

# Raznolikost mikroflora u mesu i mesnim proizvodima

Kegalj<sup>1</sup>, A., M. Krvavica<sup>1</sup>, I. Ljubičić<sup>1</sup>

stručni rad

## Sažetak

Pod mesom na tržištu ili u preradi podrazumijeva se mišićje (mišićno tkivo), s kožom ili bez nje, ovisno o vrsti stoke, peradi ili divljači, s pripadnim masnim i vezivnim tkivom, kostima i hrskavicama, krvnim i limfnim žilama, limfnim čvorovima i živcima u prirodnoj vezi. S obzirom na kemijski sastav meso je izrazito pogodan medij za rast i razmnožavanje različitih mikroorganizama. Glavni izvori primarne (početne) mikroflora mesa su same životinje, radnici koji manipuliraju mesom, te proizvodna okolina. U primarnoj mikroflori prevladavaju gram-negativne bakterije uključujući crijevne bakterije *Escherichia coli* i *Salmonella spp.*, te *Pseudomonas spp.*, a od gram-pozitivnih najčešće se nalaze laktobacili i enterokoki. Na svježem trupu se može očekivati i veliki broj plijesni od kojih prevladavaju predstavnici rodova *Penicillium*, *Mucor* i *Cladosporium*, a od kvasaca rodovi *Candida* i *Rhodotorula*. Preživljavanje primarne mikroflora mesa ovisi o stupnju kontaminiranosti (ukupnom broju mikroorganizama), vrsti mikroorganizama, kemijskom sastavu i pH mesa te temperaturi i prisutnosti kisika.

Mikroorganizmi su s jedne strane uzročnici kvarenja mesa, ali istodobno svojim metabolizmom pridonose zrenju mesa, te konačno boji, okusu i mirisu mesa i mesnih prerađevina. Poznavanje optimalnih uvjeta rasta, razvoja i razmnožavanja pojedinih mikroorganizama omogućava upravljanje kvalitetom i održivošću mesa i mesnih proizvoda, te kreiranje tehnoloških postupaka prerade i metoda konzerviranja, a temelj su i za funkcionalno korištenje mikroorganizama u proizvodnji mesnih prerađevina.

**Ključne riječi:** meso, mikroorganizmi, mikroflora

## Uvod

Meso je kao nezamjenjiv izvor bjelancevine, masti, vitamina, minerala i drugih dragocjenih nutritivnih sastojaka od davnina bilo važan čimbenik preživljavanja i mjerilo društvenoga standarda stanovništva. Pod mesom na tržištu ili u preradi podrazumijeva se mišićje (ili mišićno tkivo) s kožom ili bez nje, ovisno o vrsti stoke, peradi ili divljači, s pripadnim masnim i vezivnim tkivom, kostima i hrskavicama, krvnim i limfnim žilama, limfnim čvorovima i živcima u prirodnoj vezi (Anon., 2007). Zbog svog kemijskog sastava (tablica 1) meso je vrlo pogodan medij za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Meso je izrazito pokvarljiva namirnica i ukoliko nije pravilno pohranjeno, obrađeno i pakirano vrlo brzo postaje "opasno" za konzumaciju (Lambaša-Belak i sur., 2005). Međutim, sarkolema koja obavlja mišićno vlakno ujedno ga i štiti od prodora mikroorganizama. U procesu zrenja mesa proteolitički enzimi

(endogenog i mikrobnog podrijetla) razgrađuju sarkolemu "oslobađajući" na taj način sadržaj mišićne stanice. Aktivnost proteolitičkih bakterija u ovom smislu prvenstveno ovisi o njihovom broju, odnosno o količini proteolitičkih enzima koju navedene bakterije proizvode. Stupanj mikrobozne kontaminacije mesa u velikoj mjeri ovisi o zdravstvenom stanju životinje neposredno prije klanja, te o primjeni odgovarajućih higijenskih mjera u postupcima klanja, rukovanja i skladištenja mesa. Kombinacija i interakcija unutarnjih i vanjskih čimbenika kontaminacije određuju mikrobiologiju mesa (McDonald i Sun, 1999). Populacija mikroorganizama koja kolonizira određeno područje naziva se mikroba zajednica ili mikroflora. Mikroorganizmi mesa, kao i ostale hrane, mogu se podijeliti u tri osnovne skupine: korisni, štetni i patogeni. Korisni mikroorganizmi svojim metabolizmom sudjeluju u procesima prerade i sazrijevanja pro-

izvoda (npr. bakterije mliječne kiseline). Štetni mikroorganizmi dovode do kvarenja mesa te rastom i enzimskim reakcijama uzrokuju degradaciju arome, teksture i boje mesa. Patogeni mikroorganizmi uzrokuju različite bolesti koje mogu biti manje ili više opasne po život (Šumić, 2009).

## Primarna mikroflora mesa

Primarna mikroflora mesa je u prvom redu rezultat načina i uvjeta klanja te obrade trupa, a povezana je prvenstveno s prijenosom mikroorganizama s kože životinje na trup tijekom klanja i klaoničke obrade. Glavni izvori primarne mikroflora mesa su životinje, radnici koji manipuliraju mesom, alat i oprema te proizvodna okolina u klaonici. Najveći izvori primarne mikroflora mesa su vanjska površina tijela (koža, runo, perje, dlaka, kopita, papci,...), te probavni i dišni organi. Prema tome, mikrobiološka kakvoća obrađenog trupa prvenstveno ovi-

