH, broj 33/18.
223. Pravilniku o usitnjrenom mesu, poluproizvodima i proizvodima od mesa, Službeni glasnik BiH, br.82/13.
224. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa ("Sl. glasnik RS", br. 50/2019).
225. Qiu, Z.Z., Chin, K.B. (2020). Physicochemical properties and shelf-life of low-fat pork sausages wrapped with active film manufactured by sodium alginate and cherry tomato powder, *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(9). 1470–1476.
<https://doi.org/10.5713/ajas.20.0132>
226. Radetić, P. (1997) Sirove kobasice, Monografija, Izdavač: autor
227. Radovanović, B., Andelković, S., Radovanović, A., & Andelković, M. (2013). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(5). doi:10.4314/tjpr.v12i5.23.
228. Radulović, N., Blagojević, P., Stojanovic-Radic, Z., & Stojanović, N. (2013). Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current Medicinal Chemistry* 20. 932-952.
229. Raesi, M., Tabaraei, A., Hashemi, M., & Behnampour, N. (2016). Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. *Int. J. Food Microbiol.* 238. 139–145.
230. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 9–10. 1231–1237.
231. Rede, R.R., & Petrović, S.Lj. (1997). Tehnologija mesa i nauka o mesu. Tehnološki fakultet. Novi Sad.
232. Rimpapa, Z., Toromanovic, J., Tahirovic, I., Šapčanin, A., & Sofic, E. (2007). Total content of phenols and anthocyanins in edible fruits from Bosnia. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 7(2) 119–122. doi: 10.17305/bjbms.2007.3064.
233. Rogawansamy, S., Gaskin, S., Taylor, M., & Pisaniello, D. (2015). An evaluation of antifungal agents for the treatment of fungal contamination in indoor air environments.

- International journal of environmental research and public health 12(6). 6319–6332.
<https://doi.org/10.3390/ijerph120606319>.
- 234.Roseiro, L., Gomes, A., & Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food and Chemical Toxicology* 49. 1340–1345.
- 235.Rovčanin, B.R., Ćebović, T., Stešević, D., Kekić, D., & Ristić M. (2015). Antibacterial effect of *Herniaria hirsuta*, *Prunus avium*, *Rubia tinctorum* and *Sempervivum tectorum* plant extracts on multiple antibiotic resistant *Escherichia coli*. *Bioscience Journal* 31, 6. doi:10.14393/BJ-v31n6a2015-29091.
- 236.Ruiz, J. (2007). Ingredients, In: Handbook of fermented meat and poultry (59–76), Toldrá, F., Hui, Y.H., Astiasar'an, I., Nip, W.K., Sebranek, J.G., Silveira, E.T.F., Stahnke, L.H., Talon, R. (Eds.), Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- 237.Ruiz-Rodríguez, M.B., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., De Cortes Sánchez-Mata, M., Cámara, M., & Tardío, J. (2014). Wild blackthorn (*Prunus spinosa L.*) and hawthorn (*Crataegus monogyna Jacq.*) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* 69(1). 61-73. doi:10.1051/fruits/2013102.
- 238.Ruiz-Torralba, A., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (2018). Antioxidant capacity, polyphenol content and contribution to dietary intake of 52 fruits sold in Spain. *CyTA - Journal of Food* 16. 1131 - 1138.
- 239.Rywotycki, R. (2007). The effect of baking various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry* 101. 540-548.
- 240.Sahari, M.A., & Asgari, S. (2013). Effects of Plants Bioactive Compounds on Foods Microbial Spoilage and Lipid Oxidation. *Food Science and Technology* 13. 52-61. 20134.
- 241.Saičić, S., Vasilev, D., Vuković, I., Trbovic, D. (2011). Lipid Oxidation in Kulen, Traditional Raw Sausage from Northern Serbia. *Conference: 9th Euro Fed Lipid Congress*, At: Rotterdam, Netherlands.
- 242.Salarbashi, D., Tajik, S., Shojaee-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R., & Noghabi, M.S. (2014). Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated Zataria multiflora Boiss and Mentha pulegium essential oils. *Food chemistry* 146. 614-22.

- 243.Sánchez-Ortega. I., García-Almendárez. B.E., Santos-López. E.M., Amaro-Reyes. A., Barboza-Corona. J. E., & Regalado. C. (2014). Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation, Hindawi Publishing Corporation, *The Scientific World Journal*, 1-18. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/248935>.
- 244.Santos, C., Gomes, A., & Roseiro, L.C. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons incidence in Portuguese traditional smoked meat products. *Food and Chemical Toxicology* 49. 2343–2347.
- 245.Šarić, B. (2016). Iskorišćenje tropa borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatom vrednošću. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Tehnološki fakultet.
- 246.Savanović, J. (2019). Uticaj dodatka etarskih ulja na kvalitet fino usitnjениh barenih i fermentisanih suvih kobasica. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Tehnološki fakultet.
- 247.Savić. M., & Popović. V. (2008) Svojstva, proizvodnja i promet začina, *Institut za ekonomiku poljoprivrede Beograd*, Beograd. 1-3.
- 248.Savić, Z., & Savić, I. (2004). Sausage Casings. Victus. Vienna.
- 249.Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols in chocolate: modern science investigates an ancient medicine. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 2073. S-2085S.
- 250.Serra, A., Duarte, R., Bronze, M., & Duarte, C. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry* 125. 318-325.
- 251.Serradilla, M., Lozano, M., Bernalte, M.J., Ayuso, M., López-Corrales, M., & González-Gómez, D. (2011). Physicochemical and bioactive properties evolution during ripening of 'Ambrunés' sweet cherry cultivar. *Lwt - Food Science and Technology* 44. 199-205.
- 252.Shahidi, F., Janitha, P.K., & Wanasundara, P. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32. 67-103.
- 253.Shahin, L., Phaal, S.S., Vaidya, B.N., Brown, J.E., & Joshee, N. (2019). Aronia (Chokeberry): an underutilized, highly nutraceutical plant. *Journal of Medicinally Active Plants* 8, (4). 46-63. <https://doi.org/10.7275/q651-2w57>
- 254.Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S.M., Hosseini, S.M., Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-

- antimicrobial κ-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules* 52. 116-124. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.08.026.
- 255.Sikorski, Z.E. (2016). Smoked Foods: Principles and Production. Editor(s): Caballero, B., Finglas, P.M., & Toldrá, F., Encyclopedia of Food and Health. Academic Press. 1-5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00630-9>.
- 256.Simić, V.M. (2018). Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije (*Aronia melanocarpa* L.). Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu. Tehnološki Fakultet u Leskovcu.
- 257.Škaljac, S. (2014). Uticaj različitih tehnoloških parametara na formiranje boje tradicionalne fermentisane kobasice (Petrovačka kobasica) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Tehnološki fakultet.
- 258.Škrinjar, M., Vesović-Moračanin, S., & Nemet, N. (2010). Mycopopulations of fermented sausages during the process of ripening and storage. *International meat technology symposium NODA 2010 (XII)*. 156–163.
- 259.Skurlys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., Aguilera, J.M. (2010). Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings. *Nova Science Publishers Inc*. New York. US.
- 260.Smjernice/vodič o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013). Agencija za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine.
- 261.Šojić, B. (2013). Ispitivanje lipolitičkih i oksidativnih promena u tradicionalnoj fermentisanoj kobasici (Petrovačka kobasica) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Tehnološki fakultet.
- 262.Šojić, B., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., Džinić, N., Tomović, V., Jokanović, M., Tasić, T., Škaljac, S., & Ikonić, P. (2014). Lipid oxidative changes in traditional dry fermented sausage Petrovská klobása during storage. *Hemíjska Industrija* 68 (1). 27–34.
- 263.SRPS ISO 660 (2000) kiselinska vrijednost Životinjske i biljne masti i ulja – Određivanje kiselinskog broja i kiselosti.
- 264.Stajić, S., Stanisić, N., Novaković, S., Kovjanić, N., Tomović, V., Jokanović, M., Živković, D. (2016). The Effect of Plant Oils on Physicochemical and Sensory Properties of Dry Fermented Sausages. *21. Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem*. Čačak.

- 265.Stajić, S., Stanišić, N., Tomovic, V., Petricevic, M., Stanojković, A., Radovic, C., & Gogić, M. (2017). Changes in color and texture during storage of Sremska sausage, a traditional Serbian dry-fermented sausage. *Fleischwirtschaft -Frankfurt.* 54-58.
- 266.Stanković, M., Zia-ul-Haq, M., Bojović, B., Topuzović, M. (2014). Total phenolics, flavonoid content and antioxidant power of leaf, flower and fruits from cornelian cherry (*Cornus mas L.*), *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20 (2). 358-363.
- 267.Sun, J.S., Tsuang, Y.H., Chen, I.J., Huang, W.C., Hang, Y.S., & Lu, F.J. (1998). An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury, *Burns*, vol. 24 (3), pp. 225–231
- 268.Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S.W. (2003) Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 11. 3197-207.
- 269.Suvajdžić, B. (2018). Ispitivanje mikroflore i parametara kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u industrijskim i tradicionalnim uslovima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine.
- 270.Szczepaniak, O.M., Kobus-Cisowska, J., Kusek, W., & Przeor, M. (2019). Functional properties of Cornelian cherry (*Cornus mas L.*): a comprehensive review. *European Food Research and Technology* 245. 2071–2087.
- 271.Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Kubica, P., Banaszczak, P., Wojtanowska-Krośniak, A., Krośniak, M., Marzec-Wróblewska, U., Badura, A., Zagrodzki, P., Buciński, A., Luczkiewicz, M., & Ekiert, H. (2017). Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of Aronia sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. ×prunifolia* and their antioxidant activities. *European Food Research and Technology* 243. 1645-1657.
- 272.Tabanell, G., Coloretti, F., Chiavari, C., Grazia, L., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2012). Effects of starter cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions. *Food Control* 26. 416-426.
- 273.Tahirović, A., Bašić, N., & Čopra-Janićijević, A. (2018). Effect of solvents on phenolic compounds extraction and antioxidant activity of *Prunus spinosa* L. fruits, *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 50. 19-24.

