

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ
Катедра за хигијену и технологију намирница анималног
порекла

ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА КАРВАКРОЛА И ЕУГЕНОЛА НА
РАСТ *LISTERIA MONOCYTOGENES* У ВАКУУМ ПАКОВАНОЈ
СВЕЖОЈ ПАСТРМЦИ

Докторска дисертација

мр Слободан С. Дојчиновић, двм спец.

Београд, 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of Hygiene and Technology of Food of Animal Origin**

**EXAMINATION OF CARVACROL AND EUGENOL IMPACT ON
GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN VACUUM
PACKED FRESH TROUT**

PhD Thesis

MSc Slobodan S. Dojčinović, DVM spec.

Belgrade, 2016.

МЕНТОР:

**Др. Мирјана Димитријевић, ванредни професор
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду
Катедра за хигијену и технологију намирница анималног порекла**

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

**др Милан Ж.Балтић, редовни професор у пензији
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине,
Катедра за хигијену и технологију намирница анималног порекла**

**др Владо Теодоровић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду
Катедра за хигијену и технологију намирница анималног порекла**

**др Светлана Грдовић, ванредни професор
Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду
Катедра за исхрану**

**др Весна Ђорђевић, научни сарадник
Институт за хигијену и технологију меса, Београд**

Датум одбране докторске дисертације

Овом приликом захваљујем се свима који су својим залагањем и несебичношћу допринијели изради докторске дисертације посебно:

др Мирјани Димитријевић, као ментору, на несебичној помоћи, савјетима којима ме је усмјеравала и указаном повјерењу

Проф.др Милану Ж Балтићу на корисним сугестијама и помоћи у статистичкој обради података

Члановима Комисије на коректном и професионалном односу

Сарадницима у колективу Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске“ Др Васо Бутозан“ на несебичној помоћи и разумијевању при реализацији ове дисертације

Предузећу Рибњак Јањ

Захваљујем се мојој породици супрузи Сањи, кћеркицама Ани и Лени на разумијевању, подршци и стрпљењу.

РЕЗИМЕ

Риба као намирница има потенцијал да изазове широк спектар обољења код особа које је конзумирају, с обзиром на могућност контаминације и раста патогених бактерија током производног процеса, од тренутка излова до финалне припреме и конзумације. У нашем експерименту испитивали смо утицај карвакрола и еугнола на раст *L.monocytogenes* у вакуум пакованој свјежој пастрмки. Резултати наших испитивања показали су да испитиване компоненте етеричних уља карвакрол и еугнол као и њихова комбинација имају значајан утицај на раст *L.monocytogenes*. У току складиштења од двадесет дана, број *L.monocytogenes* је опадао, а десетог дана складиштења у испитиваној групи која је третирана еугнолом забиљежен је најмањи број овог патогена од $0,74 \pm 0,44 \log \text{CFU/g}$. Поред *L.monocytogenes* и укупан број аеробних мезофилних бактерија је опадао да би најмањи био шестог дана складиштења ($1,40 \pm 0,45 \log \text{CFU/g}$) у групи која је третирана комбинацијом карвакрола и еугнола. Укупан број бактерија млијечне киселине био је у порасту током цијелог експеримента, као и садржај укупно испарљивог азота (интервал од 31-48,60 mgN/kg). рН вриједност није се мијењала током складиштења, а основни хемијски састав био је карактеристичан за врсту намирнице. Сензорна оцјена обухватала је промјене изгледа, мириса, текстуре и укупну прихватљивост производа. Статистички значајне разлике између оцјењиваних сензорних карактеристика контролне и испитиваних група забиљежене су десетог дана складиштења. Двадесетог дана складиштења најмању просјечну оцјену ($1,70 \pm 0,2$) за укупну прихватљивост производа имала је контролна група, док је највишу просјечну оцјену ($2,75 \pm 0,19$) добила група третирана еугнолом.

Кључне ријечи: *L.monocytogenes*, карвакрол, еугнол, пастрмка, укупна прихватљивост

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Безбједност меса рибе

УДК број: 597.512:579.65:635.7

RESUME

Fish as food has the potential to cause a wide spectrum of diseases in those who consume it, considering the possibility of contamination and growth of pathogenic bacteria during the production process, from the moment of fishing to final preparation and consumption. In our experiment, we examined the carvacrol and eugenol impact on growth of *L. monocytogenes* in vacuum packed fresh trout. The results of our analysis showed that the tested components of essential oils carvacrol and eugenol, as well as their combination, have a significant impact on the growth of *L. monocytogenes*. During the storage of twenty days, the number of *L. monocytogenes* decreased, and on the tenth day of storage in tested group treated with eugenol was recorded the lowest number of the pathogen from 0.74 ± 0.44 logCFU/g. Next to *L. monocytogenes*, the total number of aerobic mesophylic bacteria decreased, and it was lowest on the sixth day of storage (1.40 ± 0.45 logCFU/g) in the group treated with a combination of carvacrol and eugenol. The total number of lactic acid bacterias increased throughout the experiment, as well as the content of volatile nitrogen (interval from 31 to 48.60 mgN/kg). pH value hasn't change during storage, and the basic chemical composition was characteristic for this type of food. Sensory evaluation included changes of appearance, odor, texture and the overall acceptability of product. Statistically important differences between evaluated sensory properties of control and tested groups were recorded on the tenth day of storage. Twentieth day of storage the lowest average score ($1,70 \pm 0,2$) for the overall acceptability of product had the control group, and the highest average score ($2,75 \pm 0,19$) had the group treated with eugenol.

Keywords: *L. monocytogenes, carvacrol, eugenol, trout, the overall acceptability*

Scientific area: Veterinary Medicine

Field of Academic Expertise: Fish meat safety

The UDK number: 597.512:579.65:635.7

САДРЖАЈ

1.	УВОД.....	1
2.	ПРЕГЛЕДЛИТЕРАТУРЕ.....	4
2.1	Микробиологија рибљег меса.....	4
2.1.1.	<i>Listeria monocytogenes</i> -таксономија, изглед колонија метаболизам.....	5
2.1.2.	Епидемиологија листериозе људи.....	8
2.1.3	Налаз <i>Listeria monocytogenes</i> у намирницама.....	14
2.1.4	Налаз <i>Listeria monocytogenes</i> у риби, производима од рибе, и плодовима мора.....	16
2.2.	Етарска уља.....	17
2.2.1.	Хемијски састав и антимикуробне особине.....	17
2.2.2.	Карвакрол.....	23
2.2.3.	Еугенол.....	24
2.2.4.	Дјеловање етарских уља на одрживост рибе и производа од рибе.....	24
2.2.5.	Органолептичка прихватљивост производа третираних етарским уљима.....	27
2.3.	Паковање свјеже рибе.....	28
3.	ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА.....	32
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	34
4.1	Материјал.....	34
4.1.1.	Микроорганизми.....	34
4.1.2.	Начин вјештачке контаминације узорака са <i>Listeria monocytogenes</i>	35
4.2.	Методe.....	35
4.2.1	Микробиолошке анализе.....	35
4.2.2.	Хемијске и физичко хемијске анализе.....	38
4.2.3.	Сензорне анализе.....	40
4.2.4.	Статистичке анализе.....	40
5.	РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА.....	41
5.1.	Микробиолошке анализе.....	41
5.1.1.	Испитивање броја <i>Listeria monocytogenes</i> у испитиваним групама током складиштења.....	41
5.1.1.1	Промјене броја <i>L. monocytogenes</i> у испитиваним групама током складиштења.....	43
5.1.2.	Испитивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија у испитиваним групама узорака током складиштења.....	46
5.1.2.1	Промјене укупног броја аеробних мезофилних бактерија током складиштења.....	48
5.1.3.	Испитивање укупног броја бактерија млијечне киселине током складиштења.....	51
5.1.3.1	Укупан број бактерија млијечне киселине у испитиваним групама узорака током складиштења.....	51
5.2.	Хемијске и физичко хемијске анализе.....	55
5.3.	Сензорне анализе.....	57
6.	ДИСКУСИЈА.....	62
7.	ЗАКЉУЧЦИ.....	73
8	СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ.....	75

1. УВОД

Према подацима Свјетске здравствене организације (World Health Organization, WHO) болести преносиве храном представљају све већи, како здравствени, тако и економски проблем у свијету и узрок су милиона обољења годишње на глобалном нивоу. Месо рибе је једна од намирница која се због неоспорног значаја, употребљава у исхрани, а чија безбједност представља један од проблема савременог друштва. Са аспекта безбједности хране, опасности поријеклом из меса рибе које могу да угрозе здравље људи дефинишу се као биолошке (бактерије, вируси, паразити), хемијске (остаци токсичних елемената, пестицида, микотоксина, халогених угљоводоника, ветеринарских лијекова и др.) и физичке (метални фрагменти, стакло, дрво, пластика и др). Као најзначајније са епидемиолошког аспекта издвајају се биолошке опасности, које најчешће угрожавају безбједност меса рибе. Риба као намирница има потенцијал да изазове широк спектар обољења код особа које је конзумирају, с обзиром на могућност контаминације и раста патогених бактерија од тренутка излова, па током производног процеса, до финалне припреме и конзумације. Као најчешћи патогени микроорганизам поријеклом из меса рибе који изазива обољења преносива храном се помиње *Listeria monocytogenes*.

Ова патогена бактерија је проузроковала значајне епидемије широм свијета од почетка осамдесетих година прошлог вијека па све до данас. Европска агенција за безбједност хране (European Food Safety Authority, EFSA) указује да се број случајева листериозе људи и даље ипак незнатно повећава последњих година. Статистички значајан тренд раста појаве алиментарне листериозе људи у Европској унији је примјећен у периоду од 2008-2012. године. (EFSA.2014). Као и претходних година, стопа смртности је била висока (17,8%). Укупно 198 смртних исхода листериозе је пријављено у 18 држава чланица ЕУ у 2012. год., што је највећи број фаталних случајева пријављених од 2006. године. Међутим, у малопродаји је *L. monocytogenes* у храни спремној за конзумирање, ријетко детектована изнад сигурносног законског лимита. Узорци који су прелазили ову границу су најчешће били производи од рибе. Подаци прикупљени током последњих 10 година, указали су на постојање група намирница које се сматрају

ризичним за појаву листериозе (Rosourt и сар., 2000). Забиљежен је и већи број епидемија узрокованих присуством листерија у храни као што су месо рибе, производи од рибе и морски плодови (Newell и сар., 2010; Nyachuba и сар., 2010). Последњих година јавља се потреба за новим методама редукције и елиминације патогених микроорганизама преносивих храном и микроорганизама квара, које би могле да се користе самостално, али и у комбинацији са већ постојећим методама (Burt, 2004). Међу њима је и употреба етарских уља, која представљају смјешу миришљавих и лако испарљивих једињења мале молекулске масе, а која се синтетишу у различитим органима биљака и растварају у липидима и органским растварачима (Burt, 2004; Bakkali и сар., 2008; Тајкарими и сар., 2010; Lv и сар., 2011; Вајраи и сар., 2012.; Бошковић и сар., 2013). Иако хемијски састав етарских уља варира, ипак су нека једињења увијек процентуално заступљенија од других, па је тако главно хемијско једињење у уљу оригана - карвакрол, а у уљу каранфилића - еугенол. Карвакрол (5-изопропил-2-метилфенол) је изомер и представља монотерпенски фенол, док је еугенол ($C_{10}H_{12}O_2$) дериват пропаноида и оба једињења имају јако антибактеријско дејство. С обзиром на то да се етарска уља састоје од великог броја хемијских компонената, њихово антибактеријско дејство је засновано на више различитих механизма, а као најодговорнији за оштећење бактеријске ћелије сматра се оштећење ћелијске мембране. Наиме, етарска уља интереагују са липидном мембраном бактеријске ћелије и повећавају њену пермеабилност. Пермеабилност ћелијске мембране настаје као резултат промјене мембранског потенцијала, колапса протонске пумпе, изласка јона из ћелије што за посљедицу има лизу и ћелијску смрт (Burt, 2004; Bakkali и сар., 2008; Lv и сар., 2011; Вајраи и сар., 2012.; Бошковић и сар., 2013). Еугенол, главна компонента етарског уља каранфилића, доводи у великој мјери до разградње ћелијског зида и растварања ћелијског састава. Претпоставља се да хидроксилна група везује протеине, спрјечавајући ензимско дјеловање. У различитим огледима испитиван је антимикуробни утицај етарских уља на патогене бактерије, укључујући и њихову потенцијалну употребу код меса и производа од меса, у циљу стварања безбједнијег производа и смањења инциденције нових обољења изазваних патогеним бактеријама. Ова истраживања показала су да антимикуробне особине етарских уља зависе не само од типа, хемијских особина, начина употребе етарских уља, већ и од карактеристика самог меса, рН вриједности,

активности воде, температуре и других параметара (Burt, 2004; Gutierrez и сар., 2008; Gutierrez и сар., 2009; Govaris и сар., 2010; Lv и сар., 2011; Karabagias и сар., 2011; Вајрај и сар., 2012; Awaisheh, 2013; Khanjari и сар., 2013; Teixeira и сар., 2013). Као етарска уља са најјачом антимикрообном активношћу помињу се етарска уља оригана, каранфилића, тимијана, рузмарина, која такође испољавају и синергистичко дејство (Burt, 2004; Nayouni и сар., 2008; Govaris и сар., 2010; Тајкарими и сар., 2010; Вајрај и сар., 2012). На основу литературних података, указује се потреба да током процеса производње и паковања калифорнијске пастрмке, у циљу превенције листериозе, али и других бактеријских обољења, као један од начина превентиве може представљати употреба активних компоненти етарских уља, које се све чешће наводе као супстанце са антибактеријским дјеловањем. Оваква истраживања би требало произвођачима свјеже рибе да омогуће примјену савременијих метода у циљу производње намирнице уједначеног квалитета и безбједне по потрошача.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Микробиологија рибљег меса

Одрживост свјеже слатководне рибе зависи од много чинилаца, који могу да се подијеле на преморталне и постморталне. Од преморталних посебан значај има бактериолошки статус воде, њен квалитет и температура. Такође, на одрживост имају утицај и изловљавање, начин и дужина транспорта рибе. Поступци који су везани за обраду рибе (омамљивање, искрварење, евисцерација и прање), убрајају се у постморталне чиниоце и такође могу значајно да утичу на бактериолошки статус рибе. Риба може да се контаминира бактеријама поријеклом из водене средине, као и бактеријама које нису карактеристичне за рибу, а контаминирају је у току обраде у контакту са рукама радника, опремом и радним површинама (Балтић и сар., 2009).

Врста и број микроорганизама рибе могу знатно варирати и зависе од врсте рибе, средине из које рибе потичу, као и хигијенских услова у току производње и прераде. Риба поријеклом из аквакултура, ријека, приобалних дијелова мора и језера примарно је више контаминирана од риба из мора. На један cm^2 површине рибе обично се налази 10^2 - 10^4 log/cfu бактерија, а некада и више. Бактеријска флора тек уловљене рибе је врло разноврсна. То су углавном грам негативне бактерије родова: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio* и *Flavobacterium*. Код пастрмки гајених у аквакултури може бити присутан *Clostridium botulinum* тип E. Од грам позитивних врста најважније су микрококе и колиформне групе бактерија. (Јемсеv и сар., 2000, Теодоровић и сар., 2015).

Рибу изловљену из загађених водених базена могу контаминирати салмонеле и ентерококе. Највише микроорганизама налази се у цријеву и шкргама риба. У једном граму садржаја цријева свјеже рибе може се наћи 10^5 - 10^8 log/cfu бактерија. То су углавном различите трулежне бактерије међу којима је много спорогених анаероба. Могу се наћи и изазивачи тровања хране (*Cl.perfringens*, *B.cereus*, *Staphylococcus aureus*) и изазивачи ботулизма (*Cl.botulinum*). На морској риби неких индустријских регија налази се *Vibrio parahaemolyticus*. (Јемсеv и сар.,2000).

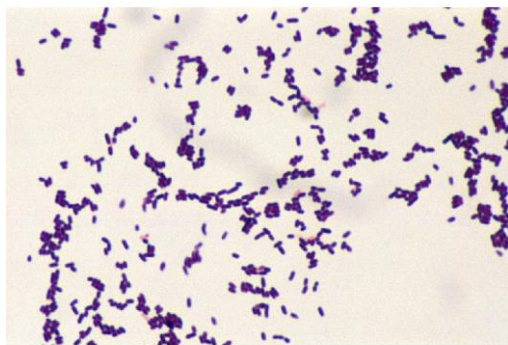
Квару меса рибе микроорганизми доприносе на више начина. Стварају бактеријске ензиме неопходне за одвијање процеса биоразграђивања. Материје које настају у

процесу биоразградње, између осталих, су и водоник-сулфид, диметил-сулфид и метил-меркаптан, које настају из аминокиселина које садрже сумпор; индол, скатол, путресцин, кадаверин, који настају из протеина; те карбонилна једињења која настају из липида (Avaru и сар.1994).

Поред микроорганизама који могу да проузрокују квар, риба такође може да буде контаминирана микроорганизмима који код људи могу да проузрокују бактеријске инфекције и интоксикације, као и инфекције коже. Због своје убиквитарности, могућности преживљавања при температурама фрижидера, те бројним епидемијама изазваним њеним присуством у храни, контрола присуства *Listeria monocytogenes* од посебног је значаја за производњу рибе и производа од рибе. Контрола микробиолошке контаминације риба могућа је примјеном интегрисаних система контроле који би обухватили све процесе од улова до испоруке крајњем потрошачу. (Теодоровић и сар.,2015)

2.1.1. *Listeria monocytogenes* -таксономија, морфологија колонија и метаболизам

Listeria monocytogenes припада роду *Listeria*. Бактерије овог рода су грам позитивни, кратки, аспорогени, каталаза позитивни, оксидаза негативни и факултативно анаеробни штапићи.



Слика 1: Микроскопски препарат *L.monocytogenes*
(Rasmussen и сар., 1995)

На микроскопском препарату могу се видјети као појединачне колоније или у кратким ланцима, у облику слова V, ријетко у дужим филаментима. Не стварају капсуле нити споре. Покретљиви су при температури од 20-25⁰С, захваљујући

поседовању перитрихно распоређених флагела, којих обично имају 2-5. У висећој капи показују типично „тумблинг кретање“.

Аероби су и факултативни анаероби. Оптимална температура раста им је између 30-37°C, док су им температурне границе од 1-45°C. Не преживљавају загревање при температури од 60 °C током 30 минута. Оптимални раст листерија је при неутралном или слабо алкалном рН. Обично расту у распону рН од 6 до 9 (не расту при рН нижем од 5.5). Стварају цитохроме, а ферментацијом глукозе стварају већином L+ млијечну киселину. Метаболишу и многе друге шећере уз стварање киселине, али не и гаса. Реакција са метил црвеним и Voges Proskauer су позитивне. Не стварају индол и не користе егзогени цитрат. Хидролизују ескулин и натријум хипурат. Не хидролизују уреу, желатин, казеин и млијеко. Захтијевају органске факторе раста, а стимулативни фактор за листерије је гвожђе. Различите врсте листерија стварају неколико форми колонија. Код свјежих изолата најчешћа је S форма (са уздигнутим ивицама и улегнутим центром), која некада у току даљег култивисања може да пређе у облик сличан R форми. Храпава R форма карактеристичног је изгледа са неравном и храпавом површином. Колоније на храњивом агару су пречника 0.5-1,5-mm, округле, слабо испупчене и прозирне.

На крвном агару ствара бета-хемолизу. Зоне које ствара *L.monocytogenes* су уске и често се не пружају иза ивице колоније и могу се детектовати једино одвајањем колоније езом са површине агара. *L.ivanovii* ствара широке или мултипле зоне хемолизе. *L.monocytogenes* ствара бета хемолизу на крвном агару чија је зона слабија него код *L.ivanovii*, али је израженија него код *L.seeligeri*. Хемолиза овчијих еритроцита се појачава CAMP феноменом, при чему се користи бета хемолитични *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi*.

Listeria monocytogenes ствара различите специфичне супстанце: хемолитични токсин, хемолизин, листериолизине, липолитични токсин (фосфолипаза), екстрацелуларно хеморагични токсин - лизоцим, пирогене супстанце и сви доприносе патогеним својствима листерија. Поред тога стварају и бактериоционе познате као моноцини или листериоцини, што су доказали још 1962. године Намон и Рерон. Бактериоцини су екстрацелуларно ослобођени пептиди или протеински молекули створени од стране одређених бактерија, који посједују бактерицидна својства према неким врстама бактерија, најчешће сродним са врстама произвођача бактериоцина (Tagg и сар., 1976). То су рибозомално створени прекурсори полипептида или протеини, који

дјелују антимикуробно на широк спектар блиско сродних бактерија (Jack и сар., 1995). Налазе се самостално или могу да буду везани са липополисахаридима ћелијског зида. Моноцини се могу упоредити са пиоцинима, колицинима и протеоцинима. Утврђено је да око 76% сојева *L.monocytogenes* производи моноцине (Ortel 1989), при чему унутар серотипа 4b – 94%, а унутар соја ½ а-67,2%.

Диференцијалне карактеристике појединих врста у оквиру рода *Listeria* дате су у следећој табели:

Табела 2.1. Карактеристике појединих врста у оквиру рода *Listeria*

Карактеристике /Врсте	<i>L.mocytogenes</i>	<i>livanovii</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.murrayi</i>
Бета хемолиза	+	+	-	+	-	-	-
САМР тест (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	-	-	+	-	-	-
САМР тест (<i>Rhodococcus equi</i>)	-	+	-	-	-	-	-
Стварање киселине од:							
Манитола	-	-	-	-	-	+	+
l- метил Д манозид	+	-	+	-	+	НД	НД
l рамнозе	+	-	д	-	д	-	Д
Хидролизом скроба	-	-	-	нд	нд	+	+
Д ксилоза	-	+	-	+	+	-	-
Хидролиза хипурата	+	+	+	нд	нд	-	-
Редукција нитрита	-	-	-	нд	нд	-	+
Патогеност за миша	+	+	-	-	-	-	-

Легенда: + 90% или више је позитивно; - 90% или више је негативно; д-11-89% позитивно; нд – није детерминисано

Listeria spp. посједује 15 соматских и 5 флагеларних антигена. Комбинацијом свих антигена омогућава се дефинисање 16 сероваријетета *L. monocytogenes* и сродних врста. Дуго се сматрало да су сероваријетети ½ а, ½ b, ½c, и 4b одговорни за листериозу код животиња и људи, па су их означавали као маркере за ову болест. Међутим, данас су сазнања измијенила, пошто је установљено да сојеве врста *L. seeligeri*, *L. welshimeri* често карактерише присуство ових антигених особина. Сви сојеви *L.ivanovii* припадају серотипу 5, тако да серотипизација у том случају представља и критеријум идентификације. Сојеви серогрупе 6 припадају непатогеним врстама *L.innocua*, *L.welshimeri* и *L.seeligeri*.

2.1.2. Епидемиологија листериозе људи

Епидемиолошки аспект листериозе, распрострањеност *Listeria monocytogenes* у животној средини, храни, откривање извора и начин преношења на људе и животиње обрађиван је у многобројним студијама.

Током испитивања листериозе код животиња и људи, установљено је да серотип $\frac{1}{2}$ а *L.monocytogenes* доминира у Европи, а серотип *4b* у Америци. То правило је важило све до увоза инфицираних чинчила из САД у Њемачку, након чега је серотип *4b* постао доминантан и у западноевропским земљама. Интересантан је и податак да је серотип $\frac{1}{2}$ а чешћи у намирницама, као и да су листериозе људи далеко чешће узроковане серотипом *4b*. Упркос великом броју *L.monocytogenes* у окружењу, релативно мали број људи озбиљно оболи, што је свакако резултат ефикасног имуног система већине здравих особа. Ипак, анализе показују да већина присутних листерија у нашем окружењу није вирулентна или су слабо вирулентне. Само неколико серотипова је одговорно за појаву озбиљне болести листериозе. Испитивањем *L.monocytogenes* изолованих од 1363 пацијента, установљен је најчешће серотип *4b* (64% случајева), док су остали серотипови били заступљени: $\frac{1}{2}$ а у 15 %, $\frac{1}{2}$ b у 10% и 1/c у 4% случајева. Серотип *4b* је најчешће био присутан у случајевима листериозе код трудница, а $\frac{1}{2}$ b код осталих случајева (Mclauchin, 1990).

Код испитивања скотних мишева, није установљена значајна разлика инфективности серотипова $\frac{1}{2}$ а, и $\frac{1}{2}$ b на скотним женкама мишева у односу на *4b* (Lammerding и сар., 1992). У другим експериментима, неколико серотипова *L.monocytogenes* које припадају серогрупи 4 поређено је на основу вируленције за мишеве и способности стварања вирулентних фактора. Сојеви *4b*, *4ab*, и $\frac{1}{2}$ а су се показали највирулентнијим за мишеве, а ниска вирулентност сојева *4a*, *4c*, *4d* и *4e* у вези је са ниском продуктивношћу вирулентних фактора и ActA протеина. Неки сојеви стварају и врло ниске количине листериолизина O и интерналина (Соколовић и сар. 1996).