<sup>1</sup> **Andrijana Kegalj, dipl. ing., dr.sc. Marina Krvavica, Iva Ljubičić, DVM, univ. mag. med. vet.**, Veleučilište "Marko Marulić" u Kninu, Kralja Petra Krešimira IV br. 30, 22300, Knin, Hrvatska; tel: ++385 (0)22 668 123; e-mail:akegalj@veleknin.hr

si o zdravstvenom stanju i vanjskoj mikroflori životinje, te o higijenskim uvjetima klanja i klaoničke obrade. U procesu klanja i klaoničke obrade životinja neminovno, kao posljedica primjene neophodnih postupaka u klaoničkoj obradi (osobito skidanje kože i evisceracija), zbog kontaminacije "izvana" progresivno raste broj mikroorganizama na trupu, dok je kasniji rast broja mikroorganizama povezan s daljnjim razmnožavanjem postojeće mikroflora (Mead, 2007). Navedeno razmnožavanje podrazumijeva nekoliko faza. Tijekom početne tzv. lag-faze mikroorganizmi se postupno prilagođavaju novoj sredini, nema razmnožavanja, odnosno moguć je pad njihovog broja. Slijedi logaritamska ili eksponencijalna faza u kojoj je brzina razmnožavanja mikroorganizama velika i konstantna. Nakon što mikroorganizmi iscrpe hranjivu podlogu, stanice se prestaju dijeliti (stacionarna faza), nakon čega na kraju procesa nastupa tzv. faza izumiranja (Aleksić i sur., 2010).

Mišićno tkivo i unutarnji organi zdravih životinja koji nemaju izravan kontakt s okolinom, smatraju se sterilnim, no u procesu klanja i klaoničke obrade trupa mikroorganizmi se mogu "prenijeti" u krv, tkivo i unutarnje organe. Klanjem bolesnih ili umornih životinja, zbog sveobuhvatne sepse ili bakterijske infekcije životinje u vrijeme klanja, mišićno tkivo i unutarnji organi mogu sadržavati specifične patogene, uzročnike bolesti (Gracey i sur., 1999). U primarnoj mikroflori mesa prevladavaju gram-negativne bakterije uključujući crijevne bakterije *Escherichia coli* i *Salmonella* spp., te vrste roda *Pseudomonas*, dok se od gram-pozitivnih najčešće nalaze laktobacili i enterokoki. Zbog široke rasprostranjenosti u okolišu, na svježem trupu se može očekivati i veliki broj plijesni među kojima prevladavaju različite vrste rodova *Penicillium*, *Mucor* i *Cladosporium*, a od kvasaca u mesu su najčešći rodovi *Candida* i *Rho-*

Tablica 1.- **Kemijski (nutritivni) sastav 100 g nemasnog crvenog mesa**

	Govedina	Janjetina
Vlaga (g)	73,1	72,9
Proteini (g)	23,2	21,9
Masnoća (g)	2,8	4,7
Energija (kJ)	498	546
Kolesterol (mg)	50	66
Tiamin (mg)	0,04	0,12
Riboflavin (mg)	0,18	0,23
Vitamin B6 (mg)	0,52	0,12
Vitamin B12 (µg)	2,5	0,10
Vitamin A (µg)	< 5	8,6
β karoten (µg)	10	< 5
Natrij (mg)	51	69
Kalij (mg)	363	344
Željezo (mg)	1,8	2,0
Cink (mg)	4,6	4,5
Magnezij (mg)	25	28

Izvor: Williams, P. G., 2007.

*dotorula* (Jay i sur., 2005). Patogeni mikroorganizmi čiji je izvor najčešće sama životinja također se mogu naći u primarnoj mikroflori, ali bi njihov broj trebao biti neznatan. Većina glavnih uzročnika trovanja hranom (*Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* i *Campylobacter jejuni*) potječu od fekalne kontaminacije trupova. Drugi uzročnici, kao što je *Listeria monocytogenes*, mogu potjecati od životinje, ali ih se češće prenese iz proizvodne okoline. Broj mikroorganizama koji se mogu naći na trupu ovisi i o dijelu trupa s kojeg se uzimaju uzorci, tako se npr. veći broj mikroorganizama može naći na rebrima, stražnjem dijelu trupa i vratu (Mead, 2007). *Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu* (Anon., 2008) propisano je mjesto na trupu za uzimanje uzoraka, kao i maksimalno dozvoljeni broj aerobnih mezofilnih bakterija (do 10<sup>4</sup> CFU/g).

Primarnu mikrofloru crvenog mesa (prije skladištenja, odnosno hlađenja) čine različite vrste većinom mezofilnih mikroorganizama (poredani po učestalosti): *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*/*Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Flavo-*

*bacterium coryneforms*, kvasci, enterobakterije, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Streptococcus*, *Bacillus* i *Brochothrix thermosphacta*. Međutim, primarna mikroflora mesa može sadržavati i manji broj psihrotrofa (*Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp.) kojima pogoduje niska temperatura, a koji mogu uzrokovati kvarenje mesa. Udio psihrotrofa prisutnih u primarnoj mikroflori pokazuje sezonsku varijaciju, te se kreće u rasponu od oko 1% u ljetnim mjesecima do 10% zimi. Kvasci i plijesni, općenito, ne utječu na kvarenje mesa, osim što u određenim uvjetima mogu usporiti ili spriječiti rast bakterija (Fernandes, 2009). Preživljavanje i rast primarne mikroflora ovisi o nizu čimbenika:

- ukupnom broju prisutnih mikroorganizama,
- vrsti mikroorganizama,
- temperaturi,
- pH mesa,
- prisutnosti hranjivih tvari i
- prisutnosti kisika (Gracey i sur., 1999).

Neposredno nakon klanja na klaonički obrađenom trupu prevladavaju gram-negativne proteolitičke bakterije koje razgrađuju proteine

Tablica 2. Minimalne  $a_w$  za rast nekih skupina mikroorganizama

Vrsta mikroorganizama	Minimalni $a_w$
gram-negativne bakterije	0,97
gram-pozitivne bakterije	0,90
većina kvasaca	0,88
većina plijesni	0,80
halofilne bakterije	0,75
osmoofilni kvasci	0,61

Izvor: Rovira i sur., 2006.

uz stvaranje neugodnog mirisa (pokvarena jaja) i okusa (Anon., 2011), dok se saprofitne gram-pozitivne bakterije (npr. *Kurthia* i netoksični stafilocoki) nalaze u znatno manjem broju. Patogene i toksične bakterije iz crijeva zdrave ili organa bolesne životinje mogu tijekom klaoničke obrade kontaminirati trup ili kontaminacija može nastati unakrsno s ruku radnog osoblja ili kože životinje (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, streptokoki grupe A, *Clostridium* spp.). S obzirom da prisutnost ovih bakterija može predstavljati opasnost za zdravlje konzumenata, mogućnost ograničavanja njihova rasta treba uzeti u obzir kod određivanja praktičnih higijenskih mjera (Holzapfel, 1998). Kada broj živih bakterija naraste na oko  $10^7$  CFU/cm<sup>2</sup> mesa javlja se neugodan miris, dok se sluzavost javlja kada njihov broj naraste na oko  $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup> (Olofsson i sur., 2007).

Poznata je činjenica da preživljavanje i rast mikroorganizama ovise o sastavu hranjive podloge (aktivnost vode i udio hranjivih sastojaka), pH vrijednosti, prisutnosti kisika, temperaturi i prisutnosti drugih mikroorganizama (antagonizam i sinergizam). Optimalna pH vrijednost za većinu bakterija je 6,5 - 7,0 iako većina mikroorganizama može rasti u širokom rasponu pH vrijednosti (4,0 - 9,5), a acidofilne bakterije mogu preživjeti čak i < pH 4,0. Brzina razmnožavanja mikroorganizama ovisi i o količini vode u mesu dostupne za biokemijske reakcije koja se izražava kao aktivnost vode ( $a_w$ ). Aktivnost vode

svježeg mesa veća je od 0,97, a optimalni  $a_w$  za većinu bakterija iznosi od 0,93 do 0,99 (tablica 2). Rast većine bakterija ograničen je pri  $a_w$  < 0,90, te će u takvom mediju prevladati gljivice (tablica 2). Smanjenjem  $a_w$  mesa produžava se lag-faza rasta mikroorganizama.

Pod aerobnim uvjetima i temperaturom hlađenja ispod 0°C raste psihrotrofni *Pseudomonas* spp., koji u pravilu dominira mikrobnom populacijom svježeg i neprerađenog mesa. U anaerobnim uvjetima može supstituirati kisik nitritom kao konačnim akceptorom elektrona. Kada njihov broj naraste na  $10^7$ - $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup> javlja se neugodan miris mesa i sluzavost. Neugodan miris je prvi znak kvarenja mesa, a nastaje tijekom procesa fermentacije koje se naziva smrdljivim zrenjem. Nakon početnih sirastih i maslačnih mirisa javljaju se mirisi na voće, a nakon što je *Pseudomonas* spp. potrošio glukozu, prelazi na metaboliziranje dušikovih spojeva kao što su aminoseline (cistin, cistein, metionin) te se javljaju mirisi na sumporne spojeve. Kasnije, pri porastu pH raste produkcija amonijaka i amina, te dolazi do pojave vidljive sluzi na površini (Krznić i sur., 2006). Mnoge vrste sintetiziraju topljivi žuto-zeleni pigment koji fluorescira u UV području. *Pseudomonas phosphorescence* uzrokuje svjetlucanje odnosno luminescenciju već nakon 7-8 sati na mesu i važan je indikator odsutnosti truležnih bakterija jer su te fotobakterije njihovi antagonisti (Živković, 1986).

Na kraju mikrobiološkog roka trajanja mesa, u mikroflori dominira samo jedna ili nekoliko vrsta mikroorganizama. Rok trajanja sirovog mesa je pod utjecajem nekoliko glavnih čimbenika:

- početnog broja mikroorganizama (osobito onim s potencijalom kvarenja),
- vrste/roda prisutnih mikroorganizama,
- temperature skladištenja ("niže je bolje" - meso može biti ohlađeno na oko -2°C prije nego što se smrzava),
- plinovite atmosfere (Mead, 2007).

Dokazano učinkovit način za kontrolu mikroflora svježeg mesa, a time i za čuvanje mesa za kasniju potrošnju su postupci soljenja i sušenja. Soljenje je jedan od najstarijih oblika konzerviranja hrane. Soli kao što su natrij-klorid, natrij-nitrit i natrij-nitrat inhibiraju proliferaciju gram-negativnih bakterija, a pospješuju rast i razmnožavanje gram-pozitivnih bakterija. Ova "mikrobna inverzija" koja se javlja tijekom soljenja i sušenja osigurava "slučajne" izvorne fermentacijske kulture za sva soljena mesa i fermentirane mesne proizvode (Anon., 2011). Sol oduzima vodu mikroorganizmima što ima za posljedicu sistiranje rasta, sporuliranje ili ugičanje bakterija. Većina halofilnih bakterija nije patogena za čovjeka, osim nekih predstavnika rodova *Vibrio*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Clostridium*. U salamurenom mesu prevladavaju mikrokoki, enterokoki i laktobacili (Mioković i Zdolec, 2004).

### Bakterije mliječne kiseline

Većina gram-pozitivnih bakterija nađenih u mesu i mesnim proizvodima filogenetski pripadaju tzv. "*Clostridium*" grani koju karakterizira niski sadržaj gvanina i citozina u sastavu DNA (<54%). Unutar klostridijum grane su bakterije mliječne kiseline (BMK), te aerobne i fakultativno anaerobne bakterije: *Bacillus*,

*Staphylococcus*, *Listeria* i anaerobne bakterije *Clostridium*, *Peptococcus*, *Ruminococcus*. Uz neke iznimke, BMK ne sintetiziraju katalazu, iako u mediju sa niskom koncentracijom šećera mogu sintetizirati neke pseudokatalaze (Holzapfel, 1998). Bakterije mliječne kiseline čine grupe gram-pozitivnih koka, kokobacila ili bacila koji fermentiraju ugljikohidrate u ATP (energiju) i mliječnu kiselinu. Ne sadrže sustav citokroma, te ne mogu sintetizirati ATP putem respiratornog lanca nego samo fermentacijom (Khalid, 2011). Većinom su mezofilne, ali mogu rasti i na temperaturama nižim od 5°C ili višim od 45°C. One su slabi proteoliti i lipoliti, a za svoj rast trebaju aminokiseline, dušične baze i vitamine B kompleksa. Bakterije mliječne kiseline su vrlo heterogene. Postoji više od 60 genetski i fiziološki različitih vrsta koje su fiziološki podijeljene u dvije skupine ovisno o metaboličkom putu razgradnje glukoze:

- homofermentativne bakterije (pr. *Lactococcus* i *Streptococcus*) razgrađuju glukozu do dvije molekule laktata, odnosno njihovim metabolizmom nastaje i do 90% laktata, te
- heterofermentativne bakterije (*Leuconostoc* i *Weissella*) koje metaboliziraju glukozu do laktata, etanola i ugljičnog dioksida, odnosno njihovim metabolizmom nastaje manja količina laktata (oko 50%) (Beasley, 2004; König i Fröhlich, 2009).

Prema Jin i sur. (2009) u BMK spadaju četiri glavna roda: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*, no prema novijoj reviziji taksonomske klasifikacije ovim rodovima nadodani su slijedeći rodovi BMK: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*.

Bakterije mliječne kiseline su s jed-

ne strane najčešći uzročnici kvarenja mesa, ali istodobno se sve više koriste za konzerviranje mesa, uglavnom kroz fermentaciju. Ukoliko je velika vlažnost površine mesa i relativno visoka temperatura pohrane mesa rast i razmnožavanje BMK mogu dovesti do pojave sluzavosti mesa koja postaje vidljiva kada njihov broj prijeđe  $3-5 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup> (Živković, 1986; Krznarić i sur., 2006). Osim sluzavosti, BMK mogu dovesti do kiselog vrenja koje uzrokuje neugodan miris i okus mesa, sivu boju na prerezu i omekšanost mesa. Kiselo vrenje može biti i posljedica lošeg iskrvarenja te odlaganja postupka hlađenja. Tijekom spontane fermentacije mesa, BMK iz sirovine ili okoline prouzrokuju mliječnu kiselinu, te dovode do pada pH vrijednost mesa (na 5,9-4,6). Zbog povećane kiselosti koaguliraju mišićni proteini što dovodi do smanjenja elastičnosti i hidratacijske sposobnosti mišićnih proteina. S druge strane, pad pH sprječava rast i razmnožavanje mnogih, pa tako i truležnih bakterija.

Danas, suvremena industrija mesa mora osigurati visoku kvalitetu, smanjiti varijabilnost i poboljšati organoleptička svojstva fermentiranih mesnih proizvoda što nije moguće korištenjem spontane fermentacije. Zadnjih 60-ak godina razvile su se starter kulture koje skraćuju vrijeme fermentacije čime se osigurava nizak sadržaj nitrita i nitrata u krajnjem proizvodu, te standardizacija organoleptičkih svojstava. Većina komercijalno dostupnih starter kultura su smjese bakterija mliječne kiseline i stafilokoka i/ili mikrokoka (Hugas i Monfort, 1997). Posljednjih nekoliko godina intenzivirana su istraživanja o antimikrobnom djelovanju BMK. One, osim organskih kiselina, vodik-peroksida i ugljik-dioksida stvaraju i izlučuju u svoju okolinu reuterin i bakteriocine. Organske kiseline i reuterin inhibiraju rast većine mikroorganizama, dok bakteriocini djeluju prvenstveno baktericidno. Bakte-

riocini se sintetiziraju na ribosomima bakterija i imaju velik potencijal za praktičnu primjenu u očuvanju hrane, ali i za prevenciju i liječenje bakterijskih infekcija (Mallesha i sur., 2010). Većina BMK koji sudjeluju u fermentaciji mesa sintetiziraju bakteriocine koji djeluju protiv ostalih BMK i prema glavnim patogenima u mesu kao što su *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Clostridium perfringens*. Inhibitorno djelovanje bakteriocina se zasniva na stvaranju pora u citoplazmatškoj membrani stanica, te ometanju sinteze DNA i proteina (Olusegun i Iniobong, 2011). Bakteriociogeni sojevi koji su dio prirodne mikroflore fermentiranih kobasica su *Lactobacillus curvatus* i *Lactobacillus sakei* koji podnose veće koncentracije soli i nitrita. Zbog tih svojih osobina ove dvije vrste su dominantna mikroflora sirovih fermentiranih kobasica i pasteriziranih emulgiranih mesnih proizvoda kao što su hrenovke i obarene kobasice. Također su važan dio mikroflore mesa i mesnih proizvoda koji se čuvaju u modificiranoj atmosferi i vakuum ambalaži, a skladište se na temperaturi nižoj od 5°C. Sulfid-producirajući sojevi *Lb. sakei* su česti uzročnici kvarenja vakuumski pakiranog mesa koje se skladišti na niskim temperaturama. Ove dvije vrste laktobacila se danas koriste kao starter kulture u industrijskoj proizvodnji fermentiranih kobasica. *Lb. sakei* sintetizira bakteriocine koji inhibitorno djeluju na *Listeria monocytogenes*, pa se koristi kao zaštitna kultura protiv roda *Listeria* (Medić i sur., 2009).

*Pediococcus* spp. je homofermentativna vrsta koja podnosi veće koncentracije soli (do 5,5%). Kao starter kulture se koriste *Pediococcus acidilactici*, te *Pediococcus pentosaceus* koja ima nižu optimalnu temperaturu od *P. acidilactici*, pa proizvodi mliječnu kiselinu mnogo sporije i pri nižim temperaturama fermentacije od 15 do 27°C (Nežak i sur., 2011). U

fermentiranim kobasicama najčešće se kao starter kultura koristi *Pediococcus cerevisiae*. *Tetragenococcus halophilus* (prije *Pediococcus halophilus*) raste u ekstremno slanim uvjetima (konc. NaCl i do 18%), a može se naći u suhomesnatim proizvodima i u salamurenoj slanini.

U prerađenom mesu prevladavaju *Leuconostoc* spp. jer imaju sposobnost fermentacije ugljikohidrata pri niskim temperaturama i smanjenom redoks potencijalu. *Leuconostoc* spp. proizvode bakteriocine koji uništavaju rod *Listeria* (Stiles i Holzapfel, 1997).

Prema Kozačinski i sur. (2008) u prirodno fermentiranim kobasicama od BMK prevladavaju *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* kao i *Pediococcus* spp. i *Leuconostoc* spp. Također je pronađen i znatan broj vrsta rodova *Staphylococcus* i *Kocuria*.

### Porodica *Micrococcaceae*

U fermentiranim mesnim proizvodima, kao prirodne starter kulture, osim BMK prisutne su dvije vrste porodice *Micrococcaceae* - *Micrococcus* i *Staphylococcus*.

*Micrococcus* spp. sadrže nitrat-reduktazu koja reducira nitrate u nitrite koji stabiliziraju crvenu boju u proizvodima od mesa. Osim toga, katalaza pozitivni su te razgradnjom vodik-peroksida koji je jako oksidacijsko sredstvo doprinose stabilizaciji boje i okusa mesnih proizvoda. Neke vrste, kao što je *Kocuria varians* (prije *Micrococcus varians*) se koriste kao starter kultura u salamama zbog njihovog doprinosa u razvoju boje i okusa, a također sprečavaju razvoj užeglosti pospješujući razgradnju vodik-peroksida (Liu, 2011). *Micrococcus* spp. se inače javljaju u mesnim proizvodima sa duljim vremenom zrenja (Frece i sur., 2010).

Koagulaza-negativni stafilocoki su

vrlo tolerantni prema slanom okolišu, te mogu rasti sa ili bez prisutnosti kisika. Najčešći sojevi u mesu pripadaju vrsti *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosum*. Koagulaza negativni stafilocoki reduciraju nitrate i nitrite pri čemu nastaje nitrozilmioglobin koji je odgovoran za karakterističnu boju mesnih proizvoda. Bez redukcije nitrata u nitrite, meso se neće "pretvoriti" u karakterističan suhomesnati proizvod. Glavno svojstvo stafilocoka je njihova lipolitička i proteolitička aktivnost u toku koje nastaju spojevi male molekularne mase kao što su aminokiseline, peptidi, slobodne masne kiseline, aldehidi i amini koji doprinose razvoju specifične arome fermentiranih mesnih proizvoda (Frece i sur., 2010a; Rantsiou i Cocolin, 2006). Ove bakterije su uglavnom nepatogeni i ne predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača. *Kocuria* i stafilocoki su tolerantiji prema povišenim koncentracijama soli od BMK, zbog čega opstaju i razvijaju se u okruženju sa znatno manjom aktivnosti vode, kao što je slučaj s vrlo slanim proizvodima. Međutim, ovi mikroorganizmi su osjetljivi na kiseline, te imaju tendenciju ugibanja na nižim pH vrijednostima tijekom i nakon procesa fermentacije. Zbog toga redukcija nitrata u nitrite se odvija prije fermentacije, odnosno prije nego što BMK postanu dominantna mikroflora mesa. Kako BMK proizvode mliječnu kiselinu, tako stafilocoki postupno odumiru (Anon., 2011).

Koja vrsta mikroflore će prevladati ovisi i o vremenu zrenja fermentiranih kobasica. Kobasice s kratkim vremenom zrenja imaju više laktobacila, te u njima prevladava "kisel" okus, pogotovo ako je zrenje kraće od dva tjedna. Produljenim zrenjem prevladavaju koagulaza-negativni stafilocoki i kvasci koji svojom aktivnošću dovode do nakupljanja raznih hlapljivih spojeva (Rantsiou i Cocolin, 2006). Prema istraživanju koje su proveli García i sur. (1995)

u nadjevu fermentiranih kobasica utvrđeno je da u mikroflori kobasica prevladavaju bakterije porodice *Micrococcaceae*. Od 159 izolata iz porodice *Micrococcaceae*, njih 81% pripada rodu *Staphylococcus* uključujući vrste *S. equorum* (43%), *S. xylosum* (29%), *S. saprophyticus* (11%) i *S. simulans* (8%). Ostatak od 11% su bakterije roda *Micrococcus*, a 8% su bile nepoznate vrste. Također su utvrdili kako udio *Staphylococcus* spp. i *Micrococcus* spp. se mijenja ovisno o koncentraciji soli i  $a_w$ .

### Plijesni i kvasci u mesu i mesnim proizvodima

Gljivice su eukariotski, nefotosintetski mikroorganizmi koji mogu biti jednostanični (kvasci) ili višestanični (plijesni). Plijesni dolaze u obliku nakupina vlaknastih stanica (hifa) koje su odgovorne za paučinast izgled kolonija plijesni. Kvasci su jednostanične gljivice čije su kolonije glatke. Gljivice se odlično prilagođavaju okolini, te mogu preživjeti na mjestima gdje većina mikroorganizama ne može.

Put onečišćenja kvascima i plijesni je sličan kao i bakterijama. Neposredno nakon klanja, broj kvasaca i plijesni je zanemariv, te se obično smatraju nevažni zbog svoga sporog rasta. Prema Fernandesu (2009) u početnoj mikroflori govedine, udio kvasaca i plijesni iznosi samo 2,6% na 20°C. Najčešći rodovi plijesni koji se mogu očekivati na svježem mesu su *Penicillium*, *Mucor* i *Cladosporium*, a od kvasaca rodovi *Candida* i *Rhodotorula*.

Plijesni prevladavaju na goveđim trupovima kada je površina presuha za bakterijski rast ili u slučaju kada je govedina tretirana antibioticima. Drugim riječima, plijesni se gotovo nikada ne razvijaju na mesu ukoliko bakterije mogu slobodno rasti. Razlog tome je što bakterije rastu brže od plijesni, te troše dostupne količine kisika i hranjivih tvari koje

plijesni zahtijevaju za svoj rast (Jay i sur., 2005). Na temperaturi nižoj od 1°C plijesni se natječu sa bakterijama. Optimalni  $a_w$  za većinu plijesni je oko 0,90, dok pojedine osmofilne plijesni rastu i na  $a_w$  oko 0,60. Ukoliko je površina mesa suha, a  $a_w$  ispod 0,90 prevladavaju plijesni. Porastom iznad 0,90 bakterije i kvasci rastu brže i obično na račun plijesni. Osim toga, plijesni mogu izdržati veće promjene pH vrijednosti od bakterija i kvasaca, a često toleriraju i veće temperaturne razlike. Iako plijesni napreduju najbolje kada je pH oko 7,0 mogu se razvijati i u rasponu pH od 2,0 do 8,0 (Šumić, 2009).

Plijesni iz roda *Penicillium* su najrasprostranjenije na mesu i mesnim proizvodima baš zbog toga što mogu rasti na nižim temperaturama i niskom  $a_w$ . *Penicillium camemberti* je bijela plijesan koja je odgovorna za karakterističnu aromu sireva Camembert i Brie, ali i za aromu fermentiranih kobasica (Bruna i sur., 2003). Ove plijesni na četiri načina povoljno djeluju u kobasicama:

- imaju antioksidativni učinak, štite od užeglosti, te djeluju na razvoj i održavanje boje kroz aktivnost katalaza,
- omogućavaju razvoj povoljne mikroklimne na površini kobasica, pa površina ne može postati ljepljiva ili sluzava, odnosno štite od spontane kolonizacije neželjene plijesni, kvasaca ili bakterija,
- zbog lipolitičkog, proteolitičkog učinka, te zbog razgradnje aminokiselina sudjeluju u razvoju karakterističnog okusa i mirisa,
- daju kobasicama tipičan izgled (López-Díaz i sur., 2001; Martinović i Vesković-Moračanin, 2006).

Osim pozitivnih učinaka tijekom zrenja kobasica, plijesni mogu uzrokovati i različite negativne učinke kao što su nastajanje zelenih, smeđih ili crnih mrlja koje su neprihvatljive većini konzumenata, a neke plijesni mogu imati negativan utjecaj

na okus i miris kobasica (Sunesen i Stahnke, 2003). Kontaminacijom mesa sporama različitih plijesni sa zidova i/ili stropova hladnjače, ambalaže i iz sadržaja želučano-crijevnog trakta može doći do razvoja plijesni koja je pretežno površinska pojava. Plijesni uzrokuju lipolitičke i proteolitičke promjene, te pogoduju i razvitku truležnih bakterija (Živković, 1986). Plijesni roda *Aspergillus* dovode do pojave zelenih mrlja na mesu, a najčešće se javljaju na vlažnoj površini ohlađenog mesa. Sivkasta, paučinasta plijesan *Mucor* se javlja na površini mesa koje se čuva na temperaturi od 1°C. Na smrznutom mesu se može javiti i crna plijesan *Cladosporium herborumi* (Krznić i sur., 2006).

Mnoge *Penicillium* spp. posjeduju sposobnost proizvodnje antibiotika penicilina što može povećati rizik od alergijske reakcije prema tom antibiotiku. Najopasniji učinak nekih plijesni je sinteza mikotoksina koji su u malim koncentracijama toksični za ljude i životinje (Sunesen i Stahnke, 2003). Prema istim autorima, mikotoksini u proizvodima od mesa se nalaze u prvih 5 mm ispod površine.

S površine salama raznih proizvođača izolirane su brojne plijesni koje ne stvaraju mikotoksine, a među njima prevladavaju rodovi *Penicillium* i *Scopularopsis*. Oni se najčešće koriste u komercijalnim starter kulturama. Iako još i danas mnogi proizvođači proizvode razne vrste fermentiranih kobasica sa nativnom kulturom plijesni, zbog mogućeg štetnog djelovanja nekih vrsta poželjno je korištenje starter kultura plijesni ispitanih funkcionalnih svojstava. (Martinović i Vesković-Moračanin, 2006). U mediteranskom području, plijesni (u manjoj mjeri i kvasci) zauzimaju značajno mjesto u fermentaciji kobasica (talijanska salama, mađarska salama,...) i zrenju pršuta. Doprinos ovih mikroorganizama tipičnoj aromi proizvoda rezultat je stvaranja njihovo-

vih primarnih i sekundarnih metabolita za čiju su sintezu najodgovornije lipaze i proteinaze.

Za proizvodnju fermentiranih mesnih prerađevina koje sadrže veću količinu soli preporučuje se uporaba odabranih sojeva kvasaca, najčešće *Debaromyces hansenii* i *Candida famata*. Oni poželjno utječu na razvoj stabilnosti boje, te općenito na senzorska svojstva proizvoda. Mikroflora kvasaca u kobasicama ovisi o uvjetima proizvodnje kobasica. U proizvodnji fermentiranih kobasica kvasci pridonose konačnim senzornim svojstvima proizvoda svojim metabolizmom povećavajući količinu amonijaka, smanjujući količinu mliječne kiseline, te proteolitičkim aktivnostima (Toldrá, 2008). Kao i plijesni, kvasci također sporo rastu, pa su zanemarivi u pogledu kvarenja svježeg mesa. No, zbog veće otpornosti na niske temperature,  $a_w$  i pH, povećan salinitet te kemijske konzervanse pod određenim uvjetima mogu postati dominantna mikroflora mesa. Kvasci su ubikuitarni organizmi koji se vrlo lako tijekom klanja životinja i manipulacije trupovima iz okoliša prenose na trup. Prema Samelisu i Sofosu (2003) broj i vrsta kvasaca pokazuju sezonske varijacije, pa tako u ljetnom periodu na janječim trupovima prevladava rod *Rhodotorula*, dok u zimskom periodu (i na temperaturi skladištenja) prevladavaju rodovi *Candida* i *Cryptococcus*. Prema istim autorima, na -5°C na površini janječih trupova prevladavaju kvasci, unutar 20 tjedana populacija kvasaca raste sa 10 na 10<sup>6</sup> CFU/cm<sup>2</sup>. Povišenjem temperature na 0°C ili više dominira bakterijska populacija, a na kvasce otpada manje od 5% mikroflora svježeg mesa. Na rasječenom svježem mesu populacija kvasaca se kreće od 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> CFU/g, a u mljevenom mesu 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> CFU/g. Najvažnija uloga kvasaca u kvarenju mesa je njihov neizravan učinak kojim omogućavaju rast bakterija-uzročnika kvarenja. Kvasci

smanjuju antimikrobni potencijal sulfita, te pogoduju rastu bakterija truljenja. Na pH mesa ispod 5,5 inhibiran je rast bakterija i rastu kvasci. Zbog toga, u fermentiranom mesu kao što su različite salame, niski pH pogoduje rastu kvasaca. Osim toga, u suhomesnatim proizvodima u kojima je niski  $a_w$ , također prevladavaju kvasci koji rastu u širokom rasponu  $a_w$  od 0,62 do 0,98. Slično tome, kvasci koriste organske kiseline (mliječna, limunska, octena kiselina), povećavaju pH te smanjuju koncentraciju konzervansa što opet pogoduje rastu bakterija truljenja (Dillon i Bord, 1991).

Tijekom zrenja na površini kobasica prevladavaju kvasci (oko 95%), nakon 2 tjedna plijesni i kvasci su prisutni u podjednakim odnosima, dok pri kraju zrenja (4-8 tjedana) prevladavaju plijesni (Toldrá, 2008).

## Zaključak

Poznata je činjenica da su meso i mesni proizvodi odličan medij za rast mikroorganizama. Neki mikroorganizmi doprinose nastanku poželjnih i specifičnih organoleptičkih svojstava mesa i mesnih proizvoda, ali isto tako njihov nekontroliran rast može uzrokovati brojne negativne učinke (degradacija arome, teksture i boje). Svojom enzimatskom aktivnošću mikroorganizmi doprinose razvoju specifične arome i boje mesa i mesnih proizvoda. Danas su u primjeni komercijalne starter kulture koje osiguravaju visoku kvalitetu, smanjuju varijabilnost i poboljšavaju organoleptička svojstva mesa i mesnih proizvoda. Osim toga, neke su bakterijske vrste zanimljive zbog svoje metaboličke aktivnosti i proizvodnje bakteriocina. Bakteriocini djeluju baktericidno, imaju velik potencijal za praktičnu primjenu u očuvanju hrane, te prevenciji i liječenju bakterijskih infekcija.

Izvori mikrobiološke kontaminacije mesa i mesnih proizvoda, kako

vanjski tako i unutarnji, su brojni. Tijekom tehnološkog procesa prerade mesa, rasijecanja i usitnjavanja mesa mogućnost kontaminacije se povećava, a povišena temperatura doprinosi bržem razmnožavanju mikroflore. Da bi se produžila održivost mesa, smanjio rizik od kvarenja i spriječila kontaminacija mesa i mesnih proizvoda neophodna je stalna kontrola proizvodnje, odnosno poduzimanje mjera i postupaka koji se temelje na načelima sustava analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (HACCP) zajedno s provedbom dobre higijenske prakse. Mikrobiološki kriteriji, odnosno odsutnost, prisutnost ili broj mikroorganizama i/ili količina njihovih toksina/metabolita iznimno je značajan kriterij pri utvrđivanju prihvatljivosti mesa ili mesnih proizvoda, odnosno njihove mikrobiološke ispravnosti.

## Literatura

- Aleksić, S., V. Pantelić, Ž. Novaković, M.M. Petrović, Lj. Sretenović, Lj. Stojanović, D. Ostojić, N. Stanišić, M. Novaković** (2010): Nova tehnologija održivosti junećih trupova. *Biotechnology in Animal Husbandry* 26, 1-7.
- Anonimno** (2007): Pravilnik o proizvodima od mesa (NN 1/07).
- Anonimno** (2008): Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (N.N. 74/08; 156/08; 89/10; 153/11).
- Anonimno** (2011): Microbiology - shelf-stable dried meat. Dostupno na [http://www.fsis.usda.gov/pdf/fsre\\_ss\\_5microbiologydried.pdf](http://www.fsis.usda.gov/pdf/fsre_ss_5microbiologydried.pdf), pristup: 03.03.2011.
- Beasley, S.** (2004): Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Academic Dissertation in Microbiology. Dostupno na: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/beasley/isolatio.pdf>.
- Bruna, J.M., E.M. Hierro, L. de la Hoz, D.S. Mottram, M. Fernández, J.A. Ordóñez** (2003): Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 85, 111–125.
- Dillon, V.M., R.G. Bord** (1991): Yeasts associated with red meat. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 93-108.
- Fernandes, R.** (2009): Microbiology handbook: Meat products. Leatherhead Food International Ltd, 3-4.
- Frece, J., K. Markov, D. Kovačević** (2010): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina, te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso* 12 (2), 92-99.
- Frece, J., K. Markov, D. Čvek, D. Kovačević** (2010a): Stafilocoki kao potencijalne izvorne starter kulture iz slavonskog kulena. *Meso* 12 (3), 150-155.
- García, I., J.M. Zumalacárregui, V. Díez** (1995): Microbial succession and identification of *Micrococccaeae* in dried beef cecina, an intermediate moisture meat product. *Food microbiology* 12, 309-315.
- Gracey, J., D.S. Collins, R. Huey** (1999): Meat Hygiene, 10th edition. W.B. Saunders Company Ltd, 339.
- Holzappel, W.H.** (1998): The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. U: The microbiology of meat and poultry, autori: Davies. A., R.G. Bord. Blackie Academic & Professional, 35-75.
- Hugas, M., J.Ma. Monfort** (1997): Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 59 (4), 547-554.
- Jay, J.M., M.J. Loessner, D.A. Golden** (2005): Modern food microbiology, 7th edition Springer, 64.
- Jin Y.L., H.L. Ai, J. Cheng, M.Y. Wu** (2009): First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology* 136 (3-4), 314-320.
- Khalid, K.** (2011): An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences* 1 (3), 1-13.
- Kozačinski L., E. Drosinos, F. Čaklovića, L. Cocolin, J. Gasparik-Reichardt, Slavica Vesković** (2008): Investigation of Microbial Association of Traditionally Fermented Sausages. *Food Technol. Biotechnol.* 46 (1) 93-106.
- König, H., J. Fröhlich** (2009): Lactic acid bacteria. U: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, autori: König, H., G.Unden, J. Fröhlich, 4.
- Krznarić, M., M. Hadžiosmanović, L. Kozačinski** (2006): Prosudivanje mesa zahvaćenog kvarenjem. *Meso* 8 (2), 89-92.

**Lambaša-Belak Ž., N. Gačina, T. Radić** (2005): Tehnologija hrane, skripta, Visoka škola za turistički menadžment u Šibeniku, 15.

**Liu, D.** (2011): *Micrococcus* and *Kocuria*. U: Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens, autor: Liu, D. CRC Press, 111.

**López-Díaz, T.M., J.A Santos, M.L García-López, A. Otero** (2001): Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. International Journal of Food Microbiology 68, 69–74.

**Mallesha, R. Shylaja, D. Selvakumar, J.H. Jagannath** (2010): Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. Recent Research in Science and Technology 2 (6), 42-46.

**Martinović, A., S. Vesković-Moračanin** (2006): Primena starter kultura u industriji mesa. Tehnologija mesa 47, 226-230.

**McDonald, K, D-W. Sun** (1999): Predictive food microbiology for the meat industry: a review. International Journal of Food Microbiology 52, 1-27.

**Mead, G.C.** (2007): Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs. Woodhead Publishing Limited, 102-103.

**Medić, H., S. Vidaček, N. Marušić, V., Šatović, J., Nežak,** (2009): Utjecaj ovitka i starter kultura na kvalitetu fermentiranih kobasica.

Meso 11, 113-122.

**Mioković, B., N. Zdolec** (2004): Značenje halofilnih bakterija u preradi mesa i ribe. Meso 6 (5), 36-42.

**Nežak, J., N. Zdolec, S. Vidaček, N. Marušić, H. Medić** (2011): Primjena starter kultura *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosum* u proizvodnji kulena, Meso 13 (2), 89-95.

**Olofsson, T.C., S. Ahrné, G. Molin** (2007): Composition of the bacterial population of refrigerated beef, identified with direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. International Journal of Food Microbiology 118, 233–240.

**Olusegun A.O., G.N. Iniobong** (2011): Spoilage and preservation of meat: a general appraisal and potential of lactic acid bacteria as biological preservatives. International Research Journal of Biotechnology 2 (1), 33-46.

**Rantsiou, K., L. Cocolin** (2006): New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review, International Journal of Food Microbiology 108 (2), 255–267.

**Rovira, J., A. Cencic, E. Santos, M. Jakobsen** (2006): Biological hazards. U: Safety in the agri-food chain, urednici: Luning, P.A., F. Devlieghere, R. Verhé. Wageningen Academic

Publishers. 132.

**Samelis, J., J. Sofos** (2003): Yeast in meat and meat products. U: Yeasts in food: Beneficial and detrimental aspects, autori: Boekhout, T., V. Robert. CRC Press, 239-245.

**Stiles, M.E., W.H. Holzapfel** (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology 36, 1- 29.

**Sunesen, L.O., L.H. Stahnke** (2003): Mould starter cultures for dry sausages selection application and effects. Meat Science 65, 935–948.


**Šumić, Z.** (2009): Mikroorganizmi-Kontaminanti hrane. Dostupno na: <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologijahrane/mikroorganizmi-kontaminanti-hrane>, pristup: 16.09.2011.

**Toldrá, F.** (2008): Handbook of Fermented Meat and Poultry. Blackwell Publishing Ltd, 142,180.

**Williams, P.G.** (2007): Nutritional composition of red meat. Dostupno na: <http://ro.uow.edu.au/cgi/viewcontent.cgi?article=1053&context=hbspapers>.

**Živković, J.** (1986): Higijena i tehnologija mesa, II dio-kakvoća i prerada. Sveučilište u Zagrebu, 16-22.

Dostavljeno: 9.3.2012.

Prihvaćeno: 4.4.2012. 



## Znanstveno-stručni skup „Hrana kao temelj zdravlja i dugovječnosti“

Zagreb, 18. lipanj 2012.

Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti Znanstveno vijeće za poljoprivredu i šumarstvo, u suorganizaciji s Akademijom tehničkih znanosti Hrvatske, organizacijom ovog skupa nastoje povećati suradnju između znanstveno-nastavnih institucija i domaćih proizvođača hrane radi pronalazjenja rješenja za povećanje broja i kakvoće domaćih funkcionalnih proizvoda na tržištu hrane u RH te konkurentnih proizvoda za tržište EU.

### CILJ SKUPA

Organizacijom ovog skupa nastoji se povećati suradnja između znanstveno-nastavnih institucija i domaćih proizvođača hrane radi pronalazjenja rješenja za povećanje broja i kakvoće domaćih funkcionalnih proizvoda na tržištu hrane u RH te konkurentnih proizvoda za tržište EU. Svrha je skupa ukazati na bitne momente u razvoju, proizvodnji i stavljanju na tržište funkcionalnih proizvoda te istaknuti važnost te vrste prehrambenih proizvoda za zdravlje potrošača.