

VPLYV ŠTARTOVACEJ KULTÚRY NA MIKROBIOLOGICKÚ KVALITU TRVANLIVÉHO TEPELNE NEOPRACOVANÉHO MÄSOVÉHO VÝROBKU EFFECT OF STARTER CULTURE ON MICROBIOLOGICAL QUALITY OF TRADITIONAL FERMENTED SAUSAGE

Miroslav Kročko, Margita Čanigová, Eva Vančíková, Erika Flimelová, Alica Bobková

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of starter culture on the growth of fortuitous spoilage microflora and in the production of traditional dry-fermented product (sausage). Starter culture contains three strains of *Staphylococcus xylosus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum*. The use of this starter culture decreased the counts of moulds and yeasts, enterococci and constituted an additional improvement to the microbial safety by reducing *Enterobacteriaceae* proliferation at the beginning of the ripening process.

Keywords: fermented meat product, starter culture, ripening process, microorganisms

ÚVOD

Výroba fermentovaných podľa Výnosu č. 1895/2004-100 (2005) označovaných ako trvanlivé tepelne neopracované mäsové výrobky (TTNMV) sa považuje za jednu z najnáročnejších v spracovaní mäsa. Kľúčové pre kvalitný finálny výrobok je výber suroviny (nemožno použiť mäso typu PSE alebo DFD), mletie a miešanie diela, plnenie a samotné zrenie, pri ktorých sa uplatňuje tzv. prekážkový efekt. Najmä v poslednej etape zrenia treba eliminovať nežiaducu mikroflóru a vytvoriť priaznivé podmienky pre existenciu mliečnych baktérií zabezpečujúcich priaznivý fermentačný proces.

Štartovacie kultúry sa považujú za dôležitý vedecký a priemyselný prínos, vyplývajúci z potreby zvýšenia kvality a bezpečnosti mäsových produktov. Zlepšujú senzorické vlastnosti, zvyšujú trvanlivosť a bezpečnosť výroby, minimalizujú riziká výskytu patogénnych mikroorganizmov. V súčasnosti používané štartovacie kultúry obsahujú prevažne baktérie mliečneho kysnutia (LAB) a kmene rodu *Staphylococcus*. Medzi najčastejšie druhy mikroorganizmov, ktoré sa uplatnili pri výrobe TTNMV patria *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus carnosus* a *Staphylococcus xylosus* (Toldrá, 2002).

Štartovacie kultúry sa zvyčajne vyrábajú kombináciou rôznych druhov mikroorganizmov, podľa požiadaviek výrobcov konečného produktu. Pre pomaly fermentované mäsové výrobky sa používa kombinácia mikroorganizmov, ktoré spôsobujú mierne okyslenie výrobku a teplota pri zrení dosahuje maximálne 20 °C. Pri týchto podmienkach sa môže využívať kombinácia druhov *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus paracasei*. Pri rýchlo zrejúcich fermentovaných mäsových výrobkoch (max teplota zrenia 24 °C) sa využíva kombinácia najmä druhov *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* a *Staphylococcus carnosus* (Nápravníková, 2005).

Cieľom práce bolo porovnať mikrobiologickú kvalitu (CPM, enterokoky, laktobacili, čeľad' *Enterobacteriaceae*, kvasinky, mikroskopické vláknité huby) fermentovaného mäsového výrobku s a bez pridania štartovacej kultúry a bez použitia dusitanovej soliacej zmesi.

MATERIÁL A METÓDY

Na prípravu 1 kg tepelne neopracovaného mäsového výrobku (Domáca klobása) sa použili nasledujúce zložky (g): chudé bravčové mäso (700), bravčové boky bez kože (300), soľ (20), čierne korenie (2), červená paprika sladká (10), červená paprika štiplavá (4), cesnak (10), drvená rasca (2). Zmes sa rozdelila na dve polovice, pričom do jednej sa pridala štartovacia kultúra „Lyocarni SHI-59“ (Clerici Sacco, Taliansko) v množstve $0,2 \text{ g.kg}^{-1}$. Táto kultúra obsahovala bakteriálne druhy *Staphylococcus xylosus*, *Pediococcus pentosaceus* a *Lactobacillus plantarum*. Výroba fermentovaných mäsových výrobkov sa uskutočnila v priestoroch s minimálnou možnosťou sekundárnej kontaminácie. Treba zdôrazniť, že pri výrobe sa nepoužila dusitanová soliaca zmes a GDL (E575). Hodnota pH použitého mäsa po 45 min (6,4) a po 24 h (5,8) od zabitia sa pohybovala v rozmedzí normálneho mäsa a nie mäsa typu PSE alebo DFD. Pripravené mäsové zmesi sa plnili do kalibrovaných bravčových čriev s priemerom 28 – 30 mm. Podľa technologického postupu sa výrobky údili 24 h studeným dymom a vložili sa do klimatizovanej komory, v ktorej sa postupne menila vlhkosť (od 80 %) ako aj teplota (od $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$) počas 15 dní zrenia a 15 dní skladovania (sušenia) na konečných $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a relatívnu vlhkosť 76 %. Pre mikrobiologické vyšetrenie sa odobralo 5g vzorky, ktorá sa homogenizovala v 45 ml fyziologického roztoku prístrojom Heidolph DIAX 900 (Nemecko).