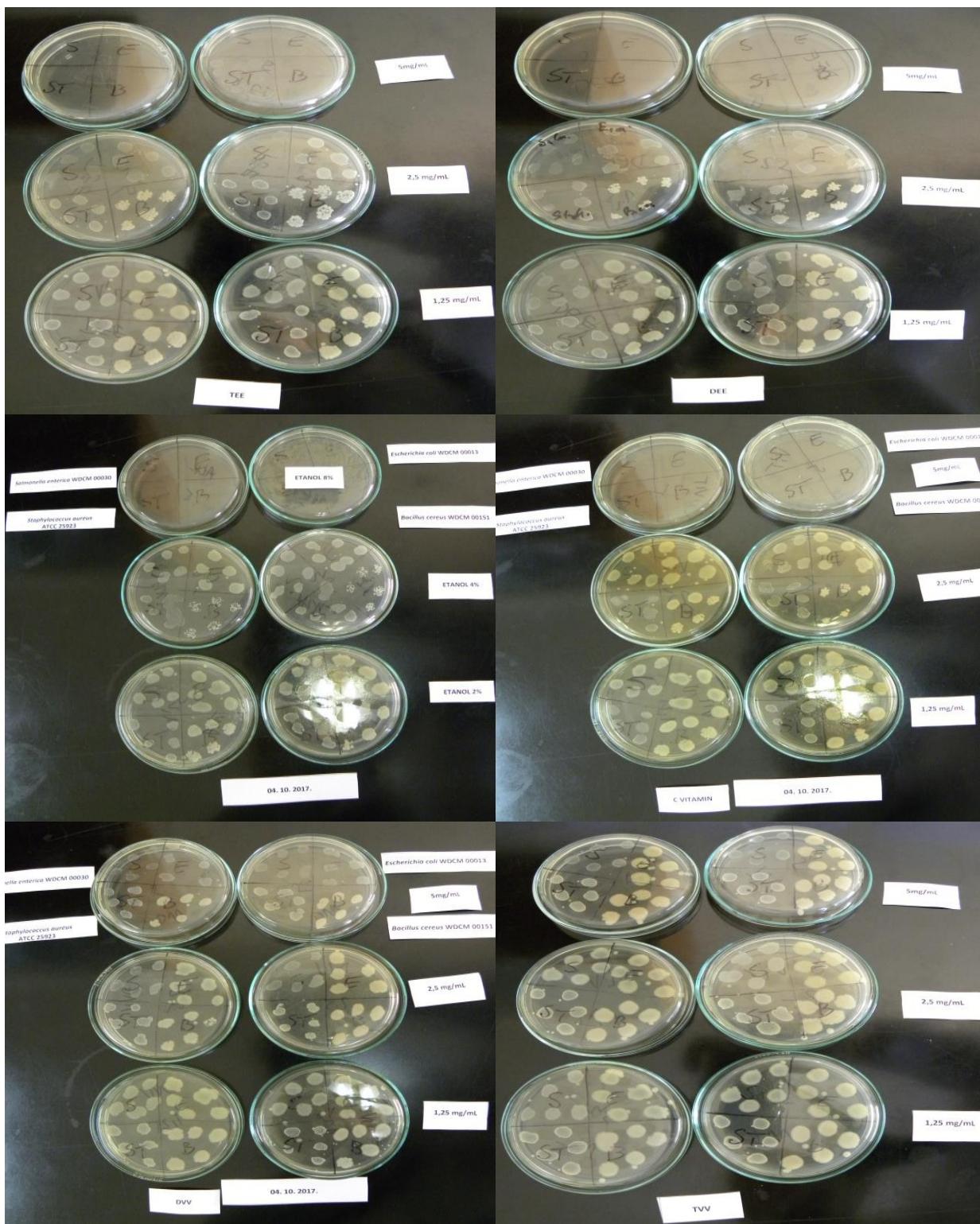
- 274.Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L., & Laukova, A. (2007). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science* 77. 570–579.
- 275.Teixeira, B., Marques, A., Pires, C., Ramos, C., Batista, I., Saraiva, J., & Nunes, M. (2014). Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT - Food Science and Technology* 59. doi:10.1016/j.lwt.2014.04.024.
- 276.Tkalec, K., Kozačinski, L., & Cvrtila, Ž. (2018) Ambalaža za pakiranje hrane životinjskog podrijetla, *Meso XX*, 1. 66-72.
- 277.Toldrá, F. (2002). Dry-cured meat products: Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition press, Inc.
- 278.Toldrá, F., Sanz, Y., & Flores, M. (2001). Meat fermentation technology. In: Meat Science and Applications, edited by. Hui, Y.H, Nip, W.K., Rogers, R.W., Young, O.A. (537- 561). New York: Marcel Dekker, Inc.
- 279.Tolić, M.T., Jurčević, I.L., Kravčić, I.P., Marković, K., & Vahčić, N. (2015). Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products. *Food Technol Biotechnol.* 53(2). 171-179. doi: 10.17113/ftb.53.02.15.3833.
- 280.Tolić, M.T., Kravčić, I.P., Vujević, P., Milinović, B., Jurčević, I.L., & Vahčić, N. (2017). Effects of Weather Conditions on Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Juice of Chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish journal of food and nutrition sciences* 67, 1. 67-74. doi: 10.1515/pjfn-2016-0009.
- 281.Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry* 134. 1571-1579. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.094>.
- 282.Topalić-Trivunović, Lj., & Žabić, M. (2015). Opšta mikrobiologija. Univerzitet u Banjoj Luci. Tehnološki fakultet.
- 283.Turker, A., Yıldırım, A., & Karakaş, F. (2012). Antibacterial and Antitumor Activities of Some Wild Fruits Grown in Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 26, 1. 2765-2772. doi: 10.5504/BBEQ.2011.0156.

- 284.Tyburcy, A., Wasiak, P., & Cegie, A. (2010). Application of composite protective coatings on the surface of sausages with different water content. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria* 9 (2). 151-159.
- 285.Vasilev, D., Vuković, I., Saičić, S., Vasiljević, N., Milanović, M., & Tubić, M. (2010). Sastav i važnije promene masti funkcionalnih fermentisanih kobasica. *Tehnologija mesa* 51, 1. 27-35.
- 286.Velebit, B., & Petrović, Z. (2012). Antimikrobnna pakovanja u industriji hrane. *Tehnologija mesa* 53(1). 71-79. <https://doi.org/10.5937/tehmesa1201071V>.
- 287.Veličković, I., Žižak, Z., Rajčević, N., Ivanov, M., Soković, M.D., Marin, P.D., & Grujic, S. (2020). Examination of the polyphenol content and bioactivities of *Prunus spinosa* L. fruit extracts. *Archives of Biological Sciences* 72. 105-115. <https://doi.org/10.2298/abs191217004v>.
- 288.Veličković, J. (2013). Hemija analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu. Prirodno-matematički fakultet. Departman za hemiju.
- 289.Veličković, M., Kostić, A.D., Stojanović, S.G., Mitić, S.S., Mitić, N., Randjelović, S., & Djordjević, S.A. (2014). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemija Industrija* 68. 297-303. doi: 10.2298/HEMIND130312054V.
- 290.Vesković-Moračanin, S., Đukić, D., Kurćubić, V., Mašković, P., & Ač, M. (2015). Prirodna antimikrobnna jedinjenja i biološka zaštita hrane. *Tehnologija mesa* 56(1). 16-25. <https://doi.org/10.5937/tehmesa1501016V>.
- 291.Vignolo, G., Fontana, C., & Fadda S. (2010). Semidry and Dry Fermented Sausages. U Toldrá, F. (ed.), *Handbook of meat processing* (379–398). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- 292.Vuković, I. (2012). Osnove tehnologije mesa. Četvrto izdanje. *Veterinarska komora Srbije*. Beograd.
- 293.Vuković, I., Saičić, S., & Vasilev, D. (2011/a). Contribution to knowledge of major quality parameters of traditional (domestic) kulen. *Tehnologija mesa* 52, 1. 134–140.

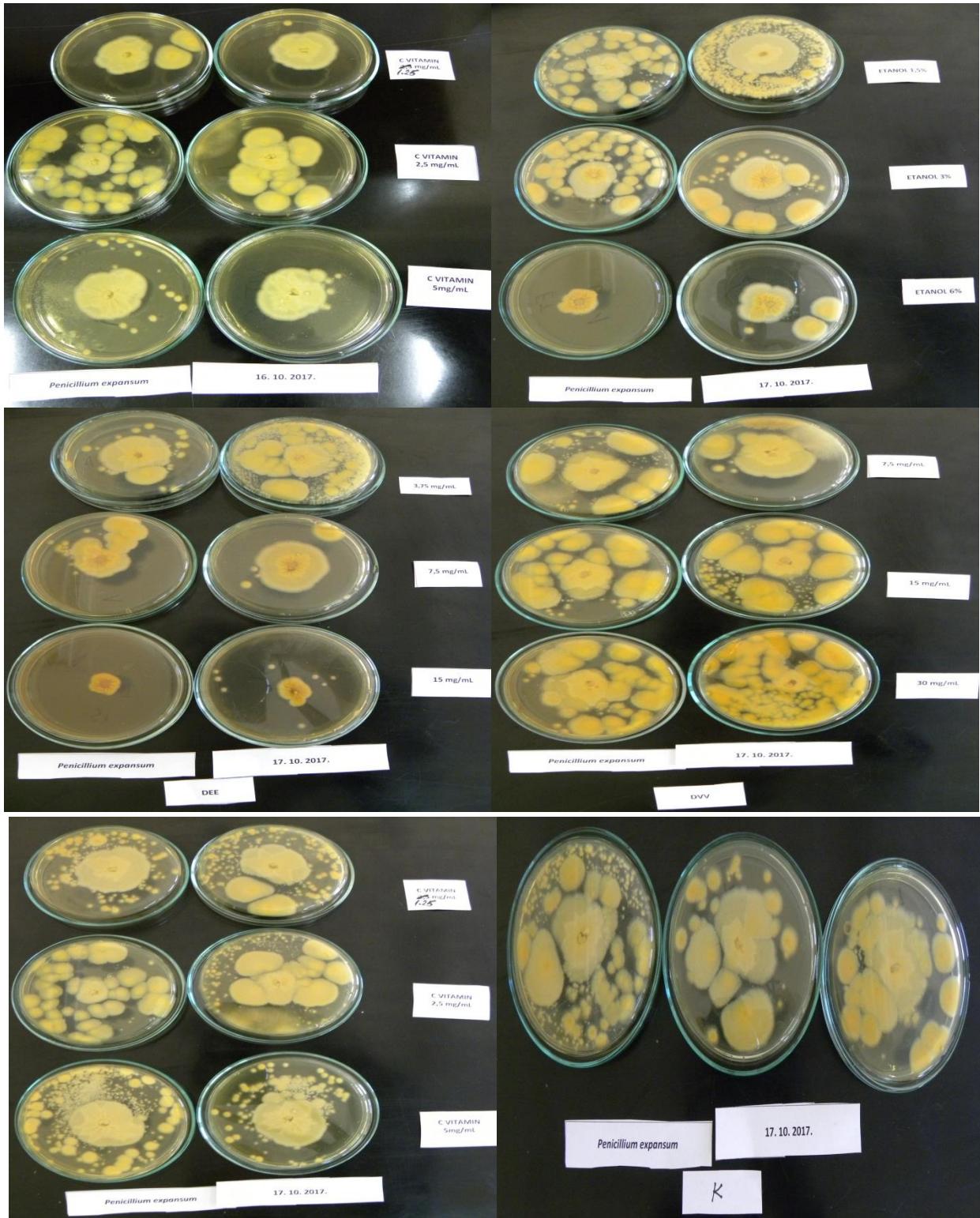
294. Vuković, I., Saičić, S., Vasilev, D., Tubić, M., Vasiljević, N., & Milanović-Stevanović, M. (2009). Neki parametri kvaliteta i nutritivna vrijednost funkcionalnih fermentisanih kobasica. *Tehnologija mesa* 50, 1-2. 68-74.
295. Vuković, I., Vasilev, D., Saičić, S., & Ivanković, S. (2011/b). Ispitivanje važnijih promena u toku zrenja tradicionalne fermentisane kobasice lemeški kulen. *Tehnologija mesa* 53, 2. 140–147.
296. Wathon, M.H., Beaumont, N.J., Benohoud, M., Blackburn, R.S., & Rayner, C.M. (2019). Extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* skin waste as a sustainable source of natural colorants. *Coloration Technology*. doi: 10.1111/COTE.12385.
297. Whelan, V.J. (2017). Chapter 11 - Difference From Control (DFC) Test. Editor(s): Lauren Rogers, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Discrimination Testing in Sensory Science, Woodhead Publishing, 209-236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101009-9.00011-3>.
298. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R.E.W. (2008). Agar and broth dilution method to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* 3(2). 163-175.
299. Wójciak, K., & Dolatowski, Z. (2012). Oxidative stability of fermented meat products. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*. 11. 99-109.
300. Wójciak, K., Trząskowska, M., Kołożyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. (2012). Evaluation of technological properties and oxidative stability of organic dry fermented probiotic sausages during long-term storage. *Journal of Veterinary Research* 56(3). 305-314. <https://doi.org/10.2478/v10213-012-0055-8>.
301. Wójciak, K.M., & Dolatowski, Z.J. (2016). Evaluation of natural preservatives in combination with acid whey for use in fermented sausage. *Scientia Agricola*. 73, 2. 125-133. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0087>.
302. Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R.H. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (3). 609-614.
303. Yan, X., Yang, L., Zhang, Y., Han, W., & Duan, Y. (2022). Effect of collagen casing on the quality characteristics of fermented sausage. *PLoS ONE* 17(2). e0263389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263389>.

- 304.Yanishhlieva, V., & Marinova, M. (1995). Antioxidant activity of selected species of the family Lamiaceae grown in Bulgaria. *Nahrung* 39. 458-463.
- 305.Yanishhlieva-Maslarova, N.V. (2001). Inhibiting oxidation in: Antioxidants in Food Practical Applications (Pokorny, J., Yanishhlieva, N., Gordon, M., ed.), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge. 22-70.
- 306.Yigit, D. (2018). Antimicrobial and Antioxidant Evaluation of Fruit Extract from *Cornus mas* L. Aksaray University Journal of Science and Engineering.
- 307.Zamuz, S., López-Pedrouso, M., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Domínguez, H., Franco, D. (2018). Application of hull, bur and leaf chestnut extracts on the shelf-life of beef patties stored under MAP: Evaluation of their impact on physicochemical properties, lipid oxidation, antioxidant, and antimicrobial potential. *Food Research International* 112. 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.053>.
- 308.Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., & Filipović, I. (2007) Postupak biokonzerviranja u proizvodnji fermentiranih kobasica, *Meso* 9, 2. 103–109.
- 309.Zhou, K., & Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidantactivity estimation. *LWT* 37. 717–721.
- 310.Žlender, B., & Gašperlin, L. (2004). Tradicionalni postupci u preradi mesa i mogućnost njihove primjene u savremenim industrijskim tehnologijama, *Tehnologija mesa* 45, 3-4. 81-88.
- 311.Zovko, L. (2017). Utjecaj soli naproteolitičke procese i oksidaciju proteina u trajnom suhomesnatom proizvodu. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu. Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

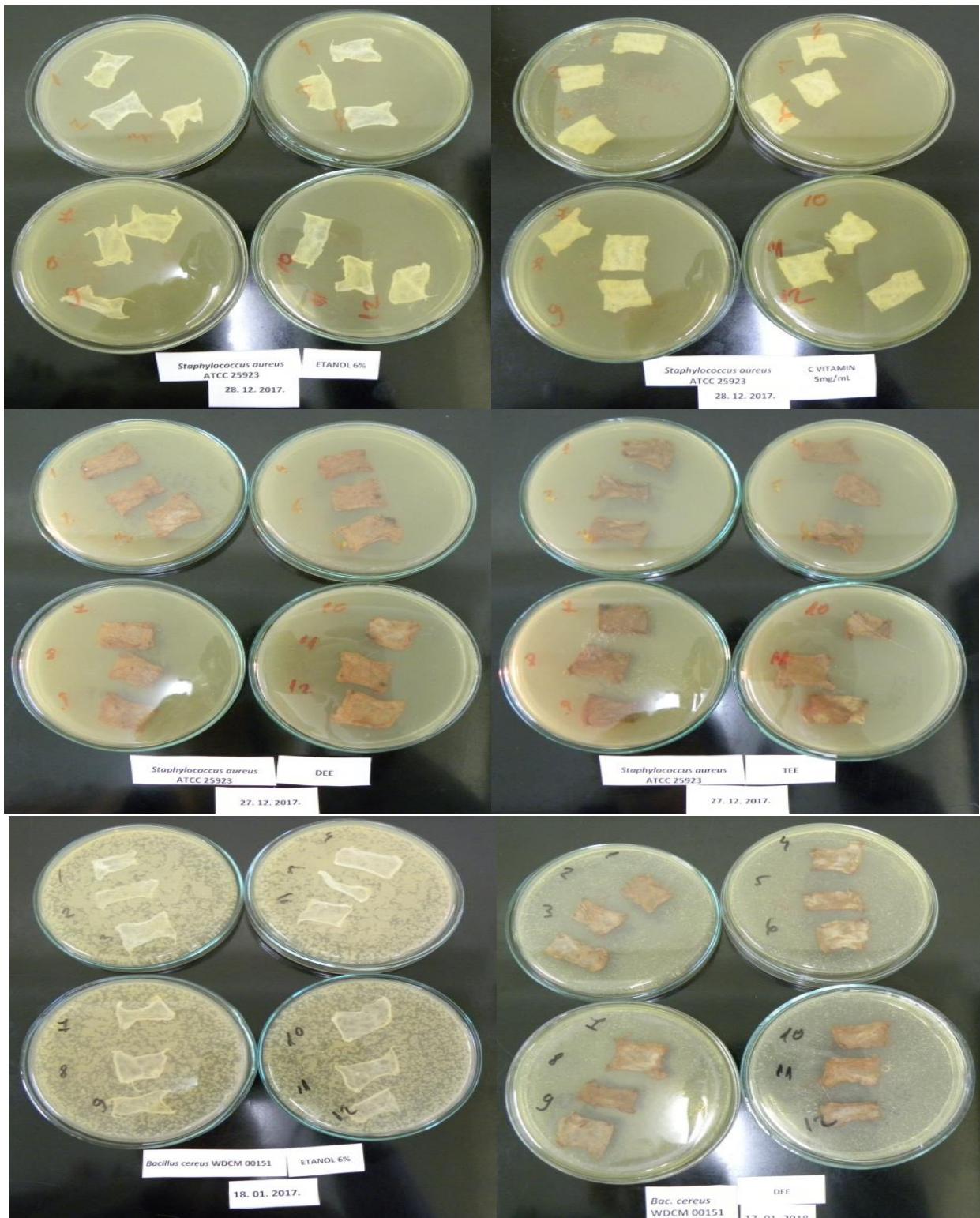
7. PRILOG



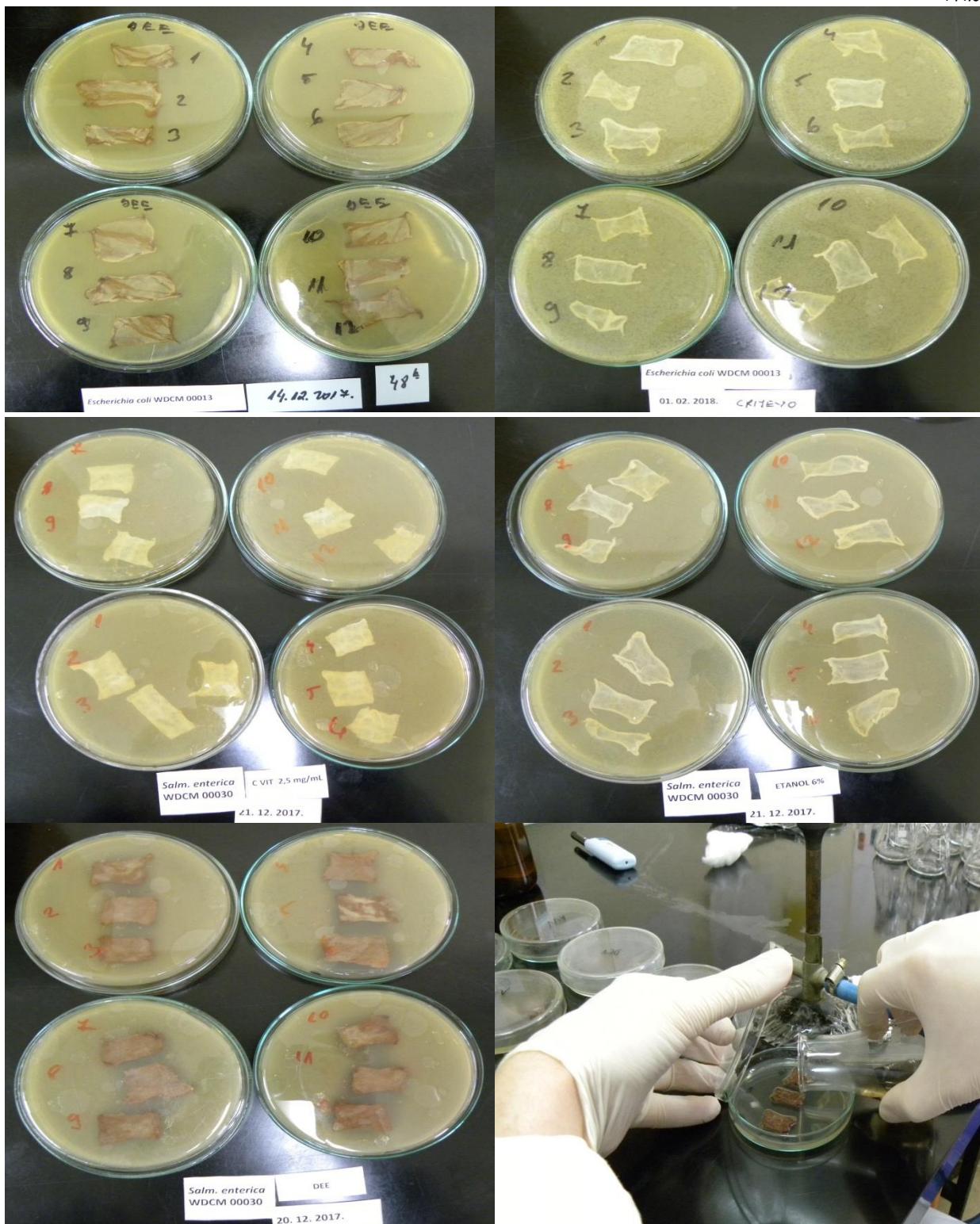
Slika A. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata



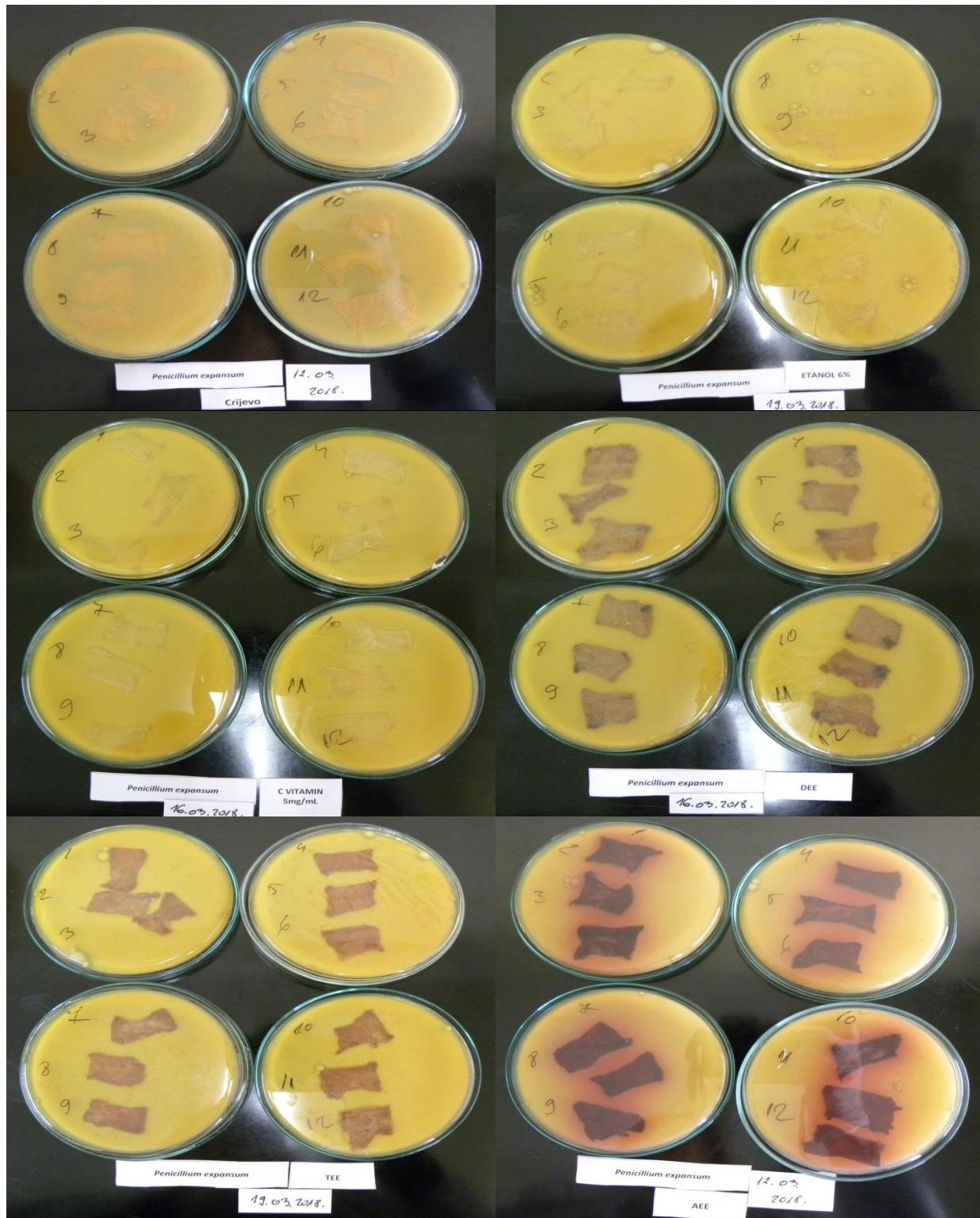
Slika B. Ispitivanje antifungalne aktivnosti biljnih ekstrakata



