

# Dominantna mikroflora fermentiranih kobasica od konjskog mesa

K. Markov<sup>1</sup>, J. Frece<sup>1</sup>, D. Čvek<sup>1</sup>, A. Trontel<sup>2</sup>, A. Slavica<sup>2</sup>, D. Kovačević<sup>3</sup>

Znanstveni rad

## Sažetak

Budući da se proizvodi od konjskog mesa, u našoj zemlji, proizvode u malim domaćinstvima na tradicionalan način, a konačan proizvod ovisi o prisutnosti i aktivnosti prirodne mikroflora, svrha ovog rada bila je odrediti mikrobnu populaciju i kemijske parametre u fermentiranim kobasicama od konjskog mesa, te izolirati i karakterizirati prisutne autohtone starter kulture i istražiti njihovu sposobnost inhibicije rasta patogenih bakterija. U uzorku kobasice od konjskog mesa biokemijskim API testovima dokazane su bakterije *Serratia odorifera* iz obitelji *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, bakterija *Listeria grayi*, bakterije iz roda *Salmonella* i sulfireducirajuće klostridije nisu utvrđene, a dokazan je i kvasac – *Candida zeylanoides*. Dominantna mikroflora u uzorku kobasice bio je izolat bakterija mliječne kiseline *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 5K1 u broju 8,301 log<sub>10</sub>cfu g<sup>-1</sup>. Na MRS podlozi (selektivnoj podlozi za bakterije mliječne kiseline) *L. lactis* ssp. *lactis* 5K1 proizveo je 13,83g L-1 mliječne kiseline (HPLC), te zakiselio podlogu na 4,16 pH vrijednost i pokazao znatno antimikrobno djelovanje prema patogenim test mikroorganizmima. U radu su praćeni i kemijski parametri: udio vode (41,12%), masti (20,93%), proteina (27,29%), natrijevog klorida (3,78%), pH (4,94) i sadržaj nitrata (0,983 mgkg<sup>-1</sup>).

**Ključne riječi:** kobasica od konjskog mesa, prirodna mikroflora, antimikrobno djelovanje

## Uvod

Potrošnja konjskog mesa nije previše poželjna ni uvriježena u prehrani ljudi u našoj zemlji, iako konjsko meso predstavlja vrlo kvalitetnu i vrijednu prehrambenu namirnicu. Kroz povijest konjsko meso je u većoj ili manjoj mjeri oduvijek služilo ljudima za hranu, ali je od 8. stoljeća Rimski crkva zabranila konzumaciju konjetine pod izlikom da je nečisto, odvratno i da izaziva gubu (Dobranić, 2008). Zbog predrasuda koje je nametnula Crkva, konjsko meso se je dugo vremena smatralo „meso iz nužde“, jer se koristilo za vrijeme ratnih i gladnih godina.

Tijekom godina, predrasude su ne-

stajale, a konjsko meso i kobasice od konjskog mesa sve su više prihvaćeni i cijenjeni specijaliteti. U Hrvatskoj, u selima oko Pakraca, u malim domaćinstvima, postoji tradicija proizvodnje proizvoda od konjskog mesa (Šimić, 2008). Konjsko meso tvrde je konzistencije, specifičnog slatkastog okusa, svijetlocrvene boje u mladim, a tamnocrvene s plavkastom nijansom u starijih životinja.

Bogato je bjelančevinama (~ 19,8%), masti sadrži ~ 6,6%, bogat je izvor Fe, Zn, P, Cu i Mg, a sadrži i dosta vitamina B-12 (Täufel i sur., 1993; Badiani i sur., 1997). Zbog lakše probavljivosti u odnosu na goveđe meso, niskog sadržaja kolesterola,

konjsko meso preporuča se u dijetalnoj prehrani, prehrani za djecu, sportaše i oboljele od anemije (Täufel i sur., 1993; Paleari i sur., 2003).

Postupak klanja konja i obrada konjskog mesa, zahtjeva više vremena i pažnje, pa se provodi u specijaliziranim mesnicama za konjsko meso kojih je u Hrvatskoj vrlo malo, jer je konjsko masno tkivo neugodna mirisa i okusa, podložno kvarenju, te kao takvo ne smije biti sastavni dio smjese za proizvodnju kobasica (Šimić, 2008). Hrvatska je po proizvodnji i potrošnji konjskog mesa skromna. Iako proizvodi od konjskog mesa nisu uobičajeni asortiman mesnih industrija (Alagić,

<sup>1</sup> dr. sc. Ksenija Markov, docent; dr. sc. Jadranka Frece, docent, dr. sc. Domagoj Čvek, asistent, Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb; Tel. +385 1 4605 045; E-mail: kmarko@pbf.hr

<sup>2</sup> Antonija Trontel, dipl. inž., dr. sc. Anita Slavica, doc., Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb

<sup>3</sup> dr. sc. Dragan Kovačević, redoviti profesor, Zavod za prehrambene tehnologije, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Kuhačeva 20, 31 000 Osijek

**Tablica 1.** Metode izolacije i identifikacije mikroorganizama  
**Table 1** Methods of isolation and identification of microorganisms

Mikroorganizmi/ Microorganisms	Hranjiva podloga/ Nutrient media	Uvjeti inkubiranja/ Incubation condition	API test/ API test
<i>Salmonella</i> sp.	RP-bujon, XLD (Biolife)	37 °C 24 - 48 h	API 20 EV4.1
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRB (Biolife)	37 °C 24 h	API 20 EV4.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	BP (Biolife)	37 °C 48 h	API STAPH V4.1
Sulfireducirajuće klostridije/ Sulphite reducing clostridia	Sulfitni agar (Biolife)	37 °C 72 h	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fraser bujon, Palcam (Biolife)	37 °C 24 h	API Listeria V1.2
Bakterije mliječne kiseline/ Lactic acid bacteria	MRS agar (Biolife)	30 °C 48-72 h	API 50 CHL V5.1
Kvasci /Yeasts	Sabouraud agar (Biolife)	25°C 48-72 h	API 20 C AUX V4.0 Kvasci /Yeasts

2008), u posljednje vrijeme u prodaji je sve veći izbor konjskog mesa, kobasica od konjskog mesa i fermentiranih kobasica od konjskog mesa. U Hrvatskoj se prirodno fermentirani mesni proizvodi tradicionalno proizvode dugi niz godina, bez dodavanja starter kultura, i ovisni su o aktivnosti prirodne mikroflora. Mnogi mikroorganizmi, svojim rastom i metabolizmom induciraju promjene u okusu, nutritivnoj kvaliteti, teksturi, aromi i sigurnosti samog proizvoda (Kovačević i sur., 2009). Iz tog razloga, poželjno je dodavati specifične starter kulture za mesne proizvode s ciljem oplemenjivanja, očuvanja senzornih svojstava, sigurnosti i trajnosti konačnog proizvoda (Frece i sur., 2010). Cilj ovog rada bio je odrediti u fermentiranim kobasicama od konjskog mesa, mikrobnu populaciju, izolirati i karakterizirati prisutne autohtone starter kulture, istražiti njihovu sposobnost inhibicije rasta patogenih bakterija te odrediti kemijski sastav.

### Materijali i metode

Izolacija mikrobnog populacije provedena je na uzorku kobasice od konjskog mesa proizvedene u domaćinstvu, a analizirani su sljedeći

parametri: bakterije roda *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* i sulfireducirajuće klostridije u 1 g uzorka, *Salmonella* sp. i bakterija *Listeria monocytogenes* u 25 g uzorka, te bakterije mliječne kiseline. Za izolaciju i identifikaciju mikrobnog populacije upotrijebljene su klasične mikrobiološke metode (HRN ISO postupci) i biokemijski (API) testovi. Za identifikaciju i razlikovanje istraživanih bakterija i bakterija mliječne kiseline, od ostalih bakterija koje mogu porasti na selektivnim podlogama upotrijebljeni su biokemijski API testovi prema uputama proizvođača (tablica 1).

