

MIKROBIOLOŠKE PROMJENE TIJEKOM ZRENJA FERMENTIRANIH KOBASICA OD KONJSKOG MESA

Alagić¹, D., L. Kozačinski², I. Filipović², N. Zdolec², M. Hadžiosmanović², B. Njari², Z. Kozačinski³, S. Uhitil⁴

SAŽETAK

U radu su praćene promjene tijekom zrenja fermentiranih kobasica od konjetine. Po tri kobasice uzorkovane su 0., 14., 28. i 42. dana zrenja. Tijekom fermentacije bakterije mliječne kiseline su bile dominantna mikroflora kobasica ($6-8 \log_{10}$ cfu g^{-1}). U fermentaciji su sudjelovali i mikrokoki, te se njihov broj kretao od $2-3 \log_{10}$ cfu g^{-1} ; kao i kvasci i plijesni ($3-4 \log_{10}$ cfu g^{-1}). pH vrijednost je značajno pala u prvih 14 dana fermentacije (5,82 - 0. dana, 5,02 - 14. dana) što je uz moguće druge antimikrobne mehanizme LAB, rezultiralo očekivanim smanjenjem broja ili eliminacijom enterobakterija, *E. coli*, patogenih stafilocoka i sulfitreducirajućih klostridija.

Ključne riječi: konjske kobasice, mikrobiološke promjene

UVOD

Iz literature je poznato da konjsko meso bogato je bjelančevinama (prosječno 19,8 %), a sadrži mali postotak masti (prosječno 6,6 %). Bjelančevine konjskog mesa imaju visok sadržaj lizina i treonina (1.57 i 0.84 g/100 g), a nizak triptofana (0.15 g). U usporedbi s drugim vrstama mesa, bogat je izvor P, Fe, Zn, Cu, i Mg (Badiani i sur., 1997). Täufel i sur. (1993) navode da je konjsko meso finovlaknasto i svijetlocrvene boje u mlađih životinja, odnosno tamnocrvene s plavkastom nijansom u starijih konja. Tvrde je konzistencije i slatkastoga okusa zbog visokog udjela glikogena kojega ima više nego u mesu ostalih životinja. S gledišta nutricionista, konjsko meso je probavljivije od goveđeg, a sadržaj kolesterola vrlo je

nizak u odnosu na goveđe i svinjsko meso, pa se iz tih razloga preporuča u dijetalnoj prehrani. Jednako tako preporuča se za prehranu djece, sportaša i oboljelih od anemije (Täufel i sur., 1993). Proizvodi od konjskog mesa nisu uobičajeni asortiman mesnih industrija. Kobasice od konjskog mesa rijetko se pojavljuju na tržištu, najčešće kao regionalni specijaliteti proizvedeni u obrtničkim mesoprerađivačkim pogonima, pa tako i fermentirane kobasice od konjskog mesa. Proces fermentacije poznat je od davnina kao uspješan način čuvanja i produženja održivosti hrane. Tijekom fermentacije, zrenja i sušenja fermentiranih kobasica, odvijaju se mnogi složeni mikrobiološki, biokemijski i fizikalno-kemijski procesi, koji utječu na kvalitetu i sigurnost proizvoda (Hadžiosmanović i sur. 2005). Fermentirani proizvodi od konjskog mesa sadrže manju količinu zasićenih masnih kiselina od onih proizvedenih od svinjetine ili govedine, a pH vrijednost im se kreće oko 5,92, dok a_w iznosi 0,94 (Paleari i sur., 2003).

Cilj ovoga rada bio je pratiti promjene u mikroflori tijekom zrenja konjskih kobasica.

MATERIJAL I METODE

Kobasice su proizvedene od konjskog mesa (75 %), svinjskog čvrstog masnog tkiva (25 %), te dodanih sastojaka (sol, papar, paprika, češnjak, nitritna sol). Nakon punjenja u umjetne ovitke promjera 55 mm, te cijedenja na štapovima, uslijedilo je hladno dimljenje 2-3 dana, a zatim zrenje u komori do 42. dana. Po tri kobasice uzorkovane su 0., 14., 28. i 42. dana. Nultog dana proizvodnje

¹ Mr. sc. Damir Alagić, dr.vet. med., Visoko gospodarsko učilište, Križevci, Milislava Demerca 1, 48260 Križevci, dalagic@vgtk.hr

² Dr. sc. Lidija Kozačinski, izv. profesor, Ivana Filipović, dr. vet. med., znanstvena novakinja – asistentica, dr. sc. Nevijeh Zdolec, znanstveni novak – viši asistent; dr. sc. Mirza Hadžiosmanović, red. profesor, dr. sc. Bela Njari, red. profesor, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica, Heinzelova 55, 10000 Zagreb

