

## Mikrobiološka karakterizacija trajnih kobasica od konjskog mesa

Alagić, D.<sup>1</sup>, N. Zdolec<sup>2</sup>, B. Njari<sup>1</sup>, I. Filipović<sup>2</sup>, A. Ekert-Kabalin<sup>3</sup>, G. Čorić-Alagić<sup>4</sup>, M. Stojnović<sup>5</sup>, N. Vragović<sup>5</sup>, L. Kozarić<sup>5</sup>

znanstveni rad

### Sažetak

Cilj ovog rada bio je istražiti mikrobiološke promjene u trajnim kobasicama od konjskog mesa prema fazama zrenja i sezoni proizvodnje, determinirati bakterije mliječne kiseline i ispitati njihov inhibicijski potencijal prema bakteriji *Listeria monocytogenes*. Sezona proizvodnje značajno je utjecala na ukupni broj bakterija, broj bakterija mliječne kiseline, koagulaza negativnih koka, enterokoka i kvasaca u gotovom proizvodu ( $p < 0.05$ ). Bakterije mliječne kiseline bile su najbrojnija mikroba populacija u nadjevu, uz značajan broj kvasaca i koagulaza negativnih koka. Najčešće izolirana vrsta bakterija mliječne kiseline bila je *Lactobacillus plantarum* (56%), a potom *Weissella confusa* (26%), *Lactobacillus fermentum* (6%), *Lactobacillus pentosus* (6%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2%), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (2%) i *Weissella viridescens* (2%). Najvažnije inhibicijsko djelovanje prema *L. monocytogenes* in vitro pokazali su izolati laktobacila. Dobiveni rezultati mogu poslužiti boljem razumijevanju specifičnosti fermentacije kobasica od konjskog mesa u odnosu na druge vrste mesa te poslužiti u postupku standardizacije proizvodnje.

**Cljučne riječi:** konji, trajne kobasice, bakterije mliječne kiseline, inhibicija

### Uvod

Kao komercijalno najvredniji kobasičarski proizvod, fermentirane kobasice proizvode se od najkvalitetnijih partija mesa različitih vrsta životinja. U tom smislu konjsko meso je s obzirom na svoj kemijski sastav i preradbenu vrijednost kvalitetna sirovina za takvu proizvodnju, a dobivene fermentirane kobasice proizvod osobite kakvoće i vrijednosti (Feiner, 2006). Proizvodnja fermentiranih kobasica od konjskog mesa nije industrijalizirana, što dodatno pridonosi njihovoj vrijednosti zbog složenosti prirodne proizvodnje i upliva brojnih čimbenika u formiranje prepoznatljive kobasice. Tijekom procesa zrenja fermentiranih kobasica razvijaju se složeni mikrobiološki, fizikalno-kemijski i biokemijski procesi kojima proizvod poprima svoja konačna senzorska svojstva. Slijed tih promjena uvjetovan je brojnim čimbenicima među kojima važno

mjesto zauzima higijenska kakvoća sirovine i higijena proizvodnje čime je zapravo uvjetovan sastav inicijalne mikroflora (Hutkins, 2006). Osim toga, važnu ulogu ima vrsta upotrijebljenog mesa s obzirom na količinu vode, bjelancevine, udio masnog tkiva, količinu glikogena te druge karakteristike koje utječu na senzorna svojstva gotovog proizvoda (boja, žilavost, sočnost i dr.) (Incze, 1998). Postupne promjene nadjeva tijekom zrenja pogoduju razvoju specifične mikroflora koja svojom saharolitičkom, proteolitičkom, lipolitičkom te antimikrobnom aktivnošću opet pridonosi napredovanju tih istih promjena.

Cilj ovog rada bio je istražiti mikrobiološke promjene tijekom zrenja kobasica od konjskog mesa ovisno o fazama zrenja te sezoni, determinirati vrste bakterija mliječne kiseline tijekom zrenja te istražiti njihov inhi-

bicijski potencijal prema bakteriji *L. monocytogenes*.

### Materijal i metode

#### Proizvodnja kobasice i uzorkovanje

Kobasice od konjskog mesa proizvedene su u privatnom malom obrtničkom objektu prema standardnom postupku koji se u njoj primjenjuje tijekom travnja, rujna i studenoga. Kobasice su proizvedene od konjskog mesa (75%), svinjskog čvrstog masnog tkiva (25%), te dodatnih sastojaka (sol, papar, paprika, češnjak, nitrin sol). Nakon punjenja u crijeva te cijeđenja na štapovima, uslijedilo je hladno dimljenje 2-3 dana, a zatim zrenje u fermentacijskoj komori do 36. dana.

