

KAROLINA M. WÓJCIAK, ZBIGNIEW J. DOLATOWSKI,
DANUTA KOŁOŻYN-KRAJEWSKA

**STABILNOŚĆ OKSYDACYJNA EKOLOGICZNEJ KIEŁBASY
SUROWO DOJRZEWAJĄCEJ Z DODATKIEM PROBIOTYCZNEGO
SZCZEPU *LACTOBACILLUS CASEI* LOCK 0900 I SERWATKI
KWASOWEJ**

Streszczenie

Celem badań była ocena stabilności oksydacyjnej kielbasy surowo dojrzewającej z dodatkiem serwatki kwasowej lub probiotyku (*Lb. casei* LOCK 0900) podczas czteromiesięcznego okresu chłodniczego przechowywania (4 °C).

Wyprodukowano cztery warianty doświadczalne wyrobu: K – peklowaną kielbasę kontrolną (2,8 % peklosoli), L – kielbasę z solą morską (2,8 %) i szczepem probiotycznym *Lb. casei* LOCK 0900 (log 6,3 jtk/g), S – kielbasę z solą morską (2,8 %) i serwatką kwasową (5,0 %) oraz LG – kielbasę z solą morską (2,8 %), probiotykiem i glukozą (0,6 %).

Badania obejmowały oznaczenie: wartości pH, aktywności wody (a_w), potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (ORP), liczby nadtlenkowej (LOO), wskaźnika TBARS, krzywej reflektanci, a także wskaźnika utlenienia i wskaźnika 650/570 nm charakteryzującego barwę wyrobu po procesie dojrzewania (0) oraz po czteromiesięcznym okresie chłodniczego przechowywania. Oznaczono również liczbę bakterii kwasu mlekowego (LAB) po czteromiesięcznym okresie przechowywania.

Stwierdzono istotnie niższą ($p < 0,001$) wartość pH w próbie z dodatkiem bakterii probiotycznych i glukozy (LG) oraz w próbie z dodatkiem serwatki kwasowej (S) w porównaniu z pozostałymi próbkami bezpośrednio po dojrzewaniu oraz podczas przechowywania. Istotnie niższe ($p < 0,05$) wartości liczby nadtlenkowej obserwowano po dojrzewaniu w próbie kontrolnej (K) oraz w próbie z probiotykiem (L) w porównaniu z pozostałymi próbkami. We wszystkich wyrobach, z wyjątkiem próby z probiotykiem i glukozą (LG), wartość liczby nadtlenkowej istotnie zwiększyła się o ok. 2,0 meqO₂/kg po czteromiesięcznym przechowywaniu. Istotnie wyższe ($p < 0,001$) wartości wskaźnika TBARS obserwowano w próbach z dodatkiem serwatki kwasowej (S) oraz probiotyku i glukozy (LG) w porównaniu z pozostałymi próbkami. Procesy oksydacyjne przebiegały najwolniej w próbie peklowanej (K). W próbach z dodat-

Dr inż. K. M. Wójciak, prof. dr hab. Z. J. Dolatowski, Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 20, 20-704 Lublin, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa. Kontakt: karolina.wojciak@up.lublin.pl

kiem szczepu *Lb. casei* LOCK 0900 wariant z dodatkiem glukozy (LC) charakteryzował się najniższym wskaźnikiem utleniania oraz wskaźnikiem 650/570 nm świadczącym o wytworzeniu w wyrobie barwy zbliżonej do barwy wyrobu peklowanego. Najwyższą wartość wskaźnika 650/570 nm uzyskano w próbie z dodatkiem serwatki kwasowej (S) po dojrzewaniu oraz po czteromiesięcznym przechowywaniu. Stabilność oksydacyjna badanych prób malała według następującej kolejności: K > LG > L > S. We wszystkich próbach badawczych obserwowano liczbę pałeczek bakterii mlekowych w liczbie wyższej niż log 7,0 jtk/g.

Słowa kluczowe: kielbasa surowo dojrzewająca, probiotyk, serwatka kwasowa, sól morska, glukoza, ekologiczne wyroby mięsne

Wprowadzenie

Konsument coraz częściej poszukuje żywności powstałej w warunkach zbliżonych do naturalnych, spełniającej jego oczekiwania odżywcze, niezawierającej pozostałości antybiotyków, pestycydów, hormonów, substancji dodatkowych czy GMO [24].

Wymagania te spełniają wędliny ekologiczne produkowane z mięsa pochodzącego ze zwierząt chowanych bez stymulatorów wzrostu, żywionych pokarmem pochodzącym z upraw ekologicznych. Do wyrobu wędlin ekologicznych stosowane jest mięso rodzimych ras trzody chlewnej i bydła o genetycznej odporności na choroby, wysokiej płodności, długowieczności oraz dużej zdolności adaptacji do warunków środowiskowych [23, 24].

W produkcji fermentowanych wędlin istotnym procesem jest peklowanie mięsa polegające na stosowaniu mieszaniny soli z azotanem(III) i/lub azotanem(V) (E250, E251, E252). Peklowanie kształtuje właściwości fizykochemiczne (pożądaną barwę, smak oraz zapach), stabilność oksydacyjną, a co najważniejsze, hamuje rozwój patogennych drobnoustrojów, szczególnie *Clostridium botulinum* i *Listeria monocytogenes* [10]. Mechanizm tworzenia barwy peklowanego mięsa jest skomplikowany. Wiele czynników determinuje ten proces. Należą do nich: skład chemiczny mięsa, rodzaj substancji dodatkowych stosowanych podczas produkcji, aktywność enzymów własnych tkanki mięśniowej, zawartość mioglobiny, potencjał oksydacyjno-redukcyjny, obecność azotanu(III) i azotanu(V) sodu. W fermentowanych wyrobach mięsnych proces tworzenia pożądanej barwy jest jeszcze bardziej skomplikowane ze względu na obecność mikroflory rodzimej oraz celowo dodanej w procesie produkcji. Ze względu na wysoką reaktywność azotanu(III) sodu i możliwość tworzenia z aminami biogennymi kancerogennych nitrozoamin, szczególnie w środowisku kwaśnym i w podwyższonej temperaturze, ogranicza się jego stosowanie [3, 24, 25]. Restrykcyjne wymagania odnośnie do stosowania azotanów(III) w mięsnych wyrobach ekologicznych występują w USA, UE, Kanadzie i innych [24].

Poszukuje się alternatywnych metod prowadzących do uzyskania pożądanej czerwonej barwy zbliżonej do nitrozylomioglobiny bez stosowania azotanu(III) sodu. Morita i wsp. [17] dowodzą, że nitrozylomioglobina w fermentowanych wyrobach mięsnych może powstawać bez udziału mieszanki peklującej. Autorzy sugerują, że niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Staphylococcus* w wyniku prowadzonego procesu proteolizy wytwarzają tlenek azotu z L-argininy, który następnie może łączyć się z cząsteczką mioglobiny tworząc nitrozylomioglobinę.

