

VLIV PŘÍDAVKU PROBIOTICKÉHO KMENE *L. casei* 01 NA KONCENTRACI BIOGENNÍCH AMINŮ VE FERMENTOVANÝCH SALÁMECH HERKULES

R. Burdychová

Došlo: 15. června 2009

Abstract

BURDYCHOVÁ, R.: *The influence of probiotic strain L. casei 01 on biogenic amines concentrations in fermented sausages Herkules*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2009, LVII, No. 5, pp. 41–48

In this work, the influence of probiotic strain *L. casei* 01 (Sacco, Italy) on biogenic amines concentrations during fermentation, ripening and storage of fermented sausages "Herkules" was studied. Two amounts of probiotic culture were added into sausages, 0,25 % and 0,40 %, respectively. Negative controls without probiotic were also made. Dry sausages were taken from two different producers (A, B). Determination of biogenic amines tyramine, histamine, putrescine and cadaverine concentration was used using HPLC method with UV detection. The content of biogenic amines was monitored during fermentation (0–28 days) and storage (28–49) of fermented sausages.

In both producers, when 0,25 % of probiotic strains was added, 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). When 0,40 % of probiotic *L. casei* 01 was added, the amount of *L. casei* cells were around 10^6 CFU/g during the whole fermentation and storage period.

A positive influence on the reduction of biogenic amines was observed in both producers. In negative controls without probiotic, the higher concentration of tyramine, histamine, putrescine and cadaverine was detected in comparison with probiotic sausages.

Differences between dry sausages with 0,25 % and 0,40 % probiotic *L. casei* 01 were also determined. In producer A, the concentration of putrescine and cadaverine in 0,40 % probiotic sausages were statistically lower in comparison with probiotic sausages where 0,25 % *L. casei* was applied. In producer B, the concentration of all monitored biogenic amines were statistically lower in 0,40 % probiotic sausages when compared with 0,25 % probiotic sausages.

biogenic amines, HPLC, *L. casei* 01, fermented sausages, Herkules

Hlavními skupinami fermentovaných masných výrobků jsou fermentované salámy s nízkou kyselostí (s vysokou konečnou hodnotou pH, klasické syrové trvanlivé salámy), fermentované salámy s vyšší kyselostí (s nízkou konečnou hodnotou pH, krájitelné) zakládající svoji trvanlivost právě na vyšší kyselosti, tedy na nižších hodnotách pH a to většinou pod hodnotu 5,0 (do této skupiny se řadí například Herkules, Paprikáš nebo lovecký salám), syrové šunky a roztíratelné fermentované salámy. Pro výrobu fermentovaných masných výrobků se používají startovací kultury, které se přidávají do díla. Jejich prvotním účelem je potlačení rozvoje nežá-

doucích, tj. kažení působících a patogenních mikroorganismů, jejichž přítomnost nelze zcela vyloučit. Potlačují nežádoucí mikroflóru, a to tvorbou kyseliny mléčné a produkcí bakteriocinů (MARIANSKI a MARIANSKI, 2008).

Startovací kultury mají dále zajistit správný a rychlejší průběh zrání, a to odbouráváním sacharidů na organické kyseliny, redukcí dusitanů, štěpením bílkovin, vytvářením typického aroma a chuti výrobku a zpevňováním jejich textury. Startovací kultury jsou různého složení s ohledem na zvyklosti příslušné země nebo oblasti a požadované typické jakosti výrobků (INGR, 1996). Mezi nejvýznamnější

představitelé patří laktobacily, pediokoky, mikrokoky, stafylokoky, kvasinky i plísně. Převládají však bakterie mléčného kvašení a stafylokoky (MARIANSKI a MARIANSKI, 2008).

V poslední době jsou při výrobě fermentovaných masných výrobků testovány probiotické mikroorganismy. Šetrný biologický charakter technologie výroby těchto produktů zaručuje přežívání vybraných bakteriálních kmenů. Výroba masných produktů s probiotickou kulturou má na rozdíl od mléčných probiotických výrobků svá specifika. Ne všechny kmeny vybraných bakterií s pozitivními dietetickými vlastnostmi přežívají v prostředí díla salámů. Velmi také záleží na použité startovací kultuře. Probiotické kultury jsou citlivé na přítomnost kuchyňské soli, proto je nutné při výrobě s přídavkem těchto kultur snížit množství na maximálně 2 %.