Po tri kobasice uzorkovane su 0, 14., 28. i 36. dana. Na početku proizvodnog procesa također je uzorko-

Tablica 1. Metodologija mikrobioloških ispitivanja

Pokazatelj	Hranjiva podloga	Inkubacija
Aerobne mezofilne bakterije	Plate Count Agar (PCA)	30°C / 72 h
Bakterije mliječne kiseline	De Man Rogosa Sharpe agar (MRS)	30°C / 72 h
Koagulaza-negativni koki	Manitol Salt Agar (MSA)	30°C / 48 h
<i>S. aureus</i>	Baird-Parker agar (BP)	37°C / 24-48 h
Enterobakterije	Violet red bile glucose agar (VRBG)	37°C / 24 h
<i>E. coli</i>	Coli ID	37°C / 24 h
Kvasci i plijesni	Oxytetracycline yeast agar with tetracycline (OGY)	25°C / 3-5 dana
Enterokoki	Kanamycin esculin agar (KEA)	37°C / 48 h
<i>Pseudomonas</i> spp.	Cetrimide-fucidin-cephaloridine (CFC) agar	25°C / 48 h
Sulfitreducirajuće klostridije	Sulphyte Polymixine Suphadiazine agar (SPS)	37°C / 5 dana
	Buffered peptonic water	37°C / 16 h
	Rappaport-Vasiladis broth	42°C / 24 h
	Muller-Kauffman tetrytonate / novobiocin broth	37°C / 48 h
<i>Salmonella</i> spp.	Brilliant fenol lactose sugar agar (BPLS)	37°C / 24 h
	XLD	37°C / 48 h
	Half-Fraser broth	30°C / 24-48 h
	Fraser broth	37°C / 24 h
	Palcam	37°C / 24 h
<i>L. monocytogenes</i>	RAPID L mono	37°C / 24-48 h

Tablica 2. Broj aerobnih mezofilnih bakterija (log<sub>10</sub> CFU/g) u konjskim kobasicama tijekom zrenja

Pokazatelj	Sezina (mjesec proizvodnje)	Dani			
		0.	14.	28.	36.
Aerobne mezofilne bakterije (log <sub>10</sub> CFU/g)	Travanj	7.04 <sup>a</sup> ± 0.04	8.61 <sup>a</sup> ± 0.04	8.26 <sup>a</sup> ± 0.12	7.58 <sup>a</sup> ± 0.12
	Rujan	7.33 <sup>a</sup> ± 0.05	8.57 <sup>a</sup> ± 0.47	8.80 <sup>ab</sup> ± 0.06	8.72 <sup>a</sup> ± 0.08
	Studenj	5.95 <sup>a</sup> ± 0.04	8.27 <sup>a</sup> ± 0.04	8.35 <sup>b</sup> ± 0.04	8.60 <sup>a</sup> ± 0.05

<sup>ab</sup> vrijednosti označene istim slovom u istom stupcu statistički se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ )

vana sirovina, odnosno konjsko meso i svinjsko masno tkivo. Uzorci su do laboratorija dostavljeni u prijenosnom hladnjaku (+ 4°C). Svi uzorci podvrgnuti su mikrobiološkim te fizikalno-kemijskim pretragama u triplicatu.

#### Mikrobiološke analize

Mikrobiološkim pretragama sirovine i kobasica tijekom zrenja određeni su broj aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija mliječne kiseline, koagulaza negativnih koka, *S. aureus*, enterobakterija, *E. coli*, kvasaca i plijesni, enterokoka, *Pseudomonas* spp,

sulfitreducirajućih klostridija, te prisutnost *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. U okviru fizikalno-kemijskih pretraga kobasica određivana je količina vode i soli te pH, koji se određivao i u sirovini. Metodologija mikrobioloških pretraga prikazana je u Tablici 1.

#### Određivanje bakterija mliječne kiseline i antimikrobno djelovanje

Nakon određivanja broja bakterija mliječne kiseline selektirano je 75 kolonija. Kolonije su bojane po Gramu i podvrgnute katalaza testu. U

postupak određivanja antimikrobne aktivnosti izolata uzeti su samo gram-pozitivni, katalaza negativni bacili i kokobacili (n=50).

Za biokemijsku determinaciju izolati su namnažani u MRS bujonu (Merck) 24-48 sati na 30°C. Potom je ezom kultura nacijpljena na MRS agar metodom iscrpljivanja radi dobivanja dobro izdvojenih kolonija, uz inkubiranje na 30°C 48-72 sata. Nakon toga je brisom uzeta jedna izolirana kolonija i gusto nacijpljena na površinu nove ploče MRS agara i ponovno inkubirana na 30°C 24 sata. Daljnji postupak je proveden prema uputama proizvođača API sustava (bioMérieux, Francuska). Antimikrobno djelovanje testirano je prema bakteriji *L. monocytogenes* NCTC 10527 koristeći agar spot i agar difuzijski test (Zdolec i sur., 2009). Kao pozitivna kontrola u testu je korišten soj *Leuconostoc mesenteroides* E131 (Drosinos i sur., 2006) koji sintetizira bakteriocin mesenterocin Y. Kao negativna kontrola korišten je soj *Lactobacillus brevis* ATCC B287.

