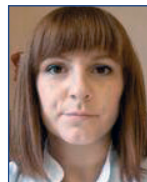


Utjecaj lokaliteta na sigurnost i kvalitetu slavonske kobasice



I. Perković, D. Kovačević, M. Zdravec, T. Lešić, J. Pleadin i M. Škrivanko*

Sažetak

Slavonska kobasica je trajna kobasica koje se u seoskim domaćinstvima u Slavoniji proizvodi tradicionalnom tehnologijom, pri kojoj se tijekom zrenja na ovitku proizvoda mogu razviti plijesni. Cilj je ovog rada bio identificirati površinske plijesni i utvrditi njihov utjecaj na kvalitetu i zdravstvenu sigurnost proizvoda, uključujući pojavnost mikotoksina okratoksina A (OTA) i aflatoksina B₁ (AFB₁) sa šest proizvodnih lokaliteta na području Slavonije. Pripremljeno je 18 uzoraka *slavonske kobasice* koje su analizirane

na kraju proizvodnog procesa u trajanju od tri mjeseca. Ukupno je identificirano 8 različitih vrsta plijesni, među kojima je dominirao rod *Penicillium* (88,89 %). Osim šest *Penicillium* vrsta, izolirana je po jedna vrsta iz rodova *Aspergillus* (8,33 %) i *Mucor* (2,78 %). Identificirani su i mogući izvori OTA i AFB₁, *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus flavus*, a određena je samo prisutnost OTA i to u koncentraciji od 5,10 µg/kg.

Ključne riječi: plijesni, mikotoksini, *slavonska kobasica*, PCR

Uvod

Proizvodnja i konzumacija tradicionalnih mesnih proizvoda je u sve većem porastu. Među tradicionalnim mesnim proizvodima u Republici Hrvatskoj, veliko značenje imaju trajne fermentirane kobasice kojima pripada i *slavonska kobasica*, a koja je i dobila oznaku zemljopisnog podrijetla te kao takva predstavlja značajnu prehrambenu prepoznatljivost Istočne Hrvatske. Budući da se njezina tradicionalna proizvodnja odvija u pri-

rodnim i nekontroliranim uvjetima i isključivo je sezonskog karaktera, stoga je u takvim uvjetima vrlo teško proizvesti proizvod ujednačene kvalitete. Na kvalitetu *slavonske kobasice* mogu utjecati različiti faktori, poput: sirovine, recepture (omjer kuhinjske soli, paprike, češnjaka, njihova kvaliteta); tehnološki parametri (temperatura, relativna vlažnost, strujanje zraka), a svakako treba istaknuti i mikroklokaciju proizvodnje, jer tehnološke

Dr. sc. Irena PERKOVIĆ, dipl. ing., stručna savjetnica, Hrvatski veterinarski institut – Veterinarski zavod Vinkovci, Hrvatska, dr. sc. Dragan KOVAČEVIĆ, dipl. ing., redoviti profesor, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Hrvatska, dr. sc. Manuela ZADRAVEC, dr. med. vet., viša znanstvena suradnica; Tina LEŠIĆ, mag. ing., viša stručna suradnica, doktorandica, dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing., znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, redovita profesorica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Mario ŠKRIVANKO*, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, docent, Hrvatski veterinarski institut – Veterinarski zavod Vinkovci, Hrvatska (dopisni autor, e-mail: skrivanko@veinst.hr)

bakterije koje su odgovorne za pozitivne procese fermentacije i zrenja *slavonske kobasice* uglavnom dolaze iz okoline. *Slavonska kobasica* se proizvodi od svinjskog mesa prve i druge kategorije uz dodatak soli, mljevene paprike i češnjaka, a nadjev se puni u tanko svinjsko crijevo (lat. *intestinum tenue*). Nakon punjenja, kobasice se podvrgavaju procesima dimljenja, fermentacije i zrenja (Kovačević i sur. 2009., Kovačević, 2014.a). Tehnološki parametri tipični za fermentaciju i zrenje u tradicionalnim komorama za zrenje pogoduju rastu plijesni na ovitku trajnih kobasica. Površinska plijesan tijekom zrenja ima pozitivnu tehnološku ulogu, osobito radi sprječavanja isušivanja ovitka proizvoda, ali s druge strane može prouzročiti neugodan miris i okus, te može i producirati mikotoksine. (Kovačević, 2014.a).

Mikotoksini pronađeni u trajnim fermentiranim kobasicama koje se proizvode tradicionalnom tehnologijom u seoskim domaćinstvima mogu biti podrijetlom iz kontaminirane stočne hrane (engl. „*carry over effect*“) ili ih tijekom višemjesečnog procesa zrenja proizvode pojedine vrste plijesni na ovitku, pri čemu vanjska oštećenja ovitka i/ili proizvoda dodatno intenziviraju njihovu difuziju u unutrašnjost proizvoda (Gareis i Wolff, 2000., Pleadin i sur., 2015.a). Provedena istraživanja pokazuju da među plijesnima koje spontano obrastaju ovitak trajnih fermentiranih kobasica tijekom procesa zrenja najčešće prevladavaju rodovi *Penicillium* i *Aspergillus* (Lopez-Diaz i sur., 2001., Mižáková i sur., 2002., Comi i sur., 2004., Tabuc i sur., 2004., Sørensen i sur., 2008., Asefa i sur., 2009., Iacumin i sur., 2009., Frece i sur., 2010., Sonjak i sur., 2011., Pleadin i sur., 2017., Zdravec i sur., 2020.), čije pojedine vrste mogu u određenim uvjetima producirati mikotoksine, okratoksin A (OTA) kao dominantni kontaminant fermentiranih kobasica i aflatoksin B₁ (AFB₁) s manjom učestalošću i u manjim koncentracijama u odnosu na OTA.

Utjecaj različitih čimbenika na pojavnost plijesni i mikotoksina za različite tradicionalne mesne proizvode nije potpuno istražen, ujedno ni za *slavonsku kobasicu*, a naročito po pitanju utjecaja lokaliteta na pojavnost plijesni i produkciju mikotoksina. Cilj je ovog rada bio odrediti vrste plijesni koje obrastaju ovitak *slavonske kobasice* tijekom procesa zrenja na šest različitih lokaliteta; odrediti dominantni rod i vrstu plijesni na ovoj vrsti kobasice, utvrditi utjecaj poraslih vrsta plijesni na njezinu sigurnost i kvalitetu; odrediti koncentraciju mikotoksina OTA i AFB₁ u uzorcima, ali i sirovinama, da bi se ispitala moguća kontaminacija proizvoda.

Materijal i metode

Proizvodnja *slavonske kobasice*

Uzorci *slavonske kobasice* proizvedeni su na šest različitih obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava (OPG) na području Slavonije prema tradicionalnoj recepturi i podvrgnuti su tehnološkim postupcima proizvodnje odabranog OPG-a. Na svakom OPG-u označena su po tri uzorka *slavonske kobasice* koji su analizirani na kraju proizvodnog procesa te je ukupno analizirano 18 uzoraka. Kobasice su proizvedene od usitnjenog svinjskog mesa prve (oko 30 %) i druge kategorije (oko 70 %) uz dodatak soli, mljevene paprike i češnjaka. Izmiješani nadjev je punjen u svinjsko tanko crijevo (lat. *intestinum tenue*), a potom su svježe kobasice podvrgnute procesima dimljenja, fermentacije i zrenja.

Nakon završenog procesa zrenja s ovitka svakog uzorka *slavonske kobasice* izdvojena je u svrhu izolacije i identifikacije plijesni na ovitku svaka različito vidljiva kolonija plijesni, a potom su uzorci pripremljeni za mikrobiološku i fizikalno-kemijsku analizu te određivanje mikotoksina.

Lokaliteti na kojima su proizvedene *slavonske kobasice* se nalaze u Vukovarsko-

srijemskoj županiji, najistočnijoj županiji Republike Hrvatske koju karakterizira umjerena klima. Prvi se OPG nalazi u Bošnjacima i smješten je u naseljenom dijelu sela, gdje je objekt za preradu mesa izgrađen u sastavu obiteljske kuće te se ne nalazi u blizini polja. Isti uvjeti karakteristični su i za drugi, treći i četvrti OPG koji se nalaze u Komletincima, Babinoj Gredi i Štitaru. U Otoku kraj Vinkovaca, nalazi se peti OPG koji je za razliku od prva četiri, smješten u samoj blizini polja, a i šesti OPG nalazi se u blizini polja, u Županji. Međusobno najudaljeniji OPG-ovi su OPG Babina Greda i Komletinci (oko 48,4 km) te Babina Greda i Otok (oko 45,3) dok su međusobno najbliži OPG Županja i Bošnjaci (oko 5,7 km), a potom OPG Otok i Komletinci (oko 5,8 km).

Određivanje mikrobiološke ispravnosti sirovina i uzoraka *slavonske kobasice*

Preporučeni mikrobiološki parametri za svježe meso, mljevenu papriku kao i trajne kobasice određeni su prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011.). Za mikrobiološku analizu, u sterilnim uvjetima, izvagano je 25 g uzorka te dodano u 225 mL puferirane peptonske vode (BPW, Biolife, Italy), homogenizirano (BagMixer 400, Interscience, Saint Nom, Francuska) te ostavljeno na sobnoj temperaturi oko 30 min. Iz tako pripremljene otopine vršila se daljnja inokulacija uzoraka. Enterobakterije su određene na Violet Red Bile Glucose agaru (VRBG, Biolife, Italy) tijekom inkubacije pri 37 °C/24 h; koagulaza-pozitivni stafilokoki/*Staphylococcus aureus* na Baird-Parker agaru (BP, Biolife, Italija) tijekom inkubacije pri 37 °C/24 h/+24 h; sulfitoreducirajuće klostridije na sulfitnom agaru (TSC, Biolife, Italija) tijekom inkubacije pri 37 °C/24 h/+24 h; kvasci i plijesni na Dichloran (18 %) glicerol agar (DG-18, Biokar, Pantin,

Francuska). Sve navedene analize provedene su u skladu s propisanim ISO normama za svaku pojedinu bakteriju. Izolacija *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes* provedena je u skladu s važećim ISO standardom.

Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava uzoraka *slavonske kobasice*

Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka *slavonske kobasice* određena su nakon tri mjeseca proizvodnje. Uzorci su homogenizirani primjenom uređaja za homogenizaciju (Grindomix GM 200, Retsch, Njemačka) tijekom 15 s pri 6000 rpm te im je određen udio vode, pepela, ukupnih masti i ukupnih bjelančevina. U uzorcima je izmjerena i pH vrijednost te aktivitet vode (a_w). Sve fizikalno-kemijske analize provedene su primjenom validiranih standardnih i internih analitičkih metoda. Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće. Udio vode (ISO 1442:1997) određen je gravimetrijski pri 103 °C, a spaljivanjem uzoraka u mufolnoj peći pri 550 °C određen je udio pepela. Udio ukupnih bjelančevina određen je metodom po Kjeldahl-u (HRN ISO 937:1999), dok su ukupne masti određene metodom po Soxhlet-u (HRN ISO 1443:1999). Vrijednost pH uzoraka određena je na način da je odvagano 5 g homogeniziranog uzorka u tikvicu i dodano 50 mL vode. Sadržaj tikvice mućkan je 15 min na tresilici, a nakon mućkanja, pomoću pH metra (UNICAM 9455 pH/ISE Meter, Apeldoorn, Nizozemska) izmjerena je pH vrijednost uzoraka *Slavonske kobasice*. Aktivitet vode određen je na način da se uzorak dobro usitnio, homogenizirao i napunio do oznake u originalnu PVC posudu te stavio u uređaj za mjerenje aktiviteta vode (HygroPalm AW1, Rotronic, Bassersdorf, Švicarska). Pokrenuto je automatsko mjerenje koje je trajalo oko 5 min. Nakon završetka mjerenja očitana je rezultat i temperatura pri kojoj je mjerenje i vršeno.

Određivanje koncentracije mikotoksina u sirovinama i uzorcima *slavonske kobasice*

U sirovinama (svježe meso, crvena mljevena paprika) te uzorcima *slavonske kobasice* na kraju proizvodnog procesa određene su koncentracije mikotoksina OTA i AFB₁ primjenom kvantitativne ELISA metode za koju je već ranije utvrđeno da se može koristiti kao učinkovita screening metoda za kvantitativno određivanje koncentracija AFB₁ i OTA u mesnim proizvodima (Pleadin i sur., 2015.b, Pleadin i sur., 2017.). ELISA test procedura provedena je prema uputama proizvođača kitova R-Biopharm (Darmstadt, Njemačka) i to AFB₁ ELISA kit (Aflatoxin B₁; Cat. No. R1211) za AFB₁ i OTA ELISA kit (Ochratoxin A; Cat. No. R1301) za određivanje OTA te uporabu kemijskog analizatora Chemwell 2910 (Awareness Technologies, Inc., Palm City, USA). Svaki kit sadrži mikrotitracijsku ploču s 96 jažica obloženih s AFB₁/OTA antitijelima, AFB₁ metanol/vodenom standardnom otopinom (0, 1, 5, 10, 20 i 50 µg/L) ili OTA vodenom standardnom otopinom (0, 0.05, 0.10, 0.30, 0.90 i 1.8 µg/L), konjugat peroksidaze AFB₁/OTA, supstrat/kromogen otopine, stop otopine i pufere za ispiranje.

Svi su uzorci analizirani u duplikatu primjenom ELISA metoda koje su ranije validirane prema uputama proizvođača kitova za određivanje mikotoksina. Priprema uzoraka za analizu mikotoksina AFB₁ i OTA provedena je prema postupcima za kobasice kako je ranije opisano (Pleadin i sur., 2015.b, Zadravec i sur., 2020.). Po završetku ELISA testa, reakcija je zaustavljena dodavanjem stop otopine, a potom je apsorbanca izmjerena fotometrijski pri 450 nm. Koncentracije AFB₁ i OTA izračunate su iz kalibracijske krivulje u šest točaka matematičkom interpolacijom te korigirane za faktor razrjeđenja uzorka i srednje vrijednosti oporavka utvrđene protokolom osiguranja kvalitete.

Izolacija i identifikacija plijesni s ovitka uzoraka *slavonske kobasice*

Svaka se vidljivo različita kolonija plijesni s ovitka uzoraka *slavonske kobasice* sterilnim nožem prenijela na Petrijevu zdjelicu (Ø 90 mm) s DG - 18 agarom (Dichloran 18% glycerol, Biokar, Francuska). Površine *slavonske kobasice* na kojima nije bilo vidljivih kolonija plijesni, prebrisane su vlažnim, sterilnim pamučnim brisom koji je direktno nanesen na površinu DG-18 agara. Inokulirani su agari tijekom 7 dana inkubirani pri 25 ± 1 °C Inokulirani agari su inkubirani tijekom 7 dana pri 25 ± 1 °C. Dobivene čiste kulture plijesni stavljene su u sterilnu epruvetu s fiziološkom otopinom te čuvane u hladnjaku pri 4 °C do analize.

Identifikacija plijesni s ovitka uzoraka *slavonske kobasice* provedena je tradicionalnom te molekularnom tzv. PCR metodom. Za provedbu identifikacije (i tradicionalne i molekularne) pripremljena je svježa kultura plijesni na način da je svaka izolirana plijesan koja je pohranjena u epruveti s fiziološkom otopinom inokulirana na Czapek yeast extract agar (CYA, Difco International) i Malt extract agar (MEA, Difco International) te inkubirana pri 25 ± 1 °C tijekom 7 dana (Zadravec i sur., 2019.).

Izolirane plijesni identificirane su do razine roda definiranjem njihovih makroskopskih i mikroskopskih karakteristika. Preparati za mikroskopiranje pripremljeni su s CYA agara nakon inkubacije pri 25 ± 1 °C tijekom 7 dana koristeći lactophenol cotton blue (LPCB). Preparat je mikroskopiran uljnom imerzijom, pod povećanjem 1000 x uz uporabu mikroskopa Axio Imager 2 (Zeiss, Germany). Svi izolati su identificirani do razine roda prema Samson i sur. (2004.) te Pitt i Hocking (2009.).

Molekularna metoda koja obuhvaća ekstrakciju DNK, umnažanje DNK te sekvencioniranje provedena je u

potpunosti u skladu s Pleadin i sur. (2017.), a izvršena je da bi se uklonila bilo koja nepouzdana identifikacija provedena tradicionalnom metodom te se identificirale vrste plijesni koje se nisu mogle identificirati tradicionalnom metodom. Rezultati obje metode su uspoređene da bi se točno odredila vrsta narasle plijesni na uzorcima *slavonske kobasice*. Sve dobivene sekvence su uređene pomoću programa Lasergene SeqManPro DNASTAR 13 (Madison, Wisconsin, USA). Uređene sekvence uspoređene su s onima koje su dostupne u bazama CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre database (<http://www.cbs.knaw.nl/>) i GeneBank pomoću BLAST algoritma (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) da bi se potvrdila izolirana vrsta plijesni.

Statistička analiza rezultata

Statistička analiza rezultata provedena je primjenom računalnog programa SPSS Statistics 22.0 (SPSS Statistics, NY IBM, 2013). One-way ANOVA test korišten je da bi se utvrdile razlike između koncentracija mikotoksina i fizikalno-kemijskih parametara s obzirom na različite lokalitete na kojima su označeni uzorci *slavonske kobasice*. Za statističku obradu podataka koncentracija mikotoksina uzeti su svi uzorci (i oni u kojima nisu detektirani mikotoksini), no u statističku obradu uzeta je $\frac{1}{2}$ LOD vrijednosti za svaki pojedini mikotoksin. Statistička značajnost postavljena je na razini $P = 0,05$.

Rezultati i rasprava

Slavonska kobasica je trajna fermentirana kobasica koje se proizvodi tradicionalnim tehnološkim postupcima te je svakako jedan od najprepoznatljivijih prehrambenih brandova Hrvatske. Tehnološki parametri tipični za fermentaciju i zrenje u tradicionalnim komorama za zrenje pogoduju rastu plijesni na površini ovih proizvoda.

Površinska plijesan tijekom zrenja ima pozitivnu tehnološku ulogu, osobito radi sprječavanja površinskog isušivanja proizvoda, ali s druge strane može prouzročiti neugodan miris i okus te može producirati mikotoksine. (Kovačević, 2014.a). Kako bi se utvrdio utjecaj naraslih vrsta plijesni na zdravstvenu sigurnost i kvalitetu *slavonske kobasice*, provedene su i mikrobiološke analize sirovina i proizvoda, ispitana fizikalno-kemijska svojstva proizvoda te određene koncentracije mikotoksina OTA i AFB₁ u sirovinama i proizvodima. Uzorci *slavonske kobasice* označeni su na šest različitih lokaliteta da bi se utvrdila pojavnost različitih vrsta plijesni s obzirom na lokalitet. Važnu ulogu u procesu fermentacije ili zrenja te formiranju senzorskih obilježja proizvoda ima tehnološka mikroflora, koja je karakteristična za svako proizvodno područje te primarno potječe iz sirovine ili proizvodne okoline.

Mikrobiološka svojstva

Standardnim mikrobiološkim metodama analizirale su se enterobakterije, sulfitoreducirajuće klostridije, kvasci i plijesni, koagulaza pozitivni stafilocoki, aerobne mezofilne/ sporogene bakterije, patogene bakterije *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, u svježem mesu i mljevenoj paprici za proizvodnju *slavonske kobasice* te u uzorcima *slavonske kobasice* na kraju proizvodnog procesa (Tabela 1). U niti jednom uzorku svježeg mesa, mljevene paprike nisu izolirane patogene bakterije *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*, niti koagulaza pozitivni stafilocoki. Također, niti u jednom uzorku *slavonske kobasice* nisu izolirane navedene patogene bakterije, što je u skladu i s drugim istraživanjima koja su provedena na nekim trajnim (fermentiranim) kobasicama (Comi i sur., 2005., Drosinos i sur., 2005., Ferreira i sur., 2009.).

Broj enterobakterija kod svježeg

Tabela 1. Rezultati mikrobiološke analize svježeg mesa, mljevene paprike i uzoraka slavonske kobasice na šest različitih lokaliteta

PARAMETRI	LOKALITETI																					
	1			2			3			4			5			6						
	SM	MP	SK	SM	MP	SK	SM	MP	SK	SM	MP	SK	SM	MP	SK	SM	MP	SK				
E/g	1,699	2,050	2,176	1,793	2,255	3,380	1,610	< 1	< 1	< 1	1,912	1,705	1,845	2,178	< 1	< 1	< 1	3,155	1,876	2,089	2,826	
KPS/g	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	
S/25 g	n.n	n.n	n.n	n.n.	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n
LM/25 g	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n
SK/g	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
K/g	< 1	< 1	1,392	1,849	< 1	4,477	< 1	< 1	4,477	2,016	< 1	4,653	2,079	< 1	5,322	2,019	< 1	5,322	2,019	< 1	5,477	< 1
P/g	< 1	1,292	1,000	< 1	1,159	2,079	< 1	< 1	2,065	< 1	< 1	< 1	2,301	< 1	1,824	< 1	< 1	2,126	< 1	2,126	< 1	< 1

E – enterobakterije; KPS – koagulaza pozitivni stafilokoki; S – *Salmonella* spp.; LM – *Listeria monocytogenes*; SRK – sulfitoreducirajuće klostridije; K – kvasci; P – plijesni
 1, 2, 3, 4, 5, 6 – oznaka lokaliteta; SM – svježe meso; MP – mljevena paprika; SK – uzorci slavonske kobasice; n.n. - nije nađeno

mesa s lokaliteta 5 je značajno veći u odnosu na lokalitete 1, 2 i 3, dok je broj enterobakterija kod mljevene paprike s lokaliteta 4 značajno najmanji u odnosu na 1, 2 i 6. Pojava enterobakterija u svježem mesu može biti kao posljedica kontaminacije mesa za vrijeme klanja i obrade mesa, a isto tako izvor mogu biti i oprema, pribor, čistoća radne površine i ruke s kojima tijekom procesa obrade i prerade meso dolazi u kontakt (Talon i sur., 2007.). Kod broja kvasaca u svježem mesu nema statistički značajne razlike ($P = 0,474$). Kod uzoraka *slavonske kobasice*, rezultati za enterobakterije, kvasce i plijesni međusobno se razlikuju s obzirom na lokalitete, tj. kod svih lokaliteta $P < 0,001$. Broj enterobakterija (cfu/g) kod lokaliteta 2 značajno je najveći u odnosu na lokalitete 4 i 6, dok je kod lokaliteta 4 značajno najmanji u odnosu na lokalitete 2, 5 i 6. Broj kvasaca i plijesni kod lokaliteta 1 je značajno najmanji. Lokaliteti 5 i 6 imaju značajno najveći broj kvasaca, a lokalitet 4 ima značajno veći broj plijesni od lokaliteta 1 i 2.

Sastav mikroflore i broj mikroorganizama u smjesi za nadjevanje ovitka ovisan je o higijenskom stanju sirovine i higijeni obrade. Kako se trajne kobasice ne podvrgavaju termičkoj obradi, nego procesima dimljenja, fermentacije i zrenja, tako će pojava mikroorganizama u proizvodu ovisiti o svojstvima nadjeva (a_w , pH) i mikroklimatskim uvjetima okoline u kojoj se odvija proizvodnja.

Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka *slavonske kobasice*

Fizikalno-kemijska svojstva uzoraka *slavonske kobasice* na kraju proizvodnog procesa određena su ispitivanjem udjela vode, pepela, bjelančevina, masti te mjerenjem pH vrijednosti i aktiviteta vode (a_w).

Rezultati fizikalno-kemijskih svojstava uzoraka *slavonske kobasice* na šest različitih lokaliteta prikazani su u Tabeli 2. Tijekom dugotrajnog zrenja, odnosno su-

šenja, mesu se oduzima voda pa se tako udio vode smanjuje.

Udio vode u uzorcima *slavonske kobasice* nakon tri mjeseca proizvodnje se kretao od najmanje izmjerene vrijednosti 19,87 % (lokalitet 1) do 26,83 % (lokalitet 2), koja je i najveća utvrđena vrijednost udjela vode u ovom proizvodu. Uspoređujući dobivene vrijednosti s optimalnim vrijednostima za udio vode *slavonskoj kobasici* koje su u provedenom istraživanju predložili Kovačević i sur. (2009.), a iznosi 21,70 % - 40,00 %, može se zaključiti da su osim uzoraka s lokaliteta 1, svi ostali rezultati dobiveni ovim istraživanjem u okviru navedenih, očekivanih, odnosno optimalnih vrijednosti. Lokalitet 1 ima statistički značajno manji udio vode od lokaliteta 2 i 4, dok je kod lokaliteta 2 i 4 udio vode značajno veći od lokaliteta 1 i 6. U uzorcima *slavonske kobasice* na kraju proizvodnog procesa udio pepela je iznosio od 3,52 % - 5,52 %, a sličan raspon za udio pepela u *slavonskoj kobasici* od $3,84 \pm 0,50$ do $4,93 \pm 0,67$ % te domaćoj salami od $3,56 \pm 0,66$ do $4,08 \pm 0,83$ %, dobili su Pleadin i sur. (2013.). Kod lokaliteta 1 udio pepela je statistički značajno najveći, a kod lokaliteta 5 je značajno najmanji od svih, osim od lokaliteta 6. Sušenjem *slavonske kobasice* udio vode se smanjuje, a posljedično raste udio bjelačevina i ostalih sastojaka. Uspoređujući s optimalnim vrijednostima za udio bjelančevina u *slavonskoj kobasici*, koje predlažu Kovačević i sur. (2009.), a iznose 22,00 % - 35,00 %, dobiveni rezultati iz ovog istraživanja se nalaze unutar predloženih optimalnih vrijednosti. Lokalitet 1 ima značajno najveći udio bjelančevina u odnosu na ostale lokalitete, osim lokaliteta 4, a najmanje je statistički značajan kod lokaliteta 5 i 6.

Mast kao sastavni dio fermentiranih (trajnih) kobasica služi kao značajni izvor energije, esencijalnih masnih kiselina i vitamina topljivih u mastima. Osim toga, pridonosi punoći okusa, teksturi

i mekoći, što je vrlo važno za kvalitetu i prihvatljivost finalnog mesnog proizvoda (Olivares i sur., 2010.). U uzorcima *slavonske kobasice* udio masti je iznosio od 38,85 % do 49,44 %. Uspoređujući ove vrijednosti s optimalnim vrijednostima za udio masti u *slavonskoj kobasici*, koje su objavili Kovačević i sur. (2009.), a koje iznose 24,00 % - 45,00 %, vidljivo je da su gornje vrijednosti rezultata dobivene u ovom istraživanju nešto veće. Lokalitet 4 ima značajno najmanji udio masti u odnosu na lokalitete 3, 5 i 6. Udio masti kod lokaliteta 5 i 6 je statistički najznačajniji. Veće vrijednosti udjela masti u uzorcima *slavonske kobasice* mogu se pripisati razlici u recepturi među proizvođačima koji koriste različite omjere mesa i masnog tkiva (Karolyi, 2011.).

Da bi se tijekom procesa fermentacije i zrenja postigla stabilnost i sigurnost proizvoda, potrebno je smanjenje vrijednosti pH i a_w (Kovačević i sur., 2014.b). U uzorcima *slavonske kobasice* izmjerena je pH vrijednost između 5,26 - 5,81, što je u skladu s predloženim optimalnim vrijednostima za pH *slavonske kobasice* (5,0 - 5,8) koje su objavili Kovačević i sur. (2009.). pH vrijednost kod *slavonske kobasice* s lokaliteta 5 i 6 se razlikuje u odnosu na ostale lokalitete, tj. vrijednosti kod navedenih lokaliteta su značajno manji u odnosu na ostale.

Aktivitet vode koji je potreban za rast većine plijesni kreće se u rasponu od 0,80 do 0,95, no postoje i određene vrste, tzv. kserofili, koji mogu rasti i pri znatno nižim vrijednostima a_w . Aktivitet vode u uzorcima *slavonske kobasice* bio je u rasponu od 0,71 - 0,82. Kovačević i sur. (2009.) su predložili vrijednost koja je manja od 0,9 kao optimalnu vrijednost a_w u *slavonskoj kobasici*, a i svi uzorci u ovom istraživanju bili su u skladu s predloženim optimalnim vrijednostima, dakle manji od 0,9. Lokalitet 1 ima značajno najmanji a_w u odnosu na ostale lokalitete, osim lokaliteta 5. Vrijednost a_w kod lokaliteta 2 je značajno veća od svih lokaliteta, osim lokaliteta 4.

Primjenom One-way ANOVA testa, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u kemijskom sastavu uzoraka *slavonske kobasice* u odnosu na pojedinačno promatrane fizikalno-kemijske parametre i promatrane lokalitete koji se nalaze u istoj klimatskoj regiji te je tako razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima *slavonske kobasice* posljedica razlika u recepturi kod njihovih priprema.

Plijesni na ovitku proizvoda

Rezultati izolacije plijesni s ovitka uzoraka *slavonske kobasice* s obzirom na šest različitih lokacija prikazani su u Tabela 3.

Tabela 2. Rezultati fizikalno-kemijskih svojstava uzoraka *slavonske kobasice* na šest različitih mikrolokaliteta

PARAMETAR	LOKALITETI										
	1	2	3	4	5	6	\bar{X}	SD	MIN	MAX	P
voda (%)	19,87	26,83	22,48	25,48	22,00	21,45	23,02	2,39	19,87	26,83	> 0,001
pepeo (%)	5,52	4,45	4,81	5,01	3,52	4,33	4,60	0,62	3,52	5,52	> 0,001
bjelančevine (%)	32,82	28,37	28,34	30,61	24,94	25,91	28,50	2,66	24,94	32,82	> 0,001
mast (%)	41,68	40,17	44,18	38,85	49,44	48,10	43,74	3,93	38,85	49,44	> 0,001
pH	5,81	5,72	5,63	5,77	5,26	5,29	5,58	0,22	5,26	5,81	> 0,001
a_w	0,71	0,82	0,78	0,80	0,75	0,76	0,77	0,04	0,71	0,82	> 0,001

Tabela 3. Izolirane plijesni s površine uzoraka *slavonske kobasice* s različitih lokaliteta prema broju izolata

LOKALITET	PLIJESNI S OVITKA SLAVONSKE KOBASICE		
	ROD	VRSTA	BROJ IZOLATA
1	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	6
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>	3
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	1
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	2
2	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	10
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	2
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>	1
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1
	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>	1
3	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	5
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	2
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	1
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>	1
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1
4	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	4
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	3
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	2
5	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	4
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	3
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	1
6	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	7
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium polonicum</i>	4
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium commune</i>	3
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium solitum</i>	1
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2
	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>	1

Neke vrste navedenih rodova plijesni, u određenim uvjetima, mogu producirati mikotoksine. Da bi se identificirale plijesni koje obrastaju površinu *slavonske kobasice* i koje bi mogle biti odgovorne za produkciju OTA i AFB₁ kao mikotoksina od

najvećeg javno-zdravstvenog značenja, identifikacija plijesni provedena je tradicionalnom i molekularnom metodom.

U svim uzorcima *slavonske kobasice* ukupno je identificirano 72 izolata plijesni (Tabela 4).

Tabela 4. Vrste plijesni s površine *slavonske kobasice* prema pojavnosti

VRSTA PLIJESNI	BROJ IZOLATA	% IZOLATA*
<i>P. polonicum</i>	24	33,33
<i>P. commune</i>	18	25,00
<i>P. verrucosum</i>	12	16,67
<i>A. flavus</i>	6	8,33
<i>P. rubens</i>	5	6,94
<i>P. brevicompactum</i>	4	5,56
<i>M. racemosus</i>	2	2,78
<i>P. solitum</i>	1	1,39
UKUPNO	72	100,00

* Broj izolata vrste/ukupan broj izolata x 100

Od ukupnog broja izolata, molekularnom metodom identificirano je ukupno 8 različitih vrsta plijesni među kojima dominiraju plijesni roda *Penicillium* (88,89 %), što je i u skladu s drugim provedenim istraživanjima na trajnim mesnim proizvodima (Papagianni i sur., 2007., Sørensen i sur., 2008., Asefa i sur., 2009., Iacumin i sur., 2009., Castellari i sur., 2010., Sonjak i sur., 2011., Pleadin i sur., 2017., Zadavec i sur., 2020.). Na svim lokalitetima izolirana je plijesan *P. commune*. Osim 6 *Penicillium* vrsta (*P. commune*, *P. polonicum*, *P. rubens*, *P. verrucosum*, *P. solitum*, *P. brevicompactum*) izolirana je još i jedna vrsta roda *Aspergillus* (*A. flavus*) te jedna vrsta roda *Mucor* (*M. racemosus*).

Vrste roda *Aspergillus* su česti kontaminanti hrane u subtropskim i tropskim područjima i stoga su u trajnim (fermentiranim) kobasicama, čija se proizvodnja (zrenje) uglavnom odvija pri nižim temperaturama, *Aspergillus* vrste mnogo rjeđe izolirane od *Penicillium* vrsta (Castellari i sur., 2010., Sonjak i sur., 2011., Pleadin i sur., 2017., Zadavec i sur., 2020.), što je dokazano i u ovom radu, gdje je na ovitku *slavonske kobasice* izolirana samo jedna vrsta plijesni roda *Aspergillus* (8,33 %) i to mikotoksikotvorna vrsta *A. flavus*, koja je prisutna na tri od ukupno

šest analiziranih lokaliteta. Na prvom i trećem lokalitetu, *A. flavus* izoliran je po jedanput, dok je u petom lokalitetu, koji je smješten uz žitno polje, najčešće izoliran.

Plijesni roda *Mucor* su u prirodi široko rasprostranjene, anamesnim proizvodima ne predstavljaju dominantnu mikofloru što je potvrđeno i u ovom radu, jer je ovaj rod bio najmanje zastupljen na ovitku *slavonske kobasice* (2,78 %). Po jedan izolat plijesni *M. racemosus* izoliran je na drugom i šestom lokalitetu. S površine *slavonske kobasice* najčešće su izolirane plijesni *Penicillium polonicum* (33,33 %), koja nije izolirana jedino na prvom lokalitetu, *Penicillium commune* (25,00 %) koja je izolirana na svih šest lokaliteta i *Penicillium verrucosum* (16,67 %) koja je izolirana na prvom, četvrtom i šestom lokalitetu. Budući da se svi promatrani lokaliteti nalaze u istoj klimatskoj regiji, tako je pojava određenih vrsta plijesni po pojedinom lokalitetu podjednaka.

Na svih šest promatranih lokaliteta nema statistički značajne razlike u broju izolata plijesni ($P = 0,782$).

Mikotoksini

Budući da AFB₁ predstavlja najpotentniji karcinogen jetre u sisavaca te je klasificiran od strane Međunarodne organizacije za istraživanje raka u grupu

Tabela 5. Koncentracija mikotoksina OTA i AFB₁ u sirovinama i uzorcima *slavonske kobasice* s različitih lokaliteta

LOKALITET	OTA (µg/kg)			AFB ₁ (µg/kg)		
	SM	MM	SK	SM	MM	SK
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	n.d.	5,10	n.d.	n.d.	n.d.

1, dokazanih ljudskih karcinogena (IARC, 2012.), a OTA je svrstan u grupu 2B, mogućih ljudskih karcinogena (IARC, 1993.) te oba predstavljaju česte kontaminante mesnih proizvoda (Iacumin i sur., 2009., Frece i sur., 2010., Rodríguez i sur., 2012., Markov i sur., 2013., Pleadin i sur., 2015.b, Pleadin i sur., 2017.) u ovom radu analizirani su spomenuti mikotoksini kao potencijalni produkti plijesni prisutni na trajnim (fermentiranim) kobasicama.

U sirovom mesu i mljevenoj paprici koji su korišteni u proizvodnji *slavonske kobasice* nisu određene koncentracije niti OTA, a niti AFB₁ veće od limita detekcije (LOD) primijenjenih analitičkih metoda (Tabela 5).

Po pitanju koncentracije mikotoksina AFB₁ u uzorcima *slavonske kobasice* nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$) u odnosu na promatrane lokalitete, budući da AFB₁ nije detektiran u niti jednom uzorku. U uzorcima s tri lokaliteta izoliran je mogući izvor mikotoksina AFB₁, *Aspergillus flavus*. Navedeni mikotoksin nije detektiran, što se može objasniti time da se tijekom procesa zrenja *slavonske kobasice*, koji traje svega 2-2,5 mjeseca, nisu postigli uvjeti koji omogućuju ovoj vrsti plijesni produkciju AFB₁.

Istraživanjem koje su proveli Markov i sur. (2013.) utvrđena je prisutnost AFB₁ u *slavonskoj kobasici* u koncentraciji $< 1 - 1,2$

µg/kg, manjom u odnosu na OTA, a i u ovom istraživanju su vrijednosti bile niže od LOD primjenjene analitičke metode.

Na tri lokaliteta s ovitka *slavonske kobasice* izolirani su mogući izvori mikotoksina OTA, *Penicillium verrucosum*, a na šestom lokalitetu, gdje je ova vrsta plijesni i izolirana najvećešće, detektiran je OTA u koncentraciji od 5,10 µg/kg. *P. verrucosum* je prisutan i u žitaricama (Pitt i Hocking, 2009.), a kako je šesti lokalitet smješten uz samo žitno polje tada je i pojava ove vrste plijesni na ovitku *slavonske kobasice* opravdana. Prisutnost toksikotvorne vrste plijesni i uvjeti zrenja *slavonske kobasice* u komori na šestom lokalitetu, doveli su u završnom proizvodu do pojave OTA.

Ranijim istraživanjima koja su provedena na *slavonskoj kobasici* određene su koncentracije OTA i to u rasponu od 2,03 µg/kg do 6,68 µg/kg (Markov i sur., 2013., Vulić i sur., 2014.). U istraživanju koje su proveli Iacumin i sur. (2009.) u oko 45 % analiziranih talijanskih trajnih kobasica određena je prisutnost OTA. Najmanja koncentracija OTA na ovitku proizvoda iznosila je 3 µg/kg, a najveća 18 µg/kg, dok su Dall'Asta i sur. (2010.), u fermentiranim kobasicama (Felino-vrsta) odredili koncentraciju OTA od 0,62 µg/kg do 3,32 µg/kg. Prisutnost određenih vrsta plijesni nije uvijek popraćena i produkcijom toksina jer su uvjeti (osobito a_w) koji omogućavaju njihovu produkciju

više restriktivni od onih koji omogućavaju sam rast plijesni (Karolyi, 2011.).

Zaključci

Svi uzorci svježeg mesa i mljevene paprike koji su korišteni za proizvodnju *slavonske kobasice* bili su mikrobiološki ispravni, tj. sve vrijednosti za analizirane mikroorganizme bile su u skladu s MDK vrijednostima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu, a svi uzorci *slavonske kobasice* bili su i mikrobiološki ispravni.

Analizom fizikalno-kemijskih svojstava, odnosno sastava *slavonske kobasice* može se zaključiti da su uzorci u skladu s vrijednostima za određene parametre koji su karakteristični za ovu vrstu mesnih proizvoda. Utvrđene razlike posljedica su neujednačenosti tehnologije proizvodnje, odnosno recepture i tehnoloških parametara. S ovitka uzoraka *slavonske kobasice* izolirane su toksikotvorne plijesni, *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus flavus*, mogući izvori mikotoksina OTA i AFB₁, a samo je OTA i određen u ovoj vrsti kobasice na jednom lokalitetu.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem nisu pokazali značajne razlike u pojavnosti plijesni koji bi mogli utjecati na sigurnost *slavonske kobasice* s obzirom na različite lokalitete koji pripadaju istoj klimatskoj regiji. Dominantnu mikofloru na uzorcima *slavonske kobasice* koji su analizirani u ovom istraživanju predstavlja rod *Penicillium*, a vrsta *Penicillium polonicum*. Kako su s ovitka *slavonske kobasice* izolirane i druge mikotoksikotvorne vrste plijesni, poput *P. commune* koja je ujedno i izolirana na svim lokalitetima, a koja može producirati ciklopiazoničnu kiselinu, potrebno je provesti i daljnja istraživanja još nedovoljno ispitanih mikotoksina u ovoj vrsti trajnih kobasica.

Literatura

1. ASEFA, D. T., R. O. GJERDE, M. S. SIDHU, S. LANGSRUD, C. F. KURE, T. NESBAKKEN and I.

- SKAAR (2009): Mouldscontaminants on Norwegian dry-cured meat products. Int. J. Food Microbiol. 128, 435-439. 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.024
2. CASTELLARI, C., A. M. QUADRELLI and F. LAICH (2010): Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 142, 149-155. 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.016
3. COMI, G., S. ORLIC, S. REDZEPOVIC, R. URSO and L. IACUMIN (2004): Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. Int. J. Food Microbiol. 96, 29-34. 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.005
4. DALL'ASTA, C., G. GALAVERNA, T. BERTUZZI, A. MOSERITI, A. PIETRI, A. DOSSENA and R. MARCHELLI (2010): Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. Food Chem. 120, 978-983. 10.1016/j.foodchem.2009.11.036
5. DROSINOS, E. H., M. MATARAGAS, N. XIRAPHI, G. MOSCHONAS, F. GAITIS and J. METAXOPOULOS (2005): Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. Meat Sci. 69, 307-317. 10.1016/j.meatsci.2004.07.012
6. FERREIRA, V., J. BARBOSA, J. SILVA, P. GIBBS, T. HOGG and P. TEIXEIRA (2009): Microbiological profile of Salpicão de Vinhais and Chouriça de Vinhais from raw materials to final products: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 10, 279-283. 10.1016/j.ifset.2008.11.001
7. FRECE, J., K. MARKOV i D. KOVAČEVIĆ (2010): Određivanje autohtone mikrobnje populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. Meso 12, 92-99.
8. GAREIS, M. and J. WOLFF (2000): Relevance of mycotoxin contaminated feed for farm animals and carryover of mycotoxins to food of animal origin. Mycoses 43, 79-83.
9. Hrvatski zavod za norme: Meso i mesni proizvodi - Određivanje količine dušika (Referentna metoda). HRN ISO 937: 1999.
10. IACUMIN, L., L. CHIESA, D. BOSCOLO, M. MANZANO, C. CANTONI, S. ORLIC and G. COMI (2009): Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. Food Microbiol. 26, 65-70. 10.1016/j.fm.2008.07.006
11. International Agency for Research on Cancer (IARC): Aflatoxins. IARC monographs 100F: 225-248, Lyon, 2012.
12. International Agency for Research on Cancer (IARC): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs on the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, IARC 56, Lyon, 1993.
13. International Standards Organisation: Meat and meat products - Determination of total ash. ISO 936:1998.
14. International Standards Organisation: Meat and meat products - Determination of moisture content (Reference method). ISO 1442:1997.

15. International Standards Organisation: Meat and meat products - Determination of total fat content. ISO 1443:1973.
16. KAROLYI, D. (2011): Fizikalno-kemijska, higijenska i organoleptička karakterizacija slavonskog kulena. Meso 13, 423-429.
17. KOVAČEVIĆ, D., K. SUMAN, D. ŠUBARIĆ, K. MASTANJEVIĆ and S. VIDAČEK (2009): Investigation of homogeneity and physicochemical characterisation of the Homemade Slavonian Sausage. Meso 11, 338-344.
18. KOVAČEVIĆ, D. (2014a): Tehnologija kulena i ostalih fermentiranih kobasica. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
19. KOVAČEVIĆ, D., K. MASTANJEVIĆ, J. FRECE, J. PLEADIN and I. ŠAKIĆ (2014b): Effect of addition of various sugars on fermentation process of Croatian indigenous dry sausage Kulenova seka. Meso 4, 351-355.
20. LÓPEZ-DÍAZ, T. M., J. A. SANTOS, M. L. GARCÍA-LÓPEZ and A. OTERO (2001): Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. Int. J. Food Microbiol. 68, 69-74. 10.1016/S0168-1605(01)00472-X
21. MARKOV, K., J. PLEADIN, M. BEVARDI, N. VAHČIĆ, D. SOKOLIĆ-MIHALAK, J. FRECE (2013): Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. Food Control. 34, 312-317. 10.1016/j.foodcont.2013.05.002
22. MIŽÁKOVÁ, A. D., M. O. PIPOVÁ and P. E. TUREK (2002): The occurrence of moulds in fermented raw meat products. Czech J. Food Sci. 20, 89-94. 10.17221/3516-CJFS
23. OLIVARES, A., J. L. NAVARRO, A. SALVADOR and M. FLORES (2010): Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. Meat Sci. 86, 251-257. 10.1016/j.meatsci.2010.04.005
24. PAPAGIANNI, M., I. AMBROSIADIS and G. FILIOUSIS (2007): Mould growth on traditional Greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. Meat Sci. 76, 653-657. 10.1016/j.meatsci.2007.01.018
25. PITT, J. I. and A. D. HOCKING (2009): Fungi and Food Spoilage. Springer, New York. 10.1007/978-0-387-92207-2
26. PLEADIN, J., D. KOVAČEVIĆ and I. PERKOVIĆ (2015a): Impact of casing damaging on aflatoxin B1 concentration during the ripening of dry-fermented meat sausages. J. Immunoassay Immunochem. 36, 655-666. 10.1080/15321819.2015.1032306
27. PLEADIN, J., M. M. STAVAR, N. VAHČIĆ, D. KOVAČEVIĆ, S. MILONE, L. SAFTIĆ, G. SCORTICINI (2015b): Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. Food control 52, 71-77. 10.1016/j.foodcont.2014.12.027
28. PLEADIN, J., N. VAHČIĆ, N. PERŠI and D. KOVAČEVIĆ (2013): Varijabilnost fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava autohtonih mesnih proizvoda između proizvođačkih domaćinstava. Meso 15, 122-131.
29. PLEADIN, J., M. ZADRAVEC, D. BRNIĆ, I. PERKOVIĆ, M. ŠKRIVANKO, D. KOVAČEVIĆ (2017): Moulds and mycotoxins detected in the regional speciality fermented sausage 'slavonski kulen' during a 1-year production period. Food Addit. Contam. Part A 34, 282-290. 10.1080/19440049.2016.1266395
30. RODRÍGUEZ, A., M. RODRÍGUEZ, A. MARTÍN, F. NUÑEZ and J. J. CORDOBA (2012): Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. Food Control 27, 118-126. 10.1016/j.foodcont.2012.03.009
31. SAMSON, R. A., E. S. HOEKSTRA and J. C. FRISVAD (2004): Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht.
32. SONJAK, S., M. LIČEN, J. C. FRISVAD and N. GUNDE-CIMERMAN (2011): The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. Food Microbiol. 28, 373-376. 10.1016/j.fm.2010.09.007
33. SØRENSEN, L. M., T. JACOBSEN, P. V. NIELSEN, J. C. FRISVAD, A. G. KOCH (2008): Mycobiota in the processing areas of two different meat products. Int. J. Food Microbiol. 124, 58-64. 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.019
34. TABUC, C., J. D. BAILLY, S. BAILLY, A. QUERIN and P. GUERRE (2004): Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. Rev. Med. Vet. 156, 287-291.
35. TALON, R., I. LEBERT, A. LEBERT, S. LEROY, M. GARRIGA, T. AYMERICH, E. H. DROSINOS, E. ZANARDI, A. IANIERI, M. J. FRAQUEZA and L. PATARATA (2007): Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. Meat Sci. 77, 570-579. 10.1016/j.meatsci.2007.05.006
36. VULIĆ, A., N. PERŠI, N. VAHČIĆ, B. HENGL, A. GROSS-BOŠKOVIĆ, M. JURKOVIĆ, D. KOVAČEVIĆ and J. PLEADIN (2014): Procjena moguće izloženosti okrotoksinu A putem konzumacije kontaminiranih mesnih proizvoda. Meso 16, 106-112.
37. ZADRAVEC, M., K. MARKOV, J. FRECE, I. PERKOVIĆ, Ž. JAKOPOVIĆ, T. LEŠIĆ, M. MITAK, J. PLEADIN (2019): Toxicogenic fungi and the occurrence of mycotoxins in traditional meat products. Croat. J. Food Sci. Technol. 11, 272-282. 10.17508/CJFST.2019.11.2.05
38. ZADRAVEC, M., N. VAHČIĆ, D. BRNIĆ, K. MARKOV, J. FRECE, R. BECK, T. LEŠIĆ, J. PLEADIN (2020): A study of surface moulds and mycotoxins in Croatian traditional dry-cured meat products. Int. J. Food Microbiol. 317, 1-7. 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108459

Influence of locality on Slavonian sausage safety and quality

Irena PERKOVIĆ, BSc, PhD, Expert Advisor, Croatian Veterinary Institute – Vinkovci Veterinary Branch, Croatia; Dragan KOVAČEVIĆ, BSc, PhD, Full Professor, Faculty of Food Science and Technology, J. J. Strossmayer University, Osijek, Croatia; Manuela ZADRAVEC, DVM, PhD, Senior Scientific Associate; Tina LEŠIĆ, mag. ing., Senior Expert Associate and Doctoral Candidate; Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Tenured Scientific Advisor, Full Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Mario ŠKRIVANKO, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute – Vinkovci Veterinary Branch, Croatia

Slavonian sausage is a cured sausage produced on rural holdings using traditional technology, in which moulds are permitted to develop on the product surface during the maturation period. The purpose of this study was to identify the surface moulds and determine their influence on product quality and safety, including the occurrence of the mycotoxins ochratoxin A (OTA) and aflatoxin B₁ (AFB₁), from six production facilities in the Slavonia region. A total of 18 samples of Slavonian sausage were prepared and analysed at the end of the production process,

i.e., after three months. A total of eight species of mould were identified, and the dominant genus was *Penicillium* (88.89%) with six species, one species from the genus *Aspergillus* (8.33%) and one species from the genus *Mucor* (2.78%). Possible causative agents of OTA and AFB₁ were identified, *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus flavus*, though only the presence of OTA was confirmed in a concentration of 5.10 µg/kg.

Key words: moulds; mycotoxins; Slavonian sausage; PCR