Utjecaj primjene različitih temperatura na proces fermentacije Slavonskog kulena

Došen, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:500372

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marija Došen

UTJECAJ PRIMJENE RAZLIČITIH TEMPERATURA NA PROCES FERMENTACIJE SLAVONSKOG KULENA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambenu tehnologiju
Katedra za tehnologiju mesa i ribe
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija mesa i ribe
Tema rada je prihvaćena na IV. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj (29. 01. 2014.).
Mentor: *Dragan Kovačević*, prof. dr. sc.
Pomoć pri izradi: *Krešimir Mastanjević*, doc. dr. sc.

UTJECAJ PRIMJENE RAZLIČITIH TEMPERATURA NA PROCES FERMENTACIJE SLAVONSKOG KULENA

Marija Došen, 135/DI

Sažetak:
Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj dodataka različitih šećera (glukoze i maltodekstrina) te primjene različitih temperatura (12 °C i 20 °C) na efikasnost procesa fermentacije kulena proizvedenog tradicionalnim postupkom. Uzorcima slanine, mesa i nadjeva te uzorcima kulena tijekom procesa fermentacije, određena su fizikalno-kemijska svojstva te je, u svrhu praćenja intenziteta i vremena trajanja procesa fermentacije, provedeno kontinuirano mjerenje pH vrijednosti. Proces fermentacije kulena započeo je neposredno nakon pripreme nadjeva te je trajao približno tri tjedna (referentni uzorak, uzorci s dodatkom 0,7% glukoze i maltodekstrina pri temperaturi fermentacije 20 °C) te više od tri tjedna (uzorak s 0,7% maltodekstrina pri temperaturi fermentacije 12 °C), odnosno više od četiri tjedna (referentni uzorak i uzorak s dodatkom 0,7% glukoze pri temperaturi fermentacije 12 °C). Praćenje procesa fermentacije, kojeg karakterizira povećanje koncentracije mliječne kiseline u nadjevu, provedeno je određivanjem pH vrijednosti. Najnižu pH vrijednost (4,58) imao je uzorak s dodatkom maltodekstrina (w = 0,7%) fermentiran pri 20 °C. Dobiveni rezultati su pokazali da dodatak maltodekstrina u odnosu na glukozu te provedba procesa fermentacije pri višim temperaturama (20 °C) ubrzavaju fermentaciju i povećavaju njezin intenzitet, odnosno znatnije snižavaju pH vrijednost nadjeva.

Ključne riječi: *Slavonski kulen, šećeri, pH, temperatura fermentacije*

Rad sadrži: 47 stranica
27 slika
19 tablica
00 priloga
16 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. *Mate Bilić*	predsjednik
2.	prof. dr. sc. *Dragan Kovačević*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Krešimir Mastanjević*	član
4.	prof. dr. sc. *Srećko Tomas*	zamjena člana

Datum obrane: 16. listopada 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Technology of Meat and Fish
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Technology of Meat and Fish
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. IV held on (January, 29th 2014.).
Mentor: *Dragan Kovačević*, PhD, full prof.
Technical assistance: *Krešimir Mastanjević,* PhD, assistant prof.

INFLUENCE OF IMPLEMENTING DIFFERENT TEMPERATURES ON THE PROCESS OF SLAVONIAN KULEN FERMENTATION

Marija Došen, 135/DI

Summary:
The aim of this study was to test the influence of adding different types of sugar (glucose, maltodextrin) and implementing different temperatures (12 °C and 20 °C) on the efficiency of the fermentation process of kulen, produced by traditional method. Bacon, meat, force-meat and kulen samples were attributed with physical-chemical characteristics. For the purpose of monitoring the intensity and the duration of the fermentation a continued measurement of the pH was conducted. The fermentation of kulen began after force-meat preparing and it lasted for nearly three weeks (reference sample, samples with 0,7 glucose and maltodextrin at 20 °C), and more than three weeks (sample with 0,7% maltodextrin at 12 °C), more than four weeks (reference sample and a sample with 0,7% glucose at 12 °C). Monitoring of the fermentation process, characterized by increasing concentrations of lactic acid, was conducted by determining the pH. The sample with the addition of maltodextrin (w = 0,7%) subjected to the fermentation at 20 °C had the lowest pH (4,58). Results showed that the addition of maltodextrin compared to the addition of glucose, as well as conducting the fermentation in higher temperatures (20 °C) accelerate the fermentation, increase its intensity and they significantly lower the pH values.

Key words: *Slavonian Kulen*, *carbohydrates*, *pH*, *fermentation temperature*

Thesis contains: 47 pages
27 figures
19 tables
00 supplements
16 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Mate Bilić,* PhD, full prof.	chair person
2.	*Dragan Kovačević,* PhD, full prof.	supervisor
3.	*Krešimir Mastanjević*, PhD assistant prof.	member
4.	*Srećko Tomas*, PhD, full prof.	stand-in

Defense date: October, 16, 2014

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Draganu Kovačeviću na predloženoj temi diplomskog rada te nesebičnoj pomoći i strpljivosti tijekom njegove izrade. Također hvala i doc. dr. sc. Krešimiru Mastanjeviću. Njegovi stručni savjeti uvelike su mi pomogli.

Od srca hvala mojim roditeljima , tati Josipu, mami Branki, braći Karlu, Filipu i Ivanu, sestri Antoniji, nećaku Edmondu, baki Marici na vjeri u mene te brojnim ohrabrenjima tijekom cijelog studija.

Hvala mojim dragim prijateljima na predivnim trenucima provedenim zajedno koji su me istinski obogatili.

Najviše zahvaljujem Bogu što me vodio kroz školovanje, jačao moju volju za izvršavanjem dužnosti te mi podario snagu i mudrost da savladam sve prepreke.

„Dobar sam boj bio, trku završio, vjeru sačuvao“ 2 Tim 4,7

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE FERMENTIRANIH KOBASICA 4
2.1.1. Uloga starter-kultura u proizvodnji trajnih kobasica 7
2.2. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SLAVONSKOG KULENA 8
2.3. UTJECAJ PROCESA FERMENTACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKA, MIKROBIOLOŠKA I SENZORSKA SVOJSTVA SLAVONSKOG KULENA 13
2.3.1. Konzerviranje fermentacijom 15
2.3.2. Senzorske greške kulena kao posljedica neadekvatne fermentacije 15
2.3.2.1. Pukotine, šupljine i mrvljenje nadjeva kulena tijekom narezivanja 15
2.3.2.2. Prekomjerna naboranost ovitka kulena te odvajanje ovitka od nadjeva 17
3. EKSPERIMENTALNI DIO 19
3.1. ZADATAK 20
3.2. MATERIJALI I METODE 20
3.2.1. Metode za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava 23
3.2.1.1. Određivanje udjela vode, bjelančevina i ukupnih masti 23
3.2.1.2. Određivanje pH vrijednosti 24
3.2.1.3. Određivanje masenog udjela soli 24
3.2.1.4. Određivanje aktiviteta vode 25
3.2.1.5. Instrumentalno određivanje boje 25
3.2.2. Mikrobiološka analiza 26
4. REZULTATI 27
4.1. REZULTATI 28
5. RASPRAVA 38
6. ZAKLJUČCI 43
7. LITERATURA 45

Popis oznaka, kratica i simbola

Rh	relativna vlažnost
T	temperatura
a_w	aktivitet vode
N.N.	Narodne novine
NOMb	nitrozilmioglobin
BMK	bakterije mliječne kiseline
KNS	koagulaza negativni stafilokoki
NaCl	natrijev klorid
SpVV	sposobnost vezanja vode
BMV	blijedo, mekano, vodnjikavo
TČS	tamno, čvrsto, suho
GDL	glukono delta lakton
I.t.	izoelektrična točka

1. UVOD

S obzirom na autohtonost, tradiciju proizvodnje i specifična senzorska svojstva, Slavonski kulen predstavlja najatraktivniji fermentirani mesni proizvod istočne Hrvatske (Kovačević, 2001.). Njegova proizvodnja seže iz doba obiteljskih zadruga i postojanja stanova (salaša) smještenih na pašnjacima u blizini šuma, na kojima su se uzgajale svinje i druga stoka.

Slavonski kulen je trajna kobasica koja se proizvodi iz mješavine najkvalitetnijeg usitnjenog svinjskog mesa i leđne slanine s dodatkom kuhinjske soli i začina (ljute i slatke paprike i češnjaka) te se nadjeva u svinjsko slijepo crijevo (lat.: *caecum*). Kulen se zatim kondicionira, hladno dimi, fermentira, suši i podvrgava procesu višemjesečnog zrenja (Kovačević, 2014.).

Fermentacija je (uz proces zrenja) ključna faza u proizvodnji trajnih fermentiranih kobasica. Tijekom procesa fermentacije dolazi do značajnih biokemijskih, kemijskih i mikrobioloških promjena (smanjenje pH vrijednosti, promjene u početnoj mikrobnoj populaciji, redukcija nitrata u nitrite te nitrita u dušikov oksid, formiranje nitrozilmioglobina, denaturacija, otapanje i želiranje miofibrilarnih proteina, dehidratacija, formiranje početne teksture nadjeva). Povećanjem koncentracije mliječne kiseline proizvedene djelovanjem tehnoloških bakterija, odnosno bakterija mliječne kiseline i posljedično sniženjem pH, utječe se na formiranje teksture i boje kobasica, mikrobiološku stabilnost te se stvaraju povoljni uvjeti za enzime zrenja, odnosno za početak proteolize i lipolize.

pH vrijednost fermentiranih kobasica ponovno raste tijekom perioda zrenja kojega karakterizira proteolitička i lipolitička aktivnost endogenih i enzima mikroorganizama koji, uz proces dimljenja i sušenja, doprinose oblikovanju konačnog proizvoda (miris, okus, tekstura, boja) (Suman, 2013.).

U ovom diplomskom radu ispitivan je utjecaj dodataka različitih šećera (glukoze i maltodekstrina) te primjene različitih temperatura (12 ^{o}C i 20 ^{o}C) na efikasnost procesa fermentacije kulena proizvedenog tradicionalnim postupkom. Uzorcima mesa, slanine, nadjeva te uzorcima kulena, tijekom procesa fermentacije, određena su fizikalno-kemijska svojstva te je provedeno kontinuirano mjerenje pH vrijednosti (u svrhu praćenja intenziteta i vremena trajanja procesa fermentacije).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE FERMENTIRANIH KOBASICA

Sukladno Pravilniku o mesnim proizvodima (N.N. br. 131/12) trajne kobasice su proizvodi od mesa, masnog tkiva i dodatnih sastojaka koji se nakon obrade i punjenja podvrgavaju postupcima fermentacije, sušenja i zrenja sa ili bez dimljenja. Trajne kobasice su mesni proizvodi koji sadrže maksimalno 40% vode. Količina bjelančevina mesa u proizvodu mora biti minimalno 16%. Trajne kobasice se proizvode i stavljaju na tržište pod nazivima: kulen, zimska, čajna, srijemska ili pod drugim nazivima.

Trajne kobasice prema brzini fermentacije dijelimo na (**Tablica 1**):

a) suhe brzofermentirane (engl.: *drysausages*) s kratkim vremenom sušenja i zrenja (kratko vrijeme fermentacije pri visokoj temperaturi rezultira većom koncentracijom bakterija mliječne kiseline (BMK) u prvim danima fermentacije, a gotov proizvod ima kiseliji okus i slabije izraženu aromu),

b) polusuhe sporofermentirane (engl.: *semi-drysausages*) s dugim vremenom sušenja i zrenja (u kobasicama podvrgnutim duljem vremenu fermentacije, pri nižim temperaturama u prvim danima fermentacije dominiraju koagulaza-negativni stafilokoki (KNS), a gotov proizvod ima izraženiju specifičnu aromu i manje kiselkast okus).

Trajne kobasice dijele se prema lokaciji proizvodnje na:

a) mediteranske ili južnoeuropske - karakterizira ih dugotrajno zrenje i fermentacija, spori pad pH vrijednosti nakon pripreme sirovog proizvoda (konačna vrijednost pH > 5). Na okus značajno utječu začini (npr. origano, kim, korijander) te dodatak bijelog ili crnog vina. Npr.: južna Italija (Salama *Felino*), južna Francuska (*Saucisson De L'ardèche*) te Portugal (*Salpição De Vinhais*)

b) sjevernoeuropske - karakterizira ih kratko trajanje zrenja i fermentacije, brz pad pH vrijednosti nakon pripreme sirovog proizvoda (konačna vrijednost pH < 5). Obavezna je operacija dimljenja, te naglasak na postizanju ljućih proizvoda dodatkom začina (ljuta paprika, papar). Npr.: Španjolska *(Chorizo)* i Njemačka *(GöttingerStracke)* (Kovačević, 2014.).

Kratko vrijeme fermentacije pri višim temperaturama rezultira bržim rastom bakterija mliječne kiseline (BMK), dok gotov proizvod, takozvana brzofermentirana kobasica, poprima kiselkast okus i ima slabije izraženu aromu. U kobasicama podvrgnutim dužem vremenu fermentacije, pri nižim temperaturama, u tzv. sporofermentiranim kobasicama, u prvim danima fermentacije dominiraju koagulaza-negativni stafilokoki (KNS), a gotov proizvod je manje kiselkastog okusa i ima izraženiju specifičnu aromu (Suman, 2013.).

Tablica 1 Svojstva suhih sporofermentiranih i polusuhih brzofermentiranih kobasica (Ockerman i Basu, 2007.; Kovačević, 2014.)

SVOJSTVA	SUHE SPOROFERMENTIRANE	POLUSUHE BRZOFERMENTIRANE
Meso u nadjevu	nasjeckano ili mljeveno	nasjeckano ili mljeveno
Mikroflora	s dodatkom ili bez dodatka bakterijskih starter kultura	bakterijski starteri
Dimljenje	bez dimljenja ili slabo dimljenje	uobičajeno dimljenje tijekom fermentacije
pH	5,3 - 5,6	5,3 i niže
Maseni udio mliječne kiseline	0,5 – 1%	0,5 – 1,3%
Udio ukupnih kiselina	1,3%	1%
M/P (omjer masenog udjela vode i proteina)	2,3 i niže/1,0	2,3 – 3,7/1,0
Smanjenje masenog udjela vode tijekom proizvodnje	25 – 50%	15 – 20%
Maseni udio vode	< 35%	30 – 50%
Tekstura	čvrsta	meka
Trajanje fermentacije	1 – 5 dana	12 – 24 h
Brzina zrenja (proizvodnje)	sporo zrenje koje se odvija pri T = 12 – 14 ^{o}C karakteristično je za tradicionalno zrenje fermentiranih suhih kobasica u domaćinstvima tijekom zimskih mjeseci i traje 3,5 – 6 i više mjeseci	brzo zrenje koje se odvija pri $T \approx 25$ ^{o}C i traje < 4 tjedna (proizvod se obično pakira nakon fermentacije)

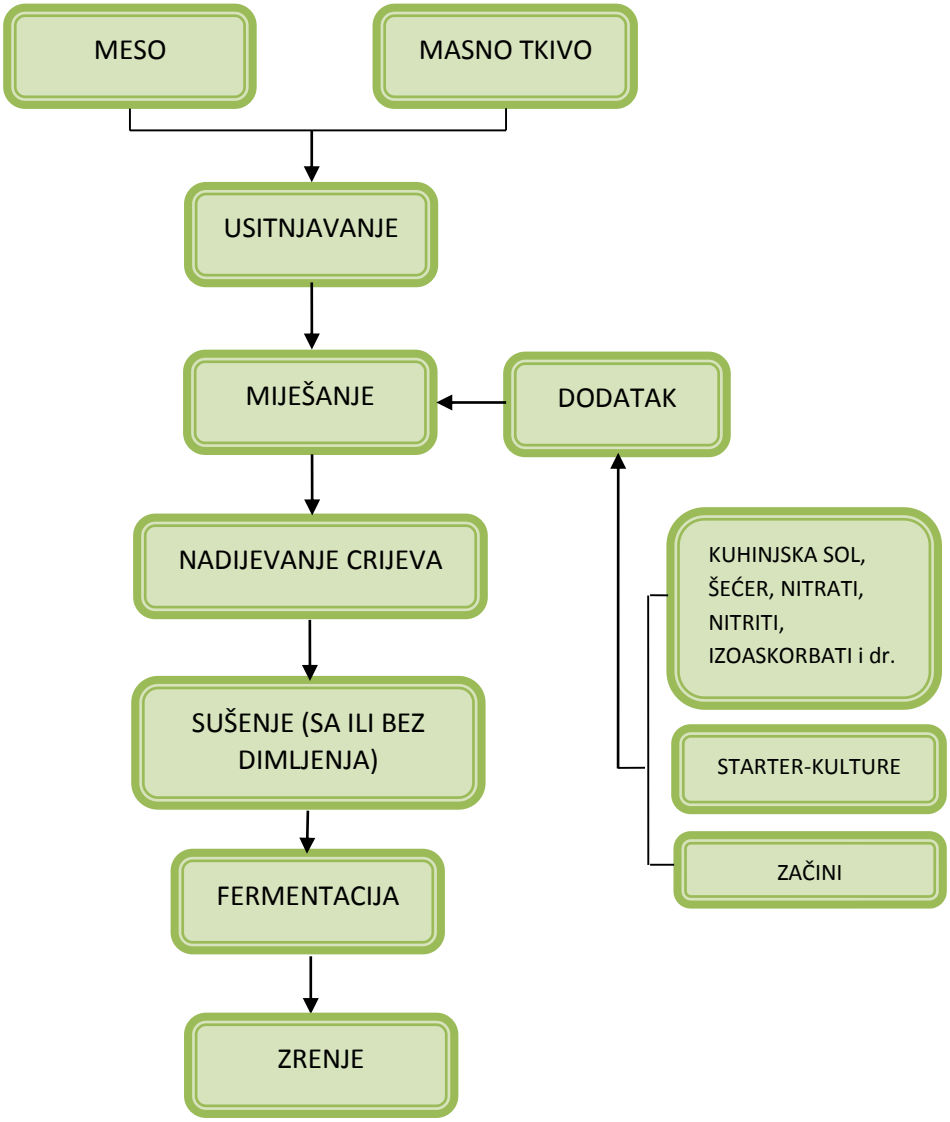
U industriji se uglavnom proizvode brzofermentirane kobasice. Brza fermentacija zasniva se na primjeni starter-kultura mikroorganizama (povoljan utjecaj na sigurnost i trajnost

proizvoda, standardizaciju fermentacije i zrenja te općenito kvalitete proizvoda) i kemijskih stimulatora zrenja.

Kao sirovina za proizvodnju trajnih kobasica najčešće se koristi meso i čvrsto masno tkivo biološki zrelih mesnatih svinja. Poželjno je da meso bude zrelije, odnosno otvorenije strukture (postiže se npr. hlađenjem minimalno 48 sati nakon klanja pri 0 do 2 ^{o}C, a zatim zamrzavanjem i skladištenjem nekoliko dana pri -3 do -8 ^{o}C). Rashlađeno, dehidrirano i ocijeđeno meso se usitnjava u vuku, a zatim kuteruje zajedno s mesnim tijestom. Mesnom tijestu se (tijekom salamurenja u kuteru) osim salamure dodaju i drugi aditivi (GDL, šećeri, škrobni sirup ili starter-kulture mikroorganizama) te smjesa specifičnih začina. Dobivena smjesa se puni (u kolagenska, konjska, goveđa i svinjska crijeva) pomoću vakuum punilica. Nakon nadijevanja i hladnog dimljenja (od 5 do 7 dana pri 10 do 15 ^{o}C) kobasice se prenose u komore za zrenje koje imaju mogućnost regulacije *Rh*, *T* i brzine strujanja zraka. Optimalna temperatura u komorama iznosi od 12 do 16 ^{o}C. Zrenjem se dobiva specifična aroma, boja i okus trajnih kobasica. Posebno su tijekom zrenja značajne fizikalne promjene nadjeva, odnosno gubitak vode, pri čemu vrijedi pravilo da količina vode koja migrira od središta prema periferiji nadjeva mora biti jednaka količini vode koja napušta proizvod. Zrenje se provodi u dvije faze:

- **faza intenzivnog zrenja** u kojoj zbog aktivnosti denitrificirajućih bakterija (*Lactobacillus* i *Micrococcus*) dolazi do stabilizacije boje, teksture i okusa proizvoda (tvorba NOMb, pad pH vrijednosti i prijelaz mišićnih proteina iz sola u gel stanje),

- **faza usporenog zrenja** koja se provodi pri $T > 10$ ^{o}C i smanjenoj *Rh* (70 do 85%), a obilježava je i česta pojava bijele plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus* koje obrastaju površinu ovitka kobasica (Kovačević, 2001.).



Slika 1 Osnovne faze procesa proizvodnje fermentiranih trajnih kobasica

2.1.1. Uloga starter-kultura u proizvodnji trajnih kobasica

U mesnoj industriji preporuča se uporaba starter-kultura od 20-ih godina prošlog stoljeća. Starter-kulture predstavljaju čiste ili miješane kulture bakterija, uzgojenih za tu svrhu. Svojim metabolizmom starter-kulture pozitivno utječu na senzorne osobine trajnih kobasica (izgled, okus, miris, konzistenciju), te imaju sposobnost trajne acidifikcije uslijed čega se inhibira rast i razvoj nepoželjnih mikroorganizama. Starter-kulture su kombinacije liofiliziranih ili smrznutih kultura ispitanih sojeva mikroorgnizama. Najvažniji uvjeti koje moraju ispunjavati prikazani su u **Tablici 2**.

Tablica 2 Opći kriteriji za izbor starter-kultura (Šušković, 2008.)

OPĆI KRITERIJI ZA IZBOR STARTER KULTURA
1. SIGURNOST
- Starteri ne smiju imati patogeno ili toksično djelovanje - Priprava startera mora biti provedena pod strogo kontroliranim aseptičnim uvjetima
2. TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE
- Starteri moraju dominirati nad autohtonom mikroflorom - Starteri provode određenu metaboličku aktivnost - Tijekom tehnološkog postupka proizvodnje startera ne smije doći do kontaminacije
3. EKONOMSKI ASPEKTI
- Uzgoj i rukovanje starterima mora biti lako i ekonomično - Čuvanje startera može biti provedeno metodama zamrzavanja ili liofilizacije s minimalnim gubitkom metaboličke aktivnosti kulture - Važna svojstva startera - moraju biti stabilna pod definiranim uvjetima čuvanja kroz nekoliko Mjeseci **- Broj mikroorganizama u starterima kreće se od 10^{10} – 10^{11} CFU/ml**

Kao starter kulture za proizvodnju fermentiranih kobasica uobičajeno se koriste bakterije koje su kao tehnološka mikroflora dominantne u trajnim kobasicama, kao što su bakterije mliječne kiseline (BMK) *(Lactobacillus, Leuconostoc* i *Pediococcus)* i gram-pozitivni katalaza-pozitivni koki i koagulaza negativni stafilokoki (*Staphylococcus, Kocuria*) (Kovačević, 2014.; Mijat i sur., 2004.).

2.2. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE SLAVONSKOG KULENA

Sukladno Pravilniku o mesnim proizvodima (N.N. br. 131/12) kulen je proizvod od usitnjenoga svinjskog mesa, masnog tkiva, kuhinjske soli, aditiva, začina i ekstrakata začina, šećera, starter kultura, a može se dodati i do 10% goveđeg mesa. Nadjev se puni u prirodne ili umjetne ovitke. Ovitak kulena može biti presvučen plemenitom plijesni. Količina bjelančevina mesa u proizvodu mora biti minimalno 22%.

Slavonski i Baranjski kulen su tradicionalne trajne kobasice Slavonije i Baranje koje se proizvode tehnološkim postupcima fermentacije, dimljenja, sušenja i dugotrajnog zrenja. Kulen se priprema od svinjećeg mesa prve i druge kategorije, tvrde leđne slanine, kuhinjske soli, ljute i slatke začinske paprike i češnjaka te se nadijeva u svinjsko slijepo crijevo (lat.: intestinum caecum), odnosno u „katicu“ (naziv za svinjsko slijepo crijevo u Baranji). Za razliku od Slavonskog kulena u nadjev Baranjskog kulena tradicionalno se dodaje i bijeli papar.

Na kakvoću Slavonskog kulena mogu utjecati različiti čimbenici, od sirovine (pasmine svinja, patoloških promjena mesa, sadržaja glikogena i dr.), preko recepture (omjera kuhinjske soli, začina te njihove kvalitete) do tehnoloških parametara (temperatura, relativna vlažnost, strujanje zraka) i pojedinih procesa (fermentacija, dimljenje, sušenje i zrenje). Također treba napomenuti da značajan utjecaj ima i mikrolokacija proizvodnje, jer tehnološke bakterije, odgovorne za pozitivne procese fermentacije i zrenja kulena, uglavnom dolaze iz okoline ili putem kontakta s uređajima, rukama radnika, vodom i dr. Najbolje sirovine za proizvodnju navedenog proizvoda su odrasle, biološki zrele svinje, odnosno šunkaši plemenitih pasmina ili njihovih križanaca (prvenstveno križanci jorkšira, landrasa i duroka) starosti od minimalno godinu dana i „žive vage“ od 150 i više kilograma s malom količinom masnog tkiva (Babić, 2011; Kovačević, 2001.). Za proizvodnju se koristi svježe svinjsko meso I. kategorije (meso dugog leđnog mišića i buta, te unutarnja pečenica), te do maksimalno 20% mesa II. kategorije (lopatica) temeljno očišćenog od vezivnog i masnog tkiva, vezivnotkivnih tvorevina i krvnih žila (Kovačević, 2001.). Pri odabiru mesa potrebno je izbjeći meso zahvaćeno patološkim promjenama boje: BMV (blijedo, mekano i vodnjikavo) i TČS (tamno, čvrsto i suho). BMV i TČS mesa posljedica su izloženosti svinja kroničnom ili akutnom stresu, odnosno posljedica neodgovarajućih uvjeta uzgoja, ishrane, transporta, ograničenja kretanja, bakterijske infekcije, uskraćivanje hrane i vode, miješanje životinja iz različitih legala, suparništva, neadekvatne operacije omamljivanja i klanja, a posebno maltretiranja životinja i nehumanog postupanja radnika (Kovačević, 2014.). Nakon klanja, polovice je potrebno brzo ohladiti (u vremenu od 18 do 24 h potrebno je postići temperaturu u dubini buta od +4 ^{o}C i pH vrijednost manju od 6,0) i dopremiti na mjesto prerade. Temperatura u prostorijama za preradu mora biti niža od 10 ^{o}C. Nakon hlađenja meso se reže na komadiće u obliku vrpci (dužine 30, širine 10 i debljine oko 3 cm) koji se slažu na nakošene perforirane plohe od nehrđajućeg materijala, radi ocjeđivanja, u trajanju oko 12 sati (preko noći) ili najduže 2 do 3 dana. Slanina se također reže na komadiće sličnih dimenzija. Temperatura mesa se održava u

rasponu od -5 do -2 ^{o}C, dok pH vrijednost mesa u ovoj fazi trebala bi biti manja od 5,9 (Babić, 2011; Kovačević, 2001; Suman, 2013.). Ovako pripremljeno meso usitnjava se u stroju za mljevenje mesa („vuku“) s perforacijama promjera od 8 do 12 mm. Važno je održavati nisku temperaturu (od -2 do -5 ^{o}C) mesa tijekom usitnjavanja kako bi se olakšalo rezanje i spriječila denaturacija proteina uslijed povišenja temperature te izbjeglo oslobađanje unutar-mišićne masti iz mesa što bi za posljedicu imalo promjene u boji proizvoda te u procesima sušenja i zrenja (Suman, 2013.). Optimalni pH mesa treba biti ispod 5,9, a slanine između 6,2 i 6,5. Usitnjenom mesu se dodaju:

- kuhinjska sol 1,8 do 2,2% ili smjesa kuhinjske soli i nitritne soli za salamurenje (u omjeru 1:1) 1,8 do 2,3%
- slatka paprika 0,8 do 1,0%
- ljuta paprika 0,6 do 0,8%
- bijeli luk 0,15 do 0,25% kojega prethodno treba usitniti i ne miješati s vodom (Kovačević, 2001.).

Pripremljena smjesa usitnjenog mesa i dodataka se miješa u miješalici za meso pri čemu bi temperatura smjese trebala biti između 0 i 4 ^{o}C, a pH ispod 5,9. Više pH vrijednosti treba sniziti dodatkom brzo razgradivih šećera (npr. dekstroze). Nadjev se puni isključivo u svinjsko slijepo crijevo. Po punjenju crijeva nadjevom treba dobro istisnuti zrak i spriječiti stvaranje „zračnih džepova“ zbog čega se preporučava upotreba vakuum-punilica (Babić, 2011; Kovačević, 2001.). Pravilno konzervirana crijeva (osušena i usoljena) prije upotrebe treba odsoliti namakanjem u toplu vodu pomiješanu s lukom radi eliminacije nepoželjnih mirisa. Prije nadijevanja crijeva moraju biti suha i ocijeđena, treba izbjegavati dodir nadjeva s vodom, jer dolazi do promjene boje nadjeva, u obliku sivih i zelenih mrlja. Nakon nadijevanja kulen se veže konopcem od konopljinih vlakana te se „šnira“. Šniranje predstavlja poseban način ispreplitanja konopca oko kulena s 3 do 5 omči (na svakih 4 do 5 cm dužine) pri čemu su krajevi konopaca pri vrhu isprepleteni u spoj za vješanje. Ovaj postupak osigurava jednolik raspored pritiska na nadjev i pozitivan vizualni učinak na gotovom proizvodu. Nakon šniranja kuleni se vješaju na kolica i prenose u komore radi izjednačavanja temperature nadjeva (Babić, 2011.). Zrenje kulena sastoji se od tri osnovna stupnja, a poželjno je da komore za zrenje imaju mogućnost regulacije *T*, *Rh* i brzine strujanja zraka sukladno optimalnim uvjetima zrenja (Kovačević, 2001.).

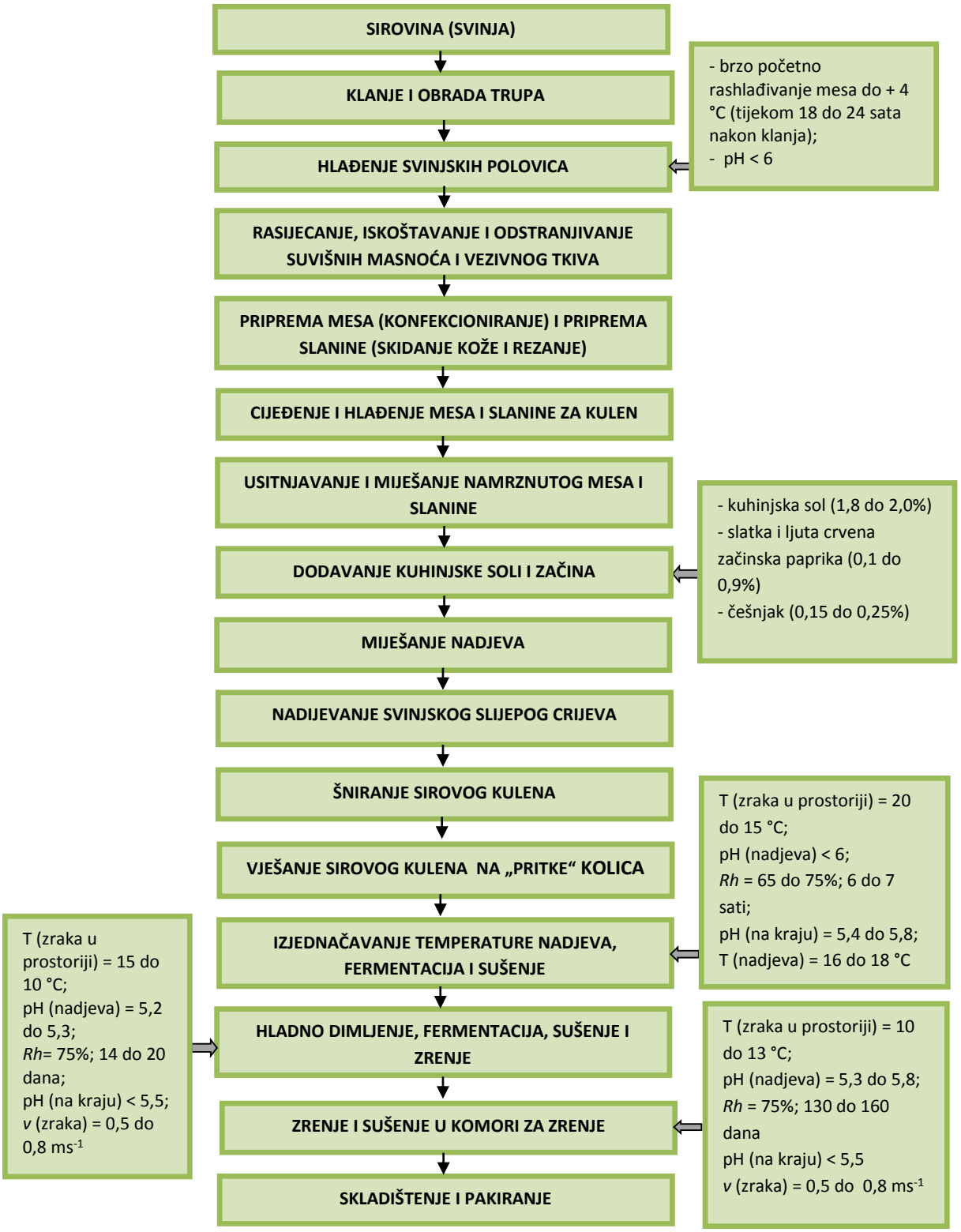
Tradicionalno dimljenje Slavonskog kulena obavlja se toplinskim izgaranjem tvrdih vrsta drva, uglavnom bukve, jasena i običnog graba. Koriste se cjepnice i piljevina, oboje ponekad navlaženi kako bi se smanjila temperatura dima. Proizvodi se obično dime u istoj komori gdje se dim generira (Karolyi, 2011.).



Slika 2 Zrenje kulena u automatiziranoj komori za zrenje

Treba naglasiti da završetkom zrenja maseni udio vode u kulenu mora biti 30% ili niži. Ovako proizveden kulen mora se skladištiti u tamnom prostoru s tim da uvjete skladištenja treba održati konstantnim: *T* na oko 15 ^{o}C, *Rh* od 65 do 75% i brzinu strujanja zraka od 0,05 do 0,1 ms^{-1}. Ukupno trajanje procesa proizvodnje Slavonskog kulena iznosi minimalno 6 mjeseci s time da produženjem vremena zrenja kulen dobiva na kakvoći. Prije isporuke kupcu Slavonski kulen se može pakirati u papirnate propusne omotače, vrećice ili kutije (Babić, 2011; Kovačević, 2001.). Slično drugim fermentiranim proizvodima koji prolaze kroz dugo razdoblje sazrijevanja, kolonizacija vanjske površine plijesnima može se pojaviti i kod Slavonskog kulena.

Prirodno obrastanje plijesnima koje potječe iz okoliša, uglavnom iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus*, može biti poželjno jer štiti od pretjeranog sušenja i oksidacije lipida te pridonosi razvoju arome gotovog proizvoda (Karolyi, 2011.).



Slika 3 Shema tehnološkog procesa proizvodnje Slavonskog kulena

2.3. UTJECAJ PROCESA FERMENTACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKA, MIKROBIOLOŠKA I SENZORSKA SVOJSTVA SLAVONSKOG KULENA

Fermentacija je metoda konzerviranja mesa. Ovisno o vrsti proizvoda, dodacima i tehnologiji proizvodnje traje od 12 sati do 7 i više dana (Kovačević, 2014.).

Fermentacija se može provoditi pri:

- visokoj temperaturi (od 18 do 24 ^{o}C) u trajanju od 1 do 2 dana, a može trajati i do 7 dana (grčke i neke talijanske kobasice),
- niskoj temperaturi (od 10 do 12 ^{o}C) tijekom 1 ili više tjedana.

Kobasice koje fermentiraju pri temperaturi oko 37 °C brzo dostižu najnižu pH vrijednost, fermentacija pri oko 24 °C rezultira pH vrijednošću od oko 4,6 do 5,0, a fermentacija pri nižim temperaturama rezultira višim pH vrijednostima i dugotrajnijom fermentacijom kobasica. Brzo snižavanje pH vrijednosti postiže se dodatkom šećera u smjesu za kobasice (Suman, 2013.).

Tijekom procesa fermentacije dolazi do značajnih biokemijskih, fizikalnih i mikrobioloških promjena, a sam proces je najintenzivniji tijekom prvih nekoliko sati proizvodnje, kada temperatura nadjeva raste od -2 ^{o}C do oko 20 ^{o}C ili 25 ^{o}C.

Fermentacija se postiže djelovanjem prirodno prisutnih odnosno autohtonih bakterija ili dodatkom starter-kultura. Danas se koriste dobro selektirane starter-kulture bakterija mliječne kiseline u kombinaciji s drugim kulturama mikroorganizama.

U fazi fermentacije, istovremeno se odvijaju dvije osnovne mikrobiološke reakcije koje utječu jedna na drugu:

- nastajanje mliječne kiseline djelovanjem bakterija mliječne kiseline (bakterije iz roda *Lactobacillus*),
- nastajanje dušikovog oksida djelovanjem nitrat i nitrit reduktaza (bakterije iz roda *Staphylococcus*) (Babić, 2011.).

Mliječna kiselina proizvedena djelovanjem bakterija mliječne kiseline, sniženjem pH, utječe na teksturu i boju kobasice, mikrobiološku stabilnost, procese proteolize i lipolize, a time i na stvaranje hlapivih spojeva arome i okusa kobasica (Suman, 2013.). Povećanjem kiselosti meso

smanjuje sposobnost vezanja vode i pospješuje se njezina difuzija prema površini kulena, odnosno osigurava ravnomjerno sušenje i učvršćivanje proteinskog gela nadjeva. Nadalje, sniženjem pH vrijednosti kulena aktiviraju se enzimi proteaze koji razgradnjom proteina započinju proces zrenja kulena koji je zajedno s razgradnjom masti (lipaza), najodgovorniji za specifični i poželjni miris i okus finalnog proizvoda (zrelog kulena). Zbog proizvodnje i povećanja koncentracije mliječne kiseline na temperaturama iznad 10 °C dolazi do denaturacije proteina, odnosno proteini „želiraju“, vežu se s mastima te se komadići mesa „sljepljuju“ u kompleksnu masu, što predstavlja početak stvaranja tipične teksture nadjeva kulena (Kovačević, 2014.).

Dakle, tijekom fermentacije dolazi do sljedećih promjena:

- smanjenja pH vrijednosti (pretvorba šećera u mliječnu kiselinu djelovanjem BMK),
- promjena inicijalne mikroflore,
- redukcije nitrata u nitrite te nitrita u dušikov oksid,
- formiranja nitrozilmioglobina,
- otapanja i želiranje miofibrilarnih i sarkoplazmatskih proteina,
- proteolitičkih, lipolitičkih i oksidativnih reakcija te dehidracije.

Najvažniji čimbenik koji zaustavlja fermentaciju kobasica je niska pH vrijednost, no i sniženje vrijednosti aktiviteta vode (a_w) također inhibira daljnji proces fermentacije.

pH vrijednost fermentiranih kobasica ponovo raste tijekom perioda zrenja koji slijedi nakon fermentacije i može trajati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci, a karakterizira ga proteolitička i lipolitička aktivnost endogenih i enzima mikroorganizama koji, uz proces dimljenja i sušenja, doprinose oblikovanju konačnog proizvoda (miris, okus, tekstura, boja).

Fermentacija i zrenje predstavljaju dvije odvojene faze proizvodnje fermentiranih kobasica, a mogu se značajno razlikovati s obzirom na temperaturu, trajanje i relativnu vlažnost zraka.

Glavni cilj procesa fermentacije i zrenja je razvoj željene i tipične boje i arome, čvrstoće koja omogućava rezanje, inhibicija patogenih bakterija i bakterija kvarenja, te dulji vijek trajnosti (Babić, 2011.).

2.3.1. Konzerviranje fermentacijom

Fermentacija je metoda konzerviranja mesa koju karakterizira porast broja bakterija mliječne kiseline (BMK) sa 10^3 do 10^5 CFU/g na 10^6 do 10^9 CFU/g te glikolitička razgradnja šećera, povećanje koncentracije mliječne kiseline, odnosno sniženje pH vrijednosti s početnih 5,7 (početak fermentacije) do 5,5 (sporofermentirane kobasice), odnosno do 4,6 i niže (4,2) (brzofermentirane kobasice). Fermentacija je najintenzivnija u prvih nekoliko sati, kada temperatura raste do vrijednosti optimalnih za razvoj BMK, a može trajati od 12 h (1 dan) do 7 dana i duže ovisno o vrsti proizvoda, dodacima, tehnologiji proizvodnje te temperaturi i relativnoj vlažnosti zraka. Konzervirajuće djelovanje fermentacije primarno je rezultat povećanja koncentracije mliječne kiseline koja djeluje bakteriostatski prema patogenim i bakterijama kvarenja. S druge strane, sniženje pH vrijednosti i temperatura iznad 10 ^oC rezultira denaturacijom proteina (koagulacijom) odnosno prijelazom iz sola u čvrsto gel stanje (vezanje proteina i masti), odnosno stvaranja tipične teksture kulena. Približavanjem pH izoelektričnoj točki (I.t.) proteina smanjuje se sposobnost vezanja vode (SpVV) i pospješuje difuzija vode prema površini kulena, što osigurava ravnomjerno sušenje i daljnju, dehidratacijom uzrokovanu, koagulaciju proteina, odnosno učvršćivanje proteinskog gela nadjeva. Zbog sniženja pH i aktiviteta vode fermentacija u kobasicama završava mliječno-kiselom fermentacijom, osim u slučaju upotrebe starter-kultura koje sadrže kvasce i plijesni koji naknadno razgrađuju laktat. Nakon fermentacije nastupa proces zrenja praćen porastom pH vrijednosti.

2.3.2. Senzorske greške kulena kao posljedica neadekvatne fermentacije

Ukoliko nisu osigurani optimalni uvjeti za fermentaciju kulena, postoji velika vjerojatnost nastanka senzorskih grešaka teksture, kao što su pukotine, šupljine i mrvljenje nadjeva tijekom narezivanja.

2.3.2.1. Pukotine, šupljine i mrvljenje nadjeva kulena tijekom narezivanja

Nastanak pukotina i šupljina u presjeku kulena i mrvljenje nadjeva tijekom narezivanja može biti posljedica:

- manjka šećera u mesu,

- prisutnost rezidua antibiotika u mesu koje inhibiraju rast i razvoj bakterija mliječne kiseline odgovornih za proces fermentacije,
- odstupanja tehnoloških parametara procesa fermentacije od optimalnih vrijednosti (niže vrijednosti temperature i relativne vlažnosti zraka koje utječu na sporiji razvoj i aktivnost bakterija mliječne kiseline),
- pojačane aktivnosti bakterije *Leuconostoc mesenteroides* koja proizvodi ugljični dioksid,
- ubrzane proteolize i porasta pH zbog prekomjerne kontaminacije i aktivnosti bakterija kvarenja.

Do manjka šećera u svinjskom mesu dolazi zbog promjena mesa, koje su uvjetovane patološkim stanjem svinja, kao što su: BMV (blijedo, mekano i vodnjikavo) i TČS (tamno, čvrsto i suho) meso.



Slika 4 Pukotine u presjeku kulena kao posljedica neadekvatne fermentacije

Mesnate i izrazito mesnate pasmine svinja kao što su pietrain, belgijski landras, njemački landras i dr., postale su selekcijom stresno osjetljive, odnosno imaju sklonost stvaranju BMV i TČS mesa, zbog čega nisu pogodne za proizvodnju kulena. Rezidue antibiotika mogu biti posljedica liječenja bolesnih svinja, pri čemu se antibiotici zbog prekratke karence mogu zadržati u mesu i u nadjevu tijekom proizvodnje kulena i spriječiti rast bakterija mliječne kiseline, donosno spriječiti normalno odvijanje procesa fermentacije. Problem stvaranja šupljina nije samo marketinški i senzorski, nego i zdravstveni. U šupljinama nadjeva dolazi do kondenzacije vode te se stvaraju povoljni uvjeti za razvoj autohtonih plijesni i patogenih bakterija. Pukotine koje nastaju tijekom procesa fermentacije povećavaju se tijekom sušenja zbog daljnje denaturacije proteina (zbog gubitka vode).

Za sprječavanje stvaranja šupljina i pukotina, te mrvljenja nadjeva potrebno je:

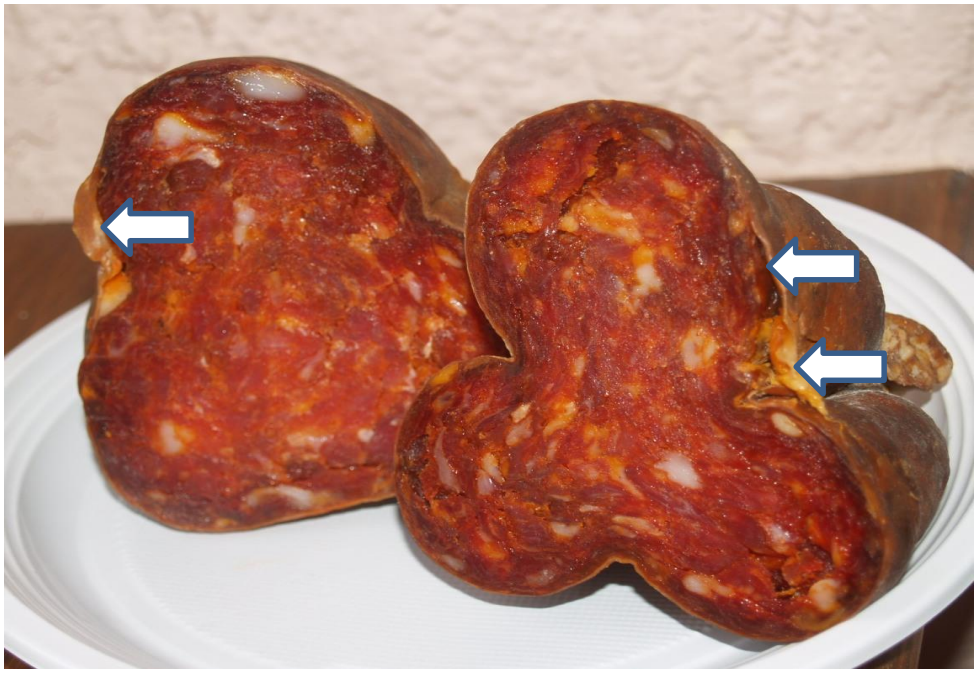
- osigurati adekvatnu sirovinu, odnosno meso svinja koje nisu bile izložene i nisu genetski sklone stresu i stvaranju BMV i TČS mesa te ne sadrže rezidue antibiotika,
- tijekom pripreme nadjeva dodati šećere i to 0,4 do 0,8% (glukoze ili maltodekstrina) na masu nadjeva, ako postoji sumnja u nedovoljni sadržaj glikogena u mesu,
- proces fermentacije provoditi u komorama za zrenje s mogućnošću automatske regulacije procesnih parametara, posebice temperature i relativne vlažnosti zraka ili bar u prvim danima fermentacije osigurati temperaturu u komori 20 do 22 ^{o}C,
- održavanjem higijene proizvodnih prostorija, ruku i odjeće radnika te opreme i pribora minimizirati kontaminaciju patogenim i bakterijama kvarenja, ako u registarskom objektu za proizvodnju kulena nije uveden HACCP.

2.3.2.2. Prekomjerna naboranost ovitka kulena te odvajanje ovitka od nadjeva

Nastanak prekomjerne naboranosti ovitka (crijeva) i odvajanje ovitka od nadjeva može biti posljedica:

- nepravilnog nadijevanja i zaostajanja zraka u nadjevu (tzv. "zračni džepovi“),
- oštećenja ili neadekvatno očišćenog ovitka (zaostatak mukoze),
- prebrzog sušenja i presušenosti,
- neadekvatna provedba fermentacije i nepovezivanje nadjeva i ovitka,
- prevelike *Rh,*

- podlijevanja masti ispod ovitka zbog visoke temperature dimljenja.



Slika 5 Odvajanje ovitka od nadjeva

Odvajanje ovitka od nadjeva i prekomjerna naboranost nisu marketinški prihvatljivi i upućuju na tehnološke greške te vrlo često dolaze u kombinaciji s tamnim rubom, prekomjernom naboranosti te nepoželjnom tamno-crvenom do smeđom bojom nadjeva. U svrhu sprječavanja navedenih pojava prilikom narezivanja, neophodno je:

- proces fermentacije, dimljenja, zrenja i sušenja radi osiguranja optimalnih procesnih uvjeta, provoditi u automatiziranim komorama za zrenje u kojima se mogu optimirati procesni parametri zraka i dima: temperatura, brzina strujanja i relativna vlažnost,
- ukoliko su u pitanju značajniji proizvodni kapaciteti, kako bi se izbjegli problemi stvaranja tzv. „zračnih džepova“, za nadijevanje treba koristiti vakuum punilice
- crijeva trebaju biti bez oštećenja i dobro očišćena,
- treba osigurati optimalne uvjete za provedbu procesa fermentacije (Kovačević, 2014.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Tradicionalnim tehnološkim postupkom pripremiti tri skupine uzoraka Slavonskog kulena s dodatkom različitih šećera te istražiti utjecaj primjene različitih temperatura (12 °C i 20 °C) na proces fermentacije Slavonskog kulena.

3.2. MATERIJALI I METODE

Nadjev kulena pripremljen je u pilot postrojenju istraživačkog Laboratorija Katedre za tehnologiju mesa i ribe, tradicionalnim postupkom koji je opisan u poglavlju pod nazivom: „Tehnologija proizvodnje Slavonskog kulena“, prema sljedećoj recepturi: *w* (kuhinjske soli) = 2%, *w* (češnjaka) = 0,25%, *w* (slatke paprike) = 0,4% i *w* (ljute paprike) = 0,4%.

Pripremljeno je šest uzoraka kulena s dodatkom različitih šećera (glukoze i maltodekstrina) pri čemu je maseni udio šećera na masu nadjeva iznosio 0,7% (**Tablica 3**).

Tablica 3 Uzorci kulena pripremljeni tradicionalnim postupkom s dodatkom različitih šećera i provedbom procesa fermentacije pri različitim temperaturama

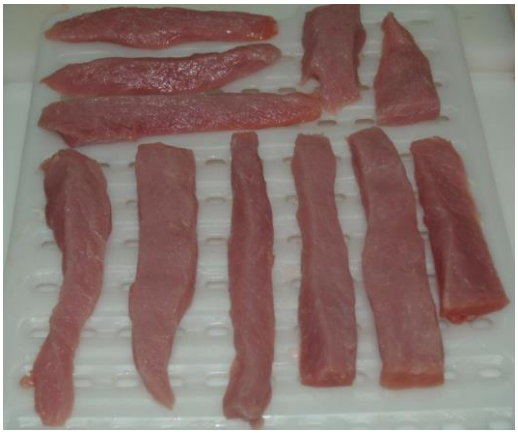
SKUPINA UZORAKA	BROJ UZORAKA	VRSTA I MASENI UDIO ŠEĆERA U NADJEVU	TEMPERATURA FERMENTACIJE (°C)
Skupina 1	2	bez dodatka šećera - referentni uzorak	12
			20
Skupina 2	2	0,7% glukoza	12
			20
Skupina 3	2	0,7% maltodekstrin	12
			20



Slika 6 Priprema crijeva za punjenje



Slika 7 Mjerenje pH vrijednosti



Slika 8 Rezanje mesa na vrpce



Slika 9 Rezanje slanine na vrpce



Slika 10 Usitnjavanje mesa



Slika 11 Usitnjavanje slanine



Slika 12 Dodavanje začina



Slika 13 Miješanje nadjeva



Slika 14 Punjenje nadjeva



Slika 15 Vaganje kulena

Pripremljeni uzorci sirovog kulena ovješeni su na „pritke“ u automatiziranoj komori za zrenje u kojoj su se tijekom operacija izjednačavanja temperature nadjeva (kondicioniranja), dimljenja, fermentacije i zrenja kontinuirano, tijekom 19 dana (pri 20 °C) te 32 dana (23 dana uzorak s dodatkom maltodekstrina) (pri 12 °C), određivale pH vrijednosti te fizikalno-kemijska svojstva. Mjerenja su provedena sljedećom dinamikom:

1. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava slanine (1. dan),
2. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava mesa (1. dan),
3. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava sirovog nadjeva (1. dan),
4. Mjerenje pH vrijednosti mesa, slanine i sirovog nadjeva (1. dan),
5. Određivanje mikrobiološke ispravnosti sirovog nadjeva (1. dan),



Slika 16 Automatizirana komora za zrenje kulena

6. Kontinuirano mjerenje pH vrijednosti kulena svakih 24 sata tijekom procesa fermentacije (19 dana pri 20 °C i 32 dana, odnosno 23 (uzorak s dodatkom maltodekstrina) pri 12 °C),
7. Određivanje mikrobiološke ispravnosti kulena tijekom procesa fermentacije (21 dan).

3.2.1. Metode za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava

3.2.1.1. Određivanje udjela vode, bjelančevina i ukupnih masti

Određivanje udjela vode, bjelančevina i ukupnih masti provedeno je na uređaju FoodScan Meat Analyser-a (FOSS) (**Slika 17**) prema AOAC (Association of Official Analytical Chemists) metodi 2007.04.



Slika 17 FoodScan Meat Analyser

3.2.1.2. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost određena je uređajem pH/Ion 510 – Bench pH/Ion/mV meter (Eutech Instruments Pte Ltd/Oakton Instruments, USA), prema ISO normi 2917:1999 (HRN ISO 2917, 2000) te uputama proizvođača (PH/Ion 510 Instruction Manual). Terenska mjerenja pH vrijednosti provedena su pomoću prijenosnog pH metra pH 3210/3310 tvrtke WTW (**Slika 18**).



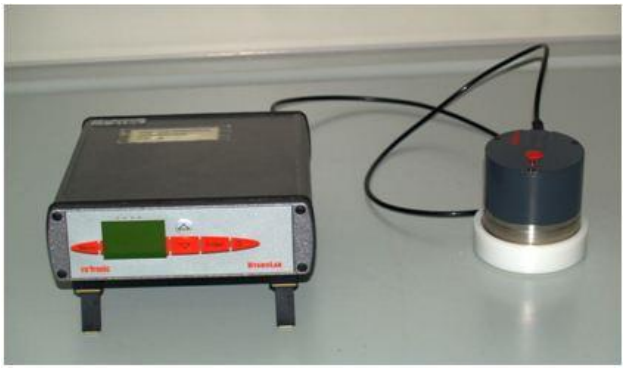
Slika 18 Prijenosni pH metar pH 3210/3310 tvrtke WTW

3.2.1.3. Određivanje masenog udjela soli

Maseni udio soli (NaCl) određen je prema ISO normi 1841:1970.

3.2.1.4. Određivanje aktiviteta vode

Aktivitet vode određen je pomoću uređaja HygroLab 3 – Multi-channel Humidity & Water Activity Analyser (ROTRONIC) (**Slika 19**), prema uputama proizvođača (HygroLab Bench Top Humidity Temperature Indicator Instruction Manual V2.0), pri sobnoj temperaturi (20± 2 ^{o}C).



Slika 19 Rotronic – HygroLab 3 – Multi – channel Humidity Water Activity Analyser

3.2.1.5. Instrumentalno određivanje boje

Instrumentalno određivanje boje je provedeno uređajem MiniScan®XE Plus spectro-colorimetar (Hunter Associates Laboratory, Inc., Virginia, USA), (angle 10°, illuminant D65) (**Slika 20**). Uređaj je prije početka rada kalibriran hvatačem svijetlosti i bijelom keramičkom pločom (L0 = 93.01, a0 = -1.11 i b0 = 1.30). Određene su koordinate boje u CIE – L*a*b* sustavu: L* – koordinata svjetline (lightness): 0 (crna) – 100 (bijela); a* - koordinata obojenja (redness): (± crveno – zeleno); te b* koordinata obojenja (yellowness): (± žuto – plavo). Mjerenje boje uzoraka kulena provedeno je pri sobnoj temperaturi (20 ± 2 ^{o}C). Mjerenje boje svakog uzorka provedeno je na 10 mjesta.



Slika 20 Hunter- Lab Mini ScanX

3.2.2. Mikrobiološka analiza

Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti, prema Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (N. N. br. 81/13) i pripadajućem Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu, 2011., provedeno je mikrobiološkim analizama prema HRN ISO postupcima u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (**Tablica 4**).

Tablica 4 Klasične mikrobiološke metode (HRN ISO) i biokemijska identifikacija mikroorganizama API *(Analitycal Profile Indeks)* testovima prema uputama proizvođača (Frece i sur., 2010.; Kovačević i Mastanjević, 2013.)

MIKROORGANIZMI	METODA	PRIMJER HRANJIVE PODLOGE	UVJETI INKUBIRANJA	API TEST
Salmonella spp.	HRN EN ISO 6579:2003./ Ispr. 1	RP-broth, XLD (Biolife)	37 °C 24 - 48 h	API 20 E V4.1
Enterobakterije	HRN ISO 21528:2008.	VRBG (Biolife)	37 °C 24 h	API 20 E V4.1
Staphylococcus aureus	HRN ISO 6888-2:1999.	BP (Merck)	37 °C 24 - 48 h	API STAPH V4.1
Sulfitoreducirajuće klostridije	HRN ISO 15213: 2003.	SPS (Merck)	37 °C 72 sata	-
Listeria monocytogenes	HRN EN ISO 11290-1/A1:2004.	Palcam (Merck)	30 °C / 24 h 37 °C / 24 - 48 h	API Listeria V1.2
Escherichia coli	HRN ISO 16649-2:2001	ENDO (Biolife)	44 °C / 24h	-
Kvasci i plijesni	(HRN ISO 7954) HRN ISO 21527-1:2012 HRN ISO 21527-2:2012	YGCA (Biolife)	25 °C 5 dana	API 20 C AUX V4.0 Kvasci
Aerobne mezofilne bakterije	HRN ISO 4833-1:2013	TGYA (Biolife)	30 °C 72h	-
	HRN ISO 7954 : 2002.	YGCA (Biolife)	25 °C 5 dana	-
Bakterije mliječne kiseline	HRN ISO 15214: 1999	MRS agar (Biolife)	30 °C 48 - 72 sata	API 50 CHL V5.1

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI

Rezultati istraživanja, odnosno provedba eksperimentalnog dijela diplomskog rada:

1. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava slanine (1. dan) (**Tablica 5**),
2. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava mesa (1. dan) (**Tablica 5**),
3. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava sirovog nadjeva (1. dan) (**Tablica 6**),
4. Mjerenje pH vrijednosti mesa, slanine i sirovog nadjeva (1. dan) (**Tablica 5**, **Tablica 6**, **Slika 18**),
5. Određivanje mikrobiološke ispravnosti sirovog nadjeva (1. dan) (**Tablica 11**),
6. Kontinuirano mjerenje pH vrijednosti kulena svakih 24 sata tijekom procesa fermentacije (**Tablica 14**, **Tablica 15**, **Tablica 16**, **Tablica 17**, **Tablica 18**, **Tablica 19**, **Slika 21**, **Slika 22**, **Slika 23**, **Slika 24**, **Slika 25**, **Slika 26**),
7. Određivanje mikrobiološke ispravnosti kulena nakon završetka procesa fermentacije (**Tablica 12**).

Tablica 5 Osnovni fizikalno-kemijski sastav, a_w i pH slanine i mesa za proizvodnju kulena

Oznaka uzorka	% masti	% vode	% proteina	% kolagena	a_w	pH
Slanina	74,04	19,93	7,32	2,70	0,96	6,63
Meso	9,00	70,67	19,85	1,36	0,95	5,62

Tablica 6 Osnovni kemijski sastav, a_w i pH nadjeva kulena

Oznaka uzorka	% masti	% vode	% proteina	% kolagena	a_w	pH
Sirovi nadjev	12,37	64,33	18,18	1,20	0,95	5,51

Tablica 7 Maseni udio soli (NaCl), pepela, ugljikohidrata, mliječne kiseline, energetska vrijednost i boja nadjeva kulena

Oznaka uzorka	% NaCl	% pepela	% ugljikohidrata	Energetska vrijednost (kcal)	L	a	b
Sirovi nadjev	1,98	2,94	2,18	192,77	55,82	21,66	35,26

Tablica 8 Osnovni kemijski sastav, a_w i pH uzoraka kulena nakon 21 dan proizvodnje

Skupina uzorka	% masti	% vode	% proteina	% kolagena	a_w
Skupina 1	17,40	54,92	25,12	0,40	0,913
Skupina 2	17,81	56,12	23,69	0,72	0,915
Skupina 3	16,99	57,57	23,91	0,97	0,912

Tablica 9 Maseni udjeli soli (NaCl), pepela, ugljikohidrata, mliječne kiseline i energetska vrijednost uzoraka kulena nakon 21 dan proizvodnje

Skupina uzorka	% NaCl	% pepela	% ugljikohidrata	Energetska vrijednost (kcal)	% mliječne kiseline
Skupina 1	2,77	4,24	-	257,08	0,86
Skupina 2	2,65	4,06	-	255,05	1,26
Skupina 3	2,70	3,90	-	248,55	1,49

Tablica 10 Instrumentalno izmjerena boja uzoraka kulena nakon 21 dan proizvodnje

Skupina uzorka		L	a	b
Skupina 1	rub	44,26	18,06	20,06
	sredina	47,18	15,51	22,59
Skupina 2	rub	45,78	14,46	21,82
	sredina	49,13	14,08	21,94
Skupina 3	rub	48,55	17,31	23,31
	sredina	49,28	17,55	23,22

Tablica 11 Rezultati mikrobiološke analize nadjeva kulena

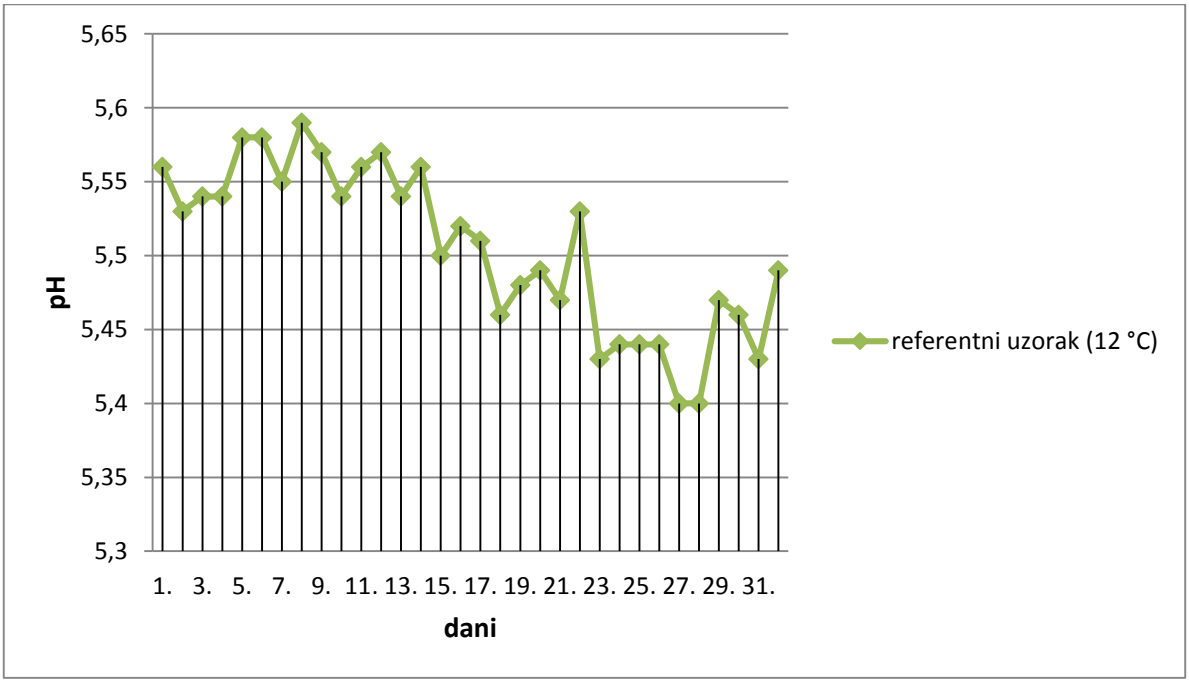
Mikroorganizmi (CFU/g uzorka)	**Oznaka uzorka Sirovi nadjev**
Listeria monocytogenes	-
Salmonella spp.	odsutno
Staphylococcus aureus	-
Sulfitoreducirajuće klostridije	-
Enterobakterije	$5,5 \times 10^1$
Escherichia coli	-
Kvasci	$1,2 \times 10^4$
Plijesni	$4,5 \times 10^1$
Aerobne mezofilne bakterije	$1,6 \times 10^4$
Bakterije mliječne kiseline	$1,4 \times 10^4$

Tablica 12 Rezultati mikrobiološke analize uzoraka kulena nakon 21 dan proizvodnje

Mikroorganizmi (CFU/g uzorka)	Skupina uzorka		
	Skupina 1	**Skupina 2**	**Skupina 3**
Listeria monocytogenes	-	-	-
Salmonella spp.	-	-	-
Sulfitoreducirajuće klostridije	-	-	-
Enterobakterije	$4{,}2 \times 10^4$	$8{,}3 \times 10^4$	$3{,}5 \times 10^4$
Kvasci i Plijesni	$1{,}5 \times 10^6$	$2{,}5 \times 10^5$	5×10^5
Aerobne mezofilne bakterije	8×10^6	$5{,}1 \times 10^6$	2×10^6
Bakterije mliječne kiseline	$6{,}5 \times 10^6$	$1{,}2 \times 10^6$	8×10^6
Koagulaza negativni stafilokoki	1×10^2	-	1×10^2

Tablica 13 Promjena pH vrijednosti kulena bez dodatka šećera (referentni uzorak) tijekom procesa fermentacije na 12 °C

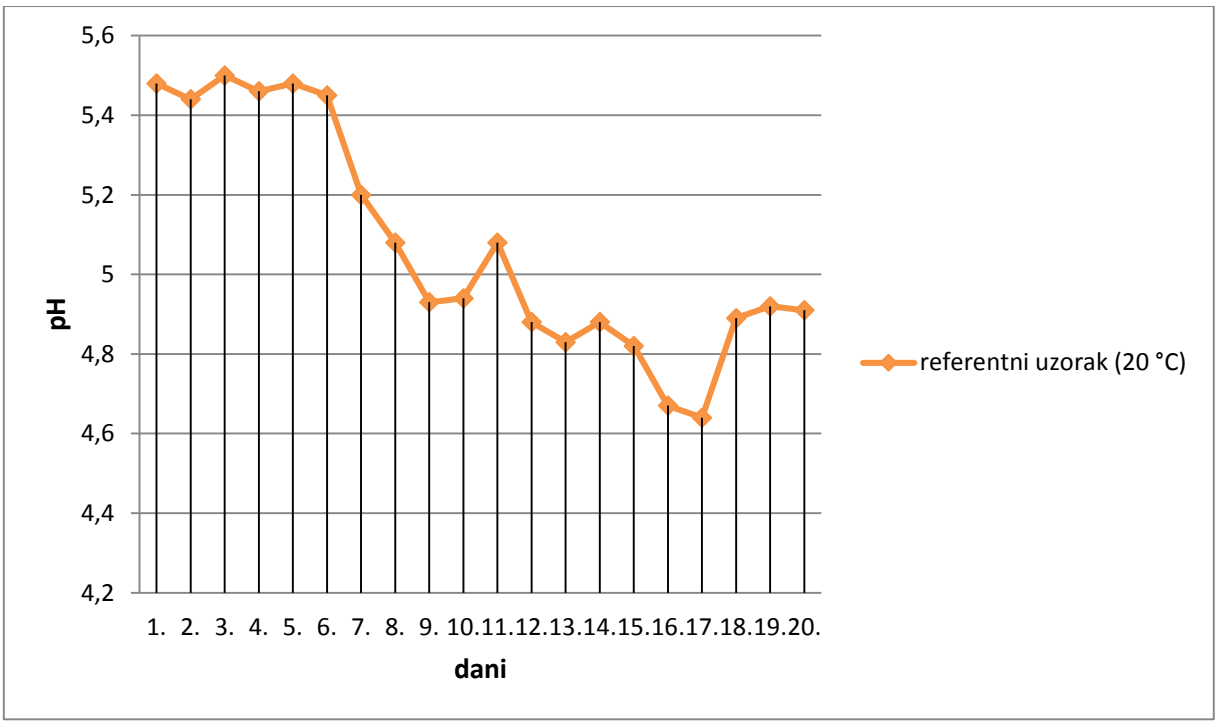
DANI	pH	DANI	pH	DANI	pH
1.	5,56	12.	5,57	23.	5,43
2.	5,53	13.	5,54	24.	5,44
3.	5,54	14.	5,56	25.	5,44
4.	5,54	15.	5,50	26.	5,44
5.	5,58	16.	5,52	27.	5,40
6.	5,58	17.	5,51	28.	5,40
7.	5,55	18.	5,46	29.	5,47
8.	5,59	19.	5,48	30.	5,46
9.	5,57	20.	5,49	31.	5,43
10.	5,54	21.	5,47	32.	5,49
11.	5,56	22.	5,53		



Slika 21 Promjena pH vrijednosti kulena bez dodatka šećera (referentni uzorak) tijekom procesa fermentacije na 12 °C

Tablica 14 Promjena pH vrijednosti kulena bez dodatka šećera (referentni uzorak) tijekom procesa fermentacije na 20 °C

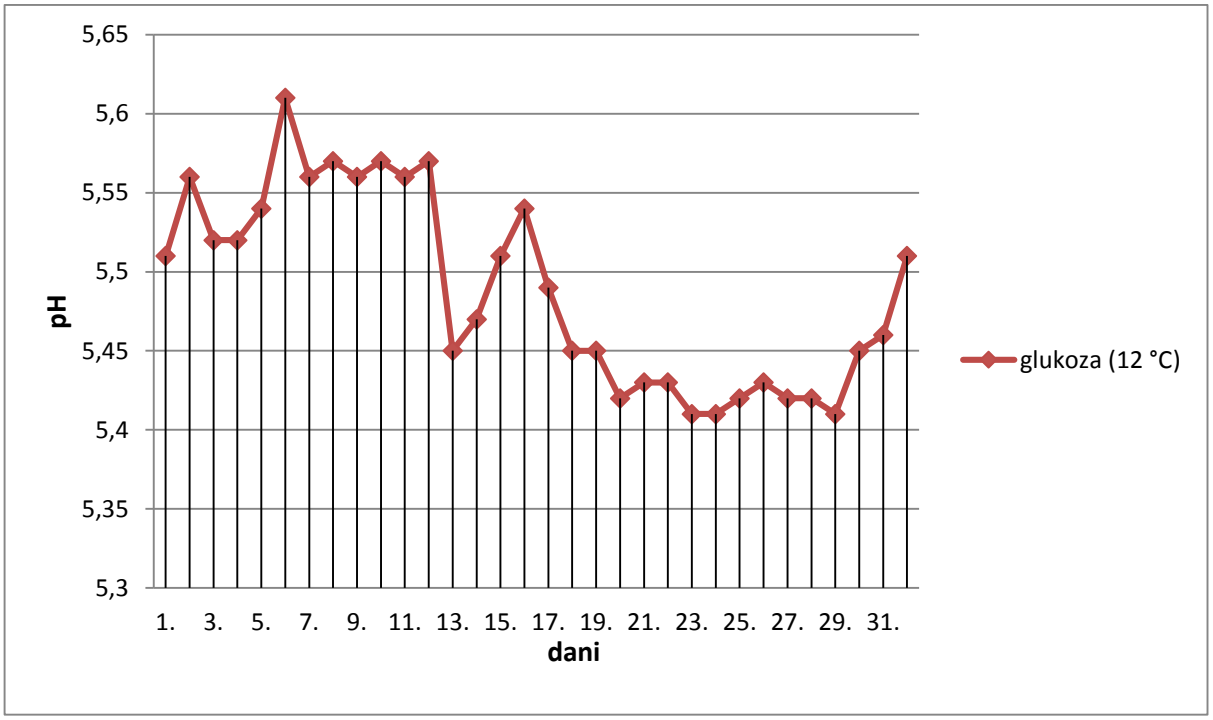
DANI	pH	DANI	pH
1.	5,48	11.	5,08
2.	5,44	12.	4,88
3.	5,50	13.	4,83
4.	5,46	14.	4,88
5.	5,48	15.	4,82
6.	5,45	16.	4,67
7.	5,20	17.	4,64
8.	5,08	18.	4,89
9.	4,93	19.	4,92
10.	4,94	20.	4,91



Slika 22 Promjena pH vrijednosti kulena bez dodatka šećera (referentni uzorak) tijekom procesa fermentacije na 20 °C

Tablica 15 Promjena pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% glukoze tijekom procesa fermentacije na 12 °C

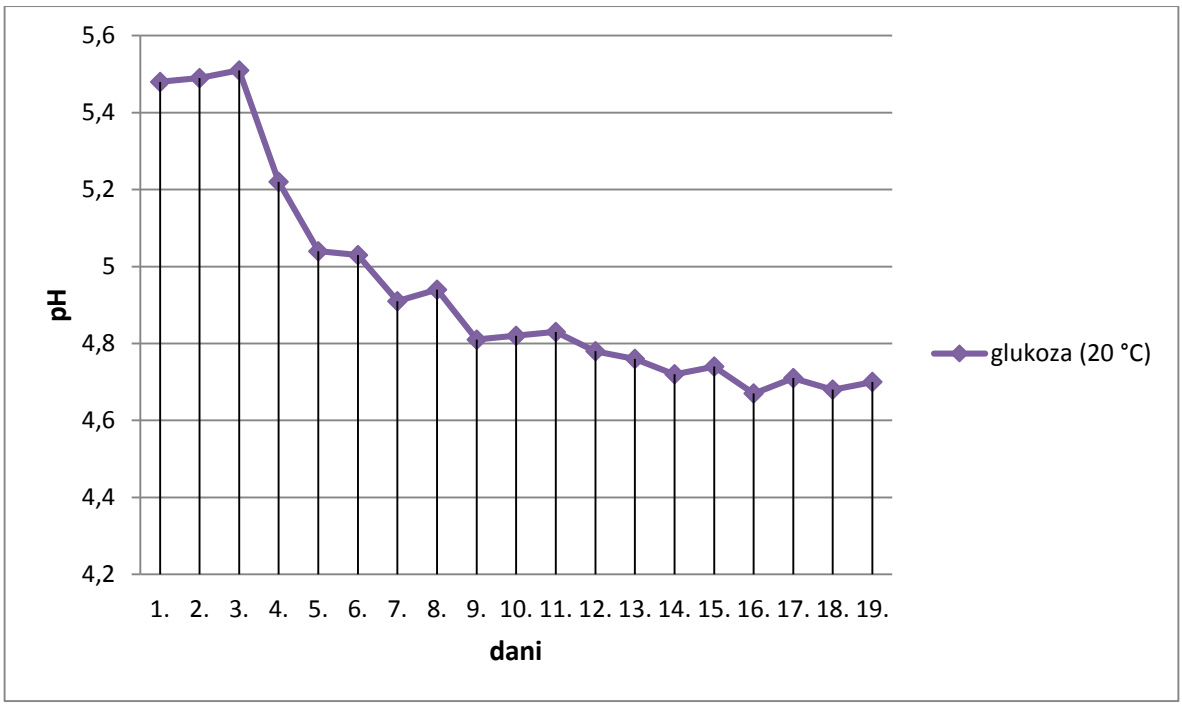
DANI	pH	DANI	pH	DANI	pH
1.	5,51	12.	5,57	23.	5,41
2.	5,56	13.	5,45	24.	5,41
3.	5,52	14.	5,47	25.	5,42
4.	5,52	15.	5,51	26.	5,43
5.	5,54	16.	5,54	27.	5,42
6.	5,61	17.	5,49	28.	5,42
7.	5,56	18.	5,45	29.	5,41
8.	5,57	19.	5,45	30.	5,45
9.	5,56	20.	5,42	31.	5,46
10.	5,57	21.	5,43	32.	5,51
11.	5,56	22.	5,43		



Slika 23 Promjeni pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% glukoze tijekom procesa fermentacije na 12 °C

Tablica 16 Promjene pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% glukoze tijekom procesa fermentacije na 20 °C

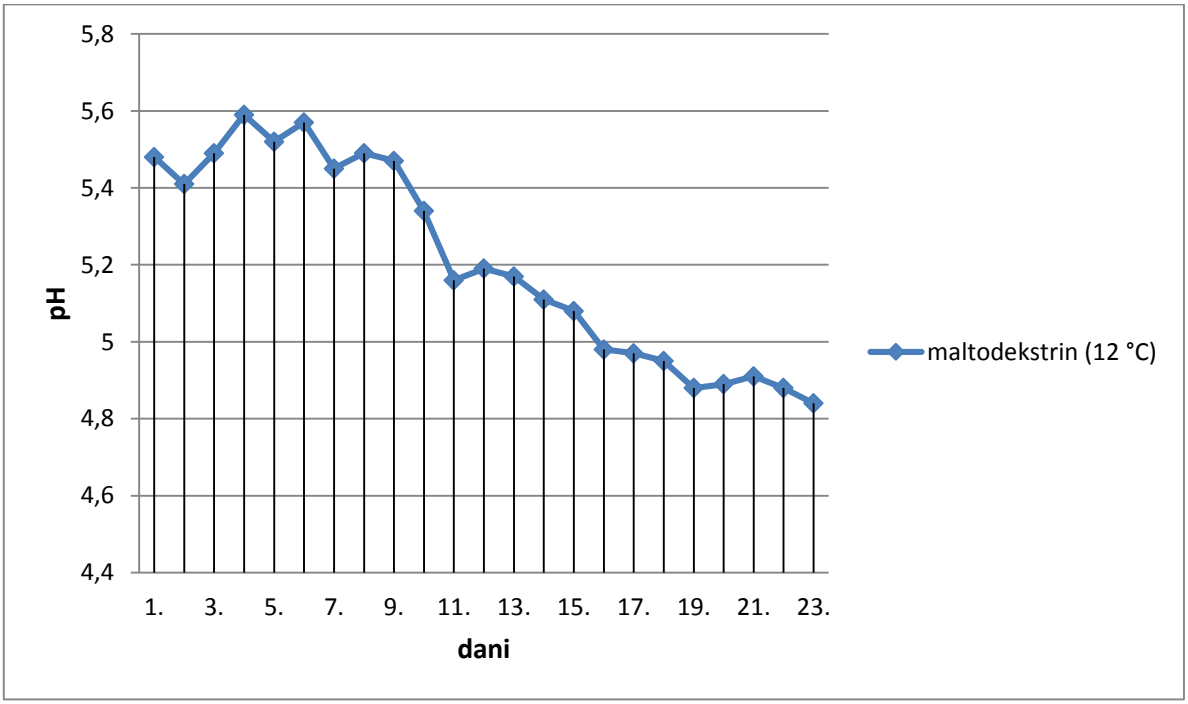
DANI	pH	DANI	pH
1.	5,48	11.	4,83
2.	5,49	12.	4,78
3.	5,51	13.	4,76
4.	5,22	14.	4,72
5.	5,04	15.	4,74
6.	5,03	16.	4,67
7.	4,91	17.	4,71
8.	4,94	18.	4,68
9.	4,81	19.	4,70
10.	4,82		



Slika 24 Promjena pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% glukoze tijekom procesa fermentacije na 20 °C

Tablica 17 Promjena pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% maltodekstrina tijekom procesa fermentacije na 12 °C

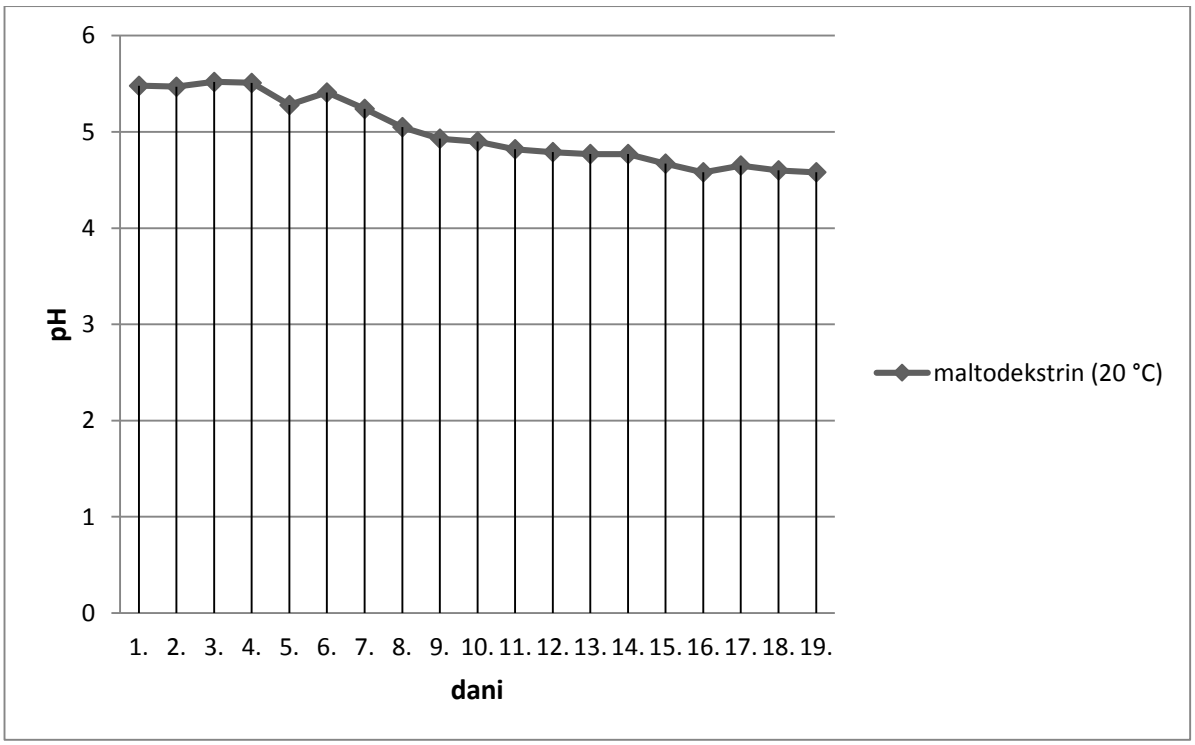
DANI	pH	DANI	pH
1.	5,48	13.	5,17
2.	5,41	14.	5,11
3.	5,49	15.	5,08
4.	5,59	16.	4,98
5.	5,52	17.	4,97
6.	5,57	18.	4,95
7.	5,45	19.	4,88
8.	5,49	20.	4,89
9.	5,47	21.	4,91
10.	5,34	22.	4,88
11.	5,16	23.	4,84
12.	5,19		



Slika 25 Promjena pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% maltodekstrina tijekom procesa fermentacije na 12 °C

Tablica 18 Promjena pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% maltodekstrina tijekom procesa fermentacije na 20 °C

DANI	pH	DANI	pH
1.	5,48	11.	4,82
2.	5,47	12.	4,79
3.	5,52	13.	4,77
4.	5,51	14.	4,77
5.	5,28	15.	4,67
6.	5,41	16.	4,58
7.	5,24	17.	4,65
8.	5,05	18.	4,60
9.	4,93	19.	4,58
10.	4,90		



Slika 26 Promjena pH vrijednosti kulena s dodatkom 0,7% maltodekstrina tijekom procesa fermentacije na 20 °C

5. RASPRAVA

Analiza fizikalno-kemijskih svojstava mesa i slanine (**Tablica 5**), korištenih za pripremu nadjeva za kulen, pokazuje da su maseni udjeli osnovnih gradivnih tvari (masti, vode, proteina, kolagena) te vrijednosti aktivnosti vode (a_w) i pH u skladu s literaturnim podacima za svježe svinjsko meso i slaninu, odnosno 24 sata *post-mortem* (Kovačević, 2001.). Zahtjev za meso, koje se koristi za proizvodnju kulena, ali i drugih trajnih kobasica, je da su vrijednosti pH nakon 24 sata niže od 6,0 što ukazuje na normalan tijek *post-mortalne* glikolize, proizvodnje mliječne kiseline i sniženja pH vrijednosti (Suman, 2013.) bez patoloških promjena kao što su blijedo, mekano i vodnjikavo meso (BMV) ili tamno, čvrsto i suho meso (TČS).

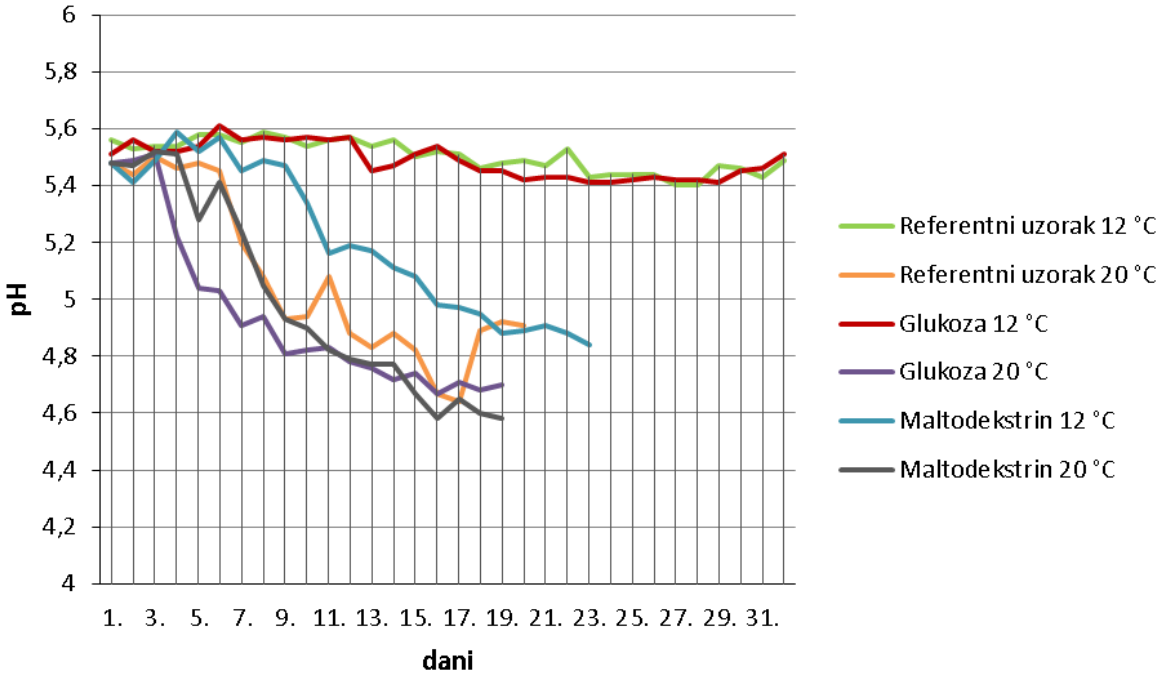
U ovom radu ispitivan je utjecaj dodataka različitih šećera te primjene različitih temperatura na efikasnost procesa fermentacije koja se pratila mjerenjem pH vrijednosti uzoraka kulena. Na **Slici 27** su prikazane vrijednosti pH izmjerene tijekom procesa fermentacije. Rezultati pokazuju da prvih 7 dana u uzorcima kulena (referentni uzorak te uzorci s dodatkom 0,7% glukoze i maltodekstrina), podvrgnutim fermentaciji pri 20 °C, dolazi do intenzivnog pada pH vrijednosti s početnih pH = 5,48 i nastavlja se do završetka procesa fermentacije (oko 3 tjedna) kada doseže najnižu vrijednost pH = 4,58 - 4,91. Proces fermentacije pri višoj temperaturi rezultira većom koncentracijom bakterija mliječne kiseline, jer su optimalne temperature rasta i razvoja bakterija mliječne kiseline iznad 20 ^oC (**Tablica 19**).

Tablica 19 Preporučene temperature fermentacije za bakterije mliječne kiseline (BMK) koje se koriste kao bakterijske starter kulture za proizvodnju trajnih kobasica (Toldra, 2007.)

ROD	VRSTA	*PREPORUČENE TEMPERATURE FERMENTACIJE (°C)
Lactobacillus	*Sakei*	21 - 32
	Plantarum	25 - 35
	Farciminis	22 - 32
	Curvatus	22 - 37
Pediococcus	*pentosaceus*	20 - 37
	Acidilactici	25 - 45
Staphylococcus		21 - 32
Kocuria		21 - 32

**Za svako se povećanje temperature za 5 ^oC brzina proizvodnje mliječne kiseline udvostručuje.*

U uzorcima (referentni uzorak, uzorak s dodatkom 0,7% glukoze) pri 12 °C došlo je do sporijeg pada pH vrijednosti s početnih pH = 5,51 - 5,56 do konačnih pH = 5,49 - 5,51 nakon završetka procesa fermentacije, odnosno nakon 4 tjedna, dok u uzorku s dodatkom 0,7% maltodekstrina, pri 12 °C, dolazi do postupnog pada pH vrijednosti s početnih 5,48 do 4,84 (nakon 23 dana fermentacije). Do značajnijeg pada pH vrijednosti tijekom fermentacije provedene pri 12 °C dolazi u uzorcima s dodatkom maltodekstrina (sa 5,48 na 4,84), dok su promjene pH vrijednosti referentnog uzorka i uzorka s dodatkom 0,7% glukoze značajno manje i kreću se u rasponu od 5,56 do 5,40, odnosno od 5,51 do 5,41. Povećanje koncentracije mliječne kiseline, odnosno intenzivno snižavanje pH vrijednosti na početku procesa fermentacije ima ključnu ulogu u denaturaciji i želiranju proteina, odnosno formiranju tipične teksture nadjeva i pospješivanju procesa sušenja te inhibiciji razvoja patogenih i bakterija kvarenja. Porast pH u odnosu na najnižu postignutu vrijednost tijekom procesa fermentacije označava završetak procesa fermentacije te početak proteolitičkih i lipolitičkih procesa, odnosno početak procesa zrenja.



Slika 27 Promjena pH vrijednosti uzoraka kulena s dodatkom različitih šećera (*w* = 0,7%) te bez dodatka šećera (referentni uzorak) tijekom procesa fermentacije pri različitim temperaturama (12 °C i 20 °C)

Rezultati pokazuju da pri uobičajenim temperaturama fermentacije tijekom proizvodnje kulena tradicionalnom tehnologijom u seoskim domaćinstvima, ukoliko se dodatkom šećera nastoji korigirati pH vrijednost nadjeva (pH ≥ 6), najbolji učinak ima dodatak maltodekstrina.

Sniženje vrijednosti aktivnosti vode sa 0,95 (sirovi nadjev) (**Tablica 6**) na prosječnih 0,91 (nakon 21 dan proizvodnje kulena) (**Tablica 8**) najvećim dijelom je posljedica sušenja, odnosno smanjenja masenog udjela vode s početnih 64,33% (**Tablica 6**) na prosječnih 56,20% (**Tablica 8**) te povećanja koncentracije natrijevog klorida.

Maseni udio NaCl s početnih 1,98% u sirovom nadjevu (**Tablica 7**) povećao se tijekom 21 dan na prosječnu vrijednost 2,71% (**Tablica 9**). NaCl pridonosi povećanju sposobnosti vezanja vode te formiranju boje, okusa i teksture. Također važnu ulogu ima i u osiguravanju mikrobiološke ispravnosti gotovog proizvoda, odnosno natrijev klorid ima konzervirajući učinak. Klor djeluje kao oksidans, inhibira lipolitičke enzime, tj. lipolizu masnog tkiva u trajnim (fermentiranim) kobasicama, denaturira mioglobin (Mb), nositelja ružičastocrvene boje mesa ili ga oksidira u nepoželjni metmioglobin (MMb) koji je tamnocrvene do smeđe i crne boje. Također, djeluje i kao prooksidans, odnosno poboljšava peroksidaciju masti te poboljšava miris i okus finalnog proizvoda. Najveći udio soli sadržavao je uzorak bez dodatka šećera (referentni uzorak). Veći maseni udio soli rezultira i povećanjem kohezivnosti proizvoda, većim otporom žvakanja, većom elastičnošću i većom gumenosti (Kovačević i sur., 2011; Suman, 2013.).

Osnovni kemijski sastav uzoraka kulena (maseni udio proteina, masti, kolagena i vode) mijenjao se tijekom procesa fermentacije kao posljedica smanjenja masenog udjela vode, odnosno operacije sušenja (**Tablica 6** i **8**).

Vrijednost L* koordinate boje (svjetlina (engl.: *lightness*): 0 (crna)-100 (*bijela*)) svježeg mesa iznosi 55,82 (**Tablica 7**) i smanjuje se uslijed dodatka paprike koja apsorbira vodu s površine koja je oslobođena dezintegriranjem tkiva operacijom usitnjavanja te zbog smanjenja pH (smanjenje pH na vrijednost blisku izoelektričnoj točki posljedično smanjuje SpVV i ubrzava gubitak (isušivanje) vode s površine). Daljnje kontinuirano, ali ne više tako značajno, smanjenje L* do završnih prosječnih 47,36 (**Tablica 10**) rezultat je kontinuiranog pada SpVV, smanjenja masenog udjela vode te povećanja masenog udjela masti koja povećava L*.

Vrijednosti a* koordinate boje (engl.: *redness:* ± crveno-zeleno) povećava se u nadjevu kulena zbog dodatka crvene paprike te je za nakon 21 dana dosegla prosječnu vrijednost 16,16

(**Tablica 10**). Vrijednost b* koordinate boje (engl.: *yellowness:* ± žuto-plavo) raste dodatkom crvene paprike u nadjev, ali sporije od a* koordinate. U prvih mjesec dana b* pada i dosegla je prosječnu izmjerenu vrijednost 22,83 (**Tablica 10**) (Suman, 2013.).

Tijekom fermentacije, bakterije mliječne kiseline razgrađuju u nadjevu prisutne šećere u mliječnu kiselinu. Broj BMK u sirovom nadjevu za proizvodnju Slavonskog kulena iznosio je 1,40 x 10^4 CFU/g (**Tablica 11**) te je, tijekom proizvodnog procesa, rastao do 6,5 x 10^6 CFU/g (referentni uzorak), 1,2 x 10^6 CFU/g (uzorak s dodatkom 0,7% glukoze). Najviši broj BMK (8 x 10^6 CFU/g (**Tablica 12**)), najveće povećanje koncentracije mliječne kiseline, a posljedično i najveće sniženje pH vrijednosti pokazuju uzorci kulena s dodatkom 0,7% maltodekstrina.

U sirovom nadjevu za proizvodnju Slavonskog kulena te u uzorcima iz svih skupina Slavonskog kulena, tijekom proizvodnog procesa, klasičnom mikrobiološkom metodom određivane su patogene bakterije *S. aureus*, *L. monocytogenes*, sulfitoreducirajući klostridiji, *Salmonella sp*., *E. coli* i enterobakterije te aerobne mezofilne bakterije, kvasci i plijesni (Babić, 2011; Suman, 2013.).

U svježem mesu za proizvodnju Slavonskog kulena te u uzorcima iz svih skupina Slavonskog kulena, tijekom proizvodnog procesa, nisu nađene patogene bakterije. Broj enterobakterija, aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca i plijesni mijenjao se različito u uzorcima iz svih skupina tijekom proizvodnog procesa što je prikazano rezultatima u **Tablici 12**.

Dosadašnje istraživanje i literaturni podaci pokazali su da je fermentacija najintenzivnija u prvih nekoliko sati kada temperatura raste do vrijednosti optimalnih za razvoj BMK, a može trajati od 12 sati (1 dan) do 7 dana i duže ovisno o vrsti proizvoda, dodacima, tehnologiji proizvodnje te temperaturi i relativnoj vlažnosti zraka (viša temperatura i viša relativna vlažnost zraka ubrzavaju fermentaciju i sniženje pH).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja, može se zaključiti:

1. Proces fermentacije kulena započeo je neposredno nakon pripreme nadjeva te je pri 20 ^{o}C trajao 19 dana (referentni uzorak te uzorci s dodatkom 0,7% glukoze i maltodekstrina), 23 dana (uzorak s dodatkom 0,7% maltodekstrina) te 32 dana (referentni uzorak, uzorak s dodatkom 0,7% glukoze) pri 12 ^{o}C.

2. Temperatura je imala značajan utjecaj na proces fermentacije. U uzorcima kulena podvrgnutim temperaturi pri 20 ^{o}C došlo je do brže i intenzivnije fermentacije te sniženja pH vrijednosti, u odnosu na uzorke podvrgnute procesu fermentacije pri 12 ^{o}C. To je sukladno literaturnim podacima prema kojima su optimalne temperature rasta i razvoja tehnološke mikroflore kulena, odnosno bakterija mliječne kiseline iznad 20 ^{o}C.

3. Najviši broj BMK (8 x 10^{6} CFU/g), najveće povećanje koncentracije mliječne kiseline, a posljedično i najveće sniženje pH vrijednosti pokazuju uzorci kulena s dodatkom 0,7% maltodekstrina pri temperaturama fermentacije od 20 ^{o}C. Prema tome, maltodekstrin se pokazao najboljim supstratom tehnološkoj mikroflori kulena. Također, više temperature fermentacije pogoduju rastu i razvoju BMK, odnosno posljedično većoj proizvodnji mliječne kiseline i nižoj pH vrijednosti kulena.

7. LITERATURA

1. Babić I: Karakterizacija mikrobnih kultura iz autohtonog Slavonskog kulena u svrhu njihove primjene kao starter kulture. Doktorski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2011.
2. Frece, J., Markov, K. (2014.): Comparison of Sensory Properties, Shelf Live and Microbiological Safety of Industrial Sausages Produced with Autochthonousand Commercial Kovačević, D., Kazazić, S., Mrvičić, J., Vahčić, N., Delaš, F., Ježek, D., Hruškar, M., Babić, I., Starter Cultures (Starter Cultures for SausagesProduction). FoodTechnol. Biotechnol. 52 (3) 307–316.
3. Karolyi D, Kovačić D: Organoleptička ocjena slavonskog domaćeg kulena od crne slavonske i bijele svinje, MESO: prvi hrvatski časopis o mesu 10, 5: 356-359, 2008.
4. Karoly D: Fizikalno-kemijska, higijenska i organoleptička karakterizacija slavonskog kulena, MESO: prvi hrvaski časopis o mesu 13, 6: 423-427, 2011.
5. Kovačević, D: Kemija i tehnologija mesa i ribe. Sveučilište J.J. strossmayera, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2001.
6. Kovačević, D. (2014.): „Kako izbjeći šupljine i pukotine u presjeku. Šupljine, pukotine i mrvljenje nisu samo estetski već i zdravstveni problem“. Agroglas br. 336 od 16. 04. 2014., str. 38-39.
7. Kovačević, D. (2014.): „Prekomjerna naboranost ovitka (crijeva) i odvajanje ovitka od nadjeva. Naboranost ovitka kulena i odvajanje od nadjeva upućuje na pogreške u tehnologiji“. Agroglas br. 338 od 14. 05. 2014., str. 34-35.
8. Kovačević, Dragan (2014.): Tehnologija kulena i drugih fermentiranih kobasica, Osijek Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
9. Kovačević, D. (2014.): Tehnologija trajnih (fermentiranih) kobasica. Meso. XVI (4) 292-295.
10. Kovačević, D., Mastanjević, K., Frece, J., Pleadin, J. (2014.): Utjecaj dodataka različitih šećera na proces fermentacije trajne kobasice kulenove seke. Meso. XVI (4) 324-328.
11. Mijat I, Zdolec N, Kaša D, Kozačinski L: Značenje starter-kultura u proizvodnji trajnih kobasica, MESO: prvi hrvatski časopis o mesu 6, 1: 52-57, 2004.
12. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: Pravilnik o mesnim proizvodima. Narodne novine 131/12, 2012., Narodne novine 46/07.

13. Ockerman, H.W., Basu, L. (2008): Fermented meat products: Production and Consumption. In: Handbook of Fermented Meat and Poultry. Toldrá, F. (ed.). Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK.
14. Suman K: Utjecaj tehnoloških parametara, dodataka i mikrobne populacije na kvalitetu Slavonskog kulena. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
15. Toldrá, F. (2002): Dry-Cured Meat Products. Food & Nutrition Press. Trumbull, Connecticut.
16. Toldrá F. (2007): Handbook of Fermented Meat and Poultry. Blackwell Publishing Professional. Iowa.