

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

MATERIJAL I METODE

Pokus I

Kobasice su proizvedene u industrijskim uvjetima prema standardnom postupku (Kozačinski i sur., 2006). Soj *Lb. sakei* I151 korišten u ovom istraživanju izoliran je iz tradicionalnih talijanskih fermentiranih kobasica (Urso i sur., 2004). Aktivna kultura je dobivena namnažanjem u MRS bujonu (na 30 °C 24 sata s trostrukim presađivanjem (1% inokulum)), centrifugirana na 2000xg 15 minuta, a dobivene stanice otopljene u 50 ml sterilne fiziološke otopine. Kultura *L. monocytogenes* NCTC 10527 pripremljena je na isti način i inokulirana u nadjev (5 log₁₀ CFU/g). U 50 % nadjeva je dodatno inokulirana kultura *Lb. sakei* (5 log₁₀ CFU/g). Kobasice su nadjevane vakuum punilicom i potom ostavljene na zrenju 28 dana u kontroliranim uvjetima (Zdolec i sur., 2007b). Proizvodnja kobasica ponovljena je tri puta. Uzorci su uzimani 0., 3., 7., 14. i 28. dana zrenja i podvrgnuti određivanju pH (u iscrpini, digitalni pH-metar), ukupnog broja bakterija, broja bakterija mliječne kiseline i broja *L. monocytogenes* standardnim mikrobiološkim metodama.

Pokus II

U drugom dijelu istraživanja kultura *Lb. sakei* I151 dodana je u nadjev (5 log₁₀ CFU/g) s ciljem usporedbe s tradicionalnim proizvodom u odnosu na mikrobiološke, fizikalno-kemijske i senzorne pokazatelje tijekom zrenja (Zdolec i sur. 2008; u tisku). Uzorkovanje je provedeno 0., 3., 4., 7., 14. i 28. dana zrenja. Od mikrobioloških pokazatelja praćen je ukupni broj bakterija, broj bakterija mliječne kiseline, enterokoka, koagulaza-negativnih koka, kvasaca, *Staphylococcus aureus*, enterobakterija, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes*. Fizikalno-kemijske pretrage obuhvatile su određivanje pH, količine vode, NaCl, nitrita, amonijaka, mliječne kiseline, octene kiseline, slobodnih masnih kiselina te indeks proteolize primjenom AOAC metoda i Megazyme dijagnostičkih kitova. Na kraju zrenja ocijenjena su senzorna svojstva: boja, izgled presjeka, povezanost nadjeva, miris, ranketljivost, kakvoća masti, kiselost, sočnost, žilavost, aroma, dojam nakon kušanja i opći dojam.

▼ **Tablica 1.** Broj *L. monocytogenes* (log₁₀ CFU/g – X ± SD) tijekom zrenja kobasica proizvedenih s kulturom *Lb. sakei* I151 i bez nje

	Dan zrenja				
	0	3	7	14	28
Kontrola	4,94 ± 0,18	5,37 ± 0,41	4,77 ± 0,15 ^{a*}	4,65 ± 0,57 ^a	<2
Kobasice s <i>Lb. sakei</i> I151	4,82 ± 0,25	5,40 ± 0,38	3,99 ± 0,20 ^b	2,55 ± 0,21 ^b	<2

* srednje vrijednosti označene različitim slovima (u stupcima) statistički se značajno razlikuju (P<0,05)

Statistička obrada

Statistička analiza podataka provedena je programom Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

REZULTATI I RASPRAVA

Pokus I

Tijekom rane faze fermentacije ukupni broj bakterija bio je znatno manji u kontrolnim kobasicama (P<0,05). U gotovim proizvodima nisu utvrđene značajne razlike u ukupnom broju bakterija i bakterija mliječne kiseline (8,5 log₁₀ CFU/g). Populacija bakterija mliječne kiseline višestruko se povećala u obje grupe kobasica do 3. dana zrenja, a neznatno veći broj je zabilježen primjenom starter kulture nultog i sedmog dana. Rezultati prikazani u tablici 1 ukazuju na intenzivnije smanjenje broja bakterije *L. monocytogenes* do 14. dana zrenja u prisutnosti kulture *Lb. sakei*.

