

STRUČNI RAD

Mikrobiološke opasnosti u proizvodnji spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači

Mirna Mrkonjić Fuka^{1*}, Valentina Odorčić¹, Luna Maslov Bandić², Irina Tanuwidjaja²

Sažetak

Tradicionalne, spontano fermentirane kobasice od mesa divljači zauzimaju važno mjesto u gastronomiji različitih kultura i naroda u Europi i svijetu. U Republici Hrvatskoj proizvode se na brojnim malim obiteljskim gospodarstvima, prateći tradicionalne recepture i postupke, te su prepoznate i cijenjene kao visoko kvalitetan proizvod specifičnih senzornih osobina. Međutim, budući da se proizvode bez upotrebe starter kultura i često u varijabilnim uvjetima proizvodnje (temperatura i vlaga), mikrobiološka ispravnost krajnjeg proizvoda može biti kompromitirana, čemu značajno doprinose i faktori povezani s načinom odstrijela životinja i obrade mesa. Mikrobiološke opasnosti povezane s proizvodnjom tradicionalnih, spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači uključuju različite patogene mikroorganizme poput *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* i drugi, te toksične produkte njihovog metabolizma poput biogenih amina i mikotoksina. Standardizacija proizvodnje i upotreba visokokvalitetnih sirovina ključni su za dobivanje zdrastveno ispravnog proizvoda ujednačenih svojstava. Uz to, iznimno je važno pridržavati se higijenskih standarda tijekom lova i evisceracije životinja, kao i tijekom proizvodnje, obrade i čuvanja kobasica od mesa divljači.

Ključne riječi: kobasice, meso divljači, patogeni mikroorganizmi, biogeni amini, mikotoksini

Uvod

Fermentirani mesni proizvodi, uključujući i spontano fermentirane trajne kobasice, zauzimaju važno mjesto na europskom tržištu (Belleggia i sur., 2020.; Leroy i sur., 2018.). Najviša stopa proizvodnje i potrošnje fermentiranih kobasica po glavi stanovnika zabilježena je u južnoj i srednjoj Europi, posebno u Njemačkoj, Italiji, Španjolskoj i Francuskoj (Lücke, 1998.). Na primjer, u Španjolskoj

se godišnje proizvodi oko 200 tisuća, a u Francuskoj 110 tisuća tona fermentiranih kobasica (Safa i sur., 2015.). U Europi, za proizvodnju fermentiranih kobasica, najčešće se koristi meso domaćih svinja, zatim goveđe i konjsko meso (Settanni i sur., 2020.; Coloretti i sur., 2019.; Geeraerts i sur., 2019.). Iako rjeđe, fermentirane kobasice se pripremaju i od mesa divljači, uglavnom divlje svinje i jelena

¹ prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka; Valentina Odorčić, mag. ing. agr.; Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za mikrobiologiju, Svetošimunska c. 25, Zagreb

² izv. prof. dr. sc. Luna Maslov Bandić; dr. sc. Irina Tanuwidjaja; Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za kemiju, Svetošimunska c. 25, Zagreb

*autor za korespondenciju: mfuka@agr.hr

(Charmpi i sur., 2020.; Mrkonjić Fuka i sur., 2020.; Settanni i sur., 2020.; Ranucci i sur., 2019.; Žgomba Maksimović i sur., 2018.). Zbog percepcije da je meso divljači zdravije, nutritivno kvalitetnije i ekološki prihvatljivije od mesa domaćih životinja, kao i zbog specifičnih organoleptičkih svojstava, fermentirane kobasice od mesa divljači postaju sve traženije, kako na globalnom tako i na hrvatskom tržištu (Czarniecka-Skubina i sur., 2022.). U Hrvatskoj, fermentirane kobasice od mesa divljači proizvode se na brojnim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima po tradicionalnim recepturama i bez dodatka starter kultura ili nitritne soli, te su vrlo cijenjen gastronomski proizvod (Žgomba Maksimović i sur., 2018.). Budući da se meso divljači dobiva od slobodno živućih ili od uzgojenih životinja, na zdravstvenu ispravnost kobasica od mesa divljači uvelike utječe način odstrjela i/ili klanja životinja i obrade mesa, kao i svi daljnji postupci tijekom proizvodnje kobasica (Cocolin i sur., 2016.) te je posljedično, mikrobiološka kontaminacija moguća na svakom koraku od dobivanja mesa do zrelih kobasica spremnih za konzumaciju. Također, divljač podliježe kontaminaciji toksičnim tvarima iz okoline, poput mikotoksina, koji se posljedično mogu naći u mesu i/ili koje sintetiziraju plijesni u procesu proizvodnje (Vulić i sur., 2021.; Kudumija i sur., 2020.; Markov i sur., 2013.). Nadalje, fermentacija kobasica je karakterizirana prisustvom velikog broja različitih mikroorganizama od kojih neki posjeduju amino-dekarboksilaznu aktivnost, odnosno mogu producirati biogene amine u matriksu hrane (Žgomba Maksimović i sur., 2018.; Markov i sur., 2013.). Iako su kobasice od mesa divljači naročito cijenjene i tražene od strane potrošača, zbog nestandardizirane proizvodnje i/ili nepridržavanja pravila dobre proizvođačke prakse, sigurnost gotovih proizvoda može biti upitna (Mrkonjić Fuka i sur., 2020.; Kos i sur., 2019.; Žgomba Maksimović i sur., 2018.; Markov i sur., 2013.). Također, zakonski normativi vezani uz potencijalne mikrobiološke i toksikološke rizike, iako jasno regulirani za ovaj tip proizvoda, ne uključuju sve potencijalne mikrobiološke i kemijske opasnosti vezano uz kriterije sigurnosti. S obzirom da je vrlo malo podataka o karakteristikama ovakvih proizvoda dostupno u literaturi, cilj ovog rada je prikupiti i objediniti raspoložive podatke te istaknuti najvažnije mikrobiološke rizike povezane s tradicionalnim, spontano fermentiranim kobasicama od mesa divljači.

Mikrobiološke opasnosti

Iako se fermentirane kobasice smatraju mikrobiološki stabilnim proizvodima, istraživanja su ukazala na prisutnost i/ili povećan broj nepoželjne mikrobiote, tj. indikatora fekalne kontaminacije, bakterija kvarenja i patogena, naročito kod kobasica proizvedenih od mesa divljači, te prisutnost produkata njihove metaboličke aktivnosti poput mikotoksina ili biogenih amina (Mrkonjić Fuka i sur., 2020.; Kos i sur., 2019.; Žgomba Maksimović i sur., 2018.; Markov i sur., 2013.). Nepoželjna mikrobiota obično potječe od sirovina (npr. meso, začini i sl.), opreme i ljudi. Najčešći nepoželjni mikroorganizmi izolirani iz fermentiranih kobasica su *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* i drugi (Mrkonjić Fuka i sur., 2020.; Žgomba Maksimović i sur., 2018.; Heir i sur., 2013.). Sastav mikrobne zajednice, a time i zdravstvena ispravnost fermentiranih kobasica od divljači značajno ovise o kvaliteti mesa korištenog u proizvodnji kao i o uvjetima u kojima se odvija fermentacija i zrenje (Holck i sur., 2017.).

Mikrobiota obrađenih trupova divljači

Zahvaljujući nutritivnom sastavu (Tablica 1), visokom aktivitetu vode (a_w 0,978-0,981) i povoljnom pH (5,51-5,82), meso divljači podržava rast različitih vrsta mikroorganizama, naročito bakterija, pa je vrlo teško predvidjeti točan početan sastav mikrobne zajednice (Charmpi i sur., 2020.). Iako postoje značajne razlike u nutritivnom sastavu različitih vrsta mesa (Tablica 1 i 2), a_w i pH vrijednost usporedive su za meso divljači i meso domaćih životinja (Charmpi i sur., 2020.). Primarna mikrobiota trupa divljači uglavnom se sastoji od Gram-negativnih, većinom psihrotrofnih bakterija slično kao i za meso domaćih životinja. Za razliku od životinja iz uzgoja čije se klanje odvija u kontroliranim uvjetima, čimbenici povezani s odstrjelom divljači mogu uvelike utjecati na primarnu mikrobiotu trupa. Neki od tih čimbenika su vrste mikroorganizama na koži životinje, u gastrointestinalnom traktu i na mišićnom tkivu, zatim anatomsko mjesto gdje je životinja ustrijeljena i načina daljnje obrade mesa (Kegalj i sur., 2012.; Gill, 2007.). Deutz i sur. (2006.) pokazali su da na trupu jelena ($n=31$) i srna ($n=6$) odstrijeljenima u prsa ukupni broj bakterija na površini mesa iznosi 4,6 log CFU/cm², a kod životinja odstrijeljenima u abdomen 5,6 log CFU/cm². U sličnom istraživa-

Tablica 1. Nutritivne vrijednosti u 100 g sirovog mesa različite divljači (USDA Food Composition Databases)
Table 1 Nutritive values in 100 g of raw meat of different game species (USDA Food Composition Databases)

Nutrijenti/ Nutrients	Meso divljih životinja (po 100 g mesa)/ Game meat (per 100 g meat)					
	Jelen/ Wild deer	Divlja svinja/ Wild boar	Medvjed/ Bear	Antilopa/ Antelope	Los/ Elk	Sob/ Reindeer
Voda, g/ Water, g	73,57	72,54	71,2	74,08	74,38	75,55
Energetska vrijednost kcal/Energy, kcal	120	122	161	114	111	102
Proteini, g/ Proteins, g	22,96	21,51	20,1	22,38	22,95	22,24
Ukupne masti, g/Total fat, g	2,42	3,33	8,3	2,03	1,45	0,74

nju, Avagnina i sur. (2012.) ističu kako je ukupni broj bakterija na površini mesa veći kod životinja odstrjeljenih u abdomen, u usporedbi sa životinjama odstrjeljenima u ostale dijelove tijela. Gomes-Neves i sur. (2021.) navode brojna istraživanja o mikrobiološkoj sigurnosti mesa divljih svinja i jelena provedena od 2010. do 2020. godine, koja su pokazala da je prisutnost različitih patogenih bakterija (npr. *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*) izravan rezultat neadekvatnog lova i odstrjela te loše higijene tijekom obrade mesa. Nadalje, pokazali su da je uvođenje bolje lovačke prakse i higijene tijekom obrade, značajno smanjilo fekalnu kontaminaciju i poboljšalo mikrobiološku kvalite-

tu obrađenih trupova i mesa divljih svinja u Europi. Mikrobiološki kriteriji za namirnice su definirani Uredbom (EZ) br. 2073/2005 (EC, 2005.) i prvenstveno se odnose na higijenske kriterije obrade trupova domaćih životinja, međutim, navedena legislativa ne obuhvaća standarde za obradu mesa divljači. Paulsen (2011.) predlaže da mikrobiološki standardi mesa divljači budu slični onima domaćih životinja, odnosno da broj aerobnih mezofilnih bakterija ne prelazi 6 log CFU/cm², a *Escherichia coli* 2 log CFU/cm² što bi prema standardima Uredbe (EC, 2005.) za meso domaćih životinja, značilo da broj aerobnih mezofilnih bakterija ne prelazi 5 log CFU/cm² odnosno za *Enterobacteriaceae* ne prelazi vrijednost od 3 log CFU/cm².

Tablica 2. Nutritivne vrijednosti u 100 g sirovog mesa domaćih životinja (USDA Food Composition Databases)
Table 2 Nutritive values in 100 g of raw meat of domestic animals (USDA Food Composition Databases)

Nutrijenti/ Nutrients	Meso domaćih životinja (po 100 g mesa)/ Domestic animals meat (per 100 g meat)			
	Puretina/ Turkey	Piletina/ Chicken	Svinjetina/ Pork	Janjetina/ Lamb
Voda, g/ Water, g	70,68	75,46	64,99	58,68
Energetska vrijednost kcal/Energy, kcal	161	119	212	276
Proteini, g/ Proteins, g	21,96	21,39	23,16	14,97
Ukupne masti, g/Total fat, g	7,43	3,08	12,59	23,54

Mikrobiota kobasica

U početnim fazama fermentacije dominiraju bakterije mliječne kiseline koje proizvode organske kiseline, primarno mliječnu kiselinu, što snižava pH nadjeva. Pad pH, u pravilu, inhibira rast i sintezu toksina mikroorganizama. Tako na primjer, pH 4,6 inhibira rast i produkciju toksina sporulirajućih patogena poput *Clostridium botulinum*, a pH vrijednost 4,2 dostatna je za inhibiciju nesporulirajućih patogenih baterija poput *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella* spp. (NSW Food Authority,

2008.). S vremenom, kako napreduje zrenje kobasica smanjuje se i aktivitet vode (a_w), te je općenito prihvaćeno da a_w ispod 0,86 ograničava rast većine patogenih bakterija (USFDA, 2001.). Iznimka je *Staphylococcus aureus* koji raste pri a_w vrijednosti 0,83 i pH vrijednosti od 4,0 (NSW Food Authority, 2008.). Također, i trajanje zrenja značajno utječe na mikrobiološku stabilnost i sigurnost fermentiranih kobasica, što je također povezano s padom pH i a_w vrijednosti. Työppönen i sur. (2003.) su poka-

zali da *L. monocytogenes*, iako prisutna u početnim fazama zrenja trajnih kobasica, najčešće nestaje tijekom trećeg tjedna zrenja. Žgomba Maksimović i sur. (2018.) su pokazali da *S. aureus* sporadično preživljava u kobasicama od divlje svinje i 20. dan zrenja te da je u potpunosti eliminiran 40. dan, dok je u svim kobasicama od jelena u potpunosti eliminiran već 20. dan. Mrkonjić Fuka i sur. (2020.) su pak dokazali prisutnost patogena rodova *Listeria*, *Yersinia* i *Erysipelothrix* u kobasicama od divlje svinje i jelena, te *Clostridium* i *Corynebacterium* u kobasicama od divlje svinje u početnim fazama proizvodnje. Istovremeno, potvrdili su i prisutnost bakterija kvarenja, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Kurthia* u kobasicama od divlje svinje i *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Acinetobacter* i *Psychrobacter* u kobasicama od jelena. U gotovim kobasicama većina nepoželjne mikrobiote je eliminirana ili značajno reducirana, međutim oko 3,40 % sekvenci pripisanih bakterijama roda *Bacillus*, *Brochothrix*, *Stenotrophomona* i *Pseudomonas* i dalje je prisutna u zrelih kobasicama (40. dan) nakon provedene analize dubokog sekvenciranja 16S rRNA gena ukupne mikrobiote. Markov i sur. (2013.) su pokazali da niti jedna od ispitanih kobasica od različitih vrsta mesa divljači nije zadovoljila propisane uvjete iz Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011.) budući da je broj *S. aureus* kod svih analiziranih kobasica bio $\geq 1 \log \text{CFU/g}$. Ostale preporučene mikrobne skupine (*Salmonella* spp., sulfitreducirajuće klostridije i *L. monocytogenes*) nisu detektirane niti u jednoj od kobasica. U sličnom istraživanju, Marty i sur. (2012.) ističu da 9 od ukupno 14 analiziranih švicarskih kobasica proizvedenih od mesa divljači, predstavlja opasnost za zdravlje zbog visokog broja ($\log \text{CFU/g}$) *S. aureus* i *Enterobacteriaceae*. Žgomba Maksimović i sur. (2018.) su pak pokazali da oko 33 % ispitanih kobasica od mesa divlje svinje i jelena analizirano na području Hrvatske nije pogodno za konzumaciju zbog povišenih razina *E. coli* i bakterija skupine *Enterobacteriaceae*.

Toksični produkti mikroorganizama

Tijekom proizvodnje tradicionalnih fermentiranih kobasica mogu nastati različiti kemijski spojevi mikrobnog podrijetla koji negativno utječu na ljudsko zdravlje. Kao najznačajniji, ističu se biogeni amini i mikotoksini.

Biogeni amini

Biogeni amini (BA) su organski kemijski spojevi male molekularne mase. Prirodno su prisutni u različitim organizmima gdje su odgovorni za mnoge esencijalne funkcije, uključujući sinaptički prijenos signala, stanični rast i diferencijaciju, regulaciju tjelesne temperature i krvnog tlaka, alergijske reakcije itd. (Doeun i sur., 2017.). Nalaze se i u namirnicama poput voća i povrća, mesa, ribe, mlijeku i dr. Obzirom da crijevni enzim amin-oksidaza brzo razgrađuje male količine BA, unos manjih količina BA hranom ne utječe negativno na zdrave osobe. Međutim, prekomjerni unos biogenih amina može uzrokovati niz zdravstvenih problema, od alergija do bolesti povezanih sa živčanim i gastrointestinalnim sustavom (Sivamaruthi i sur., 2021.; Doeun i sur., 2017.). Različite bakterije mogu sintetizirati BA kao dio obrambenog odgovora koji im omogućava obranu od stresa uzrokovanog niskim pH. Uz to što BA služe kao pH regulatori, bakterije ih mogu koristiti kao dodatni izvor energije (Sivamaruthi i sur., 2021.). U fermentiranim namirnicama, pa tako i u fermentiranim kobasicama, prisutan je velik broj mikroorganizama od kojih neki posjeduju amino-dekarboksilaznu aktivnost, nužnu za sintezu biogenih amina. U faktore koji potiču sintezu i nakupljanje BA u fermentiranim namirnicama spadaju visoki udio proteina i slobodnih aminokiselina, prisutnost bakterija koje sintetiziraju BA, uvjeti koji potiču rast tih bakterija (npr. temperatura, pH) i uvjeti koji potiču sintezu i sekreciju enzima dekarboksilaza (npr. nizak pH) (Turna i sur., 2024.). Meso, sirovina za proizvodnju fermentiranih kobasica, je bogato proteinima i idealan je medij za produkciju biogenih amina od strane različitih mikroorganizama, uključujući rodove *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella* and *Bacillus* (Barbieri i sur., 2019.). Stoga, u fermentiranim kobasicama može doći do nakupljanja BA kao što su tiramin, 2-feniletilamin, kaverin, putrescin i histamin. Istovremeno, u istom proizvodu možemo naći različite vrste i koncentracije BA. Međutim, informacije vezane uz sastav mikrobni zajednica i produkciju biogenih amina u mesu ili kobasicama od mesa divljači su vrlo ograničene, a naročito je malo podataka dostupno za kobasice proizvedene u Hrvatskoj (Žgomba Maksimović i sur., 2018.; Zdolec i sur., 2020.). Na

razini Europske Unije zakonski je regulirana samo dopuštena koncentracija histamina u ribi Uredbom Komisije (EZ) br. 1441/2007 (EC, 2005.), no trenutno nema regulative koja se odnosi na koncentraciju histamina i tiramina, kao najčešćih BA u trajnim fermentiranim kobasicama. Prema Ercan i sur. (2013.) najveća dopuštena koncentracija tiramina u hrani je 100-800 mg/kg, dok se koncentracija od 1,080 mg/kg smatra toksičnom za ljude. U mnogim zemljama, koncentracija histamina od 100 do 200 mg/kg se smatra prihvatljivom (Karovičová i Kohajdová, 2005.). Žgomba Maksimović i sur. (2018.) su istraživali koncentracije histamina i tiramina tijekom fermentacije i zrenja spontano fermentiranih kobasica od divlje svinje i jelena. U svim ispitanim kobasicama, maksimalna koncentracija histamina je iznosila 5,2 mg/kg tijekom proizvodnje, dok je u finalnim proizvodima pala ispod 5,0 mg/kg. Koncentracije tiramina su se kretale od 62,6 do 99,8 mg/kg u kobasicama od divlje svinje te od 47,3 do 219,0 mg/kg u kobasicama od jelena. U zrelim, spontano fermentiranim kobasicama od mesa domaće svinje najviše vrijednosti izmjerene su za kadaverin (41,67 mg/kg) dok su koncentracije histamina i tiramina iznosile 10,27 i 22,03 mg/kg (Zdolec i sur., 2020.). Latorre-Moratalla i sur. (2017.) su procijenili rizike vezane uz unos histamina i tiramina konzumacijom trajnih fermentiranih kobasica u španjolskoj populaciji. Autori ističu kako je prosječna koncentracija histamina iznosila 1,39 mg, a tiramina 6,2 mg po obroku. Stoga je rizik trovanja histaminom i tiraminom, unesenim isključivo konzumacijom trajnih fermentiranih kobasica za zdrave pojedince zanemariv, dok se kod osoba koje pate od intolerancije mogu razviti simptomi trovanja (Latorre-Moratalla i sur., 2017.; Kovacova-Hanuska i sur., 2015.).

Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji mogu uzrokovati bolest kod ljudi. Odlikuju se malom molekularnom masom i heterogenim kemijskim i toksikološkim karakteristikama. Aflatoksini (AF), okratoksini (OT), trikoteceni, zearalenon (ZEN), fumonizin (F), tremorgen i mikotoksini i ergot alkaloidi uzrokuju milijunske gubitke, pa se smatraju najvažnijim mikotoksinima u poljoprivrednoj proizvodnji. S obzirom da se divljač uglavnom hrani biljkama, koje su podložne kontaminacijama plijesni, u mesu divljači postoji opasnost od akumu-

lacije mikotoksina. Nadalje, plijesni se mogu razviti i tijekom zrenja kobasica, budući da mikroklimatski uvjeti podupiru njihov rast, te mogu producirati mikotoksine, naročito u slučaju tehnoloških propusta poput oštećenja ovitka. Najvažnije plijesni koje mogu sintetizirati mikotoksine uključuju rodove: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Stachybotrys*. Neki od najznačajnijih mikotoksina su aflatoksin B1, sekundarni metabolit plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, koji je poznati kancerogen jetre uzrokujući degeneraciju i nekrozu hepatocita (Khan i sur., 2024.) te okratoksin A kojeg proizvode plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium*, a djeluje kancerogeno, mutageno i nefrotoksično. Svinje su jedne od najosjetljivijih vrsta na mikotoksine, dok su preživači poput jelena manje osjetljivi.

Dopuštena količina mikotoksina u mesnim proizvodima nije regulirana zakonodavstvom Republike Hrvatske, niti na razini Europske Unije. U pojedinim zemljama Europske Unije preporučene su dopuštene količine pojedinih mikotoksina, npr. za okratoksin 1 µg/kg za meso i mesne proizvode (Duarte i sur., 2010.). Informacije o sastavu i koncentraciji mikotoksina u tradicionalnim kobasicama od mesa divljači su vrlo limitirane. Tako Markov i sur. (2013.) iznose podatke za kobasice proizvedene od mesa različitih vrsta divljači. Koncentracija okratoksina A se kretala od 1,17 µg/kg u kobasici od mesa srne do 3,07 µg/kg u kobasici od mesa divlje svinje, premašujući preporučenu granicu od 1 µg/kg. Autori navode kako je rizik od aflatoksina B1 i citrinina u svim istraživanim kobasicama minimalan i to uglavnom zbog niskog stupnja prijenoša ovih mikotoksina na jestiva tkiva, obzirom da su ciljni organi jetra, odnosno bubrezi.

Zaključak

Mikrobiološke opasnosti povezane s proizvodnjom spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači ne razlikuju se značajnije od onih povezanih s proizvodima od mesa domaćih životinja. Kao najveći problem u proizvodnji fermentiranih kobasica od mesa divljači ističe se kvaliteta sirovina, tj. mesa za pripremu kobasica. Korištenje neadekvatnog mesa divljači može u samom početku proizvodnog procesa uzrokovati kontaminaciju kobasica patogenim mikroorganizmima ili mikrobiotom koja uzrokuje kvarenje, kao i mikroorganizmi-

ma koje sintetiziraju biogene amine ili mikotoksine, što može dovesti do proizvodnje kobasica upitne mikrobiološke stabilnosti i zdravstvene ispravnosti. Također, do problema u proizvodnji može doći i zbog uporabe kontaminiranih začina te križnog onečišćenja s opreme, proizvodnih prostora, ljudi i sl. Korištenje mesa divljači za proizvodnju spontano fermentiranih kobasica zasigurno može dovesti do diverzifikacije asortimana i proširenja gastro-nomske ponude u Hrvatskoj. Međutim, nužno je osigurati standardizaciju proizvodnje i zakonsku

regulativu kako bi se postigla mikrobiološka stabilnost i zdravstvena ispravnost gotovih proizvoda. Jedan od načina kako smanjiti mikrobiološke rizike povezane s proizvodnjom tradicionalnih spontano fermentiranih kobasica od divljači je upotreba visokokvalitetnih sirovina, aplikacija starter i/ili bioprotektivnih mikrobnih kultura te pridržavanje pravila dobre proizvođačke prakse tijekom svih proizvodnih koraka, od lova do proizvodnje i čuvanja kobasica od mesa divljači.

Literatura

- [1] Avagnina, A., D. Nucera, M.A. Grassi, E. Ferroglio, A. Dalmaso, T. Civera (2012): The microbiological conditions of carcasses from large game meat animals in Italy. *Meat Sci.*, 91 (3), 266-271 doi:10.1016/j.meatsci.2012.01.025
- [2] Barbieri, F., C. Montanari, F. Gardini, G. Tabanelli (2019): Biogenic amine production by lactic acid bacteria: a review. *Foods*, 8 (1), 17 doi:10.3390/foods8010017
- [3] Belleggia, L., V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, F. Cardinali, L. Aquilanti, M. Mozzon, R. Foligni, M. Pasquini, M.F. Trombetta, F. Clementi, A. Osimani (2020): Is there any still undisclosed biodiversity in Ciauscolo salami? A new glance into the microbiota of an artisan production as revealed by high-throughput sequencing. *Meat Sci.*, 165, 108128 doi:10.1016/j.meatsci.2020.108128
- [4] Charmpi, C., E. Van Reckem, N. Sameli, D. Van der Veken, L. De Vuyst, F. Leroy (2020): The Use of Less Conventional Meats or Meat with High pH Can Lead to the Growth of Undesirable Microorganisms during Natural Meat Fermentation. *Foods*, 9 (10), 1386 doi:10.3390/foods9101386
- [5] Coccolin, L., M. Gobbetti, E. Neviani, D. Daffonchio (2016): Ensuring safety in artisanal food microbiology. *Nat. Microbiol.*, 1 (10), 16171 doi:10.1038/nmicrobiol.2016.171
- [6] Coloretti, F., C. Chiavari, A. Poeta, M. Succi, P. Tremonte, L. Grazia (2019): Hidden sugars in the mixture: Effects on microbiota and the sensory characteristics of horse meat sausage. *LWT - Food Sci. Technol.*, 106, 22-28 doi:10.1016/j.lwt.2019.02.032
- [7] Czarniecka-Skubina, E., D.M. Stasiak, A. Latoch, T. Owczarek, J. Hamulka (2022): Consumers' Perception and Preference for the Consumption of Wild Game Meat among Adults in Poland. *Foods*, 11 (6), 830 doi:10.3390/foods11060830
- [8] Deutz, A., F. Völk, P. Pless, H. Fötschl, P. Wagner (2006): Game meat hygiene aspects of dogging red and roe deer. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 57 (6), 197-202
- [9] Doeun, D., M. Davaatseren, M.-S. Chung (2017): Biogenic amines in foods. *Food Sci. Biotechnol.*, 26 (6), 1463-1474 doi:10.1007/s10068-017-0239-3.
- [10] Duarte, S.C., A. Pena, C.M. Lino (2010): Ochratoxin A in Portugal: A Review to Assess Human Exposure. *Toxins*, 2 (6), 1225-1249 doi:10.3390/toxins2061225
- [11] EC (2005): Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of European Union*, 322, 12-29
- [12] Ercan, S.S., H. Bozkurt, Ç. Soysal (2013): Significance of Biogenic Amines in Foods and Their Reduction Methods. *J. Food Sci. Technol.*, 3 (8), 395-410 doi:10.17265/2159-5828/2013.08.001
- [13] Geeraerts, W., L. De Vuyst, F. Leroy (2019): Mapping the dominant microbial species diversity at expiration date of raw meat and processed meats from equine origin, an underexplored meat ecosystem, in the Belgian retail. *Int. J. Food Microbiol.*, 289, 189-199 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.019
- [14] Gill, C.O. (2007): Microbiological conditions of meats from large game meat animals and birds. *Meat Sci.*, 77 (2), 149-160 doi:10.1016/j.meatsci.2007.03.007
- [15] Gomes-Neves, E., A.C. Abrantes, M. Vieira-Pinto, A. Müller (2021): Wild Game Meat—A Microbiological Safety and Hygiene Challenge? *Curr. Clin. Microbiol. Rep.*, 8 (2), 31-39 doi:10.1007/s40588-021-00158-8

- [16] Heir, A., A.L. Holck, M.K. Omer, O. Alvseike, I. Måge, M. Høy, T.M. Rode, M.S. Sidhu, L. Axelsson (2013): Effects of post-processing treatments on sensory quality and Shiga toxigenic *Escherichia coli* reductions in dry-fermented sausages. *Meat Sci.*, 94 (1), 47–54 doi:10.1016/j.meatsci.2012.12.020
- [17] Holck, A., L. Axelsson, A. McLeod, T.M. Rode, E. Heir (2017): Health and Safety Considerations of Fermented Sausages. *J. Food Qual.*, 2017, 9753894 doi:10.1155/2017/9753894
- [18] Karovičová, J., Z. Kohajdová (2005): Biogenic amines in food. *Chem. Pap.*, 59 (1), 70–79
- [19] Kegalj, A., M. Krvavica, I. Ljubičić (2012): Raznolikost mikroflora u mesu i mesnim proizvodima. *Meso*, 14 (3), 239–246
- [20] Khan, R., F. Anwar, F.M. Ghazali (2024): A comprehensive review of mycotoxins: Toxicology, detection, and effective mitigation approaches. *Heliyon*. 23;10(8):e28361. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e28361.
- [21] Kos, I., A. Žgomba Maksimović, M. Zunabović-Pichler, S. Mayrhofer, K.J. Domig, M. Mrkonjić Fuka (2019): The Influence of Meat Batter Composition and Sausage Diameter on Microbiota and Sensory Traits of Artisanal Wild Boar Meat Sausages. *Food Technol. Biotech.*, 57 (3), 378–387 doi:10.17113/ftb.57.03.19.6197
- [22] Kovacova-Hanusikova, E., T. Buday, S. Gavliakova, J. Plevkova (2015): Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*, 43 (5), 498–506 doi: 10.1016/j.aller.2015.05.001
- [23] Kudumija, N., A. Vulić, T. Lešić, N. Vahčić, J. Pleadin (2020): Aflatoxins and ochratoxin A in dry-fermented sausages in Croatia, by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. A.*, 13 (4), 225–232 doi:10.1080/19393210.2020.1762760
- [24] Latorre-Moratalla, M.L., O. Comas-Baste, S. Bover-Cid, M.C. Vidal-Carou (2017): Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population. *Food Chem. Toxicol.*, 99, 78–85 doi:10.1016/j.fct.2016.11.011
- [25] Leroy, F., T. Aymerich, M.C. Champomier-Vergès, L. Cocolin, L. De Vuyst, M. Flores, F. Leroi, S. Leroy, R. Talon, R.F. Vogel, M. Zagorec (2018): Fermented meats (and the symptomatic case of the Flemish food pyramid): Are we heading towards the vilification of a valuable food group? *Int. J. Food Microbiol.*, 274, 67–70 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.006
- [26] Lücke, F.K. (1998): Fermented sausages. *Microbiology of fermented foods*. Wood, B.J.B. (ed.). Boston, MA, USA; Springer, 1998. pp. 441–483 doi:10.1007/978-1-4613-0309-1_14
- [27] Markov, K., J. Pleadin, M. Horvat, M. Bevardi, D. Sokolić Mihalak, F. Delaš, J. Frece (2013): Mikrobiološke i mikotoksikološke opasnosti za zdravstvenu ispravnost i karakterizacija domaćih kobasica od mesa divljači. *Meso*, 3, 177–186
- [28] Marty, E., J. Buchs, E. Eugster – Meier, C. Lacroix, L. Meile (2012): Identification of Staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR – RFLP. *Food Microbiol.* 29 (2), 157–166
- [29] Mrkonjić Fuka, M., I. Tanuwidjaja, A. Žgomba Maksimović, M. Zunabović-Pichler, S. Kublik, N. Hulak, K.J. Domig, M. Schloter (2020): Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures. *LWT - Food Sci. Technol.*, 118, 108782 doi:10.1016/j.lwt.2019.108782
- [30] NSW Food Authority (2008): http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/science/potentially-hazardous-foods.pdf
- [31] Paulsen, P. (2011): Hygiene and microbiology of meat from wild game: an Austrian view. *Game meat hygiene in focus*. Paulsen, P., A. Bauer, M. Vodnansky, R. Winkelmayer, F.J.M. Smulders (eds.). Wageningen, Netherlands; Wageningen Academic Publishers, 2011. pp. 19–37 doi:10.3920/978-90-8686-723-3_1
- [32] Ranucci, D., R. Roila, D. Miraglia, C. Arcangeli, F. Vercillo, S. Bellucci, R. Branciarri (2019): Microbial, chemical-physical, rheological and organoleptic characterisation of roe deer (*Capreolus capreolus*) salami. *Ital. J. Food Saf.*, 8 (3), 8195 doi:10.4081/ijfs.2019.8195
- [33] Safa, H., P. Gatellier, A. Lebert, L. Picgirard, P.S. Mirade (2015): Effect of combined salt and animal fat reductions on physico-chemical and biochemical changes during the manufacture of dry-fermented sausages. *Food. Bioproc. Technol.*, 8 (10), 2109–2122 doi:10.1007/s11947-015-1563-3
- [34] Settanni, L., P. Barbaccia, A. Bonanno, M. Ponte, R. Di Gerlando, E. Franciosi, A. Di Grigoli, R. Gaglio (2020): Evolution of indigenous starter microorganisms and physicochemical parameters in spontaneously fermented beef, horse, wild boar and pork salamis produced under controlled conditions. *Food Microbiol.*, 87, 103385 doi:10.1016/j.fm.2019.103385
- [35] Sivamaruthi, B.S., P. Kesika, C. Chaiyasut (2021): A narrative review on biogenic amines in fermented fish and meat products. *J. Food Sci. Technol.*, 58 (5), 1623–1639 doi:10.1007/s13197-020-04686-x
- [36] Turna, N.S., R. Chung, L. McIntyre (2024): A review of biogenic amines in fermented foods: Occurrence and health effects. *Heliyon*, 10 (2), e24501 doi:10.1016/j.heliyon.2024.e24501
- [37] Työppönen, S., A. Markkula, E. Petäjä, M.L. Suihko, T. Mattila-Sandholm (2003): Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control*, 14 (3), 181–185 doi: 10.1016/S0956-7135(02)00086-5
- [38] USFDA – United States Food and Drug Administration (2001): <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/ucm2016794.htm>
- [39] Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2011): Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja
- [40] Vulić, A., T. Lešić, N. Kudumija, M. Zdravec, M. Kiš, N. Vahčić, J. Pleadin (2021): The development of LC-MS/MS method of determination of cyclopiiazonic acid in dry-fermented meat products. *Food Control*, 123, 107814 doi:10.1016/j.foodcont.2020.107814
- [41] Zdolec, N., T. Bogdanović, V. Pažin, V. Šimunić-Mežnarić, N. Martinec, J. M. Lorenzo (2020): Control of biogenic amines in dry sausages inoculated with dairy-originated bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* EF-101. *Vet. arhiv* 90, 77–85
- [42] Žgomba Maksimović, A., M. Zunabović-Pichler, I. Kos, S. Mayrhofer, N. Hulak, K.J. Domig, M. Mrkonjić Fuka (2018): Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: A focus on lactic acid bacteria diversity. *LWT - Food Sci. Technol.*, 89, 418–426 doi:10.1016/j.lwt.2017.11.017

Microbiological hazards in the production of spontaneously fermented game meat sausages

Abstract

Traditional, spontaneously fermented game meat sausages have long held a prominent place in the culinary traditions of various cultures and nations in Europe and around the world. In Croatia, they are produced in numerous small family farms according to traditional recipes and processes and are recognized and appreciated as a high-quality product with specific sensory properties. However, as they are produced without the use of starter cultures and often under variable production conditions (temperature and humidity), the microbiological integrity of the final product may be compromised. Factors related to the way animals are slaughtered and the processing of game meat used as raw material for the production of spontaneously fermented sausages also have a significant impact on their health safety. The main microbiological hazards associated with traditional spontaneously fermented game meat sausages, which include various pathogenic microorganisms as *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* etc., and toxic products of their metabolism such as biogenic amines and mycotoxins. Standardization of production and the use of high-quality raw materials are key to achieving a healthy product with uniform properties. In addition, compliance with hygiene standards during the hunting and evisceration of the animals and during the production, processing and storage of game meat sausage is extremely important.

Keywords: sausages, game meat, pathogenic microorganisms, biogenic amines, mycotoxines

Mikrobiologische Gefahren bei der Herstellung von spontan fermentierten Wildfleischwürsten

Zusammenfassung

Traditionelle, spontan fermentierte Wildfleischwürste haben seit langem einen festen Platz in den kulinarischen Traditionen verschiedener Kulturen und Nationen in Europa und der ganzen Welt. In Kroatien werden sie in zahlreichen kleinen Familienbetrieben nach traditionellen Rezepten und Verfahren hergestellt und sind als hochwertiges Produkt mit spezifischen sensorischen Eigenschaften anerkannt und geschätzt. Da sie jedoch ohne den Einsatz von Starterkulturen und oft unter variablen Produktionsbedingungen (Temperatur und Feuchtigkeit) hergestellt werden, kann die mikrobiologische Integrität des Endprodukts beeinträchtigt sein. Faktoren im Zusammenhang mit der Art der Schlachtung und der Verarbeitung von Wildfleisch, das als Rohmaterial für die Herstellung spontan fermentierter Würste verwendet wird, haben ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die gesundheitliche Unbedenklichkeit. Zu den wichtigsten mikrobiologischen Gefahren, die von traditionellen spontan fermentierten Wildfleischwürsten ausgehen, gehören verschiedene pathogene Mikroorganismen wie *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* usw. sowie toxische Stoffwechselprodukte wie biogene Amine und Mykotoxine. Die Standardisierung der Produktion und die Verwendung von hochwertigen Rohstoffen sind der Schlüssel zu einem gesunden Produkt mit einheitlichen Eigenschaften. Darüber hinaus ist die Einhaltung von Hygienestandards bei der Jagd und dem Ausweiden der Tiere sowie bei der Herstellung, Verarbeitung und Lagerung von Wildfleischwurst äußerst wichtig.

Schlüsselwörter: Wurst, Wildfleisch, pathogene Mikroorganismen, biogene Amine, Mykotoxine

Peligros microbiológicos en la producción de salchichas de carne de caza fermentadas espontáneamente

Resumen

Las salchichas tradicionales de carne de caza fermentadas espontáneamente han tenido un lugar destacado en las tradiciones culinarias de varias culturas y naciones en Europa y en todo el mundo. En Croacia, se producen en numerosas pequeñas granjas familiares según recetas y procesos tradicionales y son reconocidas y apreciadas como un producto de alta calidad con propiedades sensoriales específicas. Sin embargo, dado que se producen sin el uso de cultivos iniciadores y a menudo bajo condiciones de producción variables (temperatura y humedad), la integridad microbiológica del producto final puede verse comprometida. Los factores relacionados con la forma en que se sacrifican los animales y el procesamiento de la carne de caza utilizada como materia prima para la producción de salchichas fermentadas espontáneamente también tienen un impacto significativo en su seguridad sanitaria. Los principales peligros microbiológicos asociados con las salchichas tradicionales de carne de caza fermentadas espontáneamente incluyen varios microorganismos patógenos como *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, etc., y productos tóxicos de su metabolismo, como aminas biógenas y micotoxinas. La estandarización de la producción y el uso de materias primas de alta calidad son clave para lograr un producto saludable con propiedades uniformes. Además, el cumplimiento de las normas de higiene durante la caza y la evisceración de los animales, así como durante la producción, procesamiento y almacenamiento de salchichas de carne de caza, es extremadamente importante.

Palabras claves: salchichas, carne de caza, microorganismos patógenos, aminas biógenas, micotoxinas

Rischi microbiologici nella produzione di salsicce di carne di selvaggina a fermentazione spontanea

Riassunto

Le tradizionali salsicce di carne di selvaggina a fermentazione spontanea occupano un posto importante nella gastronomia di diverse culture e popoli in Europa e nel mondo. Nella Repubblica di Croazia vengono prodotte in numerose piccole aziende agricole a conduzione familiare, seguendo ricette e procedimenti tradizionali, e sono riconosciute e apprezzate come un prodotto di alta qualità con caratteristiche sensoriali specifiche. Tuttavia, poiché vengono prodotte senza l'utilizzo di colture starter e spesso in condizioni di produzione variabili (temperatura e umidità), l'idoneità microbiologica del prodotto finale, alla quale contribuiscono in modo significativo fattori legati al metodo di macellazione degli animali e alla lavorazione della carne, può risultare compromessa. I rischi microbiologici associati alla produzione di salsicce tradizionali di carne di selvaggina a fermentazione spontanea comprendono vari microrganismi patogeni come *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e altri, e prodotti tossici del loro metabolismo come le ammine biogene e le micotossine. La standardizzazione della produzione e l'utilizzo di materie prime di alta qualità sono fondamentali per ottenere un prodotto sano e con proprietà uniformi. Inoltre, è estremamente importante rispettare le norme igieniche durante la caccia e l'eviscerazione degli animali, nonché durante la produzione, la lavorazione e la conservazione del prodotto finale.

Parole chiave: salsicce, carne di selvaggina, microrganismi patogeni, ammine biogene, micotossine