Slika C. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti omotača tretiranih biljnim ekstraktima



Slika D. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti omotača tretiranih biljnim ekstraktima



Slika E. Ispitivanje antifungalne aktivnosti omotača tretiranih biljnim ekstraktima

Tabela 7.1. Prosječne promjene pH vrijednosti $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

pH	0	3	6
C1	$5.17^{\text{aA}} \pm 0.03$	$5.36^{\text{aB}} \pm 0.05$	$5.40^{\text{aBC}} \pm 0.03$
C2	$5.12^{\text{aA}} \pm 0.04$	$5.43^{\text{abBC}} \pm 0.04$	$5.42^{\text{adC}} \pm 0.03$
C3	$5.33^{\text{bA}} \pm 0.09$	$5.55^{\text{cB}} \pm 0.05$	$5.58^{\text{bB}} \pm 0.04$
AEE	$5.27^{\text{bA}} \pm 0.12$	$5.49^{\text{bcB}} \pm 0.11$	$5.51^{\text{cB}} \pm 0.05$
DEE	$5.36^{\text{bA}} \pm 0.06$	$5.44^{\text{abB}} \pm 0.07$	$5.47^{\text{cdB}} \pm 0.06$

* Vrijednosti parametara a-d, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.2. Prosječne vrijednosti $a_w \pm SD$ za ispitivane uzorke kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

a_w	0	3	6
C1	$0.856^{\text{aA}} \pm 0.001$	$0.842^{\text{aB}} \pm 0.004$	$0.843^{\text{aB}} \pm 0.003$
C2	$0.841^{\text{bA}} \pm 0.000$	$0.843^{\text{aA}} \pm 0.001$	$0.851^{\text{bB}} \pm 0.000$
C3	$0.853^{\text{aA}} \pm 0.000$	$0.838^{\text{abB}} \pm 0.000$	$0.840^{\text{aB}} \pm 0.001$
AEE	$0.845^{\text{bA}} \pm 0.001$	$0.823^{\text{cB}} \pm 0.002$	$0.842^{\text{aAC}} \pm 0.003$
DEE	$0.867^{\text{cA}} \pm 0.005$	$0.832^{\text{bB}} \pm 0.002$	$0.829^{\text{cB}} \pm 0.001$

* Vrijednosti parametara a-d, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.3. Prosječni sadržaj vode (%) $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

%	0	3	6
C1	$32.15^{\text{aA}} \pm 0.34$	$31.33^{\text{aA}} \pm 0.23$	$31.61^{\text{aA}} \pm 0.24$
C2	$30.98^{\text{aA}} \pm 0.52$	$32.15^{\text{bB}} \pm 0.15$	$31.69^{\text{aAB}} \pm 0.34$
C3	$31.52^{\text{aA}} \pm 0.22$	$32.23^{\text{bB}} \pm 0.18$	$31.72^{\text{aAB}} \pm 0.21$
AEE	$31.36^{\text{aA}} \pm 0.52$	$29.33^{\text{cB}} \pm 0.06$	$32.07^{\text{aC}} \pm 0.31$
DEE	$34.81^{\text{aA}} \pm 0.28$	$31.14^{\text{aB}} \pm 0.33$	$29.85^{\text{bC}} \pm 0.39$

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabeli 7.4. Prosječni sadržaj ukupnog pepela (%) $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

%	0	3	6
C1	$4.47^{\text{aA}} \pm 0.05$	$5.06^{\text{aB}} \pm 0.21$	$5.04^{\text{aB}} \pm 0.02$
C2	$4.54^{\text{aA}} \pm 0.06$	$4.98^{\text{aB}} \pm 0.07$	$5.01^{\text{aB}} \pm 0.06$
C3	$4.57^{\text{aA}} \pm 0.20$	$5.20^{\text{aB}} \pm 0.06$	$5.13^{\text{aB}} \pm 0.00$
AEE	$4.54^{\text{aA}} \pm 0.12$	$5.28^{\text{aB}} \pm 0.09$	$5.16^{\text{aB}} \pm 0.06$
DEE	$4.82^{\text{aA}} \pm 0.05$	$5.28^{\text{aB}} \pm 0.10$	$5.15^{\text{aB}} \pm 0.15$

* Vrijednosti parametra a, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-B unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.5. Prosječni sadržaj hlorida (%) $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

%	0	3	6
C1	4.69 ^{abA} \pm 0.01	4.36 ^{aB} \pm 0.02	4.29 ^{aB} \pm 0.05
C2	4.72 ^{abA} \pm 0.08	4.62 ^{bA} \pm 0.03	4.39 ^{abB} \pm 0.05
C3	4.63 ^{aA} \pm 0.02	4.80 ^{bcA} \pm 0.10	4.40 ^{abB} \pm 0.00
AEE	4.80 ^{bAB} \pm 0.02	4.87 ^{cA} \pm 0.08	4.57 ^{bB} \pm 0.11
DEE	4.62 ^{aA} \pm 0.02	4.93 ^{cB} \pm 0.03	4.68 ^{cA} \pm 0.04

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-B unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.6. Prosječni sadržaj proteina (%) $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

%	0	3	6
C1	22.64 ^{aA} \pm 0.41	23.56 ^{aA} \pm 0.90	23.77 ^{aA} \pm 0.09
C2	22.56 ^{aA} \pm 0.10	23.45 ^{aA} \pm 0.52	23.29 ^{aA} \pm 0.38
C3	22.57 ^{aA} \pm 0.10	24.17 ^{aB} \pm 0.49	22.89 ^{aA} \pm 0.32
AEE	21.66 ^{aA} \pm 0.67	23.15 ^{aB} \pm 0.31	22.69 ^{aAB} \pm 0.24
DEE	21.42 ^{aA} \pm 1.18	22.95 ^{aAB} \pm 0.79	23.13 ^{aB} \pm 0.27

* Vrijednosti parametara a-b, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-B unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.7. Prosječni sadržaj ukupnih masti (%) $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

%	0	3	6
C1	37.73 ^{abA} \pm 0.16	38.05 ^{aA} \pm 0.51	37.83 ^{bA} \pm 0.32
C2	39.17 ^{bA} \pm 0.48	37.86 ^{aA} \pm 0.72	37.90 ^{bA} \pm 0.21
C3	37.63 ^{abA} \pm 0.67	37.60 ^{aA} \pm 0.08	36.97 ^{aA} \pm 0.27
AEE	37.00 ^{aA} \pm 0.13	38.13 ^{aA} \pm 0.05	36.87 ^{aB} \pm 0.86
DEE	36.57 ^{cA} \pm 0.64	37.53 ^{aB} \pm 0.09	37.94 ^{bC} \pm 0.29

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.8. Prosječan sadržaj slobodnih masnih kiselina (mg KOH/g) $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

mg KOH/g	0	3	6
C1	10.30 ^{aAB} \pm 0.77	11.20 ^{abB} \pm 0.41	12.11 ^{aC} \pm 0.15
C2	10.16 ^{aA} \pm 0.92	9.88 ^{bA} \pm 0.73	12.01 ^{aB} \pm 0.02
C3	9.96 ^{aA} \pm 1.28	11.67 ^{aB} \pm 0.55	13.36 ^{bC} \pm 0.40
AEE	9.53 ^{aA} \pm 1.09	12.68 ^{aB} \pm 0.33	12.08 ^{aB} \pm 0.17
DEE	10.99 ^{aA} \pm 0.55	12.74 ^{aC} \pm 0.04	13.66 ^{bD} \pm 0.06

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.9. Prosječne vrijednosti peroksidnog broja ($\text{mmol O}_2/\text{kg}$) $\pm SD$ u ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

mmolO ₂ /kg	0	3	6
C1	$3.79^{\text{abA}}\pm0.09$	$4.19^{\text{abA}}\pm0.34$	$4.27^{\text{aA}}\pm0.09$
C2	$4.65^{\text{bA}}\pm0.86$	$4.56^{\text{aA}}\pm0.07$	$3.53^{\text{bA}}\pm0.09$
C3	$2.72^{\text{aA}}\pm0.50$	$4.22^{\text{abB}}\pm0.55$	$4.62^{\text{cB}}\pm0.07$
AEE	$3.48^{\text{abA}}\pm0.21$	$4.34^{\text{abB}}\pm0.28$	$4.77^{\text{cC}}\pm0.12$
DEE	$3.81^{\text{abAB}}\pm0.79$	$3.47^{\text{bAB}}\pm0.21$	$4.25^{\text{abB}}\pm0.06$

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.10. Prosječne vrijednosti sadržaja MDA (mg/kg) $\pm SD$ u svim ispitivanim uzorcima kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

mgMDA/kg	0	3	6
C1	$0.74^{\text{aA}}\pm0.02$	$1.25^{\text{abB}}\pm0.03$	$1.92^{\text{aC}}\pm0.02$
C2	$0.75^{\text{aA}}\pm0.01$	$1.19^{\text{abB}}\pm0.01$	$1.78^{\text{bC}}\pm0.01$
C3	$0.74^{\text{aA}}\pm0.01$	$1.08^{\text{bB}}\pm0.01$	$1.80^{\text{bC}}\pm0.01$
AEE	$0.75^{\text{aA}}\pm0.01$	$1.10^{\text{bB}}\pm0.01$	$1.73^{\text{cC}}\pm0.00$
DEE	$0.75^{\text{aA}}\pm0.01$	$1.09^{\text{bB}}\pm0.00$	$1.70^{\text{dC}}\pm0.00$

* Vrijednosti parametara a-d, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.11. Prosječna tvrdoća/mekoća (kg) $\pm SD$ ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

kg	0	3	6
C1	$0.51^{\text{abA}}\pm0.13$	$0.55^{\text{abA}}\pm0.09$	$0.54^{\text{aA}}\pm0.08$
C2	$0.58^{\text{bAB}}\pm0.14$	$0.46^{\text{aA}}\pm0.11$	$0.63^{\text{aB}}\pm0.17$
C3	$0.43^{\text{bcA}}\pm0.12$	$0.48^{\text{aA}}\pm0.08$	$0.51^{\text{aA}}\pm0.09$
AEE	$0.56^{\text{abA}}\pm0.11$	$0.62^{\text{bA}}\pm0.10$	$0.56^{\text{aA}}\pm0.14$
DEE	$0.35^{\text{cA}}\pm0.09$	$0.48^{\text{ab}}\pm0.07$	$0.65^{\text{aC}}\pm0.12$

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.12. Prosječne vrijednost L^* $\pm SD$ izmjerene na površini omotača ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

L^*	0	3	6
C1	$41.27^{\text{aA}}\pm1.34$	$42.36^{\text{abA}}\pm1.00$	$41.59^{\text{aA}}\pm0.66$
C2	$41.00^{\text{a,A}}\pm1.02$	$43.22^{\text{bB}}\pm0.64$	$39.99^{\text{aA}}\pm1.23$
C3	$40.00^{\text{aA}}\pm3.14$	$43.23^{\text{bA}}\pm1.38$	$41.14^{\text{aA}}\pm0.65$
AEE	$39.21^{\text{aA}}\pm2.00$	$40.37^{\text{aAB}}\pm1.75$	$42.25^{\text{aB}}\pm1.17$
DEE	$41.34^{\text{aA}}\pm0.53$	$42.48^{\text{abA}}\pm1.45$	$41.57^{\text{aA}}\pm2.02$