Vzorky fermentovanej salámy bez prídavku štartovacej kultúry ako aj so štartovacou kultúrou sa vyšetrili na:

- celkový počet mikroorganizmov (CPM) na GTKA (*HiMedia*, India) kultiváciou pri teplote $30 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $72 \pm 2 \text{ h}$ (STN ISO 4833, 2004),
- počet enterokokov (ENT) na živnom médiu Slanetz – Bartley (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) pri teplote $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $48 \pm 2 \text{ h}$ (STN 560100, 1970) a aj na živnom médiu Bile esculin azide agar (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) pri teplote $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $24 \pm 2 \text{ h}$,
- baktérie čeľade *Enterobacteriaceae* (ETB) na živnom médiu VRBG (*HiMedia*, India) kultiváciou pri teplote $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $24 \pm 2 \text{ h}$ (STN ISO 21528-2, 2007),
- počet baktérií rodu *Lactobacillus* (Lb.) na živnom médiu MRS (*HiMedia*, India) kultiváciou pri teplote $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, po dobu 5 dní (STN ISO 15214, 2002),
- mikroskopické vláknité huby (MVH) a kvasinky na živnom médiu DRBC a DG 18 (*Merck*, Nemecko) kultiváciou pri teplote $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 dní (STN ISO 21527-1, 2, 2008). Stanovenie aktivity vody (a_w) sa vykonalo prístrojom LabMaster (Pfaffinon Novasina, Švajčiarsko). Stanovenie hodnoty pH sa vykonalo pomocou vpichovej sondy pH metra (Gryf 209 L, Česká republika).

Experiment sa uskutočnil v dvoch opakovaniach. Výsledné hodnoty počtu mikroorganizmov sa previedli na logaritmické hodnoty $\log \text{KTJ.g}^{-1}$.

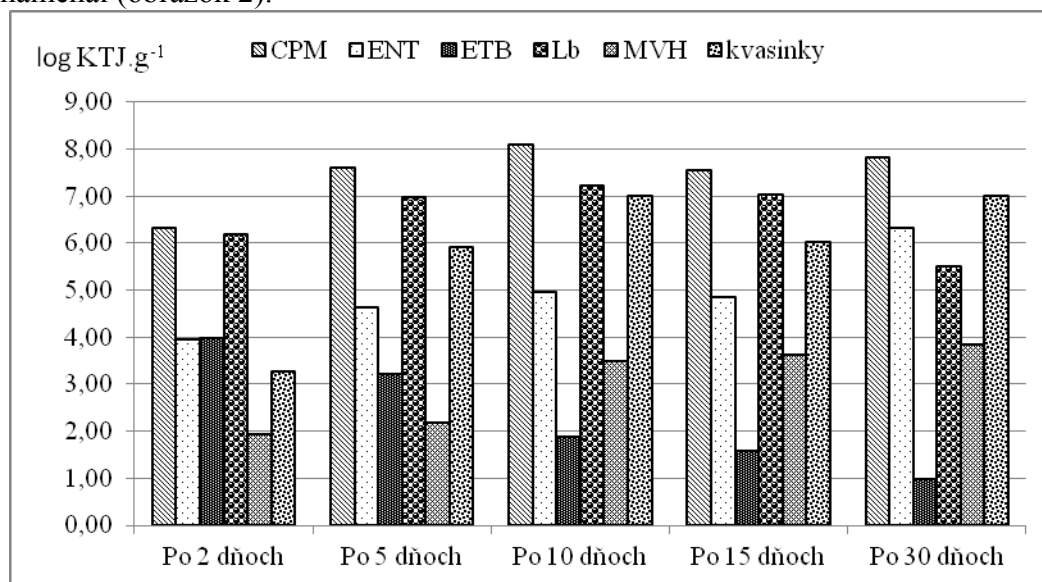
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na začiatku výroby sa uskutočnil mikrobiologický rozbor korenín (CPM, ETB) a samotného mäsového diela po pridaní korenín a soli. Z mäsa (bravčové boky) sa sterilným spôsobom zrezala koža a z druhej strany rebrá, čím sa zabezpečila surovina bez sekundárnej mikrobiologickej kontaminácie. Kontaminácia mäsového diela vyjadrená ako CPM bez prídavku štartovacej kultúry sa zistila na úrovni $4,68 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ a počet baktérií čeľade *Enterobacteriaceae* dosiahol $2,38 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Kontamináciu mäsového diela zrejme zapríčinil prídavok čierneho korenia, sladkej papriky a štiplavej papriky, v ktorých sa zistili CPM na úrovni 5,70; 5,62 resp. 6,07 $\log \text{KTJ.g}^{-1}$. Kontamináciu baktériami čeľade *Enterobacteriaceae* zapríčinilo použité čierne korenie, v ktorom sa počty tejto skupiny baktérií zistili na úrovni $2,38 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. V sladkej a štiplavej paprike sa nezistila prítomnosť baktérií čeľade *Enterobacteriaceae*. Počet baktérií rodu *Lactobacillus* sa

v mäsovom diele zistil na úrovni 3,36 log KTJ.g⁻¹, enterokokov 1,48 log KTJ.g⁻¹, mikroskopických vláknitých húb 1,04 log KTJ.g⁻¹ a kvasiniek 2,92 log KTJ.g⁻¹. **Silins a Liepins (2011)** uvádzajú, že mikrobiologická bezpečnosť fermentovaných mäsových výrobkov údených studeným dymom s ale aj bez použitia štartovacích kultúr závisí na počiatkovej úrovni kontaminácie mäsového diela.

V priebehu skladovania výrobkov sa v kontrolnej skupine CPM, počet enterokokov, mikroskopických vláknitých húb a kvasiniek postupne zvyšoval až do konca doby skladovania. V porovnaní s výsledkami uvádzanými **González a Díez (2002)** sa CPM teda množstvo autochtónnej spontánnej mikroflóry v našich vzorkách po 30 dňoch skladovania zistil vyšší, približne o 1 log poriadok. Počet laktobacilov sa do 15 dňa zrenia mierne zvyšoval a na konci skladovania (po 30 dňoch) sa ich počet znížil približne o 1,5 log poriadok. V porovnaní s ostatnými skupinami baktérií sa počet baktérií čeľade *Enterobacteriaceae* vo vzorkách fermentovaných mäsových výrobkov bez použitia štartovacej kultúry postupne znižoval počas celej doby zrenia ako aj skladovania na úroveň 1 log KTJ.g⁻¹ (obrázok 1). **Benito et al. (2007)** uvádzajú, že tradičný španielsky fermentovaný mäsový výrobok (Iberian) vyrábaný z bravčového mäsa bez použitia štartovacích kultúr môže obsahovať patogénne mikroorganizmy ako *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium perfringens*. Zástupcovia čeľade *Enterobacteriaceae* sa bežne vyskytujú v surovom bravčovom mäse, a preto ich možno zistiť aj vo fermentovaných mäsových výrobkoch. Ich počet vo výrobkoch pred zrením závisí od počiatkovej kontaminácie, ale riziko z ich výskytu v konečných fermentovaných mäsových výrobkoch sa považuje za nízke z dôvodu vytvorenia nepriaznivých podmienok pre ich rast v týchto výrobkoch počas ich zrenia (**Casquete et al., 2012**).

Vo vzorkách výrobkov s použitím štartovacej kultúry sa počet enterokokov už po dvoch dňoch výroby nezistil. Počet baktérií čeľade *Enterobacteriaceae* a mikroskopických vláknitých húb sa postupne znižoval a po 10 resp. 15 dňoch zrenia sa ich výskyt už nezaznamenal (obrázok 2).