### Turbidimetrijska metoda

Inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella* sp. 3064 i *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 s izolatima bakterija mliječne kiseline, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 5K1 određivala se turbidimetrijskom metodom (Frece, 2007). Kao test mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

### Određivanje proizvedene mliječne kiseline HPLC metodom

Proizvedena mliječna kiselina određena je u uzorcima pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) prema Trontel i sur. (2010), a rezultati su izraženi kao mliječna kiselina (g<sup>L</sup><sup>-1</sup>).

Glukoza, mliječna kiselina, acetat i etanol nabavljeni su iz Sigma-Aldrich (Bellefonte, SAD). Otopina H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85% v/v) (Sigma-Aldrich, Hamburg, Njemačka) korištena je za pripremu pokretne faze (0.1 % v/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), a deionizirana voda vodljivosti < 1 mS za pripremu pokretne faze i otopina standarda. Kromatografska analiza napravljena je pomoću Shimadzu Class-VP LC-10A<sub>VP</sub> sustava (Shimadzu, Kyoto, Japan). Klipna pumpa (LC-10AD<sub>VP</sub>) pumpala je mobilnu fazu protokom od 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Supstrat i produkti odijeljeni su pomoću Supelcogel™ C-610H (30cm x 7,8 mm ID, 9µm) analitičke kolone s Supelcogel™ H (5 cm x 4,6 mm ID, 9µm) predkolonom (obje dobavljene iz Sigma-Aldrich; Hamburg, Njemačka), i detektirani pomoću detektora indeksa loma (RID-10A).

### Kemijska analiza kobasica od konjskog mesa

Određivanje kemijskog sastava kobasice od konjskog mesa provedeno je postupcima u kemijskoj analizi, a parametri su bili: -udio vlage, masti i proteina (AOAC Official method 2007.04); udio natrijevog klorida (titrimetrijski po Volhardu); pH (ISO 2917:1999); sadržaj nitrita (spektrofotometrijski).

### Rezultati i rasprava

Upotrijebljene klasične mikrobiološke metode i biokemijski (API) testovi za identifikaciju bakterija izoliranih iz kobasice od konjskog mesa pokazuju određena odstupanja u dobivenim rezultatima. Klasičnim mikrobiološkim metodama, na

selektivnim podlogama, u istraživanom uzorku kobasice nisu dokazane bakterije iz roda *Salmonella* ni sulfitoreducirajuće klostridije. Međutim, *Staphylococcus* vrste dokazane na Baird-Parker (BP) agaru kao crne kolonije s halo efektom, dodatno su identificirane: bojanje po Gramu gram pozitivni koki; katalaza test-pozitivan; koagulaza test-pozitivan. Biokemijskim API Staph testom V4.1 u uzorku kobasice od konjskog mesa potvrđena je bakterija *Staphylococcus aureus*. Broj bakterijskih stanica *S. aureus* izoliranih iz uzorka bio je  $3,301 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$  uzorka (Tablica 2). Naime, nije svejedno da li uzorak sadrži 3 ili  $6 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$ , budući da je broj bakterija *S. aureus* od  $6 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$  već potencijalno opasan uzorak, jer se pri tolikom inokulumu mogu dokazati enterotoksini. Kako je izvor zaraze *S. aureus* čovjek, prisutnost te bakterije ukazuje na ljudsku kontaminaciju, ali i masno tkivo koje se dodaje u tijeku proizvodnje kobasica od konjskog mesa može biti izvor patogenih bakterija. Prisutnost enterobakterija indikatora su slabe higijene i propusta tijekom proizvodnje/čuvanja. Iz uzorka kobasice od konjskog mesa izolirana je bakterija *Serratia odorifera* iz porodice *Enterobacteriaceae* u broju  $3,477 \log_{10} \text{cfu g}^{-1}$  uzorka (Tablica 2).

Najmanja infektivna doza bakterije *L. monocytogenes* za ljude je nepoznata jer ovisi o imunitetu domaćina i koncentraciji patogena u konzumiranoj namirnici. Ova bakterija je raširena posvuda u okolišu i glavni izvor *L. monocytogenes* u gotovoj hrani je vanjska kontaminacija. Stoga je u svrhu prevencije potrebno posebnu pažnju posvetiti održavanju higijene, opreme, pribora i prostorija u kojima se hrana proizvodi. Budući da na PALCAM agaru, porast maslinasto-zelenih kolonija može biti i zbog pojave ostalih bakterija, svaka takva kolonija mora se dodatno identificirati potvrđnim testovima. Identifikacija bakterije *L. monocytogenes*

**Tablica 2.** Mikrobiološki i biokemijski (API) rezultati

**Table 2** Microbiological and biochemical (API) results

Mikroorganizmi/ Microorganisms	$\log_{10} \text{cfu g}^{-1}$ uzorka/samples	API test/ API test
Enterobacteriaceae	3,477	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Listeria sp.</i>	2,301	<i>Listeria grayi</i>
<i>Staphylococcus</i>	3,301	<i>S. aureus</i>
Bakterije mliječne kiseline/ Lactic acid bacteria	8,301	<i>L. lactis ssp. lactis</i>
Kvasci/ Yeasts	5,000	<i>C. zeylanoides</i>

**Tablica 3.** Inhibicija rasta bakterija u prisutnosti izolata *L. lactis ssp. lactis* 5K1

**Table 3** Inhibition of bacterial growth in the presence of isolates *L. lactis ssp. lactis* 5K1

Vrijeme / Time (h)	% inhibicije/% inhibition (mean±SD)			
	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>
0				
2	73,4 ± 0,5	61,0 ± 0,8	62,7 ± 1,3	51,5 ± 0,6
4	78,0 ± 0,9	67,7 ± 0,9	69,7 ± 0,8	61,0 ± 0,8
6	77,7 ± 1,1	70,2 ± 1,3	75,0 ± 0,6	63,6 ± 1,3
24	85,0 ± 0,7	81,8 ± 0,7	84,5 ± 0,9	69,4 ± 0,8
48	87,0 ± 0,6	87,7 ± 0,7	87,0 ± 0,7	74,8 ± 0,7
72	85,4 ± 0,5	82,4 ± 1,1	88,6 ± 1,0	87,0 ± 0,9

potvrđnim testovima uključivala je: bojanje po Gram-u gram-pozitivan štapić koji često poprima oblik slova Y ili V; test na katalazu - katalaza pozitivna i test pokretljivosti (pokretna). API Listeria V1.2 testom nije potvrđena patogena bakterija *L. monocytogenes*, ali je dokazana *L. grayi* (Tablica 2). Izolirana bakterija mliječne kiseline *L. lactis ssp. lactis* 5K1 potencijalna je starter kultura za mesne proizvode i prirodna autohtona mikroflora mesa, identificirana je API 50 CHL testom (Tablica 2). Kromatografskom analizom supernatana uzorka hranjive MRS podloge u kojoj je porasla kultura *L. lactis ssp. lactis* 5K1 dokazana je homolaktična fermentacija glukoze do mliječne kiseline ( $13,83 \text{ gL}^{-1}$  mliječne kiseline), a podloga je zakiseljena na 4,16 pH vrijednost. Kvasci također imaju važnu ulogu u zrenju kobasica, jer doprinose razvoju senzorskih svojstava fermentiranih kobasica, zbog svoje lipolitičke i proteolitičke aktivnosti (Kovačević, 2001; Alagić i sur., 2008).

Rezultati naših istraživanja su pokazali da je u uzorku kobasice od konjskog mesa pronađen kvasac *C. zeylanoides* što je u suglasju s rezultatima Nielsen i sur. (2008) koji navode kao najčešće izolirane halofilne kvasce iz fermentiranih mesnih proizvoda *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, *Candida zeylanoides*, *Trichosporon sp.*, *Cryptococcus sp.* i *Rhodotorula sp.*

Antagonizam prema patogenim mikroorganizmima je jedno od bitnih preduvjeta za potencijalne starter kulture. *L. lactis ssp. lactis* 5K1 pokazao je značajnu antimikrobnu aktivnost prema odabranim test mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella sp.* 3064 i *Listeria monocytogenes* ATCC 23074). Antimikrobna aktivnost starter kultura se povezuje sa proizvodnjom metabolita kao što su organske kiseline (mliječna i octena kiselina), vodik peroksid, etanol, diacetil, acetaldehid i bakteriocini (Fre-

**Tablica 4.** Kemijski sastav kobasice od konjskog mesa  
**Table 4.** Chemical composition of horse meat sausage

Parametar/Parameter	Jedinica/ Measure	Rezultat/Result
Sadržaj nitrita	mg kg <sup>-1</sup> NaNO <sub>2</sub>	0,983
pH		pH=4,94
Udio natrijevog klorida	%	3,78
Udio masti	%	20,93
Udio vode	%	41,12
Udio proteina	%	27,29

ce i sur., 2005.; Frece i sur., 2010). Bakterijski izolat *L. lactis* ssp. *lactis* 5K1 pokazao je značajnu inhibiciju rasta na sve istraživane patogene test mikroorganizme tijekom 72 sata rasta (tablica 3).

Iz tablice 3 je vidljivo značajno inhibitorno djelovanje izolata *L. lactis* ssp. *lactis* 5K1 na rast bakterija *E. coli*, *L. monocytogenes* i *Salmonella* sp. tijekom čitavog vremena inkubacije, a maksimum inhibicije (87%) je zabilježen nakon 48 sati uzgoja. Nadalje, rezultati istraživanja pokazali su, da je antimikrobna aktivnost izolata BMK, *L. lactis* ssp. *lactis* 5K1, na rast bakterije *S. aureus* slabiji tijekom 24 sata uzgoja (51,5% do 69,4%) u odnosu na ostale test mikroorganizme, a maksimum inhibicije (87%) je zabilježen na kraju uzgoja.

Kemijski sastav kobasice od konjskog mesa utvrđen je ispitivanjem kemijskih parametara kakvoće i to određivanjem udjela proteina, masti, vlage, NaCl i sadržaja nitrita (Tablica 4).

pH vrijednost u fermentiranim kobasicama od konjskog mesa u istraživanjima Alagića i sur. (2008) kretala se od inicijalne pH vrijednosti 5,82 do 5,02 kada je zabilježena i najveća količina BMK. Rezultati naših istraživanja također upućuju na korelaciju niske pH vrijednost (4,94) kobasice s brojem izolata BMK *L. lactis* ssp. *lactis* 5K1 (8,301 log<sub>10</sub> cfu g<sup>-1</sup>) i količinom proizvedene mliječne kiseline. Udio vode od 41,12% se može povezati

s dužinom zrenja kobasice, a prema organoleptičkim karakteristikama kobasica je bila mekane konzistencije, s komadićima mesa tamnocrvene boje. U istraživanom uzorku udio masti bio je 20,93%, dok je u istraživanjima Šimića i Miokovića (2008) dokazan sadržaj masti u rasponu od 24,83 – 36,33%. Nepodudaranje dobivenih rezultata može se objasniti time, što količina masti u kobasicama od konjskog mesa varira ovisno o recepturi, domaćinstvu u kojem je proizvedena, ali i o porijeklu same sirovine (mršavi ili debeli konji). Konjsko meso sadrži veću količinu proteina u odnosu na goveđe i svinjsko meso. Udio proteina od 27,29% u istraživanom uzorku kobasice (Tablica 4), u suglasju je s istraživanjima Šimića i Miokovića (2008), koji su u uzorcima suhih kobasica od konjskog mesa dokazali količinu proteina u rasponu od 20,30 – 36,60%. Kemijskom analizom određena je i razina natrijevog nitrita (0,983 mg kg<sup>-1</sup>NaNO<sub>2</sub>) koji se kao aditiv često dodaje u proizvode od mesa s ciljem antimikrobnog djelovanja (Branen i sur., 1990.; Janssen, 1997.).

### Zaključak

*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 5K1 prevladava u autohtonoj mikrobnjoj populaciji kobasica (8,301 log<sub>10</sub> cfu g<sup>-1</sup>), kao prirodna starter kultura, o čijoj aktivnosti ovisi zrenje samih kobasica, a dokazana je i znatna antimikrobna učinkovitost prema patogenim mikroorganizmima, proizvodnja mliječne kiseline i brzo snižavanje pH podloge. Obzirom da

je u uzorku kobasice od konjskog mesa dokazana patogena bakterija *S. aureus*, kao i *Serratia odorifera*, a budući da se tradicionalne kobasice od konjskog mesa često proizvode u seoskim domaćinstvima i po različitim recepturama, potrebno je standardizirati njihovu proizvodnju.

### Literatura

- Alagić, D., L. Kozaićinski, I. Filipović, N. Zdolec, M. Hadžiosmanović, B. Njari, Z. Kozaićinski, S. Uhtil** (2008): Mikrobiološke promjene tijekom zrenja fermentiranih kobasica od konjskog mesa. *Meso* 10, 200-203.
- Badiani, A., N. Nanni, P.P. Gatta, Tolomei, M. Manfredini** (1997): Nutrient Profile of Horsemeat. *Journal of Food Composition and Analysis* 10, 254-269.
- Branen, A. L., P. M. Devidson, S. Salminen** (1990): *Food Additives*, Marcel Dekker, Inc. New-York, Basel.
- Dobranić, V., A. Večkovec, M. Kadivc, B. Njari** (2008): Konjsko meso i hippophagia. *Meso* X, 4, 288-292.
- Frece, J., B. Kos, J. Beganović, S. Vuković, J. Šušković** (2005a): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 21, 1401-1408.
- Frece, J.** (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Frece, J., K. Markov i D. Kovačević** (2010): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso - u tisku*
- Ivanković, A., P. Caput, M. Čačić** (2001): Proizvodnja i značajke konjskog mesa. *Stočarstvo* 55 (5), 357-368.
- Janssen, M. M. T.** (1997) *Food additives*. In: De Vries, J.: *Food Safety and Toxicity*. CRC Press LLC, Florida (Chapter five).
- Kovačević, D.** (2001): Kemija i tehnologija mesa i ribe, Sveučilište J.J. Strossmayera, Prehrambeno tehnološki fakultet, Grafika Osijek
- Nielsen D.S., T. Jacobsen, L. Jespersen, A. G. Koch, N. Arneborg** (2008): Occurrence and growth of yeasts in processed meat products- Implications for potential spoilage. *Meat Sci.* 80, 919-926.

## Dominant microflora of fermented horse meat sausages

### Summary

Since the products of horse meat in our country, produced in small households in the traditional way, and the final product depends on the presence and activity of natural microflora, the purpose of this study was to determine the microbial population and chemical parameters in dry fermented sausages of horse meat, and isolate and characterize the presence of autochthonous starter cultures and to investigate their ability to inhibit growth of pathogenic bacteria. In the samples of horse meat sausages were detected bacteria *Serratia odorifera* from the family Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, API Listeria test confirmed the bacteria *L. grayi*, bacteria of the genus *Salmonella* and Sulphite reducing clostridia not established, and detected yeast - *Candida zeylanoides*. The dominant microflora in the samples of sausages were lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 5K1 in the number  $\log_{10} \text{cfu}$  8.301 g<sup>-1</sup>. On the MRS medium (selective medium for lactic acid) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 5K1 produced 13,83g<sup>-1</sup> of lactic acid (HPLC) and acidify media at pH value of 4.16 and showed significant antimicrobial activity against pathogenic test microorganisms. In the paper were also observed chemical parameters: water content (41,12%), fat (20,93%), protein (27,29%), sodium chloride (3,78%), pH (4,94) and nitrite content (0,983 mgkg<sup>-1</sup>).

**Keywords:** sausage made of horse meat, the natural microflora, antimicrobial activity.

## Dominante Mikroflora der fermentierten Würste aus Pferdefleisch

### Zusammenfassung

Da die Erzeugnisse aus Pferdefleisch in unserem Land in kleinen Haushalten auf traditionelle Weise hergestellt werden, und das Enderzeugnis hängt von der Anwesenheit und Aktivität der natürlichen Mikroflora ab, war das Ziel dieser Arbeit sowohl die mikrobielle Population und die chemischen Parameter in fermentierten Würsten aus Pferdefleisch zu bestimmen, als auch die anwesenden autochthonen Starterkulturen zu isolieren und zu charakterisieren, und zugleich ihre Fähigkeit der Inhibition des Wachstums von pathogenen Bakterien zu erforschen. In den Wurstmustern aus Pferdefleisch wurden durch biochemische API Tests die Bakterien *Serratia odorifera* aus der Familie Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, Bakterien *Listeria grayi*, Bakterien aus der Gattung *Salmonella* und sulfitoreducierende Bakterien wurden nicht vorgefunden, Hefe wurde vorgefunden – *Candida zeylanoides*. Die dominante Mikroflora in Wurstmustern war das Isolat der Milchsäure-Bakterien *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 5K1 in der Zahl 8.301  $\log_{10} \text{cfu}$  g<sup>-1</sup>. Auf der MRS Grundlage ((selektive Grundlage für Bakterien der Milchsäure) *L. lactis* ssp. *lactis* 5K1 erzeugte 13,83 gL<sup>-1</sup> Milchsäure (HPLC) und säuerte die Grundlage auf 4,16 pH Wert und zeigte bedeutende antimikrobielle Wirkung gegenüber pathogenen Test-Mikroorganismen. In der Arbeit wurden auch chemische Parameter verfolgt: Wasseranteil (41,12 %), Fette (20,93 %), Proteine (27,29 %), Natriumchlorid (3,78%), pH (4,94) und Nitritgehalt (0,983 mgkg<sup>-1</sup>).

**Schlüsselwörter:** Würste aus Pferdefleisch, natürliche Mikroflora, antimikrobielle Wirkung

## Microflora dominante nelle salsicce fermentate di carne equina

### Sommario

Siccome i prodotti di carne equina nel nostro paese vengono prodotti in modo tradizionale, nelle condizioni domestiche, in case piccole, e il prodotto finale dipende dalla presenza e dall'attività di microflora naturale, lo scopo di questo lavoro era determinare la popolazione di microbi e i parametri chimici nelle salsicce fermentate di carne equina, ed isolare e caratterizzare le presenti culture starter autoctone, così come esaminare la loro abilità di inibire la crescita di batteri patogeni. Nel campione di salsiccia di carne equina mediante i test biochimici, API, è stata affermata la presenza di batterio *Serratia odorifera* che appartiene alle Enterobacteriaceae, poi *Staphylococcus aureus* e il batterio *Listeria grayi*. I batteri di tipo *Salmonella* e le clostridie sulfitoreducenti non sono state determinate, ed è rivelato anche il fermento - *Candida zeylanoides*. La microflora dominante nel campione di salsiccia era un isolato di batteri dell'acido lattico *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 5K1 nel numero 8,301  $\log_{10} \text{cfu}$  g<sup>-1</sup>. Sul substratum MRS (il substratum selettivo per i batteri di acido lattico) *L. lactis* ssp. *lactis* 5K1 ha prodotto 13,83g<sup>-1</sup> di acido lattico (HPLC), e ha fatto il substratum acido, con il valore pH 4,16. Ha rivelato anche una notevole azione antimicrobica sui test-microorganismi patogeni. Nel lavoro sono stati seguiti anche i parametri chimici: la percentuale di acqua (41,12%), di grassi (20,93%), di proteine (27,29%), di clorido di sodio, di valore pH (4,94) e del contenuto di nitriti (0,983 mgkg<sup>-1</sup>).

**Parole chiave:** salsiccia di carne equina, microflora naturale, azione antimicrobica

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

**Šimić, D., B. Mioković** (2008): Prilog poznavanju suhih kobasica od konjskog mesa („Piketa“) iz okolice Pakraca. Meso X, 4, 292-

296.

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

**Trontel, A., V. Baršić, A. Slavica, B. Šan-tek, S. Novak** (2010): Modeling the Effect of Different Substrates and Temperature on the

Growth and Lactic Acid Production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> in Batch Process. Food technology and biotechnology. In Press

Dostavljeno: 19.5.2010.

Prihvaćeno: 7.6.2010.

m