

## SLEDOVÁNÍ POČTU PROBIOTICKÝCH BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK *LACTOBACILLUS* *CASEI* VE FERMENTOVANÝCH TEPELNĚ NEOPRACOVANÝCH SALÁMECH

R. Burdychová, P. Hoferková

Došlo: 13. prosince 2007

### Abstract

BURDYCHOVÁ, R., HOFERKOVÁ, P.: *Monitoring of probiotic bacterial cells Lactobacillus casei in dry fermented sausages*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2008, LVI, No. 2, pp. 39–44

Combination of microbiology cultivation methods and methods of molecular biology is the best way how to achieve correct qualitative and quantitative probiotic analysis. The aim of this study was monitoring of amounts of different starter bacteria supplemented with probiotic bacterial cells *Lactobacillus casei* (Chr. Hansen) during fermentation and ripening of fermented sausages. Two starter cultures, one consisted of *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus*, the second of *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus carnosus*, were used for the production of sausages. As a detection method of starter and probiotic cell counts, the cultivation on MRS –IM – sorbitol agar was used. Furthermore, the confirmation of *L. casei* was carried out using species specific PCR. The counts of probiotic *L. casei* in both probiotic sausages were  $10^6$ /g and stayed at this level during the whole ripening period (100 days). The counts of starter bacteria were  $10^7$ /g after the 7 days of fermentation and stayed at this level during the whole fermentation period. PCR from one bacterial colony confirmed the identity of *L. casei* in 80% of analysed colonies.

fermented sausages, starter cultures, probiotic, *Lactobacillus casei*, MRS –IM – sorbitol agar

Surovinou pro výrobu fermentovaných salámů je hovězí maso, vepřové maso a tuk. Chlazené nebo zmrazené suroviny se míchají s kořením, cukry, askorbáty, směsí soli a dusičnanu a startovacími kulturami a ktrují se na požadovanou zrnitost (BUCKENHÜSKES, 1993). Dílo se naráží do střev, zaudí studeným či horkým kouřem a zraje ve zracích komorách při požadované teplotě a vlhkosti vzduchu.

Startovací kultury jsou většinou směsí bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pediococcus*), kataláza pozitivních koků (*Staphylococcus*, *Micrococcus*), kvasinek (*Debaryomyces*) či plísní (*Penicillium*). Použití startovacích kultur je jedním ze způsobů optimalizace výroby a zaručení kvality výrobků, zejména zdravotní nezávadnosti a senzorické jakosti (LÜCKE, 2000).

Současným trendem je používat při výrobě fermentovaných potravin spolu se startovacími mikroorganismy probiotické bakterie. Probiotika jsou

definována jako živé mikroorganismy přítomné v potravině, které po požití v určitém množství příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry a tak i zdraví člověka. Výběr vhodných probiotických kultur pro výrobu fermentovaných výrobků závisí i na jejich schopnosti vytvořit příznivé organoleptické vlastnosti (tj. chuť, vůni apod.) potraviny (FULLER, 1997). Jako probiotické kultury jsou nejčastěji používány kmeny z rodů *Bifidobacterium*, *Enterococcus* a *Lactobacillus*, ojediněle i z rodů *Streptococcus* a *Propionibacterium* (TANNOCK, 2002). Probiotické bakterie jsou v potravinách přítomny ve formě životaschopných buněk, kterých je k dosažení pozitivního účinku na trávicí systém člověka potřeba každodenně přijmout dostatečné množství. Za tzv. terapeutické minimum je doporučována denní konzumace alespoň 100 g potraviny s minimálním obsahem 1 milion probiotických bakterií v 1 g nebo 1 ml (SHAH, 2000). Probiotika se obvykle ve fermento-

vaných výrobcích vlivem podmínek okolního prostředí pouze minimálně pomnožují (THARMARAJ a SHAH, 2003) a musí se přidat dostatečný počet živých buněk přímo do díla tak, aby byl po celou dobu trvanlivosti výrobku zaručen požadovaný počet živých buněk v 1 g výrobku.

Selektivní stanovení životaschopných probiotických bakterií ve fermentovaných salámech je dosti obtížné, protože je komplikováno přítomností startovacích kultur a další doprovodnou mikroflórou pocházející ze surovin. Při detekci je potřebné brát v úvahu druh použitého probiotického mikroorganismu a k selektivní identifikaci využít jeho specifických vlastností. Cílem této práce bylo sledování počtu startovacích mikroorganismů a probiotických bakterií *Lactobacillus casei* v tradičním českém fermentovaném salámu, a to od prvního dne výroby po celou dobu trvanlivosti. Pro selektivní detekci *L. casei* byl testován MRS – IM – sorbitol agar, který byl dánskou firmou Chr. Hansen vyvinut pro stanovení *L. casei* 431 ve fermentovaných salámech.

## MATERIÁL A METODY

### PROBIOTICKÉ BAKTERIE

Probiotické buňky kmene *Lactobacillus casei* 431 byly získány přímo od výrobce kultur (Chr. Hansen, Dánsko). Bakteriální buňky byly kultivovány anaerobně na MRS agaru (Noack, Francie) při 30 °C po dobu 72 hodin. Kultura byla použita jako pozitivní kontrola pro růst na selektivním MRS-IM-sorbitol agaru. DNA izolovaná z těchto bakterií byla použita jako pozitivní kontrola pro PCR.

### STARTOVACÍ KULTURY

Startovací kultury byly dodány výrobcem startovacích kultur (Chr. Hansen, Dánsko) v lyofilizovaném stavu. První kultura obsahovala bakteriální druhy *Staphylococcus xylosus* a *Pediococcus pentosaceus*, druhá bakteriální druhy *Staphylococcus carnosus* a *Pediococcus pentosaceus*.

### VÝROBA FERMENTOVANÝCH SALÁMŮ

Dílo pro výrobu fermentovaných salámů bylo připraveno smícháním 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 (směs *Staphylococcus xylosus* a *Pediococcus pentosaceus* v prvním případě a směs *Staphylococcus carnosus* a *Pediococcus pentosaceus* ve druhém případě) a 0,25 % probiotické kultury. U kontrolních výrobků nebyly použity probiotické mikroorganismy. Zamíchané dílo bylo naraženo do naturinových střeů, 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 udrně 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.

## IZOLACE DNA A DRUHOVÁ IDENTIFIKACE

### LACTOBACILLUS CASEI POMOCÍ PCR

Izolace DNA z bakteriálních buněk *L. casei* 431, její purifikace a způsob stanovení koncentrace a čistoty byly provedeny dle SAMBROOKA a kol. (2001) a AUSUBELA a kol. (1994). Pro identifikaci druhu *L. casei* byla použita druhově specifická PCR, popsaná MASSIM a kol. (2004). PCR byla provedena v celkovém objemu 25 µl a obsahovala 10 ng purifikované DNA, 10 pmol primeru Cas-ITS.L a CasII, 1 U Hot-Star Taq DNA polymerázy a příslušné množství Hot-Star Master Mixu (Qiagen, Hilden, Německo). Templátové DNA byly nejprve denaturovány inkubací při 95 °C 15 min. DNA byla amplifikována ve 30 cyklech (denaturace při 95 °C/45 s, hybridizace primerů při 55 °C/45 s a syntéza komplementárního DNA řetězce při 72 °C/75 s). V posledním amplifikačním cyklu byla teplota 72 °C prodloužena na 10 min., a to pro kompletní dosyntetizování finálního PCR produktu. Jako negativní kontrola PCR byly použity komponenty PCR bez DNA. PCR produkty o velikosti 118 bp byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na přístroji Easy, model B1 (Owl Scientific, USA) a vizualizovány na UV transluminátoru (EB-20E Ultralum, USA) po nabarvení ethidium bromidem (0,5 µg/ml). Dokumentace byla provedena pomocí fotodokumentačního systému Gel Imager<sup>TM</sup> Ultra-Lum, Inc., USA. V případě konfirmace narostlých kolonií na MRS-IM-sorbitol agaru byla do PCR použita jedna bakteriální kolonie.

### PŘÍPRAVA DIFERENCIAČNÍHO MÉDIA

MRS – IM – sorbitol (1000 ml) byl připraven smícháním následujících komponent: 10,0 g tryptonu (Merck, Německo), 5,0 g kvasničného extraktu (Noack, Francie), 1,0 g Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, Německo), 2,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Pliva-Lachema, ČR), 5,0 g octanu sodného (Merck, Německo), 2,0 g hydrogencitrátu diamonného (Merck, Německo), 0,2 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (Merck, Německo), 0,05 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (Pliva-Lachema, ČR), 20,0 g sorbitolu (Merck, Německo), 0,5 g bromkresolové modři (Merck, Německo) a 13,0 g agaru (Noack, Francie).

## MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR

### FERMENTOVANÝCH SALÁMŮ A VÝBĚR KOLONIÍ PRO PCR KONFIRMACI *L. CASEI*

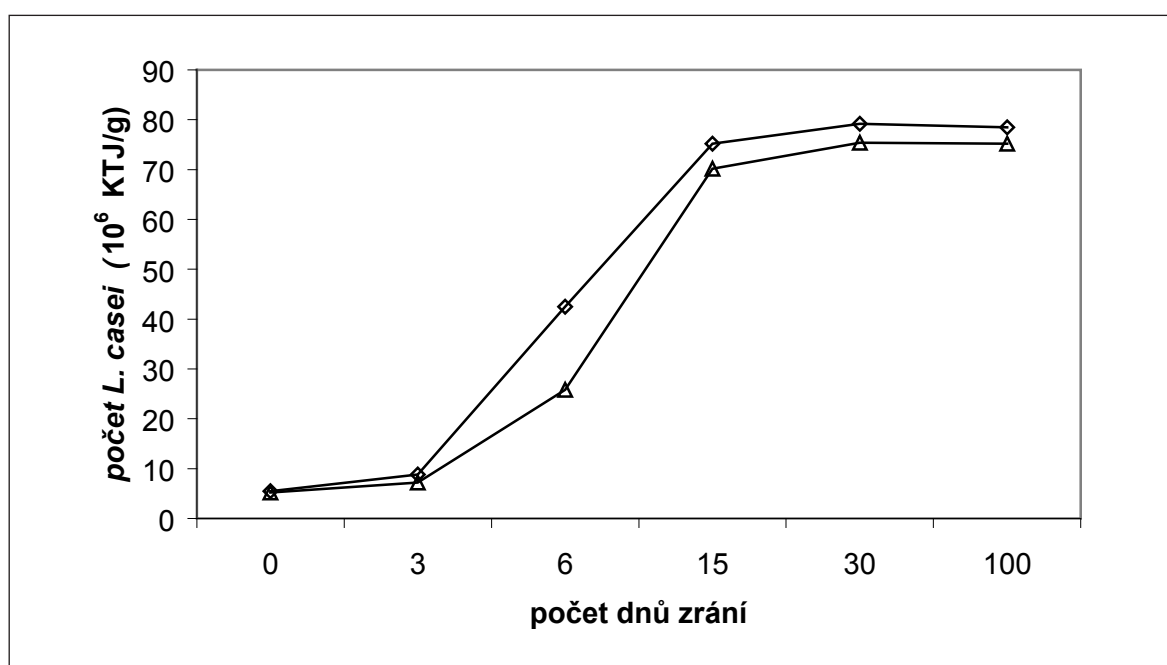
Výrobky byly analyzovány v den výroby a 3, 6, 15, 30 a 100 dnů po výrobě. Příprava vzorků pro analýzu a příslušná ředění byla provedena dle ČSN EN ISO 8261. Pro kultivaci startovacích mikroorganismů a *L. casei* byla použita selektivní živná půda MRS-IM-sorbitol. Ředění byl volen tak, aby výsledný počet KTJ na jedné plotně byl 15 až 100. Petriho misky se vzorky byly kultivovány anaerobně při 37 °C po dobu 72 h. Z jednotlivých Petriho misek byl pro PCR

analýzu vybrán takový počet kolonií, který odpovídal odmocnině z celkového počtu narostlých presumptivních kolonií *L. casei* (žluté kolonie).

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Fermentované salámy byly analyzovány na kvalitativní a kvantitativní zastoupení startovacích a probiotických mikroorganismů po celou dobu jejich trvanlivosti. Počet probiotických buněk *Lactobacillus casei* a počet startovacích mikroorganismů byl sledován na MRS – IM – sorbitol agar s využitím anaerobní kultivace při 37 °C 72 hod. Žluté kolonie (120 kolonií), které byly získány po analýze fermentovaných salámů na MRS – IM – sorbitol agaru,

byly testovány na příslušnost k bakteriálnímu druhu *L. casei* pomocí druhově specifické PCR. Pomocí této metody byly selektivně stanoveny počty *L. casei* ve výrobcích s probiotickou kulturou. Počty *L. casei* dosáhly hodnoty řádově  $10^6$  KTJ/g ( $\alpha = 0,05$ ) a zůstaly na této hodnotě po celou dobu zrání a trvanlivosti výrobků. Počty probiotických buněk nebyly ovlivněny složením startovací kultury (Obr. 1). Počet buněk startovacích kultur dosáhl hodnoty  $10^7$  ( $\alpha = 0,05$ ) už po 7 dnech od výroby a zůstal na této hodnotě po celou dobu trvanlivosti výrobku. Výsledky byly zpracovány na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ , nárůst množství probiotických buněk byl prokázán jako statisticky nevýznamný.

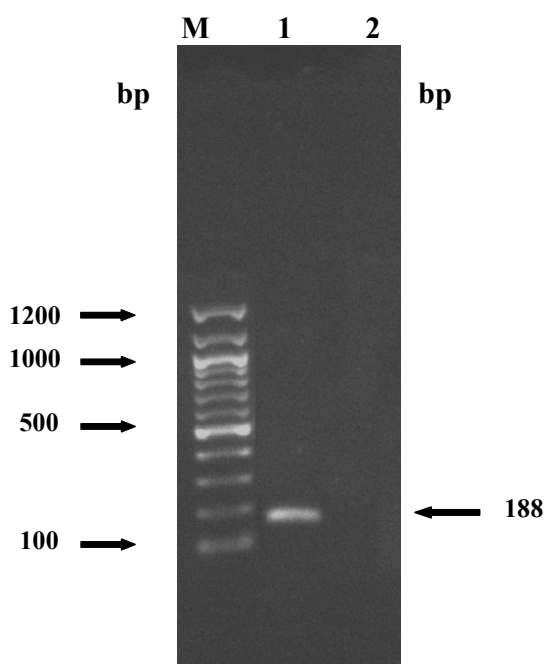


1: Počty *L. casei* 431 ve fermentovaných salámech v průběhu fermentace a zrání; (△) *Pedococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* a *L. casei* 431, (□) *Pedococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylosus* a *L. casei* 431

Dosud bylo popsáno pouze několik metod, které popisují selektivní stanovení *L. casei* za přítomnosti startovacích mikroorganismů (CHAMPAGNE et al., 1997; RAVULA AND SHAH, 1998). Při selektivním stanovení *L. casei* je třeba brát v úvahu nejen druhové složení použité startovací kultury, ale také doprovodnou mikroflóru analyzovaných výrobků. MRS – IM – sorbitol agar byl vyvinut pro selektivní stanovení *L. casei* ve fermentovaných masných výrobcích s použitím určitých druhů startovacích kultur (CH. HANSEN, 2006). *L. casei* vytváří na tomto médiu konvexní dvou až třímilimetrové žluté kolonie, které zbarvují své bezprostřední okolí do žluté barvy díky zkvašování sorbitolu. Ve výrobcích se ale

mohou vyskytnout i kontaminující bakterie mléčného kvašení, které podobně jako *L. casei* mohou zkvašovat sorbitol a komplikovat tak rozlišení kontaminujících mikroorganismů od probiotických.

Pro jednoznačnou identifikaci *L. casei* lze kromě kultivační metody s použitím MRS – IM – sorbitol agaru využít i mikroskopických metod a biochemických testů. Vhodnější je ale použití druhově specifické PCR, která identifikaci významně usnadňuje a časově zkracuje. Pro správnou identifikaci probiotických buněk *L. casei* izolovaných z masných výrobků byla použita PCR. Pomocí druhově specifické PCR byl amplifikován PCR produkt o velikosti 188 bp (Obr. 2), který je specifický pro *L. casei*.

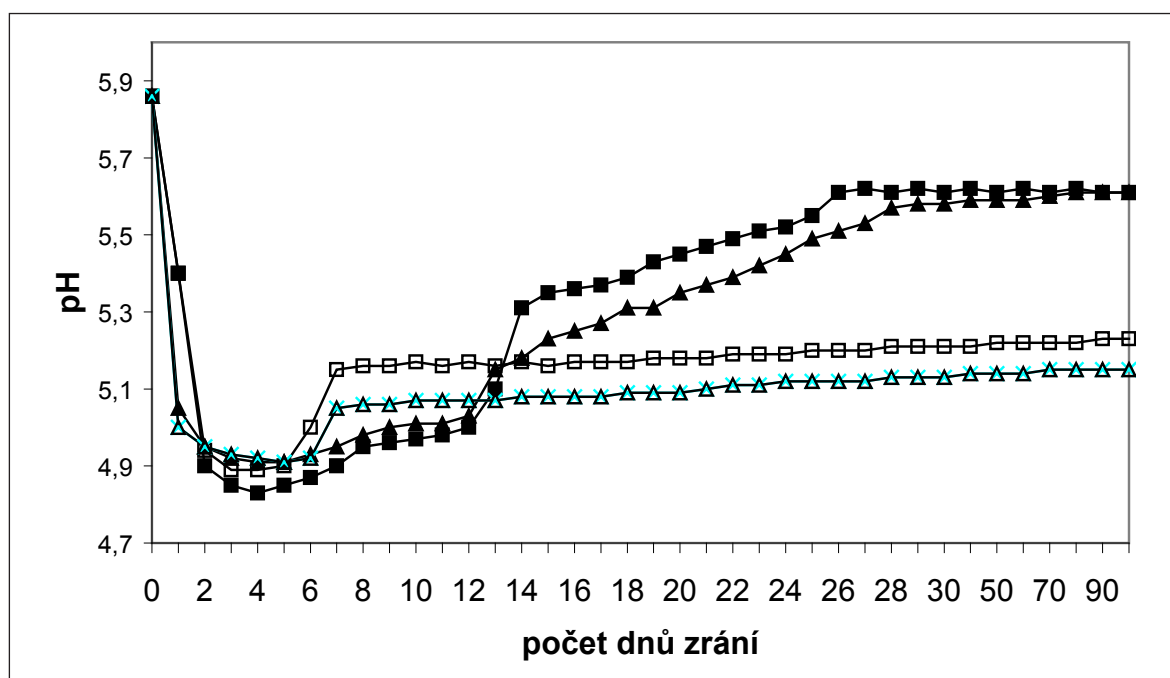


2: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktu po amplifikaci DNA *L. casei*. M: 100 bp ladder (New England Biolabs, Anglie), běh č. 1: *L. casei* 431 (Chr. Hansen), běh č. 2: negativní kontrola PCR

Rozbory provedené v počáteční fázi výroby a zrání fermentovaných salámů poskytly při PCR analýze žlutých kolonií *L. casei* téměř stoprocentní výsledky zařazení k tomuto bakteriálnímu druhu. V pozdějších stádiích zrání výrobků však zřejmě dochází

k pomnožení kontaminující mikroflóry zkvašující sorbitol, protože bylo pomocí PCR potvrzeno pouze 80 % ( $\alpha = 0,05$ ) žlutě zbarvených presumptivních kolonií *L. casei*. Výhoda potvrzení kolonií pomocí druhově specifické PCR tedy byla jasně prokázána.

U fermentovaných salámů byla dále sledována hodnota pH. pH výrobků pokleslo u všech fermentovaných salámů na hodnotu 4,9–5,0 po dvou dnech od výroby a v průběhu dalších pěti dní dále klesalo (Obr. 3). Během fermentace zjevně nastalo pomnožení startovací mikroflóry a došlo k produkci organických kyselin, což se projevilo snížením pH výrobků. Snížení pH hraje důležitou úlohu pro zajištění zdravotní nezávadnosti fermentovaných salámů a rovněž při tvorbě textury a barvy fermentovaných salámů (KRÖCKEL, 1995). Po sedmi dnech od výroby začalo pH mírně stoupat, což může být způsobeno tvorbou dusíkatých látek, které vznikají enzymatickou aktivitou mikroorganismů působících na myofibrilární proteiny masa (KLEMENT a CASSENS, 1974). Proteolýzou mohou vnikat i peptidy, aminokyseliny a amoniak, které se také podílejí na zvýšení pH (DEMEYER a kol., 1979; ASTIASARÁN a kol., 1990). Hodnota pH se u výrobků bez probiotik ustálila na konečné hodnotě 5,5–5,6, u salámů s probiotickou kulturou na hodnotách 5,0–5,1. Nižší pH u výrobků s probiotikem bylo dosaženo zřejmě aktivitou probiotického kmene *L. casei*, který může vlivem svých metabolitů pH výrobků snížit. Tento vliv na snížení pH se projevil v nežádoucím senzorickém profilu salámů s probiotiky, konkrétně v deskriptoru kyselost (dosud nepublikované výsledky).



3: pH profily fermentovaných salámů bez probiotik (▲) *Pediococcus pentosaceus* a *Staphylococcus carnosus* a (■) *Pediococcus pentosaceus* a *Staphylococcus xylosum*; a fermentovaných salámů s přidavkem probiotické kultury (△) *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* a *L. casei* (□) *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylosum* a *L. casei*



## SOUHRN

Současným trendem je používat při výrobě fermentovaných salámů spolu se startovacími mikroorganismy probiotické bakterie. Za tzv. terapeutické minimum je doporučována denní konzumace alespoň 100 milionů probiotických bakterií. Selektivní stanovení životaschopných probiotických bakterií ve fermentovaných salámech je dosti obtížné, protože je komplikováno přítomností startovacích kultur a kontaminující i doprovodnou mikroflórou výrobků. Při detekci je potřebné brát v úvahu použitý probiotický druh a k selektivní identifikaci využít jeho specifických vlastností.

Cílem této práce bylo využít kultivačních a molekulárně biologických metod ke sledování počtu probiotických bakterií *L. casei* 431 (Chr. Hansen) ve fermentovaných masných výrobcích, a to od prvního dne výroby po celou dobu trvanlivosti. Pro výrobu fermentovaných salámů byly použity dvě různé startovací kultury obsahující mikroorganismy *Staphylococcus carnosus* a *Pediococcus pentosaceus* a *Staphylococcus xylosum* a *Pediococcus pentosaceus*. Pro stanovení startovacích bakterií a probiotického druhu *L. casei* byla použita selektivní kultivační půda MRS – IM – sorbitol a druhově specifická PCR.

Počet probiotických *L. casei* byl s použitím obou startovacích kultur řádově  $10^6$ /g a tento počet byl zachován po celou dobu fermentace a trvanlivosti výrobků. Počet startovacích mikroorganismů dosáhl hodnoty řádově  $10^7$ /g a zůstal na této hodnotě po celou dobu fermentace a trvanlivosti výrobků. Pomocí druhově specifické PCR z jedné bakteriální kolonie bylo potvrzeno 80 % presumptivních kolonií *L. casei*.

fermentované salámy, startovací kultury, probiotika, *Lactobacillus casei*, MRS – IM – sorbitol agar

## SUMMARY

In the last years, the adding of probiotics into fermented sausages became more and more popular. It has confronted new challenge in the area of functional food with its efficient biosynthesis potential. The presence of adequate number of live probiotic cells in fermented sausages in the time of consumption represents the first challenge for the development of such probiotic product.

Detecting and identifying various species of probiotic bacteria with rapid methods is often important for monitoring their counts in different types of food. Because of the potential health benefits, these organisms are increasingly incorporated into fermented sausages. However, studies have shown low viability of probiotics in market preparations.

In this study, a rapid working method for selective enumeration and monitoring of survival of probiotic *Lactobacillus casei* in fermented sausages was developed. Two starter cultures, one consisted of *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosum*, the second of *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus carnosus*, were used for the production of sausages. As a detection method of probiotic cell counts, the cultivation on MRS – IM – sorbitol agar was used. Furthermore, the confirmation of *L. casei* was carried out using species specific PCR. The counts of probiotic *L. casei* in both probiotic sausages were  $10^6$ /g and stayed at this level during the whole ripening period (100 days). PCR from one bacterial colony confirmed the identity of *L. casei* in 80 % of analysed colonies. The counts of starter bacteria were  $10^7$ /g after the 7 days of fermentation and stayed at this level during the whole fermentation period.

To provide health benefits, the suggested concentration for probiotic bacteria is  $10^6$  cfu/g of a product and daily consummation of 100 g of such product is recommended. However, the minimal dose is depended on several factors such as individual person, probiotic strain and type of food product. The question still is, if those types of meat products can be called functional foods and consumed daily. Reducing of fat concentrations in such type of products to the level of 25–30 % and its consummation respecting individual physical activity can be a certain compromise.

## LITERATURA

- ASTIASARÁN, I., VILLANUEVA, R., BELLO, J., 1990: Analysis of proteolysis and protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. *Meat Sci.*, 28: 111–117.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K., 1994: Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 350 p. ISBN 0-47150-338-X.
- BUCKENHÜSKES, H. J., 1993: Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiological reviews*, 12: 253–272.
- DEMEYER, D. J., VANNDERKERHOVE, D. I., MOERMANS, R., 1979: Compounds determining pH in dry sausages. *Meat Sci.*, 3: 161–167.
- FULLER, R., 1997: Introduction. In *Probiotics 2: Applications and practical aspects* Edited by: Fuller R., New York, Chapman & Hall, 1–9.
- HAARMAN, M., KNOL, J., 2006: Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol.*, 72(4): 2359–2365.
- CHAMPAGNE, C. P., ROY, D., LAFOND, A., 1997: Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yo-

- ghurt-type fermented milks based on a 15 °C incubation temperature. *Biotechnol. Tech.*, 11: 567–569.
- CHR. HANSEN, 2006: Method for enumerating *Lactobacillus casei* 431. Technical Bulletin. March.
- KLEMENT, J. T., CASSENS, R. G., 1974: The effect of bacterial fermentation on protein solubility in a sausage model system. *J. Food Sci.*, 39 (4): 833–835.
- KRÖCKEL, I., 1995: Bacterial fermentation of meats. In Campbell-Platt, G., Cook, P. E. Fermented meats. UK: Blackie Academic & Professional.
- LÜCKE, F. K., 2000: Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 56: 105–15.
- MASSI, M., VITALI, B., FEDERACI, F., MATTEUZZI, D., BRIGIDI, P., 2004: Identification Method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina. *Journal of Applied Mikrobiology*, 96: 777–86.
- RAVULA, R. R., SHAH, N. P., 1998: Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurt and fermented milk drinks. *Biotechnol. Tech.*, 12: 819–822.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D., 2001: Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2344 p. ISBN 0-87969-577-3.
- SHAH, N. P., 2000: Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 83: 894–907.
- TANNOCK, G. W., 2002: Probiotics and Prebiotics: Where are We Going? Norwich: Caister Academic Press, 333 p. ISBN-10: 0-9542464-1-1.
- THARMARAJ, N., SHAH, N. P., 2003: Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. *J. Dairy Sci.*, 86: 2228–2296.
- WALTER, J., TANNOCK, G. W., TILSALA-TIMISJARVI, A., RODTONG, S., LOACH, D. M., MUNDRO, K., ALATOSSAVA, T., 2000: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol.*, 66 (1): 297–303.

#### Adresa

Ing. Radka Burdychová, Ph.D., Ústav technologie potravin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika