

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego w Warszawie
Państwowy Instytut Badawczy

mgr inż. Beata Łaszkiewicz

**Wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu
mlekowego na jakość mikrobiologiczną mięsa
drobiowego oddzielonego mechanicznie
i wytworzonych z jego udziałem produktów**

Influence of selected strains of lactic acid bacteria on the microbiological quality
of mechanically separated poultry meat and products made with its participation

Praca doktorska
Doctoral thesis

Promotor:

Prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Piotr Szymański
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Technologii Mięsa i Tłuszczu

Recenzenci:

Prof. dr hab. inż. Katarzyna Śliżewska
Politechnika Łódzka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Dr hab. inż. Małgorzata Karwowska, prof. UP
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Zakład Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością

Warszawa, 2023 r.

Pragnę serdecznie podziękować Pani Promotor prof. dr hab. Danucie Kołożyn-Krajewskiej
za zaangażowanie, pomoc oraz cenne rady i wskazówki.

Dziękuję Promotorowi pomocniczemu Panu dr inż. Piotrowi Szymańskiemu
za zaangażowanie i wsparcie w dążeniu do celu.

Bardzo dziękuję wszystkim Współautorom publikacji naukowych,
na których opiera się niniejsza rozprawa doktorska, za wspaniałą współpracę
oraz cenną pomoc.

Chciałabym również podziękować rodzinie i przyjaciołom
za wyrozumiałość oraz okazane wsparcie.

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Data.....

Podpis promotora pracy.....

Oświadczenie autora pracy

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....

Podpis autora pracy

.....

Streszczenie

Wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie i wytworzonych z jego udziałem produktów

Celem pracy doktorskiej była ocena wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego (LAB) na jakość mikrobiologiczną i przydatność technologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM) oraz trwałość i jakość produktów wytworzonych z jego udziałem.

*Do badań wykorzystano trzy szczepy bakterii kwasu mlekowego: *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 wyizolowany z ekologicznego surowego dojrzewającego schabu wieprzowego, *Levilactobacillus brevis* KL5 wyizolowany z ekologicznej kielbasy surowej dojrzewającej oraz *Lactiplantibacillus plantarum* S21 wyizolowany z ekologicznej serwatki kwasowej, które zastosowano do produkcji farszów z MDOM niepeklowanych i poddanych peklowaniu. Do dalszych badań został wybrany szczep *L. plantarum* SCH1, który zastosowano do wytworzenia modelowych kielbas z MDOM poddanego peklowaniu z obniżoną dawką azotanu (III) sodu (50 mg/kg).*

*Stwierdzono, że zastosowanie bakterii kwasu mlekowego miało hamujący wpływ na bakterie *E. coli* w farszach z MDOM zarówno peklowanych, jak i niepeklowanych, jednocześnie nie powodując pogorszenia cech technologicznych surowca. W przypadku modelowych kielbas z MDOM dodatek *L. plantarum* SCH1 wpłynął na wydłużenie trwałości produktów, co potwierdzono w ocenie sensorycznej i analizach mikrobiologicznych.*

Słowa kluczowe: mięso drobiowe oddzielone mechanicznie, bakterie kwasu mlekowego, azotany (III) i (V), biokonserwacja

Abstract

Influence of selected strains of lactic acid bacteria on the microbiological quality of mechanically separated poultry meat and products made with its participation

The aim of the doctoral thesis was to assess the effect of selected strains of lactic acid bacteria (LAB) on the microbiological quality and technological suitability of mechanically separated poultry meat (MSPM) as well as the durability and quality of products produced with its participation.

*Three strains of lactic acid bacteria: *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 isolated from the organic raw fermented pork roast, *Levilactobacillus brevis* KL5 isolated from organic raw fermented sausage, and *Lactiplantibacillus plantarum* S21 isolated from organic acid whey were used for the production of uncured and cured MSPM batters. *L. plantarum* SCH1 strain was selected for further research, and it was used to produce model sausages from MSPM cured with a reduced dose of sodium nitrite (50 mg/kg).*

It was found that the use of lactic acid bacteria had an inhibitory effect on E. coli bacteria in both cured and uncured MSPM batters, without worsening the technological characteristics of the raw material. In the case of model sausages with MSPM, the addition of L. plantarum SCH1 contributed to the extension of the shelf life of the products, which was confirmed by sensory evaluation and microbiological analyzes.

