PROBIOTIC CULTURES IN DRY FERMENTED SAUSAGES AND THEIR INFLUENCE ON THE CONTENT OF BIOGENIC AMINES

PROBIOTICKÉ KULTURY VE FERMENTOVANÝCH SALÁMECH A JEJICH VLIV NA OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ

Hoferková P., Burdychová R., Bubeníčková A., Dohnal V.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: p.hoferkova@seznam.cz, burdycho@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of probiotic bacteria *L. casei* on the content biogenic amines in dry fermented sausages „Paprikáš“ taken from two different producers. Probiotic bacteria *L. casei* was combined with starter cultures (*Staphylococcus carnosus* and *Lactobacillus curvatus*). To monitor the biogenic amines tyramine, histamine, putrescine and cadaverine, HPLC method with UV detection was used. The content of biogenic amines was monitored during fermentation (0-28 days) and storage (28-49) of fermented sausages. In both producers, the numbers of *L. casei* reached 10^4 CFU/g during the fermentation (0-28) and they remained relatively constant during the storage (28-49). We also observed the total numbers of LAB, which reached 10^7-10^8 CFU/g during the first 14 days of the fermentation and then were about 10^6-10^7 CFU/g during the rest of the fermentation and storage. A positive influence on the reduction of biogenic amines was observed in both producers except for the producer No. 2, where a higher number of putrescine was found in comparison with the situation when no probiotic culture was added.

Key words: biogenic amines, HPLC, *L. casei*, fermented sausages

ÚVOD

Jedním z nejdůležitějších aspektů při výrobě fermentovaných salámů je typ použité startovací kultury. Ovlivňují hlavně kvalitu výrobku (chutnost, barva, textura, údržnost, obsah nitrátů), nezávadnost výrobků (minimalizace rizik spojených s výskytem patogenů) a výrobní postup (zkrácení doby zrání a standardizace doby zrání) (Nápravníková, 2005). Startovací kultury jsou směsi převážně bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) a kataláza-pozitivních koků (*Staphylococcus*, *Micrococcus*), namíchané dle požadovaných finálních vlastností výrobku (Lücke, 2000).

V posledních letech se intenzivně zkoumá možnost přidávání probiotických kultur do fermentovaných salámů. Je prokázáno, že při pravidelné konzumaci v dostatečném množství probiotika výrazně ovlivňují střevní mikroflóru hostitele a mají tak pozitivní vliv na jeho zdraví (Fuller, 1997). Probiotické bakterie, které se dnes používají v komerčních produktech, patří hlavně do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Heller, 2001).

K toxikologicky nejvýznamnějším biogenním aminům patří tyramin, histamin, kadaverin a putrescin. U masných výrobků s dlouhou dobou zrání může docházet k přeměně volných aminokyselin na toxické biogenní aminy, a to i činností mikrobiálních dekarboxyláz. Ve fermentovaných masných výrobcích mohou být mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou přítomny jako součást přirozené mikroflóry nebo startovací kultury (Shetty et al., 2006). Tvorbě biogenních aminů ve fermentovaných salámech lze zabránit použitím vybraných startovacích mikroorganismů, které netvoří biogenní aminy a zároveň jsou schopny potlačovat růst přirozené mikroflóry s dekarboxylázovou aktivitou (Suzzi a Gardini, 2003). Také při plánovaném použití probiotických kultur pro výrobu fermentovaných potravin je schopnost tvořit biogenní aminy nežádoucí (Burdychová a Dohnal, 2008).

MATERIÁL A METODIKA

Základní surovinu pro výrobu fermentovaného salámu „Paprikáš“ tvořilo 20% hovězího, 80% vepřového masa a sádla, 4 % kuchyňské soli, 6,6 % dextrosy, 2,4 % dusitanové solící směsi, 0,65 % E316, 8,8 % směsi koření (pepř černý mletý, hřebíček mletý, glutaman, česnek granulovaný, hořčičná mouka), 0,25 % startovací kultury FU2 (směs *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus carnosus*) a 0,25 % probiotické kultury *L. casei* (Sacco, Itálie). U kontrolních výrob (kontrola 1 a 2) nebyly použity probiotické mikroorganismy. Zamíchané dílo bylo naraženo do naturinových střev, které byly vloženy do forem a klimatizovány na 26–27 °C 5 hodin. V dalším kroku byly salámy vyjmuty z forem, omyty a zauzeny v udírně při 26–24 °C po dobu šesti dnů a poté dány do zrací komory k dosoušení při 11–13 °C (relativní vlhkost vzduchu 75 %) po dobu 4–5 týdnů.

Pro detekci biogenních aminů bylo naváženo 10 g každého vzorku do plastové zkumavky. Ke každému vzorku byl přidáno 500 µl roztoku vnitřního standardu 1,7-diaminoheptanu (1 mg/ml). Dále bylo přidáno 15 ml 5 % kyseliny trichloroctové a každý vzorek byl dvě minuty vortexován na vortexu Heidolph Diax 900 (Heidolph Instruments, Německo). Patrony se vzorkem byly po dobu 10 minut odstřeďovány při 3000 ot./min při 4 °C. Supernatant byl filtrován přes papírový filtr (Filtrak no. 390) do 50 ml odměrné baňky,

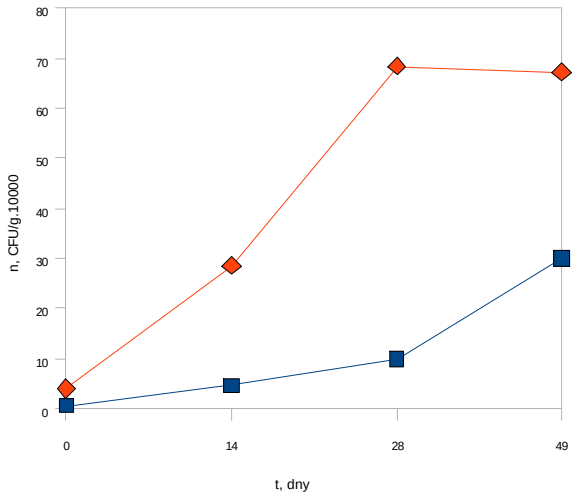
jejíž obsah byl doplněn 5 % kyselinou trichloroctovou. Celý postup se opakoval třikrát. 1 ml filtrátu byl odebrán do violky, smíchán s 0,5 ml saturované $NaHCO_3$ a derivatizován 1 ml acetonového dansylchloridu (5mg/ml)po dobu 1 hodiny při 40 °C. Nadbytek nezreagovaného činidla byl odstraněn reakcí s 250 µl 10mM NH_3. Derivatizované biogenní aminy byly extrahovány diethyletherem (3x1 ml), extrakt byl odpařen pod dusíkem, a bylo k němu přidáno 500 µl acetonitrilu. Biogenní aminy byly stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí.

Odběr a zpracování vzorku pro mikrobiologické vyšetření bylo provedeno dle platných ČSN norem. Bakterie mléčného kvašení (LAB) byly izolovány na MRS agaru (Merck, Německo). Počty *L. casei* byly stanoveny na MRS agaru (Noack, Francie)s obsahem 112 mg/l moxalactamu (Sigma-Aldrich, Německo). Misky byly inkubovány anaerobně při 37 °C po dobu 3 dnů.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pozitivní účinky probiotických bakterií na lidský organismus závisí na schopnosti probiotik zůstat životaschopné a kolonizovat povrch buněk lidského střeva (Shetty et al., 2006). Aby bylo dosaženo kladných účinků na lidské zdraví je třeba zkonzumovat 10^7 až 10^9 životaschopných buněk probiotických bakterií denně, což znamená alespoň 100 g potraviny s minimálním obsahem 1 milion probiotických bakterií v 1 g nebo 1 ml (Shah, 2000).

U obou výrobců dosáhly počty *L. casei* v průběhu zrání (0-28 dnů) hodnot 10^4 CFU/g a v průběhu skladování (28-49 dnů) zůstaly poměrně konstantní (Obr.1). Počty *L. casei* mohou být ovlivněny přítomností solí, neboť je známo, že probiotické kultury jsou citlivé na sůl (Andersen, 1998). Byly sledovány také celkové počty LAB, které během prvních 14 dnů zrání dosahovaly hodnot 10^7-10^8 CFU/g a v dalším průběhu zrání a skladování se pohybovaly kolem 10^6-10^7 CFU/g (výsledky neuvedeny).

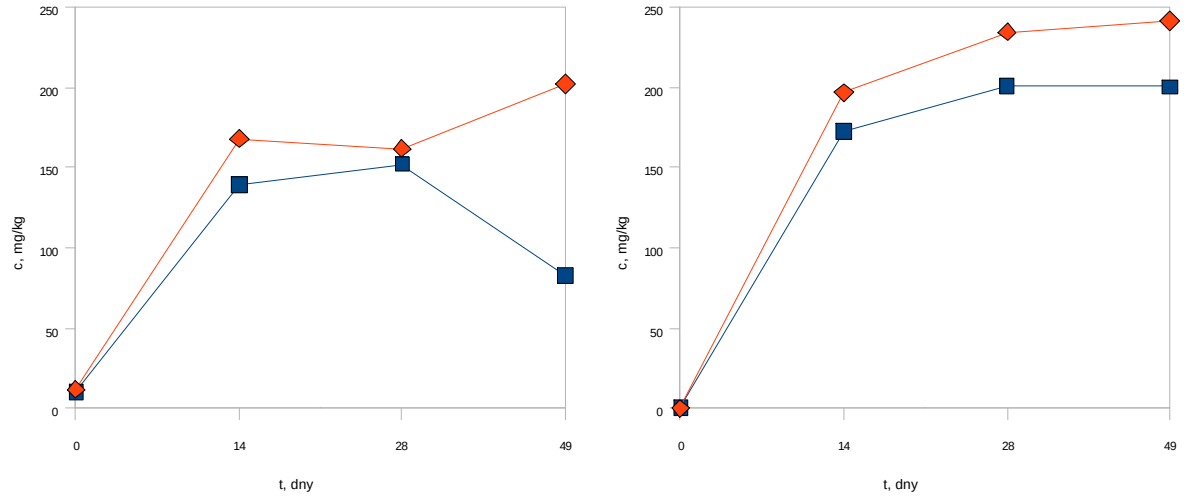


Obr. 1 Počty L. casei ve fermentovaném salámu „Paprikáš“ v průběhu zrání a skladování; ■ *výrobce 1,* ♦*výrobce 2*

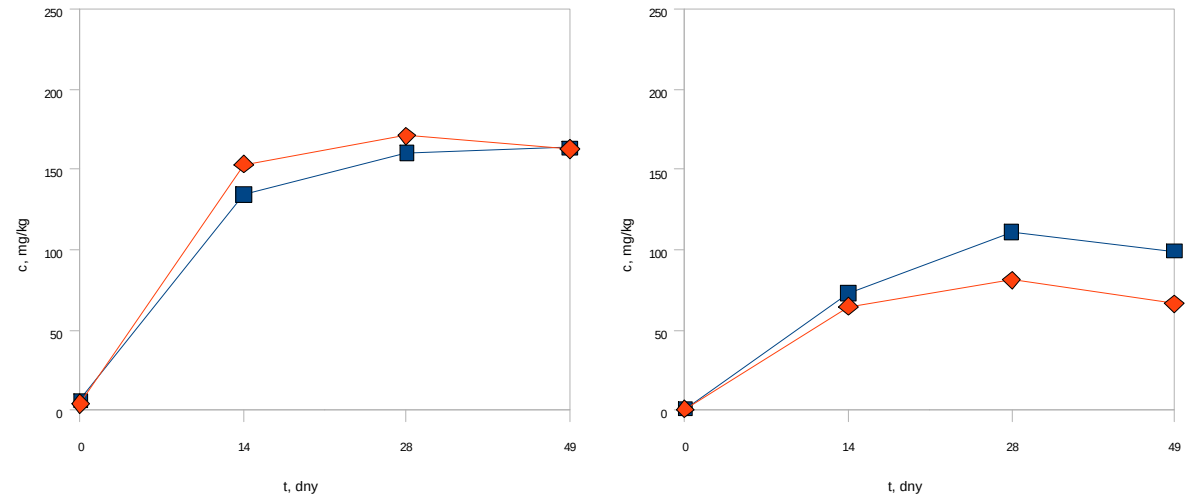
Pro obsah biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích je charakteristická značná variabilita. Salámy se srovnatelnými mikrobiologickými profily se mohou lišit v obsahu biogenních aminů, neboť tvorba těchto sloučenin je výsledkem působení celé řady faktorů (Suzzi a Gardini, 2003). Kromě enzymatické aktivity přítomných mikroorganismů je přítomnost biogenních aminů dána také fyzikálně-chemickými vlastnostmi výrobku (pH, aw, volné aminokyseliny) a technologickými podmínkami (teplota, startovací mikroorganismy, hygienická kvalita surovin a výrobního prostředí).

V naší studii jsme analyzovali salám typu „Paprikáš“ pocházející od dvou různých výrobců. Mezi výrobci byly zaznamenány značné rozdíly, ale pouze v hodnotách některých biogenních aminů (hlavně u kadaverinu). Tvorba tohoto biogenního aminu se spojuje hlavně s dekarboxylázami mikroorganismů čeledi *Enterobacteriaceae (*Shetty et al., 2006*)*, rozdíl mezi výrobci lze proto vysvětlit například horší hygienickou kvalitou surovin u výrobce 1 (Obr. 2 a 3). Zatímco množství histaminu bylo ve všech salámech zanedbatelné (do 4,1 mg/kg), nejvyšších hodnot dosahovaly koncentrace tyraminu (až 242 mg/kg). Histamin je tvořen hlavně čeledí *Enterobacteriaceae*, avšak tyramin tvoří i některé LAB, včetně některých kmenů *L. curvatus* a dalších kmenů rodu *Lactobacillus (*Suzzi a Gardini, 2003*)*.

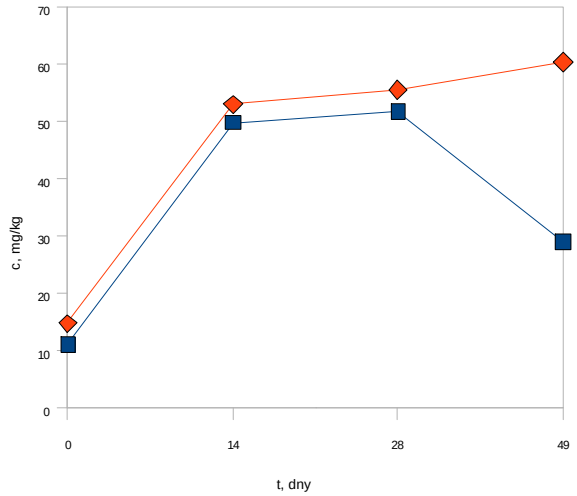
A

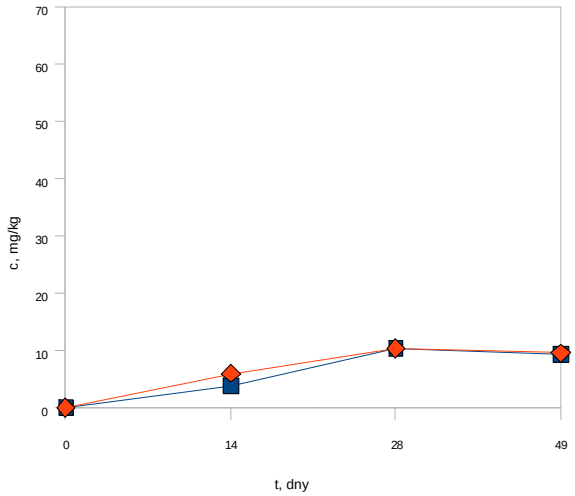


B

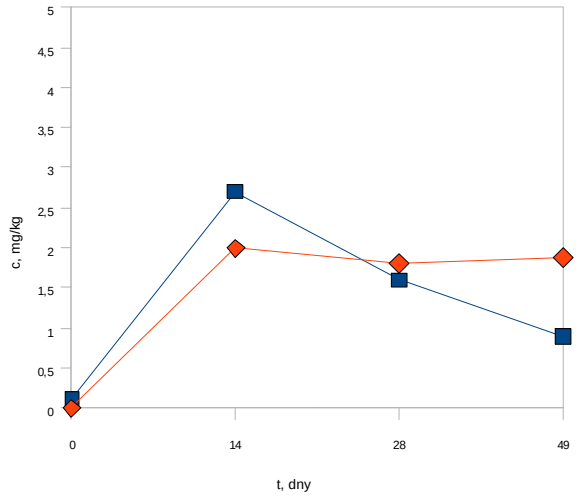


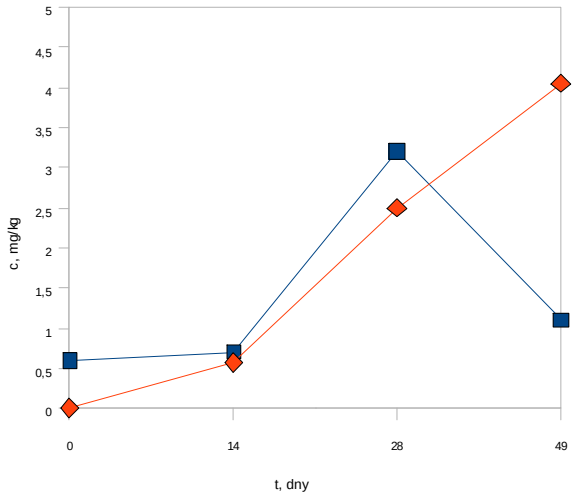
C





D





Obr. 2 Biogenní aminy během zrání (0-28) a skladování (28-49) v salámech typu „Paprikáš“ u výrobce č. 1

(A) koncentrace tyraminu, (B) koncentrace putrescinu, (C) koncentrace kadaverinu, (D) koncentrace histaminu

■ *FU2, ♦kontrola*

Obr. 3 Biogenní aminy během zrání (0-28) a skladování (28-49) v salámech typu „Paprikáš“ u výrobce č. 2

(A) koncentrace tyraminu, (B) koncentrace putrescinu, (C) koncentrace kadaverinu, (D) koncentrace histaminu

■ *FU2, ♦kontrola*

ZÁVĚR

Probiotická kultura *L. casei* (Sacco, Itálie) se ukázala být v kombinaci s použitou startovací kulturou v trvanlivém fermentovaném salámu jako velmi vhodná, vzhledem k prokazatelnému účinku na snížení obsahu biogenních aminů a to u obou výrobců. Pouze v jednom případě se toto nepotvrdilo.

LITERATURA

Andersen L. (1998): Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: 44 ed. International Commitment of Meat Science and Technology, Anais:. 826-827.

Burdychová R., Dohnal V. (2008): Skríning probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných potravin na schopnost tvorby biogenních aminů. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, LVI 1: 25-30.

Fuller R.(1997): Introduction. In Probiotics 2: Applications and practical aspects Edited by: Fuller R., New York, Chapman Hall: 1–9.

Heller KJ. (2001): Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. Americn Journal of Clinical Nutrition, 73: 374-379.

Lücke F. K. (2000): Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Sci., 56: 105–15.

Nápravníková E. (2005): Technologie trvanlivých fermentovaných masných výrobků - pohled mikrobiologa. Sborník ze semináře o údržnosti masa a masných výrobků, Praha: 27-30.

Shah N. P. (2000): Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci., 83: 894-907.

Shetty K., Paliyath G., Pometto A., Levin R. (2006): Food Biotechnology,CRC Press: 1982.

Suzzi G., Gardini F. (2003): Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. International Journal of Food Microbiology 88: 41-54.