

CZYSTOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA MIĘSA I SZYNKI PARZONEJ PO OBRÓBCE ULTRADŹWIĘKOWEJ

Zbigniew J. Dolatowski, Dariusz M. Stasiak

Streszczenie: Badania dotyczyły czystości mikrobiologicznej produktów przygotowanych z mięsa po obróbce ultradźwiękowej prowadzonej w polu o średnim natężeniu i niskiej częstotliwości. Badania przeprowadzono w warunkach zakładu przemysłowego. Ocenie mikrobiologicznej poddawano obrabiany ultradźwiękami surowiec przed i po peklowaniu (po masowaniu). Analiza wyników przeprowadzonych badań wykazała istotny wpływ obróbki ultradźwiękowej na czystość mikrobiologiczną mięsa. Wszystkie grupy badanych drobnoustrojów (bakterie: tlenowe, kwasu mlekowego) wykazały istotną wrażliwość na oddziaływanie pola ultradźwiękowego. Nie stwierdzono istotnego wpływu obróbki ultradźwiękowej surowca na rozwój mikroflory w mięsie i gotowym wyrobie podczas chłodniczego przechowywania. Podstaw inaktywacji mikroorganizmów w polu ultradźwiękowym należy doszukiwać się w szerokiej sferze zjawisk mechanicznych podczas rozchodzenia się fal w ośrodku.

Słowa kluczowe: ultradźwięki, czystość mikrobiologiczna, mięso, peklowanie

WSTĘP

Zainteresowanie ultradźwiękami wynika z różnorodności zjawisk i efektów przez nie wywoływanych. Z tego względu, zależnie od parametrów źródła fal oraz ośrodka propagacji, stosowane są w medycynie do celów diagnostycznych i leczniczych, a w przemyśle wykorzystuje się je do monitorowania procesów, modyfikowania właściwości biologicznych, chemicznych i fizycznych różnych ośrodków. Chemiczne związki wielkocząsteczkowe w polu ultradźwiękowym mogą ulegać przyspieszonej degradacji i depolimeryzacji. Ultradźwięki mogą katalizować lub wręcz wywoływać reakcje, w których wyniku powstają nowe, złożone związki chemiczne. Przebieg zjawisk zależy od wielu czynników, na które mają wpływ parametry pola ultradźwiękowego oraz początkowe cechy fizykochemiczne ciał. Zatem na całokształt zjawisk i efektów wynikających z oddziaływania fal ultradźwiękowych wpływać będą: częstotliwość fal ultradźwiękowych, natężenie, struktura fizyczna środowiska i jego skład

chemiczny, a w szczególności sprawność sprzężenia akustycznego [Elpiner 1968, Rogow i Gorbatow 1974, Śliwiński 1993, Nyborg 2000].

Przyczyn ultradźwiękowej inaktywacji drobnoustrojów dopatruje się w szeregu złożonych procesów fizykochemicznych, u których podstaw leżą szybkozmienne naprężenia mechaniczne, dyssypacja energii, kawitacja wraz z całą gamą zjawisk pochodnych, a w szczególnych przypadkach tzw. rezonans komórkowy. Badania laboratoryjne wykazują destrukcyjny wpływ ultradźwięków na kolonie drobnoustrojów uwidaczniający się w postaci uszkodzeń elementów komórek biologicznych i struktur tkankowych. Badania przeprowadzone na wodnych zawiesinach *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i innych wykazały, że stopień inaktywacji drobnoustrojów, związany z czynnym działaniem ultradźwięków, zależy od ekspozycji, czyli od czasu działania i natężenia. Stwierdzono także, że w określonych warunkach środowiskowych możliwe jest osiągnięcie całkowitej inaktywacji drobnoustrojów chorobotwórczych. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na mikroflorze kwasu mlekowego przypuszcza się, że wrażliwość mikroorganizmów na oddziaływanie ultradźwięków zależy także od wielkości komórek, a szczególnie hydrofobowości błon zewnętrznych [Dahi 1976, Povey i McClements 1988, Hoover i in. 1989, Sala i in. 1995, Cicolini i in. 1997, Bohm i in. 2000, Hua i Thompson 2000].

Celem badań była ocena poziomu zanieczyszczenia mikroflorą mięsa do produkcji szynek, masowanego z użyciem urządzenia ultradźwiękowego, oraz określenie zmiany liczby drobnoustrojów w szynce wędzonej i parzonej podczas jej przechowywania.