Trwałość mięsnych wyrobów dojrzewających zależy od szybkości utleniania tłuszczów i stabilizacji mikrobiologicznej, dlatego poszukuje się metod ograniczania niekorzystnych zjawisk. Należą do nich: pozyskiwanie surowca mięsnego o dużym potencjale antyoksydacyjnym lub wprowadzanie związków przeciwutleniających w trakcie procesu technologicznego [1, 2, 22, 23, 24].

Jedną z możliwych substancji do zastosowania w produkcji wędlin surowo dojrzewających może być serwatka kwasowa, stanowiąca produkt uboczny przy produkcji twarogów. Serwatka kwasowa pozyskana z surowego mleka ekologicznego zawiera cenne składniki, jak: białka (albuminy i globuliny), laktozę, tłuszcz, związki wapnia i fosforu, kwasy organiczne (mlekowy) oraz witaminy [22, 27]. W badaniach wykazano, że β -laktoglobulina serwatki stanowi źródło dipeptydu γ -glutamylcysteiny, prekursora glutationu o silnych właściwościach przeciwutleniających [9, 16, 27]. Forma zredukowana glutationu (GSH) utrzymuje równowagę oksydacyjno-redukcyjną poprzez redukcję reaktywnych form tlenu (RFT), zabezpieczenie przed utlenianiem grup sulfhydrylowych białek, zabezpieczenie prawidłowej struktury lipidów i białek przed działaniem wolnych rodników, działanie ochronne w stosunku do innych przeciwutleniaczy, np. kwasu askorbinowego i tokoferoli [16]. Ponadto, w serwatce kwasowej znajdują się kultury bakteryjne, w tym bakterie kwasu mlekowego niezbędne w procesie fermentacji produktów mięsnych. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że wybrane szczepy probiotyczne mogą być użyte do produkcji peklowanych kielbas surowo dojrzewających, a powstałe produkty mogą być przechowywane przez sześć miesięcy w warunkach chłodniczych bez obniżenia stabilności oksydacyjnej [28, 29]. Dane źródłowe informują, że niektóre szczepy bakterii probiotycznych należące do rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* wykazują działanie przeciwutleniające oraz antagonistyczne w stosunku do mikroflory patogennej [14] i mogą zapewniać stabilizację oksydacyjną i mikrobiologiczną żywności, wydłużając jej trwałość przechowalniczą. Jednocześnie charakteryzują się one zadowalającymi cechami mikrobiologicznymi, chemicznymi i sensorycznymi.

Celem badań było określenie możliwości zastosowania serwatki kwasowej oraz probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 do produkcji ekologicznej kielbasy surowo dojrzewającej wraz z oceną stabilności oksydacyjnej oraz barwy kiel-

bas po dojrzewaniu oraz po upływie czteromiesięcznego okresu chłodniczego przechowywania.

Material i metody badań

Surowiec do produkcji kielbasy dojrzewającej stanowiło mięso wieprzowe pochodzące z lokalnego gospodarstwa, pobierane z mięśni szynki, a także słonina. Surowce pozyskiwane były ze świń rasy wielka biała polska o masie przyżyciowej ok. 120 ÷ 130 kg chowanych w systemie ekologicznym (Certyfikat zgodności PL-03-000928/09/00). Zwierzęta były karmione paszą pochodzącą z gospodarstwa, w skład której wchodziły zboża ekologiczne (pszenica, jęczmień, owies i groch) oraz śruta i zielonka.

Materiał probiotyczny stanowił szczep *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, ożywiony w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW w Warszawie, metodą opisaną przez Jaworską i wsp. [13].

Serwatkę kwasową pozyskiwano z lokalnego gospodarstwa ekologicznego chowu bydła mlecznego i od producenta mlecznych produktów ekologicznych. Świeże niepasteryzowane mleko poddawano procesowi naturalnej fermentacji mlekowej. Następnie ogrzewano je do temp. 40 °C. Po zakończeniu kwasowej koagulacji mleka oddzielano serwatkę od skrzepu.

Materiał badawczy stanowiła modelowa kielbasa surowo dojrzewająca, w której skład wchodziło 80 % chudej szynki i 20 % twardej słoniny grzbietowej. Mięso poddano peklowaniu lub soleniu przez 48 h w temp. 2 °C, słoninę krojono w kostkę i mrożono w temp. -19 °C. Wychłodzone peklowane lub solone mięso rozdrabniano w wilku przez siatkę o średnicy oczek 8 mm. Rozdrobnione mięso mieszano z tłuszczem i dzielono na 4 porcje.

Przygotowano następujące warianty doświadczalne:

- K – kielbasa kontrolna peklowana, zawierająca 2,8 % peklosoli (o składzie: 99,4 ÷ 99,5 % chlorku sodu i 0,5 ÷ 0,6 % azotanu(III) sodu) i 5 % wody;
- S – kielbasa zawierająca 2,8 % soli morskiej i 5,0 % serwatki kwasowej;
- L – kielbasa zawierająca 2,8 % soli morskiej, log 6,3 jtk/g szczepu probiotycznego *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 i 5 % wody;
- LG – kielbasa zawierająca 2,8 % soli morskiej, log 6,3 jtk/g szczepu probiotycznego *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, 5 % wody i 0,6 % glukozy.

Przygotowanymi farszami napełniano osłonki fibrusowe o średnicy 58 mm. Produkty poddawano osadzaniu, a następnie trzytygodniowemu dojrzewaniu w temp. 18 °C i wilgotności względnej RH = 75 ÷ 85 %. Po dojrzewaniu kielbasy wędzono w zimnym dymie, a następnie pakowano próżniowo w woreczki z polietylenu o małej gęstości (LDPE). Wyroby poddawano badaniom po procesie dojrzewania (21 dni) i po czteromiesięcznym przechowywaniu w temp. 4 °C.

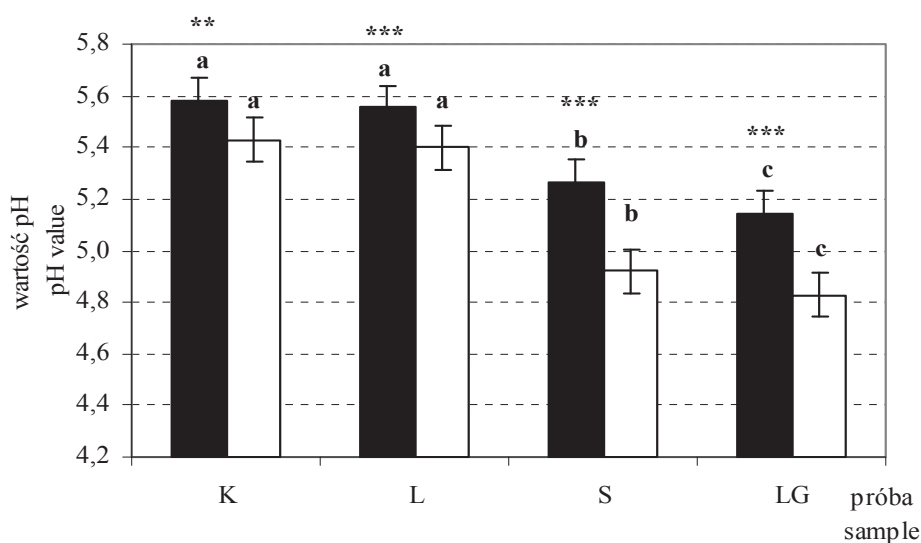
Kwasowość czynną (pH) oznaczano przy użyciu cyfrowego pH/konduktometru CPC 501 (Elmetron) i elektrody zespolonej typu ERH-111 (Elmetron). Aktywność wody (a_w) w wyrobie oznaczano w temp. 20°C przy użyciu urządzenia LabMaster (Novasina). Potencjał oksydacyjno-redukcyjny określano przy użyciu elektrody zespolonej platynowej typ ERPt-13 z zastosowaniem cyfrowego pH-konduktometru CPC-501 (Elmetron) metodą opisaną przez Ahn i Nam [1]. Ekstrakcję tłuszczu z kiełbasy przeprowadzano metodą opisaną przez Folcha i wsp. [6], a liczbę nadtlenkową, wyrażaną w meqO_2/kg , oznaczano zgodnie z normą [20]. Wskaźnik TBARS oznaczano metodą podaną przez Pikula i wsp. [19]. Intensywność różowego zabarwienia, powstałego w wyniku reakcji produktów utleniania tłuszczów z kwasem 2-tiobarbiturowym, mierzono z użyciem spektrofotometru Nicole Evolution 300 (Thermo Elektron Corporation) przy długości fali $\lambda = 532 \text{ nm}$. Pomiar parametrów barwy w systemie CIE $L^*a^*b^*$ wykonywano metodą odbiciową przy użyciu spektrofotometru sferycznego 8200 Series (X-Rite). Pomiar prowadzono z uwzględnieniem połysku (SPIN) w zakresie pomiarowym $\lambda = 360 \div 740 \text{ nm}$ przy wykorzystaniu standardowego źródła światła D65 oraz standardowego obserwatora kolorymetrycznego o polu widzenia 10° [11]. Wskaźnik utlenienia obliczano z krzywej reflektancji jako stosunek 630/580 nm, wskazujący na zmianę barwy mięsa. Kolejny wskaźnik określający intensywność barwy peklowanego mięsa obliczano ze stosunku wartości reflektancji uzyskanej przy długości fali $\lambda = 650$ i 570 nm (650/570 nm). Według Hunta i Kropfa [12] uzyskane wyniki można interpretować następująco: 1,1 – brak barwy peklowanego mięsa, 1,6 – spłowiała, wyblakła barwa mięsa peklowanego, 1,7 ÷ 2,0 – barwa mięsa peklowanego o małej intensywności, 2,6 – pełna, intensywna barwa peklowanego mięsa.

W celu oznaczenia ogólnej liczby bakterii kwasu mlekowego (LAB) zastosowano automatyczny system do pomiaru liczby drobnoustrojów – TEMPO® wraz z oryginalnymi testami TEMPO® LAB. Oznaczenie liczby bakterii kwasu mlekowego, w tym bakterii probiotycznych przeprowadzono metodą opisaną przez Jaworską i wsp. [13] w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW w Warszawie. Czas inkubacji kart zawierających 16 cel wypełnionych podłożem hodowlanym, zaszczerpionych badaną próbą wynosił 40 h w temp. 37 °C. Wyniki badań podano w jednostkach tworzących kolonie w jednym gramie produktu [jtk/g].

Doświadczenie przeprowadzono na dwóch partiach mięsa, w co najmniej dwóch powtórzeniach. Dokonano charakterystyki próby, obliczając wartości średnie (\bar{x}) oraz odchylenia standardowe (s). Otrzymane wyniki poddano statystycznej analizie wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi określano na poziomie istotności $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ przy zastosowaniu testu T-Tuckeya.

Wyniki i dyskusja

Kształtowanie jakości fermentowanych ekologicznych produktów mięsnych zależy od kierunku i szybkości przemian fizykochemicznych i biochemicznych. Kielbasy surowo dojrzewające ulegają przemianom, które mogą powodować podwyższenie lub obniżenie jakości. Przemiany spowodowane utlenianiem lipidów są główną przyczyną niepożądanych zmian chemicznych i sensorycznych prowadzących do ograniczenia lub uniemożliwienia dalszego przechowywania fermentowanych produktów mięsnych [5, 7].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

a, b, c – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w obrębie różnych próbek nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / mean values denoted by the same letters within different samples do not differ statistically significantly ($p > 0.05$); wartości średnie oznaczone asteryskiem w obrębie próby różnią się statystycznie istotnie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ // mean values denoted by asterisks within the same sample differ statistically significantly: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; N.S. – różnice statystycznie nieistotne / statistically insignificant differences.

Rys. 1. Wartość pH ekologicznej kielbasy surowo dojrzewającej oznaczona bezpośrednio po dojrzewaniu (■) oraz po 4-miesięcznym chłodniczym przechowywaniu (□).

Fig. 1. pH value in organic dry-fermented sausage as determined immediately after ripening (■) and after 4-month period of chilling storage (□).

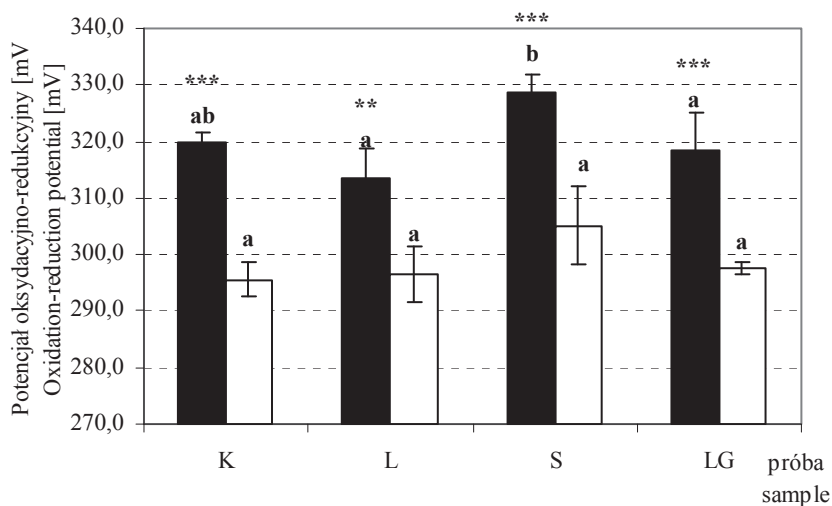
Wykazano istotny wpływ zastosowanych dodatków (serwatki kwasowej, szczepu probiotycznego i glukozy) oraz czasu przechowywania na zmiany kwasowości (rys. 1). Bezpośrednio po dojrzewaniu obserwowano istotnie ($p < 0,05$) niższe wartości pH w próbie z dodatkiem serwatki kwasowej (S) oraz w próbie ze szczepem *Lb. casei*

ŁOCK 0900 i glukozą (LG) w porównaniu z pozostałymi próbkami. Najniższą, statystycznie istotną wartością pH (5,15) charakteryzowała się próba z probiotykiem i glukozą po okresie dojrzewania oraz po czteromiesięcznym przechowywaniu (4,8). We wszystkich próbach doświadczalnych stwierdzono istotne obniżenie wartości pH po czterech miesiącach chłodniczego przechowywania. Obserwowana wysoka kwasowość w próbce z serwatką (S) wynikała prawdopodobnie z jej składu chemicznego, głównie z obecności kwasu mlekowego, a także z postępującego procesu fermentacji mono- i disacharydów prowadzonego przez bakterie kwasu mlekowego wprowadzone do farszu mięsnego z serwatką. W przypadku próby z probiotykiem obniżenie wartości pH było prawdopodobnie związane z procesem fermentacji cukrów zawartych w mięsie do kwasów organicznych, głównie kwasu mlekowego. Potwierdzają to wyniki badań innych autorów [2, 8, 28, 29]. Niższa wartość pH w próbce, w której zastosowano oprócz probiotyku dodatek glukozy wynikała prawdopodobnie z większej dostępności monosacharydu do procesu fermentacji przez pałeczki kwasu mlekowego.

Analiza aktywności wody (a_w) w kielbasie surowo dojrzewającej po procesie dojrzewania wykazała, że najniższą jej wartość stwierdzono w próbce z probiotykiem i glukozą (LG) – 0,86 (\pm 0,01), najwyższą zaś w próbce z serwatką kwasową (S) – 0,88 (\pm 0,02). Pozostałe próby charakteryzowały się wartością aktywności wody na poziomie 0,87 (\pm 0,02). Po czteromiesięcznym przechowywaniu kielbas nastąpiło obniżenie o ok. 0,1 wartości aktywności wody we wszystkich próbach, z wyjątkiem próby z serwatką kwasową, w której nie obserwowano zmiany wartości a_w . Obserwowana na początku okresu chłodniczego przechowywania niższa wartość aktywności wody w próbce z dodatkiem probiotyku i glukozy (0,86 \pm 0,01) w porównaniu z pozostałymi próbkami mogła wynikać z istotnie niższej wartości pH tych kielbas. Możliwe, że produkowane przez *Lb casei* ŁOCK 0900 kwasy organiczne spowodowały denaturację struktur białkowych mięsa. Obniżenie wartości aktywności wody o ok. 0,1 jednostki w próbach przechowywanych mogło wynikać z postępującej proteolizy i peptydolizy oraz hydrolizy triacylogliceroli, zachodzących w kielbasach [2, 21, 26], prowadzących do powstania związków niskocząsteczkowych.

Procesy oksydacyjne w peklowanych i solonych mięsnych produktach dojrzewających stanowią główny problem powodujący obniżenie jakości oraz znaczne skrócenie terminu przydatności do spożycia [4, 5, 7]. Produkty powstałe w wyniku oksydacji tłuszczów i białek wpływają na zmianę zapachu i smaku produktu oraz utratę pożądanej barwy. Dodatkowo wpływają na obniżenie wartości odżywczej wyrobu, a niekiedy mogą prowadzić do powstania związków toksycznych dla człowieka, np. oksysteroli [4, 5]. Autorzy [1, 4, 5, 7, 21] podają, że wartość pH, skład kwasów tłuszczowych, temperatura, potencjał oksydacyjno-redukcyjny, ekspozycja na światło, zawartość żelaza hemowego i wolnego oraz siła jonowa mają kluczowe znaczenie w procesie oksydacji lipidów.

Po przeanalizowaniu wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego kielbas wykazano statystycznie istotny wpływ serwatki kwasowej oraz probiotycznego szczepu na uzyskane wartości (rys. 2). Wartość potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (ORP) próby z dodatkiem serwatki (S) kształtowała się na istotnie ($p < 0,05$) wyższym poziomie w porównaniu z pozostałymi próbami badanymi bezpośrednio po dojrzewaniu. Nie obserwowano istotnych różnic pod względem potencjału redox pomiędzy próbą z probiotykiem (L) a próbą z probiotykiem i glukozą (LG) bezpośrednio po dojrzewaniu. Po czteromiesięcznego chłodniczym przechowywaniu stwierdzono istotne obniżenie wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego wszystkich badanych kielbas o ok. 20 mV. Nie wykazano istotnych różnic potencjału oksydacyjno-redukcyjnego pomiędzy próbami kielbas po przechowywaniu. Obserwowane istotnie niższe wartości potencjału redox przechowywanych kielbas mogą sprzyjać postępowaniu procesów redukcyjnych w wyrobie oraz zachowaniu ich pożądanej czerwonej barwy. Ahn i Nam [1] wykazali, że niski poziom potencjału oksydacyjno-redukcyjnego wynikający z dodatku substancji o charakterze przeciwutleniającym wpływa na stabilizację żelaza w cząsteczce hemu na drugim stopniu utlenienia (Fe^{2+}). Przeciwdziała to powstawaniu szaro-brunatnej metmioglobiny zawierającej w centrum pierścienia porfirynowego hemu żelazo na trzecim stopniu utlenienia (Fe^{3+}) oraz uwalnianiu żelaza z pierścienia

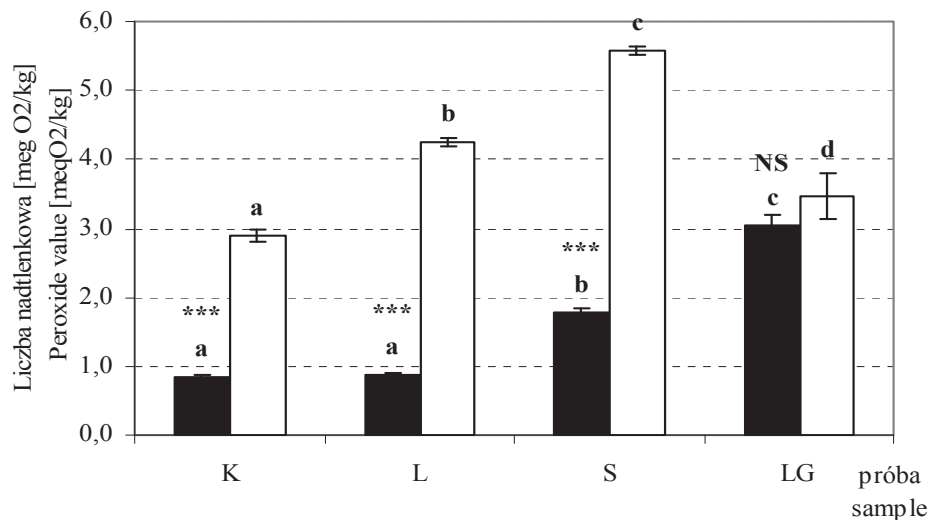


Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Potencjał oksydacyjno-redukcyjny ekologicznej kielbasy surowo dojrzewającej, badany bezpośrednio po dojrzewaniu (■) oraz po 4-miesięcznym chłodniczym przechowywaniu (□).

Fig. 2. Oxidation-reduction potential [mV] of organic dry-fermented sausage as analyzed immediately after ripening (■) and after 4 month period of chilling storage (□).

porfirynewego cząsteczki mioglobiny. Podobne wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego uzyskali Wójciak i wsp. [29] w badaniach peklowanych kielbas surowo dojrzewających z dodatkiem probiotycznego szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900, w trakcie sześciomiesięcznego chłodniczego przechowywania.



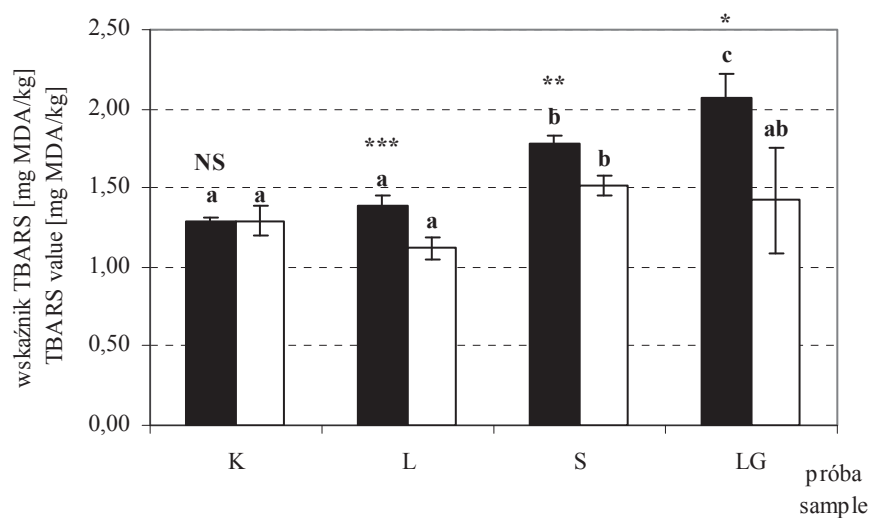
Objaśnienie jak pod rys. 1./ Explanatory note as in Fig. 1.

Rys. 3. Liczba nadtlenkowa [meqO₂/kg] ekologicznej kielbasy surowo dojrzewającej, badana bezpośrednio po dojrzewaniu (■) oraz po 4-miesięcznym chłodniczym przechowywaniu (□).

Fig. 3. Peroxide value [meq O₂/kg] of organic dry-fermented sausage as analyzed immediately after ripening (■) and after 4 month period of chilling storage (□).

Bezpośrednio po dojrzewaniu stwierdzono istotnie wyższe ($p < 0,05$) zawartości nadtlenków w próbach S i LG, wynoszące odpowiednio: 1,97 i 3,0 meq O₂/kg w porównaniu z pozostałymi próbkami (rys. 3). W kielbasach przechowywanych cztery miesiące w warunkach chłodniczych najwyższą statystycznie istotną ($p < 0,05$) wartość liczby nadtlenkowej oznaczono w próbce z serwatką kwasową (5,5 meq O₂/kg), najniższą zaś w próbce kontrolnej (3,0 meq O₂/kg). Po 4-miesięcznym chłodniczym przechowywaniu we wszystkich próbach wystąpił istotny ($p < 0,001$) wzrost wartości liczby nadtlenkowej o ok. 2,5 meq O₂/kg w porównaniu z badaniem przeprowadzonym po dojrzewaniu, z wyjątkiem próby z dodatkiem szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900 oraz glukozy (LG), w której nie stwierdzono istotnej ($p > 0,05$) różnicy wartości liczby nadtlenkowej w trakcie przechowywania. Wyższa wartość liczby nadtlenkowej w próbce z serwatką mogła wynikać z obecności H₂O₂ w serwatce kwasowej na skutek działalności bakterii kwasu mlekowego, który może stać się katalizatorem reakcji oksydacji

lipidów oraz może wpływać na tworzenie się pochodnych mioglobiny o zielonkawym zabarwieniu. W wyniku tego procesu może dochodzić do niekorzystnej zmiany barwy (powstawanie barwy brązowo-szarej, mało intensywnej), niekorzystnych zmian smaku i zapachu (smak i zapach jełki, przechowalniczy) oraz zmniejszenia wartości odżywczej. Wyższe wartości liczby nadtlenkowej w próbach kielbas bez dodatku azotanów mogą wynikać z utleniającego oddziaływania chlorku sodu i innych związków zawartych w soli morskiej na składniki mięsa, co potwierdzają wyniki badań innych autorów [25].



Objaśnienie jak pod rys. 1. / Explanatory note as in Fig. 1.

Rys. 4. Wskaźnik TBARS [mg MDA/kg] ekologicznej kielbasy surowo dojrzewającej, badany bezpośrednio po dojrzewaniu (■) oraz po 4-miesięcznym chłodniczym przechowywaniu (□).

Fig. 4. TBARS value [mg MDA/kg] of organic dry-fermented sausage as analyzed immediately after ripening (■) and after 4 month period of chilling storage (□).

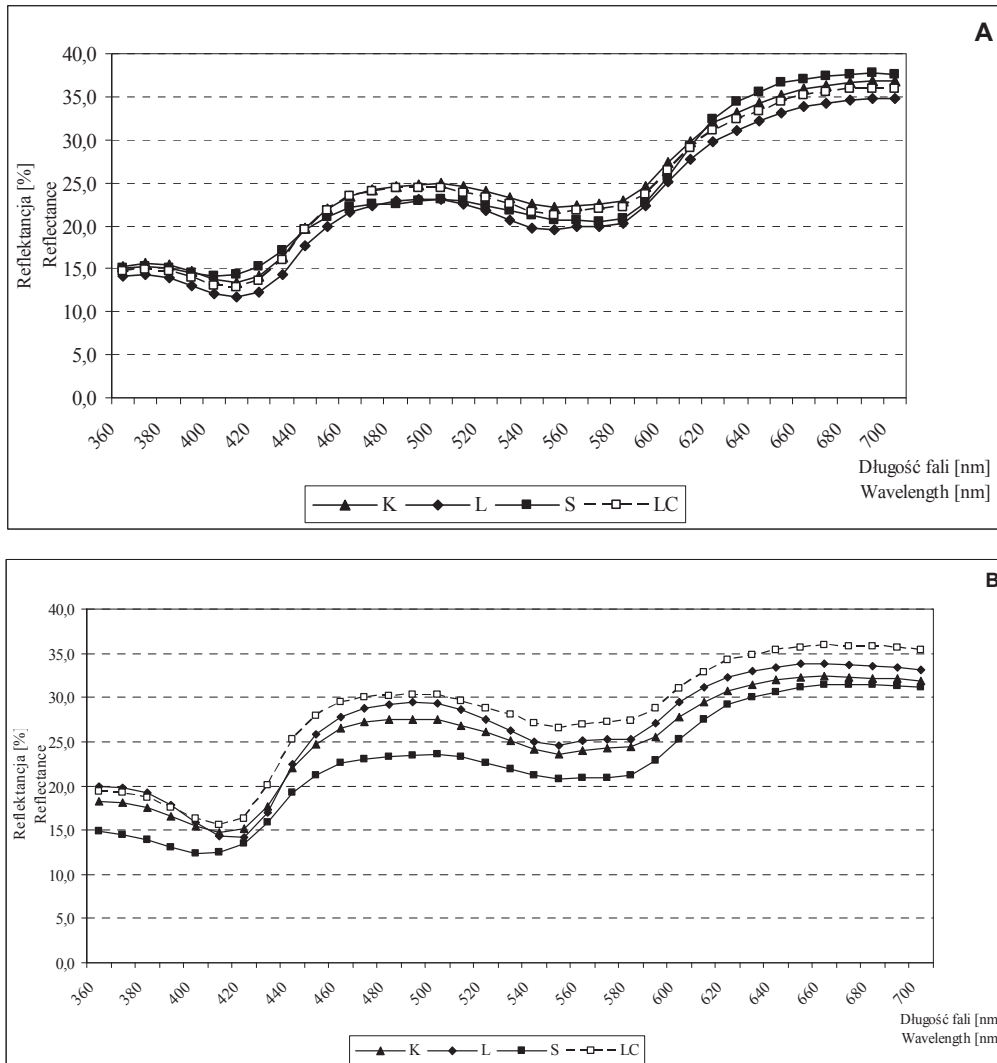
Pod względem wskaźnika TBARS (rys. 4) wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy badanymi próbkami bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po chłodniczym przechowywaniu. Stwierdzono istotnie wyższe wartości wskaźnika TBARS kielbasy z serwatką kwasową (S) oraz próby z probiotykiem i glukozą (LG) w porównaniu z pozostałymi próbkami. Najwyższą, statystycznie istotną wartością wskaźnika TBARS charakteryzowała się próba z probiotykiem i glukozą (ok. 2,0 mg MDA/kg), najniższą zaś – próba kontrolna (1,3 mg MDA/kg). Istotne obniżenie wartości wskaźnika TBARS, o 0,3 mg MDA/kg, nastąpiło w próbce z probiotykiem ($p < 0,001$), o 0,5 mg MDA/kg – w próbce z serwatką ($p < 0,01$) oraz o 0,7 mg MDA/kg – w próbce z probiotykiem i glukozą ($p < 0,05$) po czteromiesięcznym przechowywaniu kielbas. Istotnie

wyższa wartość wskaźnika TBARS prób z probiotykiem mogła wynikać ze zdolności szczepu *Lb. casei* ŁOCK do produkcji H_2O_2 , który z jednej strony wykazuje toksyczne działanie na patogeny, ale z drugiej przejawia proutleniające działanie na składniki żywności. Potwierdzają to inne badania kielbas surowo dojrzewających z udziałem analizowanego szczepu [28, 29]. Wyprodukowane kielbasy podczas całego okresu chłodniczego przechowywania charakteryzowały się wskaźnikiem TBARS niższym niż 2,5 mg MDA/kg.

Podobne wyniki uzyskali González-Fernández i wsp. [8] w badaniach kielbas surowo dojrzewających. Inni autorzy [4, 5, 21] badający wyroby surowo dojrzewające potwierdzają, że wyższe wartości wskaźnika TBARS (ok. 2,21 mg MDA/kg) nie muszą świadczyć o złej jakości wyrobów dojrzewających, gdyż oznaczane tą metodą aldehydy stanowią niezbędny element bukietu smakowo-zapachowego powstającego w trakcie biochemicznych przemian frakcji tłuszczowej zachodzącej podczas dojrzewania i przechowywania wyrobu. Należy podkreślić, że we wszystkich próbach własnych, z wyjątkiem próby z serwatką kwasową (S), poziom nadtlenuków wynosił poniżej 4,0 meq O_2 /kg, która to wartość, według Chizzolini i wsp. [4], klasyfikuje wyrób jako produkt o dobrej jakości (2 - 4 meq O_2 /kg).

Udowodniono, że oksydacja lipidów może powodować niekorzystne zmiany barwy wyrobów mięsnych na skutek reakcji zachodzącej między wtórnymi produktami oksydacji lipidów (4-HNE) a mioglobina [4, 5]. Wolne rodniki lipidowe powstałe w procesie peroksydacji lipidów mogą katalizować utlenianie żelaza (Fe^{2+}) oksymyoglobiny do szarobrunatnej metmyoglobiny (Fe^{3+}) [7].

Analiza widma spektrofotometrycznego odbiciowego w zakresie od 360 do 740 nm prowadzona bezpośrednio po dojrzewaniu (rys. 5A) wykazała, że kształt krzywych reflektancji we wszystkich wyrobach był zbliżony. Autorzy [16] podają, że w mięsie i produktach mięsnych w zakresie od 540 do 580 nm obserwuje się obniżenie krzywych wynikające z maksymalnych absorbancji oksymyoglobiny przy tych długościach fali. Wszystkie warianty badawcze charakteryzowały takie same minima (obniżenia krzywych) oraz maksima (piki). Wykazano, że w badanym zakresie długości fal występuje wyraźny pik przy $\lambda = 480 \div 510$ nm i w zakresie od 630 do 700 nm oraz obniżenie krzywych przy 420 oraz 560 nm. W ekologicznych kielbasach dojrzewających zaobserwowano dodatkowy niewielki pik przy długości fali $\lambda = 540$ nm, co może sugerować widoczny wzrost zabarwienia żółtego, pomarańczowego i czerwonego (rys. 5B). Obserwowany pik (540 nm) stwierdzali również inni autorzy w mięsie i wyrobach mięsnych charakteryzujących się jasną, pastelową barwą. Niewielkie różnice między krzywymi reflektancji prób doświadczalnych wystąpiły po czteromiesięcznym okresie chłodniczego przechowywania. W kielbasach przechowywanych cztery miesiące (rys. 5B) zmierzono wyższe wartości reflektancji w zakresie od 440 do 540 nm (obszar, w którym nitrozylobarwniki wykazują maksimum absorpcji – 500 nm).

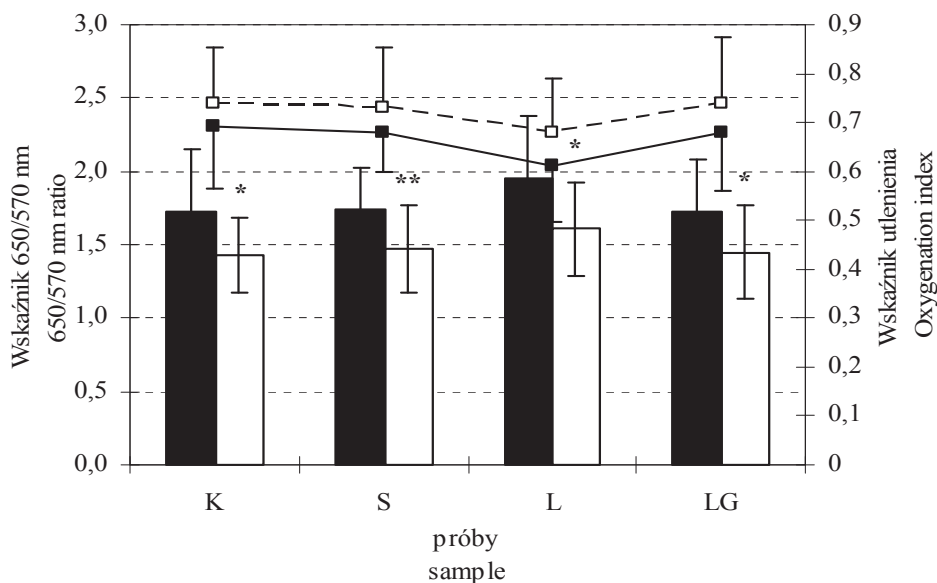


Rys. 5. Widmo odbiciowe ekologicznej kiełbasy surowo dojrzewającej, badane bezpośrednio po dojrzewaniu (A) oraz po 4-miesięcznym chłodniczym przechowywaniu (B).

Fig. 5. Reflectance spectrum in organic dry-fermented sausage as analyzed immediately after ripening (A) and after 4 month period of chilling storage (B).

Wartości wskaźników obliczonych na podstawie widma spektrofotometrycznego odbiciowego nie wykazały istotnych różnic między próbkami badanymi bezpośrednio po dojrzewaniu oraz po czteromiesięcznym przechowywaniu (rys. 5). We wszystkich próbkach obserwowano niewielki wzrost wartości wskaźnika utleniania, co wiązało się ze zmianą barwy próbek w kierunku barwy brązowej (metmioglobina). Pod względem

wskaźnika 650/570 nm stwierdzono, że wszystkie kiełbasy z dodatkiem soli morskiej charakteryzowały się barwą zbliżoną do barwy wyrobu peklowanego (K), uzyskując wartość wskaźnika na poziomie wyższym niż 1,7, co – jak podkreślają Hunt i Kroph [12] – świadczy o wytworzeniu w wyrobie barwy zbliżonej do nitrozylomioglobiny. Próby z serwatką kwasową, pomimo wyższych wartości wskaźników utleniania, charakteryzowały się barwą typową dla wyrobów z dodatkiem azotanów (III) i (V) w porównaniu z pozostałymi próbkami (nawet próby kontrolnej), po dojrzewaniu oraz po czterech miesiącach przechowywania. Podobne wartości uzyskali w badaniach Sakata i wsp. [23]. Możliwe, że zawarte w serwatce kwasowej aktywne peptydy i aminokwasy o właściwościach redukujących, z wolnymi grupami -SH, stabilizują barwę wyrobu w trakcie przechowywania. Białka zawarte w serwatce kwasowej o silnych właściwościach przeciwutleniających, takie jak β -laktoglobulina α -laktoglobulina i laktoferyna



Objaśnienie jak pod rys. 1./ Explanatory note as in Fig. 1.

Kolumnami oznaczono wskaźnik 650/570 nm, liniami oznaczono wskaźnik utlenienia /650/570 nm / index was denoted by columns; oxygenation index was denoted by lines.

Rys. 6. Wartość wskaźnika utleniania oraz wskaźnika 650/570 nm ekologicznej kiełbasy surowo dojrzewającej, badana bezpośrednio po dojrzewaniu (■) oraz po 4-miesięcznym chłodniczym przechowywaniu (□).

Fig. 6. Values of oxygenation and 650/570 nm indices of organic dry-fermented sausage as analyzed immediately after ripening (■) and after 4 month period of chilling storage (□).

z jednej strony mają zdolność wiązania żelaza wolnego, które w mięsie i produktach mięsnych jest katalizatorem reakcji utleniania tłuszczów, z drugiej zaś są bogatym źródłem aminokwasów siarkowych. W wyniku zachodzących przemian białek serwatkowych mogą stać się prekursorem niskocząsteczkowych związków tiolowych o silnych właściwościach przeciwutleniających.

Liczba bakterii kwasu mlekowego, w tym bakterii probiotycznych pod koniec przechowywania była najwyższa w próbie z serwatką kwasową – $\log 7,87$ jtk/g ($\pm 0,25$), a najniższa w próbie z dodatkiem szczepu probiotycznego (L) – $\log 7,57$ jtk/g ($\pm 0,17$). Podobne wyniki uzyskali Wójciak i wsp. [27] w badaniach kielbas peklowanych wyprodukowanych z ekologicznego surowca mięsnego. We wszystkich badanych próbach liczba bakterii kwasu mlekowego utrzymywała się na poziomie wyższym niż $\log 7,0$ jtk/g, a różnice pomiędzy poszczególnymi próbami były statystycznie nieistotne. Obserwowano większą liczbę bakterii kwasu mlekowego w próbie, w której zastosowano oprócz szczepu probiotycznego dodatek glukozy – $\log 7,62$ jtk/g ($\pm 0,08$). W próbie kontrolnej (K) liczba bakterii kwasu mlekowego była niższa o niecały rząd logarytmiczny ($\log 7,68$ jtk/g $\pm 0,02$) w porównaniu z próbą z serwatką kwasową (S) oraz próbą z probiotykiem i glukozą (LG). Dodatek monosacharydu stymulował wzrost bakterii probiotycznych w kielbasach, co jest potwierdzeniem wyników otrzymanych przez Neffe i Kołożyn-Krajewską [18] w badaniach polędwic dojrzewających z dodatkiem probiotyków i 0,2-procentowej glukozy. Obserwowana wysoka liczba LAB w próbach z serwatką kwasową ($\log 7,87$ jtk/g $\pm 0,25$) mogła wynikać z obecności w serwatce laktozy stanowiącej dodatkowo źródło węgla dla rodzimych bakterii kwasu mlekowego pochodzących z serwatki.

Wnioski

1. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że możliwe jest zastosowanie serwatki kwasowej oraz szczepu probiotycznego *Lb. casei* ŁOCK 0900 do produkcji ekologicznej kielbasy surowo dojrzewającej bez dodatku azotanów (III) i (V) sodu.
2. Dodatek serwatki kwasowej, a także zastosowanie monosacharydu w kombinacji z probiotycznym szczepem ŁOCK 0900 zwiększa kwasowość kielbas w porównaniu z próbą kontrolną oraz próbą z samym probiotykiem.
3. Próby kielbas bez dodatku mieszanki peklującej charakteryzowały się wysoką stabilizacją oksydacyjno-redukcyjną ($LOO < 5,5$ meqO₂/kg, wskaźnik TBARS $< 2,0$ mg MDA/kg) podczas całego okresu chłodniczego przechowywania.
4. Próba z serwatką kwasową charakteryzowała się barwą najbardziej zbliżoną do barwy mięsa peklowanego.
5. Liczba bakterii kwasu mlekowego, w tym bakterii probiotycznych, pod koniec okresu chłodniczego przechowywania utrzymywała się na poziomie wyższym niż zalecany do wywołania korzystnego efektu zdrowotnego.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego własnego Nr: RR-re-029-10-3040/10 finansowanego przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Literatura

- [1] Ahn D.U., Nam K.C.: Effect of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef. *Radiat. Phys. Chem.*, 2003, **71**, 149-154.
- [2] Bozkurt H.: Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and Thymbra spicata oil in Turkish dry-fermented sausage. *Meat Sci.*, 2006, **73**, 442-450.
- [3] Cassens R.: Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technol.*, 1995, **49**, 72-115.
- [4] Chizzolini R., Novelli E., Zanardi E.: Oxidation in traditional Mediterranean meat products. *Meat Sci.*, 1998, **49**, 87-99.
- [5] Domínguez-Fernández. M.C., Zumalacárregui-Rodríguez J.M.: Lipolytic and oxidative changes in "Chorizo" during ripening. *Meat Sci.*, 1991, **29**, 99-107.
- [6] Folch J., Lee M., Stanley G.G.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, **226**, 497-509.
- [7] Greene B.E.: Lipid oxidation and pigment changes in raw beef. *J. Food Sci.*, 1969, **34**, 110.
- [8] González-Fernández C., Santos E.M., Rovira J., Jaime I.: The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-fermented sausage. *Meat Sci.*, 2006, **74**, 467-475.
- [9] Gupta P., Samant K., Sahu A.: Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int. J. Microbiol.*, 2012, Article ID 578925: 5 pages.
- [10] Honikel K.O.: The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.*, 2008, **78**, 68-76.
- [11] Hunt R.G.W.: *Measuring colour*. Ellis Horwood Limited, Chichester, UK, 1987.
- [12] Hunt M.C., Kropf D.H.: Fresh and cured meat color analysis. *Muscle foods symposium — Institute of Food Technologists, Annual meeting. Paper*, 1985, p. 151.
- [13] Jaworska D., Neffe K., Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: Survival during storage and sensory effect of potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* Bauer and *Lactobacillus casei* Bif3^{IV} in dry fermented pork loins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **46** (12), 2491-2497.
- [14] Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochem.*, 2012, **47** (12), 1761-1772.
- [15] Lizaso G., Chasco J., Beriain M.J.: Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiol.*, 1999, **16**, 219-228.
- [16] Meister A., Anderson M.E.: Glutathione. *A. Rev. Biochem.*, 1983, **52** (7), 11-760.
- [17] Morita H., Yoshikawa H., Sakata R., Nagata Y., Tanata H.: Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidine nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. *J. Bacteriol.*, 1998, **179**, 7812-7815.
- [18] Neffe K., Kołożyn-Krajewska D.: Możliwość zastosowania bakterii probiotycznych w dojrzewających produktach mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **5** (72), 167-177.
- [19] Pikul J., Leszczyński D.E., Kummerow F.A.: Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**, 1309.
- [20] PN-ISO 3960:1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej.
- [21] Rubio B., Martínez B., García-Cachán M.D., Rovira J., Jaime I.: Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manu-

- factured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids. *Meat Sci.*, 2008, **80**, 1182-1187.
- [22] Sakata R., Morita H., Norimatsu T, Ito N.: Peptides contribute to colour formation: Accelerating effect of whey protein hydrolysate on colour formation in meat products. *Fleischwirtschaft Int.*, 2004, **19**, 113-116.
- [23] Sakata R., Morita H., Norimatsu T., Itoh N., Nagata S., Okayama T., Muguruma M.: Effect of whey protein hydrolysate on the acceleration of color formation in meat products and its mechanism. *Jap. J. Swine Sci.*, 2001, **38 (3)**, 115-124.
- [24] Sebranek J.G., Bacus J.N.: Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issue? *Meat Sci.*, 2007, **77**, 136-147.
- [25] Sebranek J.G., Jackson-Davis A.L., Myers K.L., Lavieri N.A.: Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Sci.*, 2012, **92**, 267-273.
- [26] Soyer A., Ertas A.H., Üzümcüoğlu Ü.: Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat Sci.*, 2005, **69**, 135-141.
- [27] Worobiej E., Wujkowska A., Drużyńska B., Wołosiak R.: Aktywność przeciwutleniająca handlowych preparatów białek serwatkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **4 (59)**, 35-42.
- [28] Wójciak K.M., Trzaskowska M., Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: Evaluation of technological properties and oxidative stability of organic dry fermented probiotic sausages during long-term storage. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2012, **56**, 305-314.
- [29] Wójciak K.M., Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D., Trzaskowska M.: The effect of the *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 probiotic strain on the quality of dry fermented sausage during chilling storage. *J. Food Qual.*, 2012, **35 (5)**, 353-365.
- [30] Zhang X., Kong B., Xiong L.: Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation. *Meat Sci.*, 2007, **77**, 593-598.

OXIDATIVE STABILITY OF ORGANIC DRY-FERMENTED SAUSAGE WITH ADDED PROBIOTIC STRAIN *Lb. CASEI* ŁOCK 0900 AND ACID WHEY

Summary

The objective of the research study was to evaluate the oxidative stability of dry-fermented sausage with acid whey or probiotic strain (*Lb. casei* ŁOCK 0900) added during a four-month period of chilling storage (4° C).

Four experimental varieties of the product were manufactured: K pickled sausage as a control sample (2.8 % of pickling salts); L sausage with sea salt (2.8 %) and *Lb. casei* ŁOCK 0900 (log 6.3 cfu/g) probiotic strain; S sausage with the sea salt (2.8 %) and acid whey (5.0 %); LG sausage with the sea salt (2.8 %), probiotic strain, and glucose (0.6 %).

The research covered the determination of the pH value, water activity (a_w), oxidation-reduction potential (ORP), peroxide value (PV), TBARS value, reflectancy spectrum as well as the oxidation value and 650/570 nm index to characterize the colour parameters of the product after ripening process (0) and after the four-month period of chilling storage. The count of lactic acid bacteria (LAB) was also determined after the four-month storage period.

Compared to other samples, a significantly lower ($p < 0.001$) pH value was reported in the sample with the probiotic bacteria and glucose (LC) added, and in the sample with the acid whey (S) added immediately after dry-fermenting and during storage period. Compared to other samples, significantly lower

peroxide values were reported in the control sample (K) and in the sample with probiotic (L) after dry-fermenting process. Except for the sample with probiotic and glucose (LG), in all the products the peroxide value increased significantly by ca. 2.0 meqO₂/kg after the four-month storage period. Compared to other samples, significantly higher TBARS values were determined in the samples with the acid whey (S) added as well as in the samples with probiotic and glucose (LC) added. The oxidation processes were the slowest in the pickled control sample (K). In the sample with the strain of *Lb. casei* ŁOCK 0900 added, the variant with the glucose (LC) added was characterized by the lowest oxidation value and 650/570 nm index; this fact proved that the colour developed in the product was similar to the colour of the pickled product. The highest 650/570 nm index was obtained in the sample with the addition of acid whey (S) after dry-fermenting and after the four-month storage period. The oxidation stability of the samples evaluated decreased as follows: K > LG > L > S. In all the studied samples, the number of lactic acid bacteria was reported to be higher than log 7.0 cfu/g.

Key words: dry-fermented sausage, probiotic, acid whey, sea salt, organic meat products 