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární dusíkaté báze, které jsou přítomny ve všech živých organismech. Podle chemické struktury se alimentárně významné biogenní aminy dělí na alifatické (putrescin, kadaverin, spermidin, spermin a agmatin, aromatické (tyramin a 2-fenylethylamin a heterocyklické (histamin a tryptamin). Zvláštní postavení zauímají polyaminy spermidin a spermin, včetně diaminu putrescinu. Putrescin je řazen do skupiny polyaminů, protože je přímým meziproduktem syntézy spermidinu a sperminu (KOMPRDA, 2005).

Na tvorbě BA se podílí řada vlivů, především je to pH, teplota, aktivita vody, doba skladování, použité startovací kultury a další vlivy. Mezi základní podmínky tvorby biogenních aminů patří přítomnost volných (biologicky dostupných) aminokyselin, výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné prostředí pro růst a množení těchto mikroorganismů.

Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné. Slouží jako zdroj uhlíku, prekurzory hormonů (2-fenylethylamin) nebo samy působí jako hormony (histamin) a podílejí se na syntéze nukleových kyselin a proteinů (KOMPRDA, 2005). Nadměrné koncentrace mohou však mít na lidský organismus negativní účinky. Histamin působí vazodilatačně, dostavuje se zvracení, průjem, křeče, pálení v ústech, dýchací potíže, pocení, kopřivka, vyrážka, edémy, lokální záněty či zarudnutí obličeje. Otrava má podobné projevy jako alergie na některé potraviny (KALAČ a KRÍŽEK, 2005; KAMENÍK, 2007). Tyramin vyvolává zvýšení srdeční činnosti

a krevního tlaku, zúžení periferních cév, migrény a dokonce může být příčinou krvácení do mozku (SHALABY, 1996). Putrescin a kadaverin způsobují hypotenzi, zpomalení srdeční činnosti a křeče žvýkacích svalů, naopak tryptamin a 2-fenylethylamin podporují zvyšování krevního tlaku. Spermidin a spermin mají význam při diferenciaci a růstu buněk střeva a účastní se i vychytávání volných radikálů v trávicím traktu.

Polyaminy hrají také podstatnou roli při karcinogenezi. Samy o sobě nevyvolávají vznik nádorů, ale podporují jejich růst. Toxicita polyaminů se zvyšuje s jejich rostoucí molekulovou hmotností a nábojem (KOMPRDA, 2005; KALAČ a KRÍŽEK, 2005).

Česká legislativa do roku 2004 obsahovala legislativní limity pro vybrané BA v rybách, sýrech, pivu a vínu, ale dnes je v ČR platný jen hygienický limit pro histamin v rybách a výrobcích z ryb uváděný v Nařízení komise (ES) č. 1441/2007 ve výši 100 mg/kg. Tento limit může být ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže překročen až do hodnoty 200 mg/kg. Legislativa neurčuje výrobcům deklarovat obsah BA na obalu (STANDAROVÁ a kol., 2008).

Cílem této části práce bylo ověřit použití probiotického kmene *L. casei* 01 ve fermentovaných masných salámech typu Herkules. Z literatury je známo, že přídavek některých (i probiotických) kultur do díla snižuje množství biogenních aminů ve finálním výrobku. Proto bylo sledováno i množství biogenních aminů v průběhu zrání fermentovaných salámů s cílem ověřit hypotézu, zda přídavek probiotické kultury *L. casei* 01 (Sacco, Itálie) snižuje obsah biogenních aminů v salámech.