Key words: mechanically separated poultry meat, lactic acid bacteria, nitrates and nitrites, bioconservation

Spis treści

1. ŹRÓDŁA FINANSOWANIA	12
2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE	13
3. WSTĘP	15
4. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	16
4.1. Charakterystyka i kierunki zastosowania mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie w przemyśle mięsnym [P1].....	16
4.2. Właściwości fizykochemiczne i jakość mikrobiologiczna mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie.....	17
4.3. Metody utrwalania mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie stosowane w praktyce przemysłowej	21
4.4. Zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej jako biokonserwantów w przemyśle mięsnym.....	23
5. CEL PRACY, HIPOTEZY BADAWCZE I ZAKRES PRACY	27
5.1. Cel pracy.....	27
5.2. Hipotezy badawcze.....	27
5.3. Zakres pracy.....	27
6. MATERIAŁ DO BADAŃ I METODY BADAŃ	29
6.1. Materiał do badań	29
6.1.1. Surowiec mięsny [P2, P3, P4]	29
6.1.2. Szczepy bakterii kwasu mlekowego [P2, P3, P4].....	29
6.1.3. Modelowe farsze z MDOM [P2, P3]	30
6.1.4. Modelowy produkt mięsny z MDOM poddany obróbce cieplnej [P4]	31
6.2. Metody badań	33
6.2.1. Pomiar pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego [P2, P3, P4].....	33
6.2.2. Zawartość azotanów (III) i azotanów (V) [P2, P3, P4]	33
6.2.3. Pomiar barwy [P2, P3, P4].....	34
6.2.4. Analiza zawartości nitrozylobarwników [P3].....	34
6.2.5. Oznaczenie ogólnej zawartości barwników hemowych i stężenia nitrozylomioglobiny [P4].....	34
6.2.6. Badania mikrobiologiczne [P2, P3, P4].....	35

6.2.7. Biochemiczna identyfikacja LAB w modelowych kiełbasach z MDOM [P4]	36
6.2.8. Ocena sensoryczna modelowych kiełbas z MDOM [P4].....	36
6.2.9. Analiza statystyczna [P2, P3, P4].....	37
7. WYNIKI I DYSKUSJA	39
7.1. Badania modelowe farszów z MDOM, wytworzonych z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego [P2, P3]	39
7.1.1. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne i przydatność technologiczną niepeklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P2]	39
7.1.2. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną niepeklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P2].....	41
7.1.3. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne i przydatność technologiczną peklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P3]	43
7.1.4. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną peklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P3].....	50
7.1.5. Wybór jednego szczepu bakteryjnego do dalszych badań i określenie warunków jego zastosowania [P2, P3].....	52
7.2. Badania jakości i trwałości produktów wytworzonych z dodatkiem MDOM poddanego bioutrwalanu bakteriami kwasu mlekowego [P4].....	55
7.2.1. Określenie wpływu wybranego szczepu bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne oraz jakość sensoryczną modelowych produktów mięsnych poddanych obróbce cieplnej [P4].....	55
7.2.2. Ocena wpływu wybranego szczepu bakterii kwasu mlekowego na trwałość mikrobiologiczną modelowych produktów mięsnych poddanych obróbce cieplnej [P4]	62
7.2.3. Identyfikacja szczepów bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z produktów modelowych przy użyciu metod fenotypowych na poziomie gatunku oraz porównanie z próbką wzorcową [P4].....	63
8. STWIERDZENIA I WNIOSKI	67

9. SPIS LITERATUREY 68

1. ŹRÓDŁA FINANSOWANIA

Praca doktorska została dofinansowana:

- a) w ramach badań statutowych prowadzonych w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego Państwowym Instytucie Badawczym o symbolu 133-01 pt. „Zastosowanie wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego do poprawy jakości mikrobiologicznej mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie i produktów z jego udziałem”,
- b) w ramach badań statutowych prowadzonych w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego Państwowym Instytucie Badawczym o symbolu 500-01-MT-02 pt. „Wpływ zastosowania wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na trwałość mikrobiologiczną i przydatność technologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie”.

2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Osiągnięciem naukowym wynikającym z ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65. poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz., 1365 oraz Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455) jest jednotematyczny cykl czterech publikacji naukowych pt. „Zastosowanie wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego do poprawy jakości mikrobiologicznej mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie i produktów z jego udziałem”.

Publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały oznaczone w tekście pracy następującymi symbolami i cyframi:

P1. Łaskiewicz B., Szymański P., Kołożyn-Krajewska D.: Problemy jakości mięsa oddzielonego mechanicznie, *Medycyna Weterynaryjna*, 2019, 75(03), 131-137. [dx.doi.org/10.21521/mw.6157](https://doi.org/10.21521/mw.6157).

Punkty MNiSW: 70 (wg Komunikatu w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznanych za publikacje naukowe w tych czasopismach, ustalony na podstawie wykazów ogłoszonych w latach 2013-2016, ogłoszonego przez MNiSW dn. 26.01.2017)

Impact Factor: 0.281

Wkład własny: współautorstwo koncepcji, przygotowanie manuskryptu (70%).

P2. Łaskiewicz B., Szymański P., Kołożyn-Krajewska D.: Wpływ wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na przydatność technologiczną i jakość mikrobiologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie. *Żywność. Nauka Technologia. Jakość*, 2019, 26 (3), 122-134. DOI: 10.15193/zntj/2019/120/302.

Punkty MNiSW: 20 (wg Komunikatu w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznanych za publikacje naukowe w tych czasopismach, ustalony na podstawie wykazów ogłoszonych w latach 2013-2016, ogłoszonego przez MNiSW dn. 26.01.2017)

Impact Factor: 0.000

Wkład własny: współautorstwo koncepcji, przygotowanie manuskryptu, wykonanie wybranych analiz, opracowanie wyników (70%).

P3. Łaszkiwicz B., Szymański P., Kołożyn-Krajewska D.: The effect of selected lactic acid bacterial strains on the technological and microbiological quality of mechanically separated poultry meat cured with a reduced amount of sodium nitrite. *Poultry Science*, 2020, 100, 1, 263-272. doi:10.1016/j.psj.2020.09.066.

Punkty MNiSW: 140 (wg Komunikatu w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznanych za publikacje naukowe w tych czasopismach, ustalony na podstawie wykazów ogłoszonych w latach 2013-2016, ogłoszonego przez MNiSW dn. 26.01.2017)

Impact Factor: 3.352

Wkład własny: współautorstwo koncepcji, przygotowanie manuskryptu, wykonanie wybranych analiz, opracowanie wyników (70%).

P4. Łaszkiwicz B., Szymański P., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Application of *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 for the Bioconservation of Cooked Sausage Made from Mechanically Separated Poultry Meat. *Applied Sciences*, 2021, 11, 1576. doi:10.3390/app11041576.

Punkty MNiSW: 100 (wg Komunikatu w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznanych za publikacje naukowe w tych czasopismach, ustalony na podstawie wykazów ogłoszonych w latach 2013-2016, ogłoszonego przez MNiSW dn. 26.01.2017)

Impact Factor: 2.679

Wkład własny: współautorstwo koncepcji, przygotowanie manuskryptu, wykonanie wybranych analiz, opracowanie wyników (60%).

3. WSTĘP

Światowa produkcja mięsa z roku na rok wzrasta, a w przypadku drobiu szacuje się, że produkcja kurcząt brojlerów w 2022 r. może wynieść 100,8 mln ton, czyli wzrośnie o 0,9% w porównaniu z rokiem ubiegłym. Jednocześnie globalnym wyzwaniem staje się problem strat i marnotrawienia żywności, która według FAO jest niemal w 1/3 uznawana za niezdatną do spożycia zanim jeszcze trafi do konsumentów lub jest przez nich wyrzucana. Zatem w celu zapobiegania powstawaniu strat, ogromne znaczenie ma m.in. ograniczenie wytwarzania odpadów żywnościowych od etapu produkcji, aż po dystrybucję żywności. Produkcja i wykorzystanie mięsa oddzielonego mechanicznie bardzo dobrze wpisuje się w ten trend.

Nowym kierunkiem w przetwórstwie żywności jest ograniczenie substancji dodawanych do produktów, czyli dążenie do uzyskania produktów wysokiej jakości bez zbędnych dodatków. W branży mięsnej aktualnie poszukuje się m.in. sposobów na ograniczenie lub wykluczenie dodatku azotanów (III) do produktów mięsnych, co staje się celem wielu badań naukowych. Równie dużym zainteresowaniem cieszą się badania w zakresie dodatku pożytecznej mikroflory do żywności w celu poprawy jakości mikrobiologicznej, jak również walorów smakowych czy zapachowych.

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) są obecnie szeroko wykorzystywane w produkcji żywności nie tylko fermentowanej, ale także w wielu innych produktach, również poddawanych obróbce cieplnej. Wiele badań wskazuje na możliwość zastosowania bakterii kwasu mlekowego w celu zahamowania wzrostu niepożądanego mikroflory, a przy tym kształtowania smaku i zapachu produktów. W związku z dużym zainteresowaniem konsumentów żywnością z ograniczonym do minimum dodatkiem substancji konserwujących, bakterie kwasu mlekowego i ich metabolity, w szczególności bakteriocyny, mogą być wykorzystane jako dodatkowa ochrona przeciwko szkodliwym drobnoustrojom.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej przeprowadzono badania dotyczące możliwości zastosowania dodatku bakterii kwasu mlekowego do mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie podanego peklowaniu. Założeniem pracy było obniżenie ilości dodawanych związków azotowych z jednoczesnym zastosowaniem bakterii kwasu mlekowego.

4. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

4.1. Charakterystyka i kierunki zastosowania mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie w przemyśle mięsnym [P1]

Rynek drobiu oddzielanego mechanicznie rozwinął się w latach 60. ubiegłego wieku, wraz z postępującą w czasie zmianą preferencji konsumentów z całych tusz na cięte części i produkty przetworzone (Petracci i wsp., 2015). Mięso oddzielone mechanicznie (MOM) definiowane jest jako surowiec powstały w wyniku mechanicznego oddzielenia pozostałości tkanek miękkich od kości pochodzących z rozbioru tusz drobiowych, wieprzowych lub wołowych (Rozporządzenie (WE) 853/2004). Aktualnie wielkość produkcji MOM ogółem w UE sięga 700 000 ton rocznie. Mięso drobiowe oddzielone mechanicznie (głównie brojłery oraz indyki) stanowi 88% całej produkcji MOM (Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady, 2010).

Produkcja MOM odbywa się najczęściej dwiema metodami: metodą naruszającą strukturę kości i metodą nienaruszającą struktury kości (Pietrzak i wsp., 2011; Szymański i Łaszkiewicz, 2017). W separatorach niszczących strukturę kości następuje rozdrobnienie kości, a następnie ich prasowanie i pozbawianie tkanek mięśniowych. Wstępnie rozdrobniona masa kostno-mięśniowa kierowana jest na sita, gdzie oddziela się grubszą frakcją kostną od homogenatu tłuszczowo-mięśniowego. W zależności od zastosowanego urządzenia i parametrów technicznych (tj. zastosowane ciśnienie, średnica otworów sita, średnica perforacji bębna) parametry jakościowe MOM oraz struktura produktu mogą być zróżnicowane (Groves, 2011; Magda, 2012). W przypadku zastosowania procesów wysokociśnieniowych (od 100 do 400 barów) uzyskuje się półprodukt o ciastowatej konsystencji, która wynika z utraty lub modyfikacji pierwotnej struktury tkanki mięśniowej. Natomiast użycie innych technik, np. niskociśnieniowych (od kilku do 100 barów) pozwala uzyskać produkt o wyglądzie zbliżonym do mięsa mielonego (Magda, 2012). W przypadku techniki nienaruszającej struktury kości, mięso oddzielane jest za pomocą wirującego bębna z perforacją. Otwory w bębnie mają wypukłe ostre powierzchnie, a dociskany do powierzchni bębