

# Usporedba mikrobioloških pokazatelja kvalitete i sigurnosti kulena proizvedenog u kontroliranim i nekontroliranim uvjetima

---

Igrec, Dunja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:820644>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

**Dunja Igrac**

**USPOREDBA MIKROBIOLOŠKIH POKAZATELJA KVALITETE I  
SIGURNOSTI KULENA PROIZVEDENOG U KONTROLIRANIM I  
NEKONTROLIRANIM UVJETIMA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2020.**

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

Predstojnik:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva:

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

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentoru, izv. prof. dr. sc. Neviju Zdolecu, na svom znanju koje mi je prenio, na neizmjernej pomoći i pristupačnosti te na beskrajnim savjetima koji su mi pomogli u izradi diplomskog rada. Također, želim se zahvaliti svim djelatnicima „Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane“ koji su mi pomogli u istraživačkom dijelu rada, a posebno dr.med.vet. Marti Kiš koja mi je izrazito pomogla u laboratorijskom istraživanju. Zahvaljujem se dr. sc. Snježani Kazazić s Instituta Ruđer Bošković na determinaciji izolata s MALDI-TOF MS.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, mami Silviji, tati Domagoju, bratu Domagoju, baki Gorani i baki Slavni na neizmjernej podršci i strpljenju bez kojih ne bih ostvarila ovakav uspjeh. I na kraju, želim se zahvaliti svim prijateljicama i prijateljima koji su mi na bilo koji način pomogli i smijehom uljepšali studentske dane.*

## POPIS PRILOGA

### Slike:

1. Slika 1. Dijagram tijeka tehnološkog procesa proizvodnje kulena
2. Slika 2. Način rada molekularne detekcije 3M™ *Listeria monocytogenes*
3. Slika 3. Presjeci uzoraka kulena proizvedeni u nekontroliranim uvjetima
4. Slika 4. Presjeci uzoraka kulena proizvedeni u kontroliranim uvjetima
5. Slika 5. Uzimanje i priprema uzorka za mikrobiološku pretragu
6. Slika 6. MDS protokol
7. Slika 7. Priprema izolata za MALDI TOF MS
8. Slika 8. Odabiranje antibiotika za antibiogram
9. Slika 9. Primjer disk-difuzijskog testa
10. Slika 10. Detalj organoleptičke ocjene kulena
11. Slika 11. Detalj organoleptičke ocjene kulena proizvedenih u nekontroliranim uvjetima
12. Slika 12. Prikaz dijela rezultata molekularne detekcije *L. monocytogenes* u uzorcima kulena

### Tablice:

1. Tablica 1. Najčešće starter kulture za fermentaciju mesa
2. Tablica 2. Antibiotici i njihova koncentracija za rod *Staphylococcus* spp.
3. Tablica 3. Antibiotici i njihova koncentracija za bakterije mliječne kiseline
4. Tablica 4. Rezultati određivanja broja bakterija mliječne kiseline (CFU/g) i prisutnosti *L. monocytogenes* (MDS)
5. Tablica 5. Prikaz rezultata MALDI-TOF MS determinacije izolata
6. Tablica 6. Prikaz rezultata testiranja osjetljivosti izolata bakterija mliječne kiseline na antimikrobne tvari (zona inhibicije; mm\*)
7. Tablica 7. Prikaz rezultata testiranja osjetljivosti izolata stafilokoka, mikrokoka i streptokoka na antimikrobne tvari (zona inhibicije; mm\*)
8. Tablica 8. Usporedba nalaza rezistentnih bakterijskih vrsta u skupinama uzoraka kulena iz nekontroliranih (1-9) i kontroliranih uvjeta (10-17)
9. Tablica 9. Rezultati organoleptičkog ocjenjivanja kulena iz nekontroliranih uvjeta proizvodnje
10. Tablica 10. Rezultati organoleptičke ocjene kulena iz kontroliranih uvjeta proizvodnje
11. Tablica 11. Usporedba srednjih vrijednosti ocjena senzornih svojstava kulena iz kontroliranih i nekontroliranih uvjeta proizvodnje

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	3
2.1 Kulen.....	3
2.2 Sirovina za proizvodnju kulena.....	3
2.3. Priprema nadjeva i punjenje nadjeva.....	4
2.4. Dimljenje, zrenje i sušenje kulena.....	5
2.5. Fermentacija.....	5
2.6. Prisutnost i uloga mikroorganizama u procesu fermentacije.....	7
2.7. Molekularna metoda detekcije <i>L. monocytogenes</i> .....	12
2.8. Antimikrobna rezistencija.....	13
3. MATERIJAL I METODE.....	15
3.1. Mikrobiološka pretraga kulena.....	18
3.2. Molekularna detekcija bakterije <i>L. monocytogenes</i> .....	19
3.3. Izolacija i identifikacija mikroorganizama s MRS agara.....	20
3.4. Test osjetljivosti izolata na antimikrobne tvari.....	22
3.5. Organoleptička ocjena kulena.....	23
4. REZULTATI.....	35
5. RASPRAVA.....	40
6. ZAKLJUČAK.....	45
7. LITERATURA.....	46
8. SAŽETAK.....	51
9. SUMMARY.....	52
10. ŽIVOTOPIS.....	53

## 1. UVOD

Proizvodnja trajnih kobasica stara je nekoliko tisuća godina. Sam proces proizvodnje trajnih tj. fermentiranih kobasica nastao je iz potrebe za očuvanjem mesa i produženjem njegovog roka trajanja. Tradicija proizvodnje očuvala se sve do danas u domaćinstvima, ali se razvijala i u industrijskim okvirima. Proces nastanka trajnog fermentiranog proizvoda je u osnovi jednak, međutim postoje određene razlike u samom procesu zavisno od pojedine regije u svijetu. Upravo zbog tih razlika mi danas možemo pričati o autohtonim proizvodima. Samo jedan od brojnih autohtonih proizvoda ovog tipa, koji su prisutni u Hrvatskoj, je kulen. Kulen je fermentirana trajna kobasica koja se proizvodi u istočnom dijelu Hrvatske (Slavonija, Srijem, Baranja), ali i u ostalim susjednim nam državama (Mađarska, Srbija). Kulen je proizvod nastao od usitnjenog svinjskog mesa i masnog tkiva s dodatkom različitih začina. Izvor sirovine je visokokvalitetno meso svinja, najčešće onih starijih i mesnatijih. Meso koje se koristi je meso buta, leđa ili plećke s dodatkom masnog tkiva s područja leđa ili podbratka svinje. Od začina najčešće se koriste sol, papar, češnjak te mljevena začinska paprika. Karakteristično za kulen, za razliku od svih ostalih fermentiranih trajnih kobasica, gotova smjesa puni se u svinjsko slijepo crijevo. Takav ovitak, ovisno o načinu proizvodnje, može biti umjetnog ili prirodnog podrijetla. Sam proizvod nakon specifične pripreme sirovine podliježe zrenju u minimalnom trajanju od 90 dana. Tijekom zrenja fermentiranih kobasica odvijaju se složeni mikrobiološki, biokemijski i fizikalno-kemijski procesi koji utječu na sigurnost i kakvoću gotovih proizvoda (HADŽIOSMANOVIĆ i sur., 2005.). Zrenje samog kulena se odvija u nekoliko faza pri čemu je u ovom radu najznačajnija mikrobiološka komponenta odnosno sastav mikroflora. Prisutna mikroflora koja sudjeluje u zrenju kulena razvija se sporo i tipična je za prirodno zrenje fermentiranih kobasica (VUKOVIĆ i sur., 2012.). Sastav mikroflora karakterističan je za svaku vrstu fermentiranih kobasica što je uvjetovano higijenskom ispravnosti upotrijebljene sirovine i dodataka, tehnološkim postupcima te mikroklimatskim uvjetima zrenja (ZDOLEC i sur., 2007.). Na osnovu dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da su unutar nadjeva fermentiranih proizvoda najaktivnije bakterije mliječne kiseline (BMK), a njihovi najčešći predstavnici su iz roda *Lactobacillus*: *L. sakei*, *L. plantarum* i *L. curvatus*, te bakterije iz roda *Micrococcus* i *Staphylococcus* (BONOMO i sur., 2008.).

U Hrvatskoj su, dakle, prisutna dva načina proizvodnje kulena. Tradicionalan način koji se odvija u seoskim gospodarstvima ili na OPG-ovima najčešće za vlastite potrebe s ili bez maloprodaje (nekontrolirani uvjeti) te industrijska proizvodnja u strogo kontroliranim uvjetima

čiji su proizvodi dostupni većem broju potrošača (kontrolirani uvjeti). Postojanje ova dva načina može rezultirati različitom kvalitetom proizvoda u smislu okusa, mikrobiološkog sastava ili konzistencije (FRECE i sur., 2010.). Cilj ovog rada je determinirati i usporediti mikrobiološki sastav kulena proizvedenih u kontroliranim i nekontroliranim uvjetima, istražiti otpornost mikroflora na antibiotike, te usporediti senzorička svojstva te na osnovu dobivenih rezultata odlučiti o kvaliteti i sigurnosti oba načina proizvodnje.



## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1 Kulen

Kulen je trajna fermentirana kobasica koja se proizvodi iz mješavine najkvalitetnijeg svinjskog mesa i leđne slanine, samljevene i pomiješane uz dodatak kuhinjske soli i prirodnih začina (ljute i slatke paprike i češnjaka) i nadjevene u svinjsko slijepo crijevo (KAROLY I KOVAČIĆ, 2008.). Tradicionalno se proizvodi u istočnim dijelovima Hrvatske što uključuje tri velike regije Srijem, Baranju i Slavoniju. Proizvodnja kulena nije ograničena samo na Hrvatsku pa shodno tome postoje različite verzije kulena i u južnoj Mađarskoj te zapadnoj Srbiji. Iako se u osnovi radi o istom proizvodu, regija gdje je proizveden utječe na prepoznatljiva specifična svojstva kulena. Autohtoni slavonski mesni proizvodi potječu još iz doba postojanja obiteljskih zadruga na kojima su se uzgajale primarno svinje, ali i ostale životinje (BENČEVIĆ I PETRIČEVIĆ, 1999.). U početku su se svinje uzgajale kao izvor slanine i masti, no unaprjeđenjem metoda uzgoja popraćen sa sve većim razvojem mesarskog obrta nastali su i drugi tradicionalni proizvodi kao što su kulen, šunka i kobasice (BENČEVIĆ I ČAKALIĆ, 2001.). Ta duga tradicija proizvodnje održala se još i danas na seoskim domaćinstvima, no uslijed povećanih zahtjeva tržišta dolazi i do povećane potrebe za industrijskom proizvodnjom ove delicatose. Sam naziv kulen potječe od grčke riječi *kolon* koja u prijevodu označava crijevo svinje. U narodnoj tradiciji postoje i druga objašnjenja, smatra se da riječ kulen označava kobasicu koja se dugo suši i samim svojim izgledom podsjeća na kulu (VUKOVIĆ I sur., 2012.). Ime kulen kao takvo prvi puta je zabilježeno 1768. godine u pjesmi Vida Došena, svećenika i pjesnika s područja Slavenskog Broda. Slavonski kulen prvi je puta zaštićen 6. svibnja 1997. godine pri Državnom zavodu za intelektualno vlasništvo i to s oznakom zemljopisnoga podrijetla.

### 2.2 Sirovina za proizvodnju kulena

Sirovina koja se koristi za proizvodnju kulena je svinjsko meso i svinjsko čvrsto masno tkivo. Primarna sirovina je meso svinja, odnosno meso zdravih ženskih jedinki svinja i zdravih kastriranih mužjaka, u starosti od 12 mjeseci i više. Koriste se starije životinje zbog poželjnijih svojstava mesa, što se ponajprije odnosi na veću količinu mioglobina u mišićju, čvršću konzistenciju te manji udio vode tj. veći udio suhe tvari. Unutar same vrste, najčešće se koriste pasmine jorkšir, landras, durok, mangulica te njihovi hibridi (TEODOROVIĆ I sur., 2015.). Za izradu kulena koriste se najkvalitetniji dijelovi svinje sa što manje mekog masnog tkiva i

vezivnog tkiva (tetiva, opni, žilica). U prvom redu to su mišići buta, lopatice te pojedini dijelovi vrata koji odgovaraju prethodno navedenom kriteriju (VUKOVIĆ i sur., 2012.). Masno tkivo mora biti zrnate konzistencije, bijele boje i bez oksidativnih promjena. Uzima se masno tkivo s područja leđa ili podbratka. Važno je da je masno tkivo ohlađeno i čvrste konzistencije kako bi kasnije nakon obrade tj. usitnjavanja dalo kulenu karakterističan izgled mozaika na samom presjeku proizvoda (TEODOROVIĆ i sur., 2015.). Začini koji se dodaju u kulen i njihov omjer ovisi o regiji iz koje potječe kulen. U osnovi su jednaki i koriste se sol, papar, češnjak i crvena začinska paprika (slatka ili ljuta). Začini pridonose poboljšanju senzoričkih osobina gotovog proizvoda, ali i na odvijanje mikrobioloških, fizikalnih i kemijskih promjena tijekom zrenja proizvoda (SUVAJDŽIĆ, 2019.). Kvaliteta gotovog proizvoda ovisi o kvaliteti sirovine tako da je vrlo važno u ovoj fazi izabrati najkvalitetnije dijelove mišićja i pravilno ih obraditi kako bi upravo ti sastojci ušli u daljnji proizvodni proces i u konačnici dali kvalitetan kulen.

### **2.3. Priprema nadjeva i punjenje nadjeva**

Svaka kobasica, pa tako i kulen, sastoji se od omotača i unutrašnjeg sadržaja ili nadjeva. Kvaliteta kobasice u prvom redu ovisi o sastavu nadjeva, odnosno vrsti sirovine koja se koristi pri samoj izradi nadjeva (JOKSIMOVIĆ i JOKSIMOVIĆ, 1990.). Nadjev za kulen sastoji se od usitnjenog svinjskog mesa i usitnjenog čvrstog masnog tkiva svinje. Ovisno o regiji, koristi se različiti omjer masnog i mišićnog tkiva, pri čemu udio masnog tkiva unutar samog nadjeva ne smije iznositi više od 10 %. Meso i masno tkivo se usitnjavaju pomoću električnog uređaja ili ručno na pločama promjera otvora od 8 do 10 mm. Nakon što je nadjev usitnjen na željenu granulaciju, dodaju se začini u različitim omjerima. Kuhinjska sol dodaje se u količini od 2,2-2,5 %, crvena mljevena paprika u količini od 1,0-1,8 % te ostali začini po želji odnosno ukusu osobe koja pravi kulen. Nadjev se zatim miješa strojno ili ručno dok se ne dobije homogena smjesa u kojoj su ravnomjerno raspoređeni svi sastojci kulena. Osim što sastojci moraju biti ravnomjerno raspoređeni, moraju biti i međusobno čvrsto povezani. Prilikom miješanja nadjeva vrlo je važno da se istisne višak zraka iz smjese te da na samom presjeku kulena ne postoje pukotine i šupljine (SUVAJDŽIĆ, 2019.). Nadjev pripremljen na ovaj način puni se u prethodno pripremljene umjetne ili prirodne ovitke. Ovitak za kulen je zapravo svinjsko slijepo crijevo koje ako je prirodnog podrijetla prethodno je očišćeno, oprano i usoljeno. Nadjev se puni u ovitak najčešće ručno, iako može se puniti i strojno. Nakon punjenja nadjeva ovitak se dodatno s vanjske strane povezuje s dva ili tri konopa zbog veće čvrstoće proizvoda u daljnjem procesu

zrenja. Ovisno o veličini samog ovitka kuleni sadrže najčešće od 1200 g do 2000 g nadjeva s tim da je minimalna dozvoljena težina 800 g.

#### **2.4. Dimljenje, zrenje i sušenje kulena**

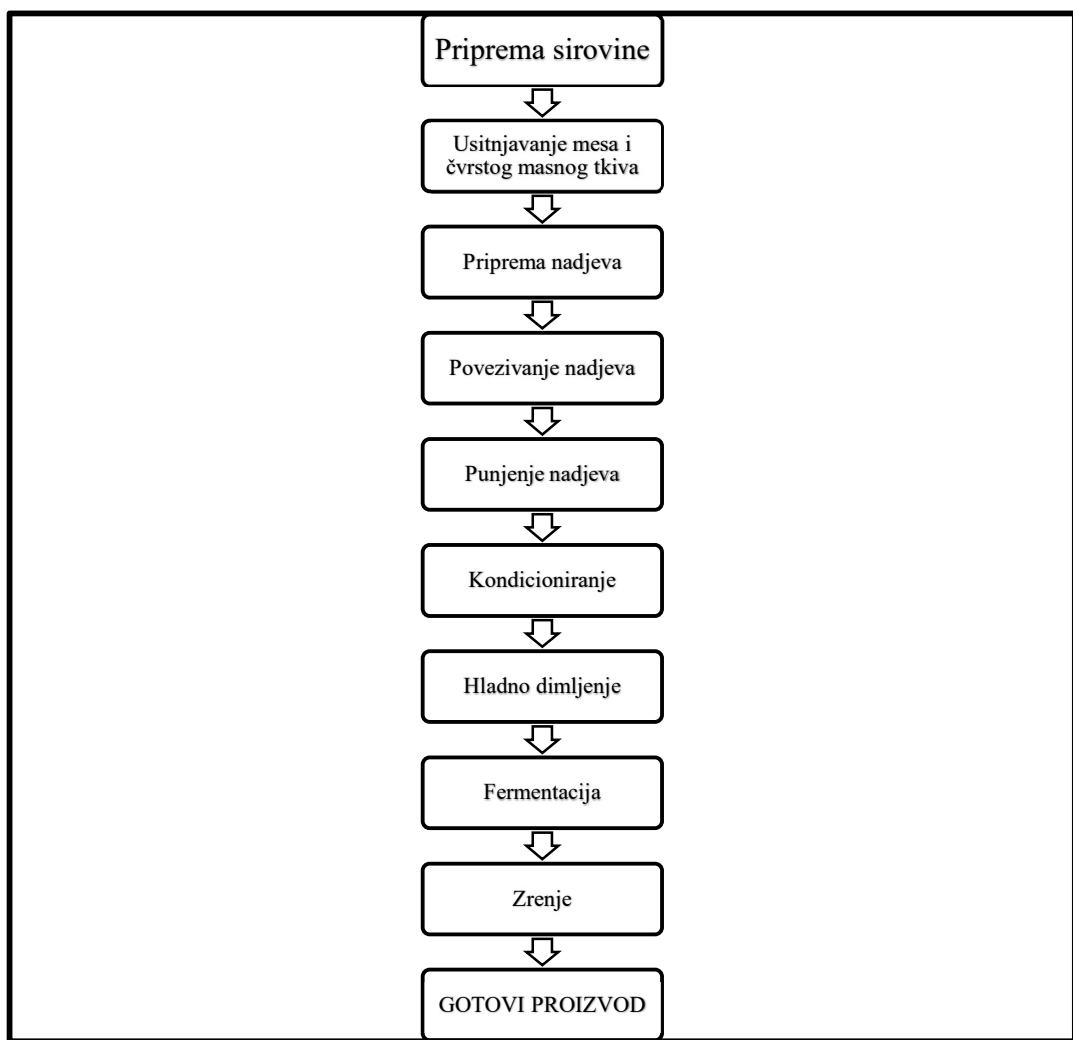
Ove tri faze obuhvaćaju dugotrajan proces koji u prosjeku traje oko pet mjeseci pri čemu se on uglavnom zbiva tijekom zimskih mjeseci. Proces proizvodnje je gotov kada dobijemo kulen u kojem ima manje od 35 % vlage i kada su se razvila optimalna senzorička svojstva (SUVAJDŽIĆ, 2019.). Za vrijeme ove tri faze odvijaju se različiti mikrobiološki, fizikalni, kemijski i strukturalni procesi od kojih su najvažniji dehidracija izazvana acidifikacijom, lipoliza i proteoliza. Ono što prethodi dimljenu kulena je faza kondicioniranja. U toj fazi kulen se ostavlja u specijaliziranim komorama u periodu oko 16 sati kako bi se izjednačila temperatura samog kulena s vanjskom temperaturom. Budući da se kulen svrstava u trajne kobasice postoje određene razlike u tehnološkom postupku proizvodnje naspram svih ostalih vrsta kobasica (toplinski obrađene i svježe kobasice). Skupina trajnih kobasica se samo suši i ne izlaže djelovanju visokih temperatura (JOKSIMOVIĆ i JOKSIMOVIĆ, 1990.). Nakon kondicioniranja dolazi do obrade samog kulena pomoću hladnog dima. Takav dim ne smije prelaziti temperaturu od 22 °C , mora biti bijele boje i bez primjesa čađi. Kulen se izlaže hladnom dimu u trajanju od najmanje 7 dana. Najčešće se za nastanak takvog dima koriste strugotine bukve, hrasta ili bagrema (VUKOVIĆ i sur., 2012.). Nakon faze hladnog dimljenja, proizvod ulazi u fazu fermentacije.

#### **2.5. Fermentacija**

Meso kao takvo je izrazito lako kvarljiva namirnica. Ono samo se ne može dugo održati u stanju koje je pogodno tj. sigurno za konzumaciju. Upravo zbog toga koriste se brojni načini konzerviranja i prerade mesa od kojih je najznačajnija fermentacija (JOKSIMOVIĆ i JOKSIMOVIĆ, 1990.). Proces fermentacije poznat je ljudima još od davnina. Najvjerojatnije je da je nastao kao slučajan proces, odnosno javlja se kao posljedica neadekvatnog skladištenja hrane. Fermentacija najvjerojatnije datira još iz Rimskog carstva, no postoje zapisi o fermentiranim mesnim proizvodima još iz Kine. Od prvog otkrića fermentacije do svih saznanja koja danas posjedujemo prošlo je izrazito puno vremena da bi se sam proces fermentacije i uvjeti u kojima se on događa razjasnili do kraja (HUTKINS, 2006.). Fermentacija po svojoj definiciji je jedan od brojnih načina konzerviranja mesa pomoću različitih fermentacijskih mikroorganizama. Upravo ti mikroorganizmi tj. njihovi produkti sprječavaju rast ostalih

patogenih i nepoželjnih mikroorganizama. Poželjni mikroorganizmi djelujući samostalno ili sinergistički s tkivnim enzimima u procesu fermentacije stvaraju karakteristična senzorička svojstva proizvoda npr. boja, aroma, tekstura i konzistencija (ZDOLEC, 2007.). Završni proizvod koji je prošao kroz cijelu fazu fermentacije postaje kemijski i mikrobiološki stabilan proizvod. Fermentacija kulena odvija se pod posebnim uvjetima. Bilo da se kulen proizvodi na tradicionalan (nekontrolirani) ili industrijski (kontrolirani) način, potrebno je osigurati posebnu komoru unutar koje možemo stvoriti idealne uvjete za fermentaciju. Kod tradicionalne proizvodnje, za takvu jednu komoru, ustalio se naziv „pušnica“. Proces fermentacije u tradicionalnim uvjetima proizvodnje traje najmanje 7 dana. Najvažniji parametri u procesu fermentacije su temperatura, vlažnost i protok zraka. Tijekom ove faze primjenjuju se sljedeće vrijednosti tehnoloških parametara: temperatura od 10 do 24 °C i vlaga zraka od 75 do 92 %. Ovi parametri izrazito su važni za optimalno funkcioniranje mikroorganizama koji sudjeluju u fermentaciji. Složen i postojan proces fermentacije ovisi i o nekim drugim parametrima kao što je primarna kontaminacija sirovine, pH, aktivitet vode, nitrati, sol te sama svojstva ovitka (ZDOLEC, 2007.). Konzerviranje, ako ga promatramo kao pojam tj. proces višeg reda, i fermentacija povezani su pod zajednički pojam biokonzerviranje. Obje metode produžuju vijek trajanja namirnica, u ovom slučaju mesa, te povećavaju sigurnost upotrebe mesnih proizvoda uz pomoć mikroorganizama i/ili njihovih produkata (ROSS i sur., 2002.).

Ono što se događa za vrijeme fermentacije kulena se zapravo događa u samom nadjevu uz pomoć mikroorganizama s ili bez tkivnih enzima. Princip fermentacije, kao i svaki postupak konzerviranja, osniva se na primjeni dva glavna načela anabioze i abioze. Kod anabioze govorimo o stvaranju nepovoljnih uvjeta za razvoj mikroorganizama i njihovog štetnog djelovanja, dok abioza omogućuje uništavanje štetnih mikroorganizama (JOKSIMOVIĆ i JOKSIMOVIĆ, 1990.). Kada je proces fermentacije završen proizvod se dodatno suši još tri mjeseca uz poštivanje tehnološki parametara: temperature do 15 °C te vlage od 60 do 80 %.



Slika 1. Dijagram tijeka tehnološkog procesa proizvodnje kulena

## 2.6. Prisutnost i uloga mikroorganizama u procesu fermentacije

Proces fermentacije smatra se biološkim sustavom na koji utječu brojni čimbenici. Njih je nužno strogo kontrolirati kako bi u konačnici dobili kvalitetan proizvod. Neki od tih čimbenika su prisutnost mikroorganizama, svojstva sirovine (svježina, minimalna kontaminacija), stroga sanitacija proizvodnog procesa, vrijeme, temperatura, vlaga, proces dimljenja i odabir pravilnih aditiva. Za proces fermentacije koji pretvara sirovo meso u gotovi fermentirani proizvod odgovorni su mikroorganizmi. Takvi mikroorganizmi mogu biti uzgojeni (starter kulture) ili pak „divlji“ (ZDOLEC i sur., 2005.). Primjenom starter kultura zapravo se skraćuje cijeli proces proizvodnje (NEŽAK i sur., 2011.). Prisutna mikroflora ovisi i o načinu proizvodnje. Kod tradicionalnog načina, odnosno proizvodnje u nekontroliranim uvjetima, ne

koriste se komercijalne starter kulture. Shodno tome tradicionalnu proizvodnju karakterizira različit mikrobiološki sastav, kvaliteta i konzistencija proizvoda u odnosu na one kulene koji su industrijski proizvedeni, odnosno proizvedeni u kontroliranim uvjetima. Ako je riječ o industrijski proizvedenim kulenima možemo reći da je mikrobiološki sastav ustaljen što se pripisuje strogo kontroliranim uvjetima fermentacije i uporabom starter kulture (BONOMO i sur., 2008.).

Kada govorimo o mikroorganizmima odgovornim za fermentaciju postoji više vrsta koji se karakteristično javljaju u trajnim tj. fermentiranim kobasicama. Općenito, mikrobiom odgovoran za fermentaciju se sastoji od bakterija mliječne kiseline, gram-pozitivnih katalaza-pozitivnih koka, kvasaca i plijesni. Podrijetlo mikroorganizama može biti iz mesa, začina ili mogu doći u proizvod tijekom procesa proizvodnje. Provedeno je niz istraživanja s ciljem determinacije sastava mikroflore trajnih fermentiranih kobasica. Na temelju dosadašnjih istraživanja mikroorganizmi koji se najčešće izoliraju su bakterije mliječne kiseline (BMK). Osim bakterija mliječne kiseline prisutne su i bakterije iz roda *Micrococcus* i *Staphylococcus* (BONOMO i sur., 2008.). U drugom istraživanju također su prevladavale bakterije mliječne kiseline, koagulaza negativni koki, rod *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Staphylococcus* (HUTKINS, 2006.). Unutar tog roda najzastupljenije su vrste *L. sakei*, *L. plantarum* i *L. curvatus*. U sljedećem istraživanju ponovno su prisutne bakterije mliječne kiseline od kojih vrste unutar rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i *Streptococcus* dominiraju tijekom zrenja tradicionalnih kobasica (LUND i BAIRD-PARKER, 2000.). U istraživanju iz 2012. godine u Hrvatskoj također su nađene *L. plantarum* i *Staphylococcus xylosum* (ZDOLEC i sur., 2012.). Među pripadnicima porodice *Micrococcaceae*, u nadjevu fermentiranih kobasica najučestalije su izolirani *S. xylosum*, *S. saprophyticus* i *S. carnosus* (MARTIN i sur., 2007.). KOZAČINSKI i sur. (2006.) su kao dio autohtone mikroflore izolirali vrste bakterija mliječne kiseline u fermentiranim kobasicama *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*. Radovi utemeljeni na istraživanju mikroflore kulena u Srbiji također daju podjednake rezultate odnosno, najzastupljeniji mikroorganizmi su bakterije mliječne kiseline, *Micrococcaceae* i enterokoki bez prisustva patogenih bakterija (VASILEV i sur., 2015.). Prikaz najčešćih mikroorganizama u procesu fermentacije vidljiv je u Tablici 1.

## Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne bakterije. One su prirodno prisutne na supstratima koji su bogati hranjivim tvarima kao što su meso i mlijeko, a može ih se naći i u probavnom sustavu ljudi. Ovi mikroorganizmi imaju važnu ulogu u industriji hrane budući da se koriste kao starter kulture za proizvodnju različitih fermentiranih proizvoda (DUKIĆ, 2009.). Od svih bakterija mliječne kiseline u fermentiranim kobasicama većinski udio čine laktobacili, a najčešće izolirane vrste su *L. sakei*, *L. plantarum* i *L. curvatus* (KOZAČINSKI i sur., 2008.; LEBERT i sur., 2007.). Istraživanje provedeno 2003. godine pokazalo je da je čak 90 % izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz prirodno fermentiranih kobasica pripadalo rodu *Lactobacillus* (PAPAMANOLI i sur., 2003.).

Široka upotreba bakterija mliječne kiseline kao starter kulture je posljedica njihovog pozitivnog učinka. Bakterije mliječne kiseline uz pomoć svojih metabolita i razgradnih produkata pridonose stvaranju karakterističnih senzoričkih svojstava svake trajne fermentirane kobasice pa tako i kulena. Njihova uloga se ponajprije očituje u acidifikaciji nadjeva što posljedično pridonosi izraženom antimikrobnom učinku i razvoju senzoričkih svojstava. Upravo ove bakterije štite meso od kvarenja odnosno poboljšavaju sigurnost i trajnost mesnih proizvoda i tako da proizvode određene količine organskih kiselina (mliječna, octena i propionska kiselina). Također, imaju bitnu ulogu u stvaranju arome, boje i teksture fermentiranih proizvoda i to postižu proizvodeći manje količine octene kiseline, ugljikovog dioksida i etanola (FRECE i sur., 2010.). Acidifikacija nadjeva moguća je upravo zbog bakterija mliječne kiseline. One kao supstrat za proizvodnju mliječne kiseline koriste ugljikohidrate. Izvor ugljikohidrata je najprije glikogen u samom mišićnom tkivu svinje, ali može biti i šećer koji je naknadno dodan u nadjev. Anaerobnom razgradnjom ugljikohidrata dolazi do stvaranja mliječne kiseline. Upravo nakupljanje mliječne kiseline, odnosno rast populacije BMK, postepeno snižava pH vrijednost nadjeva i dolazi do kemijskih, fizikalnih i mikrobioloških reakcija zbog čega acidifikacija ima važnu antimikrobnu ulogu. Snižavanjem pH vrijednosti nadjeva popraćeno sa smanjenjem aktiviteta vode ( $a_w$ ) stvaraju se uvjeti koji djeluju antimikrobno, odnosno nepovoljno na razvoj patogenih mikroorganizama kao što su *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* i *Campylobacter* (MAKSIMOVIĆ i sur., 2015.). Od ostalih patogenih mikroorganizama važno je izdvojiti i bakteriju *Listeria monocytogenes*. Ona ima nešto veću stopu preživljavanja u ovakvim uvjetima, no najčešće nestaje nakon trećeg tjedna proizvodnog procesa trajnih fermentiranih proizvoda (TYÖPPÖNEN i sur., 2003.). Osim samog snižavanja pH vrijednosti velik značaj u antimikrobnoj ulozi bakterija mliječne kiseline

ima i proizvodnja bakteriocina. Bakteriocini su mikrobnii peptidi ili proteini koji sprečavaju rast ili čak uništavaju druge bakterije (ZDOLEC i sur., 2005.). Još jedan pripadnik ovog roda koji se vrlo često koristi u starter kulturama je i *Pediococcus pentosaceus*. Koristi se zbog svojih pozitivnih karakteristika tj. proizvodi sporije mliječnu kiselinu i to pri nižim temperaturama fermentacije te posjeduje antimikrobno djelovanje i nema nepoželjnih karakteristika koje bi utjecale na sigurnost i kvalitetu krajnjeg proizvoda (NEŽAK i sur., 2011.).

#### Koagulaza-negativni stafilocoki (KNS/CNC)

Gram-pozitivni katalaza-pozitivni koagulaza-negativni stafilocoki imaju vrlo važnu ulogu u fermentaciji mesnih proizvoda. Oni zajedno s bakterijama mliječne kiseline i brojnim drugim mikroorganizmima s ili bez sudjelovanja tkivnih enzima formiraju trajnu fermentiranu kobasicu, u ovom slučaju kulen, sa svim svojim karakterističnim svojstvima. Koagulaza-negativni koki imaju glavnu ulogu u razvoju arome, okusa i boje fermentiranih mesnih proizvoda (KOVAČEVIĆ i sur., 2009.). Najčešće prisutni stafilocoki u starter kulturama su *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. carnosus* i *S. lentus* (SIMONOVA i sur., 2006.; BONOMO i sur., 2008.). Stafilocoki nemaju brzi rast i uglavnom ih možemo naći na površini kobasica koje još nisu primile prvi dim. Zbog sporog rasta i njihove lokacije, najčešće se dodaju u vidu starter kultura. Također, treba obratiti pažnju i na stupanj acidifikacije tj. na pH samog nadjeva budući da je kiseli medij nepogodan za rast, razvoj i normalnu funkciju samih stafilocoka (HOSPITAL i sur., 2005.). Stafilocoki najprije utječu na razvoj karakteristične crvene boje svih fermentiranih kobasica. Brojne vrste ovih stafilocoka posjeduju enzim nitrat reduktazu (GARCIA-VARONA i sur., 2000.). Uz pomoć tog enzima dolazi do pretvorbe nitrata u nitrit pri čemu nastaje pigment nitrosomoglobin, upravo on daje boju gotovom proizvodu. Nadalje, ove bakterije potroše sav slobodan kisik i tako sudjeluju u očuvanju boje kulena. Određena količina kisika može se naći u nadjevu kao posljedica neadekvatnog punjenja nadjeva u ovitak. S vremenom taj kisik se može spojiti s vodikom i nastaje vodikov peroksid koji djeluje nepovoljno na samu boju proizvoda i na lipolizu masti (KAMILÖGLU i sur., 2016.; FRECE i sur., 2010.). Karakterističan okus kulena postiže se uz pomoć stafilocoka odnosno njihovim proteolitičkim i lipolitičkim djelovanjem. Okus se razvija kao posljedica denaturacije proteina, odnosno slobodnih aminokiselina, i lipolizom nezasićenih masnih kiselina (TALON i sur., 2007.). Za aromu kulena odgovorna je proteoliza slobodnih aminokiselina i to pogotovo leucina, izoleucina i valina koji se pretvaraju u aldehide i ketone i tako sudjeluju u stvaranju karakteristične arome (MONTEL i sur., 1996.).



## *Micrococcaceae*

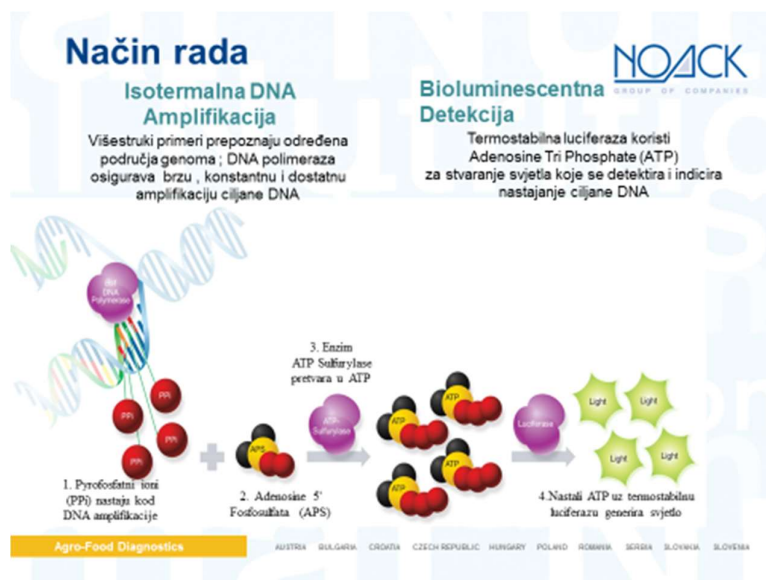
Uz dominantne bakterije mliječne kiseline i koagulaza-negativne stafilokoke u samoj mikroflori fermentacije sudjeluju i mikrokoki. Njihova primarna uloga je očuvanje karakteristične crvene boje fermentiranih proizvoda i smanjenje mogućnosti kvarenja odnosno užeglosti trajnog fermentiranog proizvoda (ANDRES, 1997.). Mikrokoki djeluju tako da smanjuju količinu proizvedenog vodikovog peroksida koji ima štetno djelovanje na boju proizvoda i na lipolizu nezaićenih masnih kiselina koja se odvija tijekom fermentacije (KAMILÖGLU i sur., 2016.; FRECE i sur., 2010.). Iz cijelog roda *Micrococcus* najčešće se izolira *Micrococcus varians* (HAMMES i HERTEL, 1998.; ŠUŠKOVIĆ, 2008.).

Tablica 1. Najčešće starter kulture za fermentaciju mesa (HAMMES i HERTEL, 1998.; ŠUŠKOVIĆ, 2008.).

<b>Grupe mikroorganizama</b>	<b>Mikrobne vrste</b>
Bakterije mliječne kiseline	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactococcus lactis</i>
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus varians</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus lentus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>
Kvasci	<i>Debaromyces hansenii</i> <i>Candida famata</i>
Plijesni	<i>Penicillium nalgiovense</i> <i>Penicillium crysogenum</i>

## 2.7. Molekularna metoda detekcije *L. monocytogenes*

Osim uobičajenih mikrobioloških metoda, u posljednjih nekoliko godina, sve češće se koriste i molekularne metode detekcije. Molekularne metode mogu se koristiti za različite vrste bakterija, odnosno njihovo dokazivanje u uzorcima hrane, uzorcima iz okoliša ili s površina koje su bile u kontaktu s hranom. U ovom radu koristili smo test molekularne detekcije 3M™ *Listeria monocytogenes*. Test pomoću kojeg se dokazuje prisustvo tj. postojanje DNA ciljanog (ispitivanog) mikroorganizma radi na sljedeći način. Prva faza koja se zbiva je faza izotermne amplifikacije sekvenci nukleinskih kiselina. Karakteristika ove faze je visoka brzina, specifičnost i djelotvornost. U ovoj fazi dolazi do brzog umnažanja nukleinske kiseline uz pomoć korištenja višestrukih primera koji se vežu za točno određena područja genoma. Najčešće korišteni primer je DNA-polimeraza. Za ovu fazu ključno je da se odvija na konstantnoj temperaturi pri čemu dolazi do razdvajanja DNA lanca. Nakon amplifikacije slijedi faza bioluminiscencije koja se koristi za detekciju amplificirane DNA. Iako je način rada podijeljen naizgled u dvije faze, one se zapravo odvijaju istovremeno. Kontinuirano i istovremeno djelovanje amplifikacije i detekcije omogućava rezultate vidljive vrlo brzo nakon samog početka analize. Ova metoda detekcije je visoko specifična, manje osjetljiva na utjecaj inhibitornih tvari u uzorku hrane te vrlo pouzdana zbog korištenja pozitivne i negativne kontrole.



Slika 2. Način rada molekularne detekcije 3M™ *Listeria monocytogenes*

## 2.8. Antimikrobna rezistencija

Antimikrobna rezistencija (AMR) je sposobnost mikroorganizama da razviju otpornost na antimikrobne lijekove koji su se do tada koristili u liječenju ili kao profilaksa. Antimikrobna rezistencija predstavlja globalni javnozdravstveni problem jer se javlja kao poveznica između humane i veterinarske medicine. Neodgovorna uporaba antimikrobnih lijekova u veterinarskoj medicini dovodi do pojave otpornosti bakterija prema antibioticima koji se koriste u terapiji ljudi, a upravo takva otpornost nastaje zbog primjene analognih preparata u veterinarskoj medicini. Jedan od vrlo čestih načina širenja antimikrobne rezistencije sa životinja na ljude je putem životinjskih proizvoda. Najveću opasnost u takvom širenju antimikrobne rezistencije predstavljaju fermentirani mesni i mliječni proizvodi koji nisu tretirani postupcima koji uključuju primjenu visoke temperature (MATHUR i SINGH, 2005.). Do nedavno, u veterini, su se koristile visoke doze antimikrobnih pripravaka u svrhu poticanja rasta tj. što većeg prirasta najčešće tovnih životinja. S određenom dozom antibiotika postiglo se da se smanjuju subkliničke infekcije kod životinja i da zapravo antibiotik djeluje kao promotor rasta. Tako su se u najvećoj mjeri određene količine antibiotika alimentarno prenijele sa životinja na ljude.

Antimikrobna rezistencija najviše se prati kod patogenih bakterija tj. kod bakterija koje su klinički značajne, no prati se i kod bakterija komenzala koje imaju sposobnost prenošenja rezistentnih gena na patogene vrste bakterija (MATHUR i SINGH, 2005.). Jedan od primjera takvih komenzala je rod *Lactobacillus*. Bakterije mliječne kiseline u pravilu su sigurne, no mogu predstavljati opasnost zbog alimentarnog prijenosa antimikrobne rezistencije na mikrofloru crijeva ljudi. Provedena su brojna istraživanja s različitim rezultatima. Antimikrobna rezistencija se najčešće se javlja kod enterokoka (MATHUR i SINGH, 2005.), zatim kod roda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* (AMMOR i sur., 2007.). Kod enterokoka najveća otpornost je na sulfametoksazol (74 %), meticilin (64 %), novobiocin (44 %), furazolidon (36 %) te gentamicin i eritromicin (24 %) (KOLUMAN i sur., 2009.). Bakterije roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* rezistentne su prema cefoxitinu. Zatim *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. i *Leuconostoc* spp. otporne su prema visokim koncentracijama vankomicina (AMMOR i sur., 2007.). *Leuconostoc* nema razvijenu otpornost osim one prirodne i to prema glikopeptidnim antibioticima (OGIER i sur., 2008.). ZDOLEC i sur. (2011.) utvrdili su da su bakterije mliječne kiseline osjetljive na tetraciklin, penicilin, bacitracin, kloramfenikol, cefaleksin, likomicin, eritromicin, ampicilin, spiramicin i amoksicilin. Na rast bakterija mliječne kiseline nije utjecao vankomicin i metronidazol. Iako ne predstavljaju direktnu prijetnju još ubrzanim razvijanju antimikrobne

rezistencije, potrebno je dodatno istražiti svojstva ovih bakterija i njihovu antimikrobnu rezistenciju.

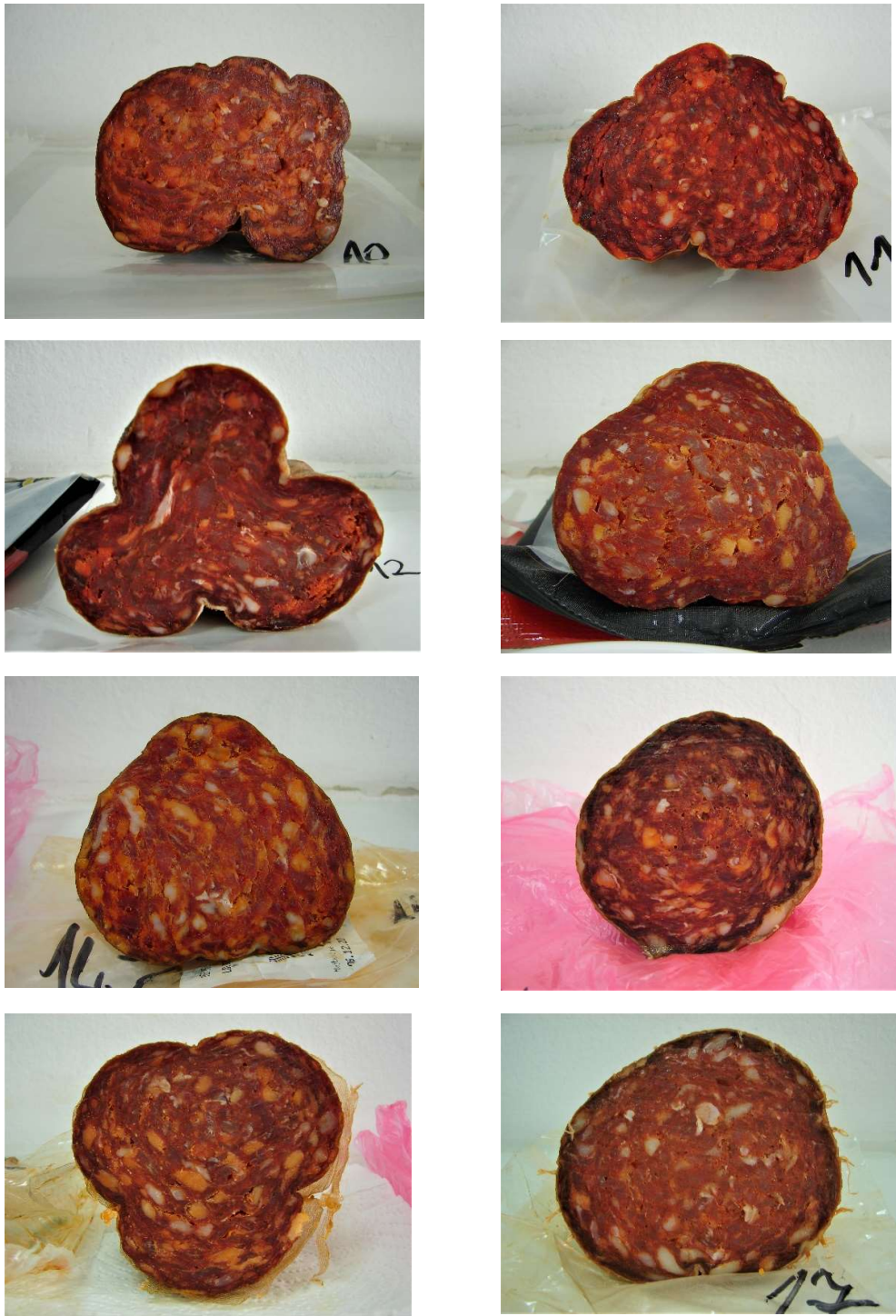
### **3. MATERIJAL I METODE**

Sva istraživanja su provedena na ukupno 17 uzoraka kulena. Uzorci predstavljaju kulene proizvedene u kontroliranim i nekontroliranim uvjetima. Kuleni proizvedeni u nekontroliranim uvjetima podrazumijevaju kulene koji su proizvedeni na obiteljskim gospodarstvima tijekom 2019. godine s lokalitetom u području Baranje (Kneževi Vinogradi, Karanac, Zmajevac, Vardarac). Takvih uzoraka je ukupno 9 i oni su označeni s oznakom „Uzorak 1-9“. Kuleni koji su proizvedeni u kontroliranim uvjetima proizvedeni su u odobrenim objektima za preradu mesa i izradu proizvoda životinjskog podrijetla. Broj uzoraka ovakvih kulena je 8 i potječu s cijelog područja istočne Hrvatske (Osijek, Slavonski Brod, Slatina, Borovo, Otok). Ti kuleni su označeni s oznakom „Uzorak 10-17“.

Uzorci su prikupljeni u periodu od 20. prosinca 2019. do 16. rujna 2020. godine. Svi uzorci su vakuumirani i skladišteni u hladnjak sve do vremena provođenja ovog istraživanja. Presjeci kulena prikazani su na slikama 3 i 4.



Slika 3. Presjeci uzoraka kulena  
proizvedeni u nekontroliranim uvjetima.  
Uzorak 1-9 s lijeva na desno.  
(fotografirao dr.sc. Tomislav Mikuš)



Slika 4. Presjeci uzoraka kulena proizvedeni u kontroliranim uvjetima  
Uzoraci 10-17 s lijeva na desno. (fotografirao dr. sc. Tomislav Mikuš)

### 3.1. Mikrobiološka pretraga kulena

Mikrobiološki je pretraženo 17 uzoraka kulena, devet proizvedenih u nekontroliranim uvjetima i osam iz kontroliranih uvjeta proizvodnje. Uzimanje uzorka provodilo se uz sam plamenik pri čemu se koristio sterilan pribor. Za uzimanje uzorka bilo je potrebno odrediti mjesto gdje će se načiniti poprečan rez kako bi se uzorak mogao uzeti iz sredine kulena. To mjesto gdje je napravljen rez je izvana dezinficirano 70 % etilnim alkoholom. Pažljivo je odstranjen ovitak te je uzet testni uzorak od 10 g u sterilnu stomaher vrećicu u koju je potom dodano 90 ml slane peptonske vode (osnovno razrjeđenje). Potom su načinjena serijska decimalna razrjeđenja u istom otapalu. Određivan je broj bakterija mliječne kiseline te enterokoka naciepljivanjem 0,1 ml odabranih razrjeđenja na MRS agar (Merck, Njemačka), odnosno *Enterococcus* Compas agar (Biorad, SAD). Naciepljeni MRS agari inkubirani su tijekom 48 sati pri 30 °C, a *Enterococcus* agar 24 sata pri 37 °C.



Slika 5. Uzimanje i priprema uzorka za mikrobiološku pretragu (fotografirala Dunja Igrec)



### 3.2. Molekularna detekcija bakterije *L. monocytogenes*

Molekularna detekcija bakterije *L. monocytogenes* uzoraka (n=17) provedena je pomoću *Molecular Detction System 3M™ Listeria monocytogenes* (3M, SAD). Ovaj test je brz i specifičan za dokazivanje *L. monocytogenes* u uzorcima hrane, uzorcima iz okoliša ili s površina koje dolaze u kontakt s hranom. Za razliku od mikrobiološke metode dokazivanja kod molekularnog dokazivanja nije potrebno prethodno izolirati bakteriju na standardnim mikrobiološkim podlogama. Kao supstrat za pretragu koristi se osnovno razrjeđenje, a test se radi prema već određenom MSD protokolu koji je karakterističan za svaki pojedini kit. Protokol za određivanje prisutnosti DNA bakterije *L. monocytogenes* prikazan je na slici 6.

## MDS-Sustav za detekciju patogena-POSTUPAK

### SASTAV KITA

Broj testova: 96

Sadržaj:

- Obojene „Reagent“ posudice
- Ready-To-Use „Lysis“ tubice
- „Reagent“ Kontrola (RC)
- Bočica sa negativnom kontrolom



### PREDOBOGAĆENJE

1. 25g uzorka 225mL 3M BPW ISO peptonske vode
2. Homogenizacija u trajanju (2) minute
3. Inkubacija na 37°C (± 1°) u trajanju od 18–24 sata

### POSTUPAK

Dva sata prije postupka, staviti „Chill“ blok u hladnjak!

Upaliti uređaj i odabrati test

Odabrati onoliko „Lysis“ tubica koliko ima uzoraka + jedna „Lysis“ tubica za kontrolu

20 µl predobogaćenog uzorka staviti u „Lysis“ tubicu



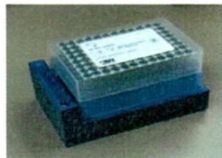
20 µl negativne probe (mala bočica u kutiji) staviti u „Lysis“ tubicu



Zatvoriti posudice posebnim zaobljenim zatvaračem

Tri do pet puta okrenuti držač sa tubicama kako bi se gel u potpunosti izmješao

Posudu sa tubicama zagrijavati 15 minuta na 100°C (u "Heat" bloku ili u vodenoj kupelji – paziti da voda u kupelji ne prelazi poklopac tubica)

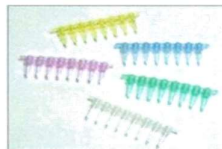


Skinuti poklopac sa posude sa tubicama i staviti je u blok koji smo izvadili iz frižidera, hladiti 10 minuta (ili manje ukoliko je malo uzoraka)

Izvaditi iz bloka nakon hlađenja (zatvoriti poklopac), okrenuti tri do pet puta (pazeći da nema mjehurića), te tri do pet puta udariti držačem o stol.

Ostaviti da stoji 5 minuta, te pripremiti da ne dođe do pomicanja.

Izvaditi „reagent“ posudice (obojane) iz vrećice i to po jednu za svaki uzorak, te jednu za neg. kontrolu.



Izvaditi „reagent“ posudice (obojane) iz vrećice i to po jednu za svaki uzorak, te jednu za neg. kontrolu. Za otvaranje i zatvaranje koristiti ravni zatvarač.

Izvaditi jednu „reagent“ kontrolu (RC) iz vrećice – koristi se kao pozitivna proba!

Ukoliko je potrebno, izvaditi određeni broj „Matrix“ kontrola

20 µl uzorka iz „Lysis“ tubice otpipetirati u „reagent“ - obojanoj tubici

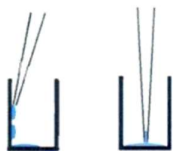
20 µl negativne kontrole iz „Lysis“ tubice otpipetirati u „reagent“ - obojanoj posudici

20 µl negativne kontrole iz „Lysis“ tubice otpipetirati u RC - prozirnu posudicu (poz. kontrola)

20 µl uzorka iz „Lysis“ tubice otpipetirati u „Matrix“ kontrolu (ukoliko je potrebno) –

Paziti prilikom pipetiranja (pipetirati uz rub posudice) kako ne bi došlo do ispadanja kuglice sa reagensima

Pet puta izmješati uzorak u posudicama (pipetom)



Sve posudice zatvoriti

Držač staviti u „ladicu“ – uzorci su spremni za mjerenje!

Slika 6. MDS protokol

### 3.3. Izolacija i identifikacija mikroorganizama s MRS agara

Nakon inkubacije određen je broj mikroorganizama za svaki pojedini uzorak kulena. S MRS agara nasumično su uzete po dvije kolonije iz najvećih razrijeđenja, presađeno na MRS, inkubirano tijekom 24 sata pri 30 °C te podvrgnuto bojanju po Gramu. Gram-pozitivni bacili,

kokobacili i koki poslani su na determinaciju metodom MALDI-TOF masene spektrometrije u Institut Ruđer Bošković. Ukupno je za determinaciju uspješno pripremljeno 20 izolata iz 10 kulena.

Identifikacija izolata provedena je pomoću MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight; matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja-analizator masa s vremenom leta) spektrometrije masa). Kolonija izolata je sterilnom čačkalicom stavljena na jedno mjesto MALDI pločice te je na nju dodan 1  $\mu$ L 70 %-tne mravlje kiseline (v/v) (Fisher Chemical, Španjolska). Uzorak osušen na sobnoj temperaturi potom je pokriven s 1  $\mu$ L MALDI matriksa (zasićena otopina  $\alpha$ -cyano-4-hidroksicinamične kiseline (HCCA, Bruker Daltonik, Njemačka) u 50 % acetonitrila i 2.5 % trifluorooctene kiseline (Fisher Chemical, Španjolska) te ponovno osušen na sobnoj temperaturi. Primjenom microflex LT spektrometra masa (Bruker Daltonik, Njemačka) za svaki izolat snimljeni su karakteristični spektri masa proteina u rasponu m/z od 2 000-20 000 Da. Snimljeni spektri masa obrađeni su pomoću MALDI Biotyper 3.0 računalnog programa (Bruker Daltonik, Njemačka). Rezultat MALDI Biotyper-a izražen je kao logaritamska vrijednost u rasponu 0–3.0 što predstavlja vjerojatnost točne identifikacije izolata, temeljem usporedbe proteinskih profila nepoznatog izolata s referentnim spektrom u bazi podataka.



Slika 7. Priprema izolata za MALDI TOF MS (fotografirala Dunja Igrac)

### 3.4. Test osjetljivosti izolata na antimikrobne tvari

Svi identificirani izolati na MALDI-TOF MS (n=17) podvrgnuti su testu osjetljivosti na antimikrobne tvari disk difuzijskom metodom (Kirby-Bauer test). Korišteno je ukupno 15 različitih antibiotika ovisno o rodu bakterija koje su podvrgnute antibiogramu. Za rod *Staphylococcus* spp. koristilo se ukupno njih 13, dok se za bakterije mliječne kiseline koristilo sedam različitih antibiotika (tablice 2 i 3).

Tablica 2. Antibiotici i njihova koncentracija za rod *Staphylococcus* spp.

Antibiotik	Koncentracija
Penicilin	10 IU
Ampicilin	10 µg
Ciprofloksacin	5 µg
Linezolid	30 µg
Ceftazidim	30 µg
Kanamycin	30 µg
Eritromicin	15 µg
Trimetoprim	1.25 µg
Tetraciklin	30 µg
Kloramfenikol	30 µg
Nitrofurantoin	100 µg
Teicoplanin	30 µg
Cefotaksim	30 µg

Tablica 3. Antibiotici i njihova koncentracija za bakterije mliječne kiseline

Antibiotik	Koncentracija
Ampicilin	10 µg
Kanamycin	30 µg
Streptomycin	10 µg
Eritromicin	15 µg
Klindamicin	30 µg
Tetraciklin	30 µg
Kloramfenikol	30 µg

Prije samog nanošenja testnog mikroorganizma potrebno je načiniti otopinu stanica gustoće 0,5 McFarlanda (Densimat, Biomerieux, Francuska). Sterilnim brisom uzeta je čista bakterijska kultura koji se otapa u 2 ml fiziološke otopine do navedene gustoće. Zatim se

sterilnim brisom nanosila otopina stanica na površinu Mueller-Hintonovog agara (Biorad, SAD) u tri smjera troslojno. Nakon sušenja tijekom 15 minuta naneseni su diskovi antibiotika (MASTDISKS<sup>®</sup> AST, Mast Group, UK). Potom je provedena inkubacija pri 35 °C tijekom 18-24 sata. Nakon inkubacije provedeno je mjerenje zona inhibicije (mm), a interpretacija osjetljivosti/otpornosti na antibiotike prema kriterijima CLSI-a za stafilokoke. Budući da za bakterije mliječne kiseline ne postoje kriteriji za agar difuzijski test, kriterij otpornosti bio je izostanak zone inhibicije rasta bakterije oko diska.



Slika 8. Odabir antibiotika za antibiogram  
(fotografirala Dunja Igrec)



Slika 9. Primjer disk-difuzijskog testa  
(fotografirala Marta Kiš, dr.med.vet.)

### 3.5. Organoleptička ocjena kulena

Ocjenjivanje je provela skupina od 10 ocjenjivača, studenata i djelatnika Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta. Ocjenjivani su vanjski izgled (izgled ovitka i površine proizvoda, boja presjeka, izgled presjeka, povezanost nadjeva), miris (ocjena samog mirisa, prisustvo neugodnog mirisa, identifikacija neugodnog mirisa) te ocjena ukupnog dojma senzorskih svojstava. Ocjenjivači su davali ocjene od 1 (minimum) do 10 (maksimum) za svaki parametar. Na temelju dobivenih ocjena izračunata je aritmetička sredina za svaki parametar kao i standardna devijacija uz pomoć programa Microsoft Excel.



Slika 10. Detalj organoleptičke ocjene kulena (fotografirala Dunja Igrec)



Slika 11. Detalj organoleptičke ocjene kulena proizvedenih u nekontroliranim uvjetima (fotografirao dr. sc. Tomislav Mikuš)

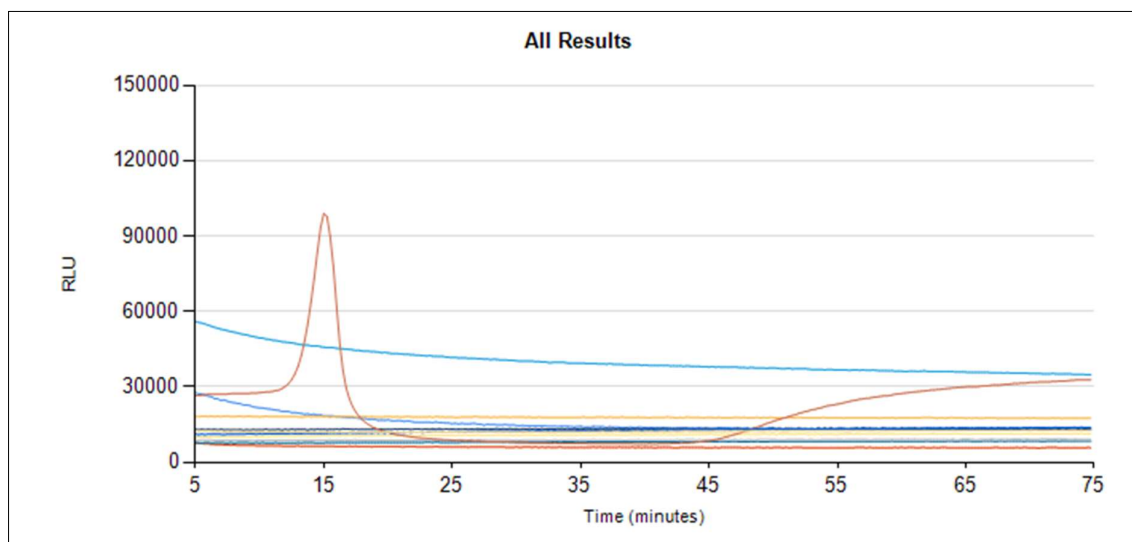
#### 4. REZULTATI

Rezultati brojnosti mikroorganizama prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati određivanja broja bakterija mliječne kiseline (CFU/g) i prisutnosti *L. monocytogenes* (MDS)

		MRS agar	<i>Enterococcus</i> agar	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> MDS
Uzorci kulena iz nekontroliranih uvjeta proizvodnje	Uzorak 1	5,2 x 10 <sup>6</sup>	8,4 x 10 <sup>4</sup>	Negativno
	Uzorak 2	8,5 x 10 <sup>6</sup>	6,2 x 10 <sup>4</sup>	Negativno
	Uzorak 3	3,3 x 10 <sup>7</sup>	4,4 x 10 <sup>4</sup>	Negativno
	Uzorak 4	-*	2,4 x 10 <sup>5</sup>	Negativno
	Uzorak 5	4,0 x 10 <sup>6</sup>	9,4 x 10 <sup>5</sup>	Negativno
	Uzorak 6	4,6 x 10 <sup>6</sup>	-*	Negativno
	Uzorak 7	2,0 x 10 <sup>5</sup>	3,4 x 10 <sup>5</sup>	Negativno
	Uzorak 8	2,3 x 10 <sup>6</sup>	5,9 x 10 <sup>4</sup>	Negativno
	Uzorak 9	7,0 x 10 <sup>6</sup>	4,6 x 10 <sup>5</sup>	Negativno
	<b>Prosječno 1-9</b>	<b>8,1 x 10<sup>6</sup></b>	<b>3,5 x 10<sup>5</sup></b>	
Uzroci kulena iz kontroliranih uvjeta proizvodnje	Uzorak 10	-*	1,2 x 10 <sup>6</sup>	Negativno
	Uzorak 11	-*	3,3 x 10 <sup>5</sup>	Negativno
	Uzorak 12	2,2 x 10 <sup>7</sup>	5,1 x 10 <sup>6</sup>	Negativno
	Uzorak 13	2,0 x 10 <sup>8</sup>	7,0 x 10 <sup>5</sup>	Negativno
	Uzorak 14	1,4 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	Negativno
	Uzorak 15	5,0 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	Negativno
	Uzorak 16	1,4 x 10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	Negativno
	Uzorak 17	4,2 x 10 <sup>6</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup>	Negativno
	<b>Prosječno 10-17</b>	<b>3,8 x 10<sup>7</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	

\*Porast nespecifične flore (kvasci/plijesni), neizbrojive bakterije mliječne kiseline/enterokoki



Slika 12. Prikaz dijela rezultata molekularne detekcije *L. monocytogenes* u uzorcima kulena

Tablica 5. Prikaz rezultata MALDI-TOF MS determinacije izolata

Oznaka izolata*	MALDI TOF MS determinacija
1a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1b	<i>Staphylococcus hominis</i>
2a	<i>Staphylococcus warneri</i>
2b	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3a	<i>Streptococcus vestibularis</i>
3b	-
5a	<i>Staphylococcus hominis</i>
5b	<i>Staphylococcus hominis</i>
8a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
8b	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
9a	-
9b	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
11a	<i>Lactobacillus curvatus</i>
11b	<i>Leuconostoc carnosum</i>
12a	-
12b	<i>Micrococcus luteus</i>
13a	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
13b	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
14a	<i>Lactobacillus sakei</i>
14b	<i>Streptococcus salivarius</i>

\*broj označava oznaku kulena (1-17); a,b – oznake izolata iz istog kulena



Rezultati ispitivanja osjetljivosti (veličina zone inhibicije izražena u mm) izolata na antimikrobne tvari prikazani su u tablicama 6 i 7. Prikazana su mjerenja za izolate koji su uspješno determinirani i koji su porasli na Muller-Hinton agaru (tri izolata bakterija mliječne kiseline i 12 izolata stafilokoka, streptokoka i mikrokoka). Nakon očitavanja promjera zone inhibicije i na temelju kriterija o rezistenciji mikroorganizama utvrđeno je koji izolati su rezistentni, a koji osjetljivi na pojedini antibiotik.

Tablica 6. Prikaz rezultata testiranja osjetljivosti izolata bakterija mliječne kiseline na antimikrobne tvari (zona inhibicije; mm\*)

Antibiotik	<i>Leuconostoc carnosum</i> (11b)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (13a)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (13b)
Ampicilin	30	24	23
Kanamycin	20	12	10
Streptomycin	15	14	13
Eritromicin	30	32	30
Klindamicin	30	32	30
Tetraciklin	0	15	12
Kloramfenikol	20	22	30

\* izostanak zone inhibicije uzet je kao kriterij otpornosti na antimikrobnu tvar

Tablica 7. Prikaz rezultata testiranja osjetljivosti izolata stafilokoka, mikrokoka i streptokoka na antimikrobne tvari (zona inhibicije; mm\*)

Antibiotik	<i>Staphy. epid.</i> (1a)	<i>Staphy. homin.</i> (1b)	<i>Staphy. warn.</i> (2a)	<i>Staphy. epid.</i> (2b)	<i>Strep. vestib.</i> (3a)	<i>Staphy. homin.</i> (5a)	<i>Staphy. homin.</i> (5b)	<i>Staphy. epid.</i> (8a)	<i>Staphy. epid.</i> (8b)	<i>Staphy. epid.</i> (9b)	<i>Microc. luteus</i> (12b)	<i>Strep. saliv.</i> (14b)
Penicilin	15	20	32	12	0	42	44	8	17	26	30	15
Ampicilin	34	26	40	22	0	48	32	20	10	33	40	20
Ciprofloksacin	18	35	32	0	25	40	0	35	22	0	28	15
Linezolid	40	36	38	32	0	42	30	36	35	31	40	25
Ceftazidim	26	28	20	20	12	26	25	17	27	20	20	10
Kanamicin	0	32	25	34	26	0	0	18	0	13	30	18
Eritromicin	0	0	0	12	10	0	0	8	32	12	15	6
Trimetoprim	34	40	38	20	36	40	40	30	30	30	32	30
Tetraciklin	32	30	40	42	30	6	10	20	30	38	41	20
Kloramfenikol	32	34	30	40	30	33	30	32	-	35	40	20
Nitrofurantoin	34	27	26	38	0	32	30	31	26	30	22	20
Teicoplanin	20	22	20	22	0	27	27	0	18	20	25	0
Cefotaksim	34	35	34	22	0	34	35	24	34	28	40	20

Tablica 8. Usporedba nalaza rezistentnih bakterijskih vrsta u skupinama uzoraka kulena iz nekontroliranih (1-9) i kontroliranih uvjeta (10-17)

<b>Antibiotik</b>	Rezistentni izolati iz kulenova iz nekontroliranih uvjeta (1-9)	Rezistentni izolati iz kulenova iz kontroliranih uvjeta (10-17)
<b>Penicilin</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1a) <i>Staphylococcus hominis</i> (1b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (2b) <i>Streptococcus vestibularis</i> (3a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (9b)	<i>Streptococcus salivaris</i> (14b)
<b>Ampicilin</b>	<i>Staphylococcus hominis</i> (1b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (2b) <i>Streptococcus vestibularis</i> (3a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8b)	<i>Streptococcus salivaris</i> (14b)
<b>Ciprofloksacin</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2b) <i>Staphylococcus hominis</i> (5b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (9b)	<i>Streptococcus salivaris</i> (14b)
<b>Linezolid</b>	<i>Streptococcus vestibularis</i> (3a)	-
<b>Ceftazidim</b>	<i>Streptococcus vestibularis</i> (3a)	<i>Streptococcus salivaris</i> (14b)
<b>Kanamicin</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1a) <i>Staphylococcus hominis</i> (5a) <i>Staphylococcus hominis</i> (5b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (9b)	-
<b>Eritromicin</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1a) <i>Staphylococcus hominis</i> (1b) <i>Staphylococcus warneri</i> (2a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (2b) <i>Streptococcus vestibularis</i> (3a) <i>Staphylococcus hominis</i> (5a) <i>Staphylococcus hominis</i> (5b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (9b)	<i>Streptococcus salivaris</i> (14b)
<b>Tetraciklin</b>	<i>Staphylococcus hominis</i> (5a) <i>Staphylococcus hominis</i> (5b)	<i>Leuconostoc carnosum</i> (11b)
<b>Nitrofurantoin</b>	<i>Streptococcus vestibularis</i> (3a)	-
<b>Teicoplanin</b>	<i>Streptococcus vestibularis</i> (3a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8a)	<i>Streptococcus salivaris</i> (14b)
<b>Ceftotaksim</b>	<i>Streptococcus vestibularis</i> (3a)	-

Niti jedan izolat nije rezistentan na trimetoprim, klorafenikol, streptomycin te klindamicin. Slaba rezistencija uočena je i na ceftotaksim, nitrofurantoin te linezolid (*Streptococcus*

*vestibularis* (3a)). Nešto veći broj izolata rezistentan je na ceftazidim (*Streptococcus vestibularis* (3a), *Streptococcus salivaris* (14b)), tetraciklin (*Staphylococcus hominis* (5a), *Staphylococcus hominis* (5b), *Leuconostoc carnosum* (11b)) te na teicoplanin (*Streptococcus vestibularis* (3a), *Staphylococcus epidermicus* (8a), *Streptococcus salivaris* (14b)). Veći broj izolata pokazuje rezistenciju na ostale antimikrobne tvari korištene u istraživanju (penicilin, ampicilin, ciprofloksacin, kanamicin, eritromicin, trimetoprim). Sve bakterije koje pokazuju rezistenciju prema gore navedenim antimikrobnim tvarima uvrštene u rod stafilokoka, streptokoka i mikrokoka. Iz tablice 8 uočava se prisutnost značajno veći broj rezistentne mikroflore u kulenovima proizvedenim u nekontroliranim uvjetima mikroklike.

U tablicama 9, 10 i 11 prikazani su rezultati organoleptičke ocjene kulena iz nekontroliranih i kontroliranih uvjeta proizvodnje.

Tablica 9. Rezultati organoleptičkog ocjenjivanja kulena iz nekontroliranih uvjeta proizvodnje

	<u>Uzorak 1</u>	<u>Uzorak 2</u>	<u>Uzorak 3</u>	<u>Uzorak 4</u>	<u>Uzorak 5</u>	<u>Uzorak 6</u>	<u>Uzorak 7</u>	<u>Uzorak 8</u>	<u>Uzorak 9</u>
<b>Izgled ovitka i površine proizvoda</b>	8,20±0,6	6,50±1,84	6,60±2,01	7,10±1,97	5,80±2,10	3,60±2,46	4,40±2,01	6,50±1,78	3,20±2,20
<b>Boja presjeka</b>	7,30±0,95	7,00±2,00	5,80±1,62	6,40±2,37	4,70±2,50	1,60±0,84	4,10±1,85	6,30±2,11	2,50±1,35
<b>Izgled presjeka</b>	6,70±1,34	6,40±2,37	5,90±1,85	5,20±1,81	4,30±2,75	1,80±0,92	4,00±2,16	6,00±1,89	2,40±1,43
<b>Ocjena povezanosti nadjeva</b>	7,40±1,07	4,80±1,40	7,00±1,76	7,10±2,02	4,40±2,17	2,30±1,06	4,40±1,71	6,30±1,77	2,60±1,35
<b>Ocjena mirisa</b>	8,00±1,05	7,00±1,41	7,20±1,99	6,50±1,90	3,60±1,96	1,90±0,99	3,40±1,84	6,40±0,97	1,90±1,52
<b>Postojanje neugodnog mirisa</b>	10 NE	10 NE	9 NE i 1 DA	10 NE	5 NE i 5 DA	3 NE i 7 DA	4 NE i 6 DA	9 NE i 1 DA	2 NE i 8 DA
<b>Opis neugodnog mirisa</b>			Kiseo		Kiseo Prejak miris paprike	Užegao Kiseo	Kiseo Trulež	Kiseo	Trulež Plijesan Kiseo
<b>Ocjena ukupnog dojma</b>	7,40±0,97	6,40±0,97	6,00±1,70	6,30±1,64	4,10±2,02	2,20±0,92	4,10±1,52	6,40±1,07	1,90±1,52

Tablica 10. Rezultati organoleptičke ocjene kulena iz kontroliranih uvjeta proizvodnje

	<u>Uzorak 10</u>	<u>Uzorak 11</u>	<u>Uzorak 12</u>	<u>Uzorak 13</u>	<u>Uzorak 14</u>	<u>Uzorak 15</u>	<u>Uzorak 16</u>	<u>Uzorak 17</u>
<b>Izgled ovitka i površine proizvoda</b>	8,80±1,14	9,00±1,05	7,90±1,20	8,50±1,51	8,00±1,41	7,50±2,01	8,00±2,31	7,30±2,26
<b>Boja presjeka</b>	8,50±0,85	9,20±1,03	7,60±1,07	8,30±1,25	7,60±1,17	6,60±1,07	7,70±1,64	6,10±1,45
<b>Izgled presjeka</b>	8,30±0,67	8,80±1,03	7,40±0,84	7,90±1,10	6,90±0,99	7,00±1,05	7,40±1,51	6,10±1,66
<b>Ocjena povezanosti nadjeva</b>	7,90±0,88	8,90±1,29	7,60±1,43	7,50±1,27	7,60±1,65	8,30±0,95	7,60±1,43	6,50±1,35
<b>Ocjena mirisa</b>	8,40±0,84	8,80±1,03	7,70±1,25	7,30±1,06	6,90±1,45	6,20±1,69	6,30±2,11	5,60±1,84
<b>Postojanje neugodnog mirisa</b>	10 NE	10 NE	9 NE i 1 DA	9 NE i 1 DA	9 NE i 1 DA	9 NE i 1 DA	9 NE i 1 DA	8 NE i 2 DA
<b>Opis neugodnog mirisa</b>			Plijesan		Ranketljiv	Metalni	Pomalo ranketljiv	Kiseo Vrenje
<b>Ocjena ukupnog dojma</b>	8,10±0,57	8,90±1,10	7,40±0,70	7,70±1,06	7,00±1,33	6,80±1,14	6,90±1,91	5,80±1,03

Tablica 11. Usporedba srednjih vrijednosti ocjena senzornih svojstava kulena iz kontroliranih i nekontroliranih uvjeta proizvodnje

	Kulen iz nekontroliranih uvjeta proizvodnje (Uzorak 1-9)	Kulen iz kontroliranih uvjeta proizvodnje (Uzorak 10-17)
<b>Izgled ovitka i površine proizvoda</b>	5,77±1,68	7,46±1,71
<b>Boja presjeka</b>	5,08±2,01	7,70±1,00
<b>Izgled presjeka</b>	4,74±1,75	7,48±0,85
<b>Ocjena povezanosti nadjeva</b>	5,14±1,92	7,74±0,69
<b>Ocjena mirisa</b>	5,10±2,39	7,15±1,11
<b>Ocjena ukupnog dojma</b>	4,98±1,98	7,33±0,939

## 5. RASPRAVA

Na osnovu dobivenih rezultata istraživanja 17 različitih uzoraka kulena jasno je vidljivo da način proizvodnje, odnosno razina kontrole uvjeta proizvodnje, znatno utječe na mikrobiološke pokazatelje sigurnosti i kakvoće kulena. Način proizvodnje pokazao se kao vrlo bitan čimbenik u formiranju svojstava kulena i u drugim istraživanjima (VUKOVIĆ i sur., 2004.; VUKOVIĆ i sur., 2012.).

Mikroflora fermentiranih proizvoda je karakteristična za svaki tip tj. vrstu fermentiranog proizvoda. Sastav mikroflore uvjetovan je higijenskom kakvoćom sirovine i dodataka, tehnološkim postupcima proizvodnje te uvjetima koji su prisutni za vrijeme fermentacije takvog proizvoda (FRECE i sur., 2010.). Upravo zbog različitog načina proizvodnje i ostalih parametara odgovornih za sastav mikroflore testirani su uzorci proizvedeni u domaćinstvima i oni koji su proizvedeni na industrijski način (u kontroliranim uvjetima). Kod industrijske proizvodnje u sam proizvodni proces uključeni su visoki sanitarni standardi krenuvši od sirovine do opreme koja se koristi za vrijeme proizvodnje te je uobičajeno korištenje različitih starter kultura. Nasuprot izrazito kontroliranim uvjetima, u tradicionalnom načinu proizvodnje, velik broj faktora pridonosi povećanom broju mikroorganizama kvarenja i/ili patogenih mikroorganizama u finalnom proizvodu. Povećan broj „loših“ mikroorganizama povezan je s velikom varijabilnosti sirovine, higijenom tijekom proizvodnog procesa i uvjetima fermentacije (SKANDAMIS i NYCHAS, 2007.). U našem istraživanju korištene su mikrobiološke podloge za izolaciju bakterija mliječne kiseline te enterokoka koji su uobičajeno prisutni u fermentiranim mesnim proizvodima (HUTKINS, 2006.; LUND i BAIRD - PARKER, 2000.), dok je sigurnost kulena evaluirana detekcijom bakterije *L. monocytogenes* molekularnim putem. Klasičnom mikrobiološkom pretragom utvrđen je prosječno veći broj bakterija mliječne kiseline u uzorcima kulena proizvedenih u kontroliranim uvjetima što je najvjerojatnije posljedica primjene starter kultura u nekim od njih. Poznato je da su bakterije mliječne kiseline odgovorne za fermentaciju ugljikohidrata (šećera) i nastanak mliječne kiseline u nadjevu. Njihovim djelovanjem omogućava se pravilan razvoj senzoričkih svojstava kulena i antimikrobni učinak na druge patogene mikroorganizme. Osim bakterija koje su značajne za sam proces fermentacije, inicijalna mikroflora trajnih fermentiranih kobasica sadrži i patogene mikroorganizme te mikroorganizme koji su odgovorni za kvarenje (LEBERT i sur., 2007.). Broj enterokoka znatno je varirao između pojedinih uzoraka kulena, s prosječno većim brojem u uzorcima iz kontrolirane proizvodnje. Bakterije roda *Enterococcus* pronađene su i u istraživanju koje je provedeno na uzorcima tradicionalnih fermentiranih proizvoda s područja



Srbije (lemeški i srijemski kulen) pri čemu također nije izolirana *Listeria monocytogenes* (VASILEV i sur., 2015.) što se podudara s rezultatima ovog istraživanja. Nalaz patogenih bakterija u uzorcima trajnih kobasica tipa kulena nije uobičajen zbog dugog perioda fermentacije i antimikrobnog učinka bakterija mliječne kiseline. Tijekom fermentacije koja traje otprilike 90 dana postepeno se smanjuje broj patogenih mikroorganizama. Smanjenje njihovog broja posljedica je acidifikacije nadjeva i smanjenja aktiviteta vode tijekom fermentacije. Zbog izraženog antimikrobnog učinka trajne tj. fermentirane kobasice smatraju se mikrobiološki stabilnim i sigurnim proizvodima koji su rijetko uzrok pojava trovanja hranom (KAROLY, 2011.). U prilog pozitivnom antimikrobnom učinku koji se odvija za vrijeme fermentacije ide i istraživanje provedeno na fermentiranim kobasicama koje su proizvedene u domaćinstvu. Rezultati tog istraživanja jasno pokazuju prisustvo brojnih mikroorganizama na samom početku proizvodnje (enterokoki, enterobakterije, kvasci, mikrokoki, stafilokoka, bakterije mliječne kiseline). Njihov broj se dodatno povećavao nakon usitnjavanja sirovine, dodavanja začina i nadijevanja smjese. Na kraju fermentacije, odnosno nakon očitovanja antimikrobnog učinka, gotovi proizvod je bio higijenski ispravan (ZDOLEC i sur., 2007.). Od patogenih mikroorganizama najčešće su prisutne *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* i *Campylobacter* (MAKSIMOVIĆ i sur., 2015.), no može se javiti i *Listeria monocytogenes* s tim da ona ima nešto veću stopu preživljavanja u ovakvim uvjetima, no najčešće nestaje nakon trećeg tjedna proizvodnog procesa trajnih fermentiranih proizvoda (TYÖPPÖNEN i sur., 2003.). Odsustvo *L. monocytogenes* kao predstavnika patogenih bakterija u ovom istraživanju samo je u konačnici potvrdilo brojna druga istraživanja. U istraživanju autohtone mikrobne populacije u slavonskom kulenu izolirane su bakterije mliječne kiseline, stafilokoki i kvasci, ali ne i patogeni mikroorganizmi (FRECE i sur., 2010.). MASTANJEVIĆ i sur. (2017.) također potvrđuju rezultate našeg istraživanja gdje je u pet uzoraka slavonskog kulena detektiran podjednak broj bakterija mliječne kiseline kao i u ovom istraživanju, a *L. monocytogenes* nije izolirana. Također, i u drugim fermentiranim mesnim proizvodima *L. monocytogenes* nije čest nalaz, poput područja Francuske (LEBERT i sur., 2007.).

Identifikacija dominantne mikroflore u kulenu bitna je za prosudbu utjecaja mikrobnih vrsta na kakvoću proizvoda. MALDI-TOF masena spektrometrija uspješno se primjenjuje u svrhu identifikacije bakterija koje u izolirane iz kliničkih materijala, ali i iz hrane. U svrhu ispitivanja raznolikosti mikroflore kulena proizvedenog u kontroliranim i nekontroliranim uvjetima prikupljeno je ukupno 20 izolata iz obje skupine uzoraka od čega je uspješno identificirano njih 17 (85 %), odnosno 10 izolata iz skupine uzoraka koji su proizvedeni u

nekontroliranim uvjetima i 7 izolata iz skupine uzoraka koji su proizvedeni u kontroliranim uvjetima. Od ukupnog broja determiniranih izolata (n=17), 5 izolata (29 %) je identificirano kao *Staphylococcus epidermis*, 3 izolata (18 %) kao *Staphylococcus hominis*, 2 izolata (11 %) kao *Pediococcus pentosaceus* te po 1 izolat (6 %) kao *Staphylococcus warneri* / *Streptococcus vestibularis* / *Lactobacillus curvatus* / *Leuconostoc carnosum* / *Micrococcus luteus* / *Lactobacillus sakei* / *Streptococcus salivatus*. Neki od izolata koji su identificirani u ovom istraživanju, identificirani su pomoću MALDI TOF MS metode i u istraživanju mikroflore i parametara kvalitete srijemskog kulena proizvedenog u tradicionalnim i industrijskim uvjetima. U tom istraživanju identificiran je najčešće *Lactobacillus sakei* (76,11 %) i *Lactobacillus curvatus* (2,78 %) (SUVAJDŽIĆ, 2019.). U istraživanju MASTANJEVIĆ i sur., (2017.) također su identificirani *Lactobacillus sakei* te *Staphylococcus warneri* u slavonskom kulenu. Uz bakterije mliječne kiseline i bakterije roda *Micrococcus* u nadjevu kulena nalaze se još i bakterije iz roda *Staphylococcus* (BONOMO i sur., 2008). Koagulaza-negativni koki imaju glavnu ulogu u razvoju arome, okusa i boje fermentiranih mesnih proizvoda (KOVAČEVIĆ i sur., 2009.). Promatrajući podrijetlo pojedinih izolata u našem istraživanju, uočava se da su u uzorcima industrijskih kulena izolirane i determinirane vrste bakterija mliječne kiseline poput *Pediococcus pentosaceus* (često u sastavu starter kultura), dok su dominantni izolati (koki i kokobacili) iz nekontrolirane proizvodnje bili stafilocoki, mikrokoki i streptokoki. S obzirom na uočene greške u organoleptičkim svojstvima kulena iz nekontrolirane proizvodnje, može se pretpostaviti da je navedena mikroflora potisnula bakterije mliječne kiseline (nisu determinirane).

U pogledu antimikrobne rezistencije uočava se da izolati iz skupine uzoraka kulena iz nekontroliranih uvjeta pokazuju izraženije svojstvo rezistencije nego kuleni koji u proizvedeni u kontroliranim uvjetima. Kuleni iz prve skupine („Uzorak 1-9“) pokazuju rezistenciju na linezolid, kanamicin i nitrofurantoin za razliku od druge skupine uzoraka („Uzorak 10-17“) koji su na te antimikrobne tvari osjetljivi. Obje skupine uzoraka kulena, odnosno njihovih izolata, pokazuje osjetljivost na penicilin, ampicilin i eritromicin. Iako se antimikrobna rezistencija pomno prati kod patogenih bakterija, odnosno klinički značajnih bakterija, važna nam je i kod bakterija komenzala kao što su bakterije mliječne kiseline. Upravo te bakterije imaju sposobnost prenošenja rezistentnih gena na patogene vrste bakterija (NOUT, 2005.; MATHUR i SINGH, 2005.). AMMOR i sur. (2007.) također nalaze rezistentne sojeve u populaciji stafilocoka, mikrokoka i bakterija mliječne kiseline u trajnim kobasicama. Bakterije mliječne kiseline su uglavnom izrazito osjetljive na antimikrobne tvari koje inhibiraju sintezu proteina

(tetraciklin, kloramfenikol, eritromicin, klindamicin), a otporne na aminoglikozide (steptomycin, kanamicin). U ovom istraživanju se to se pokazalo samo djelomično točno. Bakterije mliječne kiseline pokazale su osjetljivost na sve gore navedene antimikrobne tvari, uključujući aminoglikozide i inhibitore sinteze proteina, baš kao i u istraživanju koje su proveli ZDOLEC i sur. (2011.). DANIELSEN i WIND (2003.) izoliraju bakterije mliječne kiseline rezistentne prema pet antimikrobnih tvari (kanamicinu, teicoplaninu, streptomycinu, trimetoprimu, nitrofuratoinu) što je suprotno našim rezultatima. Napominjemo da su naši izolati potjecali iz industrijskih kulena, što ide u prilog sigurnosti proizvoda s obzirom na izostanak rezistencije. Nadalje, većina pripadnika roda *Leuconostoc* osjetljiva je na eritromicin, tetraciklin, kloramfenikol i klindamicin (SWENSON i sur., 1990.). U ovom istraživanju pripadnici roda *Leuconostoc* su zaista bili osjetljivi na eritromicin, klindamicin i kloramfenikol dok je izolat *Leuconostoc carnosum* (11b) pokazao rezistentnost prema tetraciklinu.

U ovom istraživanju izolati stafilokoka bili su osjetljivi na linezolid, ceftazidin, trimetoprim, kloramfenikol, nitrofurantoin i ceftotaksim. Rezistencija na teicoplanin uočena je samo kod *Staphylococcus epidermidis* (8a), dok je rezistencija na tetraciklin uočena kod *Streptococcus hominis* (5a, 5b). Rezistencija na ciprofloksacin uočena je na tri izolata (2b, 5b i 9b). Ostali izolati su različito rezistentni/osjetljivi na pojedine antibiotike s tim da je svakako više izolata koji su osjetljivi nego rezistentni. Ovakav nalaz ide u prilog istraživanju provedenom na slavonskom kulenu 2013. godine u kojem su izolati iz roda *Staphylococcus* većinom pokazivali svojstvo osjetljivosti na antimikrobne tvari (BABIĆ i sur., 2011.). Ako govorimo o rezistenciji istog roda bakterija, ona se najčešće javlja na penicilin, ampicilin, eritromicin i tetraciklin (MARTIN i sur., 2006.). Naše istraživanje u određenoj mjeri potvrđuje ove rezultate. Ukupno je osjetljivo na penicilin 7 izolata (77 %), na ampicilin 4 izolata (44 %), na eritromicin 8 izolata (88 %) te na tetraciklin 2 izolata (28 %). Istraživanje provedeno na kobasicama načinjenim od divlje svinje također potvrđuje to da su stafilokoki najčešće otporni na eritromicin, tetraciklin i ampicilin (ZDOLEC i sur., 2012.) kao i neka dodatna istraživanja mikroflore fermentiranih kobasica (MARTIN i sur., 2006.). Vrsta unutar ovog roda, *Staphylococcus epidermidis*, u spontano fermentiranim kobasicama pokazuje visok stupanj rezistencije na tetraciklin i eritromicin (ZDOLEC i sur., 2013.). Djelomično se podudaraju rezultati tog istraživanja s ovim rezultatima gdje je prisutan visok stupanj rezistencije za eritromicin, međutim nije uočena rezistencija *Staphylococcus epidermis* na tetraciklin. MARTIN i sur. (2006.) zabilježili su rezistenciju *S. warneri* na ampicilin i eritromicin što nije bio slučaj u našem istraživanju.

Pri ocjenjivanju i usporedbi rezultata svojstava kulena u ovom istraživanju najveća razlika između dvije testne skupine uzoraka bila je vidljiva prilikom organoleptičke pretrage. Kulen visoke organoleptičke kakvoće mora biti pravilno nadjeven, blago smeđe i podimljene površine. Palpatorno mora biti čvrste strukture, ali ne pretvrde. Mora se moći dobro rezati. Miris mora biti ugodan tj. miris fermentiranog svinjskog mesa sa svim dodanim začinima uz blago naglašenu aromu dima. Na presjeku mora biti dobro povezan, skladan i karakterističnog izgleda mozaika (pravilno raspoređeni dijelovi masnog tkiva i mišića). Usitnjeno meso treba niti crvene boje različitog intenziteta, a masno tkivo bijele do narančaste boje. Okus (nije ocjenjivan) bi trebao biti dugotrajan i odgovarati proizvodu tj. okus fermentirane začinjene svinjetine (KAROLY i sur., 2008). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je prosječna ocjena za svaki ispitivani parametar znatno viša kod kulena koji su proizvedeni u kontroliranim uvjetima. Posebna razlika u ocjeni vidljiva je za parametre: boja presjeka, izgled presjeka te za ukupni dojam kulena. Iz prikazanih rezultata velika varijabilnost u ocjenama vidljiva je kod ocjena mirisa kulena proizvedenog u nekontroliranim uvjetima te kod izgleda ovitka i površine proizvoda kulena proizvedenog u nekontroliranim uvjetima. Visoka varijabilnost pri organoleptičkoj ocjeni mirisa javlja se i drugim istraživanjima tradicionalnih fermentiranih proizvoda kao što je i u istraživanju tradicionalne grčke kobasice (AMBROSIADIS i sur., 2004.). Najmanje su varirale ocjene povezanosti nadjeva, ocjene ukupnog dojma i izgleda presjeka kod kulena koji je proizveden u kontroliranim uvjetima, kao i u radu SAMAC i sur. (2015.).

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu svih provedenih istraživanja na kulenima koji su proizvedeni u nekontroliranim uvjetima i kontroliranim uvjetima, mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. Postojanje dva načina proizvodnje jednog proizvoda za sobom povlači i različite uvjete koji su omogućeni za vrijeme proizvodnog procesa. Ovisno o tim uvjetima stvara se gotov proizvod, u ovom slučaju kulen, koji u konačnici sadrži različite mikrobiološke pokazatelje sigurnosti i kakvoće.
2. Populacija bakterija mliječne kiseline i enterokoka brojnija je u uzorcima kulena proizvedenih u kontroliranim uvjetima. Determinirane su vrste *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* koje su općenito dominantne vrste u sastavu starter kultura u proizvodnji trajnih kobasica.
3. U uzorcima kulena iz nekontroliranih uvjeta proizvodnje dominantna populacija bakterija mliječne kiseline nije izolirana, već su determinirane vrste *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri* i *Streptococcus vestibularis*.
4. Testom osjetljivosti izolata na antimikrobne tvari utvrđeno je da se rezistencija mikroorganizama češće javlja kod izolata koji su podrijetlom od kulena proizvedenih na tradicionalan način, nego kod onih kulena koji su proizvedeni industrijski. Najčešće se javlja rezistencija na penicilin, ampicilin i eritromicin. Izolirane bakterije su najosjetljivije na trimetoprim, kloramfenikol, streptomycin i klindamicin.
5. Organoleptičkom ocjenom prikupljenih uzoraka bolje je ocjenjen kulen koji je proizveden u kontroliranim uvjetima. Ovakav generalni zaključak odnosi se samo na ovo istraživanje, odnosno uvjetovan je greškama pojedinih individualnih proizvođača. Ovo istraživanje potvrđuje potrebu za njihovom boljom edukacijom i primjenom znanja u praksi što se može postići udruživanjem i zaštitom proizvoda.

## 7. LITERATURA

1. AMBROSIADIS, J., N. SOULTROS, A. ABRAHIM, J.G. BLOUKAS (2004.): Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Sci.* 66, 279-287.
2. AMMOR, M. S., A. B. FLOREZ, B. MAYO (2007.): Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24, 559-570.
3. ANDRES, C. (1977.): Starter culture for sausage has two microorganisms for better performance. *Food Protect.* 38, 132-133.
4. BABIĆ, I., K. MARKOV, D. KOVAČEVIĆ, A. TRONTEL, A. SLAVICA, J. ĐUGUM, D. ČVEK, I.K. SVETEC, S. POSAVEC, J. FRECE (2011.): Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian 'brand' product 'Slavonski kulen'. *Meat Sci.* 88, 517-524.
5. BENČEVIĆ, K., A. PETRIČEVIĆ (1999.): Slavonski domaći kulen i kobasice, Hrvatski farmer, Zagreb.
6. BENČEVIĆ, K., J. ČAKALIĆ (2001.): Proizvodnja i kakvoća slavonskih i drugih hrvatskih autohtonih, tradicionalnih, domaćih mesnih proizvoda – nekad i danas, Hrvatski farmer, Zagreb.
7. BONOMO, M.G., A. RICCIARDI, T. ZOTTA, E. PARENTE, G. SALZANO (2008.): Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Sci.* 80, 1238-1248.
8. DANIELSEN, M., A. WIND (2003.): Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1 - 11.
9. DUKIĆ, M. (2009.): Utjecaj liofilizacije i mikroinkapsulacije na funkcionalnost probiotičkih bakterija kao živih lijekova. Zagreb, Hrvatska; Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, znanstveni rad.
10. FRECE, J., K. MARKOV, D. KOVAČEVIĆ (2010.): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso XII*, 92-97.
11. GARCIA-VARONA, M., E.M. SANTOS, I. JAIME, J. ROVIRA (2000.): Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 189-195.

12. HADŽIOSMANOVIĆ, M., J. GASPARIK-REICHARDT, M. SMAJLOVIĆ, S. VESKOVIĆ-MORAČANIN, N. ZDOLEC (2005.): Possible use of bacteriocins and starter cultures in upgrading of quality and safety of traditionally fermented sausages. *Tehnologija mesa* 46, 194- 211.
13. HAMMES, W.P., C. HERTEL (1998.): New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49, 125-138.
14. HOSPITAL, X.F., J. CARBALLO, M. FERNANDEZ, J. ARNAU, M. GRATACOS, E. HIERRO (2015.): Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. *Food Control.* 57, 75-81.
15. HUTKINS, R. W. (2006.): Meat fermentation. *Microbiology and technology of fermented foods.* (Hutkins, R. W. Ur.), str. 207-232.
16. JOKSIMOVIĆ, J., Z. JOKSIMOVIĆ (1990.): Prerada mesa u domaćinstvu, Nolit, Beograd.
17. KAMILOGLU, A., G. KABAN, M. KAYA (2016.): Contribution of Catalase Positive Cocci on Flavour Formation in Fermented Sausages. *British J. Appl. Sci. Technol.* 17, 1-8.
18. KAROLYI, D. (2011.): Fizikalno-kemijska, higijenska i organoleptička karakterizacija slavonskog kulena. *Meso XIII*, 423-429.
19. KAROLYI, D., D. KOVAČIĆ (2008.): Organoleptička ocjena slavonskog domaćeg kulena od crne slavonske i bijelih svinja. *Meso X*, 356-360.
20. KOLUMAN, A., L. S. AKAN, F. P. ÇAKIROGLU (2009.): Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control* 20, 281-283.
21. KOVAČEVIĆ, D., K. SUMAN, D. ŠUBARIĆ, K. MASTANJEVIĆ, S. VIDAČEK (2009.): Investigation of homogeneity and physicochemical characterisation of the Homemade Slavonian Sausage. *Meso* 11, 338-344.
22. KOZAČINSKI, L., E. DROSINOS, F. ČAKLOVICA, L. COCOLIN, J. GASPARIK – REICHARDT, S. VESKOVIĆ (2008.): Investigation of Microbial Association of Traditionally Fermented Sausages. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 93-106.
23. KOZAČINSKI, L., N. ZDOLEC, M. HADŽIOSMANOVIĆ, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ, T. MAJIĆ (2006.): Microbial flora of the Croatian fermented sausage. *Arch. Lebensmittelhyg.* 57, 141-147.
24. LEBERT, I., S. LEROY, P. GIAMMARINARO, A. LEBERT, J. P. CHACORNAC, S. BOVER – CID, M. C. VIDAL – CAROU, R. TALON (2007.): Diversity of

- microorganisms in environments and dry fermented sausages of French traditional small units. *Meat Sci.* 76, 112 -122.
25. LUND, B., T. BAIRD–PARKER (2000.) *Microbiological Safety and Quality of Food. Microbial ecology of different types of food.* Springer Science & Business Media, 223-234.
  26. MAKSIMOVIĆ, Ž., N. HULAK, M. VUKO, V. KOVAČEVIĆ, I. KOS, M. MRKONJIĆ FUKA (2015.): Bakterije mliječne kiseline u proizvodnji tradicionalnih trajnih kobasica. *Meso XVII*, 545-550.
  27. MARTIN, A., B. COLIN, E. ARANDA, M. J. BENITO, M. G. CORDOBA (2007.): Characterization of *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Sci.* 75, 696-708.
  28. MARTIN, B., M. GARRIGA, M. HUGAS, S. BOVER-CID, M.T. VECIANA-NOGUES, T. AYMERICH (2006.): Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages, *Int. J. Food Microbiol.* 107, 148–158.
  29. MASTANJEVIĆ, K., D. KOVAČEVIĆ, J. FRECE, K. MARKOV, J. PLEADIN (2017.): The Effect of Autochthonous Starter Culture, Sugars and Temperature on the Fermentation of Slavonian Kulen. *Food Technol. Biotechnol.* 55, 67-76.
  30. MATHUR, S., R. SINGH (2005.): Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281-295.
  31. MONTEL, M.C., J. REITZ, R. TALON, J.L. BERDAGUE, S. ROUSSET-AKRIM S. (1996.): Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiol.* 13, 489–499.
  32. NEŽAK, J., N. ZDOLEC, S. VIDAČEK, N. MARUŠIĆ, H. MEDIĆ (2011.): Primjena starter kultura *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus* u proizvodnji kulena. *Meso XIII*, 89-95.
  33. NOUT, R. (2005.): Food fermentation: an introduction. *Food fermentation*, 13-18.
  34. OGIER, J.C., E. CASALTY, C. FARROKH, A. SAIHI (2008.): Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 286-290.
  35. PAPAMANOLI, E., N. TZANETAKIS, E. LITOPULOU–TZANETAKI, P. KOTZEKIDOU (2003): Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry – fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 2, 859-867.



36. ROSS, R. P., S. MORGAN, C. HILL (2002.): Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3-16.
37. SAMAC, D., Đ. SENČIĆ, Z. ANTUNOVIĆ, Z. STEINER, J. NOVOSELEC, I. KLARIĆ, E. BUGARIĆ (2015.): Utjecaj završne tjelesne mase crnih slavonskih svinja na fizikalno-kemijska svojstva i senzorna svojstva kulena. *Krmiva* 57, 17-22.
38. SIMONOVA, M., V. STROMPFOVA, M. MARCINAKOVA, A. LAUKOVA, S. VESTERLUND, M.L. MORATALLA, S. BOVER-CID, C. VIDAL-CAROU (2006.): Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Sci.* 73, 559-564.
39. SKANDAMIS, P., G-J.E. NYCHAS (2007.): Pathogens: risk and control. Handbook of fermented meat and poultry. Blackwell Publishing, 427-454.
40. SUVAJDŽIĆ, B. (2019.): Ispitivanje mikroflore i parametara kvaliteta sremskog kulena proizvedenog u industrijskim i tradicionalnim uslovima. Beograd, Srbija: Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, doktorska disertacija.
41. SWENSON, J. M., R. R. FACKLAM, C. THORNSBERRY (1990.): Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 543-549.
42. ŠUŠKOVIĆ, J. (2008.): Starter kulture – temelj fermentirane i funkcionalne hrane, predavanja iz kolegija „Probiotici, prebiotici i starter kulture“. Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
43. TALON, R., S. LEROY, I. LEBERT (2007.): Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Sci.* 77, 55–62.
44. TEODOROVIĆ, V., M. DIMITRIJEVIĆ, N. KARABASIL, D. VASILEV (2015.): Higijena i tehnologija mesa. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
45. TYÖPPÖNEN, S., A. MARKKULA, E. PETÄJÄ, M. L. SUIHKO, T. MATTILA - SANDHOLM (2003.): Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control* 14, 181- 185.
46. VASILEV, O, D. ALEKSIĆ, B. TARBUK, A. DIMITRIJEVIĆ, M. KARABASIL, N. COBANOVIC, N. VASILJEVIĆ (2015.): Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages Sremski and Lemeski kulen. *Procedia Food Science*, 5, 300-303.
47. VUKOVIĆ, I., D. VASILEV, S. SAIČIĆ, O. BUNČIĆ (2004.): Mikroflora i fizičko-hemijski pokazatelji kvaliteta kulena. *Tehnologija mesa* 45, 3–4, 104–107.

48. VUKOVIĆ, I., D. VASILEV, S. SAIČIĆ, S. IVANKOVIĆ (2012.): Investigation of major changes during ripening of traditional fermented sausage Lemeski kulen. *Meat Technology*, 53(2), 140-147.
49. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, I. FILIPOVIĆ (2005.): Utjecaj bakteriocina na mikrobiološku kakvoću fermentiranih kobasica. *Meso VII*, 43-47.
50. ZDOLEC, N. (2007.): utjecaj zaštitnih kultura i bakteriocina na sigurnost i kakvoću fermentiranih kobasica. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, doktorska disertacija.
51. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ, K. LESKOVAR, N. VRAGOVIĆ, D. BUDIMIR (2007.): Fermentirane kobasice proizvedene u domaćinstvu - mikrobiološka kakvoća. *Meso IX*, 318-324.
52. ZDOLEC, N., I. FILIPOVIĆ, Ž. CVRTILA FLECK, A. MARIĆ, D. JANKULOSKI, L. KOZAČINSKI, B. NJARI (2011.): Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese. *Vet. arhiv* 81, 133-141.
53. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. FILIPOVIĆ, D. MARCINCAKOVA (2012.): Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from spontaneously fermented wild boar sausages, Proceedings of Lectures and Posters, *Hygiene Alimentorum XXXIII*, Strbske Pleso, Slovakia, 283–287.
54. ZDOLEC, N., I. RAČIĆ, A. VUJNOVIĆ, M. ZDELAR-TUK, K. MATANOVIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. DOBRANIĆ, Ž. CVETNIĆ, S. ŠPIČIĆ (2013): Antimicrobial Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Spontaneously Fermented Sausages. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 240–246.
55. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, A. HORVATIĆ, S. VUČINIĆ (2013.): Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages. *Int. Food Res. J.* 20, 1-6.

## 8. SAŽETAK

Cilj ovog rada bila je odrediti mikrobiološke pokazatelje sigurnosti i kakvoće kulena proizvedenih u nekontroliranim (n=9) i kontroliranim uvjetima (n=8). Određivan je broj bakterija mliječne kiseline i enterokoka kulturelnim metodama te prisutnost bakterije *Listeria monocytogenes* molekularnim postupkom (LAMP, Molecular Detection System), ispitana osjetljivost izolata na antibiotike, te izvršeno organoleptičko ocjenjivanje proizvoda. Populacija bakterija mliječne kiseline i enterokoka brojnija je u uzorcima kulena proizvedenih u kontroliranim uvjetima. Primjenom MALDI-TOF masene spektrometrije determinirane su vrste *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus* koje su općenito dominantne vrste u sastavu starter kultura u proizvodnji trajnih kobasica. U uzorcima kulena iz nekontroliranih uvjeta proizvodnje dominantna populacija bakterija mliječne kiseline nije izolirana, već su determinirane samo vrste *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri* i *Streptococcus vestibularis*. Sojevi bakterija mliječne kiseline bili su otporni na antibiotike, dok su sojevi stafilokoka najučestalije bili otporni na eritromicin, penicilin, ampicilin i kanamicin. *L. monocytogenes* nije determinirana ni u jednom uzorku kulena. Razlike u sastavu dominantne mikroflore moguće su razlog uočenih grešaka i znakova kvarenja u uzorcima kulena iz nekontrolirane proizvodnje. Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu unaprjeđenja tradicionalne proizvodnje u smislu higijensko-tehnoloških normi kako bi se održala autohtona svojstva ovog proizvoda.

Ključne riječi: kulen, tradicionalna proizvodnja, industrijska proizvodnja, mikroflora, kvaliteta

## 9. SUMMARY

### MICROBIOLOGICAL INDICATORS OF SAFETY AND QUALITY OF DRY FERMENTED SAUSAGE *KULEN* PRODUCED UNDER CONTROLLED AND UNCONTROLLED CONDITIONS

The aim of this study was to determine microbiological indicators of safety and quality of kulen produced in uncontrolled (n = 9) and controlled conditions (n = 8). The number of lactic acid and enterococci was determined by culture methods and the presence of *Listeria monocytogenes* by molecular tools (LAMP, Molecular Detection System), antimicrobial susceptibility of isolates was tested and finally sensory analysis of products was performed. The population of lactic acid bacteria and enterococci was higher in kulen samples produced under controlled conditions. Using MALDI-TOF mass spectrometry, the species of *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* were determined, which generally are the dominant species in the composition of starter cultures in the production of fermented sausages. In kulen samples made in uncontrolled production conditions, the dominant population of lactic acid bacteria was not isolated, but only the species *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri* and *Streptococcus vestibularis* were confirmed. Lactic acid bacteria were susceptible to all antibiotics, while staphylococcal strains were most frequently resistant to erythromycin, penicillin, ampicillin, and kanamycin. *L. monocytogenes* was not determined in any of the kulen samples. Differences in the composition of the dominant microflora may be the reason of product failures and spoilage appearance of kulen from uncontrolled production. The obtained results indicate the need for improvement of traditional production in terms of hygienic and technological standards in order to maintain the indigenous properties of this autochthonous product.

Key words: kulen, traditional production, industrial production, microflora, quality

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 8. svibnja 1995. godine u Osijeku, gdje sam pohađala osnovnu školu i III. gimnaziju koju sam završila 2014. godine. Iste godine upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.