* Vrijednosti parametara a-b, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-B unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.13. Prosječne vrijednosti $a^* \pm SD$ izmjerene na površini omotača ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

a^*	0	3	6
C1	$3.70^{aA} \pm 0.50$	$5.86^{abB} \pm 0.31$	$5.14^{abB} \pm 0.77$
C2	$4.72^{abA} \pm 0.48$	$6.34^{abB} \pm 0.53$	$6.28^{bcB} \pm 0.50$
C3	$3.73^{aA} \pm 0.48$	$7.10^{bB} \pm 0.89$	$6.60^{cB} \pm 0.99$
AEE	$3.84^{aA} \pm 0.18$	$5.33^{abB} \pm 0.38$	$7.13^{cC} \pm 0.68$
DEE	$5.07^{bA} \pm 1.00$	$5.76^{aA} \pm 0.52$	$4.85^{aA} \pm 0.74$

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka,
A-B unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p < 0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.14. Prosječne Vrijednosti $b^* \pm SD$ izmjerene na površini omotača ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

b^*	0	3	6
C1	$2.58^{aA} \pm 0.45$	$5.28^{abB} \pm 0.66$	$5.93^{abB} \pm 0.58$
C2	$3.41^{abA} \pm 0.48$	$6.13^{bB} \pm 1.16$	$5.70^{abB} \pm 1.02$
C3	$3.50^{abA} \pm 0.81$	$6.63^{bB} \pm 1.24$	$6.69^{aB} \pm 0.98$
AEE	$2.77^{abA} \pm 0.35$	$3.85^{aB} \pm 0.57$	$6.95^{aC} \pm 0.87$
DEE	$3.73^{bA} \pm 0.66$	$5.28^{abB} \pm 0.49$	$4.39^{bAB} \pm 0.76$

* Vrijednosti parametara a-b, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka,
A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p < 0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.15. Prosječne vrijednosti $L^* \pm SD$ izmjerene na presjeku ispitivanih kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

L^*	0	3	6
C1	$48.76^{aA} \pm 0.87$	$51.67^{abB} \pm 2.06$	$53.12^{abB} \pm 2.62$
C2	$50.28^{aA} \pm 3.54$	$51.17^{abA} \pm 1.91$	$54.24^{aB} \pm 0.65$
C3	$49.10^{aA} \pm 1.16$	$48.99^{bA} \pm 1.91$	$51.98^{abB} \pm 1.69$
AEE	$48.83^{aA} \pm 1.35$	$50.20^{abAB} \pm 1.90$	$52.08^{abB} \pm 1.80$
DEE	$48.47^{aA} \pm 1.99$	$50.16^{abAB} \pm 1.77$	$51.46^{bA} \pm 1.56$

* Vrijednosti parametara a-b, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka,
A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p < 0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.16. Prosječne vrijednosti $a^* \pm SD$ izmjerene na presjeku ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

a^*	0	3	6
C1	$9.06^{aA} \pm 0.48$	$8.39^{abA} \pm 0.57$	$7.09^{aB} \pm 0.58$
C2	$9.06^{aA} \pm 0.48$	$8.80^{aA} \pm 0.57$	$7.09^{aB} \pm 0.58$
C3	$8.79^{aA} \pm 0.70$	$8.72^{aA} \pm 0.73$	$6.97^{aA} \pm 0.51$
AEE	$9.72^{aA} \pm 1.11$	$7.74^{bB} \pm 0.65$	$7.36^{aB} \pm 0.64$
DEE	$9.93^{aA} \pm 1.16$	$8.22^{abB} \pm 0.86$	$6.90^{aC} \pm 0.51$

* Vrijednosti parametara a-b, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka,
A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p < 0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.17. Prosječne vrijednosti $b^*\pm SD$ izmjerene na presjeku ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

b^*	0	3	6
C1	$6.02^{aA}\pm 0.83$	$7.58^{abB}\pm 0.76$	$7.82^{abB}\pm 1.09$
C2	$6.46^{abA}\pm 0.70$	$8.76^{ab}\pm 1.11$	$8.06^{bB}\pm 0.52$
C3	$6.47^{abA}\pm 1.04$	$7.75^{abB}\pm 1.15$	$6.91^{acAB}\pm 0.65$
AEE	$6.99^{abA}\pm 1.16$	$6.98^{bA}\pm 0.44$	$7.16^{abcA}\pm 0.75$
DEE	$7.47^{bA}\pm 1.12$	$7.65^{abA}\pm 1.11$	$6.76^{cA}\pm 0.81$

* Vrijednosti parametara a-b, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-B unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.18. Sadržaj TPC (mg GAE/g) u omotačima ispitivanih fermentisanih kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

mg GAE/g	0	3	6
C1	$3.179^{aAB}\pm 0.126$	$3.890^{aB}\pm 0.491$	$4.246^{abBC}\pm 0.367$
C2	$3.495^{aA}\pm 0.414$	$4.883^{bB}\pm 0.096$	$4.216^{abA}\pm 0.342$
C3	$4.722^{bA}\pm 0.172$	$5.721^{cB}\pm 0.242$	$3.489^{aA}\pm 0.086$
AEE	$2.812^{aA}\pm 0.047$	$4.476^{abAB}\pm 0.058$	$4.110^{abA}\pm 0.427$
DEE	$6.990^{cA}\pm 0.643$	$5.080^{bcB}\pm 0.074$	$5.225^{bB}\pm 0.708$

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-B unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.19. Vrijednost DPPH ($\mu\text{g GAE/g}$) u omotačima ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

$\mu\text{gGAE/g}$	0	3	6
C1	$0.244^{abA}\pm 0.003$	$0.090^{aB}\pm 0.001$	$0.218^{aAC}\pm 0.009$
C2	$0.262^{acA}\pm 0.039$	$0.099^{abB}\pm 0.001$	$0.220^{aA}\pm 0.031$
C3	$0.211^{bA}\pm 0.003$	$0.115^{bcB}\pm 0.008$	$0.175^{aA}\pm 0.003$
AEE	$0.292^{cA}\pm 0.006$	$0.131^{cB}\pm 0.012$	$0.218^{aC}\pm 0.012$
DEE	$0.288^{acA}\pm 0.001$	$0.126^{cB}\pm 0.011$	$0.184^{aC}\pm 0.023$

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.20. Vrijednost ABTS ($\mu\text{g GAE/g}$) u omotačima ispitivanih uzoraka kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

$\mu\text{gGE/g}$	0	3	6
C1	$0.336^{aA}\pm 0.020$	$0.160^{aB}\pm 0.022$	$0.244^{aC}\pm 0.023$
C2	$0.357^{abA}\pm 0.034$	$0.180^{aB}\pm 0.012$	$0.221^{aB}\pm 0.000$
C3	$0.305^{aA}\pm 0.026$	$0.188^{aC}\pm 0.004$	$0.226^{aB}\pm 0.001$
AEE	$0.362^{abA}\pm 0.012$	$0.187^{aB}\pm 0.006$	$0.247^{aC}\pm 0.025$
DEE	$0.407^{bA}\pm 0.012$	$0.183^{aB}\pm 0.023$	$0.250^{aC}\pm 0.007$

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-C unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Tabela 7.21. Sadržaj FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) u omotačima ispitivanih fermentisanih kobasica nakon zrenja (0) i tokom skladištenja (3 i 6 mjeseci)

umol Fe²⁺/g	0	3	6
C1	13.435 ^{aA} \pm 0.021	5.671 ^{aB} \pm 1.239	8.806 ^{aC} \pm 0.917
C2	12.483 ^{abA} \pm 2.179	5.235 ^{aB} \pm 0.336	8.559 ^{aC} \pm 0.850
C3	10.402 ^{bAB} \pm 0.197	7.743 ^{bB} \pm 0.111	8.335 ^{aB} \pm 0.018
AEE	12.623 ^{abA} \pm 0.597	6.254 ^{abB} \pm 0.528	8.756 ^{aBC} \pm 0.120
DEE	14.036 ^{aA} \pm 0.399	7.772 ^{bB} \pm 0.755	12.771 ^{bC} \pm 0.589

* Vrijednosti parametara a-c, unutar iste kolone su statističke značajnosti između uzoraka, A-D unutar istog reda su statističke značajnosti tokom skladištenja ($p<0.05$) prema Tukey testu

Биографија

Ана Велемир (рођена Гајић) рођена је 17.03.1975. у Босанској Дубици, Босна и Херцеговина, где је завршила основну и средњу хемијско-технолошку школу.

У Бањој Луци је 1993. године уписала Технолошки факултет, студијски програм Биотехнолошко-прехрамбени. Дипломирала је 2002. године и стекла звање дипломирани инжењер технологије. Академске 2003/04 године уписала је магистарски студиј на Технолошком факултету Универзитета у Бањој Луци, на студијском програму Прехрамбене технологије и биотехнологије, из у же научне области Прехрамбене технологије намирница животињског поријекла. Магистарски рад је успјешно одбранила 09.09.2016. године и стекла звање Магистар техничких наука из области прехрамбених технологија (област Инжењерство и технологије).

По завршетку студија, од 08/2002-12/2002 била је ангажована у фабрици за производњу тјестенине и кекса, "Адрија ММ", Бања Лука. У периоду од 12/2002–05/2005 и од 11/2006 радила је као лабораторијски техничар и стручни сарадник у лабораторији за анализу намирница, Технолошки факултет, Универзитет у Бањој Луци на предметима Анализа намирница, Прехрамбене технологије намирница биљног поријекла, Технологија воћа и поврћа, Технологија жита и брашна, Прехрамбене технологије намирница животињског поријекла, Технологија меса и производа од меса, Технологија млијека и производа од млијека.

Период од 05/2005–11/2006 провела је на стручном усавршавању на Институту "Lazzaro Spallanzani", Лоди, Италија, у лабораторији за биохемију млијека, као стипендиста италијанске владе.

Мр Ана Велемир је као аутор и коаутор објавила 40 научних и стручних радова. Учествовала је у реализацији седам научно-истраживачких пројеката.

Удата је и мајка двоје дјеце.

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ФАКУЛТЕТ: ТЕХНОЛОШКИ



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ
BANJA LUKA

Prijava	29.03.2022.
Odjel	15/11
	651/22

ИЗВЈЕШТАЈ
о оцјени урађене докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу члана 61. и 141. Закона о високом образовању („Службени Гласник РС“, број 67/20), члана 54. Статута Универзитета у Бањој Луци, члана 19. Статута Научно-наставног вијећа Технолошког факултета Универзитета у Бањој Луци, Научно-наставно вијеће Технолошког факултета је на 10. сједници одржаној 15.03.2022. године, донијело Одлуку број: 15/3.522-23/22 од 15.03.2022. којом је именована комисија за преглед, оцјену и одбрану докторске дисертације кандидата мр Ане Велемир под називом „**Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице**“ у саставу:

1. Др Александар Савић, ванредни професор Технолошког факултета Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област Биохемијско инжењерство, предсједник;
2. Др Сњежана Мандић, ванредни професор Технолошког факултета Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област Прехранбене технологије намирница животињског поријекла, ментор;
3. Др Сузана Јахић, ванредни професор Биотехничког факултета Универзитет у Бихаћу, ужа научна област Храна и пиће, члан;
За замјеника члана именована је др Даница Савановић, доцент Технолошког факултета Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област Прехранбене технологије намирница животињског поријекла.

Комисија је у предложеном року прегледала и оцјенила докторску дисертацију кандидата мр Ане Велемир под називом „**Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице**“, те у складу са важећим универзитетским правилницима и прописима Научно-наставном вијећу Технолошког факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци подноси извјештај.

- 1) Навести датум и орган који је именовао комисију;
- 2) Навести састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, научно-наставног звања, назива у же научне области за коју је изабран у звање и назива универзитета/факултета/института на којем је члан комисије запослен.

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Мр Ана (Милорад) Велемир рођена је 17.03.1975. године у Босанској Дубици, Босна и Херцеговина.

Академске 2003/04 године уписала је магистарски студиј на Технолошком факултету Универзитета у Бањој Луци, на студијском програму Прехранбене технологије и биотехнологије. Кандидат је магистарски рад под називом "Утицај

протеина сурутке и соје на производњу и квалитет Домаће ферментисане кобасице“, из у же научне области Прехрамбене технологије намирница животињског поријекла успјешно одбранила 09.09.2016. године и стекла звање Магистар техничких наука из области прехрамбених технологија (област Инжењерство и технологије).

Процедуру пријаве докторске дисертације кандидат је започео 2017. године, а Одлуком Сената Универзитета у Бањој Луци број 02/04-3.189-70/17 од 29.06.2017. одобрена је израда докторске дисертације под називом „Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице“. За ментора при изради дисертације именована је др Сњежана Мандић, ванредни професор.

- 1) Име, име једног родитеља, презиме;
- 2) Датум рођења, општина, држава;
- 3) Назив универзитета и факултета и назив студијског програма академских студија II циклуса, односно послиједипломских магистарских студија и стечено стручно/научно звање;
- 4) Факултет, назив магистарске тезе, научна област и датум одbrane магистарског рада;
- 5) Научна област из које је стечено научно звање магистра наука/академско звање мастера;
- 6) Година уписа на докторске студије и назив студијског програма.

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата mr Ане Велемир носи назив „Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице“. Одлуком Сената Универзитета у Бањој Луци, број 02/04-3.189-70/17 од 29.06.2017. године, даје се сагласност на Извештај о оцјени подобности теме, кандидата и ментора за израду наведене докторске дисертације.

Докторска дисертација кандидата mr Ане Велемир је написана латиничним писмом (фонт *Times New Roman*, величина слова 12, проред 1.5, формат A4). Дисертација је написана јасно и језички исправно, на 171 страница нумерисаног текста.

Садржај докторске дисертације представљен је слиједећим поглављима:

УВОД	1
1. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	4
2. ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	29
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	30
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	48
5. ЗАКЉУЧАК	126
6. ЛИТЕРАТУРА	131
7. ПРИЛОГ	161

На почетку докторске дисертације се налазе наслов и сажетак рада на српском и енглеском језику и садржај. У раду је приказано 17 слика, 31 график и 55 табела, а цитирано је 311 литературних навода.

На крају дисертације се налази биографија аутора, као и три изјаве према Правилнику о дигиталном репозиторијуму.

- 1) Наслов докторске дисертације;
- 2) Вријеме и орган који је прихватио тему докторске дисертације
- 3) Садржај докторске дисертације са страничењем;
- 4) Истачи основне податке о докторској дисертацији: обим, број табела, слика, шема, графика, број цитиране литературе и навести поглавља.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Ферментисане кобасице на нашим просторима имају дугу производну традицију. Квалитет ферментисаних кобасица, као и промјене које настају током процеса ферментације, сушења и зрења не зависе само од основних компонената надјева

кобасице, већ и од додатака који утичу на процес преласка надјева у ферментисан производ, као и од избора омотача. Учешће омотача у процесу производње почиње тренутком пуњења омотача надјевом, након чега учествује у волуметријским, структурним и хемијским промјенама које се дешавају унутар кобасице у току процеса производње, а завршава се конзумацијом. У мањој или већој мјери, сви омотачи служе као микробиолошка баријера која штити кобасицу у току производње, складиштења и дистрибуције (Savić & Savić, 2004).

Један од најчешћих узрока губитка квалитета и квара производа од меса је оксидација масти (Bystricky et al., 2004; Milanović-Stevanović et al., 2006). Под утицајем слободних радикала настају различити производи оксидације. Оксидација липида и протеина представља један од великих проблема у индустрији меса. Ове промјене могу изазвати стварање непријатних мириса и укуса, дискордације, смањење нутритивних вриједности, а с тим и квалитета, што утиче на ограничenu одрживост производа и доводи до акумулације токсичних једињења (Bošković, 2016). У производњи и преради меса као потенцијални природни додаци често се користе биљни екстракти, у циљу спречавања оксидације масти и протеина, и/или инхибиције раста и развоја бактерија, квасаца и плијесни, односно да би се спријечило пропадање и кварење производа (Botsaris et al., 2015).

Бактерије млијечне киселине и коагулаза-негативне коке представљају главне групе бактерија значајних за процесе ферментације и зрење кобасица (Ikonić, 2013). Поред бактерија значајних за процес зрења, у микрофлори надјева могу да се нађу и микроорганизми који кваре надјев, као и неки патогени микроорганизми (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 и *Staphylococcus aureus*). Познавање и контрола присутних микроорганизама има изузетан значај за микробиолошки квалитет, али и за сензорне особине као и безбједност готових производа (Mitrović, 2016; Suvajdžić, 2018).

Антиоксиданти су материје које спречавају реакције оксидације и тако неутралишу слободне радикале. Најчешће се користи за спречавање ужегlostи, а тиме се утиче на одрживост намирница. Потреба замјене синтетичких антиоксиданата природним, као и захтјеви потрошача за употребом "природних" адитива у храни, иницирали су интензивна испитивања антиоксидативне активности сирових и пречишћених екстраката биљног материјала. Такође, због све веће раширености бактеријских патогена резистентних на антибиотике, све је више истраживања усмерено на проналажење антимикробних компоненти биљног поријекла. У сврху побољшања заштитних, нутритивних и сензорних својстава производа користе се јестиви филмови и превлаке, који представљају могућност за унапријеђење квалитета хране и продужавање њене трајности, сигурности и функционалности. Защитна својства се могу побољшати додатком антимикробних агенаса или антиоксиданаса. Коришћењем вањског слоја превлаке с високом концентрацијом антимикробних или антиоксидативних агенаса могуће је одржати изворни интегритет хране или, као алтернатива, могуће је користити мање количине адитива (у односу на укупну масу производа), као додатак храни (Galić, 2009).

Циљ овог рада је испитивање утицаја додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост домаће ферментисане кобасице. У ту сврху постављене су помоћне хипотезе:

- Биљни екстракти имају различито антиоксидативно дјеловање,
- Биљни екстракти имају различито антимикробно дјеловање,
- Природни омотачи потопљени у биљне екстракте имају различито антиоксидативно дјеловање,
- Природни омотачи потопљени у биљне екстракте имају различито антимикробно дјеловање,

а на основу њих и главна хипотеза:

- Употреба омотача третираног биљним екстрактом утиче на очување квалитета и продужење трајности ферментисане Домаће кобасице током складиштења.

Истраживања у склопу ове дисертације подијељена су у три цјелине:

У првом дијелу проведена је припрема и тестирање биљних екстраката: трњине, црвене дивље трешње, ароније и дрењине. Након антиоксидативних и антимикробних анализа узорака биљних екстраката и обављене статистичке обраде резултата, одређене су концентрације за сваки биљни екстракт и тако припремљени раствори су коришћени за наставак експеримента.

Други дио истраживања односи се на тестирање природних омотача који су третирани припремљеним растворима претходно анализираних биљних екстраката. Након анализе антиоксидативних и антимикробних особина третираних омотача, и обављене статистичке обраде добијених резултата, изабрани су раствори екстраката који су показали најбоље антиоксидативне и антимикробне особине који су даље коришћени у припреми омотача за производњу ферментисаних кобасица.

У трећој цјелини извршена је анализа надјева, као и ферментисаних кобасица са претходно припремљеним омотачима третираним изабраним биљним екстрактима, након зрења и током складиштења.

Антимикробно и антиоксидативно дјеловање биљних екстраката углавном се приписује високом садржају фенолних једињења (Botsaris et al., 2015). Многе биљне врсте су занимљиве јер садрже хемијска једињења која могу утицати на продужење рока трајања, а побољшавају отпорност на оксидацију и успоравају раст микроорганизама и плијесни, чиме позитивно дјелују на особине производа (Abdel-Hamied et al., 2009; Cottone, 2009; Alhijazeen, 2014). Резултати различитих студија показују да биљна биоактивна једињења могу дјеловати као добра замјена за синтетичке антиоксидансе и конзервансе (Sahari & Asgari, 2013; Mäkinen et al., 2020). Често се дешава да биљни екстракти имају јак, препознатљив окус, па је, поред антиоксидативне способности, веома битно испитати и сензорне карактеристике које се могу пренијети на сам производ (Cottone, 2009).

Природни антиоксиданси имају велики потенцијал примјене у месној индустрији. Биљни екстракти могу бити веома корисни у прехранбеној индустрији због антимикробног и антиоксидативног потенцијала, јер су препознати као сигурни (GRAS, Generally Recognized as Safe). Биљни екстракти требало би да су једноставни за примјену, ефикасни при ниским концентрацијама (до 0.01%) и стабилни током обраде и складиштења; не би требали негативно да утичу на сензорне особине производа (нпр. боја, мирис или арома), и, наравно, да буду економски исплативи (Nikmaram et al., 2018).

Уградња антиоксидативних биоактивних једињења у формулацији производа, на површини у облику филма или у материјалу за паковање може утицати на инхибирање раста непожељних микроорганизама, као и на смањење оксидације липида и протеина у храни. У ту сврху се проводе многа истраживања да би се пронашла нова природна једињења која би очувала сензорни и микробиолошки квалитет производа од меса. Један од могућих приступа у рјешавању питања очувања квалитета у току складиштења ферментисаних кобасица је природно, еколошки прихватљиво рјешење у виду употребе јестивог, биоразградивог активног филма на бази хитозана, уз додатак етарских уља биљака (Krkić et al., 2012a; Demirok Soncu et al., 2018). Додатком етарских уља оригана и кима, као и пчелињег воска, добија се активни амбалажни материјал оптималних својстава, који доприноси очувању боје пресјека кобасице, и ефикасно штити од непожељних оксидативних промена (Hromiš, 2015). У Бразилу је одобрена примјена низина,

метаболичког производа млијечно-киселинских бактерија, који се примјењује потапањем или прскањем површине хреновки након термичке обраде. Истраживања су показала да низин инкорпориран у природном цријеву прије пуњења, утиче на смањење броја нежељених бактерија млијечне киселине у вакуум пакованим кобасицама складиштеним на ниским температурама (Barros et al., 2010). Комбинација низина са кухињском солју знатно инхибира раст *L. monocytogenes* у природним цријевима оваца (Hammou et al., 2010). У развоју антимикробних јестивих филмова и превлаке, етерична уља од зачинског биља и зачина се широко користе (Campos et al., 2010). Додавањем биљних екстраката или неких природних био конзерванаса, могу се добити филмови који поседују антимикробна и антиоксидативна својства (Krkić et al., 2012b; Adzaly et al., 2015; Raesi et al., 2016; Król et al., 2017).

Литература цитирана у докторској дисертацији, а наведена у овом дијелу извјештaja:

1. Abdel-Hamied, A.A., Nassar, A.G., & El-Badry, N. (2009). Investigations on antioxidant and antimicrobial activities of some natural extracts. *World J. Dairy Food Sci.*, 4(1): 1-7.
2. Adzaly, N.Z., Jackson, A., Villalobos-Carvajal, R., Kang, I., & Almenar, E. (2015). Development of a novel sausage casing. *Journal of Food Engineering*, 152. 24-31.
3. Alhijazeen, M. (2014). Effect of oregano essential oil and tannic acid on storage stability and quality of ground chicken meat. Graduate Theses and Dissertations. Paper 13966.
4. Barros, J. R., Kunigk, L., & Jurkiewicz, C.H. (2010). Incorporation of nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. *Brazilian Journal of Microbiology* 41. 1001-1008. doi:10.1590/S1517-838220100004000019
5. Bošković, M. (2016). Ispitivanje uticaja odabranih etarskih ulja na rast *Salmonella* spp. u mesu svinja pakovanog u vakuumu i modifikovanu atmosferu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine
6. Botsaris, G., Orphanides, A., Yiannakou, E., Gekas, V., & Goulas, V. (2015). Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L. Extracts in Pork Sausages. *Food Technol. Biotechnol.*, 53 (4). 472–478.
7. Bystrický, P., Marcinčák, S., Dičáková, Z., & Šulej, P. (2004). Dynamics of antioxidant activity during manufacturing of meat products and antioxidant activity prediction. *Meso*, VI, 2. 31–43.
8. Campos, C.A., Gerschenson, L.N., & Flores, S.K. (2010). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol.* 1-27. doi: 10.1007/s11947-010-0434-1.
9. Cottone, E. (2009). Use of natural antioxidants in dairy and meat products: A review of sensory and instrumental analyses, Kansas State University.
10. Demirok Soncu, E., Arslan, B., Ertürk, D., Kılıçükka, S., Özdemir, N., & Soyer, A. (2018). Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Turkish fermented sausages (sucuk) coated with chitosan-essential oils. *LWT-Food Science and Technology*. doi: 10.1016/j.lwt.2018.06.049.
11. Galić, K. (2009). Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji, *Hrvatski časopis za prehrabenu tehnologiju, biotehnologiju i nutriconizam*. 4. No. 1-2. 23-31.
12. Hammou, F.B., Skali, S.N., Idaomar, M., & Abrini, J. (2010). Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (8). 1190-1195.
13. Hromiš, N. (2015). Razvoj biorazgradivog aktivnog ambalažnog materijala na bazi

- hitozana: sinteza, optimizacija svojstava, karakterizacija i primena, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
14. Ikonić, P. (2013). Razvoj procesa sušenja i zrenja tradicionalne fermentisane kobasicice (Petrovská klobása) u kontrolisanim uslovima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
 15. Krkić, N., Šojić, B., Lazić, V., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., & Tomovic, V. (2012a). Lipid oxidative changes in chitosan-oregano coated traditional dry fermented sausage Petrovska klobasa. *Meat science*. 93. 767-770. doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.043.
 16. Krkić, N., Lazić, V., Savatić, S., Šojić, B., Petrović, Lj., & Šuput, D. (2012b). Application of chitosan coating with oregano essential oil on dry fermented sausage, *Journal of Food and Nutrition Research* 51 (1). 60-68.
 17. Król, Ź., Kulig, D., Marycz, K., Zimoch-Korzycka, A., & Jarmoluk, A. (2017). The Effects of Using Sodium Alginate Hydrosols Treated with Direct Electric Current as Coatings for Sausages. *Polymers* 9, 11. 602. https://doi.org/10.3390/polym9110602.
 18. Mäkinen, S., Hellström, J., Mäki, M., Korpinen, R., & Mattila, P.H. (2020) Bilberry and Sea Buckthorn Leaves and Their Subcritical Water Extracts Prevent Lipid Oxidation in Meat Products, *Foods* 9, 265. 1-14. doi:10.3390/foods9030265.
 19. Милановић-Стевановић, М., Вуковић, И., Кочовски, Т., & Марковић, К. (2006). Утицај зачинског биља на промене масти током зрења и складиштења ферментисаних кобасица, Технологија меса, 47, 1-2. 38-44.
 20. Mitrović, R. (2016) Ispitivanje mogućnosti inaktivacije *Yersinia enterocolitica* u fermentisanim kobasicama. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Fakultet Veterinarske Medicine.
 21. Nikmaram, N., Budaraju, S., Barba, F.J., Lorenzo, J., Cox, R.B., Mallikarjunan, K., & Roohinejad, S. (2018). Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat science* 145. 245-255. doi:10.1016/j.meatsci.2018.06.031.
 22. Raesi, M., Tabaraei, A., Hashemi, M., & Behnampour, N. (2016). Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. *Int. J. Food Microbiol.* 238. 139–145.
 23. Sahari, M.A., & Asgari, S. (2013). Effects of Plants Bioactive Compounds on Foods Microbial Spoilage and Lipid Oxidation. *Food Science and Technology* 13. 52-61. 20134.
 24. Savić, Z., & Savić, I. (2004). *Sausage Casings*. Victus. Vienna.
 25. Suvajdžić, B. (2018). Ispitivanje mikroflore i parametara kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u industrijskim i tradicionalnim uslovima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine.

Истраживања проведена у овој дисертацији су доприњела да биљни екстракти са антимикробним и антиоксидативним дјеловањем задовоље потребе данашњег потрошача за здравствено исправном храном, без употребе хемијских конзерванаса. Додатком биљних екстраката добија се активни јестиви амбалажни материјал оптималних својстава који доприноси очувању стабилности квалитета кобасице, и ефикасно штити од непожељних оксидативних и микробиолошких промјена.

У изради јестивих филмова ради побољшања заштитних, нутритивних и сензорних својства производа може се користити велики број додатака. Защитна својства могу се побољшати додатком антимикробних агенаса или антиоксиданаса. Коришћењем вањског слоја превлаке са високом концентрацијом биљних екстраката са антимикробним или антиоксидативним дјеловањем могуће је одржати изворни интегритет хране или, као алтернатива, могуће је користити мање

количине додатака храни (у односу на укупну количину добијеног производа). Технике у производњи јестивих превлака морају се прилагодити самим карактеристикама материјала. Јестиви филмови и превлаке представљају могућност за побољшање квалитета хране, продужавање њеног рока трајања, сигурности и функционалности. Носиоци активних састојака могу се користити као појединачни амбалажни материјали и превлаке за храну.

- 1) Укратко истаћи разлог због којих су истраживања предузета и представити проблем, предмет, циљеве и хипотезе;
- 2) На основу прегледа литературе сажето приказати резултате претходних истраживања у вези проблема који је истраживан (водити рачуна да обухвата најновија и најзначајнија сазнања из те области код нас и у свијету);
- 3) Навести допринос тезе у решавању изучаваног предмета истраживања;
- 4) Навести очекиване научне и прагматичне доприносе дисертације.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

У поглављу МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА кандидат даје детаљан опис коришћених материјала и примењених метода рада. За потребе овог рада, припремљени су етанолни и водени екстракти следећих биљних врста: трњина (*Prunus spinosa*), дрењина (*Cornus mas*), црвена дијеља трешња (*Prunus avium*) и аронија (*Aronia melanocarpa*).

Природни омотачи, усольена говеђа цријева (Месница „Код Лазе“, Бања Лука), третирани растворима биљних екстраката коришћени су за испитивање антиоксидативних и антимикробних особина. Исти природни омотачи су касније употребљени за потапање у растворе екстраката дрењине и ароније, који су се користили за производњу ферментисаних кобасица. Производња ферментисаних кобасица, рађена је према произвођачкој спецификацији у Месној Индустрији „Њамњам“, Бања Лука.

Антиоксидативна активност биљних екстраката испитана је: одређивањем садржаја укупних фенола, флавоноида, флавонола и антоцијана; мјерењем вриједности $I_{C50\%}$ према DPPH и ABTS тестовима, као и мјерењем вриједности за FRAP тест. Испитивање антимикробне активности припремљених екстраката обављено је методом разрјеђења у агару (NCCLS) за *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Penicillium expansum*.

Антиоксидативне активности омотача третираних растворима биљних екстраката праћена је одређивањем садржаја укупних фенола и антиоксидативним тестовима (FRAP, DPPH, ABTS), а за тестирање антимикробне активности омотача са екстрактима коришћена је модификована метода дифузије у агару (ISO 20645).

У циљу праћења промјена квалитета ферментисаних кобасица са третираним омотачима, коришћене су следеће методе:

- инструментално одређивање боје омотача и пресјека кобасица,
- инструментално мјерење чврстоће,
- одређивање pH вриједности и активитета воде (a_w),
- одређивање хемијских параметара (садржаја воде, садржаја укупне масти, садржаја укупних протеина, садржаја укупног пепела и садржаја натријум хлорида) по стандардним ISO методама,
- праћење липидних промјена на мастима (киселински број, пероксидни број садржај MDA),
- сензорна оцјена ферментисаних кобасица, по стандардним ISO методама.

Примијењене методе истраживања у овој докторској дисертацији су адекватне, довољно прецизне, тачне и савремене. Кандидат је поштовао план истраживања који је дат приликом пријаве докторске дисертације. Испитивани параметри дају

довољно елемената за поуздано истраживање, а статистичка обрада је адекватна.

1) Објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзор за избор материјала;

2) Дати кратак увид у примијењени метод истраживања при чemu је важно оцијенити следеће:

1. Да ли су примијењене методе истраживања адекватне,овољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
2. Да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
3. Да ли испитивани параметри дајуовољно елемената или је требало испитивати још неке, за поуздано истраживање;
4. Да ли је статистичка обрада података адекватна.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

Резултати и дискусија су приказани у поглављу 4, у три потпоглавља. У сваком од њих, табеларно и графички, су приказани резултати добијени током истраживања, који су продискутовани и поређени са резултатима других аутора.

У првом дијелу представљени су резултати добијени испитивањем антиоксидативног и антимикробног дејства екстраката трњине, дрењине, ароније и црвене трешње. Установљено је да биљни екстракти показују различито антиоксидативно дјеловање. Етанолни екстракти су показали јачу антиоксидативну активност од водених екстраката, у свим испитиваним узорцима, што је резултат боље растворљивости полифенолних компоненти у разблаженом етанолу у односу на воду. Садржај укупних фенола (TPC) у испитиваним биљним екстрактима кретао се од 14.83 до 31.87 mg GAE/g с.е. у воденим, а 38.34-54.11 mg GAE/g с.е. у етанолним екстрактима. Редосlijед биљних врста по опадајућем садржају укупних фенола у воденим екстрактима је слиједећи: црвена трешња > аронија > дрењина > трњина, а у етанолним: трњина > аронија > дрењина > црвена трешња. Садржај укупних флавоноида (TF) је мањи од садржаја нефлавоноида (TN) у воденим екстрактима код свих узорака, док је код етанолних екстраката садржај нефлавоноида већи само код дрењине.

У воденим екстрактима садржај флавонола кретао се од 1.1 до 7 mg QE/g с.е., а у етанолним екстрактима од 1.3 до 10.37 mg QE/g с.е. Највећи садржај нађен је у трњини, у оба екстракта, а најмањи у дрењини, у оба екстракта.

Највећи садржај антоцијана (>20 пута већи од осталих биљних врста) нађен је у аронији, у оба екстракта. У воденим екстрактима садржај мономерних антоцијана кретао се од 1.06 до 54.66 mg/g с.е., а за укупне антоцијане од 2.51 до 69.76 mg/g с.е. У етанолним екстрактима садржај мономерних антоцијана је био већи него у воденим екстрактима и кретао се од 3.62 до 177.88 mg/g с.е., а укупних антоцијана од 12.96 до 229.17 mg/g с.е.

Најбољу антиоксидативну активност, мјерену ABTS, DPPH и FRAP тестовима, показао је екстракт ароније (водени и етанолни) (изузетак је ABTS код етанолног екстракта). Водени екстракти су, у свим испитиваним узорцима, показали слабију антиоксидативну активност од етанолних екстраката.

Активне материје биолошког поријекла имају снажно антиоксидативно и антимикробно дјеловање, као и ниску токсичност, и сматрају се ефикасним средством за активно паковање које може да се користити за чување и конзервисање хране.

Биљни екстракти показали су различито антимикробно дејство. Вриједност минималних инхибиторних концентрација (MIC) према *S. aureus* кретале су се од 7.5 mg/mL (етанолни екастркт трњине растворен у етанолу, TEE), до 120 mg/mL (водени екстракт трешње растворен у води, TrVV). Најниže вриједности минималних бактерицидних концентрација (MBC) имали су раствори дрењине (етанолни екстракт растворен у етанолу и води (EE и EV), као и водени екстракт

растворен у води, VV) и ароније (етанолни екстракт растворен у води, EV).

Према *B. cereus* вриједност MIC кретала су од 7.5 mg/mL (етанолни екстракти трњине и дрењине растворени у етанолу, TEE и DEE, и етанолни екстракти ароније растворени у етанолу и води, AEE и AEV), до 120 mg/mL (водени екстракт трешње растворен у води, TrVV), а најнижу вриједност MBC од 7.5 mg/mL имали су раствори ароније (етанолни екстракт растворен у етанолу и води, EE и EV).

Вриједност MIC према *E. coli* кретала се од 15 mg/mL код екстраката трњине и дрењине (етанолни и водени екстракти растворени у етанолу, EE и VE), до >120 mg/mL (водени екстракти ароније растворени у води, AVV). Најниже вредности MBC имали су раствори трњине (водени екстракт растворен у етанолу, VE) и дрењине (водени и етанолни екстракти растворени у етанолу, EE и VE).

Према *S. enterica* вриједност MIC кретала су од 15 mg/mL (етанолни и водени екстракти трњине и дрењине растворени у етанолу, TEE, TVE, DEE и DVE), до >120 mg/mL (водени екстракти ароније растворени у води, AVV), а најнижу вриједност MBC од 15 mg/mL имао је раствор дрењине (етанолни екстракт растворен у етанолу, EE).

Антифунгалну активност према плијесни *P. expansum* показали су једино раствори етанолних екстраката растворених у етанолу (EE) у највишој испитиваној концентрацији од 30 mg/mL, а до повећања пречника раста плијесни дошло је тек након четвртог дана. Остали раствори нису показали антифунгалну активност.

У другом дијелу дати су резултати добијени испитивањем антиоксидативног и антимикробног дјеловања омотача, третираних растворима екстраката трњине, дрењине, ароније и црвене трешње. Природни омотачи потопљени у биљне екстракте показали су различито антиоксидативно дјеловање. ТРС у испитиваним омотачима кретао се од 0.304 mg GAE/g (етанолни екстракти трешње растворени у води, TrEV) до 6.861 mg GAE/g (етанолни екстракти ароније растворени у етанолу, AEE). Највиша вриједност ТРС нађена је у омотачима третираним екстрактима ароније, веома сличним вриједностима за узорак са витамином С (C2), који се користи као контрола антиоксидативног средства.

Вриједности за DPPH кретале су од 0.028 mg GAE/g (водени екстракт трњине растворен у етанолу, TVE) до 1.259 mg GAE/g (етанолни екстракт ароније растворен у води, AEV). Највиша вриједност за DPPH нађена је у омотачима третираним растворима екстраката ароније.

Вриједности за ABTS кретале су од 0.054 mg GAE/g (водени екстракт трњине растворен у етанолу, TVE) до 0.796 mg GAE/g (етанолни екстракт ароније растворен у етанолу, AEE).

Вриједности за FRAP кретале су од 2.414 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (водени екстракт трњине растворен у етанолу, TVE), до 38.131 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ (етанолни екстракт ароније растворен у етанолу, AEE), а највеће вриједности су показали омотачи третирани са растворима ароније (веома високе вриједности).

Природни омотачи, потопљени у биљне екстракте, показали су различито антимикробно дејство. Дејство према *S. aureus*, у виду контактне инхибиције (К.И.) показао је само етанолни екстракт дрењине растворен у води (DEV). Прорјеђен раст бактерије *B. cereus* показао је омотач третиран раствором етанолног екстракта дрењине раствореног у етанолу (DEE). Дејство према *S. enterica* у виду инхибиције (И) показали су омотачи третирани растворима дрењине (водени екстракт дрењине растворен у води и етанолу, DVV и DVE), а К.И. омотачи третирани растворима дрењине (етанолни екстракт дрењине растворен у води и етанолу, DEV и DEE) и трњине (водени екстракти трњине растворени у води и етанолу, TVV и TVE, и етанолни екстракт трњине растворен у етанолу, TEE). На *E. coli* К.И. су показали омотачи третирани воденим екстрактима трњине, дрењине и ароније, растворени у води (TVV, DVV и AVV). Добијени резултати указују да су коришћене

концентрације екстраката у које су били потопљени смотачи, иако су биле више од измјерених MIC вриједности за поједине екстракте, нису биле довољне да они покажу значајније антимикробно дејство, иако је установљено да испитивани омотачи имају позитиван утицај на антиоксидативна својства. Претпоставка је да је омотач задржао мању количину екстракта од потребне за дјеловање на изабране сојеве. Одавде произилази да се антимикробне особине биљних екстракта могу приписати индивидуалним или синериџским ефектима различитих фактора, а не само садржају фенолних материја.

У трећем дијелу дат је преглед резултата физичких, физичко-хемијских, хемијских и сензорних промјена у току зрења и складиштења традиционалних ферментисаних кобасица, као и липолитичких промјена и микробиолошког статуса.

Употреба омотача третираног биљним екстрактом утицала је на очување квалитета и одрживости ферментисаних кобасица током складиштења. Примјена омотача третираних биљним екстрактима није утицала на промјену pH и a_w вриједности, а добијене вриједности се нису разликовале од вриједности код контролног узорка. На садржај воде, пепела, соли, протеина и укупних масти у кобасицама, третирани омотачи нису имали никакав утицај и нису се разликовали од контролног узорка.

Праћењем липолитичких промјена, резултати показују да је током складиштења дошло до повећања садржаја слободних масних киселина у испитиваним узорцима кобасице, осим за AEE (етанолни екастракт ароније растворен у етанолу), код кога је у току последњег три мјесеца складиштења дошло до смањења вриједности за приближно 5%.

Резултати анализе вриједности пероксидног броја показали су да је током складиштења дошло до њеног пораста, осим код узорка третираног витамином С (C2). Узорак DEE (етанолни екастракт дрењине растворен у етанолу) је показао ниже вриједности од контролног узорка.

Праћењем напредовања оксидационог процеса MDA тестом, вриједности током складиштења су порасле у свим испитиваним узорцима и кретали су се од 0.74 до 1.90 mg/kg. У узорцима са третираним омотачима (AEE и DEE) током складиштења су измјерени мањи садржаји MDA, у односу на контролни узорак, за приближно 12%.

Резултати испитивања текстуре показују да је код узорка DEE дошло до повећања тврдоће током складиштења. Узорак AEE се током складиштења понашао слично контролном узорку, уз незнатно већу тврдоћу.

Посматрајући боју површине кобасице, долази се до закључка да је употреба екстракта ароније имала утицај на параметар боје. Током складиштења дошло је до пораста свјетлоће (L^*) и удјела црвене боје (a^*), а лагани пораст је примијеђен и код удјела жуте боје (b^*).

Код параметара L^* и a^* на пресјеку кобасица није било већих промјена, сличан тренд је присутан код свих узорака. Удио жуте боје (b^*) на пресјеку није се мијењао само код узорка AEE.

Сензорним испитивањем узорака кобасица, након зрења и током три мјесеца складиштења, установљено је да није било разлике између испитиваних узорака. Након шестог мјесеца складиштења у узорцима AEE и DEE дошло је до појаве кисelog укуса различитог интензитета, али оцјене за укупну прихватљивост су и даље биле веома високе.

Резултати „different from control“ - DFC теста показали су да је узорак AEE визуелно био прихватљивији и имао љепшу боју површине, што је потврђено и резултатима испитивања боје омотача.

Резултати TPC добијени анализом омотача ферментисаних кобасица показали су да је узорак DEE током цијelog периода складиштења имао знатно виши садржај TPC од контролног узорка (18-50%). Резултати мјерења антиоксидативних активности

примијењеним тестовима (ABTS, DPPH, FRAP), такође су показали да су вриједности мјерних параметара биле више код узорака AEE и DEE, у односу на контролни узорак.

Испитивањем укупног броја бактерија дошло се до закључка да су током цијelog периода складиштења узорци AEE и DEE имали мањи укупан број бактерија од контролног узорка. У погледу испитивања присуства других тестирањих микроорганизама (ентеробактерија, коагулаза (+) стафилокока, сулфиторедукујућих клостридија, квасца и плијесни), нису установљена одступања узорака AEE и DEE у односу на контролни узорак, а сви испитивани узорци су били микробиолошки исправни.

На основу свих резултата истраживања, генерално се може закључити да је употреба омотача третираних екстраката позитивно утицала на смањење киселинске вриједности, пероксидног броја и садржаја MDA, као и на смањење укупног броја бактерија у току складиштења у односу на контролни узорак, а није негативно утицала на сензорне особине испитиваних ферментисаних кобасица. Одабрани омотачи показали су антиоксидативну активност и позитивно дјеловање у спречавању оксидативних промјена у мастима, као и антимикробну активност која је утицала на смањење укупног броја бактерија у кобасицама и продужење одрживости и квалитета Домаће ферментисане кобасице.

Сагледавши све резултате истраживања може се констатовати да је кандидат својим експерименталним радом дошао до поузданих података, које је обрадио научним методама, те на основу њих у потпуности потврдио задане хипотезе.

Ово истраживање може бити основа за проширење истраживања у погледу одабира одговарајућих биљних врста као и употреби различитих и адекватних концентрација биљних екстраката у третирању омотача, у циљу добијања активне амбалаже и што квалитетнијих производа.

- 1) Укратко навести резултате до којих је кандидат дошао;
- 2) Оцијенити да ли су добијени резултати јасно приказани, правилно, логично и јасно тумачени, упоређујући са резултатима других аутора и да ли је кандидат при томе испољавао довољно критичности;
- 3) Посебно је важно истаћи до којих нових сазнања се дошло у истраживању, који је њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација кандидата mr Ане Велемир под називом: „**Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице**“ садржи све неопходне елементе које захтијева један научно-истраживачки рад. Дисертација је урађена у складу са савременим принципима и методологијим научно-истраживачког рада, те у складу са постављеном хипотезом коју је кандидат дао током пријаве дисертације. Сви елементи у дисертацији су изложени на јасан и конкретан начин, са научним утемељењем. Комисија сматра да дисертација mr Ане Велемир представља самосталан и оригиналан научни рад. Комисија констатује да је кандидат овладао методом научног рада, а проведена истраживања у дисертацији дају допринос науци и примјењива су у пракси.

Примјеном биљних екстраката за третирање природних омотача у производњи ферментисаних кобасица може да се очува или побољша њихов квалитет, али и да се продужи трајност током складиштења. Амбалажа која садржи природне конзервансе и антиоксидансе несумњиво има велики потенцијал. Развој антиоксидативних активних система паковања је нова алтернативна технологија

паковања заснована на утрађивању антиоксидативних агенаса у паковање, као начин побољшања стабилности прехрамбених производа осјетљивих на оксидацију.

На основу укупне оцјене докторске дисертације и свега изложеног у овом Извјештају, Комисија једногласно даје **позитивну оцјену** урађеној докторској дисертацији кандидата мр Ане Велемир под називом „**Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице**“ и предлаже Научно-наставном вијећу Технолошког факултета и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвати **позитивну оцјену** докторске дисертације кандидата **мр Ане Велемир** и одобри јавну одбрану.

- 1) Навести најзначајније чињенице што тези даје научну вриједност, ако исте постоје дати позитивну вриједност самој тези;
- 2) На основу укупне оцјене дисертације комисија предлаже:
 - да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана,
 - да се докторска дисертација враћа кандидату на дораду (да се допуни или измијени) или
 - да се докторска дисертација одбија.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: 25.03.2022.

1. Др Александар Савић, ванредни професор Технолошког факултета Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област Биохемијско инжењерство, предсједник;

2. Др Светлана Мандић, ванредни професор Технолошког факултета Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област Прехрамбене технологије намирница животињског поријекла, ментор;

3. Др Сузана Јахић, ванредни професор Биотехничког факултета Универзитета у Бихаћу, ужа научна област Храна и пиће, члан;

ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложение, односно разлог због којих не жели да потпише извјештај.

Прилог 3.

Изјава 1

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

**Изјављујем
да је докторска дисертација**

Наслов рада „Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице“

Наслов рада на енглеском језику „Effect of herbal extract addition on the properties of the natural casings and viability of domestic fermented sausage“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да докторска дисертација, у целини или у дијеловима, није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци 18.04.2022.

Потпис докторанта

Ана Веленић

Изјава 2

Изјава којом се овлашћује
Универзитет у Бањој Луцида
докторску дисертацију учини јавно
доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом

„Утицај додатка биљног екстракта на својства природног омотача и
одрживост Домаће ферментисане кобасице“

која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

Докторску дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – дијелити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Бањој Луци 18.04.2022

Потпис докторанта

Ана Веленић

Изјава 3

**Изјава о идентичности штампане и електронске
верзиједокторске дисертације**

Име и презиме аутора Ана Велемир

Наслов рада „Утицај додатка биљног екстракта на својства природног
омотача и одрживост Домаће ферментисане кобасице“

Ментор проф. др Сњежана Мандић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична
електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум
Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци 18.04.2022.

Потпис докторанта

Ана Велемир