Preživljavanje i rast bakterije *L. monocytogenes* u fermentiranim kobasciama bitno ovisi o vrsti kobasica, okolišnim uvjetima tijekom zrenja, korištenim starter kulturama i prilagođenosti patogena na mesni supstrat (Encinas i sur., 1999; Thévenot i sur., 2005). U okviru zaštitnih tehnologija upotreba bakteriocinogenih starter kultura pokazala se kao dodatni ograničavajući čimbenik za rast bakterije *L. monocytogenes* u nadjevu (Foegeding i sur., 1992; Hugas i sur., 1997; Lahti i sur., 2001; Dicks i sur., 2004). U našem istraživanju prisutnost kulture *Lb. sakei* u nadjevu je uvjetovala značajno smanjenje broja *L. monocytogenes* u prvim fazama zrenja (do 14. dana). Budući da nije bilo značajne razlike u pH nadjeva između kontrolnih i kobasica s kulturom (podaci nisu prikazani), može se pretpostaviti da je smanjenje populacije *L. monocytogenes* bilo podržano aktivnošću bakteriocina sakacina. S tim u vezi, Cocolin i sur. (2005) izvjestili su da je ekspresija sakacina u talijanskim kobasicama proizvedenim s istim sojem *Lb. sakei* najveća tijekom početnih faza zrenja. Smanjenje broja *L. monocytogenes* ispod praga detekcije do kraja zrenja (28. dan) u kontrolnim uzorcima, usprkos velikom inicijalnom broju, ide u prilog učinkovitosti prirodne fermentacije u suzbijanju eventualne kontaminacije nad-

jeva ovim patogenom (Zdolec i sur., 2005, 2007c).

Pokus II

Bakteriocinogena kultura *Lb. sakei* (5 log₁₀ CFU/g) značajno (P<0,05) je povećala ukupni broj bakterija i bakterija mliječne kiseline u nadjevu. Sposobnost kolonizacije nadjeva ovog

soja utvrđena je tijekom zrenja talijanskih tradicionalnih fermentiranih kobasica (Urso i sur., 2006). Primjenom *Lb. sakei*, broj koagulaza negativnih koka ostao je približno jednak inicijalnom (3,5 -3,7 log₁₀ CFU/g) što nije bio slučaj u kontrolnim uzorcima (2 log veći u gotovom proizvodu) (P<0,05). Populacija enterokoka je također rasla kontinuirano tijekom proizvodnog procesa u kontrolnim kobasicama (povećanje za 1,53 log), dok je u kobasicama s *Lb. sakei* broj bio statistički značajno manji na kraju zrenja (za 2 log manji; P<0,05). Urso i sur. (2006) također su utvrdili smanjene populacije enterokoka primjenom kulture *Lb. sakei*, što se nije očitivalo u tradicionalnoj proizvodnji bez starter kulture (Comi i sur., 2005). Primjenom kulture *Lb. sakei* broj kvasaca je bio 1,43 log manji u gotovom proizvodu u odnosu na kontrolu. Enterobakterije su utvrđene u obje skupine kobasica u malom broju samo nultog dana zrenja (< 3 log₁₀ CFU/g). *S. aureus* je bio prisutan iznad praga detekcije (2 log) do 7. dana u kontrolnim kobasicama, te do 4. dana u kobasicama s *Lb. sakei*. *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes* nisu izolirane iz kobasica od početka do kraja proizvodnog procesa.

Unutar prvih dana fermentacije utvrđen je značajno manji pH nadjeva primjenom *Lb. sakei* (5,10) što je bilo popraćeno značajnim porastom količine mliječne kiseline (P<0,05). Prema kraju zrenja utvrđen je značajan porast količine octene kiseline u kontrolnim uzorcima. Može se pretpostaviti da je primjenom starter kulture prevladana heterofermentativna mikroflora koja je odgovorna za nastanak većih količina octene kiseline. Prisutnost heterofermentativnih mikroorganizama u fermentiranim kobasicama nepoželjna je zbog stvaranja CO₂, diacetila i alkohola (Axellson, 1998). Značajno veći indeks proteolize te veća količina amonijaka utvrđena je u kobasicama s *Lb. sakei* prvih dana zrenja, a u kontroli u drugoj fazi (P<0,05). Veći sadržaj slobodnih masnih kiselina zabilježen je u kontrolnim uzorcima u svim fazama zrenja što se može pripisati većem broju koagulaza negativnih koka i kvasaca kao glavnih lipolitičkih mikroorganizama (Hadžiosmanović, 1978). Poboljšanje senzornih svojstava kobasica može se pripisati mikrobiološkim i fizikalno-kemijskim procesima poput izraženije acidifikacije i proteolize kao rezultat aktivnosti *Lb. sakei*. Zaključno, dobiveni rezultati sugeriraju pozitivan učinak bakteriocinogene kulture *Lb. sakei* na ukupnu kakvoću fermentiranih kobasica, kao i na njihovu sigurnost što proizlazi iz potenciranog smanjenja broja *L. monocytogenes* tijekom zrenja.

ZAHVALA

Istraživanje je dio projekta EC ("SAFETYSAUSAGE" ICA4-CT-2002-10037) i projekata MZOŠ RH (053-0531854-1851, 053-0531854-1853).

* Ovaj rad je prezentiran na međunarodnom kongresu Hygiene alimentorum XXIX, 5.-7. svibnja 2008, Strbske Pleso – Vysoke Tatry, Slovačka.

RIASSUNTO

LA MIGLIORANZA DELLA SICURTÀ E DELLA QUALITÀ DELLE SALSICCE TRADIZIONALI FERMENTATE

Lo scopo dello questo studio è stata la ricerca sul *influsso della coltura batteriocinogena del batterio Lactobacillus salvei sulla sicurezza e sulla qualità delle salsicce tradizionali fermentate*. La ricerca è ottenuta nelle due parti: la parte prima era per vedere l'*influsso della coltura sulla popolazione inoculata del batterio Listeria monocytogenes*, e la parte seconda per vedere l'*influsso della coltura sulle caratteristiche microbiologiche, fisico-chimiche e sensoriche delle salsicce*. Il numero del batterio *L. monocytogenes* è stato diminuito nelle tutte le fasi della fermentazione (P<0,05). Applicando la coltura batteriocinogena, è stato diminuito anche il numero dei enterococchi, dei cocchi coagulasa negativi e dei lieviti nel prodotto finale (P<0,05). I risultati hanno mostrato la *miglioranza delle caratteristiche sensoriche delle salsicce confrontato con il sguardo, l'aroma, il sapore e la consistenza*.

Le parole chiavi: la sicurezza, la qualità, le salsicce fermentate

LITERATURA

Axellson, L. (1998): Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: S. Salminen & A. von Wright (Eds.), Lactic Acid Bacteria (pp. 1-72). Marcel Dekker, New York.

Cocolin, L., R. Urso, K. Rantsiou, G. Comi (2005): Identification, sequencing and characterization of lactic acid bacteria genes responsible for bacteriocin production. Tehnologija mesa 46, 162-172.

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 Sci. 69, 381-392.

Dicks, L.M.T., F.D. Mellett, L.C. Hoffman (2004): Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. Meat Sci. 66, 703-708.

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

Drosinos, E. H., M. Mataragas, S. Vesković-Moračanin, J. Gasparik-Reichardt, M. Hadžiosmanović, D. Alagić (2006): Quantifying nonthermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in European fermented sausages using bacteriocinogenic lactic acid bacteria or their bacteriocins: a case study for risk assessment. J. Food Protect., 69, 2648-2663.

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.

Foegeding, P. M., A. B. Thomas, D. H. Pilkington, T. R. Klaenhammer (1992): Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sau-

sage production. Appl. Environ. Microbiol. 58, 884-890.

Gasparik-Reichardt, J., Sz. Tóth, L. Cocolin, E. H. Drosinos, M. Hadžiosmanović, F. Čaklović, L. Turubatović, I. Petrohilou (2006): Safety of traditional fermented sausages: research on protective cultures and bacteriocins. Proceeding of 52nd ICoMST "Harnessing and exploiting global opportunities", Dublin, Ireland, 13.08.-18.08.2006, 335-336.

Hadžiosmanović, M. (1978): Influence of micrococci on lipolytic changes in dry fermented sausages. Disertacija. Veterinarski fakultet, Zagreb.

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. Tehnologija mesa 46, 194-211.

Hammes, W. P. (1990): Bacterial starter cultures in food production. Food Biotechnology 4, 383-397.

Hugas, M., B. Neumeier, F. Pages, M. Garriga, W. P. Hammes (1997): Comparison of bacteriocin-producing lactobacilli on *Listeria* growth in fermented sausages. Fleischwirtschaft International 5, 31-33.

Kozačinski, L., N. Zdolec, M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtić, I. Filipović, T. Majić (2006): Microbial flora of the Croatian traditionally fermented sausage. Archiv für Lebensmittelhyg. 57, 141-147.

Lahti, E., T. Johansson, T. Honkanen-Buzalski, P. Hill, E. Nurmi (2001): Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. Food Microbiol. 18, 75-85.

Thévenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christeans, C. Vernozy-Rozand (2005): Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. Int. J. Food Microbiol. 101, 189-200.

Urso, R., L. Cocolin, G. Comi (2004): Cloning and sequencing of the sakP operon from *Lactobacillus sakei* isolated from

naturally fermented sausages. U: Proceedings Book of the 19th International ICFMH Symposium Foodmicro (pp. 157), 12-16 September 2004, Portoroz, Slovenia.

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.

Zdolec, N., L. Kozačinski, M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtić, I. Filipović (2005): Survival of *Listeria monocytogenes* during the ripening of dry sausages. Proceedings of lectures and posters Hygiene alimentorum XXVI, Safety and quality of meat and meat products in legislative conditions of the common market of the European Union. Strbske Pleso, Slovakia, 25.05.-27.05.2005., 230-233.

Zdolec, N. (2007a): Influence of protective cultures and bacteriocins on safety and quality of fermented sausages. Doctoral thesis. Veterinary Faculty, University of Zagreb.

Zdolec, N., M. Hadžiosmanović, L. Kozačinski, Ž. Cvrtić, I. Filipović, S. Marcinčák, Ž. Kuzmanović, K. Hussein (2007b): Protective effect of *Lactobacillus sakei* in fermented sausages. Archiv für Lebensmittelhyg. 58, 152-155.

Zdolec, N., L. Kozačinski, M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtić, I. Filipović (2007c): Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in dry fermented sausages. Veterinarski arhiv, 77, 507-514.

Zdolec, N., M. Hadžiosmanović, L. Kozačinski, Ž. Cvrtić, I. Filipović, M. Škrivanko, K. Leskovar (2008): Microbiological and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. Meat Sci. Article in Press.

Prispjelo / Received: 15.5.2008.

Prihvaćeno / Accepted: 24.5.2008. ■

KVALITETA SLAVONSKIH ŠUNKI NA 3. NACIONALNOJ ŠUNKIJADI

Senčić¹, Đ., Danijela Butko¹

SAŽETAK

Slavonska šunka je tradicionalni hrvatski suhomesnati proizvod. Za ocjenjivanje je prijavljeno 19 šunki različitih i, uglavnom, tržnih proizvođača. Osim organoleptičkih (senzornih) svojstava, utvrđena je pH vrijednost mesa šunki (M.

semimembranosus), uz pomoć pH-metra Mettler Toledo, kao i parametri boje mesa („L“ i „a“ vrijednost), uz pomoć chromometra Minolta CR-410. Rezultati ocjenjivanja ukazuju na varijabilnost kvalitete slavonske šunke. Utvrđena je visoka i značajna povezanost senzornih svojstava

¹ Dr. sc. Đuro Senčić, redoviti profesor; Danijela Butko, asistent – Zavod za stočarstvo, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, 31 000 Osijek; e-mail: dsencic@pfos.hr