#### Statistički podaci i analiza

Podaci su obrađeni programom Statistica 8 (StatSoft, 2008). Nakon osnovne statističke obrade, provjerna je normalnost raspodjele Kolmogorov-Smirnovim testom (K-S test). Za utvrđivanje značajnosti razlika utvrđenih vrijednosti tijekom zrenja kobasica, a po pojedinoj sezoni, korištena je jednosmjerna analiza varijance uz Tukey-ev HSD test za post-hoc analizu.

#### Rezultati

Rezultati istraživanja čimbenika fermentacije kobasica od konjskog mesa prikazane su u tablicama 2-6. Vidljivo je da se ukupni broj bakterija značajno povećao do 14. dana zrenja u svim proizvedenim serijama kobasica (tablica 2). Broj bakterija u kobasicama proizvedenima u rujnu i studenom povećavao se kontinuirano do kraja zrenja, dok je u prvoj seriji (travanj) nakon 14. dana zrenja utvrđeno

<sup>1</sup> dr. sc. Damir Alagić, mr. sc. Milomir Stojnović, Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, M. Demeca 1, Križevci  
<sup>2</sup> dr. sc. Nevija Zdolec, znanstveni novak viši asistent, dr. sc. Bela Njari, redoviti profesor, dr. sc. Ivana Filipović, univ.mag.spec., dr.med.vet., dr. sc. Lidija Kozarić, redoviti profesor, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane  
<sup>3</sup> dr. sc. Anamaria Ekert Kabalin, docent, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zavod za stočarstvo  
<sup>4</sup> Glorija Čorić-Alagić, dipl.ing.preh.teh., Odručnička škola Koprivnica, Trg Slodobe 7, Koprivnica  
<sup>5</sup> dr. sc. Natalija Vragović, EC inspekt, Zagreb

Tablica 3. Broj bakterija mliječne kiseline ( $\log_{10}$ CFU/g) u konjskim kobasicama tijekom zrenja

Pokazatelj	Serija (mjesec proizvodnje)	Dani							
		0.		14.		28.		36.	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Bakterije mliječne kiseline ( $\log_{10}$ CFU/g)	Travanj	4.07 <sup>a</sup>	± 0.04	8.57 <sup>a</sup>	± 0.06	8.00 <sup>a</sup>	± 0.09	7.01 <sup>a</sup>	± 0.07
	Rujan	4.20 <sup>a</sup>	± 0.04	8.87 <sup>a</sup>	± 0.07	8.68 <sup>a</sup>	± 0.05	7.02 <sup>b</sup>	± 0.07
	Studeni	4.29 <sup>a</sup>	± 0.04	7.87 <sup>a</sup>	± 0.04	8.35 <sup>a</sup>	± 0.04	8.60 <sup>ab</sup>	± 0.05

<sup>ab</sup> vrijednosti označene istim slovom u istom stupcu statistički se značajno razlikuju (p<0.05)

Tablica 4. Broj koagulaza-negativnih koka ( $\log_{10}$ CFU/g) u konjskim kobasicama tijekom zrenja

Pokazatelj	Serija (mjesec proizvodnje)	Dani							
		0.		14.		28.		36.	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Koagulaza-negativni koki ( $\log_{10}$ CFU/g)	Travanj	4.58 <sup>a</sup>	± 0.06	4.55 <sup>a</sup>	± 0.08	4.30 <sup>a</sup>	± 0.11	3.77 <sup>a</sup>	± 0.07
	Rujan	4.90 <sup>a</sup>	± 0.05	4.30 <sup>ab</sup>	± 0.05	3.78 <sup>a</sup>	± 0.05	4.68 <sup>a</sup>	± 0.04
	Studeni	4.43 <sup>a</sup>	± 0.05	4.50 <sup>b</sup>	± 0.08	4.39 <sup>a</sup>	± 0.04	4.88 <sup>a</sup>	± 0.08

<sup>ab</sup> vrijednosti označene istim slovom u istom stupcu statistički se značajno razlikuju (p<0.05)

Tablica 5. Broj enterokoka ( $\log_{10}$ CFU/g) u konjskim kobasicama tijekom zrenja

Pokazatelj	Serija (mjesec proizvodnje)	Dani							
		0.		14.		28.		36.	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Enterokoki ( $\log_{10}$ CFU/g)	Travanj	4.60 <sup>a</sup>	± 0.07	4.02 <sup>a</sup>	± 0.18	3.69 <sup>a</sup>	± 0.08	3.51 <sup>a</sup>	± 0.04
	Rujan	4.51 <sup>a</sup>	± 0.07	4.98 <sup>a</sup>	± 0.10	5.01 <sup>ab</sup>	± 0.10	4.84 <sup>ab</sup>	± 0.04
	Studeni	4.27 <sup>a</sup>	± 0.09	4.48 <sup>a</sup>	± 0.05	3.75 <sup>b</sup>	± 0.09	3.48 <sup>b</sup>	± 0.06

<sup>ab</sup> vrijednosti označene istim slovom u istom stupcu statistički se značajno razlikuju (p<0.05)

Tablica 6. Broj kvasaca i plijesni ( $\log_{10}$ CFU/g) u konjskim kobasicama tijekom zrenja

Pokazatelj	Serija (mjesec proizvodnje)	Dani							
		0.		14.		28.		36.	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Kvasci i plijesni ( $\log_{10}$ CFU/g)	Travanj	4.65 <sup>a</sup>	± 0.06	4.35 <sup>a</sup>	± 0.09	4.42 <sup>ab</sup>	± 0.02	4.17 <sup>ab</sup>	± 0.11
	Rujan	5.61 <sup>a</sup>	± 0.04	5.84 <sup>a</sup>	± 0.03	5.50 <sup>a</sup>	± 0.05	5.44 <sup>a</sup>	± 0.06
	Studeni	6.26 <sup>a</sup>	± 0.11	5.67 <sup>a</sup>	± 0.05	5.50 <sup>b</sup>	± 0.06	5.46 <sup>b</sup>	± 0.07

<sup>ab</sup> vrijednosti označene istim slovom u istom stupcu statistički se značajno razlikuju (p<0.05)

smanjenje za 1 log. Promatrajući broj bakterija u odnosu na sezonu proizvodnje uočavaju se statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina.

Broj bakterija mliječne kiseline se do 14. dana zrenja višestruko povećao u svim serijama kobasica (p<0,01). U prve dvije serije (travanj i rujnan) broj

se bakterija mliječne kiseline potom smanjivao prema kraju zrenja (za 1,5 odnosno 1,8 log), dok je u trećoj seriji (studeni) populacija bila u stalnom porastu. Značajne razlike pronađene su tijekom cijele sezone zrenja u odnosu na broj bakterija mliječne kiseline, osim kod gotovih proizvoda od travnja do rujna (tablica 3). Kao što je

prikazano u tablici 4, populacija koagulaza negativnih stafilocoka tijekom zrenja bila je stabilna u svim serijama kobasica (>4  $\log_{10}$  CFU/g). Statistički gledano, njihov broj u gotovom proizvodu u odnosu na početak zrenja značajno se smanjio u serijama proizvedenim u travnju i rujnu dok je u studenom bio značajno veći (p<0,01). Značajne su razlike (p<0,05) u njihovom broju u odnosu na sezonu proizvodnje prema danima zrenja. Na kraju zrenja kobasica proizvedenih u travnju broj koagulaza negativnih koka bio je značajno manji u odnosu na kobasice iz rujna i studenoga. Populacija enterokoka se unatoč relativno velikom broju na početku zrenja smanjivala prema kraju proizvodnog procesa u serijama kobasica iz travnja i studenog (za oko 1 log; p<0,01). Tijekom zrenja kobasica druge serije (rujan) broj enterokoka se povećavao do 28. dana zrenja i potom blago smanjivao do kraja zrenja, pa je njihov broj ostao stabilan, odnosno veći u odnosu na početak proces zrenja (p<0,01). U kobasicama proizvedenim u rujnu broj enterokoka je u drugoj fazi zrenja ostao statistički značajno veći (p<0,05) u odnosu na druge dvije serije kobasica. Broj enterokoka se u tom periodu zrenja nije statistički razlikovao u kobasicama iz travnja i studenog (tablica 5). Populacija kvasaca i plijesni smanjivala se tijekom zrenja neovisno o sezoni. Tablica 6 pokazuje da je stupanj smanjenja broja kvasaca i plijesni te broj u gotovom proizvodu bio ovisan o inicijalnoj populaciji (p<0,01). Uspoređujući broj kvasaca i plijesni ovisno o sezoni vidljivo je da je u drugoj fazi zrenja broj kvasaca i plijesni statistički značajno manji u kobasicama iz travnja, dok se njihov broj nije međusobno značajno razlikovao u kobasicama iz sezone rujnan-studenog (p>0,05). *S. aureus* nije utvrđen tijekom zrenja kobasica proizvedenih u travnju i studenom, dok je tijekom rujna zabilježen mali broj (2,18  $\log_{10}$  CFU/g) da bi u daljnjem tijeku zrenja ostao ispod praga detekcije (< 2 log). Sulfitreducirajuće klostridije bile su

prisutne do 14. dana u prvoj seriji (travanj), a nultog dana u seriji iz mjeseca rujna. Determinacijom izolata bakterija mliječne kiseline (n=50) pomoću API 50 CHL testa utvrđene su slijedeće vrste: *Lactobacillus plantarum* (n=28; 56 %), *Weissella confusa* (n=13; 26 %), *Lactobacillus fermentum* (n=3; 6 %), *Lactococcus pentosus* (n=3; 6 %), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (n=1; 2 %), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (n=1; 2 %), *Weissella viridescens* (n=1; 2 %). Rezultati istraživanja inhibicijskog djelovanja izolata prema *L. monocytogenes* pokazuju da svi sojevi *L. plantarum* sistiraju rast u agar spot testu. Inhibicija je također utvrđena i djelovanjem ostalih sojeva laktobacila, odnosno *L. fermentum*, *L. pentosus* i *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Nadalje, neutralizacijom supernatana nije utvrđena inhibicija niti jednim ispitivanim sojem.

#### Rasprava

Proces zrenja i slijed fizikalno-kemijskih promjena u nadjevu fermentiranih kobasica pogoduje razmnožavanju pojedinih skupina mikroorganizama, s izraženim halofilnim, osmofilnim ili acidofilnim karakteristikama (Hutkins, 2006). To su primarno bakterije mliječne kiseline kao najbrojniji/najaktivniji predstavnici tih skupina u nadjevu, zatim koagulaza negativni koki (mikrokoki, stafloki), te kvasci i plijesni (Huerta i sur., 2004; Kozaciński i sur., 2008; Cocolin i sur., 2009). Tijekom zrenja utvrdili smo višestruki porast broja bakterija mliječne kiseline (s početnih 4  $\log_{10}$  CFU/g na 8  $\log_{10}$  CFU/g), što je bilo očekivano i sukladno podacima iz literature koji se odnose na dinamiku njihovog rasta u fermentiranim kobasicama od drugih vrsta mesa (Fontana i sur., 2005; Kozaciński i sur., 2006; Drosinos i sur., 2007; Zdolec i sur., 2008; Alagić i sur., 2009). Na proteolitičke i lipolitičke promjene u nadjevu, uz tkivne enzime, utječe aktivnost stafilocoka, mikrokoka te kvasaca i plijesni (Metaxopoulos i sur., 2001; Ferreira i sur., 2007). Tablica 6 pokazuje stabilnu populaciju

kvasaca koja se nije znatno mijenjala za vrijeme zrenja kobasica, kao i stabilan broj koagulaza negativnih koka (tablica 4), koji su u drugoj fazi zrenja pokazali tendenciju rasta (osim u sezoni travnja). Utvrđeni sastav i dinamika populacije ovih mikroorganizama u suglasju je s istraživanjima fermentiranih kobasica drugih autora (Ferreira i sur., 2007; Zdolec i sur., 2008). Kako je prije već spomenuto, možda najkontroverzniju skupinu mikroorganizama u nadjevu fermentiranih kobasica čine enterokoki, budući da pokazuju i poželjna i nepoželjna svojstva u kontekstu kakvoće i sigurnosti ovih proizvoda (Franz i sur., 2003; Barbosa i sur., 2009; Jofré i sur., 2009). U našem istraživanju utvrdili smo značajne razlike u njihovom broju ovisno o sezoni proizvodnje kobasica, što se donekle može povezati s mikrobiološkom kakvoćom sirovine, ali i higijenom proizvodnje kobasica. Hugas i sur. (2003) navode da broj enterokoka u fermentiranim kobasicama može jako varirati ovisno o vrsti kobasice i sezoni proizvodnje, a čak se naglašava i mogućnost odstupanja u broju enterokoka u kobasicama iste proizvodne serije. Promjene broja enterokoka u našim uzorcima u suglasju su s istraživanjima drugih autora koji su utvrdili ili smanjenje ili stagnaciju broja tijekom zrenja (Urso i sur., 2006; Zdolec i sur., 2008). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su gotove fermentirane kobasice od konjskog mesa mikrobiološki sigurne u pogledu nalaza patogenih bakterija. To potvrđuju i rezultati drugih autora proučenjem mikroflora redovne proizvodnje (Drosinos i sur., 2005; Kozaciński i sur., 2008) ili kobasice inokulirane patogenim bakterijskim vrstama poput *L. monocytogenes* (Johnson i sur., 1998; Zdolec i sur., 2007ab). Međutim, rezultati istraživanja Encianasa i sur. (1999), Colaka i sur. (2007) te drugih autora upozoravaju na mogućnost nalaza *L. monocytogenes* u gotovim proizvodima (sudžuk, chorizo). Nalaz *L. plantarum* čest je u fermentiranim kobasicama (Drosinos i sur., 2005; Ko-

zaciński i sur., 2006), no većina autora navode da su najbrojniji i najprikladniji laktobacili u tom supstratu *L. sakei* i *L. curvatus* (Hammes i sur., 1990; Rantsiou i sur., 2005). Međutim, rezultati postupaka determinacije jako ovise o primjenjenoj metodologiji (Quere i sur., 1997; Vermeiren i sur., 2004). Tako se i rezultati dobiveni primjenom biokemijskog testa API 50 CHL trebaju oprezno tumačiti jer test ne pokriva profil *L. sakei* koji je, kako je naglašeno, najznačajniji i najbrojniji laktobacil u fermentaciji mesa. U tom smislu se može pretpostaviti da i izolati *L. fermentum* pripadaju *L. sakei*/*L. curvatus* skupini kako to tumače Vermeiren i sur. (2004). Uz *L. plantarum*, ostale vrste laktobacila utvrdili smo u malom postotku, što je u suglasju s podacima iz literature (Parente i sur., 2001; Gasparik-Reichardt i sur., 2005; Drosinos i sur., 2005). Rezultati istraživanja inhibicijskog djelovanja izolata prema *L. monocytogenes* potvrdili su poznati inhibitorski potencijal laktobacila (Zdolec i sur., 2007c; Zdolec i sur., 2009). Daljnja karakterizacija dominantnih *L. plantarum* sojeva trebala bi biti učinjena kako bi odabrali najprikladnije sojeve za za praktičnu primjenu u hrani ili životinjskim odjelima (Marcinčák i sur., 2009;2010).

#### Zaključak

Tijekom zrenja kobasica od konjskog mesa u nadjevu su utvrđene bakterije mliječne kiseline najbrojnijom mikrobnom populacijom te značajan broj kvasaca i koagulaza negativnih koka. Sezona proizvodnje značajno je utjecala na ukupni broj bakterija, broj bakterija mliječne kiseline, koagulaza negativnih koka, enterokoka i kvasaca u gotovom proizvodu (P<0,05), dominantnom vrstom u populaciji bakterija mliječne kiseline utvrđena je *L. plantarum*. Među izoliranim LAB, najjači anti-listerijski učinak u laboratorijskim uvjetima imaju sojevi laktobacila.

#### Zahvale

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu projekta

Ministarstva znanosti, obratovanja i športa Republike Hrvatske (053-0531854-1853). Zahvaljujemo Zvonku Sanjku, koji je omogućio pilot proizvodnju kobasica u svom objektu.

## Literatura

- Alagić, D., F. Čaklović, M. Smajlović, K. Čaklović, E. Članjak** (2009): Lactoflora and sensorial characteristics of experimentally produced bosnian součok. *Meso* 11, 123-130.
- Barbosa, J., V. Ferreira, P. Teixeira** (2009): Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol.* 26, 527-532.
- Cocolin, L., P. Doldi, K. Rantsiou, R. Urso, D. Cantoni, G. Comi** (2009): Bacterial ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Sci.* 82, 125-132.
- Čolak, H., H. Hamgilyan, B. Ulusoy, B.E. Bingol** (2007): Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). *Food Control* 18, 30-32.
- Drosinos, E.H., M. Mataragas, N. Xiraphi, G. Moschonas, F. Gaitis, J. Metaxopoulos** (2005): Characterisation of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Sci.* 69, 307-317.
- Drosinos, E.H., M. Mataragas, J. Metaxopoulos** (2006): Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Sci.* 74, 690-696.
- Drosinos, E.H., S. Paramithiotes, G. Kolovos, I. Tsikouras, I. Metaxopoulos** (2007): Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiol.* 24, 260-270.
- Encinas, J.P., J.J. Sanz, M.L. Garcia-Lopez, A. Otero** (1999): Behavior of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *Int. J. Food Microbiol.* 46, 167-171.
- Feiner, G.** (2006): Raw fermented salami. In: *Meat products handbook* (Feiner, G., ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Ferreira, V., J. Barbosa, J. Silva, M.T. Felicio, C. Mena, T. Hogg, P. Gibbs, P. Teixeira** (2007): Characterisation of *aherios*, traditional sausages produced in the Nord of Portugal with respect to their microbiological safety. *Food Control* 18, 436-440.
- Fontana, C., P. Sandro, G. Vignolo** (2005): Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinian sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 131-142.
- Franz, C.M.A.P., M.E. Stiles, K.H. Schleifer, W.H. Holzapfel** (2003): Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105-122.
- Gasparik-Reichardt, J., S.Z. Toth, L. Cocolin, G. Comi, E.H. Drosinos, Z. Cvrtila, L. Kozaciński, A. Smajlović, S. Saičić, B. Borović** (2005): Technological, physicochemical and microbiological characteristics of traditionally fermented sausages in Mediterranean and Central European countries. *Tehnologija mesa* 46, 143-153.
- Hammes, W.R.** (1990): Bacterial starter cultures in food production. *Food Biotechnol.* 4, 383-397.
- Huerta, R., R. Jordano, L.M. Medina, C. Lopez** (2004): Population dynamics of the constitutive biota of French dry sausages in a pilot-scale ripening chamber. *J. Food Prot.* 67, 2306-2309.
- Hugas, M., M. Garriga, M.T. Aymerich** (2003): Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 223-232.
- Hutkins, R.W.** (2006): Meat fermentation. In: *Microbiology and technology of fermented foods*. (Hutkins, R.W., ed.). Blackwell Publishing, pp. 207-232.
- Ince, K.** (1998): *Dry fermented sausages*. *Meat Sci.* 49, 169-177.
- Jofré, A., T. Aymerich, M. Garriga** (2009): Improvement of the food safety of low acid fermented sausages by enterococci A and B and high pressure. *Food Control* 20, 179-184.
- Johnson, J. L., M. P. Doyle, R.G. Cassens, J.L. Shoeni** (1998): Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 497-501.
- Kozaciński, L., N. Zdolec, M. Hadzišmanović, Z. Cvrtila, I. Filipović, T. Majić** (2008): Microbial flora of the Croatian fermented sausage. *Arch. Lebensmittelhyg.* 57, 141-147.
- Kozaciński, L., E.H. Drosinos, F. Čaklović, L. Cocolin, J. Gasparik-Reichardt, S. Vesković** (2008): Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 93-106.
- Marcinčak, S., R. Nemčović, J. Sokol, P. Popelka, S. Gancarčiková, M. Švedová** (2009): Impact of feeding of flaxseed and probiotics on meat quality and lipid oxidation process in pork during storage. *Slov. Vet. Res.* 46, 13-18.
- Marcinčak, S., Jr., J. Bulceva, P. Popelka, D. Marcinčaková, L. Staruch, Z. László, P. Mal'fa** (2010): Influence of dietary linseed and probiotics on oxidative stability and sensory properties of pork. *Magyar Allatorvosok Lapja* 132, 560-566.
- Metaxopoulos, J., J. Samelis, M. Papadeli** (2001): Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. *Ital. J. Food Sci.* 1, 3-18.
- Parente, E., S. Grieco, M.A. Crudele** (2001): Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *J. Appl. Microbiol.* 90, 943-952.
- Rantsiou, K., R. Urso, L. Iacumin, C. Cantoni, P. Cattaneo, G. Comi, L. Cocolin** (2005): Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1977-1986.
- Quere, F., A. Deschamps, M.C. Urdad** (1997): DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 82, 783-790.
- Urso, R., K. Rantsiou, C. Cantoni, G. Comi, L. Cocolin** (2006): Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 232-239.
- Vermeiren, L., F. Devieghere, J. Debevere** (2004): Evaluation of meat lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 149-164.
- Zdolec, N., M. Hadzišmanović, L. Kozaciński, Z. Cvrtila, I. Filipović, S. Marcinčak, Z. Kuzmanović, K. Hussein** (2007a): Protective effect of *Lactobacillus sakei* in fermented sausages. *Arch. Lebensmittelhyg.* 58, 152-155.
- Zdolec, N., L. Kozaciński, M. Hadzišmanović, Z. Cvrtila, I. Filipović** (2007b): Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in dry fermented sausages. *Vet. Arhiv* 77, 507-514.
- Zdolec, N., S. Lazić, L. Kozaciński, M. Hadzišmanović, I. Filipović** (2007c): The inhibitory activity of lactic acid bacteria isolated from fresh cow cheese. *Mljekarstvo* 57, 5-13.
- Zdolec, N., M. Hadzišmanović, L. Kozaciński, Z. Cvrtila, I. Filipović, M. Škrivanko, K. Leskovic** (2008): Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesentericin Y. *Meat Sci.* 80, 480-487.
- Zdolec, N., L. Kozaciński, B. Njari, I. Filipović, M. Hadzišmanović, B. Mioković, Z. Kuzmanović, M. Mitak, D. Samac** (2009): The antimicrobial effect of lactobacilli on some foodborne bacteria. *Arch. Lebensmittelhyg.* 60, 115-119.

Dostavljeno 15.7. 2011.

Prihvaćeno: 24.9. 2011. 

# Fizikalno-kemijska, higijenska i organoleptička karakterizacija slavonskog kulena

Karolyi, D.<sup>1</sup>

znanstveni rad

## Sažetak

Slavonski kulen je tradicionalna suha kobasica koja se proizvodi u Slavoniji u istočnoj Hrvatskoj. Izrađuje se iz mješavine miješanog svinjskog mesa, ledne slanine, začina i soli koja se puni u svinjsko slijepo crijevo. Nakon punjenja, slavonski kulen se hladno dimi te suši i dozrijeva kroz više mjeseci. U ovom radu analizirane su neke fizikalno-kemijske i organoleptičke osobine zrelog slavonskog kulena, kao i sigurnost gotovog proizvoda. Analizirani su uzorci (n = 12) od različitih manjih proizvođača u području Slavonije. Ustanovljeni su sljedeći fizikalno-kemijski parametri (srednja vrijednost ± SD): vlaga 38,2% ± 3,6, protein 35,0% ± 3,1, mast 23,7% ± 4,6, omjer vlaga / protein 1,1 ± 0,1, pH vrijednost 5,37 ± 0,23 i aktivitet vode (aw) 0,82 ± 0,02. Prosječni senzorni rezultati, na pet-bodovnoj ljestvici, bili su 3,7 ± 0,6 za vanjski izgled, 3,4 ± 0,6 za površinski miris, 3,8 ± 0,5 za konzistenciju, 3,2 ± 0,4 za unutarnji miris, 3,0 ± 0,7 za kakvoću presjeka, 3,3 ± 0,5 za teksturu, 3,1 ± 0,4 za okus i miris, 3,0 ± 0,5 za postojanost arome i 3,2 ± 0,4 za ukupnu kvalitetu. Glede sigurnosti gotovog proizvoda, ustanovljeni su sljedeći rezultati (po kg): histamin 330,8 mg ± 126,3, 233,9 mg tiramina ± 124,7, nitrita 6,55 mg ± 3,88 i benz(a)piren 0,05 g ± 0,03. *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes* nisu nađeni niti u jednom uzorku, dok je nađaz S. aureus, enterobakterija i sulfid-reducirajućih klostidija bio u skladu s mikrobiološkim propisima. Ključne riječi: suhe kobasice, slavonski kulen, fizikalno-kemijska svojstva, sigurnost

## Uvod

Slavonski kulen je tradicionalna kobasica od svinjskog mesa koju sezonski proizvode brojna domaćinstva i mali proizvođači na području Slavonije u istočnoj Hrvatskoj. Proizvodi se iz mješavine odabranog i usitnjenog mesa i ledne slanine, soli i začina kao što su crvena paprika i češnjak, kojom se nadijeva svinjsko slijepo crijevo (*caecum*). Po nadijevanju, slavonski kulen se hladno dimi, te naknadno suši i zrije kroz više mjeseci od postizanja potrebnog stupnja održivosti i tipičnih organoleptičkih svojstava zrelog proizvoda. Na kakvoću slavonskog kulena mogu utjecati različiti čimbenici, poput genotipa svinja, načina držanja i hranidbe tovljenjaka, pred-klaoničkih postupaka i/ili uvjeta nakon klanja koji svi utječu na kakvoću svježeg mesa. Niz drugih faktora, kao što su

odabir sirovog mesa i masnog tkiva, dodatak soli i začina, higijenski i okolišni uvjeti (npr. temperatura, vlažnost, strujanje zraka) za vrijeme fermentacije, dimljenja, sušenja i zrenja mogu dodatno pridonijeti raznolikosti karakteristika gotovog proizvoda. Kao rezultat toga, svojstva slavonskog kulena, uključujući i njegovu sigurnost mogu varirati, kako između pojedinih proizvođača, tako i između različitih godina.

U ovom radu su istražena neka fizikalno-kemijska i organoleptička svojstva tradicionalnog slavonskog kulena, s ciljem njegove bolje karakterizacije. Osim toga, analizirani su i neki parametri higijenske kvalitete i sigurnost gotovog proizvoda.

## Materijal i metode

Analizirano je dvanaest uzoraka

slavonskog kulena skupljenih od različitih malih proizvođača u Slavoniji. Uzorci slavonskog kulena bili su stari oko 6 mjeseci i proizvedeni na tradicionalan način slijedeći slične proizvodne korake i koristeći isti tip sastojaka kao što je prikazano na shemi na Slici 1.

Nakon skupljanja, uzorci su čuvani na hladnom do analize. Vrijednosti pH izmjerene su uporabom TESTO 230 pH metra (TESTO<sup>®</sup>, Germany) umetanjem ubodne elektrode (tip 13) u sredinu prepolovljene kobasice. Aktivitet vode (aw) je izmjeren korištenjem HygroPalm AW1 SET instrumenta (ROTRONIC<sup>®</sup>, Germany) uz primjenu Aw Quick modela rada u uzorcima dobivenim nakon grubo homogenizacije oko 80 g jezgre kobasice. Kemijske i mikrobiološke analize uzoraka izvršene su u Hrvat-

<sup>1</sup> dr.sc. Danijel Karolyi, docent, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za opće stočarstvo, Svetozimunska cesta 25, Zagreb, Hrvatska, e-mail: dkarolyi@agr.hr