MATERIÁL A METODY

Výroba fermentovaných salámů

Dílo pro výrobu fermentovaných salámů Herkules 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 (*Pediococcus pentosaceus* AS-3/100; Chr. Hansen, Dánsko), 0,25 % probiotického kmene *L. casei* 01 (Sacco, Itálie) a 0,40 % probiotického kmene *L. casei* 01. U kontrolních výrob nebyly použity probiotické mikroorganismy. Stejně

I: Analyzované vzorky fermentovaných salámů Herkules od dvou výrobců (A, B) s přídavkem startovací kultury *Pediococcus pentosaceus* AS-3/100 a 0,25 % probiotické kultury *L. casei* 01 a použité kombinace kmenů

Označení vzorků	Výrobce	Kmeny použité při výrobě salámů
1	A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100 <i>L. casei</i> 01
2	A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100
3	B	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100 <i>L. casei</i> 01
4	B	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100

II: Analyzované vzorky fermentovaných salámů Herkules od dvou výrobců (A, B) s přídavkem startovací kultury *Pediococcus pentosaceus* AS-3/100 a 0,40 % probiotické kultury *L. casei* 01 a použité kombinace kmenů

Označení vzorků	Výrobce	Kmeny použité při výrobě salámů
5	A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100 <i>L. casei</i> 01
6	A	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100
7	B	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100 <i>L. casei</i> 01
8	B	<i>Pediococcus pentosaceus</i> AS-3/100

výrobky byly vyrobeny u dvou různých výrobců (A a B). Tabulka I a II udává přehled analyzovaných vzorků a použitých kombinací kmenů.

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 udrně při 26–24 °C po dobu šesti dnů a poté dány do zračí komory k dosoušení při 11–13 °C (relativní vlhkost vzduchu 75%). Proces zrání byl ukončen po 28 dnech po výrobě salámů.

Mikrobiologický rozbor fermentovaných salámů

Výrobky byly analyzovány v den výroby (den 0), 7, 14, 28 a 49 dnů po výrobě. Příprava vzorků pro analýzu a příslušná ředění byla provedena dle ČSN EN ISO 8261. Pro stanovení mezofilních bakterií mléčného kvašení byl použit MRS agar (Noack, Francie) dle ČSN ISO 15214. Probiotický kmen *L. casei* 01 byl proveden dle BURDYCHOVÉ a kol. (2008).

Stanovení biogenních aminů ve fermentovaných salámech Herkules

Pro detekci biogenních aminů bylo naváženo 10 g každého vzorku masného výrobku do plastové zkumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 500 µl roztoku vnitřního standardu 1,7-diaminoheptanu (1 mg/kg). 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 deseti minut odstředovány při 3000 ot./min při 4 °C. Supernatant byl filtrován přes papírový filtr (Filtrak č. 390) do 50 ml odměrné baňky, jejíž obsah byl doplněn pětiprocentní kyselinou trichloroctovou. Celý postup se opakoval třikrát. 1 ml filtrátu byl odebrán do zkumavky, smíchan s 0,5 ml saturované NaHCO₃ a derivatizován 1 ml acetonového dansylchloridu (5 mg/ml) po dobu 1 hodiny při 40 °C. Nadbytek nezreagovaného činidla byl odstraněn reakcí s 250 µl 10 mM NH₃. Derivatizované biogenní aminy byly extrahovány diethyletherem (3×1 ml), extrakt byl odpařen pod dusíkem, a bylo k němu přidáno 500 µl acetonitrilu. Biogenní aminy byly stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí.

Vzorky byly podrobeny chromatografické analýze použitím Agilent HP 1100 systému (Agilent, Německo), který byl složen z vakuové odplyňovací jed-

notky (vacuum degasser G1322A), kvartérní pumpy (G1311A), autosampleru (G1313A) a fluorescenčního detektoru (G1321A). Pro analýzu byla dále použita Zorbax XDB C8 kolona (4,6 × 150 mm, velikost částic 5 µm) s předkolonou Meta Guard Inertsil C18 (4,6 × 30 mm, velikost částic 5 µm) a metoda popsaná v práci BURDYCHOVÉ a kol. (2008). Gradientová eluce byla provedena mobilní fází složené z 0,1 M acetatového pufru, A (pH 5,8) a acetonitrilu, ACN (Merck, Německo) (čas 0–27 min: A, 60–23 %, ACN 40–77 %) při průtokové rychlosti 0,6 ml/min. Kvalitativní detekce biogenních aminů ve vzorcích byla provedena porovnáním retenčních časů jednotlivých vzorků a retenčního času standardu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Analýza fermentovaných salámů na kvalitativní a kvantitativní zastoupení *L. casei*

Přídavek probiotik do fermentovaných masných výrobků není snadnou záležitostí, jelikož se probiotický mikroorganismus musí vyrovnat s vysokým obsahem soli, tuku, nízkou aktivitou vody a nízkou hodnotou pH (DE VUYST a kol., 2008).

Fermentované masné výrobky Herkules, vyrobené u dvou různých výrobců A a B, byly analyzovány na kvantitativní zastoupení BMK a probiotických buněk *L. casei* 01, a to v den výroby (den 0) a 14, 28 a 49 dnů po výrobě, tedy v době fermentace a zrání (0–28 dnů) a v době skladování (28–49 dnů) neboli v době předpokládané konzumace spotřebitelem, tedy v době minimální trvanlivosti.

U všech výrobků s probiotiky (výrobky č. 1, 3, 5 a 7) obou výrobců byl zjištěn během analýzy statisticky průkazný nárůst ($P < 0,05$) probiotických buněk *L. casei*. Na konci doby minimální trvanlivosti výrobků č. 1 a 3 (s přídavkem 0,25 % probiotické kultury *L. casei* 01 u obou výrobců) bylo dosaženo hodnot *L. casei* řádově 10⁴ KTJ/g. Na konci doby minimální trvanlivosti výrobků č. 5 a 7 (s přídavkem 0,40 % probiotické kultury *L. casei* u obou výrobců) bylo dosaženo hodnot *L. casei* řádově 10⁶ KTJ/g.

K podobným výsledkům dospěl i ANDERSEN (1998), který uvádí, že probiotikum *L. casei* ve spojitosti se startovací kulturou obsahující *Staphylococcus carnosus* a *Pediococcus pentosaceus* uspokojivě přežívalo výrobní proces.

U všech sledovaných výrobků došlo ke statisticky prokazatelnému nárůstu ($P < 0,05$) BMK, s čímž souvisí pokles pH výrobků. Snížení pH hraje důležitou úlohu pro zajištění zdravotní nezávadnosti fermentovaných salámů a rovněž při tvorbě textury a barvy fermentovaných salámů (KRÖCKEL, 1995). Hodnota pH výrobků č. 2, 4, 6 a 8 (negativní kontroly bez probiotik) nejvíce klesala během prvních sedmi dnů po výrobě, po sedmi dnech od výroby začalo pH mírně stoupat, což mohlo být způsobeno tvorbou dusíkatých látek, které vznikají enzymatickou aktivitou mikroorganismů působících na myofibrilární proteiny masa (KLEMENT a CASSENS, 1974). Proteolýzou mohly vnikat i peptidy, aminokyseliny a amoniak, které se také podílejí na zvýšení pH (DEMEYER a kol., 1979; ASTIASARÁN a kol., 1990).

Hodnota pH u výrobků s probiotiky (vzorky č. 1, 3, 5 a 7) klesala pomaleji než u negativních kontrol (výrobků bez probiotik), po sedmi dnech klesla na nižší hodnotu a pak začala mírně stoupat. Rychlejší pokles hodnot pH u výrobků bez probiotik (výrobky č. 2, 4, 6 a 8) během prvních sedmi dnů fermentace salámů může být vysvětlen vyšším nárůstem BMK v těchto výrobcích (výsledky neuvedeny). Byla zjištěna statistická závislost BMK na pH ($P < 0,01$). S nižší hodnotou pH vzrostl počet BMK (čím nižší pH, tím větší počet BMK). Počty *L. casei* nebyly statisticky závislé na hodnotě pH ($P < 0,01$).

Stanovení koncentrace biogenních aminů ve fermentovaných salámech

U masných výrobků s dlouhou dobou zrání může docházet k přeměně volných aminokyselin na to-

xické biogenní aminy. Tvorba biogenních aminů závisí na hygienických podmínkách výroby, použitých startovacích kulturách, pH výrobků, na aktivitě vody výrobků i na dalších faktorech (GARDINI a kol., 2001). Biogenní aminy mohou být tvořeny i činností mikrobiálních enzymů, tzv. dekarboxyláz. Ve fermentovaných masných výrobcích mohou být mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou přítomny jako součást přirozené mikroflóry nebo jako startovací kultury. 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).

Vzorky salámů pro stanovení koncentrace biogenních aminů tyraminu, histaminu, kadaverinu a putrescinu byly odebrány ve stejných časových intervalech jako pro mikrobiologickou analýzu (tedy 0, 14, 28 a 49 dnů po výrobě). Výsledky jsou uvedeny v tabulce III a IV.

Koncentrace biogenních aminů v díle všech výrobků byla velmi nízká. Výjimkou byl tyramin, jehož koncentrace v díle výrobce B dosahovala téměř toxikologického rizika (200 mg/kg výrobku). V průběhu fermentace a zrání (0–28 dnů) a skladování (28–49 dnů) došlo u všech výrobků ke statickému průkaznému nárůstu ($P < 0,01$) sledovaných biogenních aminů.

Histamin byl jediným biogenním aminem, jehož koncentrace byla u všech výrobků po celou dobu fermentace a skladování velmi nízká, pohybovala se v toxikologicky nevýznamných koncentracích

III: Analýza koncentrace biogenních aminů ve fermentovaných salámech Herkules, vzorky č. 1–4 (přídavek 0,25 % probiotického kmene *L. casei* 01)

	Herkules, označení vzorků	Počet dnů fermentace a zrání (0–28) a skladování při 15°C (28–49)			
		0	14	28	49
Výrobce A					
tyramin (mg/kg)	1	11,5 ± 0,3	139,7 ± 0,3	156,1 ± 0,1	137,5 ± 0,5
	2	10,5 ± 0,3	188,2 ± 0,1	207,6 ± 0,3	300,4 ± 0,1
histamin (mg/kg)	1	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno
	2	nedetekováno	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2
putrescin (mg/kg)	1	6,1 ± 0,1	134,5 ± 0,3	160,4 ± 0,2	163,5 ± 0,2
	2	4,6 ± 0,2	214,3 ± 0,2	241,7 ± 0,2	350,5 ± 0,1
kadaverin (mg/kg)	1	5,4 ± 0,1	46,1 ± 0,1	49,6 ± 0,2	46,3 ± 0,1
	2	2,7 ± 0,1	50,2 ± 0,2	55,3 ± 0,1	81,8 ± 0,3
Výrobce B					
tyramin (mg/kg)	3	185,2 ± 0,2	145,2 ± 0,1	172,2 ± 0,2	189,2 ± 0,1
	4	193,2 ± 0,1	210,5 ± 0,2	258,7 ± 0,3	274,2 ± 0,2
histamin (mg/kg)	3	nedetekováno	0,6 ± 0,1	2,3 ± 0,3	4,2 ± 0,2
	4	nedetekováno	3,9 ± 0,3	5,4 ± 0,2	8,2 ± 0,2
putrescin (mg/kg)	3	1,2 ± 0,1	78,2 ± 0,1	125,5 ± 0,3	132,1 ± 0,1
	4	2,3 ± 0,2	135,1 ± 0,3	154,0 ± 0,2	144,7 ± 0,2
kadaverin (mg/kg)	3	14,1 ± 0,2	27,4 ± 0,2	35,4 ± 0,1	43,1 ± 0,1
	4	17,6 ± 0,3	29,7 ± 0,1	40,1 ± 0,2	56,2 ± 0,1

IV: Analýza koncentrace biogenních aminů ve fermentovaných salámech *Herkules*, vzorky č. 5–8 (přídavek 0,40 % probiotického kmene *L. casei* 01)

		Herkules, označení vzorků	Počet dnů fermentace a zrání (0–28) a skladování při 15°C (28–49)			
			0	14	28	49
Výrobce A						
tyramin (mg/kg)	5	8,5±0,3	132,3±0,2	144,6±0,2	144,6±0,2	
	6	6,3±0,2	164,4±0,1	170,7±0,3	204,4±0,1	
histamin (mg/kg)	5	nedetekováno	nedetekováno	0,9±0,1	0,7±0,2	
	6	nedetekováno	0,9±0,1	1,7±0,2	2,3±0,2	
putrescin (mg/kg)	5	2,6±0,2	53,8±0,3	62,3±0,1	53,7±0,2	
	6	1,9±0,1	87,9±0,3	100,7±0,2	101,2±0,1	
kadaverin (mg/kg)	5	4,4±0,1	12,4±0,2	14,9±0,2	15,2±0,1	
	6	2,0±0,2	13,8±0,2	19,1±0,1	39,9±0,2	
Výrobce B						
tyramin (mg/kg)	7	185,7±0,3	136,1±0,2	154,9±0,2	185,0±0,3	
	8	195,3±0,3	199,9±0,2	258,7±0,3	262,5±0,2	
histamin (mg/kg)	7	nedetekováno	0,6±0,2	1,9±0,3	3,6±0,2	
	8	nedetekováno	4,9±0,3	10,4±0,2	11,1±0,3	
putrescin (mg/kg)	7	1,3±0,1	66,0±0,1	93,9±0,3	113,9±0,3	
	8	1,2±0,2	144,1±0,3	157,0±0,2	176,7±0,2	
kadaverin (mg/kg)	7	0,6±0,4	5,1±0,2	7,6±0,2	7,6±0,3	
	8	0,7±0,3	11,9±0,2	12,5±0,2	13,1±0,1	

0,6–11,1 mg/kg výrobků (tabulka III a IV). NOUT (1994) uvádí, pokud je výroba fermentovaných salámů provedena v dobrých hygienických podmínkách a je použita kvalitní surovina, měla by se koncentrace histaminu ve finálních výrobcích pohybovat v rozmezí 50–100 mg/kg.

Bylo prokázáno, že ve všech výrobcích s přídavkem probiotické kultury *L. casei* 01 došlo ke snížení koncentrace biogenních aminů tyraminu, putrescinu a kadaverinu. Bylo statisticky prokázáno ($P < 0,01$), že koncentrace biogenních aminů tyraminu, putrescinu a kadaverinu ve výrobcích č. 1, 3, 5 a 7 byla nižší v porovnání s příslušnými negativními kontrolami (výrobky č. 2, 4, 6 a 8 bez přídavku probiotického kmene).

Kvantitativně nejvíce zastoupenými biogenními aminy byly tyramin a putrescin. Některými autory bylo publikováno, že nižší pH výrobků podporuje tvorbu biogenních aminů (MAIJALA a kol., 1995; ROIG-SAGUÉS a kol., 1998). Závěry jiných studií však jsou opačného názoru a tvrdí, že rozhodujícím faktorem pro tvorbu biogenních aminů je vyšší pH, pH nad 5,3 (MAIJALA a EEROLA, 1993; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 1997). U výrobků č. 1–4 nebyla prokázána statistická závislost tvorby biogenních aminů na pH výrobků ($P < 0,01$), pH profily probiotických výrobků a kontrol bez probiotik se prakticky nelišily (příloha 4). U výrobků č. 5–8 lze na základě provedené statistické analýzy konstatovat, že histamin a putrescin prokázaly významnou statistickou závislost na pH ($P < 0,01$), u obou výrobců. Lze tedy prohlásit, že jejich nižší hodnoty skutečně souvisí s nižší hodnotou pH. U tyraminu a kadave-

rinu nebyla statistická závislost (lineární) potvrzena ($P < 0,01$).

Statisticky byl dále vyhodnocen vliv přídavku probiotické kultury *L. casei* 01 na tvorbu biogenních aminů. Mezi vzorky č. 1, 2, 3 a 4 byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,01$) v koncentracích všech stanovovaných biogenních aminů. Probiotické výrobky (vzorky č. 1 a 3) vykazovaly staticky nižší ($P < 0,01$) koncentraci tyraminu, histaminu, putrescinu i kadaverinu než negativní kontroly bez probiotik (vzorky č. 2 a 4). U probiotického salámu výrobce A (vzorek č. 1) byla zjištěna nižší koncentrace tyraminu a histaminu a vyšší koncentrace putrescinu a kadaverinu v porovnání s probiotickými salámy výrobce B (vzorek č. 3).

Mezi vzorky č. 5, 6, 7 a 8 byl také zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,01$) v koncentracích všech stanovovaných biogenních aminů. Probiotické výrobky (vzorky č. 5 a 7) opět vykazovaly statisticky nižší ($P < 0,01$) koncentraci tyraminu, histaminu, kadaverinu i putrescinu než negativní kontroly bez probiotik (vzorky č. 6 a 8). U probiotického salámu výrobce A (vzorek č. 5) byla zjištěna nižší koncentrace tyraminu, histaminu, kadaverinu i putrescinu než u probiotického salámu výrobce B (vzorek č. 7).

U obou výrobců se tedy podařilo statisticky prokázat, že přídavek probiotické kultury (0,25 % i 0,40 %) měl vliv na produkci biogenních aminů – v obou případech došlo ke statisticky průkaznému snížení tvorby biogenních aminů (v porovnání s negativními kontrolami bez probiotik). Dále bylo statisticky prokázáno ($P < 0,01$), že se produkce jednotlivých biogenních aminů lišila mezi výrobcem A a B.

Dále byl zjišťován vliv různých přídavek probiotické kultury *L. casei* 01 (0,25% a 0,40%) na koncentraci biogenních aminů ve fermentovaných salámech. Mezi vzorky č. 1, 3, 5 a 7 byl zjištěn významný statistický rozdíl ($P < 0,01$) v koncentracích všech stanovovaných biogenních aminů. U výrobce A (výrobky č. 1 a 3) došlo ke statisticky průkaznému po-

klesu ($P < 0,01$) koncentrace putrescinu a kadaverinu po přidavku vyššího množství (0,40%) probiotické kultury *L. casei* 01. U výrobce B (výrobky č. 5 a 7) došlo ke statisticky průkaznému poklesu ($P < 0,01$) koncentrace u všech stanovovaných BA (tyramin, putrescin, kadaverin, histamin) po přidavku vyššího množství (0,40%) probiotické kultury *L. casei* 01.

biogenní aminy, HPLC, *L. casei* 01, fermentované salámy, Herkules

SUMMARY

In the last years, the addition of probiotics into fermented sausages became more popular. 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 (HAMMES and HERTEL, 1998). The suggested concentration for probiotic bacteria is in range $10^6 - 10^7$ cfu/g of the product (ROBINSON, 1987).

The growth of LAB and probiotic bacteria in fermented sausages depends on their ability to tolerate the salty concentration, pH values and water activity of these products (MARTÍN et al., 2007).

A number of health benefits have been claimed for probiotic bacteria such as *Lactobacillus casei*. Because of the potential health benefits, this organism is increasingly incorporated into different types of fermented foods. We tested probiotic *L. casei* 01 strain (Sacco, Italy) to be used in production of typical czech fermented sausage "Herkules" (probiotic Herkules).

The aim of this work was also to study the influence of probiotic strain *L. casei* 01 (Sacco, Italy) on biogenic amines concentrations during fermentation, ripening and storage of those fermented sausages. Two amounts of probiotic strain were added into sausages, 0,25% and 0,40%, respectively. Negative controls without probiotic were also made. Dry sausages were taken from two different producers (A, B). Determination of biogenic amines tyramine, histamine, putrescine and cadaverine concentration was used using HPLC method with UV detection. The content of biogenic amines was monitored during fermentation (0–28 days) and storage (28–49) of fermented sausages.

In both producers, when 0,25% of probiotic strains was added, 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). When 0,40% of probiotic *L. casei* 01 was added, the amount of *L. casei* cells were around 10^6 CFU/g during the whole fermentation and storage period. The presence of live probiotic cells of *L. casei* in that amounts at the beginning of ripening and during the whole storage period documents survival of probiotic culture in the product.

Biogenic amines are formed by the microbial decarboxylation of free amino acids in food and they are generally present in dry sausages as reviewed by MAIJALA et al. (1995) and EEROLA et al. (1993). A positive influence on the reduction of biogenic amines was observed in both producers. In negative controls without probiotic, the higher concentration of tyramine, histamine, putrescine and cadaverine was detected in comparison with probiotic sausages.

Differences between dry sausages with 0,25% and 0,40% probiotic *L. casei* 01 were also determined. In producer A, the concentration of putrescine and cadaverine in 0,40% probiotic sausages were statistically lower in comparison with probiotic sausages where 0,25% *L. casei* was applied. In producer B, the concentration of all monitored biogenic amines were statistically lower in 0,40% probiotic sausages when compared with 0,25% probiotic sausages.

We have shown that dry sausages are products, which may be suitable carriers for probiotics. Evidently, *L. casei* 01 (Sacco, Italy) was well adapted to dry sausages environment and could have inhibitory effect on microorganisms producing BA.

LITERATURA

- ANDERSEN, L., 1998: Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. *International Commitment of Meat Science and Technology, Anais*: 826–827.
- 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.

- BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., HOFERKOVÁ, P., 2008: Biogenic amines reduction by probiotic *L. casei* during ripening of fermented sausages. *Supplement Chemické listy*. sv. 102, č. 1, 601–604. ISSN 0009-2770.

- DE VUYST, L., FALONY, G., LEROY, F., 2008: Probiotics in fermented sausages. *Meat Science*, 80: 75–78.
- DEMEYER, D. J., VANNDERKERHOVE, D. I., MOERMANS, R., 1979: Compounds determining pH in dry sausages. *Meat Sci.* 3: 161–167.
- EEROLA, S., HINKKANEN, R., LINDFORS, E., HIRVI, T., 1993: Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. AOAC Int.* 76: 575.
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GURZONI, M. E., SUZZI G., 2001: Effects on pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 64: 105–117.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., SANTOS, E. M., ROVIRA, J., JAIME, I., 2006: The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74: 467–475.
- HAMMES, W. P., HERTEL, C., 1998: New developments in meat starter culture. *Meat Sci.* 49: S-25–S138.
- INGR, I., 1996: *Technologie masa*. 1. vyd. Brno: MZLU. 273 s. ISBN 80-7157-193-8.
- KALÁČ, P., 2003: Funkční potraviny – kroky ke zdraví. *Dona, České Budějovice*, 130 s., ISBN 80-7322-029-6.
- KALÁČ, P., KRÍŽEK, M., 2005: Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*, 2: 40–42.
- KAMENÍK, J., 2007: Technologie fermentovaných trvanlivých salámů z pohledu prevence vad finálních produktů. *Maso*, 18, 3: 12–14.
- 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.
- fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 419–431.
- KOMPRDA, T., 2005: Biogenní aminy a polyamidy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství – odborný a stavovský měsíčník*, 55, 10: 646–650, ISSN 0506 8231.
- KRÖCKEL, I., 1995: Bacterial fermentation of meats. In Campbell-Platt, G., Cook, P. E. *Fermented meats*. UK: Blackie Academic & Professional.
- MAIJALA, R., EEROLA, S., 1993: Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Sci.* 35: 387–395.
- MAIJALA, R., NURMI, E., FISHER, A., 1995: Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat Sci.* 39: 9–22.
- MARIANSKI, S., MARIANSKI, A., 2008: *The Art of Making Fermented Sausages*. *Outskirts Press*. 256 s. ISBN 987-1-4327-3257-8.
- MARTÍN A., COLÍN, B., ARANDA, E., BENITO, M. J., CORDOBA, M. G., 2007: Characterization of *Micrococaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science*, 75: 696–708.
- NOUT, M. J. R., 1994: Fermented foods and food safety. *Food Research Int.* 27, 291.
- ROBINSON, R. K.: 1987: Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. *S Afr J Dairy Sci*, 19: 25–27.
- ROIG SAGUÉS, A. X., HERNÁNDEZ HERRERO, M. M., RODRÍGUEZ JEREZ, J. J., QUINTO FERNÁNDEZ, E. J., MORA VENTURA, M. T., 1998: Aminas biógenas en queso: riesgo toxicológico y factores que influyen en su formación. *Alimentaria* 7: 59–66.
- SHALABY, A. R., 1996: Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 7: 675–690.
- STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., VORLOVÁ, L., 2008: Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 58: 735–739.
- SUZZI G., GARDINI F., 2003: Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 41–54.

Adresa

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

