# BIORAZNOLIKOST MIKROBIOTE HRVATSKIH AUTOHTONIH MESNIH PROIZVODA

**Šarić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:811267

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-24**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Petra Šarić

# BIORAZNOLIKOST MIKROBIOTE HRVATSKIH AUTOHTONIH MESNIH PROIZVODA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

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. Lidija Kozačinski

2. prof. dr. sc. Vesna Dobranić

3. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

4. dr. sc. Tomislav Mikuš (zamjena)

*ZAHVALA*

*Zahvaljujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Neviju Zdolecu koji mi je svojim znanjem, savjetima, podrškom i izrazitom pristupačnošću uvelike pomogao u izradi diplomskog rada. Također, želim se zahvaliti svim djelatnicima „Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane“ koji su tijekom studija uvijek bili susretljivi i spremni pomoći kada god je bilo potrebno.*

*Nadalje, zahvaljujem svim kolegama i djelatnicima Veterinarskog fakulteta koji su mi uljepšali studentske dane.*

*Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima, sestrama i dečku Nevenu, koji su me uvijek beskrajno podržavali jer bez njih ništa od ovoga ne bi bilo moguće.*

**POPIS PRILOGA**

**Popis slika:**

Slika 1. Shema procesa proizvodnje fermentiranih kobasica

Slika 2. Karakteristike najčešće korištenih kvasaca i plijesni u obliku starter kultura za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda

**Popis tablica:**

Tablica 1. Najčešće starter kulture za fermentirane mesne proizvode

Tablica 2. Kriteriji za odabiranje bakterija mliječne kiseline i koagulaza-negativnih stafilokoka kao starter kultura za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda

SADRŽAJ

1. UVOD ..... 1

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA ..... 3

2.1. Raznolikost mikrobiote u fermentiranim mesnim proizvodima ..... 3

2.2. Starter kulture ..... 5

2.2.1. Starter kulture u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda ..... 5

2.2.2. Važnost i uloga mikroorganizama u starter kulturama ..... 7

2.3. Odabrani mikroorganizmi ..... 10

2.3.1. Bakterije mliječne kiseline ..... 10

2.3.2. Stafilokoki ..... 12

2.3.3. Kvasci i plijesni ..... 15

3. RASPRAVA ..... 18

4. ZAKLJUČAK ..... 21

5. LITERATURA ..... 22

6. SAŽETAK ..... 27

7. SUMMARY ..... 28

8. ŽIVOTOPIS ..... 29

# 1. UVOD

Fermentirani mesni proizvodi svrstavaju se u sam vrh mesnih proizvoda po cijenjenosti. Oni obuhvaćaju i autohtone mesne proizvode koji se proizvode tradicionalnim metodama ali i one koji se proizvode na industrijski način. Autohtoni mesni proizvodi su zapravo izvorni proizvodi neke zemlje, kraja, regije ili podneblja. Za poželjne i tipične karakteristike navedenih proizvoda barem su jednim dijelom zaslužni mikroorganizmi, koji u konačnici čine mikrobiotu. Mikrobiotu možemo definirati kao mikroorganizme koji su u suživotu u fermentiranim mesnim proizvodima što osigurava mikrobnu bioraznolikost.

Općenito, mikroorganizmi su s jedne strane mogući čimbenici kvarenja mesa, pojedine skupine i specifične vrste svojim metabolizmom pridonose zrenju mesa, te konačnoj boji, okusu i mirisu mesa i mesnih prerađevina (KEGALJ i sur., 2012.). Shvaćanje važnosti mikrobiote u proizvodnji fermentiranih proizvoda dovelo je do razvoja starter kultura kao i njihove primjene u proizvodnji fermentirane hrane (FRECE i MARKOV, 2016.). Mikroorganizmi iz starter kultura djeluju na način da poboljšavaju higijensku ispravnost i kvalitetu proizvoda, a svojim djelovanjem pružaju i bolju trajnost.

Proizvodnja fermentiranih mesnih proizvoda tradicionalnim metodama većinom stavlja naglasak na prirodno prisutnu mikrobiotu. No, prije otprilike 60-ak godina javlja se komercijalna upotreba starter kultura, a samim time i njihova aktivnija upotreba u mesnoj industriji. Starter kulture podrazumijevaju pripravke koji su proizvedeni od živih mikroorganizama, a dodaju se namirnici u svrhu fermentacije. S druge strane, funkcionalne starter kulture posjeduju i korisne karakteristike tj. barem jednu, čija je svrha bolja kvaliteta proizvoda, ali i povoljan utjecaj na zdravlje krajnjeg potrošača.

Različite regije svijeta prepoznatljive su po tipičnim fermentiranim mesnim proizvodima, koje pored tehnoloških specifičnosti i prepoznatljivih senzorskih svojstava karakterizira i dominacija određenih vrsta mikroorganizama u nadjevu (ZDOLEC i sur., 2007.a; FRECE i sur., 2010.a). Na području Hrvatske, fermentirani mesni proizvodi čitav niz godina proizvode se tradicionalnim metodama bez korištenja komercijalnih starter kultura što posljedično rezultira razlikama u kvaliteti, konzistenciji te samom okusu navedenih proizvoda. S obzirom da komercijalne starter kulture nisu uvijek konkurentne autohtonoj mikrobioti u pogledu postizanja

željenih senzornih svojstava, sve veća je potreba za odabirom autohtonih starter kultura iz tradicionalno proizvedenih mesnih proizvoda. Takve mikrobne kulture bi trebale biti prilagođene uvjetima u specifičnim mesnim proizvodima kako bi mogle rasti te pokazati značajan utjecaj na senzorna svojstva, kvalitetu i druge karakteristike proizvoda.

Vezano uz sve navedeno, cilj ovog diplomskog rada je prikazati raznolikost, ulogu te važnost mikrobiote kako u autohtonim, tako i mnogim drugim fermentiranim mesnim proizvodima s naglaskom na starter kulture kao izvor korisnih mikroorganizama.

# 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

## 2.1. Raznolikost mikrobiote u fermentiranim mesnim proizvodima

Meso je prema svom kemijskom sastavu izuzetno dobar medij za mikroorganizme jer podržava njihov rast i razmnožavanje. Postoji primarna mikrobiota čiji su izvor životinje od kojih meso potječe, zatim osoblje koje rukuje mesom te na kraju okruženje u kojemu se provodi proizvodni proces. U navedenoj mikrobioti nalazimo gram-negativne bakterije poput *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., a od gram-pozitivnih primjerice laktobacile i enterokoke. Kada je riječ primjerice o šunki, prirodna mikrobiota sastoji se od određenih vrsta bakterija mliječne kiseline, poput *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus curvatus* i *Pediococcus pentosaceus* (MEDIĆ, 2016.).

Vrijeme zrenja fermentiranih mesnih proizvoda je vrlo važan čimbenik koji utječe na to koji će mikroorganizmi prevladavati. Laktobacili najčešće prevladavaju u proizvodima s kraćim vremenom zrenja. Također, u takvim proizvodima dominira kiseli okus, što je posebice izraženo u slučaju zrenja kraćeg od četrnaest dana. S druge strane, ako zrenje traje duže, nalaziti će se veća populacija koagulaza-negativnih stafilokoka. Prema istraživanju GARCÍE i sur. (1995.) u nadjevu fermentiranih kobasica ustanovljeno je da mikroorganizmi koji prevladavaju potječu iz porodice *Micrococcaceae*, a prevladavajući rod iz navedene porodice bio je *Staphylococcus*.

Kada govorimo o tradicionalnim mesnim proizvodima, autohtona mikrobiota tih proizvoda je ključan čimbenik razvoja karakterističnih senzornih osobina tijekom spontane fermentacije. Mikroorganizmi koji čine takvu mikrobiotu poželjni su kada imaju optimalne tehnološke osobine jer se teži odabiru takvih sojeva kako bi se primjenjivali i u kontroliranoj proizvodnji. Spontana fermentacija može rezultirati i potencijalno rizičnim proizvodom, u smislu nalaza bakterija otpornih na antibiotike, biogenih amina, enterotoksina, pa i patogenih bakterija (ZDOLEC, 2016.). Navedene činjenice ukazuju da postoji potreba za primjenom „dobrih“ autohtonih sojeva mikroorganizama kao što su laktobacili i stafilokoki. Oni svojim kompetitivnim djelovanjem mogu pružiti bolju sigurnost mesnih proizvoda inhibicijom rasta patogenih i rezistentnih bakterija koje loše utječu na zdravlje potrošača.

Različiti autori istraživali su mikrobiotu u tradicionalnih fermentiranih mesnih proizvoda te utvrdili prisutstvo bakterija mliječne kiseline, stafilokoka i kvasaca, ali nisu izolirali patogene

mikroorganizme (COMI i sur., 2005.; URSO i sur., 2006.; SIMONOVA i sur., 2006.). Među različitim rodovima koji pripadaju skupini bakterija mliječne kiseline, oni koji se često nalaze u fermentiranim mesnim proizvodima su *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc* (FRAQUEZA i sur., 2016.).

Rezultati dosadašnjih istraživanja autohtone mikrobne populacije tradicionalnih hrvatskih fermentiranih kobasica pokazali su da hrvatski tradicionalni mesni proizvodi imaju drugačiji sastav autohtone mikrobne populacije od ostalih europskih tradicionalnih fermentiranih kobasica što se može objasniti drugačijom klimom, regijom, tehnologijom proizvodnje, drugačijim začinima (ZDOLEC i sur., 2013.; FRECE i MARKOV, 2016.).

## 2.2. Starter kulture

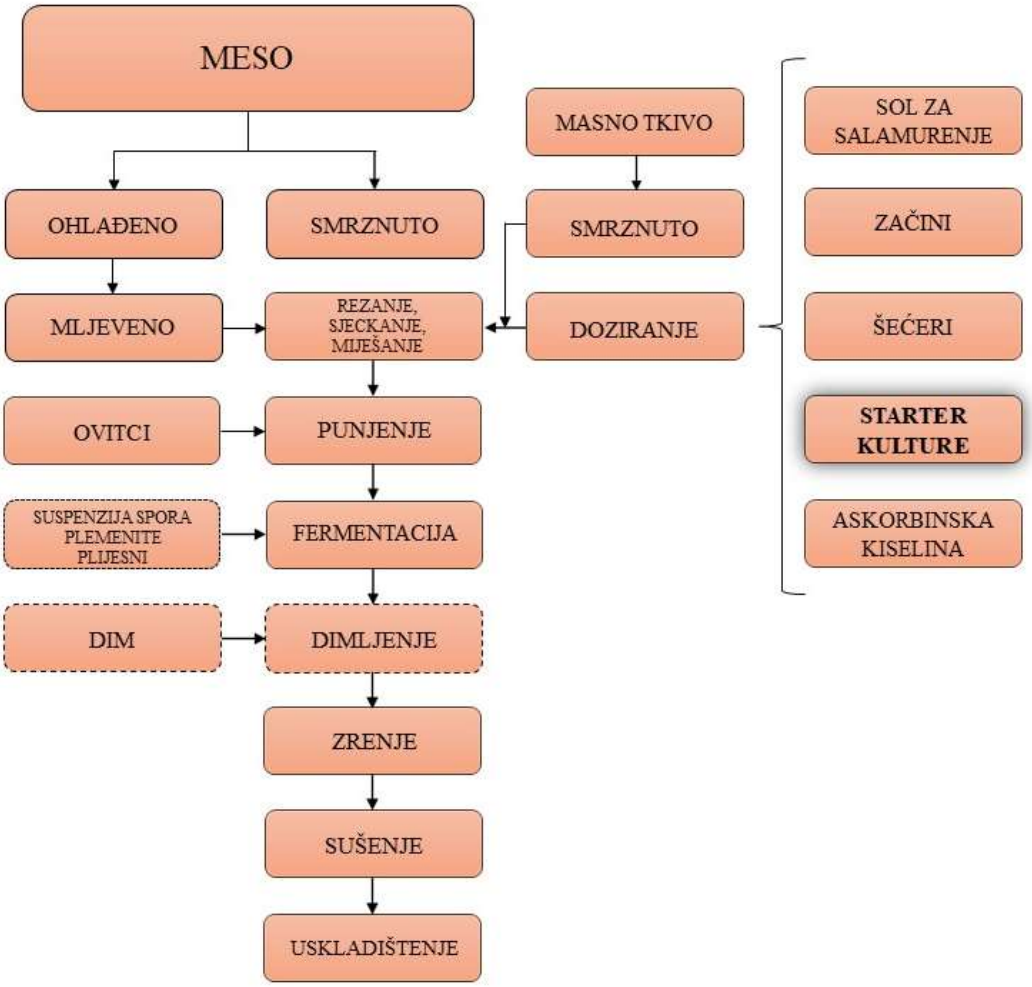
### 2.2.1. Starter kulture u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda

Fermentacija je jedan od najstarijih procesa konzerviranja mesa koji ovisi o biološkoj aktivnosti bakterija mliječne kiseline tj. o proizvodnji različitih metabolita sposobnih za suzbijanje rasta nepoželjnih mikroorganizama (ROSS i sur., 2002.; HUTKINS 2006.; OIKI i sur., 2016.). Uloga mikroorganizama u fermentaciji poznata je već dugi niz godina, pa s obzirom na to odabiru se sojevi koji su higijenski i tehnološki primjereni za potencijalnu primjenu u obliku starter kultura. Razlog zbog kojeg se one koriste proizlazi iz činjenice da spontana fermentacija može rezultirati neujednačenom kvalitetom i tehnološkim greškama proizvoda. Zbog navedenog, primjena tehnološki prihvatljivih, mesu prilagođenih i sigurnih sojeva bakterija mliječne kiseline može doprinijeti suzbijanju prirodne mikrobiote i poboljšanju senzornog profila fermentiranih kobasica (ZDOLEC i sur., 2008.; OIKI i sur., 2016.).

Fermentacija mesnih proizoda može nastati pod utjecajem prirodne mikrobiote ili starter kultura. Starter kulture u tom procesu služe za poboljšanje trajnosti proizvoda, ali i senzornih te mnogih drugih karakteristika. Glavnu fermentacijsku mikrobiotu čine bakterije mliječne kiseline (BMK) uključujući *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Weissella* (FRAQUEZA i sur., 2016.). Osim što su bakterije mliječne kiseline inače sveprisutne, dio su i prirodne mikrobiote životinja i ljudi. Gram-pozitivni katalaza pozitivni koki su još jedna skupina bakterija bitna za fermentirane mesne proizvode odnosno za proces proizvodnje. Oni su odgovorni za stabilnost boje, kontrolu kvarenja, smanjenje vremena obrade i doprinose razvoju okusa (FRAQUEZA i sur., 2016.).

Bakterije mliječne kiseline i koagulaza-negativni stafilokoki smatraju se najvažnijim mikroorganizmima za proces fermentacije mesa i zbog toga se i javila potreba da se dodaju tijekom proizvodnje u obliku starter kultura, a s ciljem postizanja bolje trajnosti, sigurnosti, ispravnosti i kvalitete fermentiranih mesnih proizvoda. U suprotnom, budući da je sastav autohtone mikrobiote varijabilan, a njezin rast pod utjecajem okolišnih uvjeta, proizvodnja fermentiranih proizvoda bez upotrebe starter kultura može rezultirati neujednačenom kvalitetom proizvoda (FRECE i MARKOV, 2016.).

U procesu proizvodnje fermentiranih mesnih proizvoda ne treba zaboraviti i važnost kvasaca koji se koriste u obliku starter kultura. Kvasci doprinose okusu i aromi proizvoda različitim mehanizmima kao npr. reduciranjem i metabolizmom mliječne kiseline. Općenito, svi do sada navedeni mikroorganizmi mogu potjecati iz mesa, začina ili mogu dospjeti u proizvod tijekom procesa proizvodnje (FRECE i MARKOV, 2016.). Shema na slici 1. prikazuje osnovne faze proizvodnje fermentiranih kobasica s naglaskom na fazu u kojoj se dodaju starter kulture kao izvor mikroorganizama.




**Slika 1.** Shema procesa proizvodnje fermentiranih kobasica (ŠUŠKOVIĆ, 2006.; TRUNTIĆ, 2007.; EREŠ, 2011.)

Fermentirani mesni proizvodi nisu uvijek proizvedeni uz dodatak starter kultura niti moraju biti na taj način proizvedeni. Međutim, u industrijskoj proizvodnji koriste se starter kulture kako bi se osigurala sigurnost i standardizacija kvalitete proizvoda (okus, boja, tekstura) i kraće vrijeme zrenja (FRECE i MARKOV, 2016.). Uporabom startera također se želi smanjiti i varijabilnost fermentiranih mesnih proizvoda koja se vrlo često javlja prilikom spontane fermentacije.

### 2.2.2. Važnost i uloga mikroorganizama u starter kulturama

Mnogi mikroorganizmi svojim rastom i metabolizmom induciraju promjene u okusu, nutritivnoj kvaliteti, teksturi, aromi i sigurnosti samog proizvođača (KOVAČEVIĆ, 2001.). Korištenjem starter kultura iz navedenih razloga, postiže se unaprjeđenje senzornih svojstava fermentiranih mesnih proizvoda. Osim toga, produžuje se trajnost takvog proizvoda jednako kao ispravnost i sigurnost. Kao što je ranije spomenuto, najčešće se koriste bakterije mliječne kiseline i koagulaza-negativni stafilokoki u obliku starter kultura. Bakterije mliječne kiseline osiguravaju sigurnost proizvoda snižavanjem pH, razgradnjom šećera i proizvodnjom mliječne kiseline te bakteriocina, a stafilokoki imaju glavnu ulogu u razvoju arome, okusa i boje fermentiranih proizvoda (FRECE i sur., 2010.b).

Fermentacija pri višoj temperaturi biti će kraća i sigurnija, a dodani mikroorganizmi iz starter kultura u kratkom roku prerastu autohtonu mikrofloru koji inače mogu dovesti i do neželjenih preinaka ili producirati različite toksine u proizvodu. Starter kulture mogu proizvesti štetne produkte metabolizma kao što su biogeni amini, mikotoksini, vodikov peroksid, ugljikov dioksid i u tom slučaju ispoljavaju neželjene učinke. No, odabir sojeva koji će se koristiti pomno se planira te se općenito smatraju sigurnima za upotrebu. Između ostalog, starter kulture nisu novost i istražuju se već dugi niz godina, a u industrijskoj proizvodnji najčešće se koriste bakterije mliječne kiseline, bakterije koje pripadaju porodici *Micrococcaceae*, rod *Streptomyces* te *Staphylococcus*. Kvasci i plijesni se, jednako kao i prethodno navedeni mikroorganizmi, često upotrebljavaju u obliku startera (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Najčešće starter kulture za fermentirane mesne proizvode (HAMMES, 1998.; ŠUŠKOVIĆ, 2008.; FRECE i sur., 2010.a)

| Grupe mikroorganizama | Vrste |
|---|---|
| Bakterije mliječne kiseline | *Lactiplantibacillus plantarum*<br>*Latilactobacillus sakei*<br>*Latilactobacillus curvatus*<br>*Lactobacillus lactis*<br>*Pediococcus acidilactici*<br>*Pediococcus pentosaceus* |
| *Micrococcaceae* | *Micrococcus varians* |
| *Streptomyces* | *Streptomyces griseus* |
| *Staphylococcus* | *Staphylococcus carnosus*<br>*Staphylococcus lentus*<br>*Staphylococcus warneri*<br>*Staphylococcus xylosus* |
| Kvasci | *Candida famata*<br>*Debaryomyces hansenii* |
| Plijesni | *Penicillium camemberti*<br>*Penicillium crysogenum*<br>*Penicillium nalgiovense* |

Mikrobiološka kontaminacija koja potječe iz okoliša može značajno narušiti uspjeh proizvodnje i konkurentnost tradicionalnih mesnih proizvoda. Kako bi to izbjegli, koriste se kompetitivne autohtone starter kulture koje smanjuju navedene opasnosti pomoću svoje antimikrobne aktivnosti i inhibicijom rasta rezistentnih i patogenih mikroorganizama. Trenutno su dostupne kombinirane starter kulture u kojima jedan mikroorganizam proizvodi mliječnu kiselinu (npr. laktobacili) i drugi koji poboljšava željene okuse (*Micrococcaceae*, *Levilactobacillus brevis*,

*Lentilactobacillus buchneri*), a to znači mnoštvo vrlo dobrih i prihvatljivih proizvoda te gotovo nijedan nepoželjan fermentirani proizvod (OCKERMAN i BASU, 2016.).

Kada odabiremo sojeve za starter kulture, potrebno je isključiti nepoželjne karakteristike poput stvaranja štetnih spojeva kao što su mikotoksini, ugljikov dioksid, biogeni amini i drugi. Mikroorganizmi iz starter kulture također mogu takve nepoželjne sojeve inhibirati u nadjevu stvaranjem kiselina i bakteriocina. Najveći potencijal za korištenje kao starter kulture imaju oni mikroorganizmi izolirani i odabrani iz autohtone mikrobiote (autohtone starter kulture), budući da isti prirodno dominiraju u tradicionalnim procesima fermentacije, prilagođeni su mikrouvjetima u proizvodu, tehnološkim procesima i tehnološkim parametrima koji su jedinstveni za svaku vrstu mesnih proizvoda, imaju veće metaboličke kapacitete koji poboljšavaju kvalitetu i sigurnost proizvoda te sudjeluju u stvaranju tipičnih senzornih svojstava (boja, tekstura, miris i okus) (FRECE i MARKOV, 2016.).

U istraživanju FRECE i sur. (2014.) izolirane su autohtone funkcionalne starter kulture koje se nalaze u hrvatskim tradicionalnim suhim kobasicama (čajna, zimska, bečka, srijemska i slavonski kulen). Za proizvodnju navedenih kobasica korištene su starter kulture u obliku kombinacije sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Staphylococcus*. Tijekom istraživanja proučavana je održivost tih sojeva i njihov učinak na karakteristike gotovog proizvoda. Autohtone starter kulture pokazale su bolji uspjeh u ocjeni senzornih svojstava, mikrobiološkoj sigurnosti i poboljšanju roka trajanja naspram komercijalnih starter kultura. Navedeno potvrđuje vrlo korisnu ulogu autohtone mikrobiote korištene u obliku starter kulture za proizvodnju mesnih proizvoda. Treba spomenuti i da je implementacija *L. sakei* kao i bakteriocina mesenteriocina Y u hrvatskim tradicionalnim fermentiranim kobasicama rezultirala smanjenjem nepoželjne mikrobiote (*Listeria monocytogenes*, enterokoki) i očuvanjem senzornih svojstava finalnih proizvoda (ZDOLEC i sur., 2007.b; ZDOLEC i sur., 2008.).

## 2.3. Odabrani mikroorganizmi

Najvažniji mikroorganizmi u procesu proizvodnje fermentiranih mesnih proizvoda su dakle bakterije mliječne kiseline, stafilokoki te kvasci i plijesni. CETIN (2014.) navodi njihove karakteristike:

- bakterije mliječne kiseline iz rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* razgrađuju ugljikohidrate do mliječne kiseline, snižavaju pH nadjeva i tako utječu na razvitak i održivost boje i konzistencije, brzinu zrenja, sigurnost zrenja te kvalitetu i zdravstvenu ispravnost proizvoda
- bakterije iz rodova *Staphylococcus* i *Micrococcus* doprinose redukciji nitrata, razgradnji vodikovog peroksida, inhibiciji procesa oksidacije, te doprinose nastanku specifičnog mirisa i okusa proizvoda lipolitičkim i proteolitičkim aktivnostima
- kvasac *Debaryomyces hansenii* koji povoljno utječe na razvitak arome i stabilnosti boje proizvoda
- plijesni iz roda *Penicillium* doprinose razvitku specifičnih svojstava fermentiranih sušenih proizvoda pokrivenih slojem plemenite plijesni

### 2.3.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline pripadaju gram-pozitivnim bakterijama koje rastu u temperaturnom rasponu od 20 do 45°C. Njihov najvažniji proizvod metabolizma ugljikohidrata je mliječna kiselina. Bakterije mliječne kiseline mogu se naći u različitim proizvodima kao što su fermentirani mesni proizvodi, kiselo tijesto, različite mliječne namirnice i drugo. Industrijski se upotrebljavaju kao starter kulture u svrhu proizvodnje fermentiranih mesnih proizvoda, a posjeduju GRAS oznaku (engl. Generally Recognized As Safe) koju dodjeljuje Američka agencija za hranu i lijekove (FDA). GRAS oznaka znači da kemikalija ili tvar koja se dodaje u hranu stručnjaci smatraju sigurnom za upotrebu. Osim te oznake, bakterije mliječne kiseline imaju QPS status (engl. The Qualified Presumption of Safety) prema europskoj regulativi odnosno EFSA-i (engl. European Food Safety Authority). Taj status podrazumijeva da se određenom procjenom i istraživanjem zaključilo da konkretna skupina mikroorganizama ne potiče zabrinutost u smislu sigurne upotrebe.

Bakterije mliječne kiseline klasificiraju se u određene rodove kao što su *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weisella* i drugi. Laktobacili koji su prisutni u hrvatskim autohtonim fermentiranim mesnim proizvodima su *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis* i još nekoliko pripadnika istog roda. Prema jednom istraživanju (LONČAR, 2011.) iz tradicionalnih fermentiranih mesnih proizvoda (kulen, slavonske kobasice i konjska kobasica) izolirane su autohtone bakterije koje pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* koji su pripadnici skupine bakterija mliječne kiseline. Osim navedenih, izolirane su i bakterije iz roda *Staphylococcus*. *L. sakei* obično je dominantna vrsta tijekom proizvodnje različitih tradicionalnih fermentiranih kobasica (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.). Prema KOZAČINSKI i sur. (2008.) u prirodno fermentiranim kobasicama od bakterija mliječne kiseline prevladavaju *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei* kao i *Pediococcus spp.*te *Leuconostoc spp.*

Bakterija mliječne kiseline u sirovom mesu obično nema u velikom broju, međutim ako su uvjeti prikladni za njihov rast ubrzo mogu predstavljati dominantnu populaciju. Nakupljanje produkata metabolizma bakterija mliječne kiseline, uglavnom mliječne i octene kiseline, dovodi do značajnog pada pH (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.). Pad pH bitan je za proizvodnju jer suzbija rast neželjenih mikroorganizama, pridonosi nastanku crvene boje, razvoju karakterističnog okusa, a također pomaže sušenju jer proteini slabije navlače i vežu vodu. Osim smanjenja pH vrijednosti i aktiviteta vode, drugi specifični metaboliti poput diacetila, bakteriocina i kratkolančanih masnih kiselina mogu biti odgovorni za antimikrobni učinak bakterija mliječne kiseline (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.). S obzirom da neki sojevi *L. sakei*, *L. curvatus* i *L. plantarum* imaju peptidazu, njihovim metabolizmom mogu nastajati slobodne aminokiseline što pridonosi nastanku arome mesnih proizvoda.

Iznimno korisno svojstvo bakterija mliječne kiseline je stvaranje bakteriocina što je važno za fermentirane mesne proizvode u smislu sigurnosti jer djeluju protiv patogenih bakterija. Bakteriocini su peptidi koji svoj antimikrobni učinak ispoljavaju baktericidnim i bakteriostatskim djelovanjem pri čemu oštećuju staničnu membranu, a mogu i remetiti sintezu stanične stijenke. Bakterije koje proizvode bakteriocine posjeduju mehanizme kojima su zaštićene od djelovanja svojih bakteriocina jer je njihovo djelovanje orijentirano na srodne bakterije ili istu vrstu bakterija. Dakle, proizvodnjom bakteriocina, mliječne kiseline i nekih organskih kiselina bakterije mliječne kiseline promiču sigurnost proizvoda jer potiskuju rast i razmnožavanje mikroorganizama,

sprječavaju kvarenje proizvoda i svojim djelovanjem teže stabilnom mesnom proizvodu s poboljšanom trajnosti.

Rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus* koriste se kao komercijalne starter kulture. Primjena laktobacila rezultira brzim zakiseljavanjem uz niske pH vrijednosti, a korištenje pediokoka dovodi do sporijeg i blažeg zakiseljavanja (MEDIĆ, 2016.). Bakterije mliječne kiseline mogu ispoljavati kompetitivnost za hranjive tvari i producirati različite antimikrobne tvari, pa se zbog toga mogu koristiti kao alternativa mnogim dodacima kemijskog podrijetla. Glavni benefit bakterija mliječne kiseline za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda odnosi se na fermentaciju saharida tj. stvaranje mliječne kiseline i shodno tome snižavanju pH. Pri smanjenoj pH vrijednosti mišićni proteini koaguliraju i gube vodu, što dovodi do čvrstoće, kohezije i lakšeg rezanja mesa (FRECE i MARKOV, 2016.). Osim toga, prednost je djelovanje na senzorna svojstva proizvoda stvaranjem aromatskih tvari.

### 2.3.2. Stafilokoki

Stafilokoki su gram-pozitivne bakterije koje pripadaju skupini katalaza-pozitivnih koka, za razliku od streptokoka i enterokoka koje svrstavamo u katalaza-negativne. Stafilokoki se dijele na koagulaza-pozitivne i koagulaza-negativne bakterije od kojih su koagulaza-pozitivne uglavnom patogene kao npr. Staphylococcus aureus. Za fermentirane mesne proizvode su važni koagulaza-negativni stafiloloki koji su i inače prisutni u hrani. Koagulaza-negativni stafilokoki, jednako kao i bakterije mliječne kiseline, trebaju posjedujovati GRAS oznaku prije primjene u proizvodnji mesnih proizvoda.

U fermentiranim mesnim proizvodima, osim bakterija mliječne kiseline, utvrđena je prisutnost i bakterija iz roda *Staphylococcus*. Stafilokoki koji se učestalo pronalaze u mesu su *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus*. Koagulaza-negativni stafilokoki su vrlo tolerantni prema slanom okolišu te mogu rasti sa ili bez prisutnosti kisika (KEGALJ i sur., 2012.). Oni reduciraju nitrate i nitrite (ukoliko se isti dodaju u proizvod) te putem nitrozilmioglobina sudjeluju u stvaranju specifične boje fermentiranih mesnih proizvoda. Važno je da ove bakterije nisu patogene i ne ugrožavaju ni na koji način zdravlje krajnjih potrošača. Što se tiče hrvatskih autohtonih fermentiranih mesnih proizvoda, u njima se pojavljuju *S. xylosus*, *Staphylococcus capitis*, *S. carnosus* i *Staphylococcus saprophyticus* (KOZAČINSKI i sur., 2008.).

Primjena bakterija iz roda *Staphylococcus* rezultira stabilnom bojom proizvoda i snižavanjem rizika od nastanka užeglosti te nepoželjnih okusa. Navedeno postižu svojim katalazama jer potiskuju proizvode metabolizma mikroba kao što je vodikov peroksid. Osim toga, skraćuje se vrijeme potrebno za obradu proizvoda, a i bolja su senzorna svojstva (npr. okus). Proteolitička i lipolitička aktivnost stafilokoka dovodi do stvaranja teksture i okusa proizvoda zbog stvaranja peptida, aminokiselina, aldehida, amina i slobodnih masnih kiselina (MAURIELLO i sur., 2004.; DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.). Dominantne vrste stafilokoka izolirane iz pršuta prema dosadašnjim istraživanjima su *S. xylosus* i *Staphylococcus equorum*, a osim njih javljaju se i *S. capitis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus* (FULLADOSA i sur., 2010.; LANDETA i sur., 2011.; LORENZO i sur., 2012.; CHERROUD i sur., 2014.). Dominante vrste u fermentiranim suhim kobasicama obično su *S. xylosus* i *S. saprophyticus* (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.).

Stafilokoki čine dio autohtone mikrobiote mesnih proizvoda što sugerira da imaju potencijal biti dio starter kultura. Prema istraživanju FRECE i sur. (2010.b) iz slavonskog kulena izdvojene su, izuzev bakterija mliječne kiseline, bakterije koje pripadaju rodu *Staphylococcus*. Od izolata bakterija iz roda *Staphylococcus*, tipičnih predstavnika starter kultura za meso, prevladavali su: *S. xylosus*, *S. warneri*, *Staphylococcus lentus* i *Staphylococcus auricularis* (FRECE i sur., 2010.b). Jedino *S. auricularis* nije pokazivao antimikrobni učinak prema patogenim bakterijama putem stvaranja mliječne kiseline.

Važnost stafilokoka za fermentirane mesne proizvode sastoji se u stvaranju arome proizvoda, razvijanju okusa te boje kao glavnih senzornih osobina. S obzirom da stafilokoki posjeduju katalazu koja razgrađuje vodikov peroksid, ne dolazi do oksidiranja lipida pa se time sprječava razvoj nepoželjnih užeglih okusa. Drugi važan enzim je lipaza koju stafilokoki proizvode, a ona pridonosi razvoju arome mesnih proizvoda. *S. xylosus* i *S. carnosus* su najčešće lipolitičke starter kulture korištene u fermentiranim mesnim proizvodima (FRECE i sur., 2010.b). Koagulaza-negativni stafilokoki, kao i bakterije mliječne kiseline, stvaraju bakteriocine i time doprinose sigurnosti konačnog proizvoda.

Treba naglasiti da stafilokoki ne podnose kiselu sredinu odnosno niske pH vrijednosti pa se njihov broj posljedično smanjuje tijekom fermentacije, ali i nakon nje. Zbog toga redukcija nitrata u nitrite se provodi prije fermentacije, odnosno prije nego što bakterije mliječne kiseline prevladaju u nadjevu (KEGALJ i sur., 2012.). Postoje kriteriji odabiranja bakterija mliječne

kiseline i koagulaza-negativnih stafilokoka koji se koriste kao starter kulture za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda, a odnose se na njihove poželjne karakteristike (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Kriteriji za odabiranje bakterija mliječne kiseline i koagulaza-negativnih stafilokoka kao starter kultura za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda (FRECE i sur., 2011.; FRECE i MARKOV, 2016.)

| Bakterije mliječne kiseline | Koagulaza-negativni stafilokoki |
|---|---|
| • brzo i adekvatno stvaranje mliječne kiseline<br>• brzi rast pri različitim temperaturama, koncentracijama soli i pH<br>• katalazna aktivnost i hidroliza vodikovog peroksida<br>• redukcija nitrata i nitrita<br>• proteolitička i lipolitička enzimatska aktivnost<br>• tolerancija ili sinergizam prema drugim mikrobnim komponentama starter kultura<br>• proizvodnja antimikrobnih spojeva<br>• antagonizam prema patogenim mikroorganizmima<br>• antagonizam prema tehnološki nepoželjnim mikroorganizmima<br>• nema antimikrobne rezistencije<br>• nema stvaranja biogenih amina<br>• nema stvaranja sluzi<br>• probiotička svojstva (tolerancija na niski pH, na žučne soli) | • brzi rast pri različitim temperaturama, koncentracijama soli i pH<br>• katalazna aktivnost i hidroliza vodikovog peroksida<br>• redukcija nitrata i nitrita<br>• proteolitička i lipolitička enzimatska aktivnost<br>• inhibicija oksidacije slobodnih masnih kiselina<br>• tolerancija ili sinergizam prema drugim mikrobnim komponentama starter kultura<br>• proizvodnja antimikrobnih spojeva<br>• antagonizam prema patogenim mikroorganizmima<br>• antagonizam prema tehnološki nepoželjnim mikroorganizmima<br>• nema antimikrobne rezistencije<br>• nema stvaranja biogenih amina |

### 2.3.3. Kvasci i plijesni

U proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda kvasci se koriste kako bi se snizila razina mliječne kiseline, a povećao udio amonijaka. Kao i prethodno opisane bakterije, kvasci posjeduju lipolitičku i proteolitičku enzimatsku aktivnost. Navedeno svojstvo utječe na aromu i okus mesnih proizvoda. Reprezentativni rodovi u fermentiranim kobasicama su *Debaryomyces* i to najčešće vrsta *Debaryomyces hansenii*, zatim rodovi *Rhodotorula*, *Candida*, *Torulonis*, *Cryptococcus*, *Pichia* i *Yarowia* (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.). *D. hansenii* utječe na okus proizvoda jer stvara spojeve koji daju aromu tj. oslobađa hlapljive spojeve poput aldehida i alkohola. Stvaranjem kiseline također pridonosi boljim senzornim svojstvima proizvoda te svim navedenim karakteristima pomaže stabilizaciji crvene boje.

Rast kvasaca u procesu fermentacije ovisi o tipu proizvodnje, ali i o drugim čimbenicima kao što je npr. promjer kobasice. Što je promjer manji, kisik je više pristupačan kobasici pa takve kobasice imaju više navedenih mikroorganizama. S obzirom da kvasci rastu i pri različitim pH vrijednostima, kisela sredina koju stvaraju bakterije mliječne kiseline neće naškoditi njihovom rastu. Njihova plazmatska membrana je nepropusna što je važan čimbenik u osiguravanju neutralnog unutarstaničnog pH čak i kada bakterije mliječne kiseline čine okolinu kiselom.

Kvasci se mogu naći na QPS popisu jednako kao i bakterije mliječne kiseline, a to mogu zahvaliti važnoj ulozi u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda ali i poznatoj sigurnoj primjeni u prošlosti. Ističe se ranije spomenut *D. hansenii* učinkom protiv nepoželjnih plijesni. Bez obzira na sigurnost i pozitivne učinke kvasaca, neki su ipak 2013. godine uklonjeni od strane EFSA-e zbog istraživanja koje je pokazalo da se virulencija nekih oportunističkih kvasaca može povećati. Stoga je potrebno provesti više usporednih studija čimbenika virulencije kod oportunističkih kvasaca prije nego što se može razviti opća slika (FRAQUEZA i sur., 2016.).

Kada se proizvode fermentirani mesni proizvodi koji imaju viši postotak soli, predlaže se korištenje određenih sojeva *D. hansenii* i *Candida famata* zbog svojih pozitivnih učinaka na boju ali i druge senzorne karakteristike. Osobito u zemljama južne Europe, fermentirane kobasice se inokuliraju atoksinogenim kvascima i plijesnima kako bi se proizveli proizvodi specifičnog okusa (OCKERMAN i BASU, 2016.). Važno je da sojevi budu netoksogeni kako bi se izbjegao rizik za potrošače, a proizvod učinio što sigurnijim.

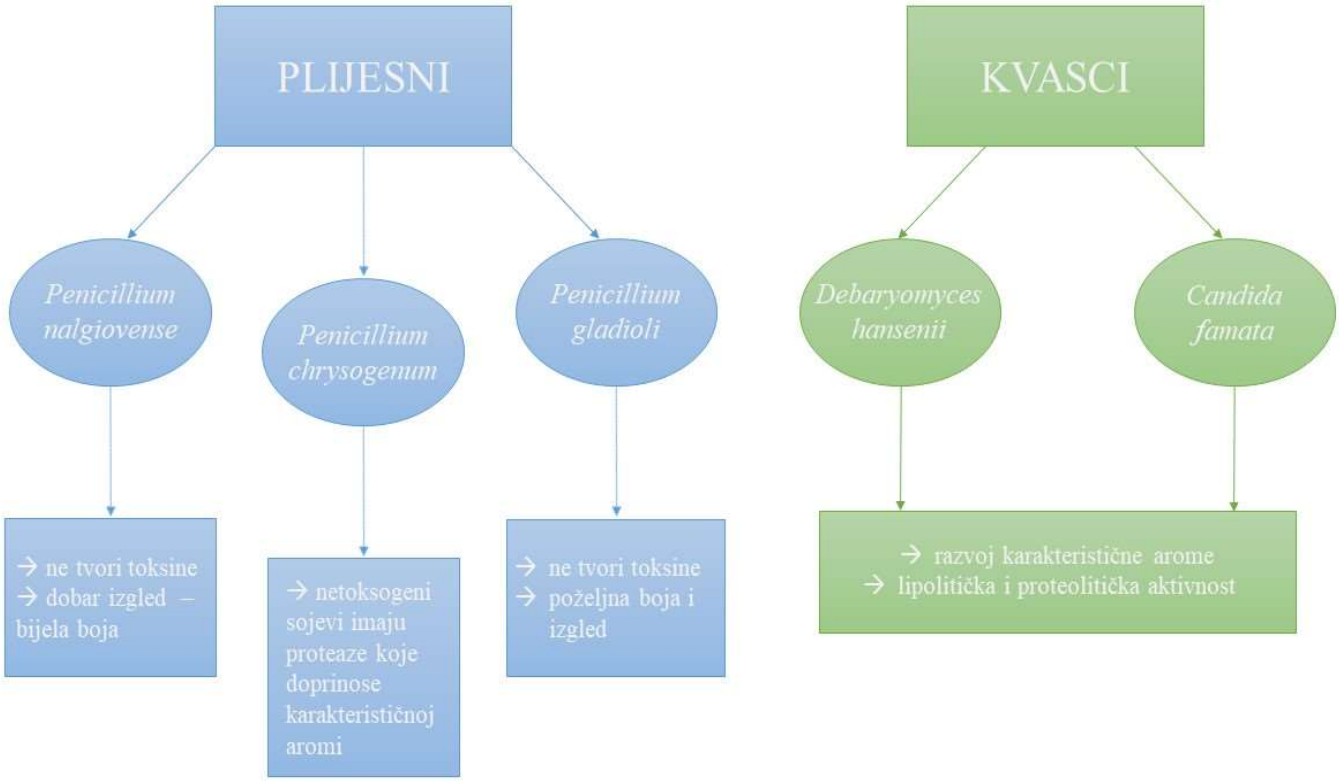
Kvasci i plijesni se inokuliraju na dva načina, uranjanjem mesnog proizvoda u otopinu ili prskanjem po površini proizvoda npr. kobasice. Obje skupine mikroorganizama pripadaju aerobnim gljivicama, a mogu biti poželjni i nepoželjni. Plijesni koje su crne, žute ili zelene boje su većinom nepoželjne dok su u nijansama bijele ili sive boje poželjne. Plijesni roda *Penicillium* obično se odabiru za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda, a od kvasaca već spomenuti rod *Debaryomyces*. Oni su netoksogeni i preporučuju se za uporabu u obliku starter kultura kako bi se suzbio rast neželjenih kvasaca i plijesni koji se javljaju posebice tijekom sušenja i zrenja proizvoda.

Plijesni imaju vrlo važnu tehnološku ulogu u procesu proizvodnje fermentiranih mesnih proizvoda. Njihovi pozitivni i ključni učinci obuhvaćaju (prema DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.):

- antioksidativni učinak i poboljšavanje stabilnosti boje s obzirom na njihovu katalaznu aktivnost i potrošnju kisika
- stvaraju mikroklimu na površini proizvoda i preveniraju nastanak ljepljive ili sluzave površine
- sudjeluju u razvoju arome i okusa oksidacijom laktata, proteolizom, razgradnjom aminokiselina, lipolizom, β-oksidacijom
- mogu imati ulogu u zaštiti od neželjenih plijesni, kvasaca i bakterija
- daju kobasicama tipičan bijeli ili sivkasti izgled
- pridonose sporijem isparavnju i gubitku vode

Neke plijesni mogu narušiti kvalitetu proizvoda ili čak sintetizirati mikotoksine koji su opasni za potrošače. Zbog navedenog, treba upotrebljavati starter kulture plijesni koje su sposobne potisnuti neželjene štetne plijesni i postati dominantne. Najčešće izolirani rodovi su Penicillium, Aspergillus i Erotium, a u mikropopulaciji suhomesnatih i fermentiranih proizvoda najdominantnije su vrste iz roda Penicillium (DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.). Iz istarskog pršuta izolirane su sljedeće vrste plijesni: *Penicillium frequentans*, *Penicillium verrocosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium commune*, *Penicillium lanoso-coeruleum*, *Penicillium lanoso-griseum*, *Aspergillus repens i Erotium repens* (COMI i sur., 2004.; DANILOVIĆ i SAVIĆ, 2016.).

Tijekom zrenja na površini mesnih proizvoda prevladavaju kvasci (oko 95%), nakon dva tjedna plijesni i kvasci prisutni su u podjednakim odnosima, dok pri kraju zrenja (4-8 tjedana) prevladavaju plijesni (TOLDRÁ, 2007.; KEGALJ i sur., 2012.).Sloj plijesni koji je na površini proizvoda doprinosi uravnoteženom sušenju, smanjuje se gubitak vode, a služi i kao zaštitni sloj od svjetla pa teže dolazi do promjene u boji ili nastanka užeglosti. Kvasci i plijesni koji se biraju za starter kulture u svrhu proizvodnje fermentiranih mesnih proizvoda definirani su korisnim karakteristikama (Slika 2.).




**Slika 2.** Karakteristike najčešće korištenih kvasaca i plijesni u obliku starter kultura za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda (prema COCCONCELLI 2007.; BABIĆ i sur., 2011.; FRECE i MARKOV, 2016.)

## 3. RASPRAVA

Bioraznolikost autohtonih fermentiranih mesnih proizvoda osiguravaju mikroorganizmi za koje se može reći da gotovo žive u simbiozi unutar njih. Mikroorganizmi svojim enzimatskim aktivnostima i metabolizmom utječu na većinu važnih svojstava gotovog proizvoda, posebno senzornih (okus, aroma, boja, konzistencija...). Bakterije mliječne kiseline zaslužne su za sprječavanje kvarenja mesnih proizvoda jer stvaraju mliječnu kiselinu i peptide bakteriocine, a zbog toga koče rast patogenih mikroorganizama i doprinose sigurnosti, trajnosti i kvaliteti proizvoda. Osim toga, utječu i na aromu, boju i druga senzorna svojstva jer proizvode organske kiseline, alkohol etanol, ugljikov dioksid i dr. Stafilokoki razgrađuju vodikov peroksid i reduciraju nitrate i nitrite, pa pomažu stabilnosti karakteristične boje fermentiranih mesnih proizvoda, a razvoj arome potiču proteolitičkim i lipolitičkim aktivnostima. Izuzev navedenih, fermentirani mesni proizvodi sadrže i mikrokoke, enterokoke, kvasce i plijesni koji individualno i sinergijski definiraju osobine gotovog proizvoda.

Spontana fermentacija empirijski se koristila u fermentiranim mesnim proizvodima kao jedna od najstarijih tehnologija biokonzerviranja (FRAQUEZA i sur., 2016.). U Hrvatskoj postoji veliki broj tradicionalnih odnosno autohtonih mesnih proizvoda, a po popularnosti se ističe slavonski kulen. BABIĆ i sur., (2011.) identificirali su mikrobiotu koja se prirodno nalazi u slavonskom kulenu s naglaskom na bakterije mliječne kiseline i stafilokoke. Uvtrđena je dominirajuća prisutnost *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus* i *L. plantarum*, a od stafilokoka su dominantno izolirani *S. xylosus* i *S. warneri*. Izolirani sojevi navedenih vrsta smatraju se dijelom autohtone mikrobiote koja se može koristiti u industrijskom procesu proizvodnje u obliku funkcionalnih starter kultura koje daju proizvodu željena svojstva.

Autohtona mikrobiota tradicionalno proizvedenih fermentiranih mesnih proizvoda predstavlja temelj za komercijalne starter kulture, a tu se posebno ističu bakterije mliječne kiseline i koagulaza-negativni stafilokoki, te kvasci i plijesni. Dodaju se tijekom proizvodnje radi bolje sigurnosti, kvalitete i postizanja zadovoljavajućih senzornih svojstava gotovog proizvoda. Najnezahvalnije je odabrati koje mikroorganizme uključiti u starter kulture da bi postigli sve prethodno navedeno. Odabir soja temelji se na općim, tehnološkim i funkcionalnim svojstvima koje treba ispitati, a na taj način konkurentne i zaštitne autohtone funkcionalne starter kulture

pridonose smanjenju ili eliminaciji mikrobioloških i toksikoloških rizika, ali također doprinose tradicionalnim senzornim svojstvima mesnih proizvoda (FRECE i MARKOV, 2016.).

Proces proizvodnje autohtonih fermentiranih mesnih proizvoda kompleksan je postupak koji ovisi o brojnim čimbenicima koji u konačnici imaju učinak na kvalitetu, izgled i sigurnost proizvoda. Važan čimbenik u tom procesu je i uvođenje komercijalnih starter kultura mikroorganizama kojima bi se održala autentičnost proizvoda, a s druge strane ne bi ugrozila sigurnost i higijenska ispravnost istih kao ni kvaliteta i senzorna svojstva već samo poboljšala. Bez obzira na brojne prednosti starter kultura, neki proizvođači (pogotovo mali proizođači) i dalje su skloniji proizvodnji na tradicionalan način što se svodi na spontanu fermentaciju, a bez uključivanja starter kultura. Kada govorimo o Hrvatskoj, također se mnoštvo fermentiranih mesnih proizvoda proizvodi na takav način izostavljajući starter kulture.

Smatra se da neke starter kulture ipak nisu u potpunosti prikladne za uvjete koji prevladavaju u mesnim proizvodima, pa posljedično tome da ne mogu postići nastanak željenih senzornih osobina gotovog proizvoda. Različiti autori potvrdili su te tvrdnje tako što su zaključili da mesni proizvodi industrijski proizvedeni uz dodatak komercijalnih starter kultura nemaju senzorna svojstva na razini tradicionalno proizvedenih proizvoda (BONOMO i sur., 2009.; BASSI i sur., 2015.). Zadovoljavajuća senzorna svojstva tradicionalno proizvedenih proizvoda pripisuju se drugačijem postupku zrenja koji je duljeg trajanja i odvija se na prirodniji način od industrijske proizvodnje. U tradicionalnim načinima proizvodnje upotrebljava se i reciklacija (engl. back-slopping), a to znači da se koristi supstrat iz prošle kvalitetne šarže kako bi sljedeći proces fermentacije bio što uspješniji. Na taj način dobiveni mesni proizvodi smatraju se također kvalitetnijim i bolje autentičnosti od industrijski proizvedenih uporabom komercijalnih starter kultura.

Do danas je provedeno mnogo istraživanja koja ipak opovrgavaju prethodno navedene tvrdnje, a potvrđuju izrazite prednosti upotrebe starter kultura u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda. NEŽAK i sur. (2011.) utvrdili su da postoji značajna razlika u ocjenama uzoraka kulena kojima su dodane starter kulture i onih kojima nisu. Uzorci pripravljeni bez dodanih starter kultura imali su istaknut nepoželjan gorkast okus, s vidljivim diskoloracijama i nekompaktnošću nadjeva. Provedena istraživanja, s naglaskom na prethodno navedeno, potvrđuju opravdanost upotrebe

komercijalnih starter kultura za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda jer se takav proces proizvodnje smatra kvalitetnijim i ekonomičnijim.

Autohtona mikrobiota fermentiranih mesnih proizvoda dosad je istraživana s ciljem utvđivanja populacije mikroorganizama kroz različite stadije zrenja, da bi se ustanovilo koji mikroorganizmi dominiraju i najviše pridonose nastanku senzornih svojstava proizvoda. Na temelju dosadašnjih saznanja najzastupljeniji mikroorganizmi u fermentiranim mesnim proizvodima su bakterije mliječne kiseline, stafilokoki i mikrokoki (FRECE i sur., 2010.a, b, c, d; FRECE i sur., 2011.; BABIĆ i sur., 2011.). Provedena istraživanja su na neki način dokazi da starter kulture pozitivno utječu na sigurnost fermentiranih mesnih proizvoda odnosno da ju poboljšavaju. Ako se neka tvar, kemikalija ili konkretno starter kultura dodaje hrani, smatra se da pozitivan utjecaj na proizvod u smislu sigurnosti, a nedvojbeno i na zdravlje potrošača pogotovo u smislu rezistencije na antibiotike. Međutim, u posljednje vrijeme ipak postoje dvojbe oko GRAS statusa bakterija mliječne kiseline. GAZZOLA i sur., (2012.) u svom istraživanju dokazali su da postoji prijenos rezistencije putem gena s enterokoka na stafilokoke i laktobacile u procesu fermentacije mesnih proizvoda.

U današnje vrijeme sve je veći trend konzerviranja hrane korištenjem autohtonih funkcionalnih starter kultura, a tradicionalna fermentirana hrana različitog podrijetla predstavlja riznicu biološke raznolikosti koja se može koristiti za razvoj takvih starter kultura (FRECE i MARKOV, 2016.). Zbog toga se istraživanja i fokusiraju na izoliranje i identificiranje takvih starter kultura, kako bi se mogli proizvoditi novi fermentirani mesni proizvodi.

# 4. ZAKLJUČAK

Mikroorganizmi mogu prouzročiti kvarenje proizvoda, negativno utjecati na sigurnost proizvoda i senzorne karakteristike, ali pravilnim odabirom onih koje će se uključiti u starter kulture za proizvodnju autohtonih fermentiranih mesnih proizvoda može se sve to suzbiti i iskoristiti pozitivne strane odabranih mikroorganizama. Oni produktima svog metabolizma i enzimatskom aktivnošću pomažu procesu zrenja mesa, postizanju željenih senzornih osobina mesnih proizvoda i stoga ih je poželjno dodavati kao funkcionalne starter kulture. Općenito, bakterije mliječne kiseline i koagulaza-negativni stafilokoki, kvasci i plijesni važni su za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda. Teži se selekciji pripadnika autohtone mikrobiote kako bi se dobile starter kulture prilagođene točno određenom mesnom proizvodu, a koje pokazuju izrazito pozitivan učinak na kvalitetu, trajnost i sigurnost proizvoda. Time se očekuje napredak u vidu standardiziranja kvalitete i kakvoće proizvoda ali i sigurnosti za zdravlje potrošača. Zaključno, korištenjem tako dobivenih autohtonih starter kultura mogu se proizvoditi fermentirani mesni proizvodi karakteristični za regiju ili područje proizvodnje.

## 5. LITERATURA


1. BABIĆ, I., K. MARKOV, I. SVETEC, A. TRONTEL, A. SLAVICA, J. ĐUGUM, D. ČVEK, S. POSAVEC, D. KOVAČEVIĆ, J. FRECE (2011.): Identification and characterisation of potential autochthonous starter cultures from Croatian „brand“ product „Slavonski kulen“. Meat Sci. 88, 517-524.
2. BARIŠIĆ, A. (2010.): Izolacija, identifikacija i karakterizacija prirodne mikrobne populacije iz tradicionalnih mesnih proizvoda. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
3. BASSI, D., E. PUGLISI, P. S. COCCONELLI (2015.): Comparing natural and selected starter cultures in meat and cheese fermentations. Curr. Opin. Food Sci. 2, 118-122.
4. BONOMO, M. G., A. RICCIARDI, T. ZOTTA, M. A. SICO, G. SALZANO (2009.): Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci from traditionally fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). Meat Sci. 83, 15-23.
5. CETIN, S. (2014.): Fermentirani mesni proizvodi. PowerPoint prezentacija u sklopu kolegija „Principi biotehnološke proizvodnje hrane“. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
6. CHERROUD, S., A. CACHALDORA, S. FONSECA, A. LAGLAOUI, J. CARBALLO, I. FRANCO (2014.): Microbiological and physicochemical characterization of dry-cured Halal goat meat. Effect of salting time and addition of olive oil and paprika covering. Meat Sci. 98, 129-134.
7. COCCONCELLI, P. S. (2007.): Starter cultures: bacteria. U: Handbook of fermented meat and poultry. (Toldrá, F., Y. H. Hui, I. Astiasaran, W. K. Nip, J. G. Sebranek, E. T. F. Silveira, L. H. Stahnke, R. Talon, ur.). Blackwell Publishing Professional. Iowa, USA. 137-146.
8. COMI, G., S. ORLIĆ, S. REDŽEPOVIĆ, R. URSO, L. IACUMIN (2004.): Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. Int. J. Food Microbiol. 96, 29-34.
9. COMI, G., R. URSO, L. IACUMIN, K. RANTSIOU, P. CATTANEO, C. CANTONI, L. COCOLIN (2005.): Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. Meat Sci. 69, 381-392.

10. DANILOVIĆ, B., D. SAVIĆ (2016.): Microbial Ecology of Fermented Sausages and Dry-Cured Meats. U: Fermented Meat Products: Health Aspects. (Zdolec, N., ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 127-166.
11. EREŠ, T. (2011.): Izolacija i identifikacija starter kultura iz fermentiranih trajnih kobasica. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
12. FRAQUEZA M. J., L. PATARATA, A. LAUKOVÁ (2016.): Protective Cultures and Bacteriocins in Fermented Meats. U: Fermented Meat Products: Health Aspects. (Zdolec, N., ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 228-269.
13. FRECE, J., K. MARKOV, D. KOVAČEVIĆ (2010.a): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. Meso. XII, 92-98.
14. FRECE, J., K. MARKOV, D. KOVAČEVIĆ (2010.b): Stafilokoki kao potencijalne izvorne starter kulture iz slavonskog kulena. Meso. XII, 150-155.
15. FRECE, J., D. ČVEK, D. KOVAČEVIĆ, I. GOBIN, T. KRCIVOJ, K. MARKOV (2010.c): Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“ kao probiotičke funkcionalne starter kulture. Meso. XII, 210-216.
16. FRECE, J., J. PLEADIN, K. MARKOV, N. PERŠI, V. DUKIĆ, F. DELAŠ (2010.d): Mikrobna populacija, kemijski sastav i mikotoksini u kobasicama s područja Varaždinske županije. Vet. Stanica. 41, 189-198.
17. FRECE, J., K. MARKOV, F. DELAŠ (2011.): Tradicionalni fermentirani mesni proizvodi – izvor autohtonih funkcionalnih starter kultura. Zbornik radova: Četvrti stručni skup „Funkcionalna hrana u Hrvatskoj“. 6-11.
18. FRECE, J., D. KOVAČEVIĆ, S. KAZAZIĆ, J. MRVČIĆ, N. VAHČIĆ, D. JEŽEK, M. HRUŠKAR I., BABIĆ, K. MARKOV (2014.): Comparison of Sensory Properties, Shelf-Life and Microbiological Safety of Industrial Sausages Produced with Aautochthonous and Commercial Starter Cultures. Food Technol. Biotechnol. 52, 307-316.
19. FRECE, J., K. MARKOV (2016.): Autochthonous Starter Cultures. U: Fermented Meat Products: Health Aspects. (Zdolec, N., ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 270-293.

20. FULLADOSA, E., M. GARRIGA, B. MARTÍN, M. D. GUÀRDIA, J. A. GARCÍA-REGUEIRO, J. ARNAU (2010.): Volatile profile and microbiological characterization of hollow defect in dry-cured ham. Meat Sci. 86, 801-807.
21. GARCÍA, I., J. M. ZUMALACÁRREGUI, V. DIEZ (1995.): Microbial succession and identification of *Micrococcaceae* in dried beef cecina, an intermediate moisture meat product. Food Microbiol. 12, 309-315.
22. GAZZOLA, S., C. FONTANA, D. BASSI, P. S. COCCONCELLI (2012.): Assesment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and – independent methods. Food Microbiol. 30, 348-354.
23. HAMMES, W. P., R. F. VOGEL (1995.): The genus Lactobacillus. U: Genera of lactic acid bacteria. (Wood., B. J. B., W. H. Holzapfel, ur.). Blackie Academic & Professional. Glasgow, Scotland. 19-54.
24. HAMMES, W. P., C. HERTEL (1998.): New developments in meat starter cultures. Meat Sci. 49, 125-138.
25. HENDAK, M. (2017.): Javnozdravstveni značaj fermentiranih mesnih proizvoda. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
26. HUTKINS, R. W. (2006.): Meat Fermentation. U: Microbiology and technology of fermented foods. (Hutkins, R.W., ur.). Blackwell Publishing Professional. Iowa, USA. 207-232.
27. KEGALJ, A., M. KRVAVICA, I. LJUBIČIĆ (2012.): Raznolikost mikroflore u mesu i mesnim proizvodima. Meso. XIV, 239-245.
28. KLEIN, G., A. PACK, C. BONAPARTE, R. REUTER (1998.): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 41, 103-125.
29. KOVAČEVIĆ, D. (2001.): Kemija i tehnologija mesa i ribe. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište J.J. Strossmayera, Grafika Osijek.
30. KOZAČINSKI, L., E. DROSINOS, F. ČAKLOVICA, L. COCOLIN, J. GASPARIK-REICHDART, S. VESKOVIĆ (2008.): Investigation of Microbial Association of Traditionally Fermented Sausages. Food Technol. Biotechnol. 46, 93-106.
31. LANDETA, G., I. REVERÓN, A. V. CARRASCOSA, B. DE LAS RIVAS, R. MUÑOZ (2011.): Use of recA gene sequence analysis for the identification of *Staphylococcus equorum* strains predominant on dry-cured hams. Food Microbiol. 28, 1205-1210.

32. LEROY, F., J. VERLUYTEN, L. DE VUYST (2006.): Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Int. J. Food Microbiol. 106, 270-285.
33. LONČAR, Z. (2011.): Prirodna mikrobna populacija tradicionalnih mesnih proizvoda i njihova antimikrobna svojstva. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
34. LORENZO, J. M., M. C. GARCÍA FONTÁN, M. GÓMEZ, S. FONSECA, I. FRANCO, J. CARBALLO (2012.): Study of the *Micrococcaceae* and *Staphylococcaceae* throughout the manufacture of dry-cured Lacón (a Spanish traditonal meat product) made without or with additives. J. Food Res. 1, 200-211.
35. MAURIELLO, G., A. CASABURI, G. BLAIOTTA, F. VILLANI (2004.): Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. Meat Sci. 67, 149-158.
36. MEDIĆ, H. (2016.): Technology of Fermented Meat Products. U: Fermented Meat Products: Health Aspects. (Zdolec, N., ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 27-48.
37. NEŽAK, J. (2008.): Prednosti i nedostaci proizvodnje kulena sa starter kulturama u odnosu na tradicionalnu proizvodnju. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
38. 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. XII, 89-95.
39. OCKERMAN, H. W., L. BASU (2016.): Current Status of Fermented Meat Production. U: Fermented Meat Products: Health Aspects. (Zdolec, N., ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 15-48.
40. OIKI, H., H. KIMURA, N. ZDOLEC (2016.): Traditional Production of Fermented Meats and Related Risk. U: Fermented Meat Products: Health Aspects. (Zdolec, N., ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 49-57.
41. PETANJEK, Z. (2019.): Potencijal primjene bakteriocina bakterija mliječne kiseline u proizvodnji mliječnih proizvoda. Diplomski rad. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
42. ROSS, R.P., S. MORGAN, C. HILL (2002.): Preservation and fermentation: past, present and future. Int. J. Food Microbiol. 79, 3-16.

43. SIMONOVA, M., V. STROMPFOVA, M. MARCINAKOVA, A. LAUKOVA, S. VESTERLUND, M. L. MORATALLA, S. BOVER-CID, C. VIDAL-CAROU (2006.): Detection, purification and efficacy of warnerin produced by *Staphylococcus warneri*. World J. Microbiol. and Biotech. 22, 865-872.
44. ŠUŠKOVIĆ, J. (2006.): Fermentacija kiselog kupusa, predavanje iz kolegija „Probiotici i starter kulture“. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
45. ŠUŠKOVIĆ, J. (2008.): Starter kulture – temelj fermentirane i funkcionalne hrane, predavanja iz kolegija „Probiotici, prebiotici i starter kulture“. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
46. TOLDRÁ, F. (2007.): Handbook of Fermented Meat and Poultry, 1st ed., Blackwell Publishing Professional. Iowa, USA. 142-180.
47. TRUNTIĆ, V. (2007.): Utjecaj starter kultura na senzorska svojstva fermentiranih kobasica. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
48. URSO, R., C. GIUSEPPE, L. COCOLIN (2006.): Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. Systematic and Appl. Microbiol. 29, 671-680.
49. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ (2007.a): Postupak biokonzerviranja u proizvodnji fermentiranih kobasica. Meso. IX, 103-109.
50. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ, S. MARCINČAK, Ž. KUZMANOVIĆ (2007.b): Protective effect of *Lactobacillus sakei* in fermented sausages. Arch. Lebensmittelhyg. 58, 152-155.
51. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA, I. FILIPOVIĆ, M. ŠKRIVANKO, K. LESKOVAR (2008.): Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin. Meat Sci. 80, 480-487.
52. 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.
53. ZDOLEC, N. (2016.): Antimicrobial resistence of fermented food bacteria. U: Fermented Foods: Part 1. Biochemistry and Biotechnology. (D. Montet i R. C. Ray, ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 264-282.

# 6. SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je prikazati važnost i ulogu mikroorganizama koji prirodno potječu iz mesnih proizvoda, a važan su čimbenik za fermentaciju kako autohtonih tako i svih drugih fermentiranih mesnih proizvoda. U radu su prikazana istraživanja čija je svrha bila izolirati i identificirati mikroorganizme prirodno prisutne u proizvodu i usporediti njihov učinak sa starter kulturama, da bi se prepoznale pozitivne strane upotrebe starter kultura. Mikroorganizmi koji se ističu svojom pojavnošću i utjecajem su bakterije mliječne kiseline, stafilokoki, kvasci i plijesni. Svaki od navedenih ima određenu metaboličku, enzimatsku ili drugu aktivnost kojom može samostalno ili zajedno s drugim mikroorganizmima značajno doprinijeti svojstvima konačnog proizvoda. Važnost prirodno prisutnih mikroorganizama odnosi se na primjenu u obliku starter kultura kako bi se dobio proizvod karakterističan za podneblje proizvodnje u smislu senzornih svojstava, a s druge strane kako bi se ostvario napredak prema poboljšanju sigurnosti, higijenske ispravnosti, trajnosti i standardizaciji gotovog proizvoda. Implementacija autohtonih funkcionalnih starter kultura ima za cilj poboljšanje senzornih karakteristika proizvoda, ali ne da ih toliko promijeni da proizvod više ne bi bio prepoznatljiv kao takav. S obzirom da se danas sve više teži zdravom životu sa što manje „umjetnih“ aditiva (što prirodnija hrana) i smanjenju onečišćenja okoliša, potrošačima treba pružiti sigurnu hranu dobivenu proizvodnim procesima s minimalnim utjecajem na okoliš. Autohtoni fermentirani mesni proizvodi su sami po sebi primamljivi potrošačima zbog svoje autentičnosti, a unaprjeđenje načina proizvodnje i poboljšanje karakteristika zasigurno će im osigurati dodatnu vrijednost.

Ključne riječi: fermentirani mesni proizvodi, autohtona mikrobiota, starter kulture, bakterije mliječne kiseline, stafilokoki

## 7. SUMMARY

BIODIVERSITY OF MICROBIOTA OF CROATIAN AUTOCHTHONOUS MEAT PRODUCTS

The aim of this study was to present the importance and role of microorganisms which naturally originate from meat products, as an important factor for fermentation of both autochthonous and every other fermented meat products. Research whose purpose was to isolate and identify microorganisms which naturally occur in products and compare their effect to starter cultures effect, in order to recognize positive aspects of using starter cultures, was reviewed in this study. Microorganisms which stand out due to their appearance and impact are lactic acid bacteria, staphylococci, yeasts and moulds. Each of the aforementioned has a specific metabolic, enzymatic or other activity that can significantly contribute to the properties of the final product, independently or along with other microorganisms. The importance of naturally occurring microorganisms refers to their administration as starter cultures in order to obtain a product indigenous to the production area in the context of sensory properties, and on the other hand to achieve progress towards improving safety, hygienic quality, durability and standardization of the final product. The implementation of autochthonous functional starter cultures aims to improve the sensory characteristics of the product, but not to change them so much that the product would no longer be recognizable as such. Given that today there is an increasing effort to live a healthy life with as few „artificial“ additives as possible (more natural food) and to reduce environmental pollution, consumers should be provided with safe food obtained through production processes with minimal impact on the environment. Autochthonous fermented meat products by themselves are attractive to consumers due to their authenticity and the improvement of their production methods and features will surely provide them additional value.

Key words: fermented meat products, autochthonous microbiota, starter cultures, lactic acid bacteria, staphylococci

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25. lipnja 1997. godine u Bjelovaru. Pohađala sam Područnu školu Nove Plavnice do 4. razreda osnovne škole, a zatim I. osnovnu školu Bjelovar od 5. do 8. razreda. Po završetku osnovne škole upisala sam Opću gimnaziju u Bjelovaru koju sam završila 2016. godine s odličnim uspjehom. Tijekom osnovne i srednje škole pohađala sam i dodatne satove engleskog jezika u Pučkom otvorenom učilištu u Bjelovaru. Integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2016. godine i na 5. godini studija opredijelila sam se za smjer Higijena i tehnologija animalnih namirnica i veterinarsko javno zdravstvo, a svaku godinu studija do sada završila sam s odličnim uspjehom.