³ Mr. sc. Zvonimir Kozačinski, dr. vet. med., Veterinarska stanica Velika Gorica, Sisačka bb, 10410 Velika Gorica

⁴ Dr. sc. Sunčica Uhitil, Veterinarska stanica Zagreb, Heinzelova 68, 10000 Zagreb

▼ **Tablica 1.** Broj mikroorganizama u sirovini (\log_{10} cfu g^{-1})

| | Konjsko meso | Svinjsko masno tkivo |
|---------------------------|--------------|----------------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | <2 | <2 |
| <i>E.coli</i> | <2 | <2 |
| <i>Micrococcus</i> spp | 2,71 ± 0,01 | 3,17 ± 0,15 |
| LAB | 3,36 ± 0,02 | <2 |
| AB | 6,27 ± 0,01 | 5,93 ± 0,00 |
| <i>Enterococcus</i> spp | 3,68 ± 0,01 | 3,25 ± 0,01 |
| <i>Pseudomonas</i> spp | 4,4 ± 0,02 | 4,28 ± 0,03 |
| Kvasci i plijesni | 4,17 ± 0,02 | 3,70 ± 0,02 |
| SRK | <1 | <1 |
| <i>S.aureus</i> | <2 | <2 |

također je uzorkovana i sirovina, odnosno konjsko meso i svinjsko masno tkivo. Svi uzorci (po tri od svakog ispitnog uzorka) podvrgnuti su mikrobiološkim te fizikalno-kemijskim pretragama. Mikrobiološke pretrage uključivale su određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija mliječne kiseline, mikrokoka, *Staphylococcus aureus*, enterobakterija, *Escherichia coli*, kvasaca i plijesni, enterokoka, *Pseudomonas* spp, sulfito-reducirajućih klostridija, te prisutnost *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp. U okviru fizikalno-kemijskih pretraga kobasica određivana je količina vode i soli te pH, koji se određivao i u sirovini.

Za mikrobiološku analizu, 25 g uzorka razrijeđeno je sa 225 ml slane peptonske vode i homogenizirano u stomaheru kako bi se dobilo osnovno razrjeđenje. Iz osnovnog razrjeđenja rađena su daljnja decimalna razrjeđenja, te se prikladno decimalno razrjeđenje nasadivalo na agar ili zalijevalo agarom. Aerobne mezofilne bakterije određivane su na Plate Count agaru (PCA, BioMerieux, Francuska) na 30 °C/72 sata; broj LAB na MRS agaru (Merck, Germany) na 30 °C/ 48-72 sata; mikrokoki na Manitol Salt agaru (MSA, BioMerieux) na 30 °C/ 48 sati; enterobakterije na Violet Red Bile Glucose agara (VRBG, Oxoid, Engleska) na 37 °C/ 48 sati; *E. coli* na Coli-ID agaru (BioMerieux) na 37 °C/ 48 sati; enterokoki na Kanamycin Aesculin Azide agaru (Merck) na 37 °C/ 48 sati; *S. aureus* na Baird-Parker agaru (BP, Merck) na 37 °C/ 48 sati; kvasci i plijesni na oxytetracycline-glucose yeasts extract agaru (Oxoid) na 25 °C/72-120 sati, *Pseudomonas* spp na cetrimide agaru (BioMerieux) na 25 °C/ 48 sati; sulfitreducirajuće klostridije na Sulphite Polymyxin Sulphadiazine agaru (SPS, Merck) anaerobno na 37 °C/ 72 sata. Za određivanje prisutnosti *Salmonella* spp u 25 g uzorka korištena je metoda HRN

ISO 6579:2003, a *Listeria monocytogenes* HRN ISO 11290-1. pH vrijednosti određene su u mesnoj iscrpini digitalnim pH metrom (Hanna instruments, Rumunjska). Količina vode i soli određivana je tijekom zrenja kobasica prema AOAC (2002) metodama.

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati mikrobioloških pretraga prikazani su u Tablicama 1. i 2. Ukupni broj bakterija u konjskom mesu premašio je graničnu vrijednost prema mikrobiološkim standardima za meso u komadima. U kobasicama se tijekom zrenja kretao između 7 i 8 \log_{10} cfu g^{-1} te se lagano smanjivao u zadnjoj fazi zrenja do 6 \log_{10} cfu g^{-1} 42. dana. Broj bakterija mliječne kiseline (LAB) znatno je rastao tijekom zrenja, s inicijalnog niskog broja (4 \log_{10} cfu g^{-1}) do 7-8 \log_{10} cfu g^{-1} (14. i 28. dana), da bi na kraju procesa iznosio 6 \log_{10} cfu g^{-1} . Kvasci i plijesni su utvrđeni u znatnom broju na početku zrenja (4 \log_{10} cfu g^{-1}), a njihov broj se smanjio za 1 \log_{10} na kraju zrenja. Ovako visok broj kvasaca vjerojatno je posljedica njihovog velikog broja u sirovini (Tablica 1.). Uz LAB te koagulaza negativne koke (*Staphylococcus* spp i *Micrococcus* spp), kvasci i plijesni imaju važnu ulogu u zrenju kobasica (Hutkins, 2006). Kvasci doprinose razvoju senzornih svojstava fermentiranih kobasica, ali i drugih mesnih proizvoda zbog svoje lipolitičke i proteolitičke aktivnosti (Hammes i Hertel, 1998), što isto vrijedi i za koagulaza negativne koke (Hadžiosmanović i sur., 1979). Broj mikrokoka i enterokoka također se lagano smanjio tijekom zrenja s 4 na 3 \log_{10} cfu g^{-1} . Populacija enterokoka često je varijabilna u različitim vrstama fermentiranih kobasica, a ovisi primarno o higijenskoj kakvoći upotrijebljene sirovine (Hugas i sur. 2003; Drosinos i sur., 2005; Comi i sur., 2005; Kozačinski i sur. 2006). *Pseudomonas* spp utvrđen je u konjskom mesu i svinjskom masnom tkivu, kao i u nadjevu kobasica 0. dana (4 \log_{10} cfu g^{-1}), no nije utvrđen tijekom fermentacije kobasica. *S. aureus* nije utvrđen u svinjskom masnom tkivu i konjskom mesu, no nakon nadijevanja kobasica, njegov broj bio je 2 \log_{10} cfu g^{-1} . Od 14. dana fermentacije nadalje, *S. aureus* nije utvrđen. Enterobakterije kao i *E.coli* utvrđene su 0. dana fermentacije (2-3 \log_{10} cfu g^{-1}), da bi kasnije njihov broj bio ispod detekcijskog limita. Sulfitreducirajuće klostridije bile su prisutne tijekom cijelog procesa zrenja kobasica, no njihov broj se smanjio s 3 \log_{10} cfu g^{-1} na 1 \log_{10} cfu g^{-1} . Budući da sulfitreducirajuće klostridije nisu nađene u mesu i masnom tkivu, njihova prisutnost u kobasicama može se objasniti kontaminacijom začina, što potvrđuje i istraživanje Fujisawa i sur. (2004), u kojem je u 47 % uzoraka začina dokazano prisutstvo klostridija. *Salmonella* spp i *Listeria monocytogenes* nisu utvrđene ni u jednom uzorku tijekom cijelog procesa zrenja.

Smanjenje broja patogenih mikroorganizama u nadjevu

▼ **Tablica 2.** Broj mikroorganizama u kobasicama (\log_{10} cfu g⁻¹)

| | 0. dan | 14. dan | 28. dan | 42. dan |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | 3,00 ± 0,41 | <1 | <1 | <1 |
| <i>E. coli</i> | 2,23 ± 0,15 | <2 | <2 | <2 |
| <i>Micrococcus</i> spp | 4,62 ± 0,14 | 4,68 ± 0,03 | 4,33 ± 0,02 | 3,79 ± 0,06 |
| LAB | 4,05 ± 0,07 | 8,53 ± 0,03 | 7,95 ± 0,04 | 6,22 ± 0,06 |
| AB | 7,01 ± 0,11 | 8,60 ± 0,06 | 8,23 ± 0,20 | 6,67 ± 0,02 |
| Enterococci | 4,64 ± 0,02 | 3,71 ± 0,10 | 3,79 ± 0,06 | 3,49 ± 0,04 |
| <i>Pseudomonas</i> spp | 4,84 ± 0,05 | <2 | <2 | <2 |
| Kvasci i plijesni | 4,62 ± 0,14 | 4,32 ± 0,15 | 3,63 ± 0,17 | 3,45 ± 0,12 |
| SRK | 3,16 ± 0,24 | 2,38 ± 0,07 | 1,43 ± 0,26 | 1,70 ± 0,18 |
| <i>S. aureus</i> | 1,35 ± 1,01 | <2 | <2 | <2 |

može se pripisati ponajviše procesu acidifikacije i sušenja proizvoda. U fermentaciji mesa, glavna funkcija LAB je brzo spuštanje pH nadjeva što osigurava: sigurnost proizvoda inaktivacijom patogena, stabilnost proizvoda i produženje održivosti te stvaranje biokemijskih uvjeta za dobivanje novih senzornih svojstava proizvoda (Lücke, 2000).

pH vrijednost konjskog mesa bila je 5,63, a masnog tkiva 5,9; dok je inicijalna pH vrijednost kobasica iznosila 5,82. Najniža pH vrijednost izmjerena je 14. dana zrenja (5,07) te se lagano povećavala da bi 42. dana bila veća od inicijalne (6,34). Broj LAB je u korelaciji s pH vrijednošću, budući da je bio najveći 14. dana, kada je izmjerena najniža pH vrijednost; a znatno se smanjio 42. dana, kada je i pH vrijednost kobasica bila visoka. Količina soli rasla je usporedo sa smanjenjem količine vode. Količina vode se s inicijalnih 59 % snizila na samo 17 % u finalnom proizvodu. Ta ekstremno niska količina vode može se povezati s predugim vremenom zrenja, budući da se kobasici zamjerila presušenost te žilavost prilikom organoleptičke pretrage, te je predloženo smanjenje perioda zrenja na 36 dana.

ZAKLJUČAK

Tijekom fermentacije LAB su bile dominantne u mikroflori kobasica (6-8 \log_{10} cfu g⁻¹). U fermentaciji su sudjelovali i mikrokoki, te se njihov broj kretao od 2-3 \log_{10} cfu g⁻¹; kao i kvasci i plijesni sa brojem 3-4 \log_{10} cfu g⁻¹. pH vrijednost je značajno pala u prvih 14 dana fermentacije (5,82 - 0.dana, odnosno 5,02 -14. dana) što je uz moguće druge antimikrobne mehanizme LAB, rezultiralo očekivanim smanjenjem broja ili eliminacijom enterobakterija, *E. coli*, patogenih stafilocoka i sulfitreducirajućih klostridija.

RIASSUNTO

IL CAMBIAMENTO MICROBIOLOGICO DURANTE LA FERMENTAZIONE DELLE SALSICCE DELLA CARNE DI CAVALLO

Nel questo studio ci sono stati osservati i cambiamenti durante la fermentazione delle salsicce della carne di cavallo. Tre salsicce erano assaggiate ai giorni 0., 14., 28. e 42. della fermentazione. Durante la fermentazione, i batteri dell'acido lattico facevano la maggioranza tra la microflora della fermentazione (6-8 \log_{10} cfu g⁻¹),

*ma c'erano presenti anche i micrococchi (2-3 \log_{10} cfu g⁻¹), i lieviti e i funghi (3-4 \log_{10} cfu g⁻¹). Nei primi 14 giorni della fermentazione è stata osservata la caduta significativa del valore di pH (5.82 al giorno 0, e 5.02 al giorno 14). Questo, insieme a tutti gli altri possibili meccanismi antibatteriali del LAB, ha risultato con la riduzione prevista del numero di batteri o con l'eliminazione dei enterobatteri, *E. coli*, staphylococchi patogeni e Clostridi solfito-riduttori.*

Le parole chiave: le salsicce della carne di cavallo, i cambiamenti microbiologici

ZAHVALA

Istraživanje je podržalo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH (projekti 053-0531854-1851, 053-0531854-1853).

* Rad je prezentiran na međunarodnoj znanstvenoj konferenciji Hygiene alimenterum XXIX, May 5-7, 2008, Štrbske Pleso, Slovačka

LITERATURA

Badiani A., N. Nanni, P.P. Gatta., Tolomelli, M. Manfredini (1997): Nutrient Profile of Horsemeat. Journal of Food Composition and Analysis 10, 254-269

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

Drosinos E. H., M. Mataragas, N. Xirapi, G. Moschonas, F. Gaitis, J. Metaxopoulos (2005): Characterisation of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. Meat Science, 69, 307-317

Fujisawa T., K. Aikawa, T. Takahashi, K. Yamaguchi, Y. Kosugi, T. Maruyama (2004): Occurrence of Clostridia in Commercially Available Spices, Spice Mixtures and Herbs. Japanese Journal of Food Microbiology 21, 145-150

Hadžiosmanović M., J. Živković, A. Pospišil (1979): Effect of starter-cultures on changes in the composition of winter salami

bacterial flora. Veterinarski arhiv, 49, 121-133

Hadžiosmanović M., J. Gasparik-Reichardt, M. Smajlović, S. Vesković-Moračanin, N. Zdolec (2005): Possible use of bacteriocins and starter cultures in upgrading of quality and safety of traditionally fermented sausages.

Hammes, W. P., C. Hertel (1998): New developments in meat starter cultures. Meat Science 49, Suppl. 1, 125-138

Hugas M., M. Garriga, M.T. Aymerich (2003): Functionality of enterococci in meat products. International Journal of Food Microbiology, 88, 223-233

Hutkins R. W. (2006): Meat fermentation. In: Microbiology and technology of fermented foods, Blackwell Publishing, 207-232

Kozačinski L., N. Zdolec, M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtila, I.

Filipović, T. Majić (2006): Microbial flora of the Croatian traditionally fermented sausage. Arch. Lebensmittelhyg. 57, 141-147

Lücke F.K. (2000): Utilisation of microbes to process and preserve meat. Meat Science 56, 105-115

Paleari M.A., V. Maria Moretti, G. Beretta, T. Mentasti, C. Bersani (2003): Cured products from different animal species. Meat Science 63, 485-489

Täufel A., W. Tenres, A. Tunger, L. Zobel (1993): LandwirtschaftsLexikon. Behr's Verlag, Hamburg.

Prispjelo / Received: 12.5.2008.

Prihvaćeno / Accepted: 19.5.2008. ■

POBOLJŠANJE SIGURNOSTI I KAKVOĆE TRADICIONALNIH FERMENTIRANIH KOBASICA

Zdolec¹, N., M. Hadžiosmanović¹, L. Kozačinski¹, Ž. Cvrtila Fleck¹, I. Filipović¹, K. Leskovar², P. Popelka³, S. Marcinčak³

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj bakteriocinogene kulture *Lactobacillus sakei* na sigurnost i kakvoću tradicionalnih fermentiranih kobasica. Istraživanje je provedeno u dva dijela; prvom zbog uvida u učinak kulture na inokuliranu populaciju bakterije *Listeria monocytogenes*, i drugom s ciljem uvida u utjecaj kulture na mikrobiološke, fizikalno-kemijske i senzorne karakteristike kobasica. Broj *L. monocytogenes* značajno je smanjen u svim fazama zrenja ($P < 0,05$). Primjenom bakteriocinogene kulture smanjen je broj enterokoka, koagulaza negativnih koka i kvasaca u gotovom proizvodu ($P < 0,05$). Rezultati su pokazali poboljšanje senzornih svojstava kobasica u odnosu na izgled, okus, miris i konzistenciju.

Ključne riječi: sigurnost, kakvoća, fermentirane kobasice

UVOD

Primjena bakterija mliječne kiseline kao starter kultura u proizvodnji fermentiranih kobasica standardiziran je

postupak već više desetaka godina. U novije vrijeme istraživanja su usmjerena prema pronalaženju novih funkcionalnih starter kultura, uključujući one koje sintetiziraju bakteriocine. Unutar skupine mliječnokiselinskih bakterija, čini se da su najprikladniji funkcionalni starteri bakteriocinogeni sojevi vrsta *Lactobacillus (Lb.) sakei* i *Lactobacillus (Lb.) curvatus* jer prevladavaju u autohtonoj mikroflori fermentiranih kobasica (Hammes, 1990; Drosinos i sur., 2005; Comi i sur., 2005). Funkcionalnost bakteriocinogenih starter kultura očituje se inhibicijskim djelovanjem koje je najviše izraženo prema bakteriji *L. monocytogenes* (Gasparik-Reichardt i sur. 2006; Drosinos i sur. 2006; Zdolec, 2007a). Osim toga, pokazale su se i tehnološki prihvatljivima u proizvodnji različitih tipova fermentiranih kobasica (Hadžiosmanović i sur., 2005; Urso i sur., 2006). Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj bakteriocinogene kulture *Lb. sakei* na mikrobiološke, kemijske i senzorne karakteristike tradicionalnih fermentiranih kobasica iz sjeverozapadne Hrvatske. Zaštitni učinak kulture provjeren je istovremenom inokulacijom populacije bakterije *L. monocytogenes*.

¹ Dr.sc. Nevijo Zdolec, znanstveni novak-viši asistent; Dr.sc. Mirza Hadžiosmanović, redoviti profesor; Dr.sc. Lidija Kozačinski, izvanredna profesorica; Dr.sc. Željka Cvrtila Fleck, docentica; Ivana Filipović, dr.vet.med., znanstvena novakinja-asistentica; Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb; e-mail: nzdolec@vef.hr

² Kristina Leskovar, dr.vet.med., Veterinarska stanica Vrbovec, Kolodvorska 68, 10340 Vrbovec

³ Dr.sc. Peter Popelka, Dr.sc. Slavomir Marcinčak, Zavod za higijenu i tehnologiju namirnica, Sveučilište veterinarske medicine u Košicama, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovačka