

Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu

J. Frece¹, K. Markov¹ i D. Kovačević²

Znanstveni rad

Sažetak

Svrha ovog rada bila je izolirati autohtonu mikrobnu populaciju iz uzoraka slavonskih kulena proizvedenih na tradicionalan način u seoskim domaćinstvima. Autohtona mikrobna populacija izvor je sojeva za razvoj starter kultura koje će, između ostalog, utjecati na aromu i teksturu određenog tradicionalnog mesnog proizvoda. Dominantna mikrobna populacija sastojala se od bakterija mliječne kiseline (BMK) i to: *Lactobacillus plantarum* u dva uzorka, *Lactobacillus delbrueckii* u dva uzorka, te *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus acidophilus* u po jednom uzorku kulena. Također, su prevladavale i bakterije iz roda *Staphylococcus*, tipični predstavnici starter kultura za meso, i to: *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. lentus* i *S. auricularis* u broju od 3,30-5,56 log₁₀CFU/g uzorka. U dva uzorka kulena izolirani su i kvasci, predstavnici starter kultura za meso: *Candida famata*. Kvasci su izolirani s površine ovoja i iz sredine kulena u broju 3,48 - 6,48 log₁₀CFU/g. Za površine 4 od 6 analiziranih kulena izolirane su plijesni iz roda *Penicillium* sp. i *Aspergillus* sp. S obzirom na prisutnost plijesni, u uzorcima kulena se određivala i prisutnost mikotoksina. Koncentracije mikotoksina bile su od 0,9 - 1,6 ppb za okratoksin A (OTA) i 0,1 - 0,5 ppb za aflatoksin B1 (AFB1) te su osim u površinskom sloju, utvrđeni i u središtu kulena. U uzorcima kulena sa kojih nisu izolirane plijesni, nije dokazana ni prisutnost mikotoksina. Svi izolati BMK pokazali su znatno antimikrobno djelovanje prema patogenim test mikroorganizmima, te pokazali jedno od važnih svojstava potencijalnih starter kultura. **Ključne riječi:** slavonski kulen, autohtona mikrobna populacija, starter kulture, mikotoksini

Uvod

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). Istraživanja prirodne, autohtone mikrobne populacije fermentiranih mesnih proizvoda, usmjerena su na praćenje promjena u populaciji pojedinih skupina mikroorganizama, tijekom različitih faza zrenja, da bi se utvrdilo koja skupina mikroorganizama je najodgovornija za stvaranje arome, okusa i boje danog proizvoda. Prema do-

sadašnjim spoznajama najaktivniji mikroorganizmi u nadjevu fermentiranih mesnih proizvoda su 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).

BMK imaju značajnu ulogu u zaštiti mesa od kvarenja, s obzirom da proizvode mliječnu kiselinu, bakteriocine i na taj način inhibiraju rast patogena te poboljšavaju sigurnost, stabilnost i trajnost mesnih proizvoda. Nadalje, imaju važnu ulogu u stvaranju arome, teksture i boje mesnih

proizvoda, kroz proizvodnju malih količina octene kiseline, etanola, diacetila i CO₂. Mikrokokci se javljaju u mesnim proizvodima sa duljim vremenom zrenja. Staflokokci su važni za stabilizaciju boje, zbog aktivnosti nitrat reduktaze, razgradnje peroksida, također su odgovorni za aromu, zbog njihove proteolitičke i lipolitičke aktivnosti te stvaranja kratkolančanih masnih kiselina. Osim njih, pojedine vrste fermentiranih mesnih proizvoda karakterizira i stabilna populacija kvasaca, plijesni te enterokoka. Svi oni utječu zasebno i združeno s tkivnim enzimima, na način i stupanj mijenjanja senzorskih svojstava proizvoda (Kovačević, 2001).

Tablica 1. Najčešće starter kulture za fermentaciju mesa (Hammes, 1998; Šušković, 2008)

Table 1 Most commonly starter cultures for meat fermentation ((Hammes, 1998; Šušković, 2008)

Grupe mikroorganizama/ Groups of microorganisms	Mikroorganizmi/ Microorganisms
Bakterije mliječne kiseline / Lactic acid bacteria	<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 / Yeasts	<i>Debaromyces hansenii</i> <i>Candida famata</i>
Plijesni moulds	<i>Penicillium nalgioense</i> <i>Penicillium crysogenum</i> <i>Penicillium camemberti</i>

Tablica 2. Klasične mikrobiološke i biokemijske (API) metode izolacije i identifikacije mikroorganizama

Table 2 Classical microbiological and biochemical (API) methods of isolation and identification of microorganisms

Mikroorganizmi/ Microorganisms	Metoda/ Method	Hranjive podloge/ Nutrient media	Uvjeti inkubiranja/ Incubation condition	API test/ API test
Bakterije mliječne kiseline/ Lactic acid bacteria	HRN ISO 13721	MRS agar (Biolife)	30 °C 48 - 72 sata/ hours	API 50 CHL V5.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	HRN ISO 6888-1	BP (Merck)	37 °C 48 sati/ hours	API STAPH V4.1
Kvasci i plijesni/ Yeasts and moulds	HRN ISO 13681	Sabouraud agar (Biolife)	25 °C 48 - 72 sata/ hours	API 20 C AUX V4.0 KvasciYeasts

U Hrvatskoj se prirodno fermentirani mesni proizvodi tradicionalno proizvode dugi niz godina, bez potrebe komercijalnih starter kultura, što može rezultirati različitim mikrobiološkom kvalitetom proizvoda, kvalitetom u okusu i konzistenciji. Tradicionalni proizvodi imaju veću kvalitetu, od mesnih proizvoda proizvedenih industrijski, pod kontroliranim uvjetima fermentacije i komercijalnim starter kulturama (Bonomo i sur., 2008)(Tablica 1).

Nadalje, komercijalni starteri se

ne mogu uvijek natjecati sa autohtonom prirodnom mikrobnom populacijom, a nisu niti prilagođeni uvjetima rasta u određenom mesnom proizvodu, pa ponekad ne postizu ni zadovoljavajući stupanj rasta, a time ni zadovoljavajuća senzorska svojstva. Stoga je u novije vrijeme sve veći trend pronalaženja i selekcioniranja novih prirodnih autohtonih potencijalnih starter kultura iz tradicionalnih mesnih proizvoda, koje će biti prilagođene rastu u određenim specifičnim mesnim proizvodima, a imat će takve metaboličke sposob-

nosti koje će znatno utjecati na kvalitetu i sigurnost proizvoda (Šušković i sur., 2001; lacumin i sur., 2006; Urso i sur., 2006; Frece i sur 2009).

Cilj rada je odrediti autohtonu mikrobnu populaciju kulena, izolirati i karakterizirati potencijalne prirodno prisutne autohtone starter kulture i odrediti moguću prisutnost mikotoksina u cijelom presjeku uzoraka kulena.

Materijali i metode

Ekperimenti su provedeni s uzorcima slavonskog kulena proizvedenih u 2009. godini na obiteljskim gospodarstvima iz okolice Osijeka. Klasičnim ISO metodama određen je broj pojedinih mikroorganizama, a biokemijskim testom (API), identifikacija autohtone mikrobne populacije, izolirane iz kulena proizvedenog na tradicionalan način (Tablica 2).

Određivanje aflatoksin A ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metodom

Aflatoksin B1 je određivan pomoću Immunolab Aflatoxin B1 kita, kat. broj AB1-E01, a okratoksin A pomoću Neogen kita – Veratox 8610. Rezultati su očitavani na čitaču mikrotitrarskih pločica (Tecan, Sunrise), pri apsorbanciji od 450 nm za AFB1, te 650 nm za okratoksin A.

Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja izoliranih bakterijskih kultura

Antimikrobno djelovanje izoliranih bakterijskih kultura istraženo je na test mikroorganizmima koji pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu: *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella typhimurium* 3064, *Listeria monocytogenes* ATCC 2356. U jažice mikrotitrarske pločice dodano

¹ dr. sc. Jadranka Frece, docent; dr. sc. Ksenija Markov, docent, Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb; Tel. +385 1 4605 045; E-mail: jgoreta@pbf.hr

² dr. sc. Dragan Kovačević, redoviti profesor, Zavod za prehrambene tehnologije, Prehrambeno-tehnički fakultet Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Kuhačeva 20, 31 000 Osijek

je 240 µL supernatana određenog bakterijskog izolata i 10 µL test mikroorganizma prethodno uzgojenog u hranjivom bujONU. Antibakterijsko djelovanje supernatana bakterijskih izolata na test mikroorganizme, tijekom 72 h uzgoja pri 37 °C, određivano je spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitrarskih pločica (TECAN, Sunrise). Razlika u prividnoj apsorbanaciji kontrole (nacijeljen hranjivi bujon s test mikroorganizmom bez dodanog supernatana bakterijskog izolata) i uzoraka s dodanim supernatantom bakterijskog izolata mjera je inhibicije rasta test mikroorganizma. Slijepe probe su bili uzorci pripremljeni bez dodatka mikroorganizama.

Određivanje stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline

1 mL uzorka se razrijedi s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvijci od 100 mL. Razrijeđeni uzorak se titrira s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator.

$$\%SH = a \cdot 20 \cdot f_{NaOH} \cdot 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = \%SH \cdot 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$(\%SH \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline} (\%))$$

Rezultati titracije izraženi su kao mliječna kiselina (g/L).

Rezultati i rasprava

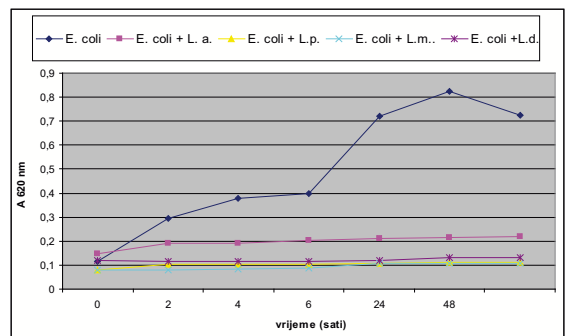
U ovom su radu, za identifikaciju bakterija izoliranih iz slavonskog kulena proizvedenog na tradicionalan način, upotrijebljene klasične mikrobiološke i biokemijske (API) metode. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da postoje određena odstupanja rezultata dobivenim klasičnim mikrobiološkim i biokemijskim – API metodom (tablica 3).

Bakterije iz roda *Salmonella* sp., enterobakterije, sulfireducirajući klostridiji i *L. monocytogenes* nisu doka-

Tablica 3. Mikrobiološki i biokemijski (API) rezultati uzoraka kulena (K1-K6)
Table 3 Microbiological and biochemical (API) results of Slavonian kulen (K1-K6)

UZORCI/SAMPLES	K1	K2	K3	K4	K5	K6
BMK/LAB log ₁₀ CFU/g API 50 CHL V5.1.	4,70 <i>L. plantarum</i>	4,70 <i>L. plantarum</i>	3,70 <i>L. delbrueckii</i>	3,0 <i>L. delbrueckii</i>	9,23 <i>L. mesenteroides</i>	7,78 <i>L. acidophilus</i>
<i>Staphylococcus</i> sp. log ₁₀ CFU/g API STAPH V4.1	4,11 <i>S. xyloso</i>	5,56 <i>S. xyloso</i>	3,30 <i>S. warneri</i>	5,36 <i>S. warneri</i>	3,30 <i>S. lentus</i>	3,30 <i>S. auricularis</i>
Kvasci/Yeasts log ₁₀ CFU/g -površina ovoja/ surface layer	-	-	-	-	5,60	-
-1 cm dubine/deep	-	-	-	-	4,48	-
-2 cm dubine/deep	-	-	-	-	3,70	-
-sredina/center	-	-	-	-	3,48	-
API20C AUX V4.0	-	-	-	-	<i>C. famata</i>	-

Plijesni/moulds	Penicillium sp.	Aspergillus sp.	-	-	Aspergillus sp.	Aspergillus sp.



Slika 1. Inhibicija rasta bakterije *E. coli* 3014 (tijekom 72 sata uzgoja) pomoću izolata bakterija mliječne kiseline: *L. plantarum* K1 (L.p.), *L. delbrueckii* K2 (L.d.), *L. acidophilus* K3 (L.a.) i *L. mesenteroides* K4 (L.m.)

zane na selektivnim podlogama ni u jednom istraživanom uzorku kulena, dok su bakterije *Staphylococcus* vrste dokazane u svih 6 uzoraka na Baird-Parker agaru (BP) kao crne kolonije s halo efektom. Sumnjive kolonije porasle na BP agaru su dodatno identificirane bojanjem po Gramu (gram pozitivni koki); katalaza testom (pozitivan) i koagulaza testom (negativan). Biokemijskim API Staph V4.1. testom ni u jednom uzorku slavons-

skog kulena nije dokazana bakterija *Staphylococcus aureus*, već *S. xyloso* u dva uzorka kulena, *S. warneri* u dva uzorka kulena, te *S. lentus* i *S. auricularis* u po jednom uzorku kulena. S površine 4 uzorka kulena izolirane su plijesni iz roda *Penicillium* sp. i *Aspergillus* sp., te kvasac *Candida famata*, koji je potencijalna starter kultura za meso te je normalna, autohtona populacija mesnih proizvoda. BMK izolirane sa MRS agara – identificira-

Tablica 4. Koncentracija aflatoxina B1 i okratoksina A u uzorcima slavonskog kulena

MIKOTOKSINI/ MYCOTOXINS (ppb)	MJESTO UZORKOVANJA/ SAMPLING	UZORCI KULENA/ SAMPLES OF KULEN					
		K1	K2	K3	K4	K5	K6
OKRATOKSIN A/ OCHRATOXIN A	1 cm dubine/ deep	1,2	1,49	0	0	1,5	1,09
	2 cm dubine/ deep	1,0	1,39	0	0	1,6	0,94
	sredina/center	1,0	1,06	0	0	1,5	0,94
AFB1/AFB1	1 cm dubine/ deep	0,1	0,3	0	0	0,475	0,1
	2 cm dubine/ deep	0	0	0	0	0	0
	sredina/center	0	0	0	0	0	0

Tablica 5. Neki od selekcijskih kriterija za starter kulture
Table 5 Some of selection criteria for starter cultures

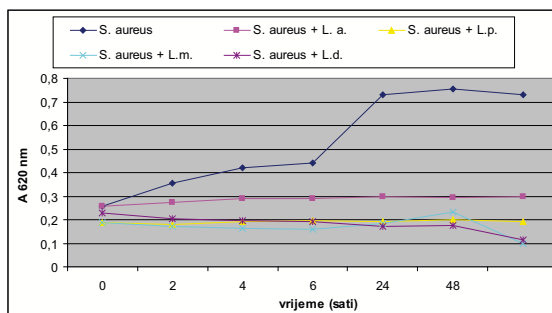
Izolati BMK/Isolate of LAB	Koncentracija mliječne kiseline g/l/ Concentration of lactic acid g/l	pH vrijednost podloge/ pH-value of medium	Katalaza test/ Catalasa test	Homofermentativna vrsta/ Homofermentative species	Heterofermentativna vrsta/ Heterofermentative species
<i>L. plantarum</i> K1	21,96	3,65	+	+	-
<i>L. plantarum</i> K2	22,06	3,60	+	+	-
<i>L. delbrueckii</i> K3	26,5	3,34	+	+	-
<i>L. delbrueckii</i> K4	26,95	3,25	+	+	-
<i>L. mesenteroides</i> K5	14,76	3,95	-	-	+
<i>L. acidophilus</i> K6	22,45	3,60	+	+	-

ne su pomoću API 50 CHL V5.1 testa (tablica 3). Sastav mikroflora karakterističan je za svaki tip ili vrstu fermentiranih mesnih proizvoda, što je uvjetovano higijenskom kakvoćom upotrijebljene sirovine i dodataka, tehnološkim postupcima, te mikro-klimatskim uvjetima zrenja. Rezultati istraživanja su pokazali da su izolirane potencijalne starter kulture, koje su prirodna mikroflora kulena. Dominantna mikroflora u uzorcima su bile BMK i stafilocoki, koji su i inače najzastupljenija mikrobna populacija u mesnim proizvodima (Comi i sur. 2005). BMK proizvode mliječnu kiselinu, snižavaju pH proizvoda i na taj način inhibiraju rast acidoneterantnih patogenih mikroorganizama (Šušćević i sur. 2001; Frece i sur. 2005 a, Frece i sur., 2005 b; Zdolec i sur. 2005). Rezultati naših istraživa-

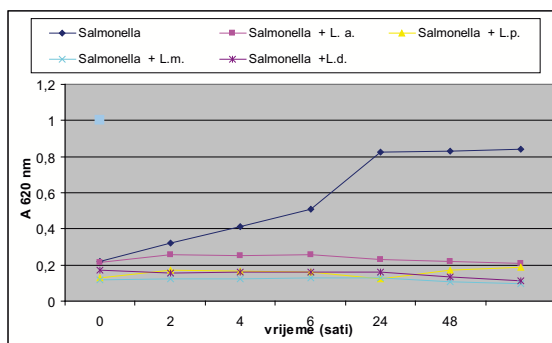
nja su u skladu s rezultatima drugih autora (Comi i sur., 2005; Urso i sur., 2006; Simonova i sur., 2006), koji su u tradicionalnim fermentiranim kobasicama izolirali samo BMK i stafilocoke, nešto kvasaca, ali ne i patogene mikroorganizme. Kvasci i plijesni također imaju važnu ulogu u zrenju kobasica. Kvasci doprinose razvoju senzorskih svojstava fermentiranih kobasica, ali i drugih mesnih proizvoda, zbog svoje lipolitičke i proteolitičke aktivnosti (Kovačević, 2001; Alagić i sur., 2008). Kvasci izolirani iz fermentiranih mesnih proizvoda su najčešće halofili: *Debaromyces hansenii*, *Candida famata*, *Candida zeylanoides*, *Trichosporon* sp., *Cryptococcus* sp. i *Rhodotorula* sp. (Nielsen i sur., 2008). Rezultati naših istraživanja su pokazali da je u 2 uzorka kulena pronađen kvasac *C. famata*

što je u suglasju s rezultatima drugih autora (Encinas i sur., 2000; Nielsen i sur., 2008), koji su dokazali da je kvasac *C. famata* autohtona mikrobna populacija u tradicionalnim fermentiranim kobasicama, a koji je odgovoran za aromu i boju proizvoda. Rezultati naših istraživanja su pokazali da su svi uzorci kulena mikrobiološki ispravni jer nisu pronađene patogene vrste mikroorganizama. Međutim, prema istraživanjima nekih autora (Kozadžinski i sur., 2008; Šimić i Mikić, 2008), u nekim od uzoraka tradicionalnih trajnih kobasica i češnjovki, pronađene su patogene vrste kao sulfireducirajući klostridiji i *Enterococcus faecalis*, te *S. aureus* u kobasicama od konjskog mesa. S obzirom, da su sa površine četiri od šest uzoraka kulena izolirane plijesni iz roda *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. (tablica 3), određivala se i potencijalna prisutnost okratoksina A i aflatoxina B1, ELISA metodom (tablica 4).

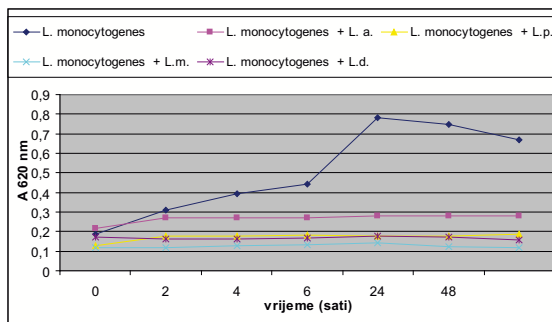
Izvor mikotoksina u uzorcima mogu biti same plijesni, ali i začini koji se dodaju u kulen. Uzorkovanje je provedeno prema Pravilniku o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina mikotoksina u hrani (NN 45/08), a uzorci su uzimani na dubini 1 i 2 cm mjereno od površine kulena te iz sredine kulena, kako bi se vidjelo koliko duboko mikotoksini prodiru u kulen (tablica 4). U četiri od šest uzoraka slavonskog kulena s kojih su izolirane plijesni dokazana je prisutnost AFB1 od 0,1 - 0,5 ppb i okratoksina A od 0,9 - 1,6 ppb. Iz rezultata istraživanja se može zaključiti da izolirane plijesni *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. mogu sintetizirati mikotoksine, budući da u uzorcima koji nisu bili pljesniv i mikotoksini nisu dokazani (tablica 4). Zanimljivo je da je okratoksin A pronađen i u sredini kulena, dok AFB1 samo uz površinu, do dubine 1 cm. Također, na uzorku kulena sa kojeg su izolirane obje plijesni, i *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp., kao mješovita kultura dokazana je manja



Slika 2. Inhibicija rasta bakterije *S. aureus* 3048 (tijekom 72 sata uzgoja) pomoću izolata bakterija mliječne kiseline: *L. plantarum* K1 (L.p.), *L. delbrueckii* K2 (L.d.), *L. acidophilus* K3 (L.a.) i *L. mesenteroides* K4 (L.m.).



Slika 3. Inhibicija rasta bakterije *Salmonella typhimurium* 3064. (tijekom 72 sata uzgoja) pomoću izolata bakterija mliječne kiseline: *L. plantarum* K1 (L.p.), *L. delbrueckii* K2 (L.d.), *L. acidophilus* K3 (L.a.) i *L. mesenteroides* K4 (L.m.).



Slika 4. Inhibicija rasta bakterije *L. monocytogenes* ATCC 2356 (tijekom 72 sata uzgoja) pomoću izolata bakterija mliječne kiseline: *L. plantarum* K1 (L.p.), *L. delbrueckii* K2 (L.d.), *L. acidophilus* K3 (L.a.) i *L. mesenteroides* K4 (L.m.).

koncentracija okratoksina A i AFB1, u odnosu na uzorke s kojih su izolirane čiste kulture plijesni (tablica 3 i 4). To se može objasniti da *Penicillium* sp. i *Aspergillus* sp. djeluju antagonistički, inhibirajući rast i proizvodnju mikotoksina. Rezultati istraživanja drugih autora (Mandić i sur., 2007) su sukladni našim rezultatima. Oni su također odredili okratoksin A u vrijednosti od 3,8 ppb, te AFB1 u vrijednosti od 1,33 ppb u fermentiranim kobasicama. Treba istaknuti da dopuštena količina okratoksina A u mesnim proizvodima nije regulirana niti propisima na razini EU niti u RH.

Sve je veći trend zaštite i konzerviranja hrane, na prirodan način, kroz poboljšanje mikrobni starter kultura za prehrambenu industriju. U tu svrhu, sve je više istraživanja usmjereno na izolaciju i identifikaciju autohtonih funkcionalnih starter kultura, s ciljem dobivanja novih funkcionalnih mesnih proizvoda, koji će imati oznaku autohtonosti, zbog utjecaja klime i biljne vegetacije kraja u kojem se proizvode, te biti prepoznati kao hrvatski autohtoni proizvod (Frece, 2007). S obzirom da je jedno od najvažnijih svojstava funkcionalnih starter kultura inhibicija patogena, u ovom radu istražena je antimikrobna aktivnost izoliranih potencijalnih starter kultura prema patogenim test mikroorganizmima (*Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *E. coli*) koji su najčešći kontaminanti u hrani i određuju se prema Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice za odabranu skupinu proizvoda. Određivanje antimikrobne aktivnosti prema patogenim mikroorganizmima provedeno je disk-difuzijskom metodom i turbidimetrijskom metodom, koja osigurava izravnu interakciju ispitivane supstancije sa stanicama test mikroorganizma.

Svi izolati BMK su pokazali značajnu inhibiciju rasta na sve istraživane patogene test mikroorganizme

tijekom 72 sata uzgoja (slike 1-4). S obzirom, da bakterije mliječne kiseline svoju antimikrobnu aktivnost iskazuju i kroz proizvodnju mliječne kiseline, a kako je jedan od selekcijskih kriterija za starter kulture i proizvodnja mliječne kiseline, svim bakterijskim izolatima BMK određen je i stupanj proizvodnje mliječne kiseline (tablica 5).

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da su svi izolati BMK proizveli znatnu količinu mliječne kiseline (14 - 22 g/L) (najveću količinu kiseline je proizveo izolat *L. Delbrueckii*) te da su snizili pH podloge na vrijednosti između 3 - 4. Nadalje, svi izolati BMK su katalaza pozitivni, izolat *L. acidophilus* je heterofermentativna vrsta BMK, dok su *L. plantarum*, *L. delbrueckii* i homofermentativne vrste BMK, što su još neki od kriterija za starter kulture (tablica 5).

Zaključak

Na osnovu provedenih istraživanja možemo zaključiti da su izolirane potencijalne autohtone funkcionalne starter kulture, koje posjeduju znatnu antimikrobnu aktivnost prema patogenim mikroorganizmima, najčešćim kontaminantima mesa i imaju velik potencijal uporabe kao funkcionalne starter kulture za tradicionalne mesne proizvode. Daljnja istraživanja će ići ka detaljnoj fenotipskoj, genotipskoj i fiziološkoj karakterizaciji izoliranih sojeva BMK i stafilocoka, s ciljem stvaranja „banke“ funkcionalnih autohtonih starter kultura za fermentirane mesne proizvode. Također, u ovom radu je utvrđeno da površinska plijesan slavonskog kulena (*Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp.) je mogući producent mikotoksina okratoksina A i AFB1 koji tijekom višemjesečnog zrenja i skladištenja prodiru do središta kulena.

Literatura

Alagić D., L. Kozaciński, I. Filipović, N. Zdolec, M. Hadžiosmanović, B. Njari, Z.

Kozaciński, S. Uhitil (2008): Mikrobiološke promjene tijekom zrenja fermentiranih kobasica od konjskog mesa. *Meso X*, 200-203.

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.

Comi G., R. Urso, L. Iacumin, K. Rantisiou, P. Cattaneo, C. Cantoni, L. Cocolin (2005): Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* 69, 381-392.

Encinas J.P., T.M. Lopez-Diaz, M.L. Garcia-Lopez, A. Otero, B. Moreno (2000): Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 54, 203-208.

Frece, J. (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Frece, J., B. Kos, I.K. Svetec, Z. Zgaga, V. Mrša, J. Šušaković (2005a): Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 98, 285-292.

Frece, J., B. Kos, I.K. Svetec, Z. Zgaga, J. Beganović, A., Leboš, J. Šušaković (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *J. Dairy Res.* 76, 98-104.

Frece, J., B. Kos, J. Beganović, S. Vučković, J. Šušaković (2005b): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 21, 1401-1408.

Hammes W.P., C. Hertel (1998): New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49, 125-138.

Iacumin L., G. Comi, C. Cantoni, L. Cocolin (2006): Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosum* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Sci.* 74, 281-288.

Kovačević D. (2001): Kemija i tehnologija mesa i ribe, Sveučilište J.J. Strossmayera, Prehrambeno tehnološki fakultet, PTF Osijek

Kozaciński L., M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtila Fleck, N. Zdolec, I. Filipović, Z.

Kozaciński (2008): Kakvoća trajnih kobasica i češnjovki iz individualnih domaćinstava. *Meso X*, 1, 45-52.

Mandić S., R. Grujić, Lj. Topalić-Trivunović, Đ. Radenko, S. Stojković (2007): Izvori mikološke i mikotoksiološke kontaminacije dimljenih suvomesnatih proizvoda. *Tehnologija mesa*, 48, 157-162.

Nielsen D.S., T. Jacobsen, L. Jespersen, A. G. Koch, N. Arneborg (2008): Occurrence and growth of yeasts in processed meat products-implications for potential spoilage. *Meat Sci.* 80, 919-926.

Simonova M., V. Strompfova, M. Marcinakova, A. Laukova, S. Vesterlund, M.L. Moratalla, S. Bover-Cid, C. Vidal-Carou (2006): Characterization of *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Sci.* 73, 559-564.

Šimić, D., B. Mioković (2008): Prilog poznavanju suhih kobasica od konjskog mesa („Piketa“) iz okolice Pakraca. *Meso X*, 4, 292-296.

Šušaković, J. (2008): Starter kulture – temelj fermentirane i funkcionalne hrane, predavanja iz kolegija „Probiotici, prebiotici i starter kulture“

Šušaković, J., B. Kos, J. Goreta, S. Matošić (2001): Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* 39, 227-235.

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.

Zdolec N., M. Hadžiosmanović, L. Kozaciński, I. Filipović (2005): Utjecaj bakteriocina na mikrobiološku kakvoću fermentiranih kobasica. *Meso VII*, 43-47.

Zdolec N., M. Hadžiosmanović, L. Kozaciński, Ž. Cvrtila, I. Filipović, K. Lesković, N. Vragović, D. Budimir (2007): Fermentirane kobasice proizvedene u domaćinstvu – mikrobiološka kakvoća. *Meso IX*, 6, 318-324.

Pravilnik o planu uzorkovanja i metoda analiza za službenu kontrolu količina mikotoksina u hrani, Narodne novine broj 45/08.

Dostavljeno: 2.3.2010.
Prihvaćeno: 14.3.2010.

Determination of indigenous microbial populations, mycotoxins and characterization of potential starter cultures in Slavonian kulen

Summary

The purpose of this study was to isolate the indigenous microbial population of samples from the Slavonian kulen produced in the traditional way in rural households. Autochthonous microbial population are potential starter cultures, which can be used to obtain top quality flavour and texture certain traditional meat products. Dominant microbial populations consisted of lactic acid bacteria (LAB): *L. plantarum* (4,7 log₁₀ CFU/g) in two samples, *L. delbrueckii* (3,0 log₁₀ CFU/g) in two samples, *L. mesenteroides* (9,23 log₁₀ CFU/g) and *L. acidophilus* (7,78 log₁₀ CFU/g) in one sample of Slavonian kulen. The bacteria from the genus *Staphylococcus* was also dominated microbial population in Slavonian kulen, the typical representatives of starter cultures for meat, as follows: *S. xylosum*, *S. warneri*, *S. lentus* and *S. auricularis* in number from 3.30 - 5.56 log₁₀ CFU / g sample. From two samples of Slavonian kulen were isolated yeasts, representatives of starter cultures for meat: *Candida famata*. Yeasts were isolated from the surface and from the mid of Slavonian kulen in number from 3.48 to 6.48 log₁₀ CFU / g. From the surface 4 of 6 analyzed kulen were isolated molds from the genus *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. Considering the presence of mold in samples of Slavonian kulen, the presence of mycotoxins were also determined. Mycotoxin concentrations were 0.9 to 1.6 ppb for ochratoxin A (OTA) and 0.1 to 0.5 ppb for aflatoxin B1 (AFB1) and were defined not only on the surface layer, but also in the centre of Slavonian kulen. In the samples of kulen which were not isolated molds, it was not proven the presence of mycotoxins. All LAB isolates showed significant antimicrobial activity against tested pathogenic microorganisms, and showed one of the important properties of potential starter cultures.

Keywords: Slavonian kulen, autochthonous microbial populations, starter culture, mycotoxins

Bestimmung der autochtonen mikrobiellen Population und Mykotoxinen und Charakterisation von potentiellen Starterkulturen im Slawonischen Kulen

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die autochtone mikrobielle Population aus den Mustern des Slawonischen Kulens, hergestellt auf traditionelle Weise in bäuerlichen Haushalten, zu isolieren. Die autochtone mikrobielle Population ist die potentielle Starterkultur, die zur Erreichung einer hervorragenden Aroma und Textur des bestimmten traditionellen Fleischerzeugnisses, dienen kann. Die dominante mikrobielle Population bestand aus Bakterien der Milchsäure (BMK) u.zw: *L. plantarum* (4,7 log₁₀ CFU/g) in zwei Mustern, *L. delbrueckii* (3,0 log₁₀ CFU/g) in zwei Mustern, sowie *L. mesenteroides* (9,23 log₁₀ CFU/g) und *L. acidophilus* (7,78 log₁₀ CFU/g) in einem Kulenmuster. Genauso überwiegen Bakterien aus der Art *Staphylococcus*, typische Vertreter der Starterkulturen für Fleisch, u.zw: *S. xylosum*, *S. warneri*, *S. lentus* und *S. auricularis* in Zahl von 3,30-5,56 log₁₀ AFU/g des Mustern. In zwei Kulenmustern sind auch Hefen isoliert, Vertreter von Starterkulturen für Fleisch: *Candida famata*. Die Hefen wurden von Hüllfläche und aus der Kulenmitte in Zahl 3,48 - 6,48 log₁₀ CFU/g isoliert. Von der Fläche 4 von 6 analysierten Kulen wurden Schimmel aus der Art *Penicillium* sp. und *Aspergillus* sp. isoliert. Mit Bezug auf die Anwesenheit von Schimmel wurde in Kulenmustern auch die Anwesenheit von Mykotoxinen bestimmt. Die Konzentrationen von Mykotoxinen waren von 0,9 - 1,6 ppb für Okratoxin A (OTA) und 0,1 - 0,5 ppb für Aflatoxin B1 (AFB1) und wurden sowohl auf der oberen Fläche als auch in der Mitte bestimmt. In Kulenmustern, aus denen keine Schimmelarten isoliert wurden, wurde auch keine Anwesenheit von Mykotoxinen festgestellt. Alle BMK Isolate zeigten bedeutende antimikrobielle Wirkung gegenüber pathogenen test Mikroorganismen, und zeigten eine der wichtigen Eigenschaften der potentiellen Starterkulturen.

Schlüsselwörter: Slawonischer Kulen, autochtone mikrobielle Population, Starterkulturen, Mykotoxine

Determinazione dell'autoctona popolazione microbica di micotossine e la caratterizzazione delle potenziali culture starter nel kulen di Slavonia

Sommario

Lo scopo di quest'articolo era isolare un'autoctona popolazione microbica dai campioni di kulen di Slavonia, prodotti in modo tradizionale a casa, in campagna. L'autoctona popolazione microbica è una potenziale cultura starter che può essere usata per ottenere un'aroma eccezionale e la tessitura di un certo prodotto tradizionale, fatto di carne. La dominante popolazione microbica conteneva i seguenti batteri dell'acido lattico (BLA): il *L. plantarum* (4,7 log₁₀ CFU/g) in due campioni, il *L. delbrueckii* (3,0 log₁₀ CFU/g) in due campioni, il *L. mesenteroides* (9,23 log₁₀ CFU/g) ed il *L. acidophilus* (7,78 log₁₀ CFU/g) in un campione di kulen. Bisogna aggiungere che prevallevano i batteri del genere *Staphylococcus*, i rappresentanti tipici delle culture starter per la carne, come segue: il *S. xylosum*, il *S. warneri*, il *S. lentus* ed il *S. auricularis* nel numero di 3,30-5,56 log₁₀ CFU/g del campione. In due campioni di kulen sono stati isolati anche i lieviti, rappresentanti di culture starter per la carne: la *Candida famata*. I lieviti sono stati isolati dalla superficie di imballaggio di kulen (l'intestino dall'origine animale) e dalla parte centrale di kulen nel numero di 3,48 - 6,48 log₁₀ CFU/g. Da 4 superfici di 6 kulen analizzati sono state isolate le muffe del genere *Penicillium* sp. e l'*Aspergillus* sp. Siccome la muffa era presente nei campioni di kulen, è stata analizzata anche la presenza di micotossine. Le concentrazioni di micotossine variavano da 0,9 - 1,6 ppb per l'ocratossina A (OTA) e 0,1 - 0,5 ppb per l'aflatossina B1 (AFB1), che sono state determinate sia nella superficie che nella parte centrale di kulen. Nei campioni di kulen dai quali non sono state isolate le muffe, non è nemmeno stata determinata la presenza di micotossine. Tutti gli isolati di BLA hanno dimostrato una notevole azione antimicrobica nei confronti di patogeni test microorganismi, e hanno rivelato una delle importanti caratteristiche di potenziali culture starter.

Parole chiave: kulen di Slavonia, autoctona popolazione microbica, culture starter, micotossine

Analiza rizika i sustav osiguranja sigurnosti hrane u proizvodnji polutrajnih kobasica

N. Uršulin-Trstenjak¹, N. Vahčić², H. Medić², S. Vidaček², S. Šabić³

Znanstveni rad

Sažetak

Mesnoj industriji cilj je proizvodnja sigurnih i kvalitetnih proizvoda uz optimalno korištenje svojih sveukupnih resursa. Stoga su poduzete sve mjere u osiguranju sigurnosti proizvoda, te se započelo s primjenom analize rizika i nadzora nad kritičnim kontrolnim točkama kako bi se sustavno analizirali svi koraci proizvodnog procesa i uvele preventivne mjere, u cilju kontrole cjelokupnog proizvodnog procesa i stvorila zaštita potrošača s obzirom na prisutnost patogena i potencijalnih uzročnika trovanja hranom i to vrste Aerobne mezofilne bakterije, *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, sulfitoreducirajuće klostridije i *Listeria monocytogenes*.

Predmetno istraživanje provodilo se u mesnoj industriji, u tehnološkom procesu proizvodnje polutrajnog kobasičarskog proizvoda – "ivanečki jeger".

Cilj ovog rada je uspostava HACCP sustava kroz analizu rizika, identifikaciju kritičnih kontrolnih točaka i definiranje kontrolnih mjera u svim fazama proizvodnje kao i dvanaesto mjesečno praćenje mikrobiološke slike polutrajnih kobasičarskih proizvoda – "ivanečki jeger" koji govore o prisutnosti ili odsutnosti patogenih mikroorganizama i samim time o zdravstvenoj ispravnosti mesnog proizvoda polutrajne kobasice – "ivanečki jeger".

Rezultati istraživanja ukazuju na proizvodnju sigurne hrane što je danas cilj svake prehrambene industrije i uvjet izlaska naših proizvoda na svjetsko tržište.

Ključne riječi: HACCP, mesna industrija, kritična kontrolna točka (CCP)

Uvod

Pravilnik o provedbi obvezatnih mjera u odobrenim objektima radi smanjenja mikrobioloških i drugih onečišćenja mesa, mesnih proizvoda i ostalih proizvoda životinjskog podrijetla namijenjenih prehrani ljudi, provedba obvezatnih mjera i poštivanje veterinarsko-sanitarnih uvjeta u objektima za klanje životinja, obradbu, preradbu i uskladištenje proizvoda životinjskog podrijetla osiguravaju smanjenje mikrobioloških opasnosti i zdravstveno ispravne i kvalitetne proizvode uz optimalno korištenje sveukupnih resursa mesne industrije (Anon., 1997).

Nadzor nad sigurnosti hrane uključuje provedbenost senzorskih, fi-

zikalnih, kemijskih i mikrobioloških analiza. Alternativno, zdravstvene ustanove i kompetentna tijela mogu odrediti metodologiju u identifikiranju objekata koji rukuju kontaminiranom hranom kao i mjera za prevenciju kontaminacije hrane. Kao zamjenu za preglede i laboratorijske analize uzoraka osoblja koje radi u proizvodnji i prometu namirnica, novi koncept nudi ciljanu edukaciju o sigurnom rukovanju hranom za radno osoblje. Novi koncept teži proizvodnji sigurnog proizvoda dok prijašnji ističe provođenje mikrobioloških analiza gotovog proizvoda kao kontrolu sigurnosti hrane (Turčić, 2000). Primarna obaveza i odgovornost uprave svih subjekata u poslovanju s hranom je prevencija

uvjeta koji mogu dovesti do razvoja i širenja bolesti koje se prenose hranom (Anon., 1986; WHO, 1989).

U skladu s navedenim, međunarodne organizacije usvojile su razne dokumente s principima kontrole kvalitete i osiguranja sigurnosti hrane koji se odnose na cijeli lanac proizvodnje hrane (Anon, 2003d; Mortimore i Wallace, 2001).

Novi pristup u prevenciji i kontroli bolesti koje se prenose hranom je sustav analize opasnosti procjenom i kontrolom kritičnih točaka – Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). Njime se nastoji prvo prepoznati opasnosti koje se mogu javiti u bilo kojoj fazi proizvodnje, obrade ili

¹ Natalija Uršulin-Trstenjak, Health Polytechnic, 38 Mlinarska St., 10000 Zagreb, Croatia, natalija.ursulin-trstenjak@zvu.hr
² dr. sc. Nada Vahčić, full professor., dr. sc. Helga Medić, assistant professor., dr. sc. Sanja Vidaček, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, 6 Pierottijeva St., 10000 Zagreb, Croatia
³ Srđan Šabić, ing, Meat Industry Ivanec Ltd, 35 Varaždinska St., 42240 Ivanec, Croatia