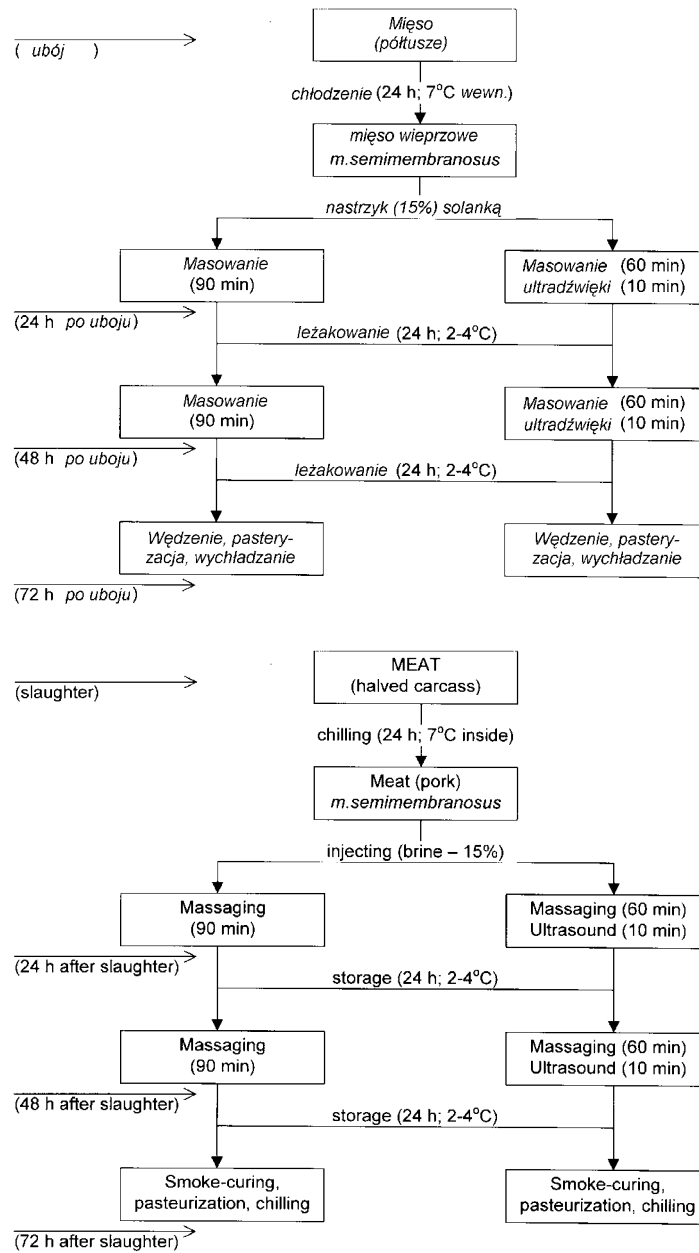
MATERIAŁ BADAWCZY

Badania prowadzono w warunkach przemysłowych na mięsie wieprzowym i wołowym (*m. semmimembranosus*).

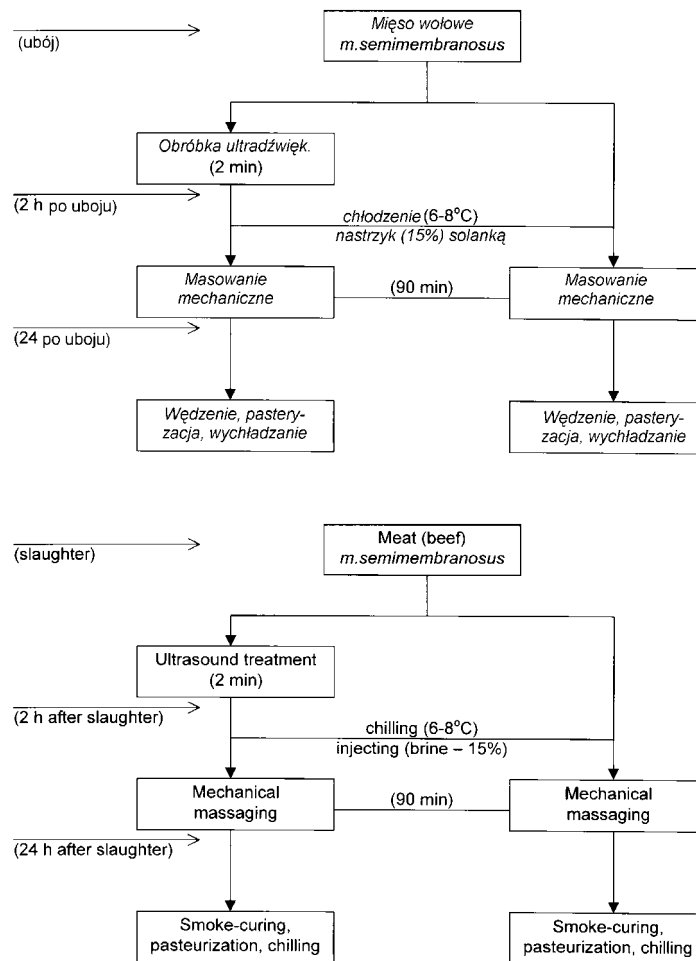
Mięso wieprzowe (porcje szynki o masie ok. 1-1,5 kg) peklowano metodą nastrzykową, po czym poddawano je masowaniu zgodnie ze schematem badań (rys. 1, 2). Dalsze przygotowanie surowca odbywało się przy użyciu modelowego urządzenia do wspomaganego ultradźwiękowo (25 kHz, ok. 2 W·cm⁻²) masowania mięsa (rys. 3, 4).

Mięso wołowe (porcje szynki o masie ok. 1-1,5 kg) obrabiano ultradźwiękowo przez 2 min. Następnie mięso peklowano metodą nastrzykową i poddawano wyłącznie mechanicznemu masowaniu przez łączny czas 1,5 h.

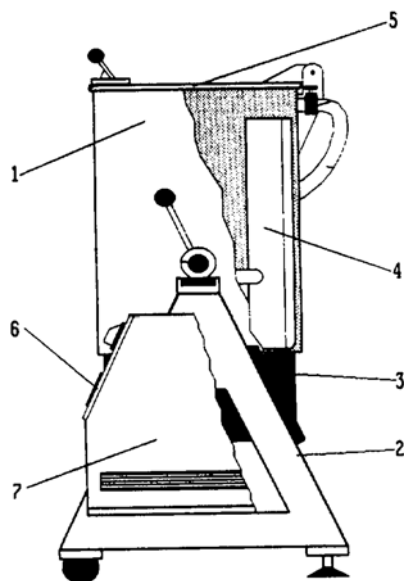
Przygotowane porcje mięsa, o masie 1-1,5 kg każda, pakowano w osłonki, wędzono i parzono do uzyskania temperatury 70°C wewnątrz bloku.



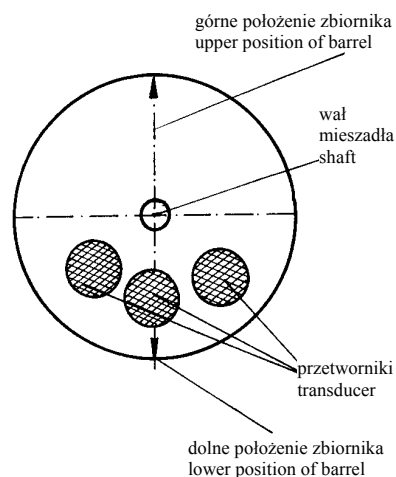
Rys. 1. Schemat obróbki mięsa wieprzowego (produkcja szynki)
 Fig. 1. Scheme of pork processing (ham production)



Rys. 2. Schemat obróbki mięsa wołowego (produkcja szynki)
 Fig. 2. Scheme of beef processing (ham production)



Rys. 3. Schemat masownicy: 1 – bęben, 2 – podstawa, 3 – napęd, 4 – łopata mieszadła, 5 – pokrywa, 6 – pulpity sterowniczy, 7 – pompa próżniowa
 Fig. 3. Scheme of massage device: 1 – barrel, 2 – basis, 3 – drive, 4 – stirrer blade, 5 – cover, 6 – control desk, 7 – vacuum pump



Rys. 4. Lokalizacja przetworników ultradźwiękowych w masownicy
 Fig. 4. Placement of ultrasound transducers in the massaging machine

METODY BADAWCZE

Wpływ ultradźwięków na zanieczyszczenie mikroflorą oceniano, porównując czystość mikrobiologiczną mięsa surowego i mięsa masowanego wyłącznie mechanicznie z mięsem masowanym metodą kombinowaną, tj. mechanicznie z udziałem ultradźwięków (rys. 1-4) [Stasiak 1996, Dolatowski 1999].

Próbki o masie 20 g pochodzące z warstw powierzchniowych mięśni homogenizowano przez 5 min ze 180 cm³ jałowego płynu do rozcieńczeń. Z tak otrzymanego homogenatu przygotowywano kolejne rozcieńczenia do badań. Oznaczenia ilościowe mikroflory przeprowadzono metodą płytkową Kocha, stosując równoległy posiew na dwie płytki. Mikroflorę tlenową oznaczano na podłożu agarowym, bakterie zakwaszające oznaczano na podłożu Kliplera. Doświadczenie przeprowadzono w pięciu powtórzeniach po dwie próby [Burbianka i in. 1993, PN-73/A-82054].

Wyniki badań poddano weryfikacji statystycznej, testując hipotezę braku różnic średnich liczebności drobnoustrojów w próbkach pochodzących z surowca przygotowywanego metodą tradycyjną (próba kontrolna) oraz przy użyciu ultradźwięków ($H_0: \mu = 0; \alpha = 0,05$).

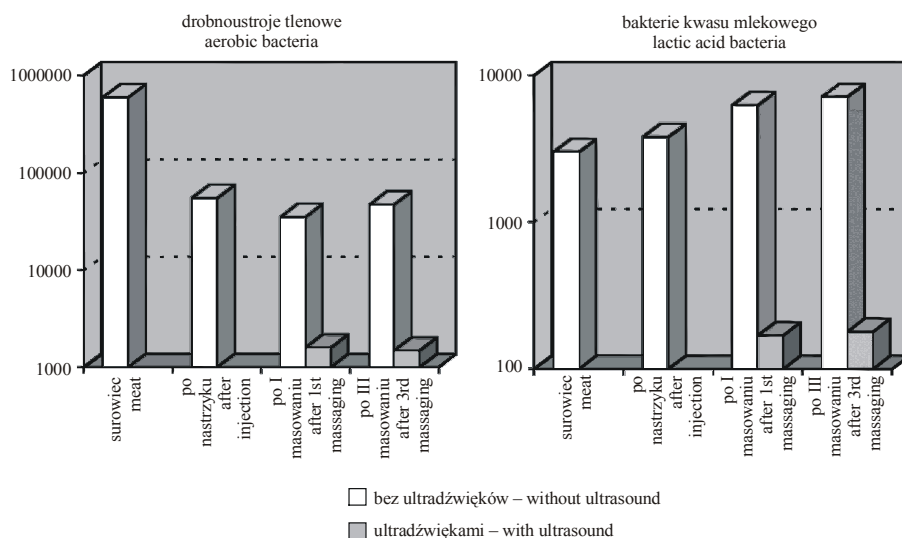
WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań mikrobiologicznych wykazały, że obróbka ultradźwiękowa mięsa wpływa istotnie statystycznie na poziom mikroflory (rys. 5, 6). Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych stwierdzonych w mięsie wieprzowym przed peklowaniem wynosiła około $6 \cdot 10^5$, a bezpośrednio po nastrzyku uległa obniżeniu do około $5 \cdot 10^4$. Masowanie bez udziału ultradźwięków nie wywołało istotnych zmian w czystości mikrobiologicznej mięsa. Zastosowanie ultradźwięków podczas masowania spowodowało istotne statystycznie obniżenie liczby drobnoustrojów tlenowych do około $1,5 \cdot 10^3$. Taki stan czystości mikrobiologicznej mięsa utrzymywał się aż do zakończenia cyklu masowania (tab. 1).

Tabela 1. Liczba drobnoustrojów tlenowych (w 1 g) w czasie chłodniczego przechowywania wyrobów plastrowanych (szynka wieprzowa)

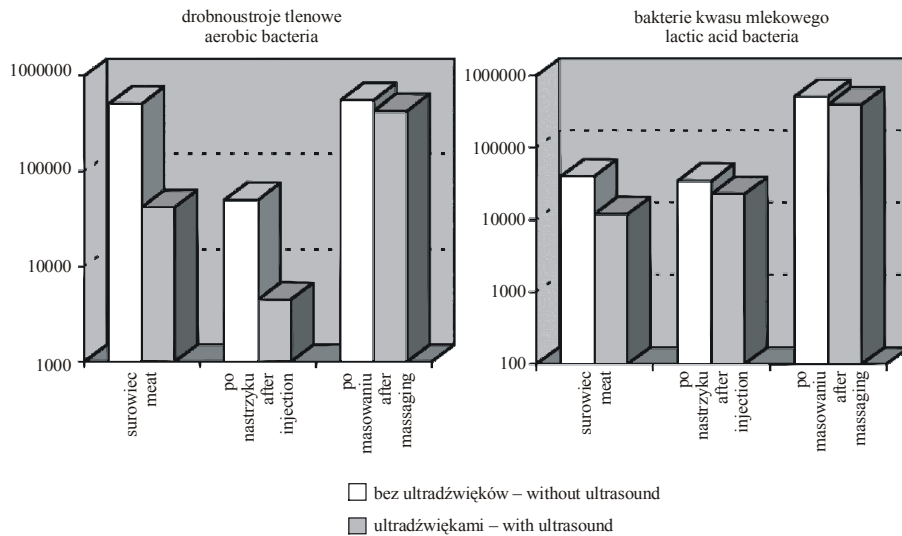
Table 1. Number of aerobic bacteria (in 1 g) after storage of sliced cooked ham

Czas przechowywania (doba) Days of storage	Liczba drobnoustrojów tlenowych po masowaniu Number of aerobic bacteria after	
	mechanicznym massaging	ultradźwiękami ultrasonic massaging
0	$2,5 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^2$
3	$3,0 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^3$
6	$5,0 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$
10	$5,5 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^4$
20	$8,0 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^7$



Rys. 5. Liczba drobnoustrojów tlenowych i bakterii kwasu mlekowego w czasie peklowania i masowania mięsa wieprzowego

Fig. 5. Number of aerobic bacteria and lactic acid bacteria during pickling and massaging of pork



Rys. 6. Liczby drobnoustrojów tlenowych i bakterii kwasu mlekowego w czasie peklowania i masowania mięsa wołowego

Fig. 6. Number of aerobic bacteria and lactic acid bacteria during pickling and massaging of beef

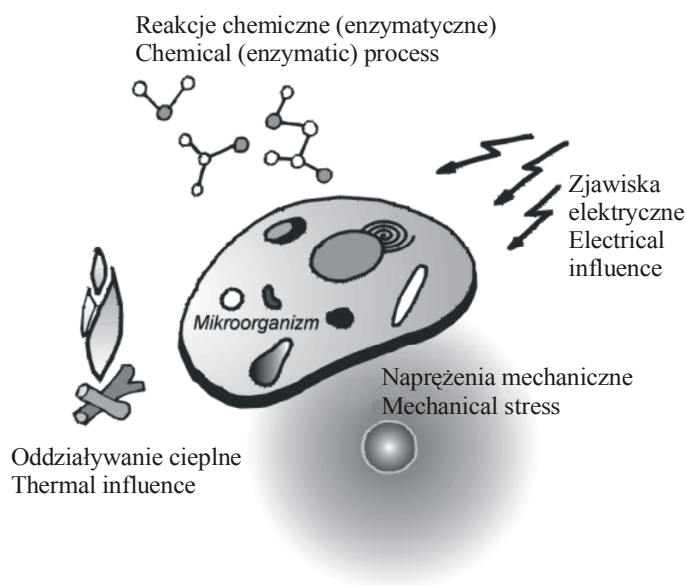
Stwierdzona liczba bakterii kwasu mlekowego w mięsie wieprzowym wynosząca około $3 \cdot 10^3$, wzrosła podczas peklowania i masowania do około $7 \cdot 10^3$ po trzecim masowaniu bez udziału ultradźwięków. Masowanie w polu ultradźwiękowym istotnie obniżyło liczebność bakterii kwasu mlekowego do około $1,7 \cdot 10^2$ po pierwszym masowaniu i około $1,8 \cdot 10^3$ po trzecim masowaniu (rys. 5, 6).

Obróbka ultradźwiękami mięsa wołowego przed peklowaniem spowodowała istotne obniżenie liczby drobnoustrojów tlenowych z około $5 \cdot 10^5$ do około $4 \cdot 10^4$. Po nastrzyku solanką liczba drobnoustrojów tlenowych wynosiła około $5 \cdot 10^4$ w mięsie nie obrabianym ultradźwiękami i około $4,5 \cdot 10^3$ w próbce po obróbce ultradźwiękowej. Liczby drobnoustrojów tlenowych w obu próbkach po zakończeniu cyklu masowania nie różniły się istotnie (ok. $5 \cdot 10^5$).

Stwierdzono, że bakterie kwasu mlekowego w mięsie wołowym wykazywały wrażliwość na obróbkę ultradźwiękową. Jednak różnice spowodowane tą obróbką, w trakcie dalszego postępowania technologicznego (peklowanie i masowanie), uległy zatarciu i stały się nieistotne statystycznie, osiągając w efekcie poziom zbliżony do obserwowanego w przypadku liczby bakterii tlenowych.

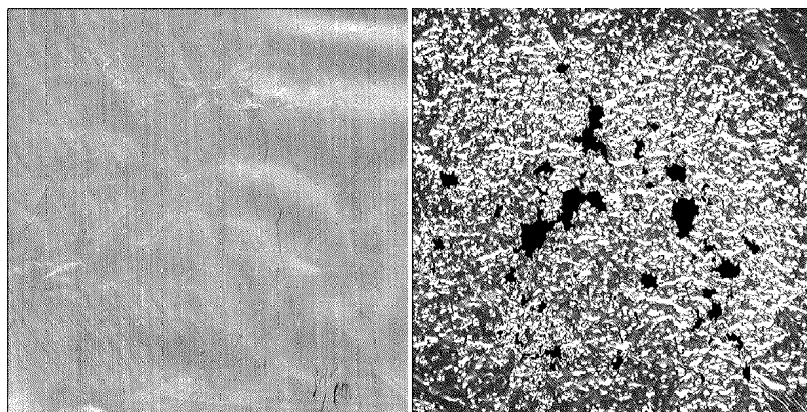
DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ

Otrzymane różnice pomiędzy wynikami czystości mikrobiologicznej próbek mięsa przygotowywanych metodą tradycyjną i próbek przygotowywanych przy użyciu ultradźwięków skłaniają do zadania pytania o przyczyny inaktywacji mikroflory (rys. 7). Ocena sensoryczna powierzchni surowca poddanego obróbce ultradźwiękowej wykazała występowanie szeregu zmian polegających na mechanicznych uszkodzeniach ciągłości



Rys. 7. Czynniki dekontaminacji mięsa w polu ultradźwiękowym
 Fig. 7. The factors of ultrasonic decontamination (scheme)

struktury tkanek. Obserwacje te znajdują potwierdzenie w wynikach badań instrumentalnych [Stasiak 1996, Dolatowski 1999]. Można zatem przypuszczać, że prawdopodobną przyczyną obserwowanego obniżenia liczby drobnoustrojów na powierzchni mięsa po obróbce ultradźwiękowej jest kawitacja wraz z całą gamą zjawisk pochodnych. Występowanie tego nieliniowego zjawiska stwierdzono za pomocą testu, wykorzystując folię aluminiową jako detektor (rys. 8). W następstwie kawitacji występuje charakterystyczna deformacja powierzchni folii, a w skrajnych przypadkach jej perforacja i fragmentaryzacja. Można przypuszczać, że powierzchniowe warstwy mięsa (po nastrzyku), o złożonej strukturze i znacznym uwodnieniu, stanowią środowisko sprzyjające wystąpieniu kawitacji ultradźwiękowej. Analiza mechanizmu powstawania i zapadania się pęcherzyków kawitacyjnych daje podstawy do przypuszczeń, że inaktywacja wiąże się głównie z końcową fazą życia pęcherzyka. Wskutek powstawania szybkozmiennych dużych gradientów naprężeń uszkodzeniu mogą ulegać elementy struktury komórek drobnoustrojów, a zwłaszcza błony komórkowe w bezpośrednim sąsiedztwie pęcherzyka. Zatem inaktywacja mikroflory w czasie masowania ultradźwiękowego może być skutkiem mechanicznej destrukcji komórek mikroorganizmów. Potwierdzeniem mogą być destrukcja i fragmentaryzacja błon komórkowych obserwowane pod mikroskopem przez Rogow i Gorbatow [1974] oraz Elpiner [1968], a w następstwie inaktywacja form wegetatywnych lub pozbawienie ich możliwości rozwoju w okresie inkubacji. Mikroorganizmy nie wykazujące widocznych zmian w budowie rozwijały się normalnie bądź wykazywały ograniczoną zdolność do namnażania w okresie inkubacji.



Rys. 8. Wygląd folii aluminiowej przed oraz po 20 s ekspozycji w polu ultradźwiękowym
Fig. 8. Plate of aluminium foil before and after exposure (20 s) in ultrasound field

Poziom uszkodzenia komórek oraz inaktywacji mikroflory jest uzależniony m.in. od takich czynników, jak parametry źródła ultradźwięków i powstającego pola (np. częstotliwość, natężenie, charakterystyka akustyczna ośrodka, podatność drobnoustrojów na określone czynniki zewnętrzne) oraz czas oddziaływania. Wykazali to w swoich badaniach Scherba i in. [1990], którzy stwierdzili, że inaktywacja mikroflory *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* w zawieszynie wodnej zależy od czasu działania ultradźwięków oraz ich natężenia. Wykazali także, iż możliwa jest całkowita inaktywacja drobnoustrojów ultradźwiękami w dostatecznie uwodnionym środowisku. Wynika z tego, że wrażliwość drobnoustrojów może zależeć także od hydrofobowości błon wewnętrznych komórek.

Mechanizmy inaktywacji drobnoustrojów mogą wiązać się także z dyssypacją energii i przemianami jej towarzyszącymi, które prowadzą m.in. do miejscowego wzrostu temperatury oraz generowania ładunków elektrycznych o wysokich potencjałach. Wyniki badań własnych wykazują, że ogólny wzrost temperatury wewnętrznej mięsa umieszczonego w polu ultradźwiękowym (o małym lub średnim natężeniu generowanym przez źródła niskiej częstotliwości), nawet w stacjonarnych warunkach jest nieistotny i przy zastosowanych parametrach masowania ultradźwiękami wynosi 2-3°C, co nie odbiega znacząco od wzrostu temperatury mięsa podczas wydłużonego czasu masowania mechanicznego. Istotny wzrost temperatury wywoływany długotrwałą ekspozycją obserwuje się w warstwach powierzchniowych tkanek, zwłaszcza w pobliżu źródła drgań. Można przypuszczać, że w obszarach tych powstają szczególnie intensywne zjawiska nieliniowe związane z dyssypacją energii. Jednak pełne, jakościowe i ilościowe ujęcie zjawisk obserwowanych w polu akustycznym w ośrodkach o złożonej budowie wewnętrznej nie doczekało się jeszcze opracowania naukowego.

Inaktywacja komórek bakteryjnych może zachodzić również wskutek tzw. rezonansu komórkowego powodowanego falami ultradźwiękowymi. Zjawisko to może oddziaływać na właściwości biomolekuł drobnoustrojów i tym samym wpływać na ich rozwój. Badania w zakresie obróbki surowców spożywczych wysokimi ciśnieniami wykazały blokowanie aktywności enzymów powodowane zacieśnieniem ich konfiguracji, szczególnie współpracujących z RNA, co przejawia się zahamowaniem ich rozwoju. *Bacillus*

subtilis i *Pseudomonas fluorescens* przestają się rozwijać pod działaniem ciśnienia około 30 MPa przez czas kilkunastu minut. Ciśnienia towarzyszące zapadaniu się pęcherzyków kawitacyjnych są wielokrotnie wyższe. Mają one impulsowy charakter o ograniczonym, miejscowym zasięgu, jednak można przypuszczać, że kawitacja wywołuje m.in. efekty podobne do paskalizacji. Zatem na całokształt inaktywującego działania kawitacji wpływać będzie liczba ośrodków, w których powstaną sprzyjające warunki dla jej powstania. Nieciągła struktura tkanek, peklowanie i masowanie mięsa wiążące się ze stosowaniem dodatków podczas nastrzyku surowca solanką sprzyjają występowaniu zjawisk nieliniowych w polu akustycznym szczególnie na uwodnionej powierzchni próbek. Tym samym wzrasta skuteczność czynnego oddziaływania fal ultradźwiękowych.

Wyniki badań mikrobiologicznych wyrobów gotowych (tab. 1) nie wykazują istotnego obniżenia liczby drobnoustrojów tworzących kolonie w następstwie obróbki ultradźwiękowej surowca. Można przypuszczać, że redukcja liczby drobnoustrojów zachodzi w efekcie towarzyszących rozchodzeniu się fal ultradźwiękowych zjawisk nieliniowych i ich czynnego oddziaływania na środowisko oraz że nie ma trwałego charakteru. Obserwowany wzrost czystości mikrobiologicznej surowca podczas masowania prowadzonego z wykorzystaniem ultradźwięków wynika głównie ze zjawisk o charakterze fizycznym zachodzących w mikroskali i związanych z występowaniem m.in. szybkozmiennych naprężeń mechanicznych. Badania [Dolatowski 1999] nie dają podstaw do wnioskowania o powstawaniu nowych związków chemicznych o inaktywującym charakterze.

PODSUMOWANIE

Reasumując można stwierdzić, że przeprowadzone dotychczas badania wskazują na możliwość praktycznego wykorzystania ultradźwięków w przetwórstwie mięsa w celu podniesienia poziomu czystości mikrobiologicznej przetwarzanego surowca. Jednak wiele aspektów związanych z utylitarnym wykorzystaniem ultradźwięków pozostaje niewyjaśnione; wiele problemów wciąż oczekuje na rozwiązanie. Zatem niezbędne jest prowadzenie pogłębionych badań, aby uzyskać pełniejszy obraz zagadnienia czystości mikrobiologicznej surowca w procesie technologicznym w kontekście obróbki ultradźwiękami.

PIŚMIENNICTWO

- Bohm H., Anthony P., Davey M.R., Briarty L.G., Power J.B., Lowe K.C., Benes E., Gröschl M., 2000. Viability of plant cell suspensions exposed to homogenous ultrasonic fields of different energy density and wave type. *Ultrasonics*, 38, 629-632.
- Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H., 1993. *Mikrobiologia żywności*. PZWL Warszawa.
- Ciccolini L., Taillandier P., Wilhem A.M., Delmas H., Strechainano P., 1997. Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and of ultrasonic power. *Chem. Eng. J.*, 65, 145-149.
- Dahi E., 1976. Physicochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. *Wat. Res.*, 10, 677-684.

- Dolatowski Z. J., 1999. Wpływ obróbki ultradźwiękami o niskiej częstotliwości na strukturę i cechy jakościowe mięsa. Rozpr. nauk. 221 AR Lublin.
- Dolatowski Z.J., Stasiak D.M., 1989. Model urządzenia do uplastyczniania mięsa z wykorzystaniem ultradźwięków. Sprawozd. z badań CPBR 10.10.3302. AR Lublin.
- Elpiner J.E., 1968. Ultradźwięki. Działanie fizykochemiczne i biologiczne. PWN Warszawa.
- Hoover D., Matrick C., Papineau A.M., Farkas D., Knorr D., 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. Food Technol. 43, 99-107.
- Hua I., Thompson J.E., 2000. Inactivation of *Escherichia coli* by sonication at discrete ultrasonic frequencies. Wat. Res., 34, (15), 3888-3893.
- Nyborg W.L., 2000. Biological effect of ultrasound: development and safety guidelines. Ultrasound Med. Biol. 26 (6), 911-964.
- PN-73/A-82054. Mięso i przetwory mięsne. Badania bakteriologiczne.
- Povey M.J.W., McClements D.J., 1988. Ultrasonics in food engineering. Part I. Introduction and experimental methods. J. Food Eng., 8, 217-245.
- Rogow I.A., Gorbatow A.W. 1974. Fizyczne metody obróbki puszczewych produktow, Puszcz. Prom. Moskwa.
- Sala F.J., Burgos J., Condon S., Lopez P., Raso, J., 1995. Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. W: G.W.Gould, New methods of food preservation. Unilever Research Laboratory, Bedford.
- Scherba G., Wrigel R.M., O'Brien jr W.D., 1990. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. App. Env. Microbiol. 57171, 2079-2084.
- Stasiak D.M., 1996. Badania nad wykorzystaniem ultradźwięków w urządzeniach do obróbki mięsa. Pr. doktorska. AR Lublin.
- Śliwiński A., 1993. Ultradźwięki i ich zastosowania. WNT Warszawa.

BACTERIAL CONTAMINATION OF MEAT AND MEAT PRODUCTS AFTER ULTRASOUND TREATMENT

Abstract: The research was carried out to verify the contamination of meat and meat products after ultrasonication. The ultrasound device working at 25 kHz was used. The raw meat treated (massaged) with ultrasound before and after brine injection was put to microbiological tests. The analyses of the results proved the significant influence of ultrasound processing on microbial contamination of meat. The aerobic bacteria and lactic acid bacteria showed significant sensitivity to ultrasound treatment. No essential effects of ultrasound processing of raw material on micro-flora growth in meat and cooked ham during cool storage were found. The mechanical influence during wave passing through the meat could explain the microbial contamination reducing in the ultrasound field.

Key words: ultrasound, microbial contamination, meat, brining

Z.J. Dolatowski, Zakład Przetwórstwa Surowców Pochodzenia Zwierzęcego, Akademia Rolnicza w Lublinie, ul. Doświadczalna 44, 20-236 Lublin