

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tatjana BERČIČ

**SENZORIČNI IN PREHRANSKI PARAMETRI KAKOVOSTI
SUŠENE KLOBASE Z DODATKOM PROBIOTIKA IN
PREBIOTIKA**

MAGISTRSKO DELO

**SENSORY AND NUTRITIONAL PROPERTIES OF DRY
FERMENTED SAUSAGES WITH THE ADDITION OF
PROBIOTICS AND PREBIOTICS**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2006

Magistrsko delo je bilo opravljeno v podjetju Kras, mesnopredelovalna industrija d.d., v obratu v Šepuljah, na Katedri za tehnologijo mesa in gotovih jedi, Katedri za kemijo in Katedri za vrednotenje živil, na Biotehniški fakulteti, Oddelek za živilstvo v Ljubljani, na Katedri za mlekarstvo, na Biotehniški fakulteti, Oddelek za zootehniko v Domžalah ter na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorja magistrskega dela s področja živilstva imenoval prof. dr. Božidarja Žlenderja in za somentorico prof. dr. Ireno Rogelj.

Mentor: prof. dr. Božidar Žlender

Somentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

prof.dr. Sonja Smole Možina – predsednica

prof.dr. Božidar Žlender – član

prof. dr. Irena Rogelj – članica

doc.dr. Lea Gašperlin – članica

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tatjana Berčič, univ. dipl. ing. živ. tehn.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 637. 52: 579. 67: 543. 61: 543. 9 (043) = 863
KG mesni izdelki/sušene mesnine/sušene klobase/starterske kulture/probiotiki/
prebiotiki/zmanjšana vsebnost maščob/senzorične lastnosti/prehranska vrednost/
preživelost *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
AV BERČIČ, Tatjana, univ. dipl. ing. živ. teh.
SA ŽLENDER, Božidar (mentor)/ROGELJ, Irena (somentorica)
KZ SI - 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN SENZORIČNI IN PREHRANSKI PARAMETRI KAKOVOSTI SUŠENE
KLOBASE Z DODATKOM PROBIOTIKA IN PREBIOTIKA
TD Magistrsko delo s področja živilstvo
OP X, 67 str., 15 pregl., 10 sl., 68 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Izdelali smo tri različne skupine sušenih klobas. Klobase kontrolne skupine smo pripravili samo z osnovno komercialno startersko kulturo Bactoferm SM 181, ki vsebuje *Lactobacillus sake* HJ-7 in *Staphylococcus xylosus* DD-34. Klobasam druge skupine smo poleg osnovne starterske kulture dodali prebiotik inulin in probiotično kulturo *L. casei*-01 nu-trish^R, ki vsebuje *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Klobase tretje skupine se od izdelkov druge skupine razlikujejo le po zmanjšanem deležu dodanih maščob. Vsaka skupina izdelkov je bila izdelana v treh ponovitvah, v serijah po 100 kg. Primerjali smo senzorične in prehranske parametre kakovosti med skupinami klobas. Dodatek probiotične bakterije *L. paracasei* subsp. *paracasei* v koncentraciji $1,25 \times 10^7$ ke/g izdelka in dodatek inulina v koncentraciji 1 % ni negativno vplival na senzorično kakovost izdelkov. Opravljena je bila senzorična analiza izdelkov in instrumentalne meritve teksture. Senzorična ocena teksture sušenih klobas je v statistično zelo visoko značilni, pozitivni in tesni korelaciji z instrumentalno izmerjeno teksturo z nastavkom Volodkevich ($r = 0,95$), medtem ko so instrumentalne meritve teksture z nastavkom Kramer v statistično zelo visoko značilni in pozitivni korelaciji z izgubo mase med sušenjem klobas ($r = 0,94$). Dodatek probiotika v kombinaciji z osnovno komercialno startersko kulturo ni vplival na pH vrednost in a_w vrednost izdelkov. Tudi zmanjšani delež dodanih maščob v nadev sušenih klobas ni negativno vplival na večino senzoričnih lastnosti, vplival pa je na izboljšanje prehranskih lastnosti ter zmanjšanje energijske vrednosti. Salamin se je pokazal kot primeren medij za prenos probiotične bakterije *L. paracasei* subsp. *paracasei*, saj so probiotične bakterije dobro preživele tehnološki postopek ter skladiščenje na temperaturi 8 °C do 10 °C. Izdelek je tudi po dvomesečnem skladiščenju vseboval v 1g nad 10^7 ke probiotičnih bakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 637. 52: 579. 67: 543. 61: 543. 9 (043) = 863
CX meat products/dry - cured products/dry fermented sausages/starters/probiotics/
prebiotics/low fat products/sensory properties/nutritional properties/
survival of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
AU BERČIČ, Tatjana
AA ŽLENDER, Božidar (supervisor)/ROGELJ, Irena (co-advisor)
PP SI - 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2006
TI SENSORY AND NUTRITIONAL PROPERTIES OF DRY FERMENTED
SAUSAGES WITH THE ADDITION OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS
DT M. Sc. Thesis
NO X, 67 p., 15 tab., 10 fig., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Dry fermented sausages were prepared in three different ways. Sausages of the control group were prepared only with basic commercial starter culture Bactoferm SM 181 composed by *Lactobacillus sake* HJ-7 and *Staphylococcus xylosum* DD-34, sausages of the second group were added probiotic culture *L. casei*-01 nu-trish which contains *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and inulin in addition to basic starter culture and sausages of the third group differed from those of the second group only in reduced fat content. Every group of products was produced three times in the batches of 100 kg each. The sensory and nutritional properties of sausages from different groups were compared. Addition of probiotic *L. paracasei* subsp. *paracasei* at a concentration of $1,25 \times 10^7$ cfu/g of the product and of inulin at a concentration of 1 % did not impair the sensory properties of products. The sensory and instrumental measurements of fermented sausages texture were done. Highly significant correlation ($r = 0,95$) between sensory evaluation of fermented sausages texture and instrumental measurements with Volodkevich jaw was found. On the other hand, instrumental measurements with Kramer shear cell were significantly correlated ($r = 0,94$) with weight loss. The addition of probiotic to the basic starter culture did not affect the course of fermentation (pH values) and a_w values of fermented sausages. Even the reduction of fat content did not have a negative impact on the most sensory properties of fermented sausages, however it ameliorated the nutritional value of the product due to lower caloric value. The results presented in this study indicate that dry fermented sausage is an appropriate medium for probiotic *L. paracasei* subsp. *paracasei* as it survived satisfactory throughout fermentation, ripening and storage at 8 °C to 10 °C. After a two-month storage period the product still contained at least 10^7 cfu/g of probiotic bacteria.

KAZALO VSEBINE

	stran
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OSNOVE TEHNOLOGIJE SUŠENIH KLOBAS	2
2.1.1 Tehnološki postopek za sušene klobase	2
2.1.2 Mesnine z zmanjšano vsebnostjo maščob	2
2.1.3 Zorenje sušenih klobas	5
2.1.4 Mikrobiologija sušenih mesnin – sušenih klobas	6
2.2 STARTERSKE KULTURE	8
2.2.1 Vloga in uporaba starterskih kultur	8
2.2.1.1 Mlečnokislinske bakterije	10
2.2.1.2 Mikrokokki	11
2.2.1.3 Kvasovke in plesni	12
2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na rast mikroorganizmov v sušenih mesninah	13
2.2.2.1 Skupno število mikroorganizmov	13
2.2.2.2 a_w vrednost	13
2.2.2.3 pH vrednost	13
2.2.2.4 Redoks potencial	14
2.2.2.5 Sladkorji	14
2.2.2.6 Začimbe	15
2.2.2.7 NaCl, nitrit, nitrat	15
2.2.2.8 Temperatura	16
2.3 PROBIOTIKI IN PREBIOTIKI	17
2.3.1 Mikroflora humanega prebavnega trakta	17
2.3.2 Probiotiki	18
2.3.2.1 Definicija in zahteve za probiotične seve	18
2.3.2.2 Probiotične bakterije in probiotični izdelki	19
2.3.2.3 Probiotiki in njihov vpliv na zdravje	22
2.3.2.4 Komercialne probiotične kulture za fermentirane probiotični izdelke	22
2.3.3 Prebiotiki	22
2.3.4 Sinbiotiki	24
2.4 SENZORIČNE LASTNOSTI SUŠENIH KLOBAS	24
2.4.1 Senzorične lastnosti sušenih klobas	24

2.4.2	Vpliv starterskih kultur na senzorične lastnosti sušenih klobas	25
2.5	EMBALIRANJE SUŠENIH MESNIN	27
3	MATERIAL IN METODE	28
3.1	MATERIAL IN NAČRT POSKUSA	28
3.1.1	Načrt poskusa	28
3.1.2	Material za poskus	29
3.1.2.1	Izdelki	29
3.1.2.2	Dodatki	30
3.2.3	Tehnološki postopek	30
3.2.	METODE DELA	31
3.2.1	Fizikalne analize	31
3.2.1.1	Izguba mase	31
3.2.1.2	Merjenje pH vrednosti	31
3.2.1.3	Merjenje a_w vrednosti	31
3.2.2	Kemijske analize	32
3.2.2.1	Določanje vsebnosti vode	32
3.2.2.2	Določanje vsebnosti maščob	32
3.2.2.3	Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi	33
3.2.2.4	Določanje vsebnosti soli	33
3.2.2.5	Določanje vsebnosti beljakovin	34
3.2.2.6	Določanje vsebnosti inulina	35
3.2.2.7	Izračun energijske vrednosti v kJ/100 g izdelka	35
3.2.3	Instrumentalne analize	36
3.2.4	Senzorična analiza	37
3.2.5	Mikrobiološka analiza	38
3.2.5.1	Priprava vzorcev	38
3.2.5.2	Ugotavljanje števila mikroorganizmov	38
3.2.5.3	Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrste <i>Lactobacillus paracasei</i> z metodo PCR	39
3.2.6	Statistična analiza	39
4	REZULTATI	41
4.1	OSNOVNI STATISTIČNI PARAMETRI REZULTATOV - SENZORIČNIH, INSTRUMENTALNIH, FIZIKALNO- KEMIJSKIH IN MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ IZDELKOV	41
4.2	VPLIV SKUPINE NA IZMERJENE PARAMETRE	43
4.2.1	Senzorične lastnosti izdelkov in instrumentalne analize teksture	43
4.2.2	Fizikalno-kemijski parametri izdelkov	45
4.2.2.1	pH vrednost izdelkov	47
4.2.2.2	Izguba mase (%) med sušenjem/zorenjem izdelkov	48
4.2.2.3	Izračunana energijska vrednost izdelkov	49
4.2.3	Mikrobiološka analiza izdelkov	49
4.2.3.1	Potrjevanje preživetja <i>L. paracasei</i> z analizo DNA z reakcijo PCR, specifično za to vrsto	51
4.3	KORELACIJSKA ANALIZA	52
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	55

5.1	RAZPRAVA	55
5.2	SKLEPI	57
6	POVZETEK	58
6.1	POVZETEK	58
6.2	SUMMARY	60
7	VIRI	62

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	stran
Preglednica 1: Vsebnost maščob v mesnih izdelkih (Colmenero, 2000)	4
Preglednica 2: Vpliv starterskih kultur na zorenje fermentiranih klobas (Čavlek, 1997)	12
Preglednica 3: Tehnološki parametri med osušenjem/zorenjem salaminov	30
Preglednica 4: Parametri poteka reakcije PCR	39
Preglednica 5: Povprečne vrednosti rezultatov analiz vseh vzorcev	41
Preglednica 6: Viri variabilnosti rezultatov analiz izdelkov in njihova statistična značilnost	42
Preglednica 7: Vpliv skupine na senzorične lastnosti in instrumentalno izmerjeno teksturo salaminov	44
Preglednica 8: Vpliv skupine na fizikalno-kemijske parametre salaminov	46
Preglednica 9: Vpliv skupine in časa zorenja na spreminjanje pH vrednosti salaminov	47
Preglednica 10: Izguba mase (%) med sušenjem/zorenjem salaminov	48
Preglednica 11: Izračunana energijska vrednost salaminov (kJ/100 g)	49
Preglednica 12: Vpliv skupine na mikrobiološke parametre salaminov	50
Preglednica 13: Korelacijski koeficienti (r) med instrumentalnimi in drugimi parametri salaminov	52
Preglednica 14: Korelacijski koeficienti (r) med senzoričnimi in fizikalno-kemijskimi parametri salaminov	53
Preglednica 15: Korelacijski koeficienti (r) med vsebnostjo inulina ter instrumentalnimi, senzoričnimi in fizikalno-kemijskimi parametri salaminov	54

KAZALO SLIK

	stran
Slika 1: Dejavniki, ki vplivajo na razvoj mesnih izdelkov z zmanjšano vsebnostjo maščob (Colmenero, 2000)	3
Slika 2: Prikaz sprememb pH vrednosti in izgube mase ter prevladujoče mikrobne populacije, med zorenjem sušenih klobas (Lücke, 1985)	7
Slika 3: Nastavek Volodkevich (Texture analyser TA.XT plus, 2005)	36
Slika 4: Nastavek Kramer (Texture analyser TA.XT plus, 2005)	36
Slika 5: Primer grafa opravljenih meritev z nastavkom Volodkevich	45
Slika 6: Primer grafa opravljenih meritev z nastavkom Kramer	45
Slika 7: Spreminjanje pH vrednosti med sušenjem/zorenjem salaminov	47
Slika 8: Izguba mase (%) med sušenjem/zorenjem salaminov	48
Slika 9: Rezultati mikrobioloških analiz ob koncu zorenja ter po dvomesečnem skladiščenju salaminov	50
Slika 10: Pomnožki PCR reakcije specifične za vrsto <i>L. paracasei</i> po elektroforezi na 2 % agaroznem gelu	51

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a_w = termodinamska aktivnost vode

DNA = deoxyribonucleic acid = deoksiribonukleinska kislina

EV = energijska vrednost

ke/ml = kolonijske enote mikroorganizmov v 1 g/ml vzorca

KV = koeficient variabilnosti

L. = *Lactobacillus*

L. p. = *Lactobacillus paracasei*

N = Newton = enota za merjenje sile

n = število obravnavanj

P = verjetnost

PP = izdelek narejen z dodatkom probiotika in prebiotika

PP + MM = izdelek, kateri ima poleg dodatka probiotika in prebiotika zmanjšano vsebnost maščob

PCR = polymerase chain reaction = verižna reakcija s polimerazo

RV = relativna vlažnost

so = standardni odklon

SŠMO = skupno število mezofilnih mikroorganizmov

standard = izdelek narejen po standardni recepturi

TLC = thin layer chromatography – tankoplastna tekočinska kromatografija

2m = meritve opravljene po dvomesečnem skladiščenju gotovih izdelkov

1 UVOD

V sodobni prehrani postaja funkcionalna hrana vse pomembnejša. Poleg osnovne naloge oskrbovanja organizma s potrebnimi hranili, prispeva k boljšemu in učinkovitejšemu delovanju organizma ter sodeluje v preventivi pred boleznimi. Prva generacija funkcionalne hrane je vključevala izdelke, obogatene z nekaterimi sestavinami, pomembnimi s prehransko-fiziološkega vidika in vidika ohranjanja zdravja, kot so kalcij, vitamini, antioksidanti. Novejše raziskave pa so usmerjene v izdelke, ki učinkujejo na sestavo in aktivnost mikroflore prebavnega trakta. V tej kategoriji imajo probiotiki, s svojim ugodnim vplivom na mikrobnno ravnotežje v prebavilih, vodilno vlogo. Možnosti vključevanja probiotičnih bakterij v hrano so dodobra raziskane v fermentiranih mlečnih izdelkih (jogurti, mlečni napitki, siri, sirotkini koncentradi). Sušene klobase, kot termično neobdelani mesni izdelki, so lahko tudi primerno živilo za vnos probiotične bakterije v človekov prebavni trakt, kar pa je še malo raziskano.

1.1 NAMEN DELA

Namen raziskave je bil razvoj sušene mesnine z lastnostmi sinbiotičnega živila ter razvoj izdelka, ki izpolnjuje sodobne prehranske zahteve v smeri živil z zmanjšano vsebnostjo maščob oziroma z nižjo energijsko vrednostjo. Primerjali smo senzorične in prehranske parametre kakovosti sušenih klobas, izdelanih po standardni recepturi, sušenih klobas z dodatkom probiotične bakterije (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) in dodatkom dietnih vlaknin (inulina) ter klobas, katere so poleg dodatka probiotika in prebiotika imele spremenjeno sestavo nadeva - zmanjšano vsebnost maščob.

1.2 HIPOTEZA

Postavili smo hipotezo, da dodane probiotične bakterije ne bodo negativno vplivale na senzorične lastnosti izdelkov. Prav tako smo predvidevali, da bodo dodane probiotične bakterije preživele tehnološki postopek in bo končni izdelek vseboval v 1 g vsaj 10^7 živih celic probiotične bakterije, ob koncu zorenja kot tudi po dvomesečnem skladiščenju izdelka. Dodatek prebiotika inulina in zmanjšana vsebnost maščob pa naj bi izboljšala prehransko vrednost izdelka, brez občutnega poslabšanja senzorične kakovosti.

Med zorenjem izdelkov smo spremljali fizikalne parametre, ob koncu zorenja izdelkov pa smo opravili kemijske, fizikalne, senzorične, instrumentalne in mikrobiološke analize izdelkov. Mikrobiološke analize smo opravili tudi po dvomesečnem skladiščenju izdelkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OSNOVE TEHNOLOGIJE SUŠENIH KLOBAS

2.1.1 Tehnološki postopek za sušene klobase

Tehnološki postopek priprave sušenih klobas se prične z izbiro ustrezne surovine. Najpogosteje se uporablja sveže svinjsko meso, normalne kakovosti, blede, mehko, vodeno meso (BMV), kot tudi TČS (temno, čvrsto, suho) meso ni primerno. Dodatne prednosti prinaša meso nekoliko starejših, težjih prašičev. Za sušene klobase je primerna le čvrsta hrbtna slanina. Mišičnina in slanina morata biti pred razdevanjem primerno ohlajeni ali celo namrznjeni, saj le tako lahko izdelamo nadev s primernim mozaikom. Razdevanju surovin sledi dodajanje soli, aditivov in začimb ter mešanje. Nadev polnimo v naravne ali prepustne umetne ovitke različnega premera. Primernejši so vakuumski stroji za mešanje in vakuumski polnilniki, ki omogočajo odstranitev čimveč zraka iz nadeva pred polnjenjem, kar prepreči oksidativne napake izdelka.

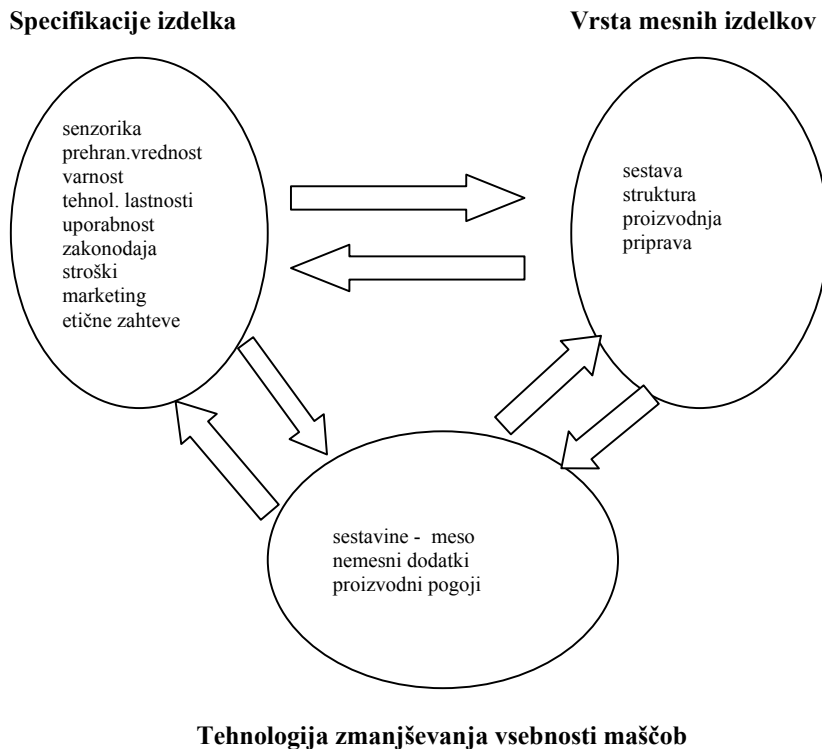
Sledita fazi sušenje (z ali brez dimljenja) in zorenje, ki potekata sočasno v prostorih, kjer sta temperatura in relativna vlaga kontrolirani. Med zorenjem potekajo biokemične, mikrobiološke in fizikalne spremembe, ki so pogoj za oblikovanje fizikalno-kemičnih in senzoričnih lastnosti ter obstojnost teh izdelkov. Oblikujejo se aroma, tekstura in značilna barva izdelka. Kljub osuševanju (izgubljanju vode) postajajo izdelki zaradi zorenja in razgradnje sestavin mehkejši, poveča se sočnost in topnost, izboljšata se vonj in okus.

2.1.2 Mesnine z zmanjšano vsebnostjo maščob

Prekomerno uživanje maščob ni priporočljivo, saj povečuje tveganje razvoja kardiovaskularnih obolenj, povišanega krvnega pritiska, kapi, diabetesa, debelosti in nekaterih oblik raka. Maščobe pa tudi vplivajo na nivo holesterola in drugih lipidov v krvi. Svetovna zdravstvena organizacija je izdala priporočila za dovoljeni dnevni vnos maščob in holesterola v prehrani. Priporočena dnevna količina maščob je do 30 % od skupnih zaužitih kalorij ter holesterola pod 300 mg (Žlender, 1997).

Tako v svetu kot pri nas so v zadnjih letih trendi v smeri naraščanja povpraševanja po mesninah z manjšo vsebnostjo maščob, kar skuša mesnopredelovalna industrija doseči z razvojem novih izdelkov z manj maščobe in/ali z maščobami s spremenjeno maščobnokislinsko sestavo.

Tehnologija izdelave mesnin z manj maščobami in/ali z maščobami s spremenjeno sestavo je zasnovana na odbiri mesa s primerno sestavo, zmanjšanju maščob in energijske vrednosti z dodatkom maščobnih nadomestkov z malo ali nič kalorijami (dodana voda, beljakovinski nadomestki rastlinskega ali živalskega izvora, ogljikohidratni nadomestki, sintetični nadomestki) ter v izbiri primernih proizvodnih tehnologij oz. prilagoditvi proizvodnih postopkov (Keeton, 1994; Žlender, 1997; Žlender, 2000).



Slika 1: Dejavniki, ki vplivajo na razvoj mesnih izdelkov z zmanjšano vsebnostjo maščob (Colmenero, 2000)

Zmanjšanje maščob v surovinah lahko dosežemo s selekcijo živali na manjšo zamaščenost in s spremembo prehrane živali ali z odbiro bolj pustega mesa, kateremu smo z obrezovanjem ali s fizikalno-kemijskimi postopki odstranili podkožno in medmišično mastnino.

Chizzolini in sodelavci (1999) navajajo, da je prednost uporabe pustega mesa lahko tudi v spremenjeni maščobnokislinski sestavi. Vsebnost nasičenih maščobnih kislin v teh živilih je lahko manjša, vsebnost nenasičenih maščobnih kislin pa povečana.

Maščobni nadomestki so sestavine ali aditivi brez ali z minimalno energijsko vrednostjo, ki ne poslabšajo izgleda, vonja in okusa, teksture in drugih senzoričnih ter tehnoloških lastnosti mesnin. Nadomestki se, sami ali v kombinaciji, uporabljajo za delno ali popolno zamenjavo maščob. Nemesni proteinski nadomestki (sojini proteini, mlečni proteini, vezivno tkivo, predvsem v obliki kožne emulzije) in ogljikohidratni nadomestki (hidrokoloide, škrobi, maltodekstrini, celulozni derivati in druge dietne vlaknine) se uporabljajo z namenom vezave dodane vode, izboljšujejo sposobnost zadrževanja vode v izdelku ter zmanjšujejo stroške proizvodnje.

Mendoza in sodelavci (2001) opisujejo uspešno uporabo dietne vlaknine inulina, v koncentraciji med 7,5 in 12,5 %, kot maščobnega nadomestka v sušenih klobasah. S tem

dodatkom so zmanjšali vsebnost maščob v sušenih klobasah od 40 do 50 % in dosegli 30 % zmanjšanje energijske vrednosti, v primerjavi s klasično proizvodnjo sušenih klobas.

V raziskavah spreminjanja sestave grških sušenih fermentiranih klobas (Muguerza in sod., 2004) pa so prišli do zaključkov, da je možno nadomestiti 20 % trde hrbtnne slanine z oljčnim oljem, predhodno emulgiranim s sojinimi proteini. Končni izdelki vsebujejo od 37 do 53 % manj maščob kot tradicionalni izdelki. Vsako večje zmanjšanje vsebnosti maščob pa vodi do večjega osuška, čvrstjše teksture in temnejše barve izdelka.

Tudi prilagoditev proizvodnih postopkov, kot na primer predhodno emulgiranje, časovna določitev dodajanja sestavin, postopek razdevanja, izbira ustreznih embalažnih materialov in postopek embaliranja ter skladiščenje, vpliva na lastnosti izdelkov s spremenjeno maščobnokislinsko sestavo (Žlender, 1997).

Klobase z bolj razdetimi sestavinami so primernejše za uporabo maščobnin nadomestkov kot grobo mlete. Vendar pa bo kljub temu, da začetni vnos maščob zmanjšujemo iz 30 % do 5 %, zaradi osuševanja končen izdelek vseboval ob koncu zorenja tudi do 15 % maščob. Najnižja sprejemljiva vsebnost maščob v teh izdelkih ob koncu zorenja je med 20 in 30 % (Colmenero, 2000).

Preglednica 1: Vsebnost maščob v mesnih izdelkih (Colmenero, 2000)

izdelki	vsebnost maščob (%)
presne klobase	30 - 50
pasterizirane mesnine (hrenovke, mortadele,..)	20 - 30
sterilizirane mesnine - paštete	30 - 45
pasterizirane mesnine - kuhan pršut	< 10
pasterizirane mesnine z zmanjšano vsebnostjo maščob	< 3
sušene mesnine - pršut	< 20
sušene mesnine - klobase	30 - 50
sušene mesnine - klobase z zmanjšano vsebnostjo maščob	20 - 30

Izdelovanje mesnin z zmanjšano količino maščob pa s tehnološkega vidika pogosto ni enostavna naloga. Zmanjšanje vsebnosti maščob, brez drugih vzporednih ukrepov, ponavadi poslabša jedilno kakovost mesnin, saj se spremeni sestava izdelkov, s tem pa tudi njihove senzorične lastnosti, predvsem barva, aroma in tekstura. Hkrati z naštetim je strošek proizvodnje in s tem cena mesnin z manj maščob 10 do 30 % višja od izdelkov z

običajno vsebnostjo maščob. Novi izdelki, z manjšo količino maščob in/ali maščobami s spremenjeno maščobnokislinsko sestavo, pa morajo biti ne samo senzorično sprejemljivi, temveč najmanj enakovredni izdelkom z normalno visoko vsebnostjo maščob (Rajar, 1997; Colmenero, 2000).

Poleg vpliva na senzorične lastnosti lahko sprememba sestave, z uporabo maščobnih nadomestkov, vpliva na poslabšanje povezanosti delcev, na krajšo obstojnost izdelkov in povečano izcejo po vakuumskem pakiranju. Zamenjava nasičenih maščobnih kislin z nenasičenimi pa lahko poleg prednosti prinaša tudi spremembe fizikalno-kemijskih parametrov, ki negativno vplivajo na senzorične lastnosti (teksturo, barvo) ter povečujejo možnosti oksidacije (Keeton, 1994; Colmenero, 2000).

2.1.3 Zorenje sušenih klobas

Zorenje je kompleksen kemijsko-biokemijski proces razgradnje beljakovin, maščob in ogljikovih hidratov, v katerem sodelujejo lastni encimi mišičnine in mastnine ter encimi naravno prisotnih ali dodanih kultur mikroorganizmov (Žlender, 2001).

V prvi fazi zorenja poteka fermentacija sladkorjev pod vplivom glikolitičnih encimov ali kot rezultat metabolne aktivnosti prisotne mikroflore. V sušenih mesninah mikroorganizmi najprej razgradijo dodane ogljikove hidrate (Bem in Adamič, 1991). Šele ko so sladkorji porabljeni, prično aerobni mikroorganizmi in fakultativni anaerobi razgrajevati aminokislino, ki služijo kot alternativni vir ogljika in vir energije. Količina in vrsta dodanega sladkorja sta pomembni, saj vplivata na hitrost in obseg tvorbe mlečne kisline pod vplivom prisotne mikroflore. Če se dodajajo velike količine hitrofermentirajočih sladkorjev (npr. glukoze), je padec pH vrednosti lahko tako hiter, da so na kislost občutljive bakterije, ki pa lahko prispevajo k zelenim lastnostim klobas, zaustavljene. Po drugi strani pa premalo dodanega sladkorja in/ali izbira sladkorja, ki se počasi razgradi, lahko vpliva tudi na rast neželenih mikroorganizmov, še posebej pri zorenju na višjih temperaturah. V sušenih klobasah mikroorganizmi razgradijo dodane sladkorje najprej na organske kisline, pa tudi na alkohole, aceton, vodik in ogljikov dioksid. Med mlečnokislinsko fermentacijo homofermentativne bakterije oblikujejo predvsem želeno mlečno kislino. Heterofermentativne vrste iz istih rodov pa poleg mlečne kisline oblikujejo tudi precej etanola, očetno in mravljično kislino, ki neugodno vplivajo na aromo mesnin. Večja količina CO₂, ki se oblikuje med procesom, lahko povzroča luknjičavost mesnin. Ti produkti fermentacije, v kombinaciji z dodatki soli, nitritov in glukono-delta-laktone, upočasnijo razmnoževanje tehnološko škodljivih (kvarljivcev) in zdravju nevarnih (patogenih) mikroorganizmov.

Med zorenjem sušenih klobas poteka encimska razgradnja proteinov. Encimi cepijo beljakovine na manjše molekule, na polipeptide in peptide ter v manjši meri na proste aminokislino in na njihove elementarne sestavine (Meszaroš, 2000). Posledica encimskih procesov je sprememba mikrostrukture, fragmentacija mišičnih vlaken pa je glavni vzrok mehčanja mišičnine med zorenjem. Ta razgradnja je rezultat aktivnosti proteolitičnih

endogenih encimov (kalpainsi, katepsini, peptidaze, aminopeptidaze) in manj proteolitičnih mikrobnih encimov. Rezultati številnih raziskav kažejo, da je za zelen senzoričen učinek bistvenega pomena aktivnost endogenih proteaz v začetni fazi zorenja/sušenja, bakterijske proteaze pa so pomembne v kasnejših fazah zorenja/sušenja. Mikroorganizmi lahko razgrajujejo le že hidrolizirane proteine do stopnje peptidov in aminokislin, v procesu deaminacije in dekarboksilacije razgrajujejo aminokislino ter tako sodelujejo pri oblikovanju arome. Pri TČS mesu je proteolitična aktivnost katepsinov zmanjšana, kar upočasni zorenje, nasprotno pa je pri BMV mesu proteolitična aktivnost povečana in zorenje pospešeno, kar se pokaže s povečano količino prostih aminokislin (Žlender, 2001). Na obseg proteolize med zorenjem suhih klobas pomembno vpliva prisotna mikroflora (naravna ali dodani starterji), pogoji med procesom (temperatura, RV), razdetost mesa, premer ovitka in drugi dejavniki. Najbolj odločilna parametra, ki vplivata na aktivnost mišičnih in bakterijskih aminopeptidaz med zorenjem sta temperatura in pH vrednost.

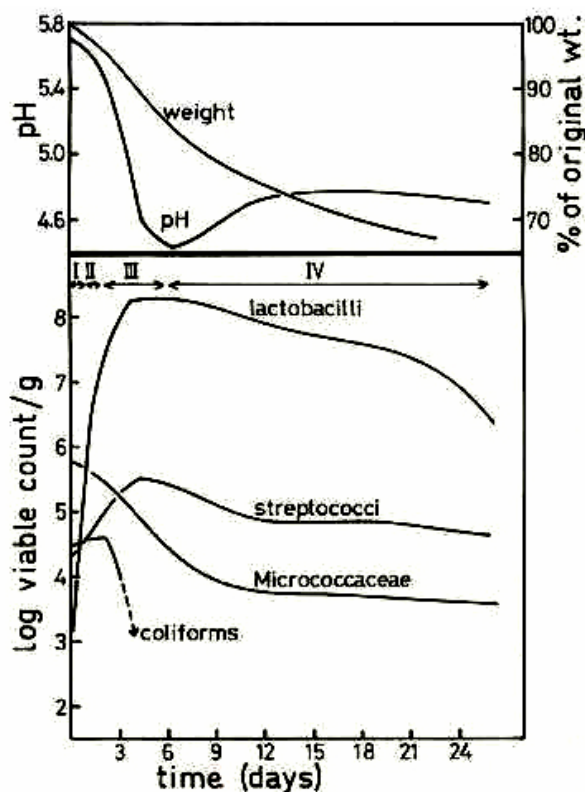
Na razvoj in nastanek arome ter značilnega vonja sušenih klobas, pomembno vplivajo encimski procesi v maščobnem tkivu. Lipoliza je encimska razgradnja mastnine na glicerol, proste maščobne kisline, monogliceride in digliceride. Poleg lipaz mišičnine sodelujejo lipaze mikrobiološkega izvora. Največji pomen za oblikovanje arome imajo maščobne kisline, tako nasičene kot nenasičene, ki imajo pomembno vlogo kot prekursorji pri nastanju manjših molekul z močno izraženimi aromatičnimi lastnostmi. Maščobne kisline, zlasti nenasičene, se oksidirajo ter pospešujejo lipooksidaze v mastnini in oksidaze večine aerobnih bakterij. Oksidacijo katalizirajo kovinski ioni, organske kovinske spojine in svetloba (Bem in Adamič, 1991). V procesu oksidacije se oblikujejo aldehidi, ketoni in maščobne kisline s kratkimi verigami. Majhne količine teh spojin prispevajo k oblikovanju značilne arome suhih mesnin, večje količine pa niso zaželeni, ker ustvarijo neprijetno aromo po žarkem.

2.1.4 Mikrobiologija sušenih mesnin – sušenih klobas

Poreklo mikroflora sušenih mesnin je normalno kontaminirana mišičnina in mastnina, dodatki in ovitki. Sestava začetne mikroflora se med tehnološkim postopkom spreminja kot posledica učinkovanja zunanjih, notranjih in implicitnih faktorjev. Mišičnina in mastnina sta kontaminirani z 10^3 do 10^6 mikroorganizmov/gram (Bem in Adamič, 1991). Prisotna mikroflora, značilna za sveže meso, so predstavniki iz družin *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Pseudomonadaceae* in *Enterobacteriaceae*, poleg bakterij pa tudi kvasovke in plesni. Po polnjenju nadeva v ovitke se giblje število živih mikroorganizmov med 10^5 do 10^6 /gram. Gram-negativne bakterije družin *Pseudomonadaceae* in *Enterobacteriaceae* so prisotne le v začetku zorenja in so zaradi znižanja pH vrednosti, prisotnosti soli in nitrita ter delovanja laktobacilov, hitro inhibirane (Čavlek, 1997).

V začetnih fazah zorenja pride do razvoja in dominacije tehnološko pomembnih mikroorganizmov: laktobacilov, pediokokov, mikrokokov in stafilokokov. Od prisotnih vrst so tehnološko najpomembnejše mlečnokislinske bakterije. Hrana živalskega izvora,

vkjučno z mesom, je bogata z vitamini skupine B, zato se laktobacili, ki so sicer občutljivi na pomanjkanje teh vitaminov, v mesu hitro razmnožujejo (Bem in Adamič, 1991). Njihovo število v prvih dneh zorenja hitro narašča na 10^8 do 10^9 /gram, s tvorbo organskih kislin znižujejo pH vrednost ter tako vplivajo na varnost izdelka ter tudi ugodno vplivajo na oblikovanje senzoričnih lastnosti – aromo in teksturo izdelka (Čavlek, 1997). Nekateri zeleni predstavniki iz družine *Micrococcaceae* prispevajo k stabilizaciji barve, saj sodelujejo pri redukciji nitrata v nitrit ter tvorbi nitrozo-mioglobina, ki daje razsoljenemu mesu zeleno, značilno in sorazmeroma stabilno barvo (Varnam in Sutherland, 1995). Mikrokoki s svojo katalazno aktivnostjo preprečujejo žarkost mastnin (Leistner, 1995) ter s produkcijo lipolitičnih encimov vplivajo na razvoj vonja in okusa. Poleg bakterij, pri oblikovanju senzoričnih lastnosti, pomembno sodelujejo tudi plesni in kvasovke. Število kvasovk se tekom zorenja zmanjšuje, ob koncu zorenja so prisotne le še na površini izdelka. Kvasovke v nadevu zmanjšujejo redoks potencial in sodelujejo pri razvoju arome izdelka. Plesni poleg vpliva na aromo izdelka sodelujejo tudi pri dinamiki sušenja ter pri oblikovanju značilnega izgleda površine.



Slika 2: Prikaz sprememb pH vrednosti in izgube mase ter prevladujoče mikrobne populacije, med zorenjem sušenih klobas (Lücke, 1985)

Legenda: weight - masa vzorcev % of original wt. - % mase glede na začetno maso
log viable count/g - log kolonijskih enot mikroorganizmov/g vzorca
time (days) - čas zorenja (dnevi) pH - pH vrednost
pogoji zorenja: (I) 4 °C; (II) 18 °C; (III) 24 °C, dim; (IV) 18 do 20 °C

Vpliv mikroorganizmov na kakovost končnega izdelka je odvisen od vrste mikroorganizmov, njihovega števila in interakcije s komponentami mesa in okolja ter tudi od medsebojnega razmerja med populacijami naselitvene mikroflore.

Tradicionalna proizvodnja sušenih mesnin (klobas) sloni na biokemijskih procesih, v katerih poleg naravno prisotnih encimov sodeluje naravno prisotna mikroflora, medtem ko v industrijski proizvodnji sušenih klobas prevladuje uporaba starterskih kultur.

2.2 STARTERSKE KULTURE

2.2.1 Vloga in uporaba starterskih kultur

V živilski industriji je že dolgo znano, da le konstantna kakovost in varnost izdelka lahko zadovolji pričakovanja vse bolj osveščenega potrošnika. Če želimo to doseči, je nujna optimizacija in standardizacija proizvodnih procesov. Na potek proizvodnje vplivajo številni dejavniki, ki lahko pomembno vplivajo tudi na kakovost končnega izdelka; eden od načinov, kako zmanjšati vpliv različnih dejavnikov in se izogniti večji porabi aditivov, je tudi dodajanje mikroorganizmov v obliki starterskih kultur.

Prednosti, ki jih prinaša uporaba starterskih kultur so:

- povečuje stabilnost in zmanjša higienska tveganja proizvodnega procesa, saj dodani mikroorganizmi že v prvih fazah osuševanja prevladajo nad avtohtono mikrofloro, znižajo pH vrednost ter inhibitorno delujejo na neželene mikroorganizme,
- možni sta kontrola in regulacija fermentacijskega procesa, kar zagotavlja konstantno in visoko raven kakovosti izdelkov,
- izboljšana je ekonomičnost proizvodnje zaradi skrajšanja časa sušenja/zorenja in manjšega deleža izdelkov s tehnološkimi napakami,
- zmanjšano je higiensko tveganje in podaljšana obstojnost izdelkov zaradi protimikrobnega delovanja primarnih in sekundarnih metabolitov starterskih kultur (predvsem mlečnokislinskih bakterij) na patogene mikroorganizme in tehnološke kvarljivce živil,
- dane so možnosti za zmanjšano uporabo nekaterih kemijskih aditivov npr. protimikrobnih sredstev, kemijskih zakisovalcev (glukono-delta-lakton),
- izboljšana je prehranska vrednost fermentiranih živil (lažja prebavljivost, višje vsebnosti peptidov, aminokislin, prostih maščobnih kislin, zmanjšanje ostankov kemijskih dodatkov), dokazan je pozitiven (probiotični) vpliv nekaterih biokultur na mikrobno združbo intestinalnega trakta,
- oblikovanje specifičnih senzoričnih lastnosti (vpliv starterskih kultur na barvo, specifično aromo, teksturo, zunanji videz),
- uporaba starterskih kultur z različnimi encimskimi sistemi daje možnosti proizvodnje širšega asortimana izdelkov, ki jih ni možno proizvesti s spontano fermentacijo (Smole Možina in Raspov, 1994; Hansen, 2002).

Starterske kulture so definirane kot tekoče, zmrznjene ali liofilizirane mono, združene ali mešane kulture živih mikroorganizmov z encimskim potencialom, ki v pogojih proizvodnje odločilno vpliva na oblikovanje lastnosti izdelka – fermentiranega živila.

Tako opredeljene starterske kulture ustrezajo definiciji aditivov za živila, saj se dodajajo med njihovo proizvodnjo, da bi se ohranila oz. izboljšala vrednost izdelka. Vsekakor so mikroorganizmi zaradi kompleksnosti metabolnih reakcij, ki potekajo v živih celicah ali jih sprožijo v živilu, specifična vrsta aditivov (Smole Možina in Raspor, 1994).

Komercialne starterske kulture sestavljajo različni predstavniki bakterij, plesni in kvasovk. Najpogosteje zastopani mikroorganizmi v starterskih kulturah so: bakterije rodov *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. sake*, *L. casei*, *L. curvates*, *L. pentosus*, *L. alimentarius*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), *Staphylococcus* (*S. xylosus*, *S. carnosus*), *Micrococcus* (*M. varians*), *Streptomyces* (*S. griseus*), kvasovke *Debarymyces hansenii* in plesni *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium chrysogenum* (Čavlek, 1997; Incze, 2003).

Mikroorganizmi starterskih kultur so dodani v nadev v količini od 10^6 do 10^7 celic/g (Varnam in Sutherland, 1995) in že v prvih fazah osuševanja prevladajo nad avtohtono mikrofloro in znižajo pH vrednost. Tudi število bakterij, dodanih v nadev, je dejavnik, ki pomembno vpliva na hitrost fermentacije. Večje število dodanih mikroorganizmov vpliva na hitrejšo fermentacijo, vendar ne vpliva na končno pH vrednost (Hansen, 2002).

Starterske kulture, ki se uporabljajo v proizvodnji sušenih klobas, so večinoma homofermentativne. Pretvorba glukoze poteka po glikolitični poti, mlečna kislina predstavlja 90 % končnega proizvoda. Heterofermentativni sevi izkoriščajo fosfoketolazno pot, pri kateri poleg mlečne kisline nastajajo še acetat, etanol, različne organske kisline in CO₂. Neželeni metabolni produkti starterskih kultur skušamo zmanjšati z uporabo vse bolj selekcioniranih sojev (Smole Možina in Raspor, 1994).

Delovanje dodanih mikroorganizmov tekom zorenja je odvisno od številnih dejavnikov: sestave nadeva, izbire aditivov, halotolerantnosti dodanih mikroorganizmov, sposobnosti redukcije nitrata, proizvodnih pogojev in temperature med zorenjem. Zato je potrebno, za pravilno uporabo starterskih kultur, poznavanje njihove metabolne in fiziološke aktivnosti, poznati pa je potrebno tudi vpliv zunanjih in notranjih dejavnikov na njihovo učinkovitost. Pri izbiri starterskih kultur moramo upoštevati njihovo zmožnost acidifikacije, končne pH vrednosti, njihov vpliv na senzorične lastnosti izdelkov. Le ob upoštevanju vseh naštetih dejavnikov lahko izkoristimo prednosti uporabe starterskih kultur. Zavedati se moramo, da lahko izbira neprimernih starterskih kultur, kot tudi nepravilno voden tehnološki postopek, vodita do kopičenja neželenih metabolnih produktov, ki lahko močno poslabšajo kakovost izdelka ali celo predstavljajo nevarnost za zdravje potrošnikov.

2.2.1.1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije so ena izmed industrijsko najpomembnejših skupin bakterij, ki pri procesu fermentacije pomembno prispevajo k zmanjšanju higienskega tveganja ter k boljši senzorični kakovosti končnih izdelkov.

Najpomembnejši protimikrobni/varovalni učinek mlečnokislinskih bakterij je posledica tvorbe organskih kislin med fermentacijo ogljikovih hidratov.

Povišana kislost in znižana pH vrednost imata številne ugodne učinke na tehnološki proces, kakovost in obstojnost izdelka, in sicer:

- omogočata selekcijo karakteristične mikroflore in inhibicijo neželene (dodani mikroorganizmi že v prvih fazah osuševanja prevladajo nad avtohtono mikrofloro),
- pomagata pri oblikovanju primerne teksture, saj se zmanjša sposobnost mišičnih proteinov za vezanje vode, kar omogoča učinkovitejši proces dehidracije,
- sta selektivni dejavnik pri kontroli encimskih reakcij, ki prispevajo k oblikovanju arome in pospešujeta redukcijske reakcije, ki so potrebne za oblikovanje primerne barve (Meszaroš, 2000).

Za številne predstavnike mlečnokislinskih bakterij je značilna visoka metabolna aktivnost, predvsem pri višjih temperaturah fermentacije (do 40 °C), kar omogoča skrajšanje proizvodnega procesa, vendar se ta lastnost pogosto odraža tudi kot neželen kisli priokus končnega izdelka (Hansen, 2002).

Učinek nastale mlečne kisline, ki ga spremlja nižanje pH vrednosti, se kaže predvsem kot inhibicija ali inaktivacija encimov v celični membrani in v citoplazmi neželenih mikroorganizmov, predvsem so to gram-negativne bakterije. Nekateri mlečnokislinske bakterije komercialnih starterskih kultur imajo tudi encime fosfoketolaze (Jessen, 1995), tako so poleg mlečne kisline možni tudi drugi metabolni produkti v nadevu suhih klobas na primer acetat in CO₂. Produkti heterofermentativnih bakterij, kot so na primer mravljična in očetna kislina, vodikov peroksid, diacetil in CO₂, neugodno vplivajo na proces zorenja in kakovost izdelkov (neugoden vpliv na aromo, luknjičavost zaradi CO₂), vendar pa inhibirajo neželeno mikrofloro.

Produkti mlečnokislinskih bakterij s protimikrobnim učinkom, kot so vodikov peroksid, diacetil in bakteriocini, močno prispevajo k primernosti uporabe določene starterske kulture. Bakteriocini so proteini oz. proteinski kompleksi, ki so pogosto vezani na lipide ali ogljikove hidrate. Njihovo delovanje je baktericidno in bakteriostatično. Primer takšnih bakteriocinov so sakacin A in P, ki sta bila odkrita pri bakterijah *Lactobacillus sake* in curvacin A pri bakterijah *Lactobacillus curvatus*. Ti dve vrsti sta prilagojeni ekološkemu pogojem med fermentacijo mesa in prevladata nad ostalo mikrobo asociacijo (Smole Možina in Raspor, 1994). Bakteriocini nekaterih sevov vrste *Lactobacillus sake* naj bi uspešno inhibirali rast vrste *Listeria monocytogenes* (Leistner, 1995).

Pomembna tehnološka lastnost nekaterih mlečnokislinskih bakterij je zmožnost razgradnje peroksidov. Peroksidi, ki so metabolni produkti nekaterih starterskih bakterij, so v nadevu klobas zelo nezaželeni, saj povzročajo številne oksidacijske procese, ki lahko vodijo do pojava diskoloracij in/ali žarkosti končnih izdelkov. Prisotnost peroksidov preprečujemo z uporabo kombiniranih starterskih kultur, ki imajo tudi katalaza pozitivne mikroorganizme ali pa z uporabo laktobacilov kot na primer *L. sake*, *L. curvates*, *L. plantarum*, ki s posebnimi mehanizmi (psevdokatalaze) pod določenimi pogoji razgrajujejo v izdelku nastali peroksid (Čavlek, 1997).

Celo tvorci organskih kislin, kot so laktobacili, so znani tudi kot proteolitični in lipolitični mikroorganizmi (*L. casei*, *L. plantarum*). S svojimi proteolitičnimi in lipolitičnimi encimi prispevajo tudi k razvoju primerne okusa in arome klobas, zlasti v poznejših fazah zorenja/sušenja.

Glede na opisane lastnosti so kriteriji, ki jih upoštevamo pri izbiri mlečnokislinskih bakterij naslednji: sposobnost zakisanja nadeva, rast pri določenih temperaturah, homofermentativna aktivnost, vztrajnost do konca zorenja, prisotnost psevdokatalaze, sodelovanje pri tvorbi aromatičnih komponent, da ne tvorijo peroksidov, da ne tvorijo biogenih aminov, sinergistično delovanje z drugimi mikroorganizmi ter antagonistično delovanje proti neželenim mikroorganizmom (Varnam in Sutherland, 1995).

2.2.1.2 Mikrokoki

Druga pomembna skupina bakterijskih starterskih kultur so bakterije iz družine *Micrococcaceae*, iz rodov *Micrococcus* in *Staphylococcus*. Zaradi fakultativno anaerobnega metabolizma imajo *Staphylococcus* spp. naravno selekcijsko prednost pred *Micrococcus* spp., ki so sposobni le aerobnega metabolizma, kar pomeni, da je njihova aktivnost v nadevu presnih klobas, zaradi nizkega redoks potenciala, hitro inhibirana. Najpomembnejša lastnost predstavnikov družine *Micrococcaceae* je prisotnost encimov nitrat reduktaz, ki reducirajo nitrate v nitrite. Zaradi sposobnosti hitrega razvoja barve, zniževanja pH v nadevu in pospeševanja procesa fermentacije so bili eden prvih starterjev, namenjenih regulaciji zorenja (Meszaroš, 2000). Inhibirajo procese oksidacije, z lipolitičnimi in proteolitičnim delovanjem pa prispevajo k nastanku vonja in okusa izdelka. Če jih uporabljamo skupaj z mlečnokislinskimi bakterijami, pospešijo tvorbo arome (Stahnke, 2003). Poleg tega imajo sposobnost kompeticije z ostalimi mikroorganizmi in tudi antimikrobni učinek. Njihove tehnološko zanimive lastnosti so sinteza katalaz, rast ob visokih koncentracijah NaCl in nizkih a_w vrednostih medija.

Kriteriji, ki jih upoštevamo pri izbiri starterskih kultur iz družine *Micrococcaceae*, so: redukcijska aktivnost, katalazna aktivnost, proteolitična in lipolitična aktivnost in tvorba aromatičnih komponent, sposobnost preživetja do konca zorenja, sinergistično delovanje z drugimi mikroorganizmi ter antagonistično delovanje proti neželenim mikroorganizmom.

2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na rast mikroorganizmov v sušenih mesninah

2.2.2.1 Skupno število mikroorganizmov

Na kakovost in obstojnost sušenih mesnih izdelkov, kot tudi na učinkovanje starterskih kultur, pomembno vpliva začetna kontaminacija surovin. Ta predstavlja seštevek začetne kontaminacije mesa in dodatkov. V primeru neustrezne kakovosti se lahko pojavi upočasnitev rasti želenih mikroorganizmov, kvar izdelkov ter tveganje za zdravje potrošnikov. V surovinah za sušene klobase skupno število živih mikroorganizmov ne sme preseči $10^6/g$ ter ne sme vsebovati patogenih mikroorganizmov (Incze, 2003). Poleg vhodne kontrole surovin (pH vrednosti in temperature surovin), je potrebno zagotoviti ustrezne temperature med skladiščenjem surovin in pripravo mase ter ustrezne higienske razmere. Pomembne pa so tudi nadaljne faze proizvodnje.

Na prisotnost mikroorganizmov v izdelkih, poleg surovin in dodatkov, vpliva tudi sekundarna kontaminacija, temperature med tehnološkim postopkom, trajanje tehnološkega procesa, skladiščenje in distribucija, higiensko stanje opreme, prostorov in osebja (Gaidella in Cantoni, 2003a; Gaidella in Cantoni, 2003b). Tako skušamo z ustrežno kombinacijo dejavnikov, kot so a_w in pH vrednost, aditivi, ustrezen tehnološki postopek ob upoštevanju načel dobre proizvodne prakse, ob upoštevanju načel dobre higienske prakse ter z uporabo HACCP sistema kontrole obvladovati mikrobno asociacijo ter preprečiti kvar in podaljšati obstojnost izdelkov. Prav procesna higiena, tehnika embalaranja ter skladiščni pogoji so dejavniki, ki pomembno vplivajo na roke trajanja izdelkov (Leistner, 1995).

2.2.2.2 a_w vrednost

Začetna a_w vrednost surovine se iz vrednosti 0,99 med postopkom sušenja/zorenja konstantno znižuje in doseže pri končnih izdelkih vrednosti pod 0,92. Z nižanjem a_w vrednosti se zmanjša rast vegetativnih celic mikroorganizmov, zaustavi se tvorba spor ter prepreči tvorba toksinov pri toksinogenih bakterijah in plesnih. Na znižanje a_w vrednosti vplivajo pH vrednost mesa, dodatek soli, razmerje meso: mastnina, maščobnokislinska sestava, metode razdevanja in stopnja razdetosti. V primeru dodatka starterskih kultur je zniževanje a_w vrednosti hitrejše (Incze, 2003).

Minimalna a_w vrednost za rast večine bakterij (tudi laktobacilov) je do 0,90. Upoštevati pa moramo, da na to vrednost vplivajo karakteristike živila (predvsem pH vrednost) in okolja, kot na primer temperatura.

2.2.2.3 pH vrednost

Začetna pH vrednost surovin za sušene mesnine se giblje med 5,6 do 6,0. S povečanjem števila mlečnokislinskih bakterij se pH vrednost znižuje proti 5,0 do 5,2. Ob koncu zorenja pH vrednost znova naraste na 5,8 do 6,0 (Leistner, 1995) kot posledica prisotnih spojin z alkalnimi lastnostmi (na primer tvorba amoniaka kot končnega produkta

proteolize). Na pH vrednost oziroma na njeno znižanje med drugim vpliva število mlečnokislinskih bakterij, tako nativnih kot tistih iz starterskih kultur, njihova rast in hitrost tvorbe kislin, temperatura, začetna a_w vrednost, dodatek reduktivnih sladkorjev in drugih aditivov ter začetna pH vrednost. Mlečnokislinske bakterije v nadevu razgrajujejo sladkorje do kislin in pospešijo padec pH vrednosti, medtem ko stafilokoki na znižanje nimajo velikega vpliva. Višje temperature, kot tudi večje količine dodanega sladkorja, pospešijo padec pH vrednosti. Mikroorganizmi z vplivom na pH vrednost vplivajo na želeno čvrstost sušenih mesnin.

Pri pH vrednosti v področju izoelektirične točke, beljakovine mesa preidejo v gel stanje, v katerem imajo najmanjšo sposobnost vezanja vode, s čimer je ustvarjena možnost za odvajanje vode iz nadeva s sušenjem. Prav tako so proteini v gel stanju lepljivi in vplivajo na povezovanje mišičnega in maščobnega tkiva in na nastanek zelene konzistence izdelka.

2.2.2.4 Redoks potencial

Med pripravo mase za sušene klobase pride do močne aeracije, zato se redoks potencial (Eh) poveča. Dodatek askorbinske kisline ali askorbata in reduktivnih sladkorjev zniža redoks potencial, kar zelo selektivno deluje na prisotno mikrofloro, in sicer inhibira rast aerobnih gnilobnih bakterij, predvsem iz družine *Pseudomonaceae* (Leistner, 1995), poveča baktericidni učinek nitrita in ustvari pogoje za razvoj zaželenih mlečnokislinskih bakterij oz. mikroorganizmov iz starterskih kultur, ki so predvsem fakultativni anaerobi.

2.2.2.5 Sladkorji

Dodani sladkorji služijo kot hrana prisotnim mikroorganizmom. Nekateri s svojimi reducirajočimi lastnostmi prispevajo k oblikovanju in stabilizaciji barve razsoljenega mesa.

Sladkorji so osnovni vir energije mlečnokislinskim bakterijam. Količina in vrsta dodanega sladkorja vplivata na metabolne produkte (želene/neželjene organske kisline) ter na pH vrednost izdelka. Predstavljata ravnovesje med efikasnostjo mlečnokislinske fermentacije in težnjo, da se izognemo prevelikemu padcu pH vrednosti (Varnam in Sutherland, 1995). Poleg neželene kislosti lahko privede preveliko doziranje ogljikovih hidratov tudi do luknjičavosti mesnin zaradi tvorbe večjih količin CO₂.

Najpogosteje uporabljeni ogljikovi hidrati so glukoza, laktoza in saharoza. Z glukozo in maltozo je hitrost in obseg tvorbe mlečne kisline večji kot z laktozo, škrobom in dekstrini. Seveda je odvisno tudi od biokemijskih sposobnosti uporabljene starterske kulture, saj vse ne fermentirajo laktoze, rafinoze, trehaloze in dekstrinov (Lücke, 1985). Določeni laktobacili imajo težave pri fermentaciji laktoze, kar posebej velja za nekatere probiotike, kot je *Lactobacillus rhamnosus* GG. Te lastnosti je potrebno upoštevati pri uporabi različnih vrst starterskih kultur (Työppönen in sod., 2003).

Sušenim klobasam običajno dodajamo kombinacijo hitro in počasi metabolizirajočega sladkorja. To zagotavlja učinkovit padec pH, brez inhibiranja drugih mikrobnih in kemijskih reakcij, potrebnih za razvoj zelene barve in arome. Običajno zadošča od 0,4 % do 0,8 % dodanih ogljikovih hidratov (Lücke, 1985; Varnam in Sutherland, 1995). Hitrofermentirajoča glukoza povzroči hitre in velike padce pH vrednosti, zato jo običajno dodajamo v kombinaciji s počasneje metabolizirajočimi sladkorji (saharoza, laktoza, koruzni sirup, dekstrini). Razgradnja sestavljenih sladkorjev poteka počasneje, saj morajo bakterije višje sladkorje najprej razgraditi, šele nato jih lahko fermentirajo. Tako so sladkorji založni vir energije za mikroorganizme, njihova reducirajoča lastnost pa je pomembna za oblikovanje in stabilnost barve. V klobasah z dodanim nitratom brez nitrita, se priporoča nižje dodatke ogljikovih hidratov (od 0,2 % do 0,3 %) zato, da se zmanjša oblikovanje organskih kislin in s tem prepreči inhibicija nitrat-reducirajočih bakterij (Varnam in Sutherland, 1995). Z vključitvijo nitrat-reducirajočih bakterij, kot so stafilokoki, v startersko kulturo skupaj z mlečnokislinskimi bakterijami, se izognemo težavam, ki lahko nastanejo kot posledica inhibicije nitrat-reducirajočih bakterij, poleg tega taka starterska kultura tudi pospešuje stabilizacijo barve. Produkcija katalaz pa preprečuje ali vsaj upočasni razvoj različnih diskoloracij in pojava žarkosti.

2.2.2.6 Začimbe

Začimbe se dodajajo k sušenim mesninam predvsem zaradi sodelovanja pri oblikovanju okusa in arome izdelka. Naravne začimbe so lahko velikokrat kontaminirane z različnimi mikroorganizmi, kar lahko negativno vpliva na potek proizvodnje. Ker obstaja možnost, da prisotni mikroorganizmi ogrozijo obstojnost izdelka, se za sušene klobase in salame predlaga začinjanje z ekstrakti. V proizvodnji sušenih klobas, pri strokovno opravljenem tehnološkem procesu, začimbe oz. njihova mikroflora direktno ne ogrožajo higienske kakovosti in obstojnosti mesnin, vse dokler se upoštevajo strokovno izbrani parametri proizvodnje, skladiščenja, distribucije in uporabe začimb. Nekatere naravne začimbe (na primer poper, paprika, česen) pomembno vplivajo na acidifikacijske procese bakterij (Vösgen, 1994). Zaradi prisotnosti mangana, ki je potreben za encimsko aktivnost mlečnokislinskih bakterij, naj bi stimulirale tvorbo mlečne kisline. Nekatere začimbe so tudi naravni antioksidanti, imajo redukcijske lastnosti in na ta način preprečujejo oksidacijo maščob in pojav žarkosti ter tako vplivajo na obstojnost klobas. Najbolj so te lastnosti izražene pri rožmarinu, žajblju in česnu. Nekatere začimbe pa imajo tudi baktericidne lastnosti, kot na primer česen, čebula, klinčki in cimet.

2.2.2.7 NaCl, nitrit, nitrat

Namen dodajanja soli je oblikovanje senzoričnih lastnosti izdelka (aroma, tekstura) ter protimikrobni učinek. NaCl v dovolj visokih koncentracijah zavira rast kvarljivcev in patogenih mikroorganizmov. Med suhim soljenjem veže na svoje ione del proste vode in po tej poti znižuje a_w vrednost. Razlika v ozmotskem tlaku povzroči dehidriranje mesa, ioni klora pa še dodatno učinkujejo protimikrobno (Bem in Adamič, 1991). NaCl deluje

kot ojačevalec arome in daje izdelkom zelen slan okus. Slanost oblikujejo Cl⁻ ioni, Na⁺ ioni pa stimulirajo brbončice za okušanje. Sol oblikuje z nativnimi beljakovinami presnih mesnih izdelkov stabilne komplekse, slan okus pa daje samo prebitna, to je prosta, nevezana sol (Rajar, 2001). Maščobna tkiva vsebujejo zelo malo vode, zato absorbirajo le malo soli, kar oblikuje blago slan okus. Podatki iz literature kažejo na različno tolerantnost mikroorganizmov za NaCl. Mlečnokislinske bakterije iz starterskih kultur naj bi tolerirale sol le do določenega obsega, to je do 3 %, večje koncentracije nad 3,5 % pa inhibirno delujejo na večino in zmanjšajo njihovo učinkovitost (Vösgen, 1994). Pri izbiri starterskih kultur je pomembno poznavanje njihove fermentativne sposobnosti, halotolerantnosti in sposobnosti redukcije nitrata.

Nitrit (NaNO₂) se dodaja sušenim mesninam v koncentraciji do 150 mg/kg (Varnam in Sutherland, 1995), običajno se uporablja skupaj z NaCl. Uporablja se zaradi vpliva na razvoj rdeče barve izdelkov in antioksidativnega učinka. Vpliva na razvoj arome zorjenih izdelkov in na rast gram-pozitivnih bakterij. Antibakterijski učinek nitrata se poveča pri nižjih pH in nižjih a_w vrednostih ter v prisotnosti reducentov, kot so askorbat, eritorbat in sorbat.

Pri sušenih in klasično zorenih klobasah se poleg nitrata dodaja tudi nitrat, običajno 0,15 g nitrata (KNO₃)/kg mesne mase in 0,05 g nitrita (NaNO₂)/kg mesne mase (Mengoli, 1999). Sušene klobase z dodatkom samo nitrata ali z dodanim nitritom in nitratom naj bi imele boljši okus, kot klobase narejene samo z dodatkom nitrita. Visoke koncentracije prisotnega nitrita na začetku fermentacije lahko inhibirajo mikroorganizme, kateri so aktivni pri sintezah komponent arome ali njihovih prekurzorjev (Lücke, 1985). Nitrat se običajno uporablja pri izdelkih, ki so zoreni daljši čas. Da bo nitrat učinkovit, je potrebna njegova redukcija do nitrita, s sodelovanjem mikroorganizmov. Če uporabljamo za razsoljevanje nitrat, je zelo pomembno, da omejimo obseg tvorbe mlečne kisline. Tako lahko na mlečno kislino občutljivi nitrat-reducirajoči mikroorganizmi, kot na primer *Micrococcaceae* ostanejo aktivni, dokler se ne reducirajo zadostne količine nitrata (Lücke, 1985).

2.2.2.8 Temperatura

Na rast mikroorganizmov pomembno vplivajo tudi temperature med tehnološkim postopkom priprave mase in polnjenja, kot tudi zorenja.

Previsoke temperature nadeva lahko povzročijo razmazanje maščob po notranji površini ovitka. Z omastitvijo ovitka se zaprejo pore na ovitku in izdelki se težje sušijo, zniževanje a_w vrednosti je počasnejše in tveganje za kvar večje.

Višje temperature zorenja pomenijo hitrejšo fermentacijo, vendar pa tudi tveganje za rast neželenih mikroorganizmov (Lücke, 1985). Bliže kot so temperature zorenja optimalnim temperaturam za rast mikroorganizmov, krajša je lag faza v razvoju bakterij in hitrejši je

start proizvodnje kislin. Zorenje klasičnih, počasi fermentirajočih salam, poteka pri nižjih temperaturah. Začetna temperatura, od 20 °C do 24 °C, se po prvih šestih dneh postopno znižuje na 12 °C do 16 °C. Te temperature se zadržuje do konca zorenja. Čas sušenja/zorenja traja nekaj tednov, odvisno od premera ovitka ter drugih dejavnikov. Za ta tip izdelkov se običajno uporablja mešana starterska kultura, sestavljena iz mlečnokislinskih bakterij (*Lactobacillus* ali *Pediococcus*) in bakterij družine *Micrococcaceae* (*Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* ali *Micrococcus varians*). Zorenje hitrofermentiranih klobas poteka pri višjih temperaturah, okrog 30 °C, ali celo višjih, na primer do 40 °C. Izbrati je potrebno mikroorganizme, katerim so višje temperature optimalne za rast. V takih starterskih kulturah je pogosto prisoten *Pediococcus acidilactici* (Hansen, 2002; Jessen, 1995). Proces zorenja se skrajša za tretjino, vpliva pa tudi na končno kakovost izdelka, oblikuje se manj izrazita aroma, bolj kiselkasta vonj in okus ter gumijava tekstura izdelka. Previsoke temperature imajo lahko za posledico tudi prehitro padec pH vrednosti. Napake se pokažejo kot povečana kislost, vpliv na konzistenco, lahko na primer tudi kot tvorba roba. Dolgotrajno visoka a_w vrednost lahko ustvarja pogoje za razvoj neželenih mikroorganizmov in neželenih metabolnih produktov.

Pomembne so tudi temperature skladiščenja izdelkov, običajno se sušene mesnine skladiščijo pri temperaturah 4 °C do 8 °C. Te temperature so ugodne za rast psihrotrofnih mikroorganizmov, uspeva pa lahko tudi precej mezofilnih mikroorganizmov. Z nižanjem temperatur, zlasti med skladiščenjem izdelkov, dosežemo počasnejšo rast mikroorganizmov, zmanjša se aktivnost njihovih encimov, reducirana je tudi tvorba spor, generacijski čas (lag in eksponencialna faza) se podaljša.

Nihanja temperatur živil med skladiščenjem ali transportom imajo velik vpliv na rast in smrt mikroorganizmov. Nihanje temperatur živil od 4 °C na 10 °C do 12 °C stimulira hitro rast psihrotrofnih patogenov in kvarljivcev, pa tudi številnih mezofilnih kvarljivcev in patogenih bakterij. Skrajša se tudi pričakovani rok trajanja. Na povečanje rasti mikroorganizmov lahko vplivajo tudi poškodbe embalaže, kar vpliva na spremembo atmosfere v embalažni enoti (tako pri vakuumsko embaliranih izdelkih kot pri izdelkih embaliranih v modificirani atmosferi) z vdorom kisika skozi embalažni material (Ray, 2001).

2.3 PROBIOTIKI IN PREBIOTIKI

2.3.1 Mikroflora humanega prebavnega trakta

Prebavni trakt človeka naseljuje več kot 400 bakterijskih vrst, vendar je med temi le 30 do 40 vrst, katere sestavljajo 99 % biomase mikroflore prebavil. Prebavni trakt predstavlja dinamičen ekosistem s kompleksno skupnostjo mikroaerofilnih in anaerobnih mikroorganizmov. Ti sodelujejo pri fermentaciji zaužite hrane in snovi, ki prispejo v prebavni takt. Značilna črevesna mikroflora prebivalcev zahodnega sveta vsebuje naslednje mikroorganizme: enterobakterije in streptokoke (do 10^9 /g blata), laktobacile (do 10^8 /g blata), bakterioide, eubakterije, peptostreptokoke in bifidobakterije (prisotni do 10^{11} /g blata) ter klostridije in stafilokoke (v blatu zdravih odraslih oseb prisotni le v

manjšem številu). Koncentracija bakterij na prehodu iz ileuma v debelo črevo močno naraste, tako v debelem črevesu najdemo nekje med 10^{11} in 10^{12} bakterij/mL vsebine. Prehrana, kot tudi starost, sta med najpomembnejšimi dejavniki, ki vplivata na prisotnost mikroorganizmov v prebavilih človeka (Stojković, 2003).

2.3.2 Probiotiki

2.3.2.1 Definicija in zahteve za probiotične seve

Beseda probiotik izvira iz grške besede pro bios (za življenje). Ruski mikrobiolog Metchnikoff je že leta 1907 na osnovi raziskav mlečnokislinskih bakterij predstavil zdravstvene koristi, vezane na redno uživanje fermentiranega mleka in s tem postavil temelje raziskovanju probiotičnih mikroorganizmov (Stojković, 2003). Osnovna definicija pravi, da so to živi mikroorganizmi, ki ob zaužitju v zadostni količini pozitivno delujejo na zdravje neposredno ali posredno z okrepitevijo fizioloških, oziroma obrambnih mehanizmov. Ker se znanost o probiotikih izjemno hitro razvija, se z novimi spoznanji spreminja tudi definicija. Probiotike danes opisujemo kot žive mikroorganizme, dodane hrani, ki vplivajo na fiziologijo gostitelja tako, da okrepijo črevesni in sistemski imunski odziv in izboljšajo prehransko in mikrobnno ravnovesje v prebavilih. Ker pa v zadnjem času ugotavljajo, da učinkovanje ni omejeno zgolj na žive celice, se pogosto srečamo tudi s terminom probiotično aktivna snov, pri čemer gre za celične komplekse (mrtve celice ali deli celic) probiotičnih mikroorganizmov, ki tudi vplivajo na funkcijo črevesne sluznice in na imunski odziv (Salminen in sod., 1999; Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004). Ni nujno, da so vedno samo dodani v hrano, ampak jih lahko zaužijemo tudi kot terapevtske pripravke.

Prvotni življenjski prostor probiotikov je črevo zdravega človeka, kjer predstavljajo del zelo kompleksne in raznolike mikrobne združbe (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Kriteriji za izbiro probiotičnih sevov, ki se še vedno dopolnjujejo, so strogi in vključujejo varnostni, funkcionalni in tehnološki vidik. Probiotični sev mora biti natančno taksonomsko definiran. Poznane morajo biti njegove karakteristike, želena je, da je humani izolat, nujne so potrditve, da je nepatogen. Za humano uporabo mora učinkovito probiotični sev delovati antimitogeno in antikarcinogeno ter učinkovito proti patogenim bakterijam, kot so *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* in *Clostridium difficile*. Pomembno je tudi, da ne tvori neželenih snovi, kot so toksini ali biogeni amini. Med najpomembnejšimi funkcionalnimi lastnostmi probiotičnih sevov je njihova sposobnost, da preživijo prehod preko ust do debelega črevesja. Odporni morajo biti predvsem na želodčno kislino in na žolčne soli, imeti morajo sposobnost vezave na intestinalne sluznične celice in rasti v intestinalnih pogojih. Vsak bakterijski sev, ki ga uporabimo kot probiotik, mora tekmovali z obstoječo mikrofloro za hranljive snovi, atmosferske potrebe in mesta vezave na površino črevesja (Rogelj, 1994; Saarela in sod., 2000; Rogelj in Bogovič Matijašič, 2004).

Poleg varnosti in dokazanih funkcionalnih lastnosti, mora imeti probiotični sev, ki ga želimo vključiti v hrano, tudi sprejemljive tehnološke lastnosti: preživeti mora tehnološki postopek, skladiščenje in distribucijo izdelka. Sestavine hrane ne smejo vplivati na njegove karakteristike. S svojo aktivnostjo ne sme negativno vplivati na senzorične lastnosti izdelka (Rogelj, 2001; Perko in sod., 2002; Leroy in sod., 2006).

2.3.2.2 Probiotične bakterije in probiotični izdelki

Najpomembnejši probiotični mikroorganizmi so mlečnokislinske bakterije rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Probiotične bakterije, najpogosteje prisotne v mesnih starterskih kulturah, so: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus alimentarius*, *Bifidobacterium* spp. (Hammes in Hertel, 1998).

Probiotski proizvodi so tisti, ki povzročajo uporabniku zdravju koristne učinke z uravnavanjem intestinalne mikroflore. Probiotski proizvodi so lahko v različnih oblikah: v obliki prahu, tablet ali kapsul, kot liofilizirane bakterije ali kot fermentirani izdelki (mlečni izdelki, mesni izdelki). V Evropi ni splošno sprejetih smernic glede najmanjše zahtevane koncentracije probiotičnih bakterij v tovrstnih izdelkih. Nekateri avtorji navajajo (Perko in sod., 2002), da mora probiotični izdelek v 1 mL ali 1 g vsebovati več kot 10^6 živih celic probiotične bakterije, glede na japonske smernice pa je priporočeno, da vsebuje izdelek 10^7 živih celic v 1 g ali 1 mL izdelka (Ishibashi in Shimamura, 1993).

Kljub različnim oblikam probiotičnih pripravkov imajo fermentirane vrste mleka še vedno posebno mesto med probiotiki, saj je število živih bakterij *L. acidophilus* in *B. bifidum* v njih visoko (10^6 do 10^8 živih celic/mL) in običajno presega število v drugih pripravkih. Fermentirani mlečni izdelki imajo v prehrani tudi druge ugodne učinke, kot so povečano izločanje sline, žolča in želodčnega soka, boljše izkoriščanje in vezava kalcija v telesu, preprečevanje rasti patogenih bakterij, povečevanje imunske odpornosti (Rogelj, 1994).

Sir se je pokazal kot primeren medij za prenos probiotičnih bakterij *Lactobacillus gasseri* LF 221 in K 7 (v 1 g je vseboval okrog 10^8 živih celic), saj so probiotične bakterije preživele tehnološki postopek sirjenja in 6-tedensko zorenje sirov. Poleg tega pa seva, dodana k tipični sirarski kulturi, nimata negativnega vpliva na senzorične lastnosti sira (Perko in sod., 2002).

Lynch in sodelavci (1999) so proučevali vpliv *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* in *Lactobacillus plantarum* na zorenje sira Čedar in razvoj senzoričnih karakteristik med zorenjem. Kljub začetni razliki v številu mikroorganizmov, je po 9-mesečnem zorenju prisotno enako število laktobacilov ($\approx 10^6$ ke/g) v vseh sirih. Dodane kulture mezofilnih laktobacilov imajo relativno majhen vpliv na proteolizo (večinoma le na povečanje obsega prostih aminokislin), imajo pa signifikanten vpliv na aromo in vonj.

Tako kot v mlečnopredelovalni industriji so tudi v mesni industriji raziskave usmerjene v nove starterske kulture z dodano vrednostjo. Vendar Hammes in Hertel (1998) v svojem delu opozarjata, da iz rezultatov študij na mlečnih izdelkih ni mogoče zaključiti, da bi bila specifična vrsta enako učinkovita, če je uporabljena v različnih vrstah hrane, saj so lastnosti bakterij in njihova izraznost v veliki meri odvisne od dejavnikov okolja. Na število preživelih probiotikov v izdelkih vplivajo številni dejavniki, med drugim temperatura, relativna vlažnost, vsebnost maščob in kemijskih dodatkov.

Lücke (2001) navaja, da so soji skupine *Lactobacillus casei* (*L. casei*, *L. paracasei* in *L. rhamnosus*) primernejši za mesne izdelke (preživetje med fermentacijo in skladiščenjem) kot bifidobakterije in naj bi bili primerni za koriščenje kot probiotske kulture mesa.

Erkkilä (2001) je v svoji disertaciji preučevala vpliv biozaščitnih in probiotičnih starterskih kultur treh različnih sevov *Lactobacillus rhamnosus* na fermentacijo sušenih salam, na tehnološke, mikrobiološke kot tudi senzorične karakteristike. V zaključku svojega dela navaja, da so sevi *Lactobacillus rhamnosus* primerni za proizvodnjo visoko kvalitetnih salam. Tveganje, povezano s preživetjem patogenih mikroorganizmov *Listeria monocytogenes* ali *Escherichia coli* O157 : H7 pa je enako veliko, kot pri sušenih salamah, zorenih s komercialnimi starterskimi kulturami. Pidcock s sodelavci (2002) pa v svoji raziskavi navaja, da je za doseg želenih fermentacijskih parametrov nujen dodatek tradicionalnih starterskih kultur, dodatek drugih, na primer probiotičnih kultur, pa lahko doprinese k večji varnosti izdelkov. Tako navaja, da se probiotiki kot *L. acidophilus* LAFTI™ L10, *L. paracasei* LAFTI™ L26, *L. paracasei* 5119, *Lactobacillus* sp. L24 in *Bifidobacterium lactis* LAFTI™ B94 lahko uspešno uporabljajo za povečanje varnosti madžarskih salam, saj so te kulture močno inhibirale rast inokuliranih *E. coli* O111 in *L. monocytogenes*.

Erkkilä in sodelavci (2001a) so raziskovali vpliv treh različnih sevov *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* E-90390 in *Lactobacillus plantarum* E-98098, predvsem njihovo sposobnost, da delujejo kot glavni fermentirajoči mikroorganizmi v proizvodnji sušenih klobas. Študije so bile usmerjene v sposobnost tvorbe zadostne količine mlečne kisline in v zahtevo, da ne tvorijo biogenih aminov. Mikrobiološke analize so bile opravljene na dan proizvodnje in po 35 dneh zorenja. Fizikalne analize so bile opravljene na dan polnjenja, po 7., 14., 28. in 35. dneh zorenja. Profil arome pri eksperimentalnih izdelkih, proizvedenih s probiotičnimi ali biozaščitnimi starterskimi kulturami, je bil enak kot pri izdelkih z dodanimi komercialnimi starterskimi kulturami, narejenimi po komercialni recepturi za Severno-evropske izdelke. Število laktobacilov ali 10^8 ke/g ali 10^9 ke/g v končnem izdelku ni vplivalo na tehnološke ali senzorične lastnosti klobas. Prav tako ni bilo značilnih razlik v pH vrednosti, izgubi mase in v aromi izdelkov, proizvedenih s temi starterskimi kulturami. V nadaljnjih raziskavah Erkkilä in sodelavci (2001b) potrjujejo, da izbrani sevi *Lactobacillus rhamnosus* ne tvorijo biogenih aminov ter so primerni za uporabo kot probiotične starterske kulture v sušenih klobasah.

Työppönen in sodelavci (2003) v svojem delu razpravljajo o možnosti uporabe mlečnokislinskih bakterij kot biozaščitnih kultur v sušenih klobasah, s produkcijo protimikrobnih snovi (mlečna kislina, bakteriocini), kot probiotičnih kultur ter kot kultur, ki vplivajo na fermentacijo izdelkov, obenem pa ne poslabšajo njihovih senzoričnih lastnosti. Prav tako navajajo, da je bila v sušenih klobasah uspešna uporaba mešanice tradicionalne starterske kulture Bactoferm T-SPX Chr. Hansen in potencialne probiotične kulture *L. casei* LC-01, kot tudi mešanica istega starterja s probiotikom *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

Leroy in sodelavci (2006) navajajo, da nova generacija starterskih kultur, tako imenovane funkcionalne starterske kulture, v primerjavi s klasičnimi starterskimi kulturami, prispeva k večji mikrobiološki varnosti, doprinaša pa tudi k senzoričnim, tehnološkim in prehranskim prednostim ali prednostim iz zdravstvenega vidika. Kot primer navaja, da črevesni laktobacili *L. rhamnosus* FERM P-15120 in *L. paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121 inhibirajo rast in produkcijo toksina pri *S. aureus* do enakega obsega kot komercialna starterska kultura *L. sakei* v izdelkih, fermentiranih pri temperaturah 20 °C ali 35 °C. V vseh primerih ni bilo negativnega vpliva na senzorične lastnosti izdelkov. Tudi črevesni izolati *L. paracasei* L26 in *B. lactis* B94 niso imeli negativnega vpliva na senzorične lastnosti izdelkov, ko so jih uporabili istočasno s tradicionalnimi mesnimi starterskimi kulturami.

Potrebne so še številne humane klinične študije glede zdravstvenih učinkov probiotikov v sušenih mesninah. Dokončno bodo šele humane študije potrdile funkcionalnost probiotičnih fermentiranih klobas. *In vitro* raziskave so pokazale, da probiotične bakterije, dodane v čvrsta živila, bolje preživijo »kisle pogoje želodca«. Dobro so se izkazali mlečni izdelki. V fermentiranih mesnih izdelkih naj bi bili starterji vključeni v matriks izdelka, ki ga tvorijo mišičnina in mastnina, tako naj bi lažje preživeli kritični prehod skozi želodec (Työppönen in sod., 2003). Priporočen najmanjši dnevni odmerek probiotikov naj bi bil med 10^9 do 10^{10} živih mikrobov, da lahko govorimo o zdravstvenih vplivih in začasni kolonizaciji, ki naj bi bila 10^6 do 10^8 živih mikrobov/g blata. Pri sušenih klobasah, katere vsebujejo 10^8 živih mikrobov/g, naj bi zadoščal minimalni dnevni vnos med 10 - 100 g izdelka.

Hammes in sodelavci (2001) so raziskovali preživelost probiotične bakterije *L. paracasei* LTH 2579 v fermentiranih mesnih izdelkih ter preživelost v prebavnem traktu. *L. paracasei* se je izkazal primeren kot starterska kultura, preživel je tehnološki postopek kot tudi pot skozi prebavni trakt ter je ugodno vplival na tipične senzorične lastnosti. V fermentiranih mesnih izdelkih je zrasel $> 3 \times 10^8$ ke/g. Prostovoljci, ki so sodelovali v poskusu, so uživali 50 g izdelka z *L. paracasei* na dan, kar naj bi ustrezalo priporočenemu dnevni vnosu probiotikov 10^9 ke/dan.

Leroy s sodelavci (2006) navaja, da pri zdravem prostovoljcu dnevna poraba 50 g probiotične salame, katera vsebuje *L. paracasei* LTH 2579, ne statistično značilno vpliva na serumsko koncentracijo različnih holesterolnih frakcij in trigliceridov. V fekalnih

vzorcih pa je bil statistično značilen porast *L. paracasei* LTH 2579, vendar ne pri vseh prostovoljcih.

2.3.2.3 Probiotiki in njihov vpliv na zdravje

Raziskovalci vse več pozornosti namenjajo skrbnemu načrtovanju in izvedbi kliničnih poskusov tako, da za nekatere od učinkov izbranih probiotičnih bakterij že lahko rečemo, da so ustrezno znanstveno dokazani. Ti so: skrajšanje trajanja rotavirusne driske, lajšanje gastrointestinalnih motenj, ki spremljajo zdravljenje z antibiotiki, lajšanje simptomov laktozne intolerance, zmanjšanje ponovljivosti površinskega tumorja na sečniku, zmanjšanje škodljive mikrobne encimske aktivnosti v prebavilih, okrepitev imunskega odziva in zmanjšanje fekalne mutagenosti. Pri nekaterih drugih obolenjih pa so na najboljši poti, da dokažejo učinkovitost probiotikov: alergije na hrano, kronična črevesna vnetja, rak debelega črevesa, lajšanje spremljevalnih pojavov obsevanj pri bolnikih z rakom (Bogovič Matijašič, 2001)

2.3.2.4 Komercialne probiotične kulture za fermentirane probiotične izdelke

Komercialno dostopne probiotične kulture lahko vsebujejo samo en sev, lahko pa so sestavljene tudi iz mešanice sevov večih vrst. Večina komercialnih pripravkov probiotičnih kultur je distribuirana v obliki visoko koncentriranih pripravkov v DVS (direct vat set) obliki. DVS kulture se dobavljajo kot visoko koncentrirane zmrznjene kulture ali kot liofilizirane kulture. Kulture so v embalaži, nepropustni za pline, ki ščiti kulture pred vlago in svetlobo, običajno so to alu-folije. Ker so kulture občutljive, je pomembno, da se spoštujejo navodila proizvajalcev glede rokovanja in hranjenja. Običajno vsebujejo globoko zmrznjene kulture več kot 10^{10} bakterij/g, liofilizirane kulture pa več kot 10^{11} bakterij/g (Saarela in sod., 2000). V fermentiranih izdelkih probiotične bakterije dodajajo poleg drugih komercialnih bakterij, specifičnih za izdelek.

2.3.3 Prebiotiki

Prebiotiki so po definiciji nerazgradljive sestavine živil, s pozitivnim učinkom na človeka. Selektivno stimulirajo in/ali aktivirajo enega ali omejeno število bakterij v debelem črevesu ter ugodno vplivajo na zdravje človeka (Roberfroid, 2000; van Roost, 2005; Pennacchia in sod., 2006).

Številni polisaharidi se ne razgrajujejo v zgornjem delu prebavnega trakta, ampak prihaja do njihove fermentacije šele v debelem črevesu. Zaradi te lastnosti imajo polisaharidi pozitiven fiziološki učinek, saj selektivno stimulirajo rast ugodne črevesne mikroflore, ki jih lahko fermentira. Polisaharidi, ki imajo tak učinek so opisani kot prebiotiki.

Raziskave zadnjih let so potrdile številne prehranske in funkcionalne lastnosti (prebiotsko aktivnost) za inulin in oligofruktozo. Inulin in oligofruktoza sta skupini naravnih prehranskih vlaknin, ki jih najdemo v sadju in zelenjavi ter so tradicionalno prisotni v hrani. Med najpogosteje zaužitimi rastlinami, v dnevnem obroku hrane, ki vsebuje inulin

in oligofruktozo, je najverjetneje čebula, ostali naravni viri inulina in oligofruktoze so še česen, pšenica, banane, artičoke in cikorija.

Industrijsko se inulin in oligofruktoza, kot živilska dodatka, pridobivata predvsem iz korenov cikoriije. Koren rastline *Cichorium intybus* vsebuje v povprečju 15 % do 20 % inulina in 5 % do 10 % oligofruktoze. Inulin je mešanica oligo in polisaharidov, ki jih sestavljajo molekule glukoze in n-fruktoznih enot, ki so med seboj povezane z $\beta(2\rightarrow1)$ vezjo. Stopnja polimerizacije pri inulinu je najbolj pogosto med 3 in 60. Splošna formula inulina je GF_n , kjer je G glukozna enota, F fruktozna enota, n = število fruktoznih enot ($n \geq 2$) (Batič, 2001). Inulin, ekstrahiran iz korena cikoriije, vsebuje do 10 % monosaharidov in disaharidov, predvsem saharozo in fruktozo ter 30 % oligosaharidov. Ti proizvodi imajo nizko stopnjo sladkosti glede na prisotnost mono-, di- in oligosaharidov. Proizvodnja inulina poteka z ekstrakcijo z vročo vodo iz korenov cikoriije, kateri sledita fazi čiščenja in sušenja. V primeru, ko se inulinu s fizikalnimi metodami odstrani frakcije z nižjimi stopnjami polimerizacije in pusti frakcije s povprečno stopnjo polimerizacije 25, dobimo produkte, ki so zelo učinkoviti zamenjevalci maščob.

Inulin in oligofruktoza delujeta kot prehranska vlaknina, ugodno vplivata na delovanje črevesja, stimulirata rast bifidobakterij. Vplivata na večjo absorpcijo kalcija v organizmu in celo upočasnita rast tumorjev. Inulin in oligofruktoza ugodno delujeta pri ljudeh, ki so nagnjeni k zaprtju, saj povečata frekvenco iztrebljanja, vplivata pa tudi na znižanje pH vrednosti blata, kar zavira proizvodnjo gnilobnih substanc v črevesju. Številne raziskave so pokazale, da inulin in oligofruktoza neprebavljena prehajata skozi usta, želodec in tanko črevo do debelega črevesa, kjer ju fermentira prisotna črevesna mikroflora. Zato imata bistveno manjšo energijsko vrednost kot običajni ogljikovi hidrati. Prehranski strokovnjaki priporočajo, da se za namene prehranskega označevanja za inulin in ostale nerazgradljive ogljikove hidrate, ki se v glavnem fermentirajo v debelem črevesju, poda enotna kalorična vrednost: 1,5 kcal/g oz. 6,3 kJ/g (Roberfroid, 1999; Golob, 2001).

Dodatek inulina v živilo omogoča izboljšanje prehranske vrednosti tako, da se poveča vsebnost vlaknin, zmanjša energetska vrednost in poveča bifidogena kapaciteta izdelka. Po drugi strani pa ima inulin zelo zanimive tehnološke lastnosti. Je nevtralnega okusa, brezbarven ali bele barve in ima minimalni vpliv na senzorične lastnosti izdelka (Batič, 2001). Je slabo do delno topen, prispeva k teksturi in strukturi, daje zaznavo »obloženih ust«, v večjih koncentracijah ima sposobnost želiranja, v kremasti obliki ima maščobi podobno teksturo, izboljša stabilnost emulzij (Golob, 2001). Inulin se že uspešno uporablja v izdelkih mlečnopredelovalne industrije in žitnopredelovalne industrije ter v izdelkih mesnopredelovalne industrije. Poleg tega, da prebiotiki lahko izboljšajo živilu senzorične lastnosti in prehransko vrednost, živilska industrija uspešno uporablja inulin v procesih priprave funkcionalnih izdelkov z zmanjšano vsebnostjo sladkorjev in maščob (Batič, 2001).

Evropska direktiva 95/002 je inulinu odvzela status aditiva. Danes sta naravno pridobljen inulin in iz njega, s hidrolizo pridobljena oligofruktoza, definirana kot živilo ali živilska

sestavina in ne kot aditiv. Tudi v slovenskem pravilniku o aditivih je inulin označen kot sestavina, ki ni aditiv (Golob, 2001).

Mendoza in sodelavci (2001) v svojem delu navajajo, da je možna izdelava sušenih klobas z dodatkom inulina, katere imajo skoraj 40 do 50 % manjšo vsebnost maščob in 30 % manj kalorij kot standardne sušene klobase. Dodatek inulina lahko odlično nadomesti maščobe v izdelku, vpliva na teksturo in mehkobo izdelka, kot tudiboljša njegovo prehransko vrednost.

2.3.4 Sinbiotiki

V zadnjem času je veliko raziskav, ki obravnavajo funkcionalno hrano, usmerjenih v izdelke, ki učinkujejo na sestavo in aktivnost mikroflore prebavnega trakta. V tej kategoriji izdelkov imajo probiotiki in prebiotiki vodilno vlogo, saj je že po definiciji njihovo ciljano mesto mikroflora prebavnega trakta. Prebiotike in probiotike so začeli kombinirati v sinbiotike, kjer inulin in oligofruktoza, kot prebiotika, omogočata rast obstoječim vrstam ugodnih bakterij v črevesju. Vplivata pa tudi na boljše preživetje in rast novih dodanih vrst probiotikov. Tako naj bi imeli izdelki z dodanima obema komponentama dvojni koristen učinek, kar pa bo potrebno še dokazati (Roberfroid, 2000; Rogelj, 2001).

Pennacchia in sodelavci (2006) so raziskovali sposobnosti preživetja probiotikov v prebavnem traktu ter njihovo rast v prisotnosti petih prebiotskih ogljikovih hidratov (fruktooligosaharidov, inulina, isomaltooligosaharidov, galatooligosaharidov ter laktuloze). Ugotovili so, da je bil med vsemi probiotiki le *Lactobacillus paracasei* EL7 sposoben rasti v prisotnosti vseh testiranih prebiotikov.

Iskanje ustreznih sinbiotičnih parov, kjer bo prebiotik ustrezal specifičnemu probiotskemu sevu, ni enostavna naloga. Sinbiotski sistem je učinkovit le, če se obadva ujemata, kar je potrebno določiti z raziskovanjem rasti določenih bakterijskih sevov na substratih prebiotičnih ogljikovodikov.

2.4 SENZORIČNE LASTNOSTI SUŠENIH KLOBAS

2.4.1 Senzorične lastnosti sušenih klobas

Pri ocenjevanju senzoričnih lastnosti sušenih mesnin uporabljamo vizualna, olfaktorna, oralna in palpatorna senzorična vrednotenja. Vizualno ocenjevanje vključuje zunanji videz izdelka, ki ga ocenjujemo na celem izdelku (pravilnost oblike, napolnjenost, nagubanost ovitka, značilnost barve izdelka, enakomernost in barvo plesni na ovitku) ter videz barve in prereza, ki ju ocenjujemo na vzdolžnem prerezu izdelka. Ocenjujemo barvo mišičnine in slanine, intenziteto in enakomernost barve, razporeditev slanine, količino in enakomernost koščkov slanine ter povezanost rezine.

Ostale senzorične lastnosti pa ocenjujemo na rezinah debeline do 2 mm. Vključujejo karakteristike vonja in okusa (intenzivnost vonja in okusa, značilnost vonja in okusa, tipičnega za sušene in zorene izdelke, tipičnost arome za dimljene izdelke, slanost, kislost, skladnost vonja, harmoničnost okusa, vonj in okus prisotnih začimb) in karakteristike teksture (sočnost, mehkoča, čvrstost, drobljivost, topnost rezin – zrelost, mastnost in zamaščenost v ustih, žvečljivost, ostanek veziva med žvečenjem).

2.4.2 Vpliv starterskih kultur na senzorične lastnosti sušenih klobas

Mikroorganizmi iz starterskih kultur sodelujejo pri oblikovanju barve končnega izdelka s svojo sposobnostjo redukcije nitrata, nižanjem pH vrednosti nadeva ter vpliva na Eh vrednost. Pomembna je tudi njihova katalazna aktivnost in preprečevanje oksidativnih procesov. Vpliv na oblikovanje barve izdelka imajo predvsem bakterijske starterske kulture iz družine *Micrococcaceae*. Če starterske kulture vsebujejo *Staphylococcus xylosus*, ki ima močno nitrat-reduktazno aktivnost, se barva hitreje razvije (Chr. Hansen's, 1991). Prav tako je tudi, zaradi delovanja te starterske kulture na preprečevanje oksidacijskih procesov, bolj ohranjena zelena barva izdelkov med skladiščenjem. Reduktazna aktivnost pri mlečnokislinskih bakterijah je precej manjša, prav tako tudi sposobnost tvorbe katalaz, do katere pride le pod posebnimi pogoji (Jessen, 1995).

K teksturnim lastnostim izdelka največ prispevajo proteolitični encimi (Smole Možina in Raspor, 1994), in sicer več naravno prisotni encimi in v manjšem obsegu bakterijske proteinaze. Pri proteolitičnih aktivnostih sodelujeta *Lactobacillus casei* in *Lactobacillus plantarum*. Kot starterski kulturi sodelujeta pri razgradnji mesnih sarkoplazemskih in miofibrilarnih proteinov med fermentacijo (Fadda in sod., 2002). Afiniteta njunih proteolitičnih encimov je večja do sarkoplazemskih proteinov. Aktivnosti proteolitičnih encimov so višje pri višjih temperaturah, zorenje je torej hitrejše pri višjih temperaturah. Poleg proteolitičnega delovanja vplivajo mlečnokislinske bakterije na teksturo tudi s tvorbo mlečne kisline. Padec pH vrednosti vpliva na topnost proteinov in tako igra pomembno vlogo pri oblikovanju teksturnih lastnosti fermentiranih klobas, pri povezanosti rezin ter vpliva na skrajšanje proizvodnega časa (Varnam in Sutherland, 1995).

Hammes in Hertel (1998) navajata, da je razvoj arome fermentiranega izdelka prispevek številnih komponent: uporabljenih surovin, dodanih aditivov in začimb, izbranih postopkov ter kemijskih sprememb tekom glikolize, proteolize, lipolize in lipidne oksidacije, ki nastanejo pod vplivom endogenih encimov ali bakterijskih encimov. Pomemben vpliv imajo temperatura, čas proizvodnje, dimljenje in izbira starterskih kultur (Leroy in sod., 2006).

Ker se klobasam v glavnem dodaja glukoza, je končni produkt fermentacije mlečnokislinskih bakterij pretežno laktat, ki prispeva h kisli aromi izdelkov. Preveč mlečne kisline in verjetno tudi majhne količine očetne kisline pa okarakterizirajo okus kot oster, močan ali pikanten. Ostale organske kisline, ki nastanejo med fermentacijo (očetna, citronska, vinska) v manjših količinah, pozitivno prispevajo k razvoju arome,

preveč očetne kisline pa povzroča pojav neprijetnega pekoče kislega okusa, ki se ob uporabi glukono-delta-laktone v kombinaciji z mikroorganizmi še stopnjuje. Zato je potrebno glede na zelene končne senzorične lastnosti izdelkov in zelen končni pH upoštevati vpliv aditivov na metabolne aktivnosti mikroorganizmov (Jessen, 1995).

Za nastanek in razvoj arome ter značilnega vonja zrelega izdelka so bolj kot proteolitični encimski procesi pomembni encimski procesi v maščobnem tkivu. Lipolitična in proteolitična aktivnost mlečnokislinskih bakterij je omejena in bistveno ne doprinaša k okusu zrelega izdelka, je pa veliko večja pri starterskih kulturah iz družine *Micrococcaceae*. Razgradnja maščob poteka pod učinkom lastnih lipaz maščobnega tkiva ter lipaz bakterij. Lipoliza je le prva stopnja v procesu razgradnje maščob. Sledi ji nadaljna oksidativna razgradnja prostih maščobnih kislin v alkane, alkene, alkohole, aldehide, ketone in furane. Lipoliza je pozitivna le do določene mere, sicer prispeva k pojavu žarkosti in drugih neprijetnih arom. V začetku zorenja narašča količina peroksidov, kot prvih produktov avtooksidacije. Ob navzočnosti katalizatorjev kovinskih ionov sledi razgradnja na karbonile, aldehide in ketone, ki so v večjih količinah nosilci žarkosti in drugih tujih priokusov. Večina laktobacilov je katalaza negativnih in ne razgrajujejo peroksidov, nastalih z oksidacijo nenasičenih maščobnih kislin. Prisotnost peroksidov rešujemo z uporabo kombiniranih starterjev s katalazno aktivnostjo (nekateri laktobacili, *S. carnosus*). Te starterske kulture in tudi plesni zmanjšujejo možnost nastanka produktov oksidacije s porabo kisika v svojem metabolizmu.

Kolikšen je vpliv mikrobnih in nemikrobnih encimov pri proteolizi še vedno ni popolnoma razjasnjeno. Med zorenjem klobas je velik del proteinov podvržen encimski hidrolizi. Nekatero aminokislino so pozneje dekarboksilirane, deaminirane ali celo podvržene nadaljnemu metabolizmu. Poveča se delež neproteinskega dušika, α -amino dušika, peptidov, prostih aminokislin, amoniaka in aminov. Nastali produkti prispevajo k okusu zorenih izdelkov. Porast amoniaka vpliva na dvig pH vrednosti ter na senzorične lastnosti izdelkov, zorenih daljši čas.

Pomembni udeleženci v procesih oblikovanja vonja in okusa izdelkov so stafilokoki. Sodelujejo tako v lipolitičnih kot proteolitičnih procesih. Stafilokoki (predvsem *S. xylosus* in *S. carnosus*) pomembno vplivajo na aromo preko razgradnje aminokislin (predvsem levcin, izolevcin in valin) in prostih maščobnih kislin (Hammes in Hertel, 1998; Leroy in sod., 2006). Klobase z dodanim *S. carnosus* zorijo hitreje. Stahnke s sodelavci (2002) navaja, da se je čas zorenja pri Milanski salami skrajšal do dva tedna ter da te klobase vsebujejo več aromatskih komponent. Pri daljšem času zorenja in/ali aktivnostih kombiniranih starterskih kultur, je aroma izdelkov celovitejša, polnejša in prijetnejša kot aroma krajši čas zorenih izdelkov. V izdelkih južne Evrope je pogosta uporaba *S. xylosus*, njegova uporaba je priporočena za izdelke z značilno polno, zaokroženo aromo in manj kislim okusom (Leroy in sod., 2006).

Tudi plesni in kvasovke pomembno vplivajo na karakteristike okusa. Prispevek teh organizmov pri oblikovanju tipične arome bazira na njihovi proteolitični in lipolitični aktivnosti. V prisotnosti kisika plesni in kvasovke ne tvorijo samo komponente arome,

ampak tudi oksidirajo mlečno kislino, pH vrednost naraste tudi nad 7,0. Taki izdelki imajo drugačen, bolj pikanten okus. Plesen na površini izdelka vpliva na okus tudi s preprečevanjem dostopa kisika in omogoča mikroklimo, ki spodbuja pravilno osuševanje izdelka.

2.5 EMBALIRANJE SUŠENIH MESNIN

Ob doseženi tehnološki zrelosti se sušeni mesni izdelki embalirajo (na primer vakuumski postopek, embaliranje v modificirani atmosferi ali embaliranje v perforirane materiale). Glede na način embaliranja izdelke skladiščimo pri različnih temperaturah. Vakumirane izdelke skladiščimo pri temperaturi 4 °C do 8 °C, izdelke embalirane v modificirani atmosferi ali v perforirane materiale pri temperaturah med 6 °C do 12 °C. Namen embaliranja je podaljšanje obstojnosti, zaščita izdelka pred mehanskimi, mikrobiološkimi ter kemičnimi spremembami in ohranitev senzoričnih lastnosti.

Posebnost sušenih mesnin je stabilnost in bakteriološka varnost tudi pri sobni temperaturi. Na površini izdelkov se niso sposobni razviti niti kvarljivci niti patogeni mikororganizmi. Lažje se lahko razvijejo plesni, ki so tolerantne na nizke a_w vrednosti. Ne glede na potencialno rast plesni na površini (predvsem med hranjenjem pri neprimerni relativni vlagi), je stabilnost izdelkov omejena s senzoričnimi spremembami, ki so posledica fizikalnih in kemijskih vplivov. Pri višjih temperaturah pride do topljenja maščob, v prisotnosti kisika pa lahko pride do žarkosti. Z uporabo vakuumskega pakiranja ali pakiranja v modificirani atmosferi je hranjenje sušenih mesnin lahko uspešno tudi do nekaj mesecev, lahko tudi do enega leta. Temperature med skladiščenjem in distribucijo morajo biti čimbolj konstantne, saj vsako nihanje predstavlja nevarnost za kakovost in obstojnost izdelkov (Incze, 2003; Bem in sod., 2003)

Embaliranje izdelkov v modificirani atmosferi je definirano kot postopek, pri katerem se obda živilo v materiale z nizko propustnostjo za pline. Spremeni se plinsko okolje z namenom upočasnitve intenzivnosti dihanja, redukcije mikrobne rasti in upočasnitve encimske aktivnosti, z namenom podaljšanja obstojnosti živila. Pri embaliranju sušenih mesnin je atmosfera modificirana tako, da je zmanjšana prisotnost kisika ter povečana koncentracija CO₂. Najpogosteje se uporablja mešanica ogljikovega dioksida in dušika v razmerju 20 CO₂ : 80 N₂ (Gašperlin, 2001).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL IN NAČRT POSKUSA

3.1.1 Načrt poskusa

Za poskus smo izbrali izdelek kraški salamin. Pripravili smo tri skupine izdelkov:

- 1. skupina: izdelki, narejeni po standardni recepturi, s komercialno osnovno startersko kulturo (standard/kontrola),
- 2. skupina: izdelki, katerim sta bila poleg komercialne osnovne starterske kulture dodana probiotik in prebiotik inulin (PP),
- 3. skupina: izdelki, katerim sta bila poleg osnovne starterske kulture dodana probiotik, prebiotik ter bila spremenjena sestava nadeva – zmanjšana vsebnost maščobe (PP + MM).

Vsaka skupina izdelkov je bila izdelana v treh ponovitvah oz. serijah po 100 kg. Skupno smo torej imeli 9 vzorčnih skupin po 100 kg. Izdelke smo pripravili po standardni recepturi. Priprava salaminov ter postopek sušenja in zorenja je potekal v podjetju Kras, mesnopredelovalna industrija d.d., Obrat Šepulje. Vse vzorčne skupine so bile celoten čas sušenja/zorenja izpostavljene enakim klimatskim pogojem.

Namen poskusa je bil ugotoviti vpliv dodane probiotične kulture, prebiotika inulina ter spremenjene sestave nadeva – zmanjšane vsebnosti maščob, na kakovostne parametre izdelkov. Vzorce iz poskusa smo ovrednotili z analizo kemijske sestave (vsebnost vode, vsebnost maščobe, vsebnost beljakovin, vsebnost soli, vsebnost mineralnih snovi in vsebnost inulina), s pomočjo fizikalnih analiz (pH vrednost, a_w vrednost, izguba mase), instrumentalnih analiz teksture (meritve z nastavkom Volodkevich in nastavkom Kramer) ter s senzoričnim ocenjevanjem. Z mikrobiološkimi analizami (skupno število mikroorganizmov, skupno število laktobacilov, preverjanje prisotnosti probiotika *L. paracasei* subsp. *paracasei*) pa smo ugotavljali ali dodan probiotik preživi tehnološki postopek in dvomesečno skladiščenje izdelka.

Med samim postopkom sušenja/zorenja smo spremljali sledeče tehnološke parametre:

- izguba mase (na dan polnjenja, 3., 7., 14., 28. dan ter ob koncu zorenja),
- pH vrednost (na dan polnjenja, 3., 7., 14. dan ter ob koncu zorenja),
- temperaturo in relativno vlažnost v prostoru/zorilnici (vsak delovni dan).

Ob koncu zorenja (po 35 dneh) so bile opravljene naslednje analize izdelkov:

- a_w vrednost na BF, Oddelek za živilstvo, Katedra za kemijo,
- analiza kemijske sestave na BF, Oddelek za živilstvo, Katedra za tehnologijo mesa in gotovih jedi in Katedra za vrednotenje živil,
- ugotavljanje vsebnosti inulina na Kemijskem inštitutu v Ljubljani,
- instrumentalne analize teksture klobas na BF, Oddelek za živilstvo, Katedra za tehnologijo mesa in gotovih jedi,
- senzorična ocena na BF, Oddelek za živilstvo, Katedra za tehnologijo mesa in gotovih jedi.

Mikrobiološke analize so bile opravljene ob koncu zorenja ter po dvomesečnem skladiščenju embaliranih izdelkov v hladilnici na temperaturi med 8 °C do 10 °C. Analize so bile opravljene na BF, Oddelek za zootehniko, Katedra za mlekarstvo.

Dobljene rezultate smo med seboj primerjali in jih statistično obdelali.

3.1.2 Material za poskus

3.1.2.1 Izdelki

Za izdelavo salaminov 1. skupine (standard/kontrola) smo uporabili sledeče sestavine:

- svinjsko meso II. kategorije,
- čvrsta hrbtina slanina (preračunano skupaj do 25 % dodane mastnine),
- 2,6 % drobna morska sol,
- 1 % mešanica mesnih svinjskih proteinov v prahu in naravne arome,
- 0,6 % mešanica sladkorjev, antioksidant E 301 (natrijev askorbat) in naravne arome,
- 0,015 % nitrat (E 252),
- 0,01 % nitrit (E 250),
- starterska kultura Bactoferm SM 181.

Za izdelavo salaminov 2. skupine (PP) smo uporabili sledeče sestavine:

- svinjsko meso II. kategorije,
- čvrsta hrbtina slanina (preračunano skupaj do 25 % dodane mastnine),
- 2,6 % drobna morska sol,
- 1 % mešanica mesnih svinjskih proteinov v prahu in naravne arome,
- 1 % inulin kot prebiotik,
- 0,6 % mešanica sladkorjev, antioksidant E 301 (natrijev askorbat) in naravne arome,
- 0,015 % nitrat (E 252),
- 0,01 % nitrit (E 250),
- starterska kultura Bactoferm SM 181,
- probiotična kultura FD-DVS *L. casei*-01 nu-trish^R.

Za izdelavo izdelkov 3. skupine (PP + MM) smo uporabili sledeče sestavine:

- svinjsko meso II. kategorije,
- 15 % emulzija – nadomestek slanine (preračunano skupaj do 15 % dodane mastnine),
- 2,6 % drobna morska sol,
- 1 % mešanica mesnih svinjskih proteinov v prahu in naravne arome,
- 1 % inulin kot prebiotik,
- 0,6 % mešanica sladkorjev, antioksidant E 301 (natrijev askorbat) in naravne arome,
- 0,015 % nitrat (E 252),
- 0,01 % nitrit (E 250),
- starterska kultura Bactoferm SM 181,
- probiotična kultura FD-DVS *L. casei*-01 nu-trish^R.

3.1.2.2 Dodatki

Starterska kultura: Za pripravo salaminov ene sarže smo uporabili 1 originalno pakiranje (25 g) liofilizirane starterske kulture s komercialnim imenom Bactoferm SM 181 danske firme Chr. Hansen. Vsebuje mešanico *Lactobacillus sake* HJ-7 in *Staphylococcus xylosus* DD-34, v koncentraciji 0,75 do 1,25 x 10¹² ke/g. Za startersko kulturo je značilna srednja acidifikacija, kratka lag faza, nižje temperature fermentacije ter ugoden vpliv na barvo in aromo izdelkov.

Prebiotik: Uporabili smo inulin, čistosti 99,5 %, s komercialnim imenom Raftiline HP, proizvajalec je belgijska firma Orafti.

Probiotik: Dodali smo 12,5 g probiotične kulture *L. paracasei* subsp. *paracasei* v koncentraciji 10¹¹ ke/g kulture, s komercialnim imenom FD-DVS L. casei-01 nu-trish^R, proizvajalec je danska firma Chr. Hansen.

Emulzija – nadomestek slanine: Emulzijo sestavlja 10 % aditiva, 30 % čvrste hrbtne slanine ter 60 % vode. Aditiv sestavljajo ogljikohidratni nadomestki maščob, kolagen, antioksidacijski rastlinski ekstrakti in naravne arome. Priprava emulzije prične z grobim razdevanjem slanine, ohlajene na -10 °C. Sledi dodatek aditiva in mrzle vode, nato nadaljujemo mletje na kutru še 3 do 4 min s povečano hitrostjo, tako da dobimo dobro homogenizirano emulzijo. Tako pripravljeno emulzijo je potrebno ohladiti na 2 °C, priporočljiva pa je priprava emulzije 1 dan pred pripravo nadeva.

3.1.3 Tehnološki postopek

Kot surovino smo uporabili sveže svinjsko meso II. kategorije, predhodno temperirano na -2 °C. Zmrznjeno hrbtno slanino (-18 °C) smo pred uporabo nasekali na giljotini. Po razdevanju surovin na volku (na 4 mm), dobimo maso s temperaturo -1,5 °C. Masi smo dodali mešanico aditivov in začimb ter starterske kulture. Sledilo je 1,5 min mešanje v vakuumskem mešalniku. Nadev s temperaturo -1 °C smo z vakuumskim polnilnikom polnili v kolagenske ovitke premera 50 mm. Ovitke smo pred polnjenjem namakali v mlačni, slani vodi. Po polnjenju smo salamine obesili na vozičke.

Preglednica 3: Tehnološki parametri med osuševanjem/zorenjem salaminov
Table 3: Technological parameters during drying/ripening of dry fermented sausages

faza/čas (h)	temperatura (°C)	relativna vlaga (%)
1. faza/ 18	22 - 24	85 - 90
2. faza/ 24	21 - 23	60 - 65
3. faza/ 24	20 - 22	70 - 75
4. faza/ 24	18 - 20	73 - 78
5. faza/ 24	16 - 18	75 - 80
6. faza/ 24	14 - 16	78 - 83
do konca zorenja	13 - 15	80 - 85

Sledilo je 6-dnevno osuševanje (osuševanje in fiksacija barve izdelka) v osuševalni komori, sedmi dan so bili izdelki prestavljeni v zorilno komoro. Za vsako posamezno fazo osuševanja/zorenja so bili nastavljeni in spremljani sledeči parametri: temperatura, relativna vlaga, čas trajanja posamezne faze, izmenjave zraka.

Ko so bili izdelki tehnološko zreli (po 35 dneh) smo jih embalirani v modificirani atmosferi (mešanica ogljikovega dioksida in dušika v razmerju 20 CO₂ : 80 N₂) ter skladiščili v hladilnici s temperaturo 8 °C do 10 °C.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Fizikalne analize

3.2.1.1 Izguba mase

Izgubo mase smo določali s tehtanjem izdelkov na elektronski tehtnici z natančnostjo 0,001 kg. Tehtali smo 4 vzorce iz vsake vzorčne skupine ter nato izračunali povprečno vrednost izgube mase za vsako vzorčno skupino.

Izračun izgube mase:

$$A = \frac{a - b}{a} \times 100 \%$$

A = izguba mase v %

a = masa sveže polnjenih klobas v kg

b = masa klobas na dan tehtanja v kg

3.2.1.2 Merjenje pH vrednosti

Metoda: za merjenje pH vrednosti vzorcev smo uporabili metodo merjenja v ekstraktu, ker je natančnejša od direktnega merjenja z vbodno elektrodo. Osnovni princip metode je ekstrakcija predhodno homogeniziranega vzorca z destilirano vodo.

Postopek: 5 g zmletega homogeniziranega vzorca, brez večjih delov maščobnega in vezivnega tkiva, prenesemo v čašo in prelijemo s 50 mL destilirane vode. Vzorec pustimo stati 15 min pri sobni temperaturi, medtem ga večkrat premešamo in nato filtriramo. V tako dobljenem vodnem ekstraktu izmerimo pH vrednost. pH meter je bil predhodno umerjen pri vrednostih pH = 4, pH = 7 in pH = 10. Meritve so bile opravljene na instrumentu Sartorius PB 20.

3.2.1.3 Merjenje a_w vrednosti

Termodinamsko aktivnost vode (a_w vrednost) smo izmerili z instrumentom CX - 1. Postopek: sesekljane in homogenizirane vzorce prenesemo v posodo za merjenje vodne

aktivnosti in jih segrejemo na delovno temperaturo instrumenta. Instrument CX - 1 je bil predhodno umerjen z nasičenimi vodnimi raztopinami soli z znano termodinamsko aktivnostjo.

3.2.2 Kemijske analize

3.2.2.1 Določanje vsebnosti vode

Metoda: vsebnost vode smo ugotavljali z metodo sušenja vzorca v zračnem sušilniku pri 105 °C do konstantne mase. Vse meritve smo opravili v dveh vzporednih določitvah.

Postopek: tehtič s stekleno palčko smo najmanj eno uro sušili pri 105 °C, ohladili v eksikatorju, stehali in dodali 10 do 20 g predhodno sušenega kremenčevega peska ter 5 do 10 g homogeniziranega vzorca. Vzorec smo s pomočjo steklene palčke dobro premešali s kremenčevim peskom, sledilo je sušenje v sušilniku pri 105 °C do konstantne mase (približno 4 do 5 ur) (Meso vaje, 2001a).

Izračun % vode:

$$\% \text{ vode} = \frac{a}{b} \times 100$$

a = izguba mase vzorca po sušenju

b = masa vzorca v g

3.2.2.2 Določanje vsebnosti maščob

Metoda: za določanje vsebnosti masti smo uporabili metodo po Weibullu in Stoldt. Vzorec kuhamo s HCl, da popolnoma razkrojimo beljakovine. Izločeno mast odfiltriramo in ekstrahiramo z organskim topilom v Soxhletovem aparatu (Meso vaje, 2001a).

Postopek: 5 do 10 g vzorca zatehtamo v čašo, dodamo 100 mL H₂O in 80 mL koncentrirane HCl ter segrevamo 15 min na vreli vodni kopeli. Med segrevanjem mešamo. Čašo postavimo na kuhalnik, pokrijemo z urnim steklom in pustimo, da vsebina približno 30 min polagoma vre. Še vroče razredčimo z vročo vodo, speremo urno steklo in takoj filtriramo skozi naguban vlažen filtrirni papir. Izpiramo z vročo vodo, dokler filtrat ne reagira več na klorove ione (dodatek 2M AgNO₃). Nato filtrirni papir z vsebino položimo na urno steklo, na katerega smo prej položili dvojno plast filter papirja in sušimo 2 do 4 ure pri 105 °C. Suh filter z vsebino in podloženim filter papirjem prenesemo v ekstrakcijski tulec, pokrijemo z vato in tulec vstavimo v ekstraktor Soxhletovega aparata. Urno steklo izperemo s topilom, ki ga vlijemo v ekstraktor. Čisto ekstrakcijsko bučko z vrelnimi kroglicami sušimo eno uro v sušilniku pri 105 °C, ohladimo v eksikatorju in stehamo. V bučko vlijemo topilo, jo spojimo z ekstraktorjem,

v katerem je filter papir z vsebino, spojimo s povratnim hladilnikom ter previdno segrevamo na vodni kopeli. Mast iz vzorca ekstrahiramo približno 6 ur. Po končani ekstrakciji topilo oddestiliramo, bučko z mastjo pa sušimo v sušilniku pri 105 °C do konstantne mase (približno 1 uro). Po hlajenju v eksikatorju bučko z mastjo stehamo in izračunamo % maščobe.

Izračun % maščobe:

$$\% \text{ maščobe} = \frac{(b - a)}{z} \times 100$$

a = masa prazne bučke v g

b = masa bučke z maščobo v g

z = masa vzorca v g

3.2.2.3 Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi

Metoda: vsebnost skupnih mineralnih snovi smo določali z metodo s suhim sežigom vzorca. Pri tej metodi dobimo anorganski ostanek živila. Meritve smo opravljali v dveh vzporednih določitvah (Meso vaje, 2001a).

Postopek: žarilni lonček najprej posušimo, nato pa ga 1 uro žarimo v peči pri temperaturi sežiga (525 °C do 550 °C). Lonček ohladimo v eksikatorju in stehamo. Nato vanj zatehamo 5 do 10 g homogeniziranega vzorca in ga nekaj ur sušimo v sušilniku pri 105 °C. Zatem vzorec pooglenimo nad umirjenim plamenom in ga nato 4 do 5 ur sežigamo v žarilni peči pri temperaturi 525 °C do 550 °C. Po končanem sežigu lonček s pepelom ohladimo v eksikatorju in stehamo.

Izračun:

$$\% \text{ pepela} = \frac{a}{b} \times 100$$

a = masa pepela v g

b = masa vzorca v g

3.2.2.4 Določanje vsebnosti soli

Metoda: vsebnost soli smo določali z metodo po Volhardu. Kloride oborimo z AgNO₃; prebitek AgNO₃ določimo z rodanidom v kislem mediju; prebitek rodanida pa določimo z Fe³⁺ soljo v kislem mediju, pri čemer dobimo intenzivno rdečo barvo Fe(III) tiocianata.

Postopek: približno 10 g zmletega in homogeniziranega vzorca zmešamo v majhni čaši z malo vode, prenesemo v 200 mL merilno bučo, dodamo vročo destilirano vodo. Bučko brez zamaška postavimo v vrelo vodno kopel za 15 minut in vsebino večkrat premešamo. Po ohlaiditvi dodamo po 10 mL Carrezove raztopine I in II, da se balastne snovi sesedejo, nato dopolnimo do 200 mL in premešamo. Ko se usedlina sesede, jo filtriramo skozi naguban filtrirni papir. Filtriramo ves vzorec. Nekaj prvih mL filtrata odstranimo, 20 mL popolnoma bistrega filtrata pa s pipeto nakapljamo v 250 mL erlenmajerico. Dodamo 20 mL natančno odmerjene 0,1 M raztopine srebrovega nitrata, 10 mL 10 % dušikove kisline in 5 mL etra. To premešamo in ko se tekočina zbistri, dodamo 5 mL raztopine amonijevega ferisulfata, ostanek srebrovega nitrata pa titriramo z 0,1 M raztopino amonijevega rodanida, dokler se ne pokaže obstojna rdečkasta barva. Po porabljeni količini srebrovega nitrata izračunamo vsebnost natrijevega klorida (Meso vaje, 2001b).

Izračun:

$$\% \text{ soli} = \frac{(a - b) \times M \text{ NH}_4\text{CNS} \times 58,46}{\text{masa vzorca}}$$

a = mL NH₄CNS porabljeni za titracijo slepega vzorca

b = mL NH₄CNS porabljeni za titracijo vzorca

M = molarnost NH₄CNS

1 mL 0,1 M AgNO₃ odgovarja 0,005846 g NaCl

3.2.2.5 Določanje vsebnosti beljakovin

Metoda: Kjeldahlova metoda temelji na določanju beljakovin neposredno preko dušika (ob upoštevanju, da je ves dušik, prisoten v živilu, beljakovinski). Za preračunavanje dušika v beljakovine uporabljamo ustrezne faktorje (Golob in Plestenjak, 2000).

Vzorec razklopimo z mokrim sežigom s pomočjo kisline (H₂SO₄), katalizatorja in visoke temperature. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo NH₃, ki ga lovimo v prebitek borne kisline in nato titriramo amonijev borat s standardno klorovodikovo kislino ali v določeno količino kisline znane koncentracije; prebitek kisline pa titriramo z bazo znane koncentracije.

Postopek: razdelimo na tri faze

- a) mokri sežig: v sežigno epruveto odtehtamo 0,6 do 0,7 g vzorca. Vzorec natehtamo na tehtirno ladjico in damo vse skupaj v epruveto. V epruveto dodamo 2 tableti bakrovega katalizatorja in 20 mL koncentrirane H₂SO₄. Epruveto postavimo v stojalo in pokrijemo s steklenimi zvonci. Vse skupaj postavimo v ogreto enoto za razklop (Digestion Unit), kjer je temperatura 370 °C. Z vodno črpalko odvajamo zdravju škodljive hlape prek enote imenovane Scrubber, kjer se del hlapov utekočini, preostanek se nevtralizira v cca. 15 % raztopini NaOH in končno vodi prek aktivnega oglja. Sežig je končan po 1 uri.

- b) destilacija: vzorec ohladimo v epruveti na sobno temperaturo. Epruveto postavimo v destilacijsko enoto, kjer poteče doziranje 50 mL destilirane vode in 70 mL baze (NaOH) v vzorec. V destilacijsko predložko se dozira 60 mL borne kisline (H_3BO_4). Nato se začne uvajati para v vzorec. Destilacija traja 4 min.
- c) Raztopino nastalega amonborata v predložki titriramo z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4,65. Titracija poteče avtomatsko po vnosu zatehte vzorca (v mg) v titracijsko enoto. V končni točki titracije se zabeleži poraba kisline, iz katere se izračuna % dušika v vzorcu ter % beljakovin v vzorcu (uporabi se splošni empirični faktor za preračun dušika v beljakovine, ki je enak 6,25).

Izračun:

$$\% \text{ beljakovin} = \frac{\text{mL } 0,1 \text{ M HCl} \times 1,4 \times f}{\text{mg (odtehta)}} \times 100 \times 6,25$$

$$f = \frac{\text{točna molarnost HCl}}{0,1 \text{ M HCl}}$$

$$\% \text{ beljakovin} = \% \text{ N} \times F$$

3.2.2.6 Določanje vsebnosti inulina

Metoda: vsebnost inulina smo določili s pomočjo tankoplastne tekočinske kromatografije. Uporabljena je bila TLC analiza AP Inulin - ISO AP - 06 - 1213 (Simonovska, 2000). Metoda sloni na določanju sladkorjev v vzorcu pred in po hidrolizi.

Priprava vzorca in postopek: vzorec se najprej hidrolizira 30 min v vroči vodni kopeli z 1 % oksalno kislino ter z uporabo encimov. S pomočjo tankoplastne kromatografske metode sledi determinacija fruktoze nastale po hidrolizi. Vsebnost inulina v vzorcu je preračunana iz razlike med vsebnostjo fruktoze v vzorcu pred in po hidrolizi.

3.2.2.7 Izračun energijske vrednosti v kJ/100 g izdelka

Izračun energijske vrednosti (EV):

$$\text{EV beljakovin} = \% \text{ beljakovin} \times 17,1$$

$$\text{EV maščob} = \% \text{ maščob} \times 38,9$$

$$\text{EV ogljikovih hidratov} = \% \text{ ogljikovih hidratov} \times 17,1$$

$$\text{EV inulina} = \% \text{ inulina} \times 6,3$$

$$\text{EV izdelka} = \text{EV beljakovin} + \text{EV maščob} + \text{EV ogljikovih hidratov} + \text{EV inulina}$$

(Golob, 2001; Kuhar, 2001)

3.2.3 Instrumentalne analize

Za instrumentalne meritve teksturnih lastnosti smo uporabili univerzalni aparat Texture analyser TA.XT plus z nastavkom Volodkevich (Volodkevich bite jaw) in s Kramer nastavkom (Kramer shear cell). Aparat je sestavljen iz kontaktnega nastavka (npr. rezila), iz zapisovalnika, ki grafično prikaže silo, potrebno za deformacijo živila ter iz pogonskega mehanizma (vertikalno gibanje kontaktnega nastavka z določeno hitrostjo).

Za meritve z nastavkom Volodkevich smo pripravili rezine iz sredine izdelka, dimenzij 11 mm x 20 mm x 50 mm. Hitrost vertikalnega pomika rezil je 2 mm/s. Rezultati meritev, izraženi v newtonih (N), predstavljajo upor vzorca na deformiranje z rezilom.



Slika 3: Nastavek Volodkevich (Texture analyser TA.XT plus, 2005)

Za meritve z nastavkom Kramer smo pripravili rezine dimenzij: 3 mm debelina rezine x 80 mm dolžina rezine. Širina rezine je enaka širini izdelka na prerezu. Rezino namestimo na sredino celice pod rezila. Uporabili smo nastavek s 5 rezili. Hitrost vertikalnega pomika rezil je 3 mm/s. Rezultat meritev je izražen v newtonih (N).



Slika 4: Nastavek Kramer (Texture analyser TA.XT plus, 2005)

3.2.4 Senzorična analiza

Za senzorično analizo smo uporabili test točkovanja z nestrukturirano točkovno lestvico iz skupin deskriptivnih analitičnih testov. Panel so sestavljali štiri izšolani preskuševalci. Ocene posameznih senzoričnih lastnosti sestavljajo povprečne ocene panela.

Ocenjene senzorične lastnosti in sistem ocenjevanja:

Oblika izdelka (1-7 točk)

- 1 - neprimerna oblika
- 7 - primerna oblika

Nagubanost površine (1-7 točk)

- 1 - nenagubana površina
- 7 - močno nagubana površina

Rob (1-7 točk)

- 1 - brez roba
- 7 - močno izražen rob

Intenzivnost barve (1-7 točk)

- 1 - barva ni intenzivna
- 7 - intenzivna, značilna barva

Povezanost rezine (1-4-7 točk)

- 1 - nepovezana, razpadajoča rezina
- 4 - dobra povezanost rezine
- 7 - gumijavost, prečvrsta povezanost

Tekstura (1-4-7 točk)

- 1 - gnečava tekstura
- 4 - optimalna tekstura
- 7 - prečvrsta tekstura

Vonj (1-7 točk)

- 1 - neznačilen vonj zrelega izdelka
- 7 - značilen in izražen vonj zrelega izdelka

Aroma (1-7 točk)

- 1 - neznačilna aroma zrelega izdelka
- 7 - značilna in izražena aroma zrelega izdelka

Slanost (1-4-7 točk)

- 1 - neslano
- 4 - optimalna slanost
- 7 - prevelika slanost

Skupni vtis (1-7 točk)

- 1 - vzorec je nesprejemljiv
- 7 - vzorec po vseh lastnostih dosega optimalno kakovost

Senzorični lastnosti oblika izdelka in nagubanost površine sta bili ocenjeni na celem izdelku; za oceno roba, intenzivnosti barve in povezanosti rezine se je pripravil vzdolžni prerez izdelka ter se je izdelek narezal na rezine debeline 2 mm. Ostale lastnosti tekstura, vonj, aroma, slanost in skupni vtis so bile ocenjene na rezinah debeline 2 mm. Odbitki za napake so bili po 0,5 točke.

3.2.5 Mikrobiološka analiza

3.2.5.1 Priprava vzorcev

Priprava vzorcev: 20 g salamina smo v sterilnih pogojih razdrobili in homogenizirali v 180 mL sterilnega diluenta z naslednjo sestavo v 1 L: 1 g pepton (Biolife), 0,85 g NaCl (Merck), 1 mL Tween 80 (Biolife). Nadaljnje razredčevanje je bilo opravljeno v peptonski vodi (1 g/L peptona v ¼ Ringerjevi raztopini).

3.2.5.2 Ugotavljanje števila mikroorganizmov

Za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov smo nacepili vzorce na Plate Count Agarju (Merck) ter inkubirali 2 dni pri 30 °C v aerobnih pogojih. Za ugotavljanje skupnega števila laktobacilov smo nacepili vzorce na gojišče LAMVAB ter inkubirali pri 30 °C 3 dni v anaerobnih pogojih (Generbox anaer, BioMerieux).

Gojišče LAMVAB je bilo sestavljeno tako kot so opisali Hartemink in sod. (1997), iz sestavin proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija). Antibiotik vankomicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA) smo dodajali (20 mg/L) v ohlajeno gojišče (45 °C) tik pred uporabo.

Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Število kolonijskih enot (KE) bakterij v gramu izdelka smo izračunali po naslednji formuli (IDF standard 100B, 1991):

$$KE = \Sigma n / ((f_a \cdot 1 + f_b \cdot 0,1) \cdot d)$$

Legenda:

- Σn = vsota kolonij zraslih na ploščah
- f_a = število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi
- f_b = število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi
- d = recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

Število bakterij vrste *Lactobacillus paracasei* je bilo ocenjeno na podlagi štetja kolonij tipične oblike, to je majhnih, belih kolonij. Da so te kolonije res *Lactobacillus paracasei* pa je bilo potrjeno z analizo DNA z reakcijo PCR, specifično za to vrsto.

3.2.5.3 Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrste *Lactobacillus paracasei* z metodo PCR

Postopek PCR smo izvedli po protokolu, ki sta ga opisala Ward in Timmins (1999). Oligonukleotidna začetnika, ki smo ju uporabili, se imenujeta para in Y2. Reakcija je potekala v 25 μ L. Po zaključeni reakciji smo po 10 μ L reakcijske mešanice pregledali z elektroforezo v 2 % agaroznem gelu, v pufru TAE. Elektroforezo smo vodili pri 90 V. Pričakovana velikost specifičnih produktov je bila 290 bp. Gel smo po elektroforezi barvali z etidijevim bromidom (0,5 μ g/mL) in pregledali pri UV svetlobi ($\lambda = 302$ nm). Parametri reakcije pa so opisani v preglednici 4.

Reakcijska mešanica (100 μ L) je bila sestavljena iz:

- 20 μ L 20 x GoTaq pufru za polimerazo (Promega, ZDA),
- 1,5 μ L oligonukleotidnega začetnika para (Invitrogen, UK; 100 μ M),
- 1,5 μ L oligonukleotidnega začetnika Y2 (Invitrogen, UK; 100 μ M),
- 2 μ L dNTP (Fermentas, Litva; 10mM),
- 0,5 μ L 2,5 U encima Taq polimeraze (Promega, ZDA; 5U μ L⁻¹),
- 66,5 μ L vode.

Reakcijske epruvetke so vsebovale po 23 μ L reakcijske mešanice in po 2 μ L vzorca z DNA.

Preglednica 4: Parametri poteka reakcije PCR

reakcija	parametri	št. ciklov
začetek	95 °C/3 min	1
denaturacija DNA	95 °C/45 s	30
prileganje oligonukleotidnih začetnikov	55 °C/45 s	
podaljševanje	72 °C/1 min	
zaključek	72 °C/5 min	1

3.2.6 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model).

Statistični model 1 smo uporabili za obdelavo podatkov merjenja parametrov salaminov. V model smo vključili vpliv skupine, proizvodne ponovitve in klobase.

Statistični model 2 smo uporabili za obdelavo podatkov merjenja vrednosti pH. Model je vključeval vpliv skupine, proizvodne ponovitve in časa merjenja. Vsi podatki so predstavljeni kot ocenjene srednje vrednosti (LS-mean).

Statistični model 1:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + PP_j + K_k + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = opazovana vrednost

μ = povprečna vrednost

G_i = vpliv i-te grupe; i = dodan probiotik in prebiotik ter manj dodane maščobe; dodan probiotik in prebiotik; standardna klobasa

PP_j = vpliv j-te proizvodne ponovitve; j = 1-3

K_k = vpliv k-te klobase; k = 1-2

e_{ijkl} = ostanek.

Statistični model 2:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + PP_j + C_k + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = opazovana vrednost

μ = povprečna vrednost

G_i = vpliv i-te grupe; i = dodan probiotik in prebiotik ter manj dodane maščobe; dodan probiotik in prebiotik; standardna klobasa

PP_j = vpliv j-te proizvodne ponovitve; j = 1-3

C_k = vpliv k-tega časa merjenja pH vrednosti; k = dan polnjenja, 3, 7, 14 dni, konec zorenja

e_{ijkl} = ostanek.

Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri sušenih klobas so izračunani z uporabo CORR procedure (SAS Software. Version 8.01, 1999).

4 REZULTATI

4.1 OSNOVNI STATISTIČNI PARAMETRI REZULTATOV SENZORIČNIH, INSTRUMENTALNIH, FIZIKALNO-KEMIJSKIH IN MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ IZDELKOV

V preglednicah 5 in 6 so prikazani osnovni statistični parametri za senzorične, instrumentalne, fizikalno-kemijske lastnosti salaminov, rezultati mikrobioloških analiz ter dejavniki, ki nanje vplivajo (viri variabilnosti). Vpliv posameznega dejavnika na določeno lastnost je izražen s P-vrednostjo. Merila zanj so podrobneje podana v legendah pod posamezno preglednico.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti rezultatov analiz vseh vzorcev
Table 5: Average values of results of analyses of all samples

parameter (enote)	n	\bar{x}	min	max	so	KV (%)
nastavek Kramer (N)	36	177,2	101,4	298,7	59,6	33,6
nastavek Volodkevich (N)	36	5,6	1,6	11,3	2,5	44,4
oblika izdelka (1-7 točk)	72	4,7	3,0	6,0	0,6	11,9
nagub. površine (1-7 točk)	72	3,4	1,5	5,0	0,8	23,0
rob (1-7 točk)	72	2,6	1,5	4,0	0,5	21,0
intenzivnost barve (1-7 točk)	72	4,8	3,5	6,0	0,5	10,9
povezan. rezine (1-4-7 točk)	72	3,5	2,0	5,0	0,6	16,7
tekstura (1-4-7 točk)	72	3,5	2,0	5,0	0,5	15,6
vonj (1-7 točk)	72	5,2	4,5	6,0	0,4	7,3
aroma (1-7 točk)	72	4,9	4,0	6,0	0,4	8,5
slanost (1-4-7 točk)	72	4,2	4,0	5,5	0,3	8,1
skupni vtis (1-7 točk)	72	4,9	3,5	6,0	0,5	9,9
vsebnost vode (%)	18	35,28	30,98	38,20	2,10	5,95
vsebnost maščobe (%)	18	32,09	26,58	39,27	4,23	13,17
vsebnost soli (%)	18	3,61	3,28	4,32	0,27	7,47
vsebnost sk. min.snovi (%)	18	5,47	4,81	6,21	0,47	8,52
vsebnost beljakovin (%)	18	26,89	24,23	29,56	1,69	6,30
vsebnost inulina (%)	9	1,07	0,00	1,66	0,80	75,07
a_w vrednost	9	0,885	0,870	0,899	0,011	1,267
izguba mase (%)	36	38,8	35,2	45,3	4,0	10,2
SŠMO (log ke/g)	36	7,9	7,3	8,2	0,3	3,4
<i>L.</i> (log ke/g)	36	7,7	7,3	8,0	0,2	2,5
<i>L.p.</i> (log ke/g)	36	4,9	0,0	7,6	3,5	71,7
SŠMO 2m (log ke/g)	36	7,7	7,0	8,1	0,3	3,6
<i>L.</i> 2m (log ke/g)	36	7,3	6,6	7,9	0,3	3,8
<i>L.p.</i> 2m (log ke/g)	36	4,8	0,0	7,6	3,4	72,0

Legenda:

n - število obravnavanj \bar{x} - povprečna vrednost min - minimalna vrednost,
max - maksimalna vrednost so - standardni odklon KV (%) - koeficient variabilnosti.
L. - *Lactobacillus* - skupno število laktobacilov *L.p.* - *Lactobacillus paracasei* - število bakterij *L. paracasei*
2m - meritve opravljene po dvomesečnem skladiščenju gotovih izdelkov

S statistično obdelavo rezultatov smo predvsem želeli ugotoviti vpliv skupine na parametre kakovosti salaminov ter ugotoviti, ali so predvidevanja, katera smo si postavili pred začetkom poskusa, pravilna.

Preglednica 6: Viri variabilnost rezultatov analiz izdelkov in njihova statistična značilnost

Table 6: Sources of variability of results and their statistic significance

parameter (enote)	skupina (LSM)				vpliv	
	standard	PP	PP + MM	SEM	P _g -vr.	P _{pp} -vr.
nastavek Kramer (N)	141,6 ^b	138,7 ^b	251,3 ^a	6,7	<0,0001	0,0022
nastavek Volodkevich (N)	4,15 ^b	5,20 ^b	7,31 ^a	0,6	0,0012	0,0112
oblika izdelka (1-7 točk)	4,7 ^{ab}	5,0 ^a	4,5 ^b	0,1	0,0046	0,4620
nagub. površine (1-7 točk)	3,3 ^b	2,8 ^c	4,0 ^a	0,1	<0,0001	0,5704
rob (1-7 točk)	2,5 ^a	2,7 ^a	2,6 ^a	0,1	0,1899	<0,0001
intenzivnost barve (1-7 točk)	4,8 ^a	4,8 ^a	5,0 ^a	0,1	0,3143	0,0007
povezan. rezine (1-4-7 točk)	3,3 ^b	3,4 ^b	3,9 ^a	0,1	<0,0001	<0,0001
tekstura (1-4-7 točk)	3,3 ^b	3,4 ^b	3,9 ^a	0,1	0,0003	0,0049
vonj (1-7 točk)	5,2 ^a	5,2 ^a	5,3 ^a	0,1	0,7340	0,1825
aroma (1-7 točk)	4,8 ^a	5,0 ^a	5,0 ^a	0,1	0,4290	0,3603
slanost (1-4-7 točk)	4,1 ^b	4,1 ^b	4,3 ^a	0,1	0,0207	0,1105
skupni vtis (1-7 točk)	4,8 ^a	5,0 ^a	5,0 ^a	0,1	0,2715	0,0262
vsebnost vode (%)	34,51 ^a	34,97 ^a	36,34 ^a	0,67	0,1716	0,0190
vsebnost maščobe (%)	34,74 ^a	34,03 ^a	27,51 ^b	0,83	<0,0001	0,0079
vsebnost soli (%)	3,59 ^a	3,52 ^a	3,72 ^a	0,10	0,4404	0,0678
vsebnost sk. min. snovi (%)	5,39 ^b	5,01 ^c	6,00 ^a	0,07	<0,0001	0,0294
vsebnost beljakovin (%)	26,12 ^b	26,01 ^b	28,53 ^a	0,42	0,0013	0,0215
vsebnost inulina (%)	0,00 ^b	1,59 ^a	1,62 ^a	0,02	<0,0001	0,2703
a _w vrednost	0,879 ^a	0,892 ^a	0,884 ^a	0,007	0,5464	0,7269
izguba mase (%)	36,7 ^b	35,4 ^c	44,1 ^a	0,2	<0,0001	0,0052
SŠMO (log ke/g)	8,13 ^a	7,72 ^b	7,88 ^c	0,044	<0,0001	<0,0001
L. (log ke/g)	7,80 ^a	7,60 ^b	7,74 ^a	0,046	0,0103	0,0111
L.p. (log ke/g)	0,00 ^c	7,37 ^b	7,47 ^a	0,026	<0,0001	0,8135
SŠMO 2m (log ke/g)	7,89 ^a	7,48 ^c	7,76 ^b	0,044	<0,0001	<0,0001
L. 2m (log ke/g)	7,15 ^b	7,23 ^b	7,50 ^a	0,067	0,0020	0,2925
L.p. 2m (log ke/g)	0,00 ^b	7,09 ^a	7,18 ^a	0,084	<0,0001	0,6427

Legenda:

Standard – izdelek narejen po standardni recepturi

PP – izdelek narejen z dodatkom probiotika in prebiotika

PP + MM – izdelek, kateri ima poleg dodatka probiotika in prebiotika zmanjšano vsebnost maščob

L.- *Lactobacillus* - skupno število laktobacilov L.p.- *Lactobacillus paracasei* - število bakterij *L. paracasei*

2m - meritve opravljene po dvomesečnem skladiščenju gotovih izdelkov

LSM – ocenjena srednja vrednost

SEM – napaka srednje vrednosti

g – vpliv skupine ; pp – vpliv proizvodne ponovitve

P≤0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv; P≤0,01 statistično visoko značilen vpliv; P≤0,05 statistično značilen vpliv; nz - P>0,05 statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.2 VPLIV SKUPINE NA IZMERJENE PARAMETRE

4.2.1 Senzorične lastnosti izdelkov in instrumentalne analize teksture

Statistična analiza rezultatov senzoričnih lastnosti in instrumentalno izmerjeno teksturo salaminov (Preglednica 7) je pokazala, da v senzoričnih lastnostih med standardno skupino in skupino z dodanim probiotikom in prebiotikom ni statistično značilnih razlik, razen v obliki izdelka in nagubanosti površine. Iz rezultatov lahko sklepamo, da dodatek probiotika in prebiotika ne vpliva negativno na senzorične lastnosti.

Nasprotno, izdelki z dodatkom probiotika in prebiotika (PP) imajo boljšo obliko in manjšo nagubanost površine, pa tudi v lastnostih aroma in skupni vtis so bili ti izdelki bolje ocenjeni kot izdelki s standardno recepturo (Preglednica 7), čeprav razlike med skupinami niso statistično značilne.

Skupina izdelkov, z dodanim probiotikom in prebiotikom ter z zmanjšano vsebnostjo maščob (PP + MM), se od ostalih dveh skupin statistično značilno razlikuje v več lastnostih: obliki izdelka, nagubanosti površine, povezanosti rezine, teksturi in slanosti. Izdelki iz skupine PP + MM so imeli bolj nagubano površino in so bolj slani kot ostali dve skupini, imajo pa boljšo povezanost rezine ter optimalnejšo teksturo. Prav tako so bili ocenjeni z višjo oceno za intenzivnost barve, vendar razlika ni statistično značilna. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so statistično značilne razlike posledica spremenjene sestave nadeva in ne dodatka probiotične starterske kulture in prebiotika.

Vpliv skupine se pokaže tudi pri instrumentalno izmerjeni teksturi, kjer so razlike med posameznimi skupinami statistično zelo visoko značilne pri meritvah opravljenih z nastavkom Kramer, oziroma statistično visoko značilne pri meritvah opravljenih z nastavkom Volodkevich.

Podobno kot pri senzoričnih lastnostih, med skupino standard ter med skupino PP ni statistično značilnih razlik v instrumentalno izmerjeni teksturi, medtem ko so med skupino PP + MM in ostalima dvema skupinama statistično značilne razlike. Za prerez rezin je bila potrebna večja sila kot pri ostalih dveh skupinah, tako z nastavkom Kramer kot z nastavkom Volodkevich, kar lahko primerjamo tudi z rezultati senzorične analize, kjer je skupina PP + MM prejela višje točke za lastnosti tekstura in povezanost rezine napram ostalima dvema skupinama.

Na slikah 5 in 6 sta prikazana primera grafa opravljenih meritev z nastavkom Volodkevich in z nastavkom Kramer.

Preglednica 7: Vpliv skupine na senzorične lastnosti in instrumentalno izmerjeno teksturo salaminov

Table 7: Impact of group on sensory and instrumental properties of dry fermented sausages

parameter (enote)	skupina (LSM)				vpliv
	standard	PP	PP + MM	SEM	P-vrednost
senzorične lastnosti					
oblika izdelka (točke 1 - 7)	4,7 ^{ab}	5,0 ^a	4,5 ^b	0,1	0,0046**
nagubanost površine (točke 1 - 7)	3,3 ^b	2,8 ^c	4,0 ^a	0,1	<0,0001***
rob (točke 1 - 7)	2,5 ^a	2,7 ^a	2,6 ^a	0,1	0,1899
intenzivnost barve (točke 1 - 7)	4,8 ^a	4,8 ^a	5,0 ^a	0,1	0,3143
povezanost rezine (točke 1 - 4 - 7)	3,3 ^b	3,4 ^b	3,9 ^a	0,1	<0,0001***
tekstura (točke 1 - 4 - 7)	3,3 ^b	3,4 ^b	3,9 ^a	0,1	0,0003***
vonj (točke 1 - 7)	5,2 ^a	5,2 ^a	5,3 ^a	0,1	0,7340
aroma (točke 1 - 7)	4,8 ^a	5,0 ^a	5,0 ^a	0,1	0,4290
slanost (točke 1 - 4 - 7)	4,1 ^b	4,1 ^b	4,3 ^a	0,1	0,0207*
skupni vtis (točke 1 - 7)	4,8 ^a	5,0 ^a	5,0 ^a	0,1	0,2715
instrumentalne lastnosti teksture					
nastavek Kramer (N)	141,6 ^b	138,7 ^b	251,3 ^a	6,7	<0,0001***
nastavek Volodkevich (N)	4,15 ^b	5,20 ^b	7,31 ^a	0,6	0,0012**

Legenda:

Standard – izdelek narejen po standardni recepturi

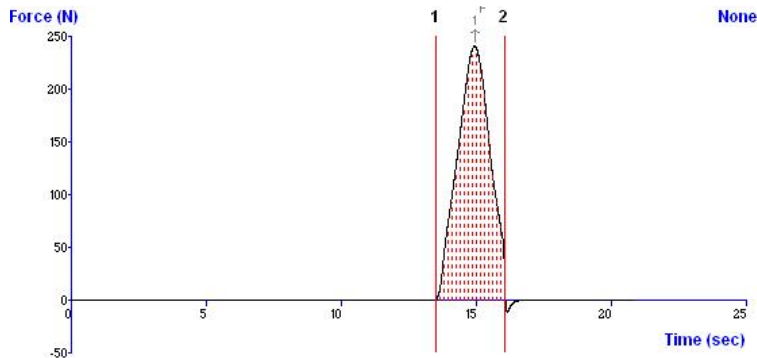
PP – izdelek narejen z dodatkom probiotika in prebiotika

PP + MM – izdelek, kateri ima poleg dodatka probiotika in prebiotika zmanjšano vsebnost maščob

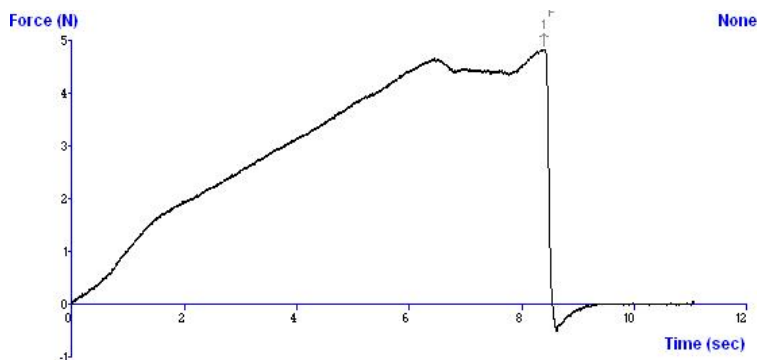
LSM – ocenjena srednja vrednost

SEM – napaka srednje vrednosti

***P≤0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv; **P≤0,01 statistično visoko značilen vpliv; *P≤0,05 statistično značilen vpliv; nz - P>0,05 statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.



Slika 5: Primer grafa opravljenih meritev z nastavkom Volodkevich
Figure 5: An example graph of measurements done with Volodkevich bite jaw



Slika 6: Primer grafa opravljenih meritev z nastavkom Kramer
Figure 6: An example graph of measurements done with Kramer shear cell

4.2.2 Fizikalno-kemijski parametri izdelkov

Glede na dobljene rezultate (Preglednica 8) ugotavljamo, da so pri merjenih fizikalnih parametrih statistično značilne razlike le pri izgubi mase (osušku), medtem ko med izmerjenimi a_w vrednostmi med skupinami ni statistično značilnih razlik. Največja izguba mase je pri skupini PP + MM, najmanjša pa pri skupini PP. Ponovno lahko sklepamo, da ima na izgubo mase vpliv spremenjena sestava nadeva (zmanjšana vsebnost maščob) v večji meri kot pa dodatek probiotične starterske kulture in inulina.

Glede kemijskih parametrov med standardno skupino ter skupino PP ni statistično značilnih razlik, razen v vsebnosti mineralnih snovi ter seveda v dejstvu, da skupina PP vsebuje prebiotik inulin, kateri pa ni bil dodan izdelkom narejenim po standardni recepturi.

Salamini skupine PP + MM se od ostalih dveh skupin statistično značilno ($P \leq 0,001$) razlikujejo v treh lastnostih, razlike so v nižji vsebnosti maščob ter višji vsebnosti mineralnih snovi in beljakovin. Vsebnost soli je najvišja, ni pa statistično značilne razlike napram ostalima dvema skupinama. Presenetljiv je podatek, da je kljub najvišji izgubi mase, najvišja tudi vsebnost vode, kar lahko pripišemo tehnološkim lastnostim dodane emulzije (dodatku maščobnih nadomestkov).

Preglednica 8: Vpliv skupine na fizikalno- kemijske parametre salaminov
Table 8: Impact of group on physico-chemical parameters of dry fermented sausages

parameter (enote)	skupina (LSM)				vpliv
	standard	PP	PP + MM	SEM	P-vrednost
fizikalni parametri					
izguba mase (%)	36,7 ^b	35,4 ^c	44,1 ^a	0,2	<0,0001***
a _w vrednost	0,879 ^a	0,892 ^a	0,884 ^a	0,007	0,5464
kemijski parametri					
vsebnost vode (%)	34,51 ^a	34,97 ^a	36,34 ^a	0,67	0,1716
vsebnost maščobe (%)	34,74 ^a	34,03 ^a	27,51 ^b	0,83	<0,0001***
vsebnost soli (%)	3,59 ^a	3,52 ^a	3,72 ^a	0,10	0,4404
vsebnost sk. min. snovi (%)	5,39 ^b	5,01 ^c	6,00 ^a	0,07	<0,0001***
vsebnost beljakovin (%)	26,12 ^b	26,01 ^b	28,53 ^a	0,42	0,0013**
vsebnost inulina (%)	0,00 ^b	1,59 ^a	1,62 ^a	0,02	<0,0001***

Legenda:

Standard – izdelek narejen po standardni recepturi

PP – izdelek narejen z dodatkom probiotika in prebiotika

PP + MM – izdelek, kateri ima poleg dodatka probiotika in prebiotika zmanjšano vsebnost maščob

LSM – ocenjena srednja vrednost

SEM – napaka srednje vrednosti

*** $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz - $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.2.2.1 pH vrednost izdelkov

Pri analizi meritev pH vrednosti smo poleg vpliva skupine obravnavali tudi vpliv časa sušenja/zorenja. Na osnovi izmerjenih pH vrednosti ugotavljamo, da ni statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami, glede vpliva časa zorenja pa je največji padec pH vrednosti izmerjen na tretji dan sušenja. Statistično visoko značilen vpliv in največji padec pH vrednosti pa je ugotovljen pri skupini PP (Preglednica 9, Slika 7).

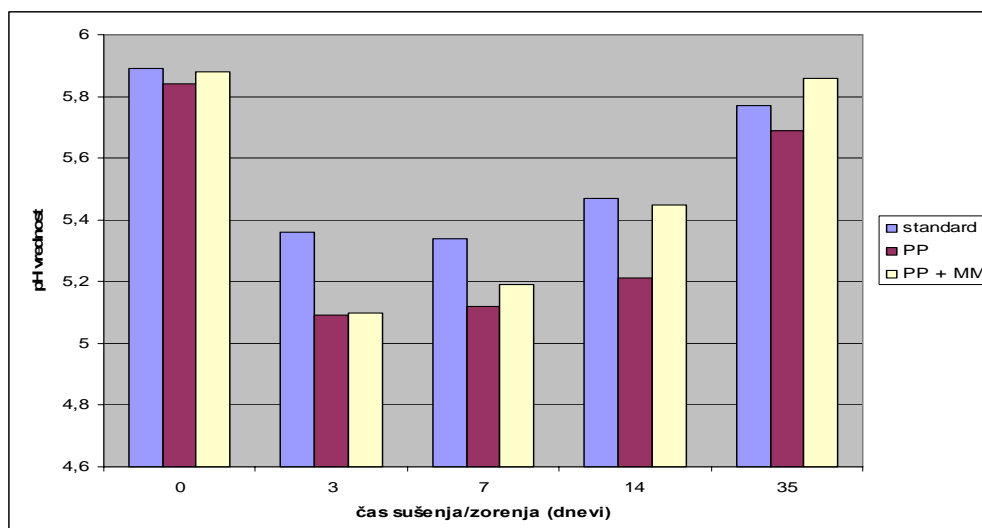
Preglednica 9: Vpliv skupine in časa zorenja na spreminjanje pH vrednosti salaminov
Table 9: Impact of group and time of ripening on pH value of dry fermented sausages

čas (dnevi)	skupina (LSM)			vpliv skupine (P-vrednost)
	standard	PP	PP + MM	
0 (dan polnjenja)	5,89 ^a	5,84 ^a	5,88 ^a	0,6807
3	5,36 ^b	5,09 ^b	5,10 ^b	0,0803
7	5,34 ^b	5,12 ^b	5,19 ^b	0,3724
14	5,47 ^{ab}	5,21 ^b	5,45 ^{ab}	0,7510
35 (konec zorenja)	5,77 ^{ab}	5,69 ^a	5,86 ^a	0,8342
vpliv časa zorenja (P-vrednost)	0,0729	0,0054**	0,0531	n = 45

Legenda:

n – število obravnavanj

*** P<0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv;** P<0,01 statistično visoko značilen vpliv;* P<0,05 statistično značilen vpliv; nz - P>0,05 statistično neznačilen vpliv; v indeksu je prikazan vpliv časa, ocenjene povprečne vrednosti znotraj stolpca z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.



Slika 7: Spreminjanje pH vrednosti med sušenjem/zorenjem salaminov

Figure 7: Changes in pH value during drying/ripening of dry fermented sausages

4.2.2.2 Izguba mase (%) med sušenjem/zorenjem izdelkov

Iz preglednice 10 in slike 8 vidimo, da je največja izguba mase ugotovljena pri skupini PP + MM in to ne samo ob koncu zorenja, temveč ves čas sušenja/zorenja. Najmanjša izguba mase pa je pri skupini PP, kar se je prav tako izražalo ves čas sušenja/zorenja.

Preglednica 10: Izguba mase (%) med sušenjem/zorenjem salaminov

Table 10: Weight loss (%) during drying/ripening of dry fermented sausages

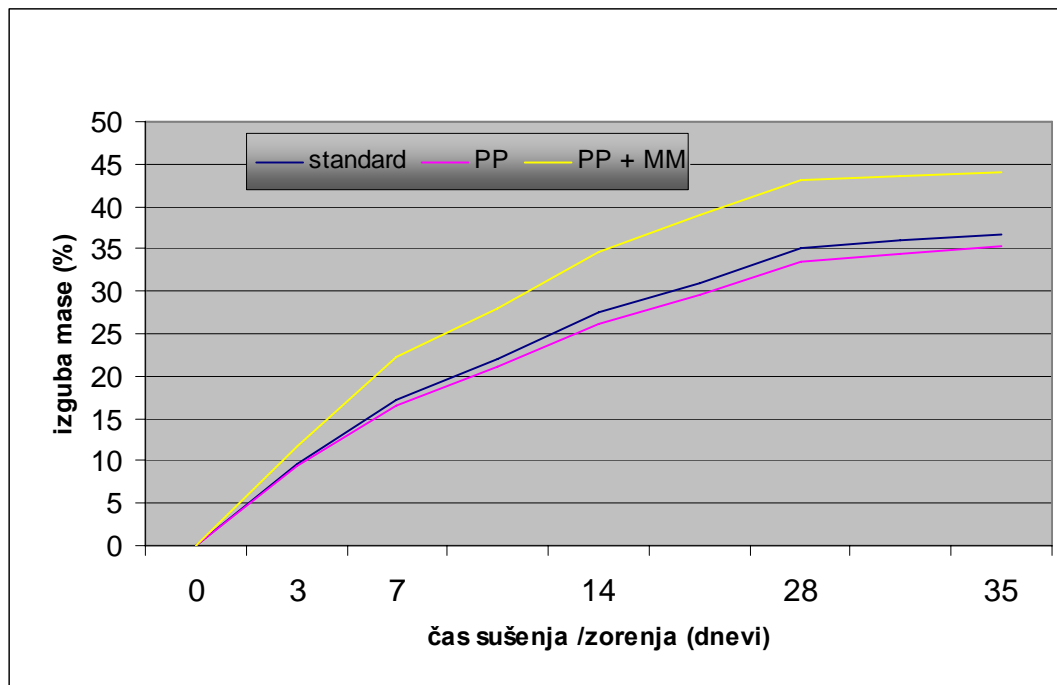
čas (dnevi)	skupina		
	standard	PP	PP + MM
0 (dan polnjenja)	0	0	0
3	9,7	9,3	11,8
7	17,1	16,5	22,2
14	27,6	26,1	34,7
28	35,0	33,6	43,1
35 (konec zorenja)	36,7	35,4	44,1

Legenda:

Standard – izdelek narejen po standardni recepturi

PP – izdelek narejen z dodatkom probiotika in prebiotika

PP + MM – izdelek, kateri ima poleg dodatka probiotika in prebiotika zmanjšano vsebnost maščob



Slika 8: Izguba mase (%) med sušenjem/zorenjem salaminov

Figure 8: Weight loss (%) during drying/ripening of dry fermented sausages

4.2.2.3 Izračunana energijska vrednost izdelkov

Največja energijska vrednost je izračunana pri standardni skupini salaminov, najnižja pa, po pričakovanjih, pri skupini s spremenjeno sestavo – z zmanjšano vsebnostjo maščob, ki je za kar 229,9 kJ manjša. Med standardno skupino in skupino PP so minimalne razlike v energijski vrednosti.

Preglednica 11: Izračunana energijska vrednost salaminov (kJ/100 g)

Table 11: Calculated caloric value of dry fermented sausages (kJ/100 g)

skupina	kemijska sestava (g/100 g)				energijska vrednost (kJ/100 g)
	maščobe	beljakovine	ogljikovi hidrati*	inulin	
standard	34,74	26,12	< 0,3	0,00	1798,1
PP	34,03	26,01	< 0,3	1,59	1778,6
PP + MM	27,51	28,53	< 0,3	1,62	1568,2

Legenda:

*Ogljikovi hidrati brez inulina; glede na začetni dodatek sladkorjev 0,3% po recepturi, predvidevamo, da so bili dodani sladkorji prefermentirani v celoti, zato se njihova vrednost ni upoštevala pri izračunu energijske vrednosti.

4.2.3. Mikrobiološka analiza izdelkov

Mikrobiološka analiza je bila opravljena ob koncu zorenja izdelkov ter po dvomesečnem skladiščenju embaliranih izdelkov v hladilnici na temperaturi 8 °C do 10 °C.

Glede na dobljene rezultate (Preglednica 12) ugotavljamo statistično zelo visoko značilne razlike med skupinami glede skupnega števila mikroorganizmov, tako ob koncu zorenja, kot po dvomesečnem skladiščenju. Statistično značilne razlike so tudi v številu laktobacilov, ob koncu zorenja jih je bilo največ prisotnih v izdelkih, narejenih po standardni recepturi, po dvomesečnem skladiščenju pa v izdelkih skupine PP + MM.

Ob koncu zorenja je statistično značilna razlika v številu *L. paracasei* med skupinama PP in PP + MM, po dvomesečnem skladiščenju pa statistično značilne razlike ni več. Nadevu (100 kg) smo dodali 12,5 g probiotične kulture, ki vsebuje 10^{11} ke/g seva *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Torej je bil začetni vnos probiotične bakterije $1,25 \times 10^7$ ke/g nadeva. Pri končnih izdelkih je bilo število *L. paracasei* pri obeh skupinah nad 10^7 , po dvomesečnem skladiščenju se je nekoliko znižalo, vendar pa je vrednost še vedno ostala večja kot 10^7 ke/g. Probiotičen sev je preživel tehnološki postopek in dvomesečno skladiščenje in je prisoten v izdelku v številu nad 10^7 ke/g, kar zadostuje za probiotičen izdelek.

Preglednica 12: Vpliv skupine na mikrobiološke parametre salaminov

Table 12: Impact of group on microbiological parameters of dry fermented sausages

parameter (enota)	skupina (LSM)				vpliv
	standard	PP	PP + MM	SEM	P-vrednost
SŠMO (log ke/g)	8,13 ^a	7,72 ^b	7,88 ^c	0,044	<0,0001***
L. (log ke/g)	7,80 ^a	7,60 ^b	7,74 ^a	0,046	0,0103*
L.p. (log ke/g)	0,00 ^c	7,37 ^b	7,47 ^a	0,026	<0,0001***
SŠMO 2m (log ke/g)	7,89 ^a	7,48 ^c	7,76 ^b	0,044	<0,0001***
L. 2m (log ke/g)	7,15 ^b	7,23 ^b	7,50 ^a	0,067	0,0020**
L.p. 2m (log ke/g)	0,00 ^b	7,09 ^a	7,18 ^a	0,084	<0,0001***

Legenda:

Standard – izdelek narejen po standardni recepturi

PP – izdelek narejen z dodatkom probiotika in prebiotika

PP + MM – izdelek, kateri ima poleg dodatka probiotika in prebiotika zmanjšano vsebnost maščob

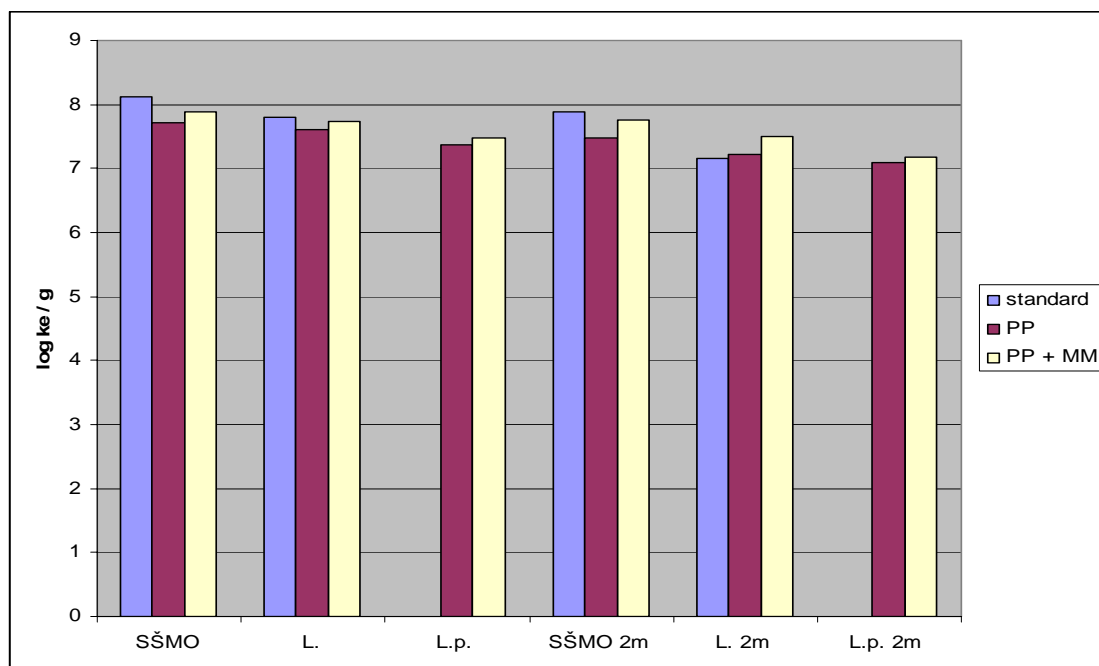
L.- *Lactobacillus* – skupno število laktobacilov L.p.- *Lactobacillus paracasei* – število bakterij *L. paracasei*

2m – rezultati analiz po dvomesečnem skladiščenju

LSM – ocenjena srednja vrednost SEM – napaka srednje vrednosti

***P<0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv; **P<0,01 statistično visoko značilen vpliv; *P<0,05

statistično značilen vpliv; nz – P>0,05 statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

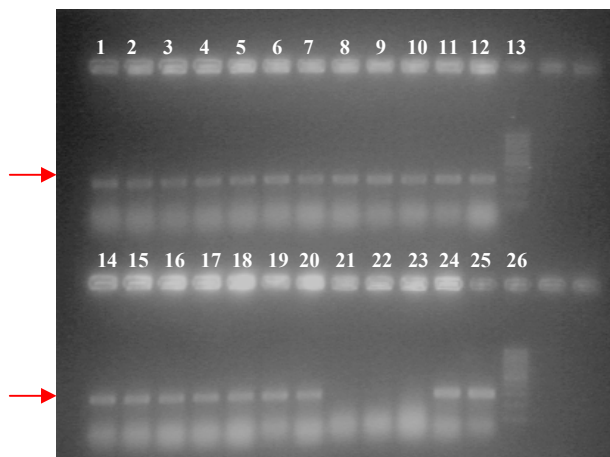


Slika 9: Rezultati mikrobioloških analiz ob koncu zorenja ter po dvomesečnem skladiščenju salaminov

Figure 9: Results of microbiological analyses at the end of ripening and after two-month storage of dry fermented sausages

4.2.3.1 Potrjevanje preživetja *L. paracasei* z analizo DNA z reakcijo PCR, specifično za to vrsto

Pri vsaki mikrobiološki analizi salaminov je bilo naključno izbranih nekaj, a za *L. paracasei* značilnih kolonij iz plošč s hranljivim gojiščem LAMVAB, na katere so bili nacepljeni vzorci različnih salaminov. Pripadnost vrsti *L. paracasei* se je ugotavljalo z analizo DNA (Ward in Timmins, 1999). Produkti reakcije PCR so bili pregledani z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu, primer dobljene slike je prikazan na sliki 10.



Slika 10: Pomnožki PCR reakcije specifične za vrsto *L. paracasei* po elektroforezi na 2 % agaroznem gelu

Figure 10: Amplification products obtained from PCR reaction specific for *L. paracasei* strain after electrophoresis on 2 % agarose gel

Progi 13 in 26 sta 100 bp velikostni DNA standard (Fermentas); progi 24 in 25 sta pozitivni kontroli, *L. paracasei* DSM 5622 in *L. paracasei* FD-DVS *L. casei*-01 nu-trish^R; proge 1 do 12 in 14 do 20, DNA iz naključno izbranih kolonij z gojišča LAMVAB, ki so bile po izgledu značilne za *L. paracasei* (majhne bele kolonije); proge 21 do 23 so DNA iz treh kolonij, ki so bile po velikosti enake tistim od *L. paracasei*, vendar so se razlikovale po izgledu.

Puščici označujeta položaj pomnožkov pričakovane velikosti, 290 bp. Ker pri prosojnih kolonijah ni bil dobljen značilen pomnožek, se jih pri štetju kolonij *L. paracasei* ni upoštevalo. Rezultati kažejo na to, da večina kolonij, ki so po izgledu podobne *L. paracasei* in se jih je pri štetju na ploščah upoštevalo, dejansko pripada tej vrsti.

4.3 KORELACIJSKA ANALIZA

Pri korelacijski analizi med instrumentalno izmerjeno teksturo in senzoričnimi lastnostmi ugotavljamo, da se je nastavek Volodkevich pokazal kot primernejši. Dve lastnosti, tekstura in povezanost rezin, sta pokazali statistično zelo visoko značilno povezavo z instrumentalnimi rezultati. Ker je korelacija tako tesna, bi lahko senzorično ocenjevanje pri teksturnih lastnostih nadomestili z instrumentalno analizo.

Zanimiva je tudi visoka korelacija med slanostjo in instrumentalnimi meritvami teksture z nastavkom Volodkevich, iz česar sklepamo, da večja slanost izdelkov kaže na tršo teksturo. To se najbolj nazorno pokaže pri izdelkih tretje skupine (PP + MM), kjer smo izmerili največjo slanost, najboljšo povezanost rezin, najvišje vrednosti z nastavkom Volodkevich ter najbolj optimalno teksturo.

Pri korelacijski analizi med instrumentalno izmerjeno teksturo in fizikalnimi lastnostmi pa ugotavljamo nasprotno, bolje se je izkazalo instrumentalno testiranje teksture z nastavkom Kramer, ki je pokazalo zelo visoko korelacijo z osuškom (izgubo mase). Pri izdelkih z večjim osuškom so bile tudi višje instrumentalno izmerjene vrednosti teksture z nastavkom Kramer.

Preglednica 13: Korelacijski koeficienti (r) med instrumentalnimi in drugimi parametri salaminov

Table 13: Correlation coefficients (r) between instrumental and other parameters of dry fermented sausages

parametri	korelacijski koeficienti	
	nastavek Kramer	nastavek Volodkevich
nastavek Volodkevich	0,83**	
oblika izdelka	-0,30	-0,05
nagubanost površine	0,79**	0,76*
rob	0,34	0,71*
povezanost rezine	0,79**	0,96***
tekstura	0,70*	0,95***
slanost	0,74*	0,90***
skupni vtis	0,37	0,46
a _w vrednost	-0,31	-0,52
izguba mase	0,94***	0,59

Legenda:

*** statistično zelo visoko značilna korelacija; ** statistično visoko značilna korelacija; * statistično značilna korelacija

Pri korelacijski analizi med senzoričnimi lastnostmi ugotavljamo, da sta na oceno skupnega vtisa najbolj vplivala vonj in aroma izdelka. Korelacijski koeficienti kažejo zelo visoko značilno in tesno povezavo med:

- teksturo izdelkov in povezanostjo rezine,

- teksturo in slanostjo izdelkov,
- značilno korelacijo pa med:
- teksturo izdelkov in robom,
- aromo in vonjem izdelkov.

Pri ugotavljanju povezave med senzoričnimi lastnostmi in fizikalnimi parametri salaminov ugotavljamo pozitivno, statistično značilno korelacijo med izgubo mase in nagubanostjo površine izdelka. Zanimiva je tudi negativna korelacija med a_w vrednostjo in slanostjo: nižja a_w vrednost kaže na večjo slanost izdelkov.

Med kemijskimi parametri smo ugotovili sledeče povezave:

- negativna korelacija med vsebnostjo vode in maščob (nižji % vode: večji % maščob),
- negativna korelacija med vsebnostjo maščob ter vsebnostjo beljakovin.

Slednja se je pri kemijskih analizah najbolj izrazito pokazala v tretji skupini izdelkov s spremenjeno sestavo nadeva, kjer je najnižja vsebnost maščob ter najvišja vsebnost beljakovin in vode.

Preglednica 14: Korelacijski koeficienti (r) med senzoričnimi in fizikalno-kemijskimi parametri salaminov

Table 14: Correlation coefficients (r) between sensory and physico-chemical parameters of dry fermented sausages

	nagub. površ.	rob	inten. barve	povez. rezine	tekstura	vonj	aroma	slanost	skup. vtis	vseb. vode	vseb. mašč.	vseb. soli	vseb. min. sn.	vseb. beljak.	a_w vr.
rob	0,28														
inten. barve	0,34	-0,16													
povez. rezine	0,67*	0,67*	0,26												
tekstura	0,64	0,72*	0,38	0,95***											
vonj	0,21	-0,08	0,32	0,42	0,23										
aroma	-0,10	-0,13	-0,15	0,19	-0,04	0,73*									
slanost	0,83**	0,65	0,30	0,83**	0,89***	-0,03	-0,29								
skup. vtis	0,09	0,19	0,37	0,59	0,50	0,77*	0,73*	0,13							
vseb. vode	-0,04	-0,30	-0,18	-0,45	-0,40	-0,35	-0,17	-0,20	-0,54						
vseb. mašč.	-0,50	-0,02	0,22	-0,07	-0,03	0,08	-0,05	-0,27	0,29	-0,77*					
vseb. soli	-0,27	-0,37	-0,32	-0,04	-0,27	0,47	0,74*	-0,42	0,31	0,22	-0,20				
vseb. min. sn.	0,65	0,15	-0,04	0,55	0,38	0,36	0,34	0,50	0,16	0,23	-0,67*	0,45			
vseb. beljak.	0,60	0,38	-0,36	0,41	0,32	-0,06	0,19	0,52	-0,06	0,37	-0,83**	0,16	0,78*		
a_w vr.	-0,51	-0,41	-0,43	-0,62	-0,65	-0,04	0,38	-0,71*	-0,09	0,56	-0,31	0,42	-0,23	0,03	
izguba mase	0,74*	0,06	0,11	0,53	0,42	0,32	0,30	0,54	0,18	0,33	-0,76*	0,37	0,94***	0,79**	-0,12

Legenda:

*** statistično zelo visoko značilna korelacija; ** statistično visoko značilna korelacija; * statistično značilna korelacija

Z analizo korelacij med kemijskimi in fizikalnimi parametri smo dobili sledeče rezultate:

- visoko značilno povezavo med vsebnostjo beljakovin in izgubo mase,
- zelo visoko značilno povezavo med vsebnostjo mineralnih snovi in izgubo mase,
- negativno korelacijo med vsebnostjo maščob in izgubo mase.

Vse korelacijske analize med vsebnostjo dodanega inulina z ostalimi parametri kažejo na statistično neznačilne – ohlapne korelacije (Preglednica 15). Dodatek inulina ni značilno vplival na senzorične lastnosti izdelkov.

Preglednica 15: Korelacijski koeficienti (r) med vsebnostjo inulina ter instrumentalnimi, senzoričnimi in fizikalno-kemijskimi parametri salaminov

Table 15: Correlation coefficients (r) between content of inulin and instrumental, sensory and physico-chemical parameters of dry fermented sausages

	kram.	volod.	obl. izd.	nagub. površ.	rob	inten. barve	povez. rezine	tekstura	vonj	aroma	slanost	skup. vtis	vseb. vode	vseb. mašč.	vs. soli	vseb. min.sn.	vseb. beljak.	a _w vr.
vseb. inulina	0,45	0,49	0,04	0,30	0,24	0,02	0,33	0,40	0,09	0,17	0,29	0,28	0,29	-0,48	0,04	0,13	0,39	0,38

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naloge je bil izdelati sušene klobase – salamine z značilnostmi funkcionalnega živila. V ta namen smo želeli ugotoviti vpliv dodatka probiotičnih starterskih kultur ter prebiotika inulina na kakovostne parametre sušenih klobas – salaminov, kot tudi vpliv spremenjene sestave nadeva – zmanjšane vsebnosti maščob.

Kakovost izdelkov smo opredelili s senzoričnimi, instrumentalnimi, fizikalnimi, kemijskimi in mikrobiološkimi parametri.

Ugotovili smo, da so senzorične lastnosti pri vseh treh poskusnih skupinah zelo podobne, zlasti aroma, intenzivnost barve, vonj in skupni vtis se med posameznimi skupinami izdelkov niso statistično značilno razlikovale. Dobljeni rezultati so pri večini lastnosti v skladu s pričakovanji, kot tudi z literaturnimi podatki. Erkkilä in sod. (2001a) ugotavljajo, da probiotične kulture, dodane sočasno s komercialnimi starterskimi kulturami, ne vplivajo negativno na senzorične lastnosti izdelkov. Prav tako pa je Erkkilä (2001) v svoji disertaciji potrdila identičen profil arome med različnimi poskusnimi skupinami salam, ne glede na dodane starterske kulture, ob uporabi komercialne mešanice začimb in arom. Vsaj 60 % identificiranih komponent naj bi imelo izvor v začimbah, 19 % v lipidni oksidaciji, 12 % v metabolizmu aminokislin ter le 5 % v fermentacijskih procesih.

Dodan inulin ni statistično značilno vplival na senzorične lastnosti, tudi korelacijske analize med vsebnostjo inulina in ostalimi parametri kažejo na statistično neznačilno korelacijo.

Prav tako smo ugotovili, da ni statistično značilnih razlik v a_w vrednosti med posameznimi skupinami salaminov. Preseneča pa nas ugotovitev, da se skupine niso statistično značilno razlikovale v pH vrednosti, kljub temu, da sta skupini PP in PP + MM vsebovali poleg standardne starterske kulture še dodatek probiotične kulture in prebiotika. Največji padec pH vrednosti je sicer izmerjen tretji dan sušenja/zorenja salaminov pri skupini PP, pH vrednost se je iz vrednosti 5,84 spustila minimalno do vrednosti 5,09 ter do konca zorenja ponovno narastla na 5,86. Vendar pa so podobne rezultate dobili tudi Erkkilä in sod. (2001a). Rezultati meritev pH vrednosti so ugodni, saj kažejo na to, da dodatki niso negativno vplivali na kakovost izdelkov.

Tudi skupina, ki je poleg dodatka probiotika in prebiotika imela še spremenjeno sestavo nadeva, ni imela bistveno slabših senzoričnih lastnosti, razlikuje se le v slabšem zunanjem videzu (obliki izdelka in nagubanosti površine) ter večji slanosti, boljša pa je povezanost rezine in optimalnejša tekstura. Pri tej skupini so bile izmerjene najvišje instrumentalne vrednosti, tako z nastavkom Kramer kot z nastavkom Volodkevich, kar nakazuje na večjo izgubo mase in čvrstejšo teksturo, v primerjavi z ostalima dvema skupinama.

Zanimive rezultate smo dobili tudi pri kemijski analizi salaminov z dodatkom probiotika, inulina in s spremenjeno sestavo. Glede na manjši začetni vnos maščob je vsebnost maščob v končnih izdelkih manjša, večja je vsebnost beljakovin ter ne glede na večjo izgubo mase, večja tudi vsebnost vode, kar lahko pojasnimo z vplivom dodane emulzije – nadomestka za maščobo.

V izdelkih z zmanjšano vsebnostjo maščob (PP + MM) smo le-to deloma nadomestili z emulzijo, sestavljeno iz dodane vode, slanine, nemesnih proteinskih nadomestkov in ogljikohidratnih nadomestkov. Dodani nemesni proteinski nadomestki in ogljikohidratni nadomestki vplivajo na teksturo, pa tudi na povečano sposobnost vezave dodane vode v izdelkih.

Mendoza in sod. (2001) opisujejo uspešno uporabo dietne vlaknine inulina kot maščobnega nadomestka v sušenih klobasah s 25 % zmanjšano vsebnostjo maščob. V rezultatih je prikazano izboljšanje senzoričnih lastnosti, predvsem zaradi mehkejše teksture, gumijavost in povezanost rezine pa je bila enaka kot pri izdelkih z običajno vsebnostjo maščob. Vendar pa so v teh raziskavah dodajali 7,5 % in 12,5 % inulina, v naši raziskavi pa smo salaminom dodali le 1 % inulina.

Glede na podatke iz literature (Žlender, 1997) je v izdelovanju mesnin z zmanjšano vsebnostjo maščob pomembno tudi zaporedje tehnoloških postopkov. Predhodno emulgiranje dela maščobe z nemesnimi proteini (pred dodatkom v mesni nadev) izboljša nadevu sposobnost vezanja maščob. Tako ostane večji del mesnih proteinov za oblikovanje gela, kar poveča sposobnost zadrževanja vode v nadevu. Boljši učinek dosežemo tudi takrat, ko so nemesni proteinski nadomestki, ogljikohidratni nadomestki oziroma izdelane emulzije, dodane med in ne pred razdevanjem, kar smo tudi upoštevali pri izdelavi salaminov z zmanjšano vsebnostjo maščob. Rezultati so potrdili uspešnost navedenega postopka, saj so bili izdelki kljub 21 % manjši vsebnosti maščobe senzorično sprejemljivi.

Po pričakovanju imajo izdelki tretje skupine PP + MM najnižjo izračunano energijsko vrednost in to kar za 23 % nižjo od energijske vrednosti standardne skupine salaminov.

Z mikrobiološkimi analizami smo potrdili, da so dodane probiotične bakterije *L. paracasei* subsp. *paracasei* preživele tehnološki postopek in prav tako tudi dvomesečno skladiščenje na 8 °C do 10 °C. V končnem izdelku smo ugotovili več kot 10^7 ke/g, kar smo si tudi postavili za ciljno vrednost.

V predposkusu smo izdelali salamine, ki smo jim dodali poleg komercialne osnovne starterske kulture probiotično kulturo s komercialnim imenom SM-137, katera je vsebovala *L. paracasei* v koncentraciji 10^9 ke/g. Ugotovili smo, da so salamini po končanem zorenju vsebovali samo med $2,1 \times 10^6$ do $1,1 \times 10^7$ ke/g izdelka, zato smo dodatek probiotika povečali. Začetni vnos probiotične kulture *L. paracasei* v vseh treh ponovitvah poskusa je bil $1,25 \times 10^7$ ke/g nadeva, tako smo uspeli izdelati salamine, ki

so vsebovali več kot 10^7 ke/g izdelka (po končanem zorenju med 2,3 in 3×10^7 ke/g izdelka ter po dvomesečnem skladiščenju izdelkov med 1,5 in $1,8 \times 10^7$ ke/g izdelka).

Iz rezultatov teh analiz lahko sklepamo, da začetni vnos probiotičnih bakterij pomembno vpliva tudi na število preživelih probiotičnih bakterij v končnem izdelku, ne pa tudi na senzorične lastnosti. Tudi Erkkilä in sodelavci (2001a) navajajo, da število mlečnokislinskih bakterij ali 10^8 ali 10^9 ke/g ni bistveno vplivalo na senzorične lastnosti končnega izdelka.

5.2 SKLEPI

- Uspeli smo izdelati sušeno mesnino, z lastnostmi sinbiotičnega živila, ki izpolnjuje sodobne prehranske zahteve v smeri živil z manjšo vsebnostjo maščob oziroma z nižjo energijsko vrednostjo.
- Salamin se je pokazal kot primeren medij za prenos probiotične bakterije *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, saj so probiotične bakterije preživele tehnološki postopek ter dvomesečno skladiščenje na temperaturi 8 °C do 10 °C v predvideni koncentraciji nad 10^7 ke/g izdelka.
- Dodatek prebiotika inulina v koncentraciji 1 %, v kombinaciji s kulturo probiotične bakterije *L. paracasei* subsp. *paracasei* v koncentraciji $1,25 \times 10^7$ ke/g nadeva sušene klobase – salamina, izdelanega z osnovno komercialno startersko kulturo, ni negativno vplival na senzorično kakovost izdelka.
- Senzorično izvrednotena tekstura salaminov je v statistično zelo visoko značilni, pozitivni in tesni korelaciji z instrumentalno izmerjeno teksturo z nastavkom Volodkevich, medtem ko so meritve teksture z nastavkom Kramer v statistično zelo visoko značilni pozitivni korelaciji z izgubo mase med sušenjem klobas.
- Salamini z manjšim deležem dodanih maščob ter dodatkom probiotika in prebiotika se po senzorični kakovosti niso statistično značilno razlikovali od kontrolnih izdelkov (standard), zaradi večjega deleža beljakovin in manjšega deleža maščob oz. energijske vrednosti pa imajo boljše prehranske lastnosti.
- Dodatek probiotika *L. paracasei* subsp. *paracasei*, v kombinaciji z osnovno komercialno startersko kulturo *L. sake* HJ-7 in *Staphylococcus xylosus* DD-34, ni vplival na pH vrednost in a_w vrednost izdelkov.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Med funkcionalnimi živili so probiotični izdelki vse pogostejši. Dodane probiotične bakterije morajo izpolnjevati številne zahteve glede varnosti, funkcionalnih lastnosti in tehnoloških lastnosti, med drugim morajo preživeti med tehnološkim postopkom in skladiščenjem. Za njihovo uspešno vključitev v živilo pa se zahteva tudi to, da ne puščajo priokusov ter da ne vplivajo negativno na senzorične lastnosti živila.

Namen naloge je bil ugotoviti vpliv dodatka probiotičnih kultur, prebiotika inulina ter spremenjene sestave nadeva – zmanjšane vsebnosti maščob, na kakovostne parametre sušenih klobas – salaminov. Predvidevali smo, da dodatek probiotikov in prebiotikov kot tudi spremenjena sestava nadeva ne bodo bistveno vplivali na poslabšanje senzoričnih lastnosti izdelka.

Primerjali smo tri skupine izdelkov: sušene salamine, izdelane po standardni recepturi, z dodatkom komercialne osnovne starterske kulture, sušene salamine z dodatkom probiotične kulture in prebiotikom inulinom ter sušene salamine, katerim smo poleg dodanega probiotika in prebiotika zmanjšali vsebnost maščob v nadevu.

Med zorenjem izdelkov smo spremljali fizikalne parametre (pH vrednost, izguba mase). Ob koncu zorenja so bile opravljene kemijske analize (vsebnost vode, maščob, beljakovin, mineralnih snovi, soli in inulina), fizikalne analize (a_w vrednost), senzorična analiza in instrumentalne analize teksture klobas (nastavek Kramer in nastavek Volodkevich).

Mikrobiološke analize, ki so vključevale ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov, skupnega števila laktobacilov ter števila in potrjevanje prisotnosti probiotika *L. paracasei* subsp. *paracasei*, so bile opravljene ob koncu zorenja ter po dvomesečnem skladiščenju embaliranih izdelkov na temperaturi 8 °C do 10 °C. Potrjevanje *L. paracasei* subsp. *paracasei* je bilo narejeno z analizo DNA z reakcijo PCR specifično za to vrsto. Produkti reakcije PCR so bili pregledani z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999), Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri sušenih klobas so izračunani z uporabo CORR procedure.

Ugotovili smo, da dodatek probiotične bakterije *L. paracasei* subsp. *paracasei* v koncentraciji $1,25 \times 10^7$ ke/g nadeva sušene klobase – salamina, izdelanega s komercialno osnovno startersko kulturo, ne vpliva negativno na spremembo senzorične kakovosti izdelka.

Dodatek prebiotika inulina, ki smo ga dodali v koncentraciji 1 %, z namenom izboljšanja prehranske vrednosti izdelka, ni imel negativnega vpliva na kakovostne parametre. Korelacijske analize med vsebnostjo inulina in ostalimi parametri pa kažejo na statistično neznačilne razlike.

Senzorično iz vrednotena tekstura salaminov je v statistično zelo visoko značilni, pozitivni in tesni korelaciji z instrumentalno izmerjeno teksturo z nastavkom Volodkevich, medtem ko so meritve teksture z nastavkom Kramer v statistično zelo visoko značilni korelaciji z izgubo mase med sušenjem klobas.

Dodatek probiotika *L. paracasei* subsp. *paracasei*, v kombinaciji z osnovno komercialno startersko kulturo *L. sake* HJ-7 in *Staphylococcus xylosum* DD-34, ni vplival na pH vrednost in a_w vrednost izdelkov.

Zmanjšanje deleža dodanih maščob ni bistveno spremenilo senzoričnih lastnosti, razen nagubanosti izdelka in slanosti izdelka. Skupina izdelkov, katera je poleg dodanega probiotika in prebiotika imela spremenjeno sestavo nadeva, se od ostalih dveh razlikuje predvsem po kemijski sestavi: manjši vsebnosti maščob, večji vsebnosti beljakovin; kar pomembno vpliva na izboljšanje prehranske vrednosti ter zmanjšanje energijske vrednosti.

Salamin se je pokazal kot primeren medij za prenos probiotičnih bakterij *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, saj so probiotične bakterije preživele tehnološki postopek ter dvomesečno skladiščenje na temperaturi 8 °C do 10 °C v predvideni koncentraciji nad 10^7 ke/g izdelka.

Uspeli smo izdelati sušeno mesnino, z lastnostmi sinbiotičnega živila, ki izpolnjuje sodobne prehranske zahteve v smeri živil z manjšo vsebnostjo maščob oziroma z nižjo energijsko vrednostjo. Tudi taka živila so lahko primerne senzorične kakovosti, poleg tega jih lahko vključimo med varno in zdravo prehrano.

6.2 SUMMARY

Probiotic products are increasingly important functional foods. The probiotic bacteria have to meet requirements for safety, functional and technological properties, as well as survive manufacturing and storage. For successful incorporation into food, they must not produce off-flavours and adversely affect the food's sensory properties.

The aim of this study was to define the effects of the addition of probiotics, prebiotic inulin and modified composition, i.e. reduced fat content, on quality parameters of dry fermented sausages. No significant negative effect of probiotics, prebiotic and modified composition on sensory properties was expected.

Three groups of products were compared:

- dry fermented sausages - standard recipe with basic commercial starter culture,
- dry fermented sausages - with the addition of probiotics and prebiotic (inulin),
- dry fermented sausages - with the addition of probiotics, prebiotic (inulin) and reduced fat content.

Throughout fermentation and ripening physical parameters were monitored; pH value was measured and weight loss of products were monitored. At the end of ripening a_w value was measured, chemical analysis were made (content of water, fat, proteins, minerals, salt and inulin). Sensory properties were also checked and two instrumental analysis were performed with Volodkevich bite jaw and Kramer shear cell.

Microbiological analysis, which included total cell counts (cfu/g), number of lactic acid bacteria, survival and number of probiotics *L. paracasei* subsp. *paracasei*, were performed at the end of ripening and a two-month storage period at 8 °C to 10 °C. To confirm the survival of *L. paracasei* subsp. *paracasei*, a DNA analysis with PCR reaction specific for this strain was made. The products of this reaction were checked with electrophoresis on 2 % agarose gel.

The results were analysed with SAS/STAT software (SAS Software. Version 8.01, 1999). Pearson correlation coefficients between parameters of dry fermented sausages were calculated with the CORR procedure.

We established that initial inoculation of probiotics *L. paracasei* subsp. *paracasei* at a concentration of $1,25 \times 10^7$ cfu/g with basic commercial starter cultures did not have a negative impact on sensory properties of products.

There was no negative effects of the addition of prebiotic inulin at a concentration of 1 % on quality parameters. There were no statistically significant correlations between inulin and other parameters.

There was very high significant, positive and tight correlation between sensory evaluated texture and instrumental measurements with Volodkevich bite jaw. The correlation between weight loss and instrumental measurements with Kramer shear cell was statistically very high significant too.

The addition of probiotic with the basic commercial starter culture *L. sake* HJ-7 and *Staphylococcus xylosum* DD-34 did not affects pH value and a_w value.

Reducing fat content did not have a negative impact on most sensory properties, but there were differences between groups in chemical parameters. The third group had the lowest fat content, more proteins and more water in spite of the greatest weight loss. This group had the best nutritional value and the lowest caloric value.

The results presented in this study indicate that dry fermented sausages are an appropriate medium for probiotics, *L. paracasei* subsp. *paracasei* survived throughout fermentation, ripening and two-month storage at 8 °C to 10 °C and were present in the final products at the predicted level of 10^7 cfu/g or more.

We succeed in producing dry fermented sausages with synbiotic properties which meet modern nutritional requirements for products with low fat content or lower caloric value. These products may also have convenient sensory properties and at the same time they may be classified as safe and healthy food.

7 VIRI

- Batič M. 2001. Polisaharidi - prebiotiki. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8.- 9.11. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 37-50
- Bem Z., Adamič J. 1991. Mikrobiologija mesa in mesnih izdelkov. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 248 str.
- Bem Z., Žlender B., Savič I. 2003. Mikrobiologija pakiranih mesnih izdelkov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 386-392
- Bogovič Matijašič B. 2001. Ugotavljanje varnosti in učinkovitosti funkcionalne hrane. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8.-9. 11. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 153-165
- Chizzolini R., Zanardi E., Dorigoni V., Ghidini S. 1999. Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. Trends in Food Science & Technology, 10, 4-5: 119-128
- Colmenero F.J. 2000. Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. Trends in Food Science & Technology, 11, 2: 56-66
- Čavlek B. 1997. Starter kulture mikroorganizma u proizvodnji fermentiranih proizvoda od mesa. V: Moderne tehnologije predelave in kakovosti živil. 18. Bitenčevi živilski dnevi 1997, Ljubljana, 12.-13.6.1997. Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 137-150
- Erkkilä S. 2001. Bioprotective and probiotic meat starter cultures for the fermentation of dry sausages. Academic dissertation. Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food Technology: 61 str.
- Erkkilä S., Petäjä E., Eerola S., Lilleberg L., Mattila-Sandholm T., Suihko M.L. 2001a. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Meat Science, 58, 2: 111-116
- Erkkilä S., Suihko M.L., Eerola S., Petäjä E., Mattila-Sandholm T. 2001b. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. International Journal of Food Microbiology, 64, 1-2: 205-210

- Fadda S., Oliver G., Vignolo G. 2002. Degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a sausage model system. *Journal of Food Science*, 67, 3: 1179-1183
- Gaidella L., Cantoni C. 2003a. L'autocontrollo con il sistema HACCP nella produzione del salame tradizionale mantovano, prima parte. *Ingegneria Alimentare le Conserve Animali*, 19, 2: 19-24
- Gaidella L., Cantoni C. 2003b. L'autocontrollo con il sistema HACCP nella produzione del salame tradizionale mantovano, seconda parte. *Ingegneria Alimentare le Conserve Animali*, 19, 3/4: 13-20
- Gašperlin L. 2001. Pakiranje svežega mesa. *Meso in mesnine*, 1, 2: 25-30
- Golob T. 2001. Živila z inulinom - funkcionalna živila. V: *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8.-9.11.2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 275-286
- Golob T., Plestenjak A. 2000. Analiza kakovosti živil. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo: 96-98
- Hammes W.P., Hertel C. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science*, 49, 1: 125-138
- Hammes W.P., Hertel C., Bunte C. 2001. The use of *Lactobacillus paracasei* as a starter culture with probiotic activity. V: *Future of meat: congress proceedings of the 47th International Congress of Meat Science and Technology, 26th-31st August, 2001, Kraków, Poland: 47th ICoMST. – Warszawa: Meat and Fat Research Institute, 2001. -2 zv. (XXV, 304; 317 str.): ilustr.; 30 cm*
- Hansen E.B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 1-2: 119-131
- Hartemink R., Domenech V.R., Rombouts F.M. 1997. LAMVAB - a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 77-84
- IDF standard 100B. Milk and milk production - Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C. 1991: 3 str.
- Incze K. 2003. Mikrobiologija presnih klobas. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 342-350

- Ishibashi N., Shimamura S. 1993. Bifidobacteria: reserch and development in Japan. *FoodTechnology*, 46: 126-135
- Jessen B. 1995. Starter cultures for meat fermentations. V: *Fermented meats*. Campbell-Platt G., Cook P.E. (eds.). Glasgow, Blackie Academic and Professional: 130-150
- Keeton J.T. 1994. Low-fat meat products - technological problems with processing. *Meat Science*, 36, 1-2: 261-276
- Kuhar N. 2001. Senzorična, hranilna in energijska vrednost čokolade z inulinom. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 56 str.
- Leistner L. 1995. Stable and safe fermented sausages world-wide. V: *Fermented meats*. Campbell-Platt G., Cook, P.E. (eds.). Glasgow, Blackie Academic and Professional: 160-174
- Leroy F., Verluyten J., Vuyst L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 3: 270-285
- Lücke F.K. 1985. Fermented sausages. V: *Microbiology of fermented sausages*. Vol. 2. Wood B.J.B. (ed.). London, New York, Elsevier Applied Science Publishers: 41-83
- Lücke F.K. 2001. Starter and protective cultures for meats - recent developments. *Tehnologija mesa*, 42, 5-6: 356-374
- Lynch C.M., Muir D.D., Banks J.M., McSweeney P.L.H., Fox P.F. 1999. Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 82, 8: 1618-1628
- Mendoza E., Garcia M.L., Casas C., Selgas M.D. 2001. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science*, 57, 4: 387-393
- Mengoli A. 1999. La nuova legislazione in tema di additivi, aromatizzanti e sostanze aggiunte, impiegati nella preparazione dei salumi. *Ingegneria Alimentare le Conserve Animali*, 15, 2: 27-35
- Meso vaje. 2001a. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo (december 2001)
<http://www.bf.uni-lj.si/zt/meso/vaja2/določanje%20vsebnosti.htm> (december, 2005):1 str.

- Meso vaje. 2001b. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo (december, 2001)
<http://www.bf.uni-lj.si/zt/meso/vaja4/določanje%20vsebnosti%20natrijevega%20klorida.htm> (december, 2005): 1 str.
- Meszaroš A. 2000. Vpliv različnih starter kultur na kakovost suhih klobas. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 82 str.
- Meszaroš A. 2001. Starter kulture v proizvodnji suhih klobas. Meso in mesnine, 2, 2: 44-47
- Muguerza E., Gimeno O., Ansorena D., Astiasarán I. 2004. New formulations for healthier dry fermented sausages : a review. Trends in Food Science & Technology, 15, 9: 452-457
- Pennacchia C., Vaughan E.E., Villani F. 2006. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. Meat Science, 73, 1: 90-101
- Perko B., Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2002. Izdelava probiotičnega sira z dodatkom *Lactobacillus gasseri* LF 221 in K7. Zbornik Biotehniške Fakultete, Univerza Ljubljana, Kmetijstvo, Zootehnika, 80, 1: 61-70
- Pidcock K., Heard G.M., Henriksson A. 2002. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. International Journal of Food Microbiology, 76, 1-2: 75-81
- Rajar A. 1997. Sodobni trendi v proizvodnji zdravju varnejših mesnih izdelkov. V: Meso v prehrani in zdravje. Posvet posvečen 50. obletnici Biotehniške fakultete, Radenci, 20.-21.11. 1997. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 135-143
- Rajar A. 2001. Kuhinjska sol v predelavi mesa. Meso in mesnine, 2, 2: 34-35
- Ray B. 2001. Fundamental food microbiology. 2nd ed., Boca Raton, CRC Press: 562 str.
- Roberfroid M.B. 1999. Caloric value of inulin and oligofructose. Journal of Nutrition, 129: 1436-1437
- Roberfroid M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? American Journal of Clinical Nutrition, 71, 6: 1682-1687

- Rogelj I. 1994. Probiotiki. V: Aditivi. 16. Bitenčevi živilski dnevi 1994, Bled, 9.-10. 6.1994. Raspor P. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 109-117
- Rogelj I. 2001. Sinbiotični mlečni izdelki - učni primer funkcionalne hrane. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8.-9.11.2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 219-229
- Rogelj I., Bogovič Matijašič B. 2004. Probiotiki in varnost. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci, 18.-19.3. 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 181-189
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 3: 197-215
- SAS Softwear. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: softwear
- Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, 10, 3: 107-110
- Simonovska B. 2000. Determination of Inulin in Foods. *Journal of AOAC International*, 83, 3: 675-678
- Smole Možina S., Raspor P. 1994. Starter kulture v živilstvu. V: Aditivi. 16. Bitenčevi živilski dnevi 1994, Bled, 9.-10.6.1994. Raspor P. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99-108
- Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8.-9.11.2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-218
- Stahnke L.H., Holck A., Jensen A., Nilsen A., Zanardi E. 2002. Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus* - relationship between maturity and flavor compounds. *Journal of Food Science*, 67, 5: 1914-1921
- Stahnke L.H. 2003. Flavour formation in fermented sausages - the influence of bacteria. V: *Ethnic and meat technology: 49th International Congress of Meat Science and Technology: 49th ICoMST 2003, Brazil: 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology: Sao Paulo: Brazil, 31st August -05th September*

2003. - Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, (ICoMST), 2003. -516 str.: graf. prikazi; 30 cm
- Stojković S. 2003. Preživetje in učinkovitost sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in LF 221 v različnih okoljskih razmerah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 139 str.
- Texture analyser TA.XT plus. 2005. London, Stable Micro System, Texture analyses (september 2005)
<http://www.stablemicrosystems.com> (maj, 2006): 4 str.
- Thumel H. 1995. Preserving meat and meat products. Possibilities and methods. *Fleischwirtschaft*, 75, 5: 674-678
- Työppönen S., Petäjä E., Mattila-Sandholm T. 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 3: 233-244
- van Roost M. 2005. Prebiotics - a new tool to tackle obesity? *Food Engineering & Ingredients*, 30, 3: 40-43
- Varnam A.H., Sutherland J.P. 1995. Meat and meat products: technology, chemistry and microbiology. London, Chapman and Hall: 430 str.
- Vösgen W. 1994. Dry sausage - new and established production methods. *Fleishwirtschaft*, 74, 1: 62-63
- Žlender B. 1997. Tehnologija in kakovost mesnin z zmanjšano količino maščob. V: *Moderne tehnologije predelave in kakovost živil*. 18. Bitenčevi živilski dnevi 1997, Ljubljana, 12.-13.6.1997, Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 127-136
- Žlender B. 2000. Kakovostni in tehnološki vidiki zmanjšanja maščob in holesterola v predelavi mesa. V: *Meso in mesnine za kakovostno prehrano*. 2. posvet o vlogi in pomenu mesa v normalni - zdravi in dietni prehrani, Portorož, 10.-11.2.2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67-77
- Žlender B. 2001. Procesna kontrola v proizvodnji suhih klobas. *Meso in mesnine*, 3, 2: 21-25
- Ward L. J. H., Timmins M. J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 90-92

ZAHVALA

Podjetju Kras mesnopredelovalna industrija d.d. se zahvaljujem za finančno pomoč pri izvedbi naloge.

Mentorju prof. dr. Božidarju Žlendru in somentorici prof. dr. Ireni Rogljevi se zahvaljujem za strokovno pomoč pri izdelavi naloge.

Osebjem Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Katedre za meso, Katedre za vrednotenje živil in Katedre za kemijo ter Kemijskem inštitutu v Ljubljani se zahvaljujem za pomoč pri izvedbi kemijskih, senzoričnih in instrumentalnih analiz ter doc. dr. Lei Gašperlin za statistično obdelavo podatkov.

Posebno zahvalo za ves trud pri izvedbi mikrobioloških analiz namenjam dr. Bojani Bogovič Matijašič s Katedre za mlekarstvo.

Za vso pomoč, podporo in potrpljenje se zahvaljujem tudi moji družini, ki mi je med časom podiplomskega študija stala ob strani in me vzpodbujala pri izvedbi naloge.

Zahvalila bi se tudi svojim kolegom in sodelavcem, katerim namenjam naslednjo misel Lorda Baden-Powell-a:

*»Nothing is impossible.
That what is difficult can be done immediately.
The impossible takes a little longer.«*