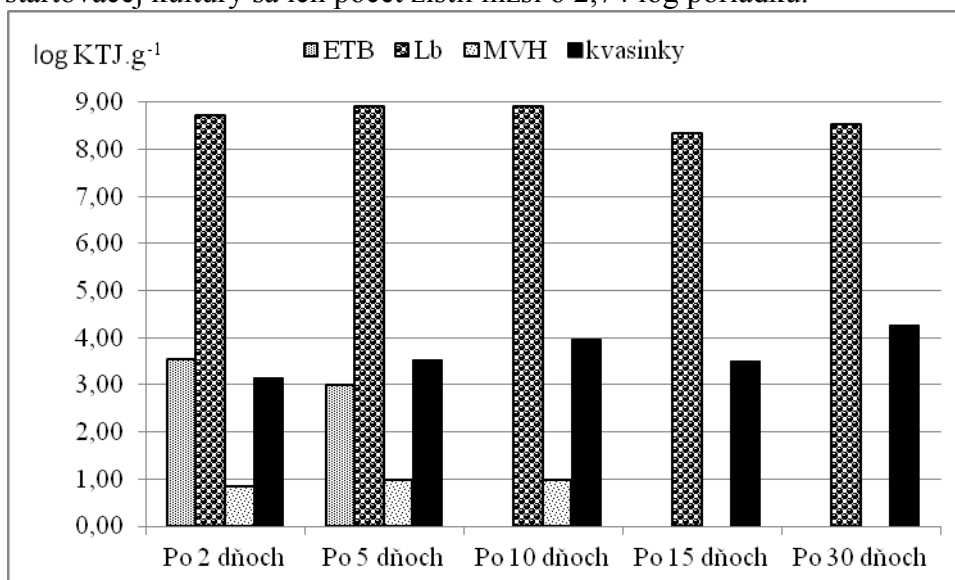


Obrázok 1 Zastúpenie jednotlivých skupín mikroorganizmov v TTNMV bez použitia štartovacej kultúry v priebehu zrenia

González a Díez (2002) zistili zníženie počtu baktérií čeľade *Enterobacteriaceae* s použitím štartovacej kultúry vo fermentovaných mäsových výrobkoch už po 24 hodinách. Zníženie počtu zástupcov tejto čeľade vo fermentovaných mäsových výrobkoch sa pripisuje k ich zvýšenej citlivosti na kyslé prostredie s nízkou hodnotou a_w **Kaban a Kaya (2009)**.

Dominantnou mikroflórou sa vo vzorkách stali laktobacily a ich počet sa po 30 dňoch (15 dní zrenia a 15 dní skladovania) v porovnaní so zistením **Kameníka et al. (2012)** zistil vyšší približne o 1 log poriadok. **Kaban a Kaya (2009)** v tradičných fermentovaných výrobkoch s použitím hovädzieho mäsa a s prídavkom štartovacej kultúry obsahujúcej kmene *Lactobacillus plantarum* GM77 a *Staphylococcus xylosus* GM92 zistili po 14 dňoch zrenia počet baktérií mliečneho kysnutia na úrovni 7,61 log KTJ.g⁻¹ a zástupcov rodu *Staphylococcus* a *Micrococcus* na úrovni 6,61 log KTJ.g⁻¹.

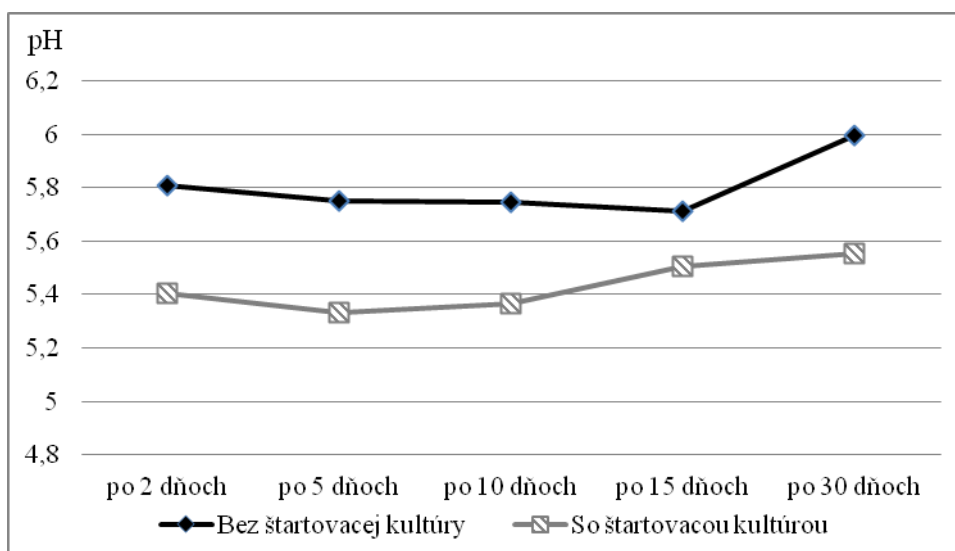
Taktiež sa zistilo, že kvasinky v nami vyrobených fermentovaných mäsových výrobkoch prežívajú pôsobenie podmienok vytvorených štartovacou kultúrou a ich množstvo sa počas zrenia ako aj skladovania zvýšilo o 1 log poriadok (obrázok 2). Avšak v porovnaní s výrobkami, do ktorých sa nepridala štartovacia kultúra sa ich počet počas zrenia a skladovania zvyšoval veľmi pomaly a na konci skladovania v porovnaní so vzorkami bez prídavku štartovacej kultúry sa ich počet zistil nižší o 2,74 log poriadku.



Obrázok 2 Zastúpenie jednotlivých skupín mikroorganizmov v TTNMV s použitím štartovacej kultúry v priebehu zrenia

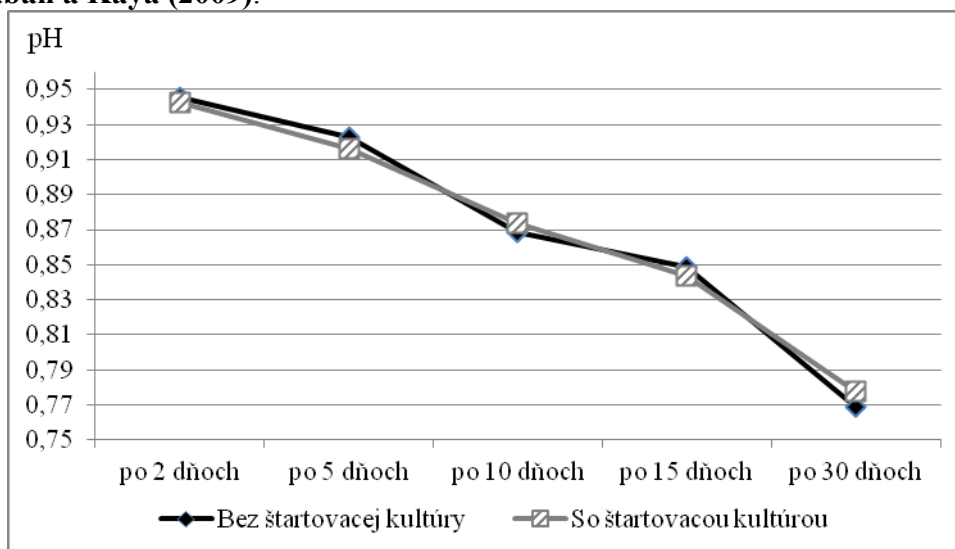
Na množstvo a zastúpenie mikroorganizmov vplyvali samotné podmienky prostredia vo fermentovaných mäsových výrobkoch ako je aktivita vody a pH (obrázok 3 a 4). Fermentované mäsové výrobky s použitím štartovacej kultúry sa vyznačovali nižšou hodnotou pH, čo spôsobili mikroorganizmy pochádzajúce zo štartovacej kultúry. Vyššia kyslosť týchto výrobkov ihneď na začiatku zrenia mala pravdepodobne za následok nižší počet kaziacich a patogénnych mikroorganizmov ako aj mikroskopických vláknitých húb. **Ammor a Mayo, 2007** uvádzajú, že ochranný účinok vo fermentovaných mäsových výrobkoch s použitím štartovacích kultúr obsahujúcich predovšetkým zástupcov rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus* a druhu *Staphylococcus xylosus* je spôsobený antimikrobiálnymi vlastnosťami ich metabolitov, medzi ktoré patria predovšetkým organické kyseliny (najmä kyselina mliečna), peroxid vodíka a bakteriocíny. Podobne **Kameník et al. (2012)** zistili pokles hodnoty pH vo fermentovanom mäsovom výrobku s prídavkom štartovacej kultúry (Poličan) z 5,93 na 5,04 po 30 dňoch skladovania.

Fermentované mäsové výrobky bez pridania štartovacej kultúry sa v porovnaní s tými v ktorých sa štartovacia kultúra nachádzala síce vyznačovali mierne nižšou hodnotou a_w počas celej doby zrenia a skladovania, avšak tieto štatisticky nepreukazne suchšie podmienky nezabezpečili dostatočné zníženie počtu kaziacich a patogénnych mikroorganizmov ako aj kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb.



Obrázok 3 Priebeh hodnôt pH počas doby skladovania fermentovaného mäsového výrobku

Silins a Liepinsa (2011) zistili, že priemerná hodnota pH vo fermentovaných výrobkoch s prídavkom štartovacej kultúry údených studeným dymom sa znížila z 5,8 na 4,65 už počas prvých 5 dní, zatiaľ čo vodná aktivita (a_w) sa v týchto výrobkoch znižovala veľmi pomaly (z 0,963 na 0,817). Prudké zníženie hodnoty pH zrejme súvisí s prídavkom cukru, ktorý títo autori pridali do mäsového diela. Nižšie hodnoty pH (5,5) ako aj a_w (0,833) po 15 dňoch skladovania fermentovaného mäsového výrobku v porovnaní s našimi výsledkami zistili **Kaban a Kaya (2009)**.



Obrázok 4 Zmeny hodnôt a_w počas doby skladovania fermentovaného mäsového výrobku

Z výsledkov vyplýva, že mikrobiálna kontaminácia na začiatku výroby fermentovaných mäsových výrobkov ovplyvní mikrobiologickú kvalitu fermentovaných mäsových výrobkov bez prídavku, ale aj s prídavkom štartovacej kultúry. Avšak počas 15 dňového zrenia sa počet nežiaducich mikroorganizmov ako aj mikroskopických vláknitých húb s použitím štartovacej kultúry eliminuje a zníži sa aj počet kvasiniek. Z uvedeného vyplýva možnosť používať testovanú štartovaciu kultúru aj pri výrobe domácich tepelne neopracovaných mäsových výrobkov (domáce klobásky) s použitím len klasickej kuchynskej soli bez prídavku dusitanov. Zabezpečí sa nie len vysoká bezpečnosť týchto výrobkov počas

dlhej doby skladovania, ale účinkom baktérií štartovacej kultúry aj vysoká technologická kvalita týchto výrobkov.

LITERATÚRA

- Ammor, M. S., Mayo, B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. In *Meat Science*, vol. 76, 2007, p. 138-146.
- Benito, M. J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M. G. 2007. Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. In *Journal of Food Science*, vol. 72, 2007, p. 193-201.
- Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Aranda, E., Córdoba, M. G. 2012. Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. In *Food Control*, vol. 24, 2012, p. 191-198.
- González, B., Díez, V. 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of “chorizo” a Spanish dry cured sausage. In *Meat Science*, vol. 60, 2002, p. 295-298.
- Kameník, J., Saláková, A., Bořilová, G., Pavlík, Z., Standarová, E., Steinhauser, L. 2012. Effect of Storage Temperature on the Quality of Dry Fermented Sausage Poličan. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 30, 2012, p. 293-301.
- Kaban, G., Kaya, M. 2009. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on the Quality Characteristics of Dry Fermented Sausage “Sucuk”. In *Journal of Food Science*, vol. 74, 2009, p. 58-63.
- Nápravníková, E. 2005. Technologie fermentovaných masných výrobkov: pohľad mikrobiologa. In *7. Seminár o údržnosti masa, masných výrobkov a lahudek*. 2005, s. 27-30.
- Silins, I., Liepins, E. 2011. Microbiological quality and physiochemical parameters of cold-smoked sausages during ripening. In *6th Baltic Conference on Food Science and Technology: Innovations for Food Science and Production, FOODBALT-2011 - Conference Proceedings*, p. 182-186, ISBN: 978-998448045-9.
- Toldrá, F. 2002. Fermentation and starter cultures. In *Dry-cured meat products*. Trumbull : Food & Nutrition Press Inc., 2002, s. 89-112, ISBN 978-0-47038-511-1.
- Výnosu č. 1895/2004-100, 2005. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 18. augusta 2005 č. 1895/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mäsové výrobky, s. 29.

PodĎakovanie: Práca bola podporená grantom VEGA 1/0897/11. Za spoluprácu ďakujeme Katedre hygieny a bezpečnosti potravín a Katedre mikrobiológie Fakulty biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre.

Kontaktná adresa: Ing. Miroslav Kročko, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, katedra hodnotenia a spracovanie živočíšnych produktov, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika. e-mail: mirokrocko@yahoo.com.