Анализом варијација у сојевима листерија коришћењем RAPD метода (Random Amplification of polymorphic DNA), утврђено је да су само поједини генотипови *L.monocytogenes* заједнички свим изолатима који су проузроковали листериозу људи у Јапану (Inoue и сар., 2001). Прегледом ДНА секвенци неких вирулентних гена, указано је да постоје три еволутивне линије *L.monocytogenes* (Rasmussen и сар., 1995, Wiedmann и сар., 1997). Сви испитани сојеви који су изоловани у случајевима епидемија код људи и неки спорадични случајеви хумане листериозе припадају

линији I, а изолати који нису хумани су дио линије III (Wiedmasnn и сар. 1997). Овом техником, од 117 изолата *L.monocytogenes* из димљене рибе и производа који се обрађују димом, 37% је припадало линији I. Кориштењем цитотоксичних тестова 17% изолата је показивало авирулентност или врло слабу вирулентност (Norton и сар., 2001).

Сојеви *L.monocytogenes* пронађени током избијања листериоза, прегледани су и PCR методом. Разлике које су утврђене указују на везу између њихових ДНК-а секвенци и способности експресије различитих фактора вируленције (Franciosa и сар.2001).

Сви добијени резултати указују на чињеницу да све *L.monocytogenes* које су изоловане из хране или окружења не представљају подједнаку опасност по здравље људи. Поред тога, и многи фактори средине могу да утичу на појачање или слабљење вирулентности серотипова *L.monocytogenes*. Уколико је *L. monocytogenes* изложена умјерено киселим условима средине, развија толеранцију на киселину и постаје способнија за инвадирање и пролиферацију у културама ћелија, од бактерија које нису стекле такав тип толеранције (Conte и сар., 2000). Разлог што је *L.monocytogenes* узрокује тако тешку болест лежи у њеној способности да индукује сопствену фагоцитозу, користећи ћелије домаћина за размножавање и директно транспортовање у друге ћелије. Када листерија уђе у ћелију домаћина, шири се по организму, заштићена од многих одбрамбених механизма организма, укључујући антитијела и комплемент.

L.monocytogenes представља убиквитарну бактерију, што значи да је веома распрострањена у животној средини. Због тога постоји могућност да се нађе у организму животиња и људи, како оних обољелих од листериозе, тако и код потпуно здравих јединки. Такође, и храна се може контаминирати током производње и складиштења, па на тај начин постати извор заразе за људе и животиње. Инфекције листеријама јављају се најчешће спорадично, мада се могу манифестовати и као епидемија.

Listeria monocytogenes је као значајан патоген који се уноси храном препозната тек у последњих тридесетак година. Од како је *Listeria monocytogenes* установљена као бактерија која може да изазове обољење путем хране (Schlech и сар., 1983), све више се повећава интерес и потреба за контролом овог микроорганизма у најразноврснијим намирницама.

Након три значајна случаја епидемије листериозе: изазаване купус салатом (Schlech и сар., 1983), пуномасним и дјелимично обраним млијеком (Felming, 1985) и меким мексичким сиром (Linnan, 1988) *Listeria monocytogenes* била је разматрана као узрочником болести људи, при чему је храна идентификована као један од битних преносиоца заразе међу људима (Schuchat, 1992).

Избијање епидемије у Калифорнији током 1985. године, када су обољеле 142 особе, од којих је 48 завршило смртним исходом, било је последње упозорење да би се *Listeria monocytogenes* прихавтила као значајан алиментарни патоген (ICMSF, 1986).

Поврће, месни, млијечни производи и морска храна могу да буду контаминирани са *Listeria monocytogenes* и као такви се сматрају једним од главних извора за појаву листериозе људи (Rorvik и сар., 2000, Jensen A. и сар., 1994). *Listeria monocytogenes* се у храни размножава при широком распону рН, температуре и релативној ниској активности воде. Може да се размножава у храни чуваној у фрижидерима, при температури од 4°C. При температури од 4°C генерацијско вријеме *Listeria monocytogenes* износи 12-36 часова. Када се храна чува дуже вријеме, при температури фрижидера, број *Listeria monocytogenes* се може увећати и до 10⁶ cfu/g. Халотолерантна је и преживљава стотину дана у концентрацијама соли од 30,5%, при температури од 4°C. Ова особина јој омогућава да преживи у неким врстама сирева и производима од млијека.

Иако је појава хумане листериозе ниска (2-15 особа на милион становника), летални однос (број леталних исхода/број случајева листериозе) износи више од 20% (Cabanes и сар., 2002). У САД је забиљежено 2500 случајева листериозе сваке године, што би значило да би се могло очекивати и до 500 смртних исхода узрокованих листериозом, с обзиром на високу стопу леталитета код овог обољења (Mead и сар., 1999).

Постоји неколико начина преноса листерија: инфекција са мајке на фетус у утерусу или приликом рођења, са дјетета на дјете, са животиње на човјека, и најважнији начин је трансмисија храном (McLauchin, 1990; Rocourt, 1999). Са скоро 8000 случајева у САД и 2000 смртоносних исхода годишње, менингитиси изазвани бактеријама представљају значајан извор морбидитета и морталитета. Основни узрочници су *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, група Б стрептокок и *Haemophilus influenzae*, али и *Listeria monocytogenes*. У табели 2.2 може се видјети процентуална заступљеност узрочника бактеријског менингитиса, по старосним категоријама.

Табела 2.2. Заступљеност узрочника бактеријског менингитиса (McLauchin, 1990)

Старосна категорија	Микроорганизам	Приближна учесталост (%)
Новорођенчад	Streptokoke групе В	68
	<i>Listeria monocytogenes</i>	22
	<i>S.pnumoniae</i>	10
1-23 мјесеца	<i>S.pnumoniae</i>	45
	<i>N.meningitidis</i>	30
2-18 година	Streptokoke групе В	20
	<i>N.meningitidis</i>	58
	<i>S.pneumoniae</i>	30
19-59 година	<i>H.influenzae</i>	5
	<i>S.pneumoniae</i>	60
	<i>N.meningitidis</i>	20
60 и више година	<i>H.influenzae</i>	10
	<i>S.pnumoniae</i>	70
	<i>Listeria monocytogenes</i>	20
	<i>H.influenzae</i>	5

Озбиљне инфекције листеријама манифестују се септикемијом и менингитисом, а могу да се заврше и летално. Изузетно ризичне категорије за листериозу су новорођенчад, старе особе и особе са ослабљеним имунитетом и труднице. Инфекције здравих особа су ријетке. Морталитет код озбиљних, нелијечених листериоза је велик и може да износи и до 25%. Ralovich (1987) истиче да је за хуману листериозу карактеристичан и неравномјеран распоред броја обољелих по старосним категоријама. Просјечан број, израчунат за различите земље, обољелих особа до 31 дана живота износи 40,3% а од 70-79 година 20,7 %. По томе листериоза се најчешће јавља код новорођенчади и старијих људи. Установљено је да 6% људи носи у интерстиналном тракту *Listeria monocytogenes*, без појаве обољења.

Забилежен је већи број избијања листериозе током протеклих двадесетак година на подручју Европе и Сјеверне Америке. У бројним епидемијама је сир био чест извор *Listeria monocytogenes*. У табели 2.3. приказани су потврђени случајеви листериозе људи у Европској унији током 2014 године.

Табела 2.3. Извјештај о забиљеженим случајевима листериозе људи и инциденца на 100 000 особа у ЕУ 2014 године (EFSA Journal 2014)

Држава	Национална покривеност	Поријекло података	Укупан број случајева	Потврђени случајеви и инциденца
Аустрија	Да	В	49	49 0,58
Белгија	Да	В	84	84 0,75
Бугарска	Да	А	10	10 0,14
Хрватска	Да	А	4	4 0,09
Кипар	Да	В	0	0 0,00
Чешка	Да	В	38	38 0,36
Данска	Да	В	92	92 1,64
Естонија	Да	В	1	1 0,08
Финска	Да	В	65	65 1,19
Француска	Да	В	374	374 0,57
Њемачка	Да	В	609	609 0,74
Грчка	Да	В	10	10 0,09
Мађарска	Да	В	39	39 0,40
Ирска	Да	В	15	15 0,33
Италија	-	-	52	52 -
Латвија	Да	В	3	3 0,15
Литванија	Да	В	7	7 0,24
Луксембург	Да	В	5	5 0,91
Малта	Да	В	1	1 0,24
Холандија	Да	В	90	90 0,54
Пољска	Да	В	86	86 0,23
Португал ^(а)	-	-	-	- -
Румунија	Да	В	5	5 0,03
Словачка	Да	В	29	29 0,54
Словенија	Да	В	18	18 0,87
Шпанија	Не	В	161	161 1,15
Шведска	Да	В	125	125 1,30
Велика Британија	Да	В	201	201 0,31

Легенда: А- скупљани подаци, В- подаци из базе података, - нема извјештаја; а- нема система надзора,

Најчешћа клиничка манифестација листериозе људи је менингитис, праћен понекад септикемијом. Карактеристика листериозе је да дужина инкубационог периода, која од конзумације наминирце контаминиране са *Listeria monocytogenes* до испољавања клиничких симптома, знатно може да варира. Инкубација може да траје краће од 24 часа, а може да износи и неколико дана (2-4 дана), па чак и неколико недеља.

Листериоза у трудноћи се појављује, најчешће у трећем триместру, него током првих 6 мјесеци (Smith, 1999).

Инфекција мајке може протећи асимптоматски или са благим симптомима сличним грипу, укључујући грозницу, миалгију и главобољу. Инфекција централног нервног система је врло ријетка код трудних жена. Међутим, посљедице могу да буду врло

озбиљне по дијете, укључујући спонтани абортус, феталну смрт, пријевремено рођење, различите видове неонаталних септикемија и менингитисе (Frederiksen и Samuelsseon, 1992).

Листериије које се унесу у организам преко хране, улазе у ентероците или М ћелије смјештене близу Пајерових плоча и тада започиње њихова диоба у фагоцитним ћелијама које су смјештене у слоју испод ентероцита. Бактерије се тада транспортују у макрофазима из цријева у крв и лимфу до јетре и слезене гдје их већина страда под дејством неутрофила смјештених уз Купферове ћелије јетре. Уколико је домаћинев Т ћелијски имуни одговор неадекватан, листерије се могу размножавати у хепатоцитима и макрофазима и потом ношене крвљу, могу да дођу до разних органа, посебно до мозга и/или материце, гдје пролазе кроз крвно-мождану баријеру и/или плаценталну баријеру. Током сваке од ових фаза инвазије и ширења *L.monocytogenes* по организму, ствара се велики број различитих вирулентних фактора:

- Интерналини (*In-A, In-B*)-површински протеин листерија, који омогућава пенетрацију *L. monocytogenes* у нефагоцитне ћелије (епителијалне ћелије, хепатроцити);
- Површински протеин *p104*, чија је улога у адхезији бактерије за интестиналне ћелије;
- *Листерииолизин О* - бактеријски токсин, неопходан за лизирање вакуоларне мембране фагоцита, чиме се обезбјеђује листеријама бекство у цитоплазму ћелије домаћина.

Гени који кодирају већину ових фактора налазе се заједно на хромозому и регулисани су помоћу *prfA* гена (Cossart и Lecuit, 1998; Kuhn и Goebel, 1999).

Инфекција централног нервног система представља једну од најозбиљнијих манифестација листериозе. *L.monocytogenes* може да узрокује менингитис, често удружен са одузетошћу или ромбоенцефалитис (Southwick и Purich., 1996). Да би дошло до инфекције централног нервног система, листерије морају да прођу крвно-мождану баријеру, која је битна за одржавање биохемијске хомеостазе у мозгу и кичменој мождини.

Бактерије имају способност кретања дуж аксона нервних ћелија у оба правца, тако да је могућа њихова дисеминација са периферије до централног нервног система дуж сензорних нерава. Макрофаги у којима се налазе листерије циркулишу тијелом. У плаценти, листерије из макрофага могу да инфицирају ендотелијалне ћелије, а потом

и фетус, доводећи до прераног рађања и смрти. Новорођенче се може инфицирати и током пасаже кроз порођајни канал, уз развој сепсе и менингитиса након неколико дана. Иако амнионска течност која окружује фетус дјелује бактерицидно на већину бактерија, на *L.monocytogenes* нема такав ефекат (Dons и сар., 2001).

2.1.3. Налаз *Listeria monocytogenes* у намирницама анималног поријекла

Способност листерија да расте при температури хлађења, чињеница да је распрострањена у природи и да преживљава дуго времена у неповољним условима, допринјели су сазнању да је ова бактерија све значајнији патоген који се преноси храном на људе.

Listeria monocytogenes се појављује као контаминант многих намирница, како анималног, тако и биљног поријекла. Присуство листерија у храни може да буде различитог поријекла: контакт са контаминираним намирницама или површинама, постпроцесна контаминација у производној околини или контаминација услед манипулације храном, или током складиштења намирница.

Извори контаминације млијека су разноврсни. Краве излучују листерије млијеком након побачаја или за вријеме инфекције вимена која је праћена маститисом. Контаминација млијеком могућа је и из фекалног извора. У погоне за прераду млијека листерије се могу унијети сировим материјалом, преко одјеће и обуће радника. Извори листерија за контаминацију меса у клаоници могу бити и лимфни чворови. *Listeria monocytogenes* је релативно отпорна на процесе зрења меса. Изолована је из многих месних прерађевина: из кобасица, сувог меса, димљених производа, салама нарезака, вакуум пакованих производа и др. Maurohofer и сар., (2004) су испитивали присуство *L. monocytogenes* у различитим врстама меса и установили следеће: од 90 узорака свињског меса, 20 је било позитивно (22%). У говеђем месу је било 12% позитивних, у мљевеном месу су изолована 3 соја (23%), док је код испитаних 89 узорака пилећег меса позитивно на присуство листерија било 23 (26%), а код ћурећег меса од 21 узорака, 3 су била контаминирана овим патогеном (14%). Исти аутори су испитивали и резистенцију изолованих *L. monocytogenes* на антибиотике и установили осјетљивост на следеће: тетрацилин, пеницилин, гентамицин, ванкомицин, котримо-ксазол, еритромицин, хлорамфеникол и стрептомицин.

Мена и сар., (2004) су испитали 1035 узорака разноврсних животних намирница, чиме је потврђена убиквираност *L. monocytogenes*. Из њиховог рада може се закључити да су производи најизложенији контаминацији листеријама: свјежа пилетина, (60%), свјеже месо (17,7%), сирово млијеко (16,7%), свјежа риба (12%), брашно (18,5%) и замрзнуто поврће (12,9%). Наведено присуство *L. monocytogenes* у овим узорцима не може да се сматра коначним, пошто ове намирнице подлијежу даљој обради, која најчешће обухвата термичко третирање, чиме је омогућена елиминација овог патогеног микроорганизма (Norrung, 2000).

И деликатесни производи могу да буду контаминирани са *L. monocytogenes*. Тако је овај микроорганизам изолован из шунке (25%), шпанске специјалне кобасице (3,7%), крвавице (11,1%) и пршута (2,3%) (Norrung, 2000).

Listeria monocytogenes може да се изолује из свјежег и пастеризованог млијека, крема, путера и сладоледа. Ова бактерија је способна да преживи зрење многих различитих сирева и може се наћи и у средње киселим млијечним производима и котаж сиревима. У објектима за производњу сирева са црвеном мажом, значајан извор контаминације може да буде вода за мажу и машине за мазање у одјељењу за зрење (Eilertz и сар., 1993). Способна је да преживи у куваним јајима, али и у замрзнутим јајима. Биљке могу да буду контаминирани са *Listeria monocytogenes*. Различите салате од купуса, парадајза, ротквица представљају најчешћи извор заразе људи. (Мена и сар., 2004)

Листериија се најбоље опстаје и расте у следећим намирницама:

- које нису адекватно термички обрађене,
- које су дуго времена провеле у складишту;
- које су произведене на мјесту на којем принципи хигијенског руковања храном нису споровођени и
- у кувано –хладним оброцима, спремним за јело.

Извршена је подјела животних намирница на групе високог ризика и ризичне намирнице које би требало избјегавати, како би се заштититли од могуће инфекције. У групу ризичних намирница које се припремају комерцијално спадају:

- паштета,
- кувана нарезана пилетина,
- месни производи,

- меки сиреви,
- готова или пакована салата,
- хладно димљена или свјежа риба и
- точени сладолед

2.1.4. Налаз *Listeria monocytogenes* у риби, производима од рибе и плодовима мора

Listeria monocytogenes је изолована из воде ријека и ријечног седимента канала и језера, морске воде и обала (Colburn и сар., 1990). Последично томе, овај микроорганизам може да се очекује и у воденим организмима (Karunasagar, 2000). Подаци прикупљени током последњих десет година, указали су на постојање група намирница пореклом од водених организама, које се сматрају различито ризичним за појаву листериозе (Rosourt и сар., 2000). У високо ризичне намирнице у оквиру врста риба, производи од рибе и плодова мора спадају следеће:

- мекушци (шкољке, ракови, остриге),
- свјежа риба (која се конзумира прије термичке обраде),
- рибљи производи у „лаком паковању“ - у воденом раствору NaCl (сољена маринада, ферментисана хладно димљена риба у сопственом соку) и
- средње термички обрађена риба и рибљи производи.

У намирницама рибљег поријекла ниског ризика налазе се:

- полуконзервисане рибе,
- сољене или мариниране рибе, кавијар и ферментоване рибе,
- термички обрађене рибе (стерилизоване, упаковане у запечаћене амбалажне јединице),
- сушене рибе, сушено-сољене и сушено-димљене рибе и
- свјеже/замрзнуте рибе и ракови.

Прегледом производа од рибе на присуство *L. monocytogenes*, установљено је да широм свијета присутност ове бактерије износи 4-12%, зависно од температуре средине Embark (1994). Појава *L. monocytogenes* у тропским рибама и плодовима мора

је ниска и износи од 0-2% (Davis и сар., 2001). Поред *L. monocytogenes* изоловане су и друге врсте листерија, а већином је откривена *L. ivanovii*.

Табела 2.4. Главне документоване листериозе узроковане конзумацијом рибе, производа од рибе и плодова мора (Davis и сар., 2001)

Држава	Година	Број случајева	Клиничка форма	Број фаталних исхода	Врста хране	Серотип
САД	1989	2	-	-	Шкампи	4б
Италија	1989	1	1	-	Риба	4б
Аустралија	1991	2	2	-	Димљене шкољке	-
Нови Зеланд	1992	4	-	-	Димљене шкољке	1/2б
Канада	1996	2	2	-	Имитација меса крабе	1/2б
Шведска	1994/95	6-9	6	2	Пастрмка у сопственом соку	4б
Финска	-	5	5	-	Хладно димљена пастрмка	1/2а

Laciar i Centorbi (2002) су испитали 100 узорака хране од производа мора уз аргетинске обале Атлантика на присуство *Listeria spp.* Позитивни изолати су установљени биохемијским тестовима, серотипизацијом, фаготипизацијом и прегледом ДНК помоћу електрофорезе коришћењем макрорестриктијских ензима. *Listeria spp.* је установљена код 12% узорака, при чему је код 3 изолата (из различитих врста мекушаца) била присутна *L. monocytogenes*, а код осталих 9 (из рибе, лигњи и шкољки) *L. innocua*. Све три изоловане *L. monocytogenes* припадале су серотипу 4б, а код *L. innocua* 8 изолата је припадало серотипу ба, а један серотипу бб. Код узорака свјеже сирове рибе *L. innocua* пронађена је у 30,8%, док је *L. monocytogenes* у 1,3% узорака. Остале врсте листерије нису изоловане.

Испитивањем присуства *L. monocytogenes* током различитих фаза процеса производње хладно димљене рибе, ова бактерија је утврђена у 6,06 % узорака брисева са радних површина и руку радника, као и у 13,33% узорака меса рибе Димитријевић и сар. (2011).

2.2. Етарска уља

2.2.1. Хемијски састав и антимикробне особине

Последњих година све већи број истраживања усмјерен је на испитивање могућности примјене етарских уља, изолованих из љековитих и зачинских биљака, у прехранбеној индустрији у циљу продужења рока трајања животних намирница, односно успоравања или спрјечавања развоја патогених бактерија и побољшања квалитета прехранбених производа (Bakkali i sar., 2008; Tajkarimi i sar., 2010;). Етарска уља, која се сматрају носиоцима антибактеријске активности, спадају у секундарне продукте метаболичких процеса који се одвијају у биљкама и представљају сложене смјеше угљоводоника, алкохола, естара, терпена и њихових деривата, алдехида и кетона и других органских једињења (Fisher i Phillips, 2006). Етарска уља су смјеше ароматичних и лако испарљивих једињења. Мале су молекулске масе и растварају се у липидима и органским растварачима. Могу да се синтетишу у различитим органима биљке, а скупљају се у шупљинама, каналима и ћелијама епидерма биљке, одакле се и екстрахују (Burt, 2004).

Метода дестилације као процес добијања етарских уља први пут је кориштена у Египту, Индији, Персији прије 2000 година, док је први аутентични процес дестилације етарских уља описао Vilanova (Guenther, 1948). Током 13-ог вијека етарска уља су се припремала фармаколошким поступцима описаним у фармакопејама (Bauer и сар., 2001), али тек у 16. вијеку почела је њихова широка употреба. (Crosthwaite, 1998). Кориштење чаја од дрвета у медицинске сврхе код домородаца описали су аустралијски колонисти у 18-ом вијеку (Carson and Riley, 1995). Прва експериментална мјерења бактеријских својстава пара етарских уља урадио је De la Croix 1881 (Boyle, 1955).

Антибактеријска својства етарских уља и њихових компоненти употребљена су и у стоматологији, (Manabe и сар.,1987), гдје се користе као антисептици (Bauer and Garbe, 1985), али и као додатак храни за крмаче дојиле и прасади (Hsley и сар., 2002). Главне компоненте етарских уља које имају антибактеријски ефекат приказане су у табели 2.5.

Табела 2.5. Главне компоненте одабраних етарска уља (Burt, 2004)

Назив етеричног уља	Латински назив биљке	Главна компонента	Заступљеност главне компоненте
Коријандер	Coriandrum sativum L.	linalool	26%
		E-2 decanal	20%
Цимет	Cinnamomum zeylanicum Nees	Trans-cinnamaldehyde	65%
Оригано	Origanum vulgare L.	carvacrol	80%
		thymol	64%
		γ -terpinene	2-52%
		p-cymene	52%
Рузмарин	Rosmarinus officinalis L.	α pinene	2-25%
		1,8 cineole	3-89%
Жалфија	Salvia officinalis L.	camphor	6-15%
		α pinene	4-5%
		β pinene	2-10%
		1,8 cineole	6-14%
		α tujone	20-42%
Каранфилић	Syzygium aromaticum (L.) Merrill & Perry	eugenol	75-85%
		eugenyl acetate	8-15%
Тимијан	Thymus vulgaris	thymol	10-64%
		carvacrol	2-11%
		γ -terpinene	2-31%
		p-cymene	10-56%

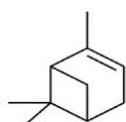
Етарска уља садрже различит број компоненти. Главне компоненте заступљене су у већим процентима и њима се приписује антибактеријско дјеловање уља (Burt, 2004; Vakalli, 2008). Активне компоненте етарских уља на основу хемијске структуре дијеле се на: терпене, терпеноиде, фенилпропане и друге компоненте.

Терпене чине монотерпени и сесквитерпени, а у мањим концентрацијама налазе се хемитерпени, дитерпени, тритерпени и др. Монотерпени примјењени засебно показују слабу или никакву антибактеријску активност.

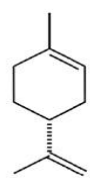
Терпени који су подлегли ензимским модификацијама и садрже кисеоник, а положај метил групе им је промијењен или је нема, називају се терпеноиди. За разлику од терпена, терпеноиди посједују веома јака антимикуробна својства и дијеле се на алкоhole, естре, алдехиде, кетоне, етре, феноле и епоксиде. Антимикуробна активност терпеноида приписује се функционалној групи, хидроксил-групи или фенолним компонентама (Huygard, 2012). Фенилпропани су органска једињења мање заступљена у етарским уљима. У фенилпропане спадају еугенол, изоеугенол, ванилин и др.

Terpenes

Monoterpenes



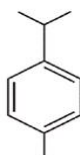
α -Pinene



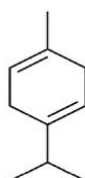
Limonene



Sabinene

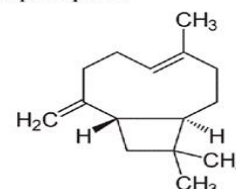


p-Cymene



γ -Terpinene

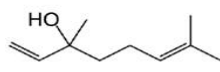
Sesquiterpenes



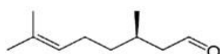
β -Caryophyllene

Terpenoids

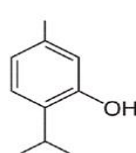
Monoterpenoids



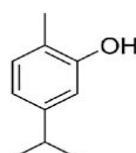
Linalool



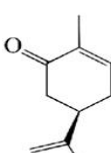
Citronellal



Thymol



Carvacrol

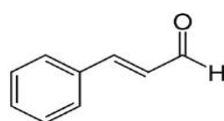


Carvone

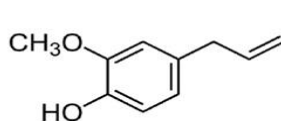


Borneol

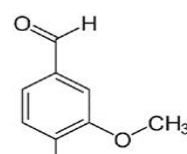
Phenylpropanoids



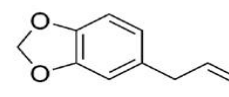
Cinnamaldehyde



Eugenol

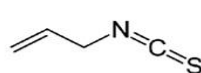


Vanillin

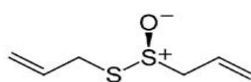


Safrole

Others



Allyl-isothiocyanate



Allicin

Слика 2.2. Структурне формуле одабраних компоненти етарских уља (Lambert и сар., 2001).

Опште је прихваћено да фенолни спојеви који су хидроксилном групом везани за фенолни прстен имају, међу метаболитима, највећу антимикуробну способност (Lambert и сар., 2001). Такви примјери су монотерпени карвакрол и тимол, као и фенилпропан еугенол (Venchaar и сар., 2009).

Нефенолни секундарни метаболити који се могу наћи у етарским уљима имају промјенљив антимикуробни потенцијал. Dorman и сар. (2000) у својим истраживањима указују да је антимикуробни потенцијал монотерпена *p*-сумена и *y*-*terpinena* ограничен, упоређујући их са фенолним монотерпенима, док су други истраживачи (Hellander и сар., 1998) утврдили да цималдехиди и нефенолни фенилпропани показују врло јаку антимикуробну активност.

Поједине ароматичне биљке и њихови естракти стимулишу раст пожељних бактерија и на тај начин дјелују као пребиотици (Greathead., 2003). Пребиотици су познати по томе што повећавају интерстицијалну популацију *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и на тај начин побољшавају здравствено стање јединке. Ароматичне биљке и њихова етарска уља добар су избор природних антиоксиданата са фенолном компонентом као што су еугенол, тимол и карвакрол. Полифеноли се обично јављају као гликозиди мада се њихова антимикуробна активност приписује агликонским структурама, посебно катехолу (Sakakibara и сар., 2003), те с тога могу имати улогу у заштити високо незасићених масних киселина у храни, гдје дјелимично могу замјенити друге конзервансе.

Оксидација липида у прехранбеним производима сматра се једним од главних узрока у ограничавању квалитета и прихватљивости производа. Етарска уља могу имати утицај на метаболизам липида у ткиву животиња показујући корисне ефекте на активност антиоксидативних ензима и састав вишеструко незасићених масних киселина (Husain и сар., 2008). Флавоноиди су важни додаци исхрани, иако се не сматрају хранљивим материјама. Флавоноиди могу дјеловати као прооксиданси, посебно они спојеви који имају више хидроксилних група (Miguel, 2010). Након што прођу ћелијску мембрану флавоноиди могу да се промијене у прооксидансе који су у могућности да оксидишу масти, бјеланчевине и ДНК (Cowan, 1999). Овај механизам доводи касније до појаве апоптозе и некрозе оштећених ћелија и на тај начин се спрјечава потенцијално стварање мутираних ћелија. *Rosemarinus officinalis* L. производи безбојно или блиједо жуто уље.

Користи се у индустрији парфема и као поспјешивач укуса. Неколико једињења која се налазе у овом уљу су инхибитори микроорганизама. Међутим, познато је да исте врсте биљака, али са различитих локалитета, могу да се разликују у особинама својих етарских уља. Иако је етарско уље *R.officinalis* L. из региона медитерана добро проучавано, његов састав, као и његова антимикробна својства, могу се разликовати од оних варијанти које расту у Јужној Африци (Deans и Svoboda, 1990). Scortichini и Rossi (1991) пишу о утицају уља рузмарина на *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Активна компонента етарског уља рузмарина, α -pinene, такође успорава раст *Erwinia amylovora*. Исте резултате испитивања добили су Oussalah и сар.,(2007) и Celiktas (2007). Вјероватно због посједовања липополисахаридне овојнице ћелија, грам негативне бактерије много су отпорније на дјеловање етарских уља од грам позитивних бактерија (Outtara и сар., 1997).

Важна карактеристика етарских уља је њихова хидрофобност која им омогућава да подјеле липиде у мембранама ћелије и митохондрија и на тај начин поремете њихову структуру. Хемијска структура појединих компоненти уља утиче на њихову антимикробну активност (Sikkema и сар., 1994). Поједине компоненте етарских уља могу да дјелују на протеине ћелијске мембране. Два су могућа механизма дјеловања на протеине мембране. Липофилне молекуле угљених хидрата могу да се акумулирају у двоструки липидни слој мембране нарушавајући везу између липида и протеина. Други начин дјеловања на протеине је преко ензима као што је АТП-аза. Поједина етарска уља могу да стимулишу раст псеудомицелија квасаца. Ово је и доказ да етарска уља утичу и на синтезу структурних ћелијских компоненти. (Conner и сар., 1984).

2.2.2 Карвакрол

Карвакрол је највише заступљен у етарском уљу оригана и тимијана. Структурно је врло сличан тимолу. Антимикробно дјеловање карвакрола заснива се на промјени пропустљивости ћелијске мембране. (Lambert, и сар., 2001).

Карвакрол је у могућности да својим дјеловањем разори ћелијску мембрану грам негативних бактерија отпуштајући липополисахариде и повећањем пропустљивости цитоплазматске мембране. Присутност магнезијум хлорида у мембрани нема утицаја на ове активности осим у стварању хелата са катионима мембране (Helander, и сар., 1998).

Студија са *Bacillus cereus* показала је да карвакрол раствара мембрану ћелије у њеном фосфолипидном дијелу између ланаца масних киселина. (Ultee и сар., 2000). Ова грешка у физичкој структури доводи до поремећаја пропустљивости мембране (Ultee и сар., 2000; Solorzano и сар., 2012). Мјерењем просјечних температура појединих фаза транзиције, утврђено је да се приликом додавања карвакрола у липидним дијеловима мембране повећава садржај воде. Мјерења унутарћелијског и ванћелијског АТР-а, показала су да је ниво АТР-а у ћелији нижи, а да није дошло до повећања нивоа ванћелијског АТР-а. Предпоставља се да је синтеза АТР-а смањена или је брзина хидролизе АТР-а повећана. Мјерењем мембранског потенцијала у експоненцијалном расту ћелије, у присуству карвакрола долази до наглог пада потенцијала, што указује на слабљење протонске пумпе. Ниво унутар-ћелијског калијума опада, док пропорционално расте ниво ван-ћелијског калијума, што доводи до закључка да карвакрол раствара мембрану у њеном фосфолипидном дијелу формирајући канале за пролазак јона (Ultee и сар., 2000).

Осим инхибиције раста вегетативних облика бактерија, карвакрол је за микробиологију хране интересантан јер инхибише синтезу токсина *B. cereus-a*, одговорног за дијареју. Двије су теорије које објашњавају ову инхибицију. По једној, сматра се да је излучивање токсина активан процес, који ће бити ослабљен ако нема довољно АТР-а. Друга теорија указује да спорији раст бактеријску ћелију наводи на кориштење све доступне енергије, тако да врло мало енергије остаје за синтезу токсина (Ultee и сар., 2000).

2.2.3 Еуенол

Еуенол је главна компонента уља каранфилића. То је органски фенол са антипиретичким, аналгетичким, антиинфламаторним и анестетичким ефектом. Студије показују да еуенол такође има и антибактеријско и антиканцерогено дејство, као и особине репелента. Бројне студије су рађене на тему антимикуробног дјеловања еуенола. Katayama и сар.,(1960) у свом истраживању утврдили су да је бензенев прстен са хидроксилном групом антибактеријски ефикасан чак и када се разриједи 2000 пута.

У *in vitro* огледима еуенол је показао антибактеријско дјеловање према 12 испитиваних бактерија (Lu, и сар., 2008). Хидрофобност еуенола важна је за његово антибактеријско дјеловање. Хидрофобна компонента еуенола раздваја липидне компоненте мембране цитоплазме и митохондрија. Мијењање структуре мембрана доводи до промјене њихове пропустљивости, што за последицу има колапс протонске пумпе и смрт ћелије.

Сублеталне концентрације еуенола код *B. cereus*-а инхибишу синтезу амилазе и протеазе. Thoroski и сар. (1989) у свом раду утврдили су да еуенол доприноси великом степену разградње ћелијске мембране што доводи до смрти ћелије. Сматра се да хидроксилна група еуенола веже протеине и на тај начин спрјечава ензимске реакције (Wendacouoon и Sakaguci, 1995).

Такође, исти аутори утврдили су да су антимикуробне особине еуенола у вези са поремећајима у ћелијској мембрани узроковани инактивацијом ензима и генетичког материјала (Wendacouoon и Sakaguci, 1993).

2.2.4 Дјеловање етарских уља на одрживост рибе и производа од рибе

Због антимикуробног дјеловања етарска уља се све више употребљавају у индустрији хране (Табела 2.6). Кориштењем етарских уља, који представљају природне биопротективе, у индустрији хране се спрјечава њено квариње и продужава јој се рок употребе (Sharafi и сар., 2010).

Да би продужили рок употребе плавој риби Erkan и сар. (2011) предлажу кориштење уља тимијана и ловора у концентрацији од 1%. Квалитет топло димљене калифорнијске пастрмке, паковане у вакуум паковању, побољшава се ако се третира са 1% уљем тимијана и бијелог лука (Erkan, 2012). Такође, установљено је да

комбинација уља тимијана у концентрацији 0,1% са паковањем у модификованој атмосфери продужава рок употребе свјежих филеа медитеранске сабљарке (Kykkidou и сар., 2009). Додатак уља тимијана у концентрацији 0,1%, рок употребе са 8 продужава на 13 дана, док је комбинација етарског уља тимијана и паковања у модификованој атмосфери продужило рок употребе на 20 дана. Goulas и Kontominas (2007) уљем оригана (0,8%) продужили су рок употребе филеа ораде преко 17 дана. Сличне резултате добили су Purgotou и сар. (2010) са калифорнијском пастрмком, с тим што су утврдили смањен број микроорганизама који узрокују квар. Corbo и сар. (2008) истичу могућност повећавања граница микробиолошке прихватљивости за свјеже рибље плескавице користећи мјешавину уља тимијана, грејпа и лимуна. Мјешавина ова три природна састојка одржава сензорне карактеристике производа, без утицаја на окус рибе. Премазивањем филеа пастрмке цитосаном и уљем цимета продужен је рок употребе са 10 на 16 дана уз дјелимичне измјене текстуре, мириса и боје (Ojagh и сар., 2010). Сличне резултате у свом истраживању добили су Andevari и Rezaei (2011). Свјежи филе пастрмке премазивали су желатином обогаћеним уљем цимета у концентрацијама од 1%, 1,5% и 2%.

Табела 2.6. Дјеловање етарских уља на одрживост рибе и производа од рибе
(Lucera и сар., 2012)

Производи и услови складиштења	Додана компонента	Резултат испитивања
Филе калифорнијске пастрмке, у вакуум паковању	Етарско уље оригана у концентрацијама 0,2% и 0,4%	Комбинација уља оригана концентрације 0,2 % и вакуум паковања продужило је рок употребе производа са 5 на 12 дана.
Филе калифорнијске пастрмке у паковању са апсорберима кисеоника	Етарско уље оригана у концентрацији 0,4%	Додана антимикуробна материја продужила је рок употребе
Рибља пљескавица у вакуум паковању	Уље рузмарина у концентрацијама од 0,4% и 0,8%	Уље рузмарина ефикасно је у комбинацији са вакуум паковањем и ефикасно је у контроли микробиолошког раста и биохемијских промјена
Пржени филе од главаш рибе	Премазан мјешавином тимијана и мајорана концентрације 2,5% и 5%.	Изражено јако дејство против <i>Enterobacteriaceae</i>
Филе бранчина пакован у модификованој атмосфери	Етарско уље тимијана у концентрацији 0,2%	Етарско уље у комбинацији са 60% CO ₂ ; 30% N ₂ ; 10% O ₂ , продужило је рок употребе филеа са 6 на 17 дана.
Остриге паковане у модификованој атмосфери	Премазане тимолом у концентрацијама 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm	Продужен рок употребе са 5 на 14 дана користећи концентрацију од 1000 ppm.

Утицај етарских уља на инхибицију раста *L. monocytogenes* истраживао је Apostolidis (2008). Утврдио је да комбинација оригана и бруснице у односу 50:50 у концентрацији од 750 ppm, у 2% раствору кухињске соли показује инхибиторни ефекат на тестиране сојеве. Резултати овог испитивања показали су да концентрација пролина има утицај на раст бактерија, указујући на могући механизам дејства инхибитора, укључујући пролински метаболизам. Представљени резултати потврђују потенцијал етарских уља у комбинацији са кухињском соли у конзервисању хране.

О цитотоксичном дејству уља рузмарина писао је Vozin (2007). Тестирао је утицај уља рузмарина на 13 бактеријских сојева и 6 гљивица укључујући *Candida albicans* и 5 дерматофита. Високо антимикуробно дјеловање показало је на *E. coli*, *Salmonelae typhi*, *S. enteritidis* и *Shigella sonei*.

Gutierrez (2008) је својим истраживањима доказао да је антимикуробно дејство етарских уља много јаче код намирница са високим садржајем протеина и рН, него код намирница богатих мастима и угљеним хидратима.

Бактерије нису заштићене од утицаја етарских уља дјеловањем угљених хидрата, протеина или масти у намирницама. Антилистеријско дјеловање уља оригана и тимијана, у екстракту говеђег меса и соса од парадајза, побољшава се када је садржај шећера до 2,3%. Међутим, виша концентрација шећера не утиче на дјеловање етарских уља (Gutiérrez, 2008). Супротно овоме, повећање концентрације скроба поријеклом из кромпира од 1-10% незнатно је смањила утицај дјеловања етарских уља. На нивоу концентрације од 10% антилистеријско дјеловање било је на нивоу као да етарска уља нису додавана.

Температура складиштења је други фактор који утиче на ефикасност етарских уља на *L. monocytogenes*, с обзиром да се температура раста и развоја овог патогена креће у опсегу 2-45°C. Уље клинчића ефикасније је у контроли раста *L. monocytogenes* у пилећим хреновкама при температури од 5°C него при температури од 15°C (Myle и сар., 2006).

Физичка структура хране битна је за дјеловање етарских уља. Бактерије могу ући у површинске поре намирница и тако смањити могућност директног контакта са антимикубним средством (Нао и сар., 1998).

Етарска уља цимета, каранфилића, оригана, паприке, и тимијана показују антимикубна својства у триптон соја бујону. У мљевеном месу свиња у које је додано уље тимијана популација *L. monocytogenes* умањена је скоро стотину пута у првој седмици складиштења (Aureli и сар., 1992).

Установљено је да уље каранфилића у концентрацији од 1% умањује број *L. monocytogenes*, са 10^6 до $< 1 \log \text{CFU}$ у свјежем и пуномасном сиру (Smith Palmer и сар., 2001). Антимикубну активност уља каранфилића у сиру и месу у концентрацијама од 0,5% и 1% потврдили су Menon и Garg (2001).

2.2.5 Органолептичка прихватљивост производа третираних етарским уљима

С обзиром да се етарска уља користе као антимикубне материје у производњи хране, од велике је важности сензорна прихватљивост тих производа. Примјена етарских уља може бити ограничена због сензорне неприхватљивости третираних производа. Такав случај је са употребом оригана приликом припреме рибе и производа од рибе. Tsigarida и сар. (2000), у свом експерименту утврдили су да је говеђе месо третирано са 0,8% концентрацијом уља оригана, било прихватљиво након складиштења при 5°C и накнадног кувања. Додавање уља тимијана у концентрацији од 0,9% није имало

утицаја на укус и изглед куваних рачића. Међутим, у концентрацији од 1,8% значајно смањује њихову сензорну прихватљивост (Ouatara и сар., 2001). Пилеће кобасице третиране уљем каранфилића у концентрацији од 2% сензорно нису биле прихватљиве, међутим кобасице третиране у концентрацији од 1% за потрошача су биле сензорно прихватљиве (Mytle и сар., 2006). Kim и сар. (1995), биљеже у свом раду да риба третирана карвакролом производи топло-опор мирис. Сензорне карактеристике димљене рибе третиране етарским уљима рузмарина, истраживао је Coban (2012). Утврдио је да су рибе третиране етарским уљима сензорно прихватљиве до 84. дана складиштења, док рибе које нису биле третиране, 56. дана складиштења нису биле сензорно прихватљиве.

2.3. Паковање свјеже рибе

На свјетском тржишту постоји све већа потражња за свјежим, природно очуваним и квалитетним прехранбеним производима који су током производње што је могуће мање физички и хемијски третирани. Овакав тренд пред произвођаче намеће задатак да поред усавршавања метода прераде, које продужавају рок трајања производа, такође искључују вјештачке адитиве и конзервансе.

Да би се омогућила производња такве, природне хране, која би при томе имала дуг рок употребе и очуван квалитет, морају се примењивати неки од основних принципи паковања хране: избјегавање накнадне контаминације, одлагање квара, фаворизовање појединих ензимских реакција које поспјешују мекоћу производа, смањење губитка на маси и осигурање задржавања органолептичких својстава намирнице (Dainelli и сар., 2008). Да би се у производу сачувале оригиналне сензорне и нутритивне особине сировине, морају се примјенити знатно блажи третмани конзервисања при њеној производњи.

У новије вријеме све више се примјењује и техника „конзервисања препрекама“, што значи да се примјењује серија процесних препрека које неповољно делују на евентуално присутне микоорганизме (температура, активност воде, редокс потенцијал и др.). Што је више процесних препрека микроорганизми ће их теже савладати. Комбинацијом ових препрека, процес у серији се може спроводити у знатно блажим условима него када се користи сам за себе (Lelas, 2006). У овако миимално третираној храни по правилу се не постиже комерцијална стерилност, па се ради продужења њене трајности, посебна пажња мора посветити на одабир

амбалажног материјала и на одабир начина паковања. За прехрамбене производе најчешће примјењивани начини паковања су: паковање у модификованој атмосфери (МАП), паковање у вакууму и асептично паковање (Lelas, 2006).

Паковање хране, па и свјеже рибе, једна је од најкритичнијих операција у ланцу производње. Манипулација храном у току дистрибуције, складиштења и продаје пружа могућност контаминације различитим биолошким опасностима. У научној и стручној литератури поступци паковања рибе су доста описани, при чему су најчешћи паковање рибе у вакууму и у модификованој атмосфери гасова (МАП). Вакуум паковање се већ дуго примјењује. Извлачењем ваздуха из паковања стварају се посебни микроклиматски услови који успоравају раст грам-негативних бактерија. Вакуумирање само по себи нема конзервишући ефекат, али га постиже у комбинацији са другим методама конзервисања. Најчешће се користи комбинација вакуум паковања и складиштења, при температури која не прелази + 4⁰С. Балтић и сар., 2009. и Бабић и сар., 2014. су то и доказали испитивањем одрживости вакуум пакованих филета пастрмке и шарана при различитим температурама складиштења.

Садржај укупно испарљивог азота као и промјену рН вриједности у вакуум пакованој пастрмци и пастрмци пакованој у модификованој атмосфери гасова испитивали су Бабић и сар., 2014. Утврдили су да већ седми дан складиштења постоји статистички значајна разлика у количини укупно испарљивог азота, између вакуум паковане пастрмке и пастрмке паковане у МАП. Такође, промјена рН вриједности у току складиштења (14 дана) статистички се значајно разликовала код вакуум паковане пастрмке, док код паковане у МАП није било статистички значајних разлика. Установљено је и да вакуум паковање успорава раст бактерија квара, као што су *Pseudomonas spp* и *Achromobacter spp*.

Међутим, неколико студија показало је да се елиминацијом ваздуха приликом вакуумирања стварају повољни услови за раст и стварање токсина *C. botulinum* (Lund и сар. 2000). Ефикасност паковања у вакуум, као и у МАП, произилази прије свега из процеса уклањања кисеоника, са посљедичном инхибицијом раста строго аеробних микроорганизама. Ферментативни микроорганизми настављају да се размножавају, али далеко спорије, а за неке врсте намирница и са мањим посљедицама по квалитет хране (Lund и сар. 2000).

Одрживост различитих врста меса и рибе и плодова вода паковних у смјеси гасова у односу на њихово паковање у вакууму или чувању на ваздуху приказани су у табелама 2.7. и 2.8.

Табела 2.7. Утицај паковања на одрживост различитих врста меса и рибе и плодова вода, (Dalgaard 1995)

Врста производа	Температура складиштења (°C)	Одрживост (дани)		
		Ваздух	Вакуум	МАП
Месо Говедина,пилетина, свињетина	1.0-4.4	1-3	1-12	3-21
Посна риба Бакалар, шарун,вук	0.0-4.0	1-2	1-2	1-3
Масна риба Харинга, лосос	0.0-4.0	1-2	1-2	1-3
Плодови вода крабе, шампи,шкољке	0.0.-4.0	½-2	-	½ -3
Рибе топлих вода тилапија,сабљарка,шпиц	2.0-4.0	½-2	-	2-4

Arashisar и сар. (2004) испитивали су одрживост пастрмке паковане у три различите смјеше гасова и вакуум. Најнижа стопа раста аеробних мезофилних психротрофних бактерија и ентеробактерија била је у паковању са атмосфером од 100% CO₂, док је највиша стопа раста аеробних мезофилних психротрофних бактерија и ентеробактерија била је у вакуум пакованим пастрмкама.

Табела 2.8. Ефекат паковања рибе и различитих производа од рибе у смјеси гасова на њихову одрживост (Siverstvik и сар.,2002)

Врста рибе (производи од рибе)	Температура складиштења (°C)	Атмосфера CO ₂ :N ₂ :O ₂	Одрживост (дани)
Филети сома	2	80:20	28
	16	Ваздух	3
	16	75:25:0	4
	16	Вакуум	3
Филети афричког сома	8	Ваздух	6
	8	75:25:0	13
	8	Вакуум	6
	4	Ваздух	13
	4	75:25:0	38-40
	4	Вакуум	20-24
Филети бакалара	16	Ваздух	3-4
	16	75:25:0	6
	16	Вакуум	3-4
	8	Ваздух	13-17
	8	75:25:0	24-27
	8	Вакуум	13
	4	Ваздух	20-24
	4	75:25:0	55-60
	4	Вакуум	24-27
	0	60:40:0	8
Пастрмка -цијела	5	60:40:0	8
	10	60:40:0	3
	0	Вакуум	9
	5	Вакуум	6
	10	Вакуум	3
	2	20:80:0	6
Дужичаста пастрмка	2	20:80:0	9
	2	40:60:0	6
	2	40:60:0	9
	2	Вакуум	6

Stamatis и Arkoudelos (2007) су у свом истраживању утврдили да је укупан број микроорганизама и укупан број лактобацила, као и укупан број ентеробактерија био нижи у узорцима свјеже скуше паковане у смјеси гасова него у вакуум пакованим узорцима. Међутим, Muratore и Licciardello (2005) утврдили су супротно. Њихови резултати показују да је димњена сабљарка пакована у вакуум и складиштена при 4°C имала знатно већу одрживост (42 дана), у односу на ону паковану у комбинацији смјеше гасова (12 дана).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Према подацима Свјетске здравствене организације (World Health Organization-WHO), болести преносиве храном представљају све већи, како здравствени, тако и економски проблем у свијету, на глобалном нивоу. Месо рибе, због свог неоспорног значаја, је намирница која се употребљава у исхрани, а чија безбједност представља један од проблема савременог друштва. Као одговор на све захтјевније потребе потрошача, индустрија хране последњих година улаже све више средстава и напора у унапређење постојећих, као и проналажење нових, савременијих поступака у циљу повећања безбједности хране.

Као патогени микроорганизам, поријеклом из меса рибе, који изазива болести преносиве храном најчешће се помиње *Listeria monocytogenes*. Због тога је стручно и научно оправдано што је као циљ истраживања у оквиру ове дисертације да се утврди утицај активних компоненти етарских уља- карвакрола и еугенола, на раст *Listeria monocytogenes*, затим на микробиолошки статус (укупан број мезофилних бактерија, број бактерија млијечне киселине), на физичко-хемијске промјене одабраних параметара квалитета, као и на сензорне особине калифорнијске пастрмке паковане у вакуум. Истраживања имају за циљ и да укажу на предности употребе карвакрола и еугенола у вакуум пакованој свјежој риби са аспекта безбједности, одрживости и квалитета, као и да се утврди оптимална комбинација ових активних компоненти етарских уља при којој свјежа вакуум пакована пастрмка најдуже задржава непромијењена хемијска, микробиолошка и сензорна својства.

За остварење овог циља постављени су следећи задаци:

- да се у току двадесетодневног складиштења вакуум паковане калифорнијске свјеже пастрмке, контаминирание бактеријом *Listeria monocytogenes*, у коју су апликовани карвакрол и еугенол у одређеној концентрацији, складиштене при температури од 4 ± 1 °C, прате промјене (нултог, трећег, шестог, десетог, петнаестог и двадесетог дана):
 - броја бактерија *Listeria monocytogenes*,
 - укупног броја аеробних мезофилних бактерија,
 - броја бактерија млијечне киселине,

- да се испита садржај воде, масти, протеина и пепела у месу калифорнијске пастрмке нултог дана складиштења;
- да се прати вриједност укупног испарљивог азота (TVB-N), рН вриједности, садржај соли (NaCl) у току двадесет дана складиштења при температури од +4° С (нултог, трећег, шестог, десетог, петнаестог и двадесетог дана) узорака вакуум паковане калифорнијске свјеже пастрмке;
- да се прате промјене сензорне особине (мириса, изгледа, текстуре и укупне прихватљивости силових одрезака) калифорнијске пастрмке у току двадесет дана складиштења при температури од +4°С (нултог, трећег, шестог, десетог, петнаестог и двадесетог дана).

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

1.1. Материјал

За екперимент је кориштена калифорнијска пастрмка *Oncorhynchus mykiss* поријеклом из рибњака „Рибњак Јањ“ из Бања Луке, гдје је и гајена. Изловљена из базена риба је клана на мјесту излова, без претходног омамљивања, при чему се клање обављало засијецањем врата (иза шкржних лукова) у вентралном дијелу, ножем. Након тога улиједило је прање трупа и евисцерација унутрашњих органа машинским путем. Одсјецање главе и скидање пераја урађено је ручно.

Након ове обраде, риба је подијељена у четири групе. У сваку групу додан је одговарајући коктел различитих сојева *Listeria monocytogenes* (серотип 4b АТСС 19115, серотип 4b NCTC 11994, као и серотипови 4b и 1/2a - изоловани током магистарског рада). Риба је затим саламурена поступком који се назива влажно сољење са концентрацијом соли од 9%. У саламуру су у зависности од испитиване групе додаване одабране компоненте етарских уља: карвакрол (прва испитивана група), еугенол (друга испитивана група) и њихова комбинација (трећа испитивана група) у количини да им коначна конценетрација у намирници буде 0,5%. Контролна група је била без одабраних компоненти етарских уља. За потребе експеримента кориштени су карвакрол (Carvacrol Natural 99% Sigma Aldrich) и еугенол (Eugenol 99% Sigma Aldrich). Након 24-часовног саламурења риба је пакована у вакуум и чувана при температури од 4⁰С +/- 1⁰С. Током складиштења обављене су микробиолошке анализе, праћени поједини хемијски и физичко-хемијски параметри као и промена сензорних својстава рибе. Риба је анализирана нултог, трећег, 6-ог, 10-тог, 15-тог и 20-тог дана складиштења.

4.1.1. Микроорганизми

У испитивању су кориштена 4 соја бактерија *Listeria monocytogenes* различитог поријекла. (табела 4.1.)

Табела 4.1. Поријекло бактерија кориштених у експерименту

Серотип	Сој	Поријекло
4b	Референтни сој АТСС 19115	Microbiologics, лиофилизовани микроорганизми
4b	Иzolовани сој приликом ПТ, референтни сој NCTC 11994	Food Microbiology Proficiency Testing Trial, Eurofins Norsk matanalyse PT001
4b	Иzolовани сој током магистарског рада	Димљена харинга
1/2a	Иzolовани сој током магистарског рада	Димљени лосос

4.1.2 Начин вјештачке контаминације узорака са сојевима *Listeria monocytogenes*

Појединачни сојеви *Listeria monocytogenes* су адекватно чувани и правовремено пресијавани на храљиве подлоге. Током чувања су редовно провјераване њихове морфолошке и биохемијске карактеристике. Пред почетак испитивања сојеви су пресијани на површину TSEY агара и током 24-36 часова култивисани при температури од 37⁰С. Култивисани сојеви су тако били спремни за даље кориштење у експерименту. Најбоље изоловане колоније су пикиране и суспендоване у 9 милилитара физиолошког раствора са додатком пептона и инкубиране током 1 часа на 37 °С. Узорци рибе су прије саламурења контаминирани одговарајућим разређењем коктела *Listeria monocytogenes* са циљем остваривања иницијалног нивоа од 10⁶.

4.2. Методе

За испитивање су кориштене:

- микробиолошке анализе,
- хемијске и физичко- хемијске анализе,
- сензорне анализе и
- статистичка анализа.

4.2.1. Микробиолошке анализе

Микробиолошке анализе обухватале су испитивање броја *Listeria monocytogenes*, броја мезофилних бактерија, броја бактерија млијечне киселине. Микробиолошка испитивања рађена су према ISO методама испитивања и то:

а) Хоризонтална метода за детекцију и бројање *Listeria monocytogenes* – Дио2: Метода нумерације BAS EN ISO 11290-2:2005 (ISO 11290-2:1998). Одмјеравањем и хомогенизовањем 10g/ml и 90ml PPV или HFBb, припремити иницијалну суспензију и ово разређење инкубисати 1 час ± 5 минута, на $20 \pm 2^\circ \text{C}$. Из основног разређења пренијети 0,1 милилитар у сваку од двије плоче ALOA агара, осушене у инкубатору. Стакленим штапићем- шпатулом размазати инокулум, водећи рачуна да се ивице Петри плоче не додирују. За сваку Петри плочу користити посебан стерилан штапић-шпатулу. Петри плоче оставити 15 минута да подлога упије инокулум, а затим плоче окрнути наопако и инкубисати 24-48 часова на 37°C .

Након инкубације од 24 часа, и додатог времена од 18-24 часа (ако је раст слаб или нема видљивих колонија), плоче се испитују на присуство *Listeria.spp*. Послије инкубације од 24 ± 3 часа колоније *L.monocytogenes* на ALOA агару су зелено-плаве боје, са мутним ореолом.

б) Укупан број аеробних мезофилних бактерија према BAS EN ISO 4833: 2008 Микробиологија хране и хране за животиње - Хоризонтална метода за одређивање броја микроорганизама - Техника бројања колонија на 30°C

За одређивање укупног броја мезофилних и психротрофних бактерија коришћен је Plate Count Agar (PCA, Merck) следећег састава: ензимски дигестат казеина - 5,0 g, екстракт квасца - 2,5 g, глукоза анхидрована - 1,0 g, агар - 9 до 18 g, дестилована вода - 1000 ml. Компоненте су растваране у дестилованој води следећим редом: екстракт квасца, ензимски дигестат казеина и глукоза. На крају је додат агар, загријано је до кључања да би се подлога комплетно растворила. рН вриједност је подешена тако да последије стерилизације буде $7,00 \pm 0,20$ на 25°C . Подлога је затим разливена у боце, а потом стерилисана у аутоклаву 15 минута на 121°C .

Од сваког узорка је одмјерено по 20g мишићног ткива. Одмјереном узорку је додавано 180ml физиолошког раствора, последије чега је обављена хомогенизација у стомахеру. Послије хомогенизације припремана су одговарајућа децимална

разблажења. На плоче је наливено 15ml агара, који је претходно отопљен и охлађен на температури од 44 до 47°C. Из одговарајућих разблажења засијавано је по 0,1 ml на површину РСА и размазан је стерилним еталером. Засијана подлога је инкубирана на 30°C током 72±3 h. Послије инкубационог периода избројане су израсле колоније. Колоније су бројане на плочама на којима је израсло између 15 и 300 колонија. Добијени број колонија множен је са величином разређења, подијљен је са бројем грама и исказан као log cfu (Colony Forming Unit) у 1 граму мяса пастрмке.

в) Одређивање бактерија млијечне киселине према методи ISO 15214:1998 (E)

Изоловање бактерија млијечне киселине врста обављено је на MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) агару (Merck) следећег састава: триптозни пептон - 10,0g, месни екстракт - 8,0 g, квашчев екстракт - 4,0 g, глукоза - 20,0 g, tween - 1,0 ml, дикалијумхидрогенфосфат - 2,0 g, диамонијумхидрогенцитрат - 2,0 g, натријумацетат - 5,0 g, магнезијумсулфат - 0,2 g, мангансулфат - 0,04 g, агар-агар - 14,0 g, дестилована вода ad 1000 ml. Састојци подлоге, или готова подлога, су растворени у дестилованој води и стерилисани су у аутоклаву 15 минута на 121°C. рН вриједност подлоге након стерилизације је износила 5,70±0,20. Од сваког испитиваног узорка одмјерено је по 20g мишићног ткива. Од припремљеног основног разблажења узорака прављена је серија разблажења. Из сваког разблажења је узиман по 1 ml узорка и преношен у Петри плоче које су затим наливане са 15 ml MRS агара охлађеног на 45°C. Кружним покретима су узорци и агар хомогенизовани. Засијане подлоге су инкубиране 3 дана при 30°C у микроаерофилним условима. Послије инкубације бројане су израсле колоније. Добијени број колонија множен је са величином разређења, подељен са бројем грама и исказан као log cfu у 1g мяса рибе.

4.2.2 Хемијске и физичко-хемијске анализе

Основни хемијски састав је испитан нултог дана експеримента у све четири групе узорака калифорнијске пастрмке. За испитивање основног хемијског састава коришћене су следеће методе:

- Одређивање садржаја протеина – метода по Kjeldahl-у примјеном уређаја фирме "Тесатор по ISO 937/1992. Принцип методе се заснива на дигестији узорка концентрованом сумпорном киселином уз коришћење бакар сулфата као катализатора. Приликом дигестије органски азот се преводи у амонијумове јоне, затим се врши алкализација и дестилација ослобођеног амонијака. Титровањем се одређује количина амонијака и на крају израчунава садржај азота у узорку из количине добијеног амонијака.
- Одређивање садржаја воде – одређивање губитка масе при сушењу хомогенизованог узорка при 105 ± 1 °C до константне масе BAS ISO 1442/1998. Принцип методе: потпуно мијешање дијела узорка за испитивање са пијеском и сушење до константне масе на 103 ± 2 °C.
- Одређивање укупне масти – метода по Soxhletу, екстракцијом масти из осушеног узорка петрол етром, дестилацијом и сушењем при 105 ± 1 °C до константне масе BAS ISO 1443/1992. Принцип методе: кључање дијела узорка за испитивање са разблаженом хлороводоничном киселином да би се ослободиле оклудоване и везане липидне фракције, филтрирање и сушење добијене масе и екстракција масти петролетром коришћењем апаратуре по - Soxhlet- у.
- Одређивање садржаја укупног пепела – сагорјевање узорка при 550 °C до константне масе BAS ISO 936/1999. Принцип методе: део узорка за испитивање се суши, угљенише, а затим жари на 550 ± 25 °C. После хлађења се одреди маса остатка.

- Одређивање количине укупног испарљивог азота -Commission regulation (EC) 2074/2005. Принцип методе: Испарљиви азот се екстрахује из узорка меса рибе употребом 0,6 моларне перхлорне киселине. После алкализације, екстракт се дестилује. Испарљиве базе које се налазе у добијеном раствору после дестилације одређују се титрацијом са стандардним раствором хлороводоничне киселине. Концентрација укупно испарљивог азота изражава се у мг/100г узорка.
- Садржај соли одређиван је методом по Volhard-у, SRPS ISO 1841-1:1999. Принцип методе: Око 10g ($\pm 0,01$ g) што више иситњеног узорка измијеша се у малој чашици с нешто воде, пренесе у тиквицу од 200ml по Kohlrausch-у (тиквица с проширеним грлом) или- недостатку исте- у обичну одмјерену тиквицу, и дода се још воде којом се испере чашица (укупно око 100ml воде). Тиквица се стави у кључало водено купатило и у току четврт сата чешће мијеша. Кад се тиквица охлади, таложе се баластне материје са по 1 ml раствора по Carrez-у I и II, допуни до 200ml и промјеша. Кад се талог слегне, филтрира се кроз наборани филтар-папир. Првих неколико ml филтрата се одбаци, 20ml потпуно бистрог филтрата (=1g узорка) сипа се пипетом у Erlenmeyer-ову тиквицу од 250ml с брушеним запушачем, дода 10ml 10%-тне азотне киселине, 25 до 50ml тачно одмјереног 0,1 n- раствора сребро нитрата (према очекиваног садржају соли, јер мора бити у вишку) и 5ml етра. Промјеша се и, кад се течност разбистри, дода се 5ml раствора амонијум фери сулфата а вишак сребро нитрата ретитрира са 0,1 n-раствором калијум или амонијум роданида, док се не појави стална црвенкаста боја.
- Вриједност рН узорака мјерена је директно, рН метром-Cyber Scan 510 - SRPS ISO 2917/2004. Мјерења су рађена нултог, трећег, шестог, десетог, петнаестог и двадесетог дана складиштења.

4.2.3. Сензорне анализе

Узорке свих испитиваних група, оцјењивала је група од шест обучених оцјењивача. Одабир, обука и праћење способности оцјењивача извршено је према стандарду ISO 8586-2:2012. Узорци су испитани у просторијама које су пројектоване према захтјевима стандарда ISO 8589:2012. Сензорна оцјена обављена је квантитативно дескриптивном анализом (ISO 6658:2001 и ISO 4121:2001) и обухватала је оцјену мириса и укупне прихватљивости сирових одрезака калифорнијске пастрмке.

4.2.4. Статистичке анализе

Сва испитивања су укључивала довољан број понављања (минимум шест) за статистичку обраду података. За табеларно представљање података, припрему за даљу обраду и основна статистичка израчунавања је коришћен програм Excel из Microsoft office 2007 софтверског пакета са Data Analysis додатком.

Примјењене су следеће статистичке методе за обраду података:

- а) дескриптивна статистика за приказивање средњих вриједности резултата, стандардних девијација и других параметара у вези са поновљеним одређивањима;
- б) т-тестови за поређење два сета резултата и утврђивање статистички значајних разлика међу њима;
- ц) анализа варијансе, ANOVA, за испитивање постојања статистички значајне разлике између више сетова резултата;
- д) линеарна регресија за праћење временске зависности промјене испитиваних микробиолошких, хемијских, физичко-хемијских параметара и сензорских својстава.

5. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА

Резултати испитивања су подијељени у три цјелине, на основу резултата испитивања микробиолошких анализа, хемијских и физичко-хемијских анализа и сензорних анализа, а сходно постављеним задацима испитивања.

5.1. Микробиолошке анализе

5.1.1. Испитивање броја *L.monocytogenes* у испитиваним групама узорака током складиштења

Резултати испитивања броја *L. monocytogenes* у четири испитиване групе производа и њихов међусобни однос по групама, складиштених од нултог до двадесетог дана, приказани су у табелама 5.1 и 5.2.

Нултог дана складиштења просјечан број *L.monocytogenes* био је од $4,28 \pm 0,76$ logCFU/g (трећа група) до $4,70 \pm 0,49$ logCFU/g (прва група). Утврђено је да је трећег дана складиштења просјечан број *L.monocytogenes* контролне групе узорака ($2,06 \pm 0,41$ log CFU/g) био статистички значајно већи ($p < 0,01$) од просјечног броја *L.monocytogenes* у осталим испитиваним узорцима, гдје је просјечан број био $1,01 \pm 0,18$ logCFU/g (друга група) до $1,07 \pm 0,26$ logCFU/g (трећа група). Као и трећег дана, тако је и шестог дана испитивања број *L.monocytogenes* контролне групе ($2,39 \pm 0,27$ logCFU/g) био статистички значајно већи ($p < 0,01$) од просјечног броја *L.monocytogenes* у осталим испитиваним узорцима, у којима је просјечан укупан број *L.monocytogenes* био од $0,94 \pm 0,34$ logCFU/g (трећа група) до $1,36 \pm 0,35$ logCFU/g (друга група) и између којих није утврђена статистички значајна разлика (табела 5. 1.)

Табела 5.1. Просјечан број *L.monocytogenes* нултог, трећег и шестог дана складиштења (log CFU/g)

Група	Дани складиштења ($\bar{X} \pm Sd$)		
	0.	3.	6.
К	$4,48 \pm 0,31$	$2,06^{ABC} \pm 0,41$	$2,39^{ABC} \pm 0,27$
1	$4,70 \pm 0,49$	$1,05^A \pm 0,07$	$1,26^A \pm 0,57$
2	$4,69 \pm 0,32$	$1,01^B \pm 0,18$	$1,36^B \pm 0,35$
3	$4,28 \pm 0,76$	$1,07^C \pm 0,26$	$0,94^C \pm 0,34$

Легенда: Иста слова А, В, С- $p < 0,01$

У табели 5.2. приказани су резултати просјечног броја *L.monocytogenes* од десетог до двадесетог дана складиштења. Десетог дана испитивања, просјечан број *L.monocytogenes* био је у интервалу од $0,74 \pm 0,44 \log \text{CFU/g}$ (друга група) до $2,49 \pm 0,24 \log \text{CFU/g}$ (контролна група). Просјечан број *L.monocytogenes* контролне групе био је статистички значајно већи ($p < 0,01$) од просјечног броја прве ($1,00 \pm 0,22 \log \text{CFU/g}$), друге ($0,74 \pm 0,44 \log \text{CFU/g}$), као и треће групе ($1,17 \pm 0,36 \log \text{CFU/g}$). Такође, петнаестог дана складиштења просјечан број *L.monocytogenes* контролне групе ($2,87 \pm 0,37 \log \text{CFU/g}$) био је статистички значајно већи ($p < 0,01$), од просјечног броја прве ($2,01 \pm 0,08 \log \text{CFU/g}$), $1,76 \log \text{CFU/g}$ друге и $2,04 \pm 0,39 \log \text{CFU/g}$ треће испитиване групе. Двадесетог дана складиштења просјечан број *L.monocytogenes* контролне групе ($3,13 \pm 0,25 \log \text{CFU/g}$), био је статистички значајно већи ($p < 0,01$) од просјечног броја прве ($1,95 \pm 0,41 \log \text{CFU/g}$), друге ($1,85 \pm 0,20 \log \text{CFU/g}$) као и треће ($2,93 \pm 0,34 \log \text{CFU/g}$) испитиване групе.

Табела 5.2. Просјечан број *L.monocytogenes* десетог, петнаестог и двадесетог дана складиштења ($\log \text{CFU/g}$)

Група	Дани складиштења ($\bar{X} \pm \text{Sd}$)		
	10.	15.	20.
К	$2,49^{\text{ABC}} \pm 0,24$	$2,87^{\text{ABC}} \pm 0,37$	$3,13^{\text{AB}} \pm 0,25$
1	$1,00^{\text{A}} \pm 0,22$	$2,01^{\text{A}} \pm 0,08$	$1,95^{\text{A}} \pm 0,41$
2	$0,74^{\text{B}} \pm 0,44$	$1,76^{\text{B}} \pm 0,28$	$1,85^{\text{BD}} \pm 0,20$
3	$1,17^{\text{C}} \pm 0,36$	$2,04^{\text{C}} \pm 0,39$	$2,93^{\text{CD}} \pm 0,34$

Легенда: Иста слова А, В, С- $p < 0,01$

5.1.1.1 Промјене броја *L. monocytogenes* у испитиваним групама током складиштења

У табели 5.3. приказане су промјене броја *L.monocytogenes* у испитиваним групама током складиштења узорака током двадесет дана . Нултог дана испитивања број *L.monocytogenes* у контролној групи ($4,48 \pm 0,309 \log \text{CFU/g}$) био је статистички значајно већи ($p < 0,01$) од просјечног броја *L.monocytogenes* утврђеног током осталих дана испитивања. Утврђена је статистички значајна разлика између броја *L.monocytogenes* трећег ($2,06 \pm 0,406 \log \text{CFU/g}$) и петнаестог ($2,87 \pm 0,373 \log \text{CFU/g}$), односно двадесетог дана ($3,13 \pm 0,246 \log \text{CFU/g}$) испитивања. Такође је утврђена статистички значајна разлика ($p < 0,01$) између *L.monocytogenes* шестог ($2,39 \pm 0,272 \log \text{CFU/g}$) и двадесетог дана испитивања, као и између десетог

($2,49 \pm 0,242 \log \text{CFU/g}$) и двадесетог дана испитивања, али са статистичком значајности на нивоу $p < 0,05$ (табела 5.3а).

Табела 5.3. Промјене броја *L.monocytogenes* у испитиваним групама током складиштења ($\log \text{CFU/g}$)

Дани складиштења	Група ($\bar{X} \pm \text{Sd}$)			
	К	1	2	3
0	$4,48 \pm 0,309$	$4,70 \pm 0,487$	$4,69 \pm 0,316$	$4,28 \pm 0,757$
3	$2,06 \pm 0,406$	$1,05 \pm 0,071$	$1,01 \pm 0,179$	$1,07 \pm 0,261$
6	$2,39 \pm 0,272$	$1,26 \pm 0,565$	$1,36 \pm 0,348$	$0,94 \pm 0,341$
10	$2,49 \pm 0,242$	$1,00 \pm 0,222$	$0,74 \pm 0,441$	$1,17 \pm 0,360$
15	$2,87 \pm 0,373$	$2,01 \pm 0,077$	$1,76 \pm 0,284$	$2,04 \pm 0,392$
20	$3,13 \pm 0,246$	$1,95 \pm 0,415$	$1,85 \pm 0,196$	$2,93 \pm 0,342$

Табела 5.3а. Статистичка значајност разлика између броја *L.monocytogenes* контролне групе током испитивања

Дани	3	6	10	15	20
0	**	**	**	**	**
3	-	нс	нс	**	**
6	-	-	нс	нс	**
10	-	-	-	нс	*
15	-	-	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс-нема статистичке значајности

У првој групи испитиваних узорака просјечан број *L.monocytogenes* кретао се од $4,70 \pm 0,487 \log \text{CFU/g}$ нултог дана складиштења до $1,00 \pm 0,222 \log \text{CFU/g}$ десетог дана складиштења. Просјечан број *L.monocytogenes* нултог дана био је статистички значајно већи ($p < 0,05$) о односу на остале дане складиштења. Статистички значајна разлика утврђена је између броја *L.monocytogenes* трећег ($1,05 \pm 0,071 \log \text{CFU/g}$) и петнаестог дана складиштења ($2,01 \pm 0,077 \log \text{CFU/g}$), као и трећег и двадесетог дана складиштења ($1,95 \pm 0,415 \log \text{CFU/g}$).

Број *L.monocytogenes* шестог дана складиштења ($1,26 \pm 0,565 \log \text{CFU/g}$), био је статистички значајно већи ($p < 0,05$), од броја *L.monocytogenes* узорака складиштених петнаестог дана ($2,01 \pm 0,077 \log \text{CFU/g}$), као и код узорака складиштених двадесет дана ($1,95 \pm 0,415 \log \text{CFU/g}$). Статистички значајна разлика ($p < 0,05$) утврђена је између броја *L.monocytogenes* код узорака складиштених десетог дана ($1,00 \pm 0,222 \log \text{CFU/g}$) и узорака складиштених петнаест ($2,01 \pm 0,077 \log \text{CFU/g}$) односно двадесет дана ($1,95 \pm 0,415 \log \text{CFU/g}$). Није забиљежена статистички значајна разлика између броја *L.monocytogenes* код узорака

складиштених петнаестог ($2,01 \pm 0,077 \log\text{CFU/g}$) и двадесетог ($1,95 \pm 0,415 \log\text{CFU/g}$) дана складиштења. (табела 5.3б)

Табела 5.3б. Статистичка значајност разлика између броја *L.monocytogenes* прве групе током испитивања

Дани	3	6	10	15	20
0	**	**	**	**	**
3	-	нс	нс	**	**
6	-	-	нс	*	*
10	-	-	-	**	**
15	-	-	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс-нема статистичке значајности

Број *L.monocytogenes* испитиване друге групе кретао се у интервалу од $4,69 \pm 0,316 \log\text{CFU/g}$ нултог дана складиштења до $0,74 \pm 0,441 \log\text{CFU/g}$ десетог дана складиштења. Просјечан број *L.monocytogenes* нултог дана био је статистички значајно већи ($p < 0,05$) у односу на остале дане складиштења. Број *L.monocytogenes* трећег дана складиштења ($1,01 \pm 0,179 \log\text{CFU/g}$) статистички се значајно разликовао ($p < 0,01$) од броја *L.monocytogenes* код узорак складиштених петнаестог ($1,76 \pm 0,284 \log\text{CFU/g}$) односно двадесетог ($1,85 \pm 0,196 \log\text{CFU/g}$) дана складиштења. Шестог дана складиштења број *L.monocytogenes* био је $1,36 \pm 0,348 \log\text{CFU/g}$ и статистички се значајно разликовао ($p < 0,05$) само од броја десетог дана складиштења ($0,74 \pm 0,441 \log\text{CFU/g}$). Статистички значајна разлика на нивоу од $p < 0,01$ утврђена је између броја *L.monocytogenes* узорак складиштених десетог дана $0,74 \pm 0,441 \log\text{CFU/g}$ и узорак складиштених петнаестог дана ($1,76 \pm 0,284 \log\text{CFU/g}$) као и узорак складиштених двадесетог дана ($1,85 \pm 0,196 \log\text{CFU/g}$). Између броја *L.monocytogenes* узорак складиштених петнаестог и двадесетог дана није било статистички значајне разлике (табела 5.3в).

Табела 5.3в. Статистичка значајност разлика између броја *L.monocytogenes* друге групе током испитивања

Дани	3	6	10	15	20
0	**	**	**	**	**
3	-	нс	нс	**	**
6	-	-	*	нс	нс
10	-	-	-	**	**
15	-	-	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс-нема статистичке значајности

Укупан број *L.monocytogenes* нултог дана складиштења ($4,28 \pm 0,757 \log\text{CFU/g}$) треће испитиване групе био је статистички значајно већи $p < 0,01$ од броја *L.monocytogenes* осталих дана складиштења. Трећег дана складиштења број *L.monocytogenes* био је $1,07 \pm 0,261 \log \text{CFU/g}$ и статистички се значајно разликовао, на нивоу $p < 0,01$, од броја *L.monocytogenes* узорака складиштених петнаестог ($2,04 \pm 0,392 \log\text{CFU/g}$) и двадесетог дана складиштења ($2,93 \pm 0,342 \log\text{CFU/g}$). На истом нивоу, као и код трећег дана складиштења, статистички значајна разлика, утврђена је између броја *L.monocytogenes* узорака складиштених петнаестог ($2,04 \pm 0,392 \log\text{CFU/g}$) и двадесетог дана ($2,93 \pm 0,342 \log \text{CFU/g}$) складиштења у односу на број *L.monocytogenes* код узорака складиштених шест дана ($0,94 \pm 0,341 \log \text{CFU/g}$). Број *L.monocytogenes* код узорака складиштених десетог дана био је $1,17 \pm 0,360 \log\text{CFU/g}$ и статистички се значајно разликовао ($p < 0,05$) од броја *L.monocytogenes* код узорака складиштених петнаестог ($2,04 \pm 0,392 \log\text{CFU/g}$) односно код узорака складиштених двадесетог дана ($2,93 \pm 0,342 \log\text{CFU/g}$), на статистичком нивоу значајности $p < 0,01$. Петнаестог дана складиштења број *L.monocytogenes* био је $2,04 \pm 0,392 \log\text{CFU/g}$ и статистички се значајно разликовао $p < 0,05$ од броја *L.monocytogenes* код узорака складиштених двадесетог дана ($2,93 \pm 0,342 \log \text{CFU/g}$). (табела 5.3г).

Табела 5.3г. Статистичка значајност разлика између броја *L.monocytogenes* треће групе током испитивања

Дани	3	6	10	15	20
0	**	**	**	**	**
3	-	НС	НС	**	**
6	-	-	НС	**	**
10	-	-	-	*	**
15	-	-	-	-	*

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс-нема статистичке значајности

5.1.2 Испитивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија у испитиваним групама узорака током складиштења

У табелама 5.4. и 5.5. приказани су резултати испитивања укупног броја аеробних мезофилних бактерија у четири испитиване групе производа и њихов међусобни однос по групама, складиштених од нултог до двадесетог дана.

Испитивањем промјене укупног броја аеробних мезофилних бактерија утврђено је да је нултог дана складиштења у контролној групи ($3,26 \pm 0,16 \log \text{CFU/g}$) њихов број био статистички значајно већи ($p < 0,05$) од укупног броја мезофилних бактерија прве ($2,64 \pm 0,31 \log \text{CFU/g}$) и треће ($2,57 \pm 0,23 \log \text{CFU/g}$) испитиване групе производа. Трећег дана складиштења укупан број мезофилних бактерија кретао се од $1,88 \pm 0,45 \log \text{CFU/g}$ утврђен код контролне групе до $1,56 \pm 0,40 \log \text{CFU/g}$, код прве испитиване групе. Укупан број мезофилних бактерија друге и треће испитиване групе био је $1,62 \pm 0,13 \log \text{CFU/g}$ односно $1,62 \pm 0,49 \log \text{CFU/g}$. Између укупног броја мезофилних бактерија, испитиваних група, трећег дана складиштења није забиљежена статистички значајна разлика. Шестог испитиваног дана укупан број мезофилних бактерија контролне групе ($2,67 \pm 0,20 \log \text{CFU/g}$) био је статистички значајно већи од укупног броја прве $1,48 \pm 0,25 \log \text{CFU/g}$, друге $1,41 \pm 0,18 \log \text{CFU/g}$ и треће $1,40 \pm 0,45 \log \text{CFU/g}$ испитиване групе (табела 5.4.)

Табела 5.4. Просјечан укупан број аеробних мезофилних бактерија нултог, трећег, шестог дана складиштења ($\log \text{CFU/g}$)

Група	Дани складиштења ($\bar{X} \pm \text{Sd}$)		
	0.	3.	6.
К	$3,26^{ab} \pm 0,16$	$1,88 \pm 0,45$	$2,67^{ABC} \pm 0,20$
1	$2,64^a \pm 0,31$	$1,56 \pm 0,40$	$1,48^A \pm 0,25$
2	$2,80 \pm 0,60$	$1,62 \pm 0,13$	$1,41^B \pm 0,18$
3	$2,57^b \pm 0,23$	$1,62 \pm 0,49$	$1,40^C \pm 0,45$

Легенда: Исто слово а, b- $p < 0,05$

Десетог дана складиштења укупан број аеробних мезофилних бактерија контролне групе био је $3,26 \pm 0,18 \log \text{CFU/g}$ и статистички значајно већи од укупног броја мезофилних бактерија осталих испитиваних група. Укупан број мезофилних бактерија прве ($2,08 \pm 0,56 \log \text{CFU/g}$), друге ($2,37 \pm 0,16 \log \text{CFU/g}$) и треће ($2,45 \pm 0,28 \log \text{CFU/g}$) испитиване групе није се статистички значајно

разликовао. Статистички значајно већи ($p < 0,01$) укупан број мезофилних бактерија $4,63 \pm 0,23 \log \text{CFU/g}$ био је у контролној групи петнаестог дана складиштења. Такође, укупан број мезофилних бактерија друге испитиване групе ($3,67 \pm 0,31 \log \text{CFU/g}$) био је статистички значајно већи ($p < 0,01$) од укупног броја мезофилних бактерија прве ($2,71 \pm 0,18 \log \text{CFU/g}$) и треће ($2,68 \pm 0,78 \log \text{CFU/g}$) испитиване групе. Двадесетог дана складиштења укупан број мезофилних бактерија био је $5,77 \pm 0,36 \log \text{CFU/g}$ и статистички значајно већи ($p < 0,01$) од укупног броја мезофилних бактерија прве $3,38 \pm 0,36 \log \text{CFU/g}$, друге $3,85 \pm 0,56 \log \text{CFU/g}$ и треће испитиване групе $3,71 \pm 0,66 \log \text{CFU/g}$.

Табела 5.5 Просјечан укупан број аеробних мезофилних бактерија десетог, петнаестог и двадесетог дана складиштења ($\log \text{CFU/g}$)

Група	Дани складиштења ($\bar{X} \pm \text{Sd}$)		
	10.	15.	20.
К	$3,26^{\text{ABC}} \pm 0,18$	$4,63^{\text{ABC}} \pm 0,23$	$5,77^{\text{ABC}} \pm 0,36$
1	$2,08^{\text{A}} \pm 0,56$	$2,71^{\text{AD}} \pm 0,18$	$3,38^{\text{A}} \pm 0,36$
2	$2,37^{\text{B}} \pm 0,16$	$3,67^{\text{BDE}} \pm 0,31$	$3,85^{\text{B}} \pm 0,56$
3	$2,45^{\text{C}} \pm 0,28$	$2,68^{\text{CE}} \pm 0,78$	$3,71^{\text{C}} \pm 0,66$

Легенда: Иста слова А, В, С, D- $p < 0,01$

5.1.2.1 Промјене укупног броја аеробних мезофилних бактерија током складиштења

У табели 5.6. приказане су промјене укупног броја аеробних мезофилних бактерија током двадесет дана складиштења узорака. Нултог дана складиштења укупан број мезофилних бактерија контролне групе био је $3,26 \pm 0,158 \log \text{CFU/g}$ и статистички значајно се разликовао на нивоу $p < 0,01$ од укупног броја мезофилних бактерија трећег ($1,88 \pm 0,446 \log \text{CFU/g}$), петнаестог ($4,63 \pm 0,232 \log \text{CFU/g}$) и двадесетог дана складиштења ($5,77 \pm 0,361 \log \text{CFU/g}$). Статистички се значајно разликовао и од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених шестог дана ($2,67 \pm 0,197 \log \text{CFU/g}$), али на ниво статистичке значајности од $p < 0,05$. Укупан број мезофилних бактерија трећег дана складиштења био је $1,88 \pm 0,446 \log \text{CFU/g}$ и статистички се значајно разликовао ($p < 0,01$), од укупног броја шестог ($2,67 \pm 0,197 \log \text{CFU/g}$), десетог ($3,26 \pm 0,179 \log \text{CFU/g}$), петнаестог ($4,63 \pm 0,232 \log \text{CFU/g}$) и двадесетог дана ($5,77 \pm 0,361 \log \text{CFU/g}$) складиштења. Шестог дана складиштења укупан број мезофилних бактерија контролне групе био је $2,67 \pm 0,197 \log \text{CFU/g}$ и статистички значајно мањи, на нивоу статистичке значајности $p < 0,05$ од укупног броја мезофилних бактерија, узорака

складиштених десетог дана ($3,26 \pm 0,179 \log \text{CFU/g}$), односно на нивоу статистичке значајности $p < 0,01$, од укупног броја мезофилних бактерија код узорака складиштених петнаестог ($4,63 \pm 0,232 \log \text{CFU/g}$), и двадесетог дана складиштења ($5,77 \pm 0,361 \log \text{CFU/g}$). (табела 5.6а)

Табела 5.6 Промјене укупног броја мезофилних у испитиваним групама током складиштења ($\log \text{CFU/g}$)

Дани испитивања	Група ($\bar{X} \pm \text{Sd}$)			
	К	1	2	3
0	$3,26 \pm 0,158$	$2,64 \pm 0,307$	$2,80 \pm 0,599$	$2,57 \pm 0,232$
3	$1,88 \pm 0,446$	$1,30 \pm 0,728$	$1,62 \pm 0,128$	$1,62 \pm 0,491$
6	$2,67 \pm 0,197$	$1,48 \pm 0,247$	$1,41 \pm 0,178$	$1,40 \pm 0,445$
10	$3,26 \pm 0,179$	$2,08 \pm 0,557$	$2,37 \pm 0,163$	$2,45 \pm 0,280$
15	$4,63 \pm 0,232$	$2,71 \pm 0,182$	$3,67 \pm 0,313$	$2,68 \pm 0,784$
20	$5,77 \pm 0,361$	$3,38 \pm 0,357$	$3,85 \pm 0,557$	$3,71 \pm 0,656$

Табела 5.6а Статистичка значајност разлика између укупног броја аеробних мезофилних бактерија контролне групе током испитивања

Дани	3	6	10	15	20
0	**	*	нс	**	**
3	-	**	**	**	**
6	-	-	*	**	**
10	-	-	-	**	**
15	-	-	-	-	**

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс – нема статистичке значајности

Укупан број мезофилних бактерија нултог дана прве испитиване групе био је $2,64 \pm 0,307 \log \text{CFU/g}$ и статистички значајно већи ($p < 0,01$) од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених трећег ($1,30 \pm 0,728 \log \text{CFU/g}$) и шестог дана ($1,48 \pm 0,247 \log \text{CFU/g}$). Међутим, статистички значајна разлика није забиљежена за узорке складиштене десет ($2,08 \pm 0,557 \log \text{CFU/g}$), петнаест ($2,71 \pm 0,182 \log \text{CFU/g}$) и двадесет ($3,38 \pm 0,357 \log \text{CFU/g}$) дана складиштења. Трећег дана складиштења укупан број мезофилних бактерија ($1,30 \pm 0,728 \log \text{CFU/g}$) статистички је значајно мањи на нивоу статистичке значајности $p < 0,05$ од укупног броја мезофилних бактерија код узорака складиштених десетог дана ($2,08 \pm 0,557 \log \text{CFU/g}$), односно на нивоу статистичке значајности $p < 0,01$ за узорке складиштене петнаестог ($2,71 \pm 0,182 \log \text{CFU/g}$) и двадесетог ($3,38 \pm 0,357 \log \text{CFU/g}$) дана складиштења. Статистички значајна разлика није забиљежена

између укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених шестог ($1,48 \pm 0,247 \text{ logCFU/g}$) и десетог дана ($2,08 \pm 0,557 \text{ logCFU/g}$), али био је статистички значајно мањи $p < 0,01$ од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених петнаест дана ($2,71 \pm 0,182 \text{ logCFU/g}$) и укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених двадесет дана ($3,38 \pm 0,357 \text{ logCFU/g}$). Није утврђена статистички значајна разлика између укупног броја мезофилних бактерија код узорака складиштених десет ($2,08 \pm 0,557 \text{ logCFU/g}$) и петнаест дана ($2,71 \pm 0,182 \text{ logCFU/g}$), а утврђена је на нивоу $p < 0,01$ двадесетог дана складиштења ($3,38 \pm 0,357 \text{ logCFU/g}$). Такође, статистички значајна разлика није утврђена између укупног броја мезофилних бактерија код узорака складиштених петнаестог ($2,71 \pm 0,182 \text{ logCFU/g}$) и двадесетог дана складиштења ($3,38 \pm 0,357 \text{ logCFU/g}$). (табела 5.6б)

Табела 5.6б Статистичка значајност између укупног броја аеробних мезофилних бактерија прве групе током испитивања

Дани	3	6	10	15	20
0	**	**	нс	нс	нс
3	-	нс	*	**	**
6	-	-	нс	**	**
10	-	-	-	нс	**
15	-	-	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс – нема статистичке значајност

Током испитивања друге групе утврђено је да је укупан број мезофилних бактерија статистички значајно већи ($p < 0,01$) нултог дана ($2,80 \pm 0,599 \text{ logCFU/g}$) у односу на укупан број мезофилних бактерија код узорака складиштених трећег ($1,62 \pm 0,128 \text{ logCFU/g}$) односно шестог дана ($1,41 \pm 0,178 \text{ logCFU/g}$) складиштења. Међутим, на истом нивоу статистичке значајности укупан број мезофилних бактерија узорака складиштених нултог дана мањи је од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених петнаест дана ($3,67 \pm 0,313 \text{ logCFU/g}$) и укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених двадесет дана ($3,85 \pm 0,557 \text{ logCFU/g}$). Трећег дана складиштења укупан број мезофилних бактерија није се статистички значајно разликовао ($1,62 \pm 0,128 \text{ logCFU/g}$), од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених шестог дана ($1,41 \pm 0,178 \text{ logCFU/g}$). Укупан број мезофилних бактерија трећег дана складиштења, био је статистички значајно мањи ($p < 0,05$) од укупног броја

мезофилних бактерија код узорака складиштених десет дана ($2,37 \pm 0,163 \log\text{CFU/g}$), односно мањи на нивоу статистичке значајности $p < 0,01$, од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених петнаест ($3,67 \pm 0,313 \log\text{CFU/g}$) и двадесет ($3,85 \pm 0,557 \log\text{CFU/g}$) дана. Укупан број мезофилних бактерија забиљежен шестог дана складиштења ($1,41 \pm 0,178 \log\text{CFU/g}$) статистички је значајно мањи ($p < 0,01$) од укупног броја мезофилних бактерија код узорака складиштених десет ($2,37 \pm 0,163 \log\text{CFU/g}$), петнаест ($3,67 \pm 0,313 \log\text{CFU/g}$) и двадесет дана складиштења ($3,85 \pm 0,557 \log\text{CFU/g}$).

Такође, укупан број мезофилних бактерија узорака складиштених десет дана статистички значајно је мањи $p < 0,01$ од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених петнаест ($3,67 \pm 0,313 \log\text{CFU/g}$) и двадесет дана ($3,85 \pm 0,557 \log\text{CFU/g}$). Петнаестог дана складиштења укупан број мезофилних бактерија није се статистички значајно разликовао од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених двадесет дана ($3,85 \pm 0,557 \log\text{CFU/g}$). (табела 5.6в)

Табела 5.6в Статистичка значајност разлике између укупног броја аеробних мезофилних бактерија друге испитиване групе

Дани	3	6	10	15	20
0	**	**	нс	**	**
3	-	нс	*	**	**
6	-	-	**	**	**
10	-	-	-	**	**
15	-	-	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс – нема статистичке значајности

Укупан број мезофилних бактерија нултог дана треће испитиване групе ($2,57 \pm 0,232 \log\text{CFU/g}$) био је статистички значајно већи $p < 0,05$ од укупног броја мезофилних бактерија а код узорака складиштених трећег дана ($1,62 \pm 0,491 \log\text{CFU/g}$), односно већи на нивоу статистичке значајности $p < 0,01$ од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених шест дана ($1,40 \pm 0,445 \log\text{CFU/g}$). Укупан број мезофилних бактерија нултог дана складиштења статистички је значајно мањи $p < 0,01$ од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених двадесет дана ($3,71 \pm 0,565 \log\text{CFU/g}$). Добијени укупан број мезофилних бактерија узорака складиштених три дана статистички је значајно ($p < 0,05$) мањи од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених петнаест дана ($2,68 \pm 0,784 \log\text{CFU/g}$), односно статистички значајно мањи ($p < 0,01$)

од укупног броја мезофилних бактерија код узорака складиштених двадесет дана ($3,71 \pm 0,565 \text{ logCFU/g}$). Шестог дана складиштења добијени укупни број мезофилних бактерија ($1,40 \pm 0,445 \text{ logCFU/g}$), био је статистички значајно мањи ($p < 0,05$) од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених десети дан ($2,45 \pm 0,280 \text{ logCFU/g}$), и статистички значајно мањи али на нивоу $p < 0,01$, од укупног броја мезофилних бактерија узорака складиштених петнаест ($2,68 \pm 0,784 \text{ logCFU/g}$) и двадесет дана ($3,71 \pm 0,656 \text{ logCFU/g}$). Статистички значајна разлика $p < 0,01$ утврђена у укупном броју мезофилних бактерија код узорака складиштених десет ($2,45 \pm 0,280 \text{ logCFU/g}$) и двадесет дана ($3,71 \pm 0,656 \text{ logCFU/g}$) складиштења, као и код узорака складиштених петнаест ($2,68 \pm 0,784 \text{ logCFU/g}$) и двадесет дана ($3,71 \pm 0,656 \text{ logCFU/g}$), али на нивоу статистичке значајности $p < 0,05$. (табела 5.6г)

Табела 5.6г Статистичка значајност између укупног броја аеробних мезофилних бактерија треће испитиване групе

Дани	3	6	10	15	20
0	*	**	нс	нс	**
3	-	нс	нс	*	**
6	-	-	*	**	**
10	-	-	-	нс	**
15	-	-	-	-	*

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс – нема статистичке значајности

5.1.3 Испитивање укупног броја бактерија млијечне киселине током складиштења

5.1.3.1 Укупан број бактерија млијечне киселине у испитиваним групама узорака током складиштења

У табелама 5.7 и 5.8. приказан је просјечан укупан број бактерија млијечне киселине код узорака складиштених од нултог до двадесетог дана. Шестог дана складиштења изоловане су прве колоније бактерија млијечне киселине. Укупан број бактерија млијечне киселине кретао се од $1,50 \pm 0,43 \text{ logCFU/g}$ у контролној групи до $1,87 \pm 0,19 \text{ logCFU/g}$ у првој испитиваној групи. У контролној групи десетог ($2,42 \pm 0,35 \text{ logCFU/g}$), петнаестог ($2,10 \pm 0,28 \text{ logCFU/g}$) и двадесетог дана ($2,52 \pm 0,29 \text{ logCFU/g}$) складиштења забиљежен је у односу на остале групе, али без статистички значајне разлике, највећи број бактерија млијечне киселине.

Табела 5.7 Просјечан укупан број бактерија млијечне киселине нултог, трећег и шестог дана складиштења(log CFU/g)

Група	Дани складиштења ($\bar{X} \pm Sd$)		
	0.	3.	6.
К	/	/	1,50±0,43
1	/	/	1,87±0,19
2	/	/	1,81±0,11
3	/	/	1,69±0,45

Табела 5.8 Просјечан укупан број бактерија млијечне киселине десетог, петнаестог и двадесетог дана складиштења (log CFU/g)

Група	Дани складиштења ($\bar{X} \pm Sd$)		
	10.	15.	20.
К	2,42±0,35	2,10±0,28	2,52±0,29
1	2,23±0,33	2,00±0,46	2,13±0,22
2	2,08±0,33	1,75±0,26	2,31±0,38
3	2,07±0,65	2,04±0,17	2,21±0,28

Укупан број бактерија млијечне киселине шестог дана складиштења контролне групе био је $1,50 \pm 0,429 \log CFU/g$ и статистички значајно мањи ($p < 0,01$) од укупног броја бактерија млијечне киселине десетог дана складиштења ($2,42 \pm 0,348 \log CFU/g$), и двадесетог дана складиштења ($2,52 \pm 0,287 \log CFU/g$) (Табела 5.9). Такође, статистички значајно мањи ($p < 0,05$) је и од укупног броја бактерија млијечне киселине код узорак складиштених петнаест дана ($2,10 \pm 0,276 \log CFU/g$). Укупан број бактерија млијечне киселине изолованих из узорак осталих дана складиштења није се статистички значајно разликовао. (Табела 5.9а)

Табела 5.9 Промјене укупног броја бактерија млијечне киселине у испитиваним групама током складиштења (log CFU/g)

Дани испитивања	Група ($\bar{X} \pm Sd$)			
	К	1	2	3
0	/	/	/	/
3	/	/	/	/
6	1,50±0,429	1,87±0,187	1,81±0,107	1,69±0,448
10	2,42±0,348	2,23±0,333	2,08±0,332	2,07±0,648
15	2,10±0,276	2,00±0,461	1,75±0,257	2,04±0,168
20	2,52±0,287	2,13±0,225	2,31±0,379	2,21±0,277

Табела 5.9а Статистичка значајност између бактерија млијечне киселине током испитивања контролне групе

Дани	10	15	20
6	**	*	**
10	-	нс	нс
15	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс – нема статистичке значајности

Шестог дана складиштења, укупан број бактерија млијечне киселине ($1,87 \pm 0,187 \log \text{CFU/g}$) био је статистички значајно мањи $p < 0,05$ од укупног броја бактерија млијечне киселине десетог дана складиштења ($2,23 \pm 0,333 \log \text{CFU/g}$). Укупан број бактерија млијечне киселине код осталих узорака није се статистички значајно мијењао. (табела 5.9б)

Табела 5.9б Статистичка значајност између броја бактерија млијечне киселине током испитивања прве групе

Дани	6	10	15	20
6	-	*	нс	нс
10	-	-	нс	нс
15	-	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс – нема статистичке значајности

Укупан број бактерија млијечне киселине шестог дана складиштења друге групе ($1,81 \pm 0,448 \log \text{CFU/g}$), био је статистички значајно мањи $p < 0,05$ од укупног броја бактерија млијечне киселине код узорака складиштених двадесет дана ($2,31 \pm 0,379 \log \text{CFU/g}$). На истим нивоу статистичке значајности био је мањи и број бактерија млијечне киселине код узорака складиштених петнаестог дана ($1,75 \pm 0,257 \log \text{CFU/g}$) у односу на број бактерија код узорака складиштених двадесет дана ($2,31 \pm 0,277 \log \text{CFU/g}$). Укупан број бактерија млијечне киселине код осталих узорака није се статистички значајно мијењао. (Табела 5.9в)

Табела 5.9в. Статистичка значајност разлика између броја бактерија млијечне киселине током испитивања друге групе

Дани	6	10	15	20
6	-	нс	нс	*
10	-	-	нс	нс
15	-	-	-	*

Легенда: * - $p < 0,05$; нс – нема статистичке значајности

Шестог дана складиштења укупан број бактерија млијечне киселине треће испитиване групе био је $1,69 \pm 0,448 \log\text{CFU/g}$ и статистички значајно $p < 0,05$ мањи од укупног броја бактерија млијечне киселине двадесетог дана складиштења ($2,21 \pm 0,277 \log\text{CFU/g}$). Укупан број бактерија млијечне киселине код осталих узорака није се статистички значајно мијењао. (Табела 5.9г)

Табела 5.9г. Статистичка значајност разлика између броја бактерија млијечне киселине током испитивања треће групе

Дани	6	10	15	20
6	-	нс	нс	*
10	-	-	нс	нс
15	-	-	-	нс

Легенда: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; нс – нема статистичке значајности

5.2. Хемијске и физичко-хемијске анализе

У табели 5.10. приказан је хемијски састав контролне групе узорака рибе. Просјечан садржај протеина био је 19,34%, масти 4,35%, воде 72,88%, пепела 3,31% и соли 2,23%. Највећи коефицијент варијације (CV%) од 10,47% забиљежен је код масти, а најмањи код воде 0,61%.

Табела 5.10 Хемијски састав контролне групе узорака рибе (%)

Хемијски састав	\bar{X}	Мјере варијације				CV%
		S _d	S _e	I _v		
				X _{max}	X _{min}	
Протеини	19,43	0,19	0,08	19,17	19,66	0,99
Маст	4,35	0,46	0,19	4,00	4,97	10,47
Вода	72,88	0,44	0,18	72,44	73,45	0,61
Пепео	3,31	0,22	0,09	3,11	3,62	6,56
Со	2,23	0,19	0,08	2,05	2,49	8,55

Табела 5.11 Просјечан садржај испарљивог азота током контролне групе узорака рибе складиштење (mg/kg)

Дани складиштења	\bar{X}	Мјере варијације				$C_{V\%}$
		S_d	S_e	I_v		
				X_{max}	X_{min}	
0.	21,00	3,43	1,40	25,50	35,60	11,08
3.	25,62	2,66	1,08	30,90	38,74	7,46
6.	28,60	2,32	0,95	35,60	41,55	6,01
10.	31,56	2,66	1,09	39,26	46,31	6,40
15.	35,49	2,66	1,09	41,50	48,00	5,99
20.	38,76	1,22	0,50	46,77	50,18	2,50

Нултог дана складиштења садржај укупног испарљивог азота износио је 21,00 mg/kg, и био је статистички значајно нижи ($p < 0,05$) од садржаја из узорака трећег дана складиштења 25,62 mg/kg. Такође, био је статистички значајно нижи ($p < 0,01$) од садржаја укупног испарљивог азота из узорака складиштених шестог (28,60 mg/kg), десетог (31,56 mg/kg), петнаестог (35,49 mg/kg) и двадесетог дана складиштења (38,76 mg/kg). Садржај укупног испарљивог азота узорака складиштених три дана није се статистички значајно разликовао од садржаја шестог дана складиштења. Међутим, био је статистички значајно мањи ($p < 0,01$) од садржаја узорака складиштених десетог 31,56 mg/kg, петнаестог 35,49 mg/kg и двадесетог дана складиштења 38,76 mg/kg. Укупан садржај испарљивог азота шестог дана био је статистички значајно мањи ($p < 0,01$) од садржаја код узорака складиштених петнаест дана (35,49 mg/kg), и двадесет дана 38,76 mg/kg).

Садржај укупног испарљивог азота узорака складиштених десет дана био је 31,56 mg/kg и статистички значајно мањи ($p < 0,01$) од садржаја код узорака складиштених двадесет дана (38,76 mg/kg). Није било статистички значајне разлике између садржаја укупног испарљивог азота узорка складиштених петнаест и двадесет дана. (табела 5.12.)

Табела 5.12 Статистичка значајност разлика садржаја испарљивог азота током складиштења

Дани испитивања	3	6	10	15	20
0	*	**	**	**	**
3	-	НС	**	**	**
6	-	-	НС	**	**
10	-	-	-	НС	**
15	-	-	-	-	НС

Легенда: *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, нс-нема статистичке значајности

Просјечна рН вриједност кретала се у интервалу од 6,33 нултог и трећег дана складиштења до 6,43 двадесетог дана складиштења (табела 5.13.)

Табела 5.13 Просјечна рН вриједност контролне групе узорака током складиштења

Дани складиштења	\bar{X}	Мјере варијације				$C_{V\%}$
		S_d	S_e	I_V		
				X_{\max}	X_{\min}	
0.	6,33	0,07	0,03	6,23	6,46	1,35
3.	6,33	0,07	0,03	6,34	6,41	0,47
6.	6,35	0,03	0,01	6,28	6,46	1,03
10.	6,38	0,03	0,01	6,30	6,38	0,55
15.	6,39	0,07	0,03	6,28	6,68	2,59
20.	6,43	0,17	0,07	6,26	6,44	1,11

Просјечна вриједност активности воде (a_w) била је 0,9841.

5.3. Сензорне анализе

Сензорно оцијењивање обухватило је оцјене изгледа, мириса, текстуре и укупне прихватљивости. У табелама од 5.14- 5.19 приказане су средње оцјене сензорног испитивања рибе током складиштења.

Нултог дана складиштења (табела.5.14.) није било статистички значајних разлика између оцјена оцијењиваних сензорних карактеристика. Највећу оцјену од $4,78 \pm 0,19$ за укупну прихватљивост имала је друга група производа, док је најслабије са просјечном оцјеном од $4,62 \pm 0,19$ оцијењена је трећа група производа.

Табела 5. 14 Сензорна оцјена рибе нултог дана испитивања

Узорак	Изглед	Мирис	Текстура	Укупна прихватљивост
	$\bar{X} \pm SD$			
К	$4,75 \pm 0,22$	$4,93 \pm 0,22$	$4,73 \pm 0,19$	$4,65 \pm 0,15$
I (КК)	$4,78 \pm 0,25$	$4,73 \pm 0,22$	$4,68 \pm 0,21$	$4,73 \pm 0,20$
II (Е)	$4,73 \pm 0,20$	$4,80 \pm 0,20$	$4,78 \pm 0,17$	$4,78 \pm 0,19$
III (КЕ)	$4,75 \pm 0,19$	$4,78 \pm 0,23$	$4,68 \pm 0,25$	$4,62 \pm 0,19$

Слично као и нултог дана складиштења тако и трећег, није било статистички значајне разлике у добијеним просјечним оцјенама. За разлику од нултог дана складиштења, када је друга испитивана група добила највише оцјене за укупну прихватљивост, трећег дана складиштења контролна група је за укупну прихватљивост добила највише оцјене ($4,85 \pm 0,19$), док је укупна прихватљивост друге групе оцијењена са најслабијим оцјенама ($4,67 \pm 0,21$). (табела 5.15.)

Табела 5.15 Сензорна оцјена рибе трећег дана испитивања

Узорак	Изглед	Мирис	Текстура	Укупна прихватљивост
	$\bar{X} \pm SD$			
К	$4,77 \pm 0,27$	$4,17 \pm 0,21$	$4,78 \pm 0,21$	$4,85 \pm 0,19$
I (КК)	$4,77 \pm 0,17$	$4,82 \pm 0,19$	$4,73 \pm 0,19$	$4,75 \pm 0,19$
II (Е)	$4,80 \pm 0,19$	$4,85 \pm 0,19$	$4,73 \pm 0,21$	$4,67 \pm 0,21$
III (КЕ)	$4,75 \pm 0,19$	$4,78 \pm 0,19$	$4,75 \pm 0,23$	$4,77 \pm 0,17$

Шестог дана складиштења највишу просјечну оцјену за изглед имала је контролна група рибе ($4,83 \pm 0,19$) и била је статистички значајно већа ($<0,01$) у односу на прву ($3,73 \pm 0,22$), другу ($4,80 \pm 0,18$), и трећу испитивану групу. Највећу просјечну

оцјену за мирис имала је контролна група ($4,72, \pm 0,21$) и била је статистички значајно већа $p < 0,01$ од прве ($4,20 \pm 0,21$) и треће ($4,18 \pm 0,25$), односно друге испитиване ($4,35 \pm 0,19$) групе, али на нивоу статистичке значајности $p < 0,05$. Најслабије оцјене за текстуру имала је друга група ($4,23 \pm 0,23$) и била је статистички значајно мања ($p < 0,01$) у односу на остале испитиване групе (табела 5.16.). Просјечне оцјене за укупну прихватљивост кретале су се у интервалу од $4,17 \pm 0,20$ до $4,33 \pm 0,20$ без статистички значајних разлика у просјечним оцјенама испитиваних група.

Табела 5.16 Сензорна оцјена изгледа рибе шестог дана испитивања

Узорак	Изглед	Мирис	Текстура	Укупна прихватљивост
К	$4,83^{A,B} \pm 0,19$	$4,72^{A,B,a} \pm 0,21$	$4,72^A \pm 0,23$	$4,25 \pm 0,19$
I (КК)	$3,73^{A,C} \pm 0,22$	$4,20^A \pm 0,21$	$4,23^{A,B,C} \pm 0,23$	$4,17 \pm 0,20$
II (Е)	$4,80^{C,D} \pm 0,18$	$4,35^a \pm 0,19$	$4,70^B \pm 0,21$	$4,32 \pm 0,19$
III (КЕ)	$3,75^{B,D} \pm 0,19$	$4,18^B \pm 0,25$	$4,75^C \pm 0,19$	$4,33 \pm 0,20$

Легенда: Иста слова ^{A,B,C,D} – $p < 0,01$; ^a – $p < 0,05$.

Десетог дана складиштења просјечна оцјена изгледа контролне групе ($4,25 \pm 0,24$) и био је статистички значајно већи $p < 0,05$ од просјечне оцјене прве ($3,77 \pm 0,22$), треће ($3,78 \pm 0,18$) односно $p < 0,05$ друге ($3,57 \pm 0,42$) испитиване групе. Највеће просјечне оцјене мириса имала је трећа испитивана група ($4,27 \pm 0,20$) и била је статистички значајно већа од ($p < 0,01$) од друге ($4,22 \pm 0,19$), односно прве ($3,72 \pm 0,22$) и контролне групе ($3,73 \pm 0,22$). Као и код оцјене мириса, највеће оцјене приликом оцјењивања текстуре добила је трећа испитивана група ($4,28 \pm 0,21$) и била је статистички значајно већа ($p < 0,01$) од друге ($3,78 \pm 0,19$) прве ($3,83 \pm 0,20$) и контролне групе ($3,75 \pm 0,21$). Просјечна оцјена укупне прихватљивости контролне групе ($3,83 \pm 0,20$) била је статистички значајно мања $p < 0,05$ у односу на просјечну оцјену друге ($4,18 \pm 0,19$) и треће испитиване групе ($4,22 \pm 0,19$). (табела 5.17.)

Табела 5.17 Сензорна оцјена изгледа рибе десетог дана испитивања

Узорак	Изглед	Мирис	Текстура	Укупна прихватљивост
К	4,25 ^{A,a,b} ±0,24	3,73 ^{A,B} ±0,22	3,75 ^A ±0,21	3,83 ^{a,b} ±0,20
I (КК)	3,77 ^a ±0,22	3,72 ^{C,D} ±0,22	3,83 ^C ±0,20	4,13±0,20
II (Е)	3,57 ^A ±0,42	4,22 ^{A,C} ±0,19	3,78 ^B ±0,19	4,18 ^a ±0,19
III (КЕ)	3,78 ^b ±0,18	4,27 ^{B,D} ±0,20	4,28 ^{A,B,C} ±0,21	4,22 ^b ±0,19

Легенда: Иста слова ^{A,B,C,D} – $p < 0,01$; ^{a,b} – $p < 0,05$.

Након петнаест дана складиштења (табела 5.18), најмање оцјене за изглед (3,17±0,17), имала је трећа испитивана група и била је статистички значајно мања $p < 0,01$ у односу на другу (3,23±0,22), прву (3,23±0,17), односно контролну групу (3,75±0,23). Контролна испитивана група добила је најмање оцјене (2,42±0,42) за мирис и статистички су значајно мање ($p < 0,01$) од прве (3,70±0,24), друге (3,72±0,23) и треће (3,45±0,42) испитиване групе.

Табела 5.18 Сензорна оцјена изгледа рибе 15-тог дана испитивања

Узорак	Изглед	Мирис	Текстура	Укупна прихватљивост
К	3,75 ^{A,B,C} ±0,23	2,42 ^{A,B,C} ±0,42	2,83 ^{A,B,C} ±0,21	2,58 ^{A,B,C} ±0,38
I (КК)	3,23 ^B ±0,17	3,70 ^B ±0,24	3,32 ^B ±0,17	3,58 ^B ±0,38
II (Е)	3,23 ^A ±0,22	3,72 ^A ±0,23	3,30 ^A ±0,20	3,37 ^A ±0,34
III (КЕ)	3,17 ^C ±0,17	3,45 ^C ±0,42	3,28 ^C ±0,21	3,72 ^C ±0,21

Легенда: Иста слова ^{A,B,C} – $p < 0,01$.

Најслабије оцјењену текстуру имала је контролна група (2,83±0,21) и статистички значајно мање ($p < 0,01$) од прве (3,32±0,17), друге (3,30±0,20) и треће испитиване групе (3,28±0,21). Сходно предходним резултатима укупна прихватљивост производа за контролну групу била је (2,58±0,38) и статистички се значајно разликовала ($p < 0,01$) од оцјена за укупну прихватљивост прве (3,58±0,38), друге (3,37±0,34) и треће испитиване групе. (3,72±0,21).

Након двадесет дана складиштења највећу оцјену за изглед (3,78±0,17) имала је друга испитивана група и била је статистички значајно већа на нивоу $p < 0,01$ и $p < 0,05$, у односу на трећу (2,73±0,22) и прву испитивану групу (2,32±0,19), односно $p < 0,01$ за контролну испитивану групу (2,45±0,38). Контролна испитивана група добила је најмање оцјене 1,63±0,21 за мирис и статистички су

значајно мање ($p < 0,01$) од прве ($3,83 \pm 0,19$), друге ($3,25 \pm 0,20$) и треће ($2,77 \pm 0,21$) испитиване групе. Просјечне оцјене за текстуру испитиваних група кретале су се у интервалу од $2,23 \pm 0,22$ контролне групе до $2,67 \pm 0,19$ треће испитиване групе без статистички значајних разлика између просјечних оцјена испитиваних група. Најмање оцјене за укупну прихватљивост ($1,70 \pm 0,21$) имала је контролна испитивана група и статистички значајно ниже на ниво од ($p < 0,01$) од прве ($2,25 \pm 0,23$), друге ($2,75 \pm 0,19$) и треће испитиване групе ($2,27 \pm 0,21$). (табела 5.19)

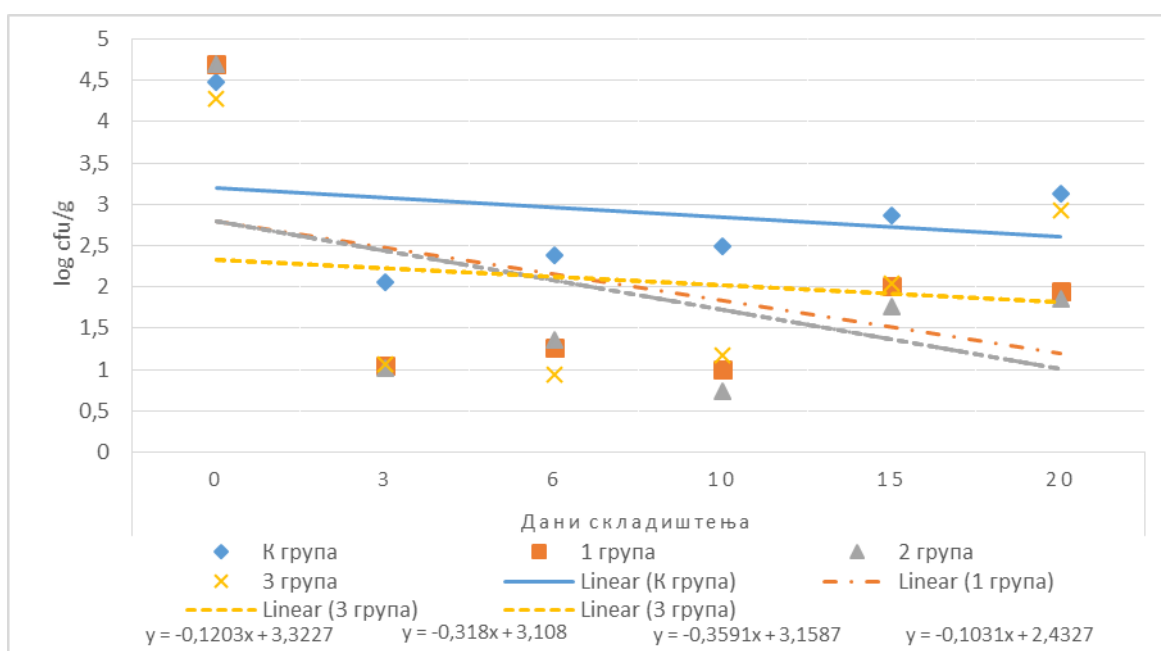
Табела 5.19 Сензорна оцјена изгледа рибе 20-тог дана испитивања

Узорак	Изглед	Мирис	Текстура	Укупна прихватљивост
	$\bar{X} \pm SD$			
К	$2,45^{A} \pm 0,38$	$1,63^{A,B,C} \pm 0,21$	$2,23 \pm 0,22$	$1,70^{A,B,C} \pm 0,21$
I (КК)	$2,32^{B,a} \pm 0,19$	$3,83^{B,D,F} \pm 0,19$	$2,37 \pm 0,38$	$2,25^{B,D} \pm 0,23$
II (Е)	$3,78^{A,B,C} \pm 0,17$	$3,25^{A,D,E} \pm 0,20$	$2,50 \pm 0,45$	$2,75^{A,D,E} \pm 0,19$
III (КЕ)	$2,73^{C,a} \pm 0,22$	$2,77^{C,E,F} \pm 0,21$	$2,67 \pm 0,19$	$2,27^{C,E} \pm 0,21$

Легенда Иста слова ^{A,B,C,D,E,F} – $p < 0,01$; ^a – $p < 0,05$.

6. ДИСКУСИЈА

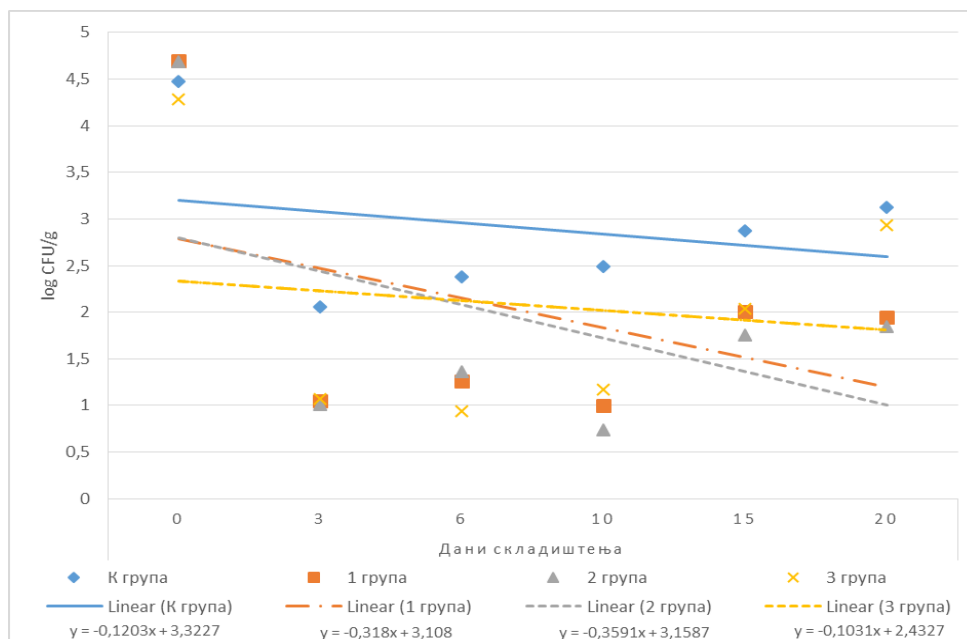
Многе природне компоненте биљака, као што су њихови екстракти показују антимикробне способности према *L.monocytogenes*. Тимол и карвакрол изоловани из екстракта оригана врло су ефикасни у инхибицији раста *L.monocytogenes*. Чисте концентрације тимола и карвактола од 150 до 200 ppm инхибишу раст *L.monocytogenes*. У нашим истраживањима установили смо да је број *L.monocytogenes* огледних група био статистички значајно мањи у односу на број контролне групе. У току двадесетодневног складиштења највећи број *L.monocytogenes* био је нултог дана складиштења, да би број опадао до десетог дана, а затим почео благо да расте. Позитивна вриједност коефицијента у једначини регресије указује на тенденцију пада броја *L.monocytogenes* (графикон 6.1.). О инхибиторном дјеловању чистог уља оригана писали су Lin и сар.(2004). Утврдили су да је комбинација уља оригана и бруснице у омјеру 75:25 уз додаток млијечне киселине у потпуности инхибира раст *L.monocytogenes*.



Графикон 6.1. Промјене броја *L.monocytogenes* у испитиваним групама узорака током складиштења (log CFU/g)

Супресију раста *L.monocytogenes* забиљежили су и Restituto и сар.(2014) додавањем уља тимола. У свом истраживању складиштили су узорке димљене рибе 35 дана на 5°C и забиљежили инхибицију раста са 10^8 CFU/g на 10^2 CFU/g. Инхибицију раста *L.monocytogenes* забиљежили су и Menon и Gearg (2001) додавањем уља каранфилића месу и сиру. Додавањем 0,5% и 1% уља каранфилића у којем је еугенол носилац антимикуробних својстава смањили су број *L.monocytogenes* у мљевеном месу, што потврђује антилистеријско дјеловање еугенола, које смо и ми утврдили у нашем испитивању. Антилистеријско дјеловање уља оригана потврдили су Ravishankar и сар. (2009) који су у свом експерименту у пилеће месо додали 0,5 % концентрацију уља оригана. И након складиштења на 4°C, 72 часа утврдили су да се број *L.monocytogenes* редукује. Резултати нашег испитивања у потпуности су у сагласности са њиховим резултатима, јер у нашем експерименту смо утврдили смањење броја *L.monocytogenes* током истог периода складиштења. Tsigarida и сар. (2000) у свом истраживању комбинацијом уља оригана у концентрацији 0-0,8% смањило је број *L.monocytogenes* и пратеће микрофлоре (лактобацили, аеробних мезофилних бактерија) за 2-3 logCFU/g, што би у потпуности одговарало нашим резултатима испитивања гдје смо од почетних $4,48 \pm 0,31$ logCFU/g, десетог дана складиштења добили $0,74 \pm 0,44$ logCFU/g у другој испитиваној групи, односно $1,00 \pm 0,22$ log CFU/g у првој испитиваној групи и $1,17 \pm 0,36$ log CFU/g треће испитиване групе. О инхибиторном дјеловању еугенола на раст *L.monocytogenes* писали су и Нао и сар.(1998). Као и у нашим испитивањима, гдје смо забиљежили утицај еугенола на раст *L.monocytogenes*, они су утврдили да еугенол утиче на раст *L.monocytogenes* у куваном говеђем месу, складиштенем на 15°C. Desai и сар. (2012) су утврдили да концентрација карвакрола од 0,5% већ након 30-минутне изложености у потпуности уништава бактерије *L.monocytogenes* у бујонској култури. Међутим, наведена концентрација карвакрола, у првих 30 минута складиштења није утицала на раст *L.monocytogenes* у филетима сома. Ови резултати у потпуности су сагласни са нашим испитивањима, јер нисмо утврдили редукацију броја *L.monocytogenes* нултог дана испитивања ни у једној испитиваној групи.

У нашим истраживањима укупан број аеробних мезофилних бактерија био је у интервалу од $1,88 \pm 0,45 \log \text{CFU/g}$ до $5,77 \log \text{CFU/g}$. Укупан број аеробних мезофилних бактерија контролне групе након трећег дана складиштења у константном је порасту, док у огледним групама пораст укупног броја аеробних мезофилних бактерија забиљежен након шестог дана складиштења. Позитивна вриједност коефицијента у једначини регресије указује на тенденцију сталног пораста укупног броја аеробних мезофилних бактерија (графикон 6.2.) Иницијални укупан број аеробних мезофилних бактерија у нашем истраживању у сагласности је са Durmuş M., и сар. 2014. Ниску иницијалну контаминацију ($2,22 \log \text{CFU/g}$) у својим испитивањима утврдили су Özogul и Özogul (2004). Као максимална вриједност укупног броја аеробних мезофилних бактерија за прихватљивост свјеже рибе препоручује се $7 \log \text{CFU/g}$. У нашим испитивањима укупан број аеробних мезофилних бактерија контролне групе био двадесетог дана складиштења и износио је $5,77 \log \text{CFU/g}$. Двадесетог дана складиштења најмањи број аеробних мезофилних бактерија забиљежен је у првој (узорци третирани карвакролом) групи ($3,38 \log \text{CFU/g}$). Статистички значајан утицај етеричних уља на бактеријски раст у рибљим филетима забиљежио је и Mahsa и сар.(2014). Они су у свом истраживању утврдили статистички значајан утицај етеричног уља *Mentha longifolia* на *Lactococcus garliviae* у филетима пастмке. Сигнификантне промјене микробиолошког статуса мљевеног меса након додавања уља оригана забиљежили су Skandamis и Nychas (2001).



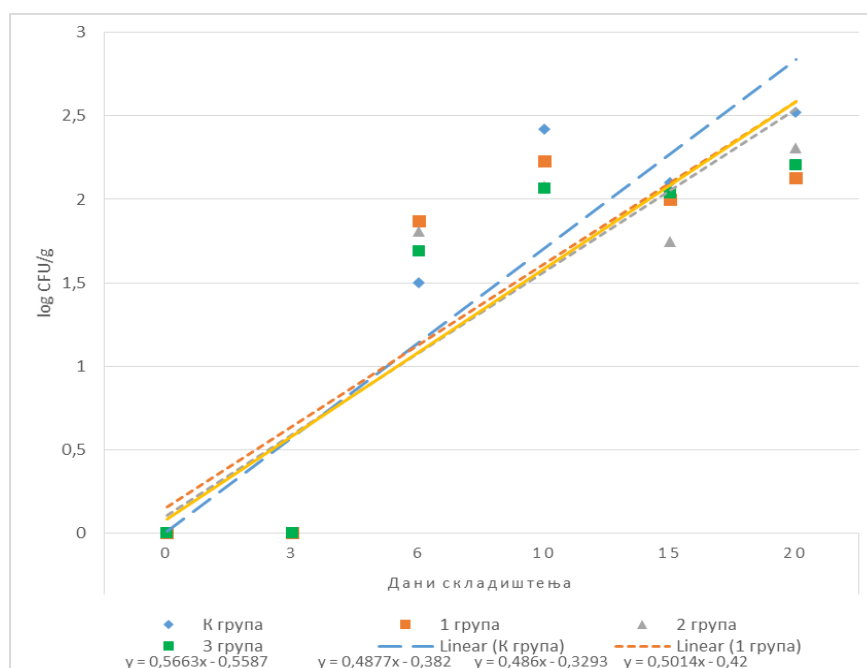
Графикон 6.2. Промјене укупног броја аеробних мезофилних бактерија (logCFU/g)

Слично нашим испитивањима и ови аутори су утврдили да је пад броја микроорганизама током складиштења био у корелацији са концентрацијом додатог уља. Да уље оригана има један од најбољих антимикуробних својстава показало је и истраживање Elgaууар и сар.(2001). Испитивањем су утврдили да уље оригана има јако антимикуробно дјеловање на грам негативне патогене, као и на *L.monocytogenes*, што би било у сагласности са нашим добијеним резултатима. Статистички значајне разлике укупног броја аеробних мезофилних бактерија током складиштења пилећег меса третираног са *Salvia officinalis* утврдили су Petrova и сар.(2013).

Резултати које је у свом експерименту добио Ozlem (2011) у сагласности су са нашим резултатима испитивања. Наведени аутор је комбинацијом соли и уља тимијана у концентрацији 0,5%, двадесет првог дана складиштења на 4°C продужио је микробиолошки рок употребе пастрмке на 21 дан.

Приликом паковања рибе у вакуум ствара се микроаерофилна средина, а дјелимично се накопља угљен диоксид чиме се инхибира раст аеробних грам – негативних бактерија и тако постиже боља одрживост меса. Стварањем микроаерофилних услова долази и до промјене бактериолошке микрофлоре. Уз

доминантне аеробне мезофилне бактерије појављују се и бактерије млијечне киселине. У нашим испитивањима прве колоније бактерија млијечне киселине изоловане су шестог дана складиштења. Током складиштења њихов број је варирао у свим испитиваним групама. Забиљежен је раст до десетог дана складиштења, затим пад броја петнаестог дана складиштења и поново раст броја бактерија млијечне киселине двадесетог дана складиштења. (графикон 6.3.).



Графикон 6.3. Промјене укупног броја бактерија млијечне киселине у испитиваним групама током складиштења (log CFU/g)

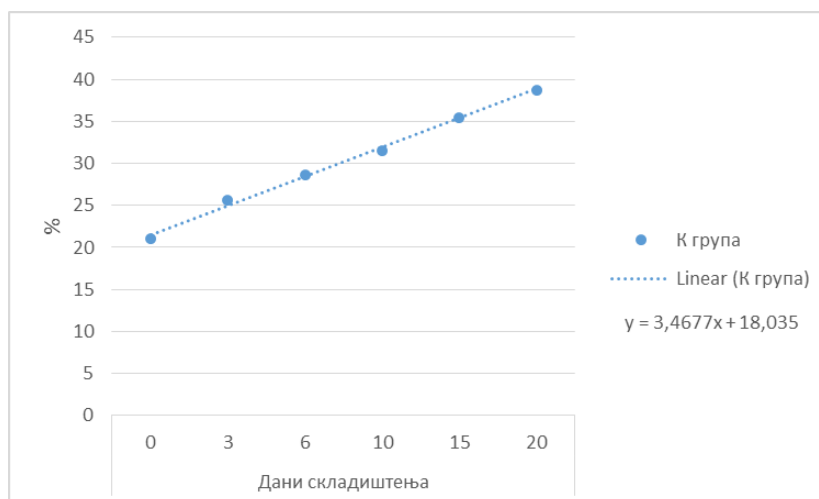
С обзиром да су ове варијације у броју бактерија млијечне киселине забиљене у свим испитиваним групама и без статистички значајне разлике међу њима, можемо закључити да у нашем испитивању компоненте етеричних уља карвакрол и еуџенол нису утицале на раст ове групе бактерија. У огледним групама број бактерија млијечне киселине био је нешто нижи у односу на контролну групу. О инхибицији етарских уља на раст бактерија млијечне киселине писали су Ногођова и сар. (2006). Они су у свом раду утврдили да уље оригана и тимијана имају јако инхибиторно дјеловање на бактерије млијечне киселине изоловане из

пилећег меса. До сличних резултата, у свом испитивању дошли су Ouwehand и сар.(2010). Такође, инхибицију раста бактерија млијечне киселине од стране етеричних уља примјетили су и Moritz и сар.(2012). О инхибицији раста бактерија млијечне киселине од стране карвакрола (0,2%) и еугенола (0,25%) пише и Gann (2013). У свом истраживању утврдио је да карвакрол и еугенол у датим концентрацијама за шест сати редукују раст бактерија млијечне киселине за 2-3 logCFU/g. Међутим, постоје и аутори који су у свом раду забиљежили резистенцију бактерија млијечне киселине на одабрана етарска уља и њихових компоненти (Hammer и сар.1999).

Због варирања резултата међу различитим испитивањима, где се понекад и не може успоставити корелација између броја одређених група микроорганизама и настанка квара самог производа, рјешење у успостављању индикатора квалитета тражи се у хемијским и физичко-хемијским показатељима одрживости.

Садржај укупно испарљивог азота прати се као хемијски индикатор квалитета рибе. Укупно испарљиви азот представља комбинацију амонијака, триметиламина, диметиламина, и других амина. У нашим испитивањима просјечна вриједност садржаја укупно испарљивог азота нултог дана складиштења (21,00 mg N/kg) у узорцима пастрмке била нешто виша од вриједности наведених у литератури. Бабић и сар. (2014) добили су вриједности од 9,10 mg N/100g, док Arasihar и сар.(2004) у својим истраживањима наводе 12 mgN/100g, као иницијалну вриједност за садржај укупно испарљивог азота. Килибарда (2010) у свом раду наводи вриједности $3,02 \pm 0,06$ mg N/100 g. Разлике у вриједностима за садржај укупно испарљивог азота, могу бити посљедица различитих вриједности непротеинског азота меса рибе, које зависе од начина исхране, времена излова, величине рибе као и микробиолошког статуса рибе. У току складиштења вриједност укупно испарљивог азота повећавала се, да би двадесетог дана складиштења износила 38,76 mg N/kg. Позитивна вриједност коефицијента у једначини регресије указује на тенденцију сталног пораста садржаја укупног испарљивог азота.

Повећавање садржаја укупног испарљивог азота током складиштења забиљежено је и у другим истраживањима. (Бабић и сар.,2014;Килибарда, 2010, Arasihar и сар., 2004)

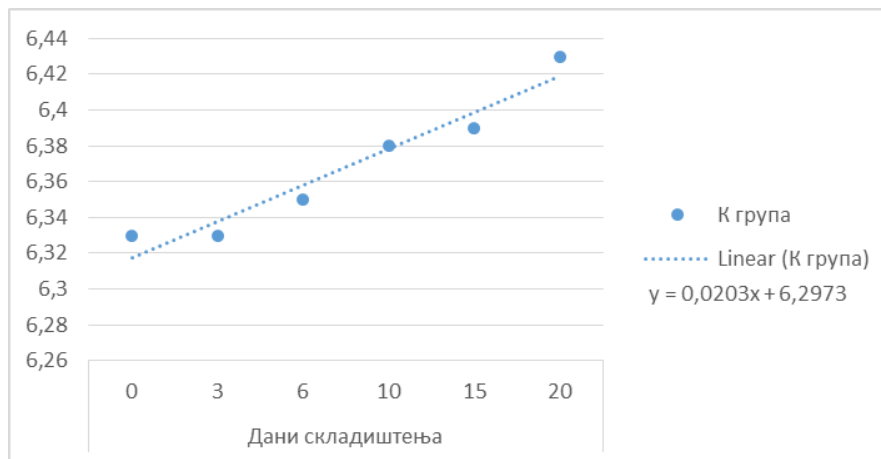


Графикон 6.4. Промјене садржаја укупно испарљивог азота током складиштења

Регулативом из 2005. године (Анон 2005) за поједине врсте рибе установљене су максимално дозвољене вриједности укупног испарљивог азота за свјежу рибу која се ставља у промет, максимално дозвољене вриједности у зависности од врсте рибе крећу се у интервалу од 25mg/100g-35mg/100g. Scherer и сар.(2006) сматрају да је садржај укупног испарљивог азота као индикатора квара много погоднији за процјену квара свјеже морске рибе. (графикон 6.4.)

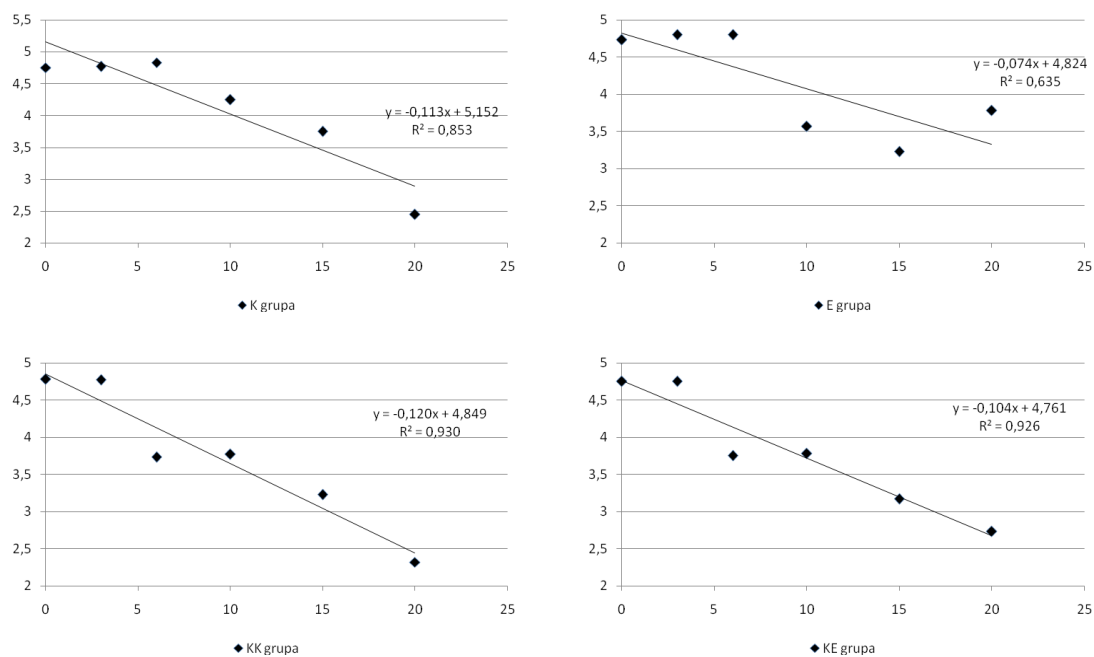
У нашим истраживањима, првог дана складиштења рН вриједност износила је 6,33 и у складу је са вриједностима које су добили други истраживачи (Бабић и сар. 2014, Scherer и сар. 2006). Међутим, у нашим истраживањима рН вриједност током складиштења се повећавала, али није се статистички значајно разликовала, док Бабић и сар. (2014) наводе статистички значајну разлику рН вриједности током складиштења свјеже вакуум паковане пастрмке. Сличне њиховим резултатима испитивања рН вриједности, добили су Stamatis и Arkoudelos (2007). Постмортална вриједност рН мишићног ткива рибе варира између 6,0 и 7,1 у зависности од годишњег доба, врсте рибе, микробиолошке активности и других фактора. Услед накупљања млијечне киселине настале у фази гликолизе под анаеробним условима, постмортална рН вриједност рибе опада, а степен њеног смањења утиче на квалитет меса рибе. Позитивна вриједност коефицијента у једначини регресије указује на тенденцију сталног пораста вриједности. Пораст рН вриједности може се између осталог приписати и метаболичкој активности

бактерија, чији су производи разградње, који се нагомилавају, базна једињења (амонијак, триметиламин, диметиламин) (Stohr и сар.2001). (графикон 6.5.)



Графикон 6.5. Промјене рН вриједности током складиштења

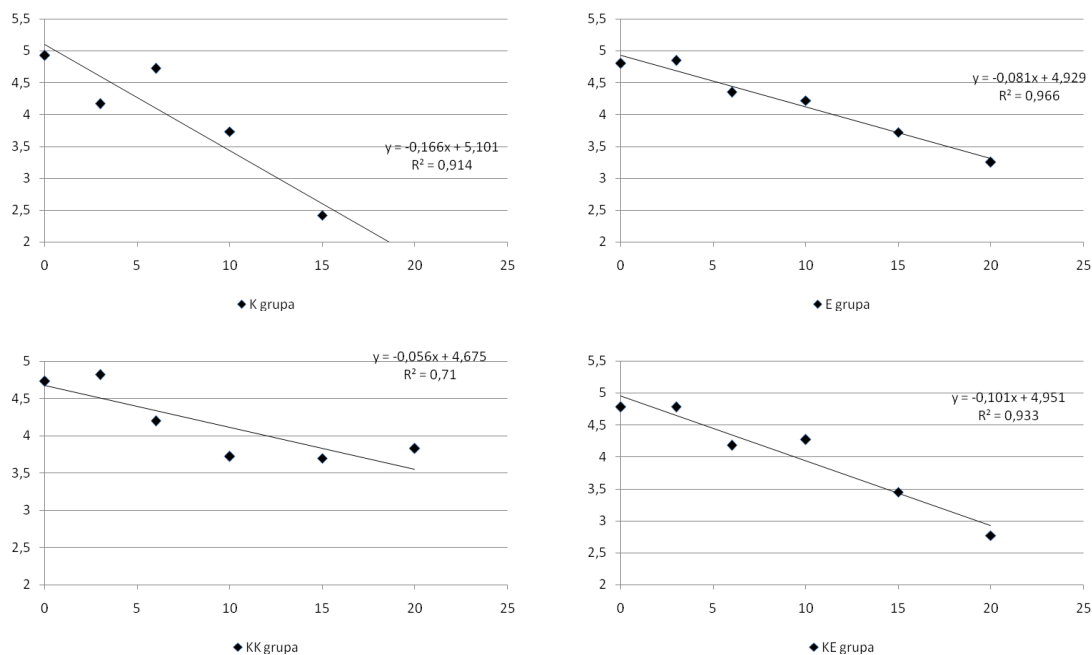
У нашим испитивањима сензорном оцијењивању биле су обухваћене промјене изгледа, мириса, текстуре и оцјена укупне прихватљивости. Нултог и трећег дана складиштења нису забиљежене статистички значајне разлике у оцјенама одабраних сензорних карактеристика. Већ од шестог дана складиштења примјећене су статистички значајне разлике у оцјенама одабраних сензорних карактеристика као и укупне прихватљивости производа. У графикону 6.6. приказан је тренд промјене сензорне оцјене изгледа рибе током испитивања. Из графикона 6.6. види се да су се током складиштења и смањивале просјечне оцјене изгледа рибе. Највише оцјене за изглед шрстог дана складиштења имала је друга испитивана група.



Графикон б.б. Тренд промјене сензорне оцјене изгледа рибе током испитивања

Skandamis и сар.(2001) писали су о промјени изгледа меса третираног са уљем оригана и утврдили су да месо након дванаестог дана складиштења по питању оцјене изгледа на самој граници прихватљивости. Њихова испитивања у складу су са нашим резултатима, гдје смо петнаестог дана складиштења забиљежили просјечне сензорне оцјене за изглед рибе које су на граници прихватљивости.

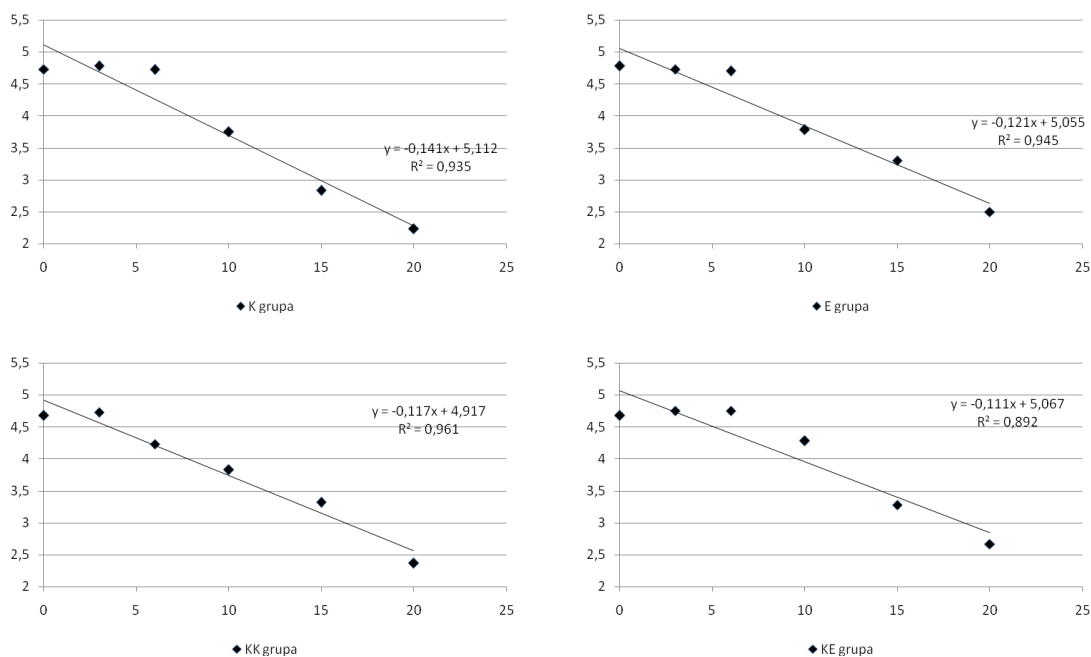
У графикону 6.7. приказан је тренд промјене оцјене мириса рибе током испитивања..



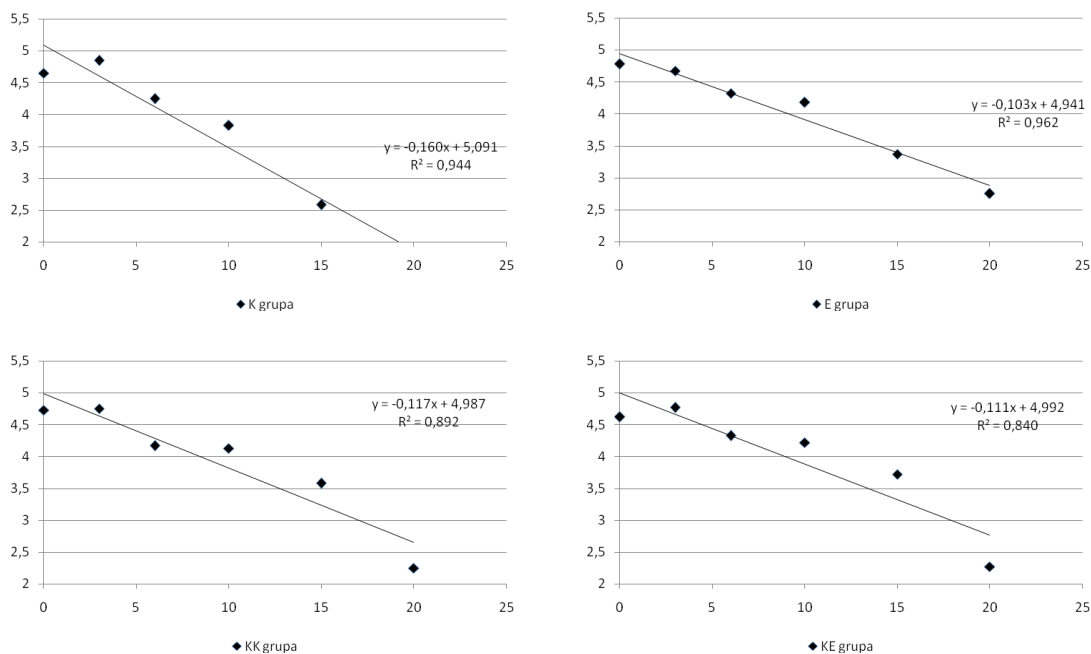
Графикон 6.7. Тренд промјене сензорне оцјене мириса рибе током испитивања

Као и код других аутора (Skandamis и сар.,2001;Stamatis и сар.,2007) у нашим испитивањима промјене мириса забиљежене су десетог дана складиштења. С тим што су наши резултати показали да су другој и трећој испитиваној групи те промјене значајно мање него у контролној и првој испитиваној групи. Што би било у сагласности са испитивањима наведених аутора, који су утврдили да већ дванаестог дана складиштења сензорна оцјена мириса није прихватљива.

У графиконима 6.8.и 6.9. приказан је тренд промјене сензорне оцјене текстуре, односно укупне прихватљивости рибе током испитивања.



Графикон 6.8. Тренд промјене сензорне оцјене текстуре рибе током испитивања



Графикон 6.9. Тренд промјене укупне прихватљивости сензорне оцјене рибе током испитивања

У нашим испитивањима утврдили смо да је вакуум пакована пастрмка третирана компонентама етеричних уља десетог дана складиштења добила високе оцјене за сензорну прихватљивост. Посебно се истиче просјечна оцјена укупне прихватљивости треће испитиване групе $4,22 \pm 0,19$. У односу на контролну групу средње оцјене укупне прихватљивости испитиваних група и петнаести дан складиштења прихватљиве су са аспекта оцјењиваних сензорних карактеристика. Добијени резултати у сагласности су са резултатима које су добили Kenar и сар., (2010). Они су у својим испитивањима утврдили да након тринаестог дана складиштења контролна група сардина није сензорно прихватљива у односу на испитиване групе третиране етерским уљима које су након двадесетог дана складиштења биле сензорно неприхватљиве. Mahmud и сар., (2004) третирани су 1% карвакролом и 1% тимолом и складиштили на 5°C филете шарана утврдили су одрживост од осам дана, што није у сагласности са нашим резултатима испитивања. У свом раду Frangos и сар., (2010) третирани су 0,2 % уљем оригана филете пастрмке и продужили су рок употребе на дванаест дана, седам дана дуже од контролне групе, што би одговарало нашим резултатима испитивања.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведених испитивања и добијених резултата, донети су следећи закључци:

1. Испитиване компоненте етарских уља – карвакрол и еугенол испољиле су инхибиторно дјеловање на раст *Listeria monocytogenes* у вакуум пакованој калифорнијској пастрмци. Број бактерија *L. monocytogenes* био је свих дана испитивања статистички значајно мањи у узорцима којима су додата етарска уља. Најјаче инхибиторно дјеловање на раст *Listeria monocytogenes* у вакуум пакованој калифорнијској пастрмци имао је додати еугенол.
2. Просечан укупан број аеробних мезофилних бактерија у свим испитиваним групама без статистички значајних разлика опадао је до шестог дана складиштења. До краја складиштења је растао, али статистички значајно мање у испитиваним групама са етарским уљима, него у контролној групи. На крају складиштења највеће инхибиторно дејство на раст аеробних мезофилних бактерија је установљено у групи узорака третираној карвакролом.
3. Карвакрол, еугенол као ни њихова комбинација, нису статистички значајно утицали на раст бактерија млечне киселине.
4. Просечан садржај укупног испарљивог азота у контролној групи узорака вакуум паковане калифорнијске пастрмке растао је током складиштења и петнаестог дана дана био изнад законски прописане вредности за рибу.
5. У испитиваним групама узорака вакуум паковане калифорнијске пастрмке рН вредност се није статистички значајно мењала током складиштења.

6. Хемијски састав узорака вакуум паковане калифорнијске пастрмке био је карактеристичан за испитивани производ и током складиштења се није мењао.
7. Од десетог дана складиштења просечне оцене сензорних особина, односно укупне прихватљивости биле су статистички значајно веће код испитиваних група узорака са додатим етарским уљима, у односу на контролну групу. Петнаестог дана складиштења просечне оцене сензорних особина, односно укупне прихватљивости контролне групе биле су испод прихватљиве вредности. Двадесетог дана складиштења група узорака са еугенолом је још увек имала просечне оцене сензорних особина веће од граница прихватљивости.
8. Најбољи ефекат на безбједност и одрживост вакуум пакованих свјежих одрезака калифорнијске пастрмке се постиже додавањем еугенола у саламуру.

8. СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ

1. Anon (2005); Officinal Journal of the European Union COMMISSION REGULATION (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005
2. Andevvari, G.T. and Rezaei,M., (2011): Effect of gelatin coating incorporated with cinnamon oil on the quality of fresh rainbow trout in cold storage Int., J.Food Sci.,Technol.46,2305-2311
3. Apostolidis E.,Y-I Know, K. Shetty (2008): Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in brith and cooked ground beef systems and likely mode of action trough proline metabolism, international journal of Food microbiology,128,317-324
4. Arasiha, O.Hisar, M.Kaya,T.Yanik (2004); effect of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trouth (*Oncorhynchus mykiss*) fillets Int.J.Food microbiolo.97,209-214
5. Aureli,P., Costentini,A. and Zolea,S., (1992); Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes* J. Food Protect., 55, 344-348
6. Avary,S.M.,Hudson,J.A.&Penney,N.(1994): Inhibition of *Listeriamonocytogenes* on normal ultimate pH beef at abusive storage temperature by saturated carbon dioxide controlled atmosphere packaging; Jotrnal of Food Protection,57,331-333,336
7. Awaisheh, S. S., (2013): Efficacy of Fir and Qysoom essential oils, alone and in combination, in controlling *Listeria monocytogenes* in vitro and in RTE Meat products model. Food Contro, 34, 657-661.
8. Бабић Јелена, Мирјана Димитријевић, Милијашевић М.,Ђорђевић Весна, Петронијевић Р., С.Грбић, Аурелија Спирић (2014): Утицај паковања у модификованој атмосфери и вакууму на одабране хемијске параметре свјежине калифорнијске пастрмке (*Oncorhynchus mykiss*) и одрезака шарана (*Cyprinus carpio*), Хемијска индустрија 68, 69-79.
9. Вајрај, V. K., Баек, K. H., Kang, S. C., (2012): Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. Food Research International, 45, 722-734.

10. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., (2008): Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46,446-475
11. Балтић, Ж.М., Килибарда,Н., Димитријевић,М. (2009): Чиниоци од значаја за одрживост рибе и одабраних производа од рибе у промету; технологија меса, 50,(1-2):166-176
12. BAS EN ISO 11290-2:2005 (ISO 11290-2:1998). Метода за детекцију и бројање *Listeria monocytogenes* – Дио2: Метода нумерације
13. BAS EN ISO 4833: 2008 Микробиологија хране и хране за животиње - Хоризонтална метода за одређивање броја микроорганизама - Техника бројања колонија на 30° C
14. BAS ISO 1442/1998 Одређивање садржаја влаге
15. BAS ISO 1443/1992 Одређивање укупне масти
16. BAS ISO 936/1999 Одређивање садржаја укупног пепела
17. Bauer,К., Garbe,. D., (1985): *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses*, Wiley – VCH Weinheim, p.21
18. Bauer,К., Garbe,D., Surbug,Н.,(2001): *Common Fragrance and flavor materials: preparation, Propertiese and uses*. Woley-VCH Weinheim, p.123
19. Benchaar,C.,;Hristov ,A.N.; Greathead,Н., (2009): Essential oils as feed additives in ruminnat nutrition in *Phytogenics in Animal Nutrition*; Steiner,T.,Ed.; Nuttingham University Press: Notingham ,UK., 111-146
20. Bošković M., Baltić Ž. M., Ivanović J., Đurić J., Lončina J., Dokmanović M., Marković R., (2013). Use of essential oils in order to prevent foodborne illnesses caused by pahogens in meat, *Tehnologija mesa*, 54, 1-2, 14-20.
21. Bozin B., Mimica-Dukic,N.,Samojilik, I., Jovin, E.,(2007): Antimicrobial and antioxidant propeties of rosemary and sage (*Rosemarinus officinalis L.*, and *Salvia officinalis L.*, *Lamiaceae essential oils* *J.Agric. Food chem.*,55 7879-7885)
22. Burt Sara, (2004): Essential oils: their antibacterial propeties and potential applications in foods:*International Journal of Food Microbiology* 223-253
23. Boyle W., (1955): Spices and essential oils as preservatives. *The American perfumer and essential Oil Review* 66,25-28

24. Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O., Frangeul L., Cossart P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*, Trends Microbiol 10: 238-245
25. Carson , C.F., Riley, T.V.,(1995):Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* .Microbios 82,181-185
26. Celiktas Y., E Bedir, F. Vardan Sukan (2007): in vitro antioxidant activitis of Rosemarinus officinalis extract treated with supercriticak carbon dioxide. Food Chem., 101, 1457-1464
27. Coban Ozlem Emir. (2012): Protective effect of essentil oils on the shelf life of smoked and vacuum packed rainbow trout fillets J.Food Scientists & Technologists,
28. Commission regulation (EC) 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004.
29. Colburn, K.G., Kaysner, C.A., Abeyta, C., Wekeel, M. (1990). *Listeria* species in a California Coast Estuarine Environment. Applied and Environmental Microbiology 56 (7): 2007-2011.
30. Cooner,D., E., Beuchat, L.R., 1984: Effects of essential oils from plants on grow of food spoilage yeasts. Journal of Food Science 49, 429-434.
31. Corbo,M.R. Speranza ,B.,Filippone,A.,Granatiero,S., Conte A., Sinigaglia,M.,and Del Nobile M.A. (2008): Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger Int.J. Food microbiol.,127,261-267
32. Conte M.P., Longhi C., Polidoro M., Petrone G., Seganti L., Valenti P. (2000). Modulation of actA gene expression in *Listeria monocytogenes* by iron, J Med Microbiol 49: 681-683

33. Cossart P., Lecuit M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling, EMBO J 17: 3797-3806
34. Cowan, M.M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiolog. Rev. (12),564-582
35. Crosthwaite D., (1998): UK trade within the flavour and fragrance industry. International Federation of essential oils and aroma trades -21 st. International Conference on Essential Oils and Aromas IFEAT, london,pp 6-12
36. Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, Zondervan-van den Beuken E, Tobback P (2008) Active and intelligent food pack-aging: legal aspects and safety concerns. Trends Food Sci Tech 19:S103–S112
37. Dalgaard, P. (1995): The effect of anaerobic conditions and carbon dioxide. In: H.H. Huss editor, Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO Fisheries Tehnical Paper, No,348.FAO, rome Italy
38. Davies, A.R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G.J.E. and Kirby, R.M. (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish. Food Control 12, 67-71.
39. Deans SG., Svoboda KP, (1990): The antimicrobial properties of marjoram (*origanum majorane L.*) volatile oil. Flav. Fragan. J., 5,187-190
40. Desai Monil.A., Kamlesh A.Soni, Ramakrishna nannapaneni, M.Wes Schililing, and Juan L.Silva (2012); Reduction of *Listeria monocitogenes* in Raw Cat fish Fillets by essential oils and phenolic constituent carvacrol. Journal of food science, Vol.77.,Nr.9
41. Димитријевић Мирјана, Anderson RC, Карабасил Н. Павлићевић Наташа, Јовановић С. Недељковић-Траиловић Јелена, Теодоровић В., Марковић Маја, Дојчиновић С.(2011). Налаз и преживљавање *Listeria monocytogenes* у погонима за производњу хладно димљене пастрмке, Acta Veterinaria (Beograd) Vol.61, No. 4, 429-442,2011; UDK 619:637.56/81
42. Dorman, H.J.D., Deans, S.G., (2000): Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl., Microbiol., 88, 308-316
43. Dons L., Jin Y., Kristensson K., Rottenberg M.E. (2001). Neural route of cerebral *Listeria monocytogenes* murine infection: role of immune response mechanisms in controlling bacterial neuroinvasion, Infect Immun 69: 1093-110

44. Durmuş M A Polat, M ÖZ, Y Ozogul, I Ucak.,(2014) The effects of seasonal dynamics on sensory, chemical and microbiological quality parameters of vacuum-packed sardine (*Sardinella aurita*); Journal of Food & Nutrition Research 53 (4)
45. EFSA. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012, EFSA Journal 2014;12(2):3547.
46. Eilertz I., Danielsson-Tham M.-L., Hammarberg K.-E. (1993). Isolation of *Listeria monocytogenes* from goat chesse associated with a case of listeriosis in goat, Acta Vet Scand 34: 145-149
47. Elgayyar M., Draughon F.A., Golden A., mount J.R. (2001): Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, Journal of Food protection Vol.64, No 7
48. Embark B. P.K. (1994). Presence, detection and growth *Listeria monocytogenes* in sea foods : a review. Int.J. Food microbiology 23:17-34
49. Erkan N.,(2012): The effect of thyme and garlic oil on the preservation of vacuum-packaged hot smoked rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*), Food Bioprocess Technol.,5, 1246-1254
50. Erkan,N., Tosun,S.Y., Ulusoy,S., and Uretener,G. (2011): The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. J. Consum.Protec.Food Saf.,6, 39-48
51. Fischer K., Philips C.(2006): The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*; Journal applied of Microbiology, volume 106, Issue 4.
52. Fleming D W (1985): Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. :New England Journal .Medicine 3 12:404 407.
53. Franciosa G., Tartaro S., Wedell-Neergaard C., Aureli P. (2001). Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques, Appl Environ Microbiol 67: 1793-1799
54. Frangos, L., Pyrgotou N., Giatrakou,V., Ntzimani,A.,and Savvaidis,I.N.(2010); Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging, on the shelf – life of refrigerated trout fillets, Food microbiology 27,115-121

55. Frederiksen B., Samuelsson S. (1992). Foeto-maternal listeriosis in Denmark 1981-1988, *J Infect* 24: 277-287
56. Gann Duun Laurel (2013): Antimicrobial Activity of essential oils and Their components against lactic acid bacteria. Masters theses University of Tennessee, Knoxville
57. Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P. S., (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International journal of food microbiology*, 137, 175-180.
58. Goulas,A.,E., and Kontominas,M.G.,(2007): Combined effect of light salting,modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*), biochemical and sensory attributes . *Food Chem.*,100,287-296
59. Greathead,H.(2003): Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr.Soc.*62,279-290
60. Guenter, E.,1948: The essential oils. ; D.Van Nostrand, New York
61. Gutierrez,,J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., (2008): Antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients *Int.J.Food Microbiol.*,124, 91-97
62. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food Microbiology*, 26, 142-150.
63. Hellander,M.; Alakomi,H.; Latva-Kala,K.; Mattila –Sandholm,T.; Pol,I.;Smid, E.J.; Gorris,L.G.M.; Wright,A.V. (1998): Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria, *J.Agic.Food Chem.*,46,3590-3595
64. Hammer KA,Carson CF,Riley TV, (1999): In vitro susceptibilities of lactobacilli and organisms associated with bacterial vaginosis to melaleuca alternifolia (tea tree)oil; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43,196
65. Hamon, Y. & Peron, Y. (1962). Etude du pouvoir bacteriocinogkne dans le genre *Listeria*. I. Propriet generales de ces bacteriocines. *Annals de L'Institut Pasteur* 103, 876-889.

66. Hao, Y. Y.; Brackett, R. E. and Doyle, M. P. 1998: Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef J. Food Protect, 61, 307-312
67. Hayouni E. A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J. Y., Mohammed H., Hamdi M., 2008. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. International Journal of Food Microbiology, 125, 242-251.
68. Horosova K., Bujnakova D., Kmet V., 2006: Effect of Oregano Essential Oil on *Chichen Lactobacilli* and *E. coli*, Folia Mikrobiol. 51 (4) 278-280
69. Hussain, A. I.; Anwar, F.; Sherazi, S. T. H.; Przybylski, R. 2008; Chemical composition, an antioxidant and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations, Food Chem., 108, 986-995
70. Hyldgaard M., Tina Mygind, Meyer R. L. 2012: Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components, Front. Microbiology.
71. Ilsey, S., Miller H., Greathed, Kamel C. (2002): Herbal sow diets boost pre weaning growth Pig progress 18 8-10.
72. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1986). Sampling for microbial analysis: principles and specific applications. In: Microorganisms in Foods. Second editions. Blackwell Scientific Publications. p. 190.
73. Inoue S., Katagiri K., Terao M., Maruyama T. (2001). RAPD- and actA genotyping of *Listeria monocytogenes* isolates of human listeriosis, the intestinal contents of cows and beef, Microbiol Immunol 45: 127-133
74. ISO 15214:1998 (E)- Одређивање бактерија млечне киселине према методи
75. ISO 937/1992- Одређивање садржаја протеина.
76. Jack, R. W., Tagg J. R., Ray B., (1995): Bacteriocins of Gram – positive Bacteria. Microbial Rev., 59 171-200
77. Jensen A., Frederiksen W., Garner-Smidt P. (1994). Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990 Scand J Infect Dis 26: 171-178
78. Jemcev V., Đukić D. (2000): Mikrobiologija ; Vojnomedicinski zavod Beograd

79. Karabagias, I., Badeka, A., Kontominas, M. G., (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 88, 109-116.
80. Karunasagar I., Karunasagar In. (2000). *Listeria* in tropical fish and fishery products, *Int J Food Microbiol* 62: 177-181
81. Katayama T., Nagai I., Chemical significance of the volatile compounds of spices in the food preservative viewpoint –IV, Structure and antibacterial activity of terpens. *Bulletin Japanese Society Science Fisheries* 1960, 26,29-33
82. Kenar M., Ozogul F., Kuley Esmeray,2010: effects of rosemary and sage tea extract on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*sardina pilchardus*) fillets. *International journal of Food science & tehnology* 45,2366-2372
83. Khanjari, A., Karabagias, I. K., Kontominas, M. G., 2013. Combined effect of N, O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control
84. Килибарда Наташа 2010; Упоредно испитивање одабраних параметара квалитета у току складиштења хладно димљене пастрмке паковане у вакууму и модификованој атмосфери, Докторска дисертација, Факултете ветеринарске медицине Универзитета у Београду
85. Kim,J., Marshall,M.R., and Wei,C.I. 1995: Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens *J.Agric.,Food Chem.*43 2839-2845
86. Kuhn M., Goebel W. (1999). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, p.97-130. In Ryser E.T. and Marth E.H. (eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, New York
87. Kykkidou, S., Giatrakou,V., Papavergou, A., Kontominas M.G. and Savvaidis I.N. 2009: Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4⁰C. *Food Chem.*, 115, 169-175
88. Laciari A.L., O.N.P. de Centorbi (2002). *Listeria* species in seafood: isolation and characterization of *Listeria* spp. from seafood in San Luis, Argentina, *Food Microbiology* 19:645-651
89. Lambert,R.J.W.; Skandamis,P.N.; Coote,P.J.; Nychas ,G.J.E.2001; A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J.Appl.Microbiology*,91,453-462

90. Lammerding, A M, K A Glass, A Gendron-Fitzpatrick and M P Doyle (1992) Determination of virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice, Applied and Environmental Microbiology, 58, 3991-4000
91. Lelas Vesna, 2006: Nove tehnike procesiranja hrane., Mljekarstvo 56 (4) 331-336
92. Lu S.M., Chen ZL., Chen JX, 2008; A study on in vitro bacteriostatic action of eugenol Shi Pin Ke Xue, 29, 122-124
93. Lucera Annalisa, Cristina Costa, Amalia Counte and matteo A. Del Nobile 2012; Food applications of natural antimicrobial compounds; Frontiers in microbiology, volume 3,
94. Lund Barbara, Baird Parker Tony, Graham Gould (2000): The microbiological safety and quality of foods, Volume I, Aspen Publisher Maryland.
95. Lin Y.T., Labbe, R., G., Kalidas Shetty 2004: Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. Applied and environmental microbiology, vol. 70 no. 9 5672-5678
96. Linnan M.J.L., Mascola X.D., Lou V., Goulet, S., May C., Salminen, D., W., Hird M.L. yonkura P. Hayes, R. Weaver, Audurier, B.D., Plikaytis, S.K., Fannin A. Kleks and C.V. Broome (1988): Epidemic listeriosis associated with Mexican – style cheese, New England J. Med., 319: 823-828
97. Lv F., Liang H., Yuan Q., Li C., (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International, 44, 3057-3064
98. Manabe, A., Nakayama, S., Sakamoto, K., 1987: Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine – liposomes. Japanese Journal of pharmacology, 44, 77-84
99. Mahsa Ansari, Mehdi Soltani, Sayyed Ebrahim Hosseini, and Abolghasem Kamali, (2014): Study of antibacterial effect of *Mentha longifolia* essential oil on *Lactococcus garvieae* in rainbow trout fillet at 4°C, Research opinions in animal & veterinary sciences (4): 556-559
100. Mahmoud B., Yamazaki, K., Miyashita, K., Li Shik, S., Dong Suk, C., Suzuki, T., 2004; Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oils compounds, Food Microbiology, 21, 657-666

101. Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders J.M., Hilbert F. (2004). Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry, *Int J Food Microbiology* 97:23-29
102. McLauchin I. (1990): Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. *Epidemiol. Infect* 104, 181-189
103. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV (1999): Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5(5):607-25.
104. Mena C., Almeida G., Carneiro L., Teixeira P., Hogg T., Gibbs P.A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology* 21: 213-216
105. Menon, K.V. and Garg, S.R. 2001: Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiol.* 18, 647-650
106. Miguel, M.G., Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants 2010. A review., *Flavour Fragr. J.*, 25, 291-312
107. Moritz Feniman Mengue Cristiane, Vera Lucia Mores Rall, Saeki Juri Margarida, Junior Ari Fernandes, 2010: Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf – life period; *Brazilian J. Microbiol.* 43(3), 1147-1156
108. Muratore, G. and Licciardello, F. 2005. Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the shelf-life of liquid-smoked swordfish (*Xiphias gladius*) slices. *Journal of Food Science* 70: 359-363
109. Mytle N., Anderson GL., Doyle MP., Smith Ma., 2006: Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control* ,17, 102-107
110. Norton D.M., Scarlett J.M., Horton K., Sue D., Thimothe J., Boor K.J., Wiedmann D. (2001). Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry, *Appl Environ Microbiol* 67: 646-653
111. Norrung B. (2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches, *Int J Food Microbiol* 62:217-221

112. Newell D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh M., Langelaar M., Threlfall J., Scheutz F., van der Giessen J., Kruse, H., 2010. Food-borne diseases, The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge, *International Journal of Food Microbiology*, 139, 3-15.
113. Nyachuba, D. G., 2010. Foodborne illness: is it on the rise?. *Nutrition reviews*, 68, 5, 257-269.
114. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi S.H., and Hosseini, S.M.H. 2010: Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem.* 120, 193-198
115. Ortel S. (1989); Listeriocins (monocins). *Int. J. Food Microbiol* 8.; 249-250
116. Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.-P., Begin, A., 1997: Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37, 155-162
117. Ouattara, B., Sabato, S.F., Lacroix, M., 2001: Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus spp.*) *International Journal of Food Microbiology* 68, 1-9.
118. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., and Lacroix, M. 2007: Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, *J. Food Prot.* 69, 1046-1055
119. Ouwehand A.C., K., Tiihonen, H., Kettunen, S., Peuranen, H., Shulze, N., Rautonen 2010; *Veterinari Medicina*, 55, 71-78
120. Ozlem Pelin Can 2011; Combine effects of salting and thyme (*thymus vulgaris*) essential oil on shelf life of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored at 4°C: *Bull. Vet., Inst Pulawy* 55, 435-441
121. Petrova Jana, Pavelkova Adriana, Lukas Hleba, Jaroslav Pochop, Katarina Rovna Miroslava Kačaniova 2013: Antimicrobial Effect of *Salvia officinalis* L., against Selected Group of Bacteria Isolated from Chicken Meat; *Animal Science and Biotechnologies* 46, (2)
122. Pyrgotou, N., Gitrakou, V., Ntzimani, A., and Savvaidis I.N. 2010: Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. *J. Food Sci.*, 75 406-411

123. Ralovich B. (1984); Listeriosis rearsch-present situation and perspective. Budapest. Akademiai Kiado.
124. Rasmussen Ole F.,lt Pernille Skouboe,l Lone Dons,'S2 Lone Rossenl and John E. Olsen (1995); *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin 0 genes , Microbiology, 141,2053-2061
125. Ravishankar,S., Zhu,L.Olsen,C.W.,McHugh T.H.,Friedman 2009: edible apple film wraps containing plant antimicrobials inactivate foodborne pathogens on meat and poultry products ; Journal of Food Science 74 (8) M440-445
126. Restituto Tocmo, katja krizman, Wei Jie Khoo, Li Kai Phua, Minjeong kim, Hyun-Gyun Yuk 2014: *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed smoked fish products: occurrence, routes of contamination, and potential intervention measures. Comphreshive reviews in food science and food safety, vol.13 2014.
127. Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*. Phylogenetic position, taxonomy and identification. In: Ryser E.T. and E.H. Marth (eds.) *Listeria*, listeriosis and food safety, 2ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA, p. 1-20.
128. Rocourt J, Jacquet Ch, Reilly A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods, Int J Food Microbiology 62: 197-209
129. Rorvik L., Aase B., Alvestad T., Caugant D. (2000). Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafood and seafood-processing plants, Appl Environ Microbiol 66 (11): 4779-4789
130. Sakakibara,H.;Hona, Y.; Nagawaga,S.; Ashida H., Kanazawa,K.(2003): Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas.,J.Agric.,Food Chem.2003,
131. Scherer,R.,Augusti, R.P., Boschi,C.V., Steffens, C., Fries, L.L.M.,Daniel, A.P. Kubota,E.H., Beto, J.R., Emanuelli, T., (2006); Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods (2006), Food Chemistry, 99, 136-142
132. Schlech WF , Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, (1983): Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. N Engl J Med. Jan 27;308(4):203 6.

133. Schuchat A., Deaver K.A., Wenger J.D., Plikaytis B.D., Mascola L., Pinner R.W., Reingold A.L., Broome C.V. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. I Case control study of dietary risk factors. JAMA 267: 2041-2045, 571-581
134. Scortichini M., Mario Pia Rossi, 1991: In vitro susceptibility of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. to garronil and citronellol; Journal of Applied Bacteriology 71, 113-118.
135. Sharafi, S.M.; Rasooli, I., Owlia, P.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.D. (2010); protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. Pharmacogn. Mag., 2010, 6, 147-153
136. Skandamis P.N., G.- J.E. Nychas 2001; Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres; Journal of Applied Microbiology, 91, 1011-1022
137. Solorzano- Santos, F., Miranda Novales, M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents Curr. Opin. Biotechnol. (23), 136-141
138. Sokolović Z., Schuller S., Bohne J., Baur A., Rdest U., Nichterline T., Goebel W., (1996): Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4, Infect Immun 64, 4008-4019
139. Stamatis N., JS Arkoudelos 2007; Effect of modified atmosphere and vacuum packing on microbial, chemical and sensory quality indicators of fresh, filleted *Sardina pilchardus* at 3°C, 2007; Journal of Science of Food and Agriculture, 1164-1171.
140. Storh V., Joffraud, J., Cardinal, M., Leroi F. (2001); Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. Food Research International 34, 797-806
141. Smith J.L. (1999). Foodborne infections during pregnancy, J Food Prot 62: 818-829
142. Smith Palmer, A.; Stewart, J., and Fyfe, L., (2001): The potential application of plant essential oils as natural food preservation of soft cheese. Food Microbiol., 18, 463-470
143. Siverstvik, M., Jeksrud, W.K. and Rosnes, T. (2002): A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of

- microbiological growth, activity and safety. International Journal of Food Science and Tehnology, 37,107-127.
144. Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., (1994): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons with biological membranes. Journal of Biological Chemistry 269, (11), 8022-8028.
145. SRPS ISO 1841-1:1999-Одређивање садржаја соли
146. SRPS ISO 4121:2001. – Senzorske analize - Metodologija - Procenjivanje prehrambenih proizvoda pomoću metoda skala
147. SRPS ISO 6658: 2001. - Senzorske analize – Metodologija - Opšte uputstvo
148. SRPS EN ISO 8589:2012. - Senzorske analize - Opšte uputstvo za projektovanje prostorija za ispitivanja
149. SRPS EN ISO 8586-2:2012. - Senzorske analize – Opšte uputstvo za odabir, obuku i praćenje ocenjivača - Deo 2: Senzorski ocenjivači (eksperti)
150. SRPS ISO 2917/2004. - Meso i proizvodi od mesa - Merenje pH.
151. Southwick F.S., Purich D.L. (1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis, N Engl J Med 334: 770-776
152. Tagg J.R., and Wannmaker, L. W. (1976): Antimicrob. Agents., Chemoter., 10., 299-306
153. Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21, 1199-1218.
154. Teodorović. V. Karabasil N., Dimitrijević Mirjana, Vasilev D. (2015): Higijena i tehnologija mesa; Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
155. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Saraiva, J. A., Nunes, M. L., (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils, Industrial Crops and Products, 43, 587-595.
156. Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C., (1989): Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. Journal of Food Protection 52, (6), 399-403.
157. Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.J.E., (2000): Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum

- and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5⁰C. Journal of Applied Microbiology 89, 901
158. Ultee A., E.P.W. Albrede, M. Hoekstra, F.A. Smith E.J., (2000). Adaptation of the food borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol . Archives of Microbiology 174 (4) 233-238
159. Özogul Y., Özogul F: Effects of slaughtering methods on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice and MAP (2004); Eur. Food Res. Technol. 219, 211-216
160. Wendakdoon C., N, and Sakaguchi, M., (1993): Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract . J. Food Protect, 56, 410-413
161. Wendakdoon C., N, and Sakaguchi, M., (1995): Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices, Journal of Food Protection 58, 280-283.
162. Wiedmann, M., J. L. Bruce, C. Keating, A. E. Johnson, P. L. McDonough, and C. A. Batt (1997): Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infect. Immun. 65:2707-2716.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Слободан Дојчиновић рођен је 10.01.1981 године у Бања Луци. Основну и средњу школу завршио у Бања Луци. Дипломирао 2004 године на Ветеринарском факултету Универзитета у Сарајеву. Магистарску тезу под називом „Утицај замрзавања на одабране параметре квалитета хладно димљеног шарана“ одбранио 2009 године на Катедри за хигијену и технологију намирница Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, а на истом факултету. 2014 године одбранио специјалистички рад под називом „Испитивање хемијских параметара квалитета производа од меса на бањалучком тржишту“.

Од 2005 године запослен у Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, а на радном мјесту Руководилац Одјелења за микробиологију намирница и испитивање резидуа.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Слободан Дојчиновић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА КАРВАКРОЛА И ЕУГЕНОЛА НА РАСТ *LISTERIA*
MONOCYTOGENES У ВАКУУМ ПАКОВАНОЈ СВЕЖОЈ ПАСТРМЦИ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима 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.

Потпис докторанда

У Београду, 14.04.2016.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: СЛОБОДАН ДОЈЧИНОВИЋ

Број уписа: _____

Студијски програм: _____

Наслов рада: Испитивање утицаја карвакрола и еугенола на раст *Listeria monocytogenes* у вакуум пакованој свежој пастрмци

Ментор: др Мирјана Димитријевић, ванредни професор

Потписани Слободан Дојчиновић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 14.04.2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање утицаја карвакрола и еугенола на раст *Listeria monocytogenes* у вакуум пакованој свежој пастрмци
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду 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 – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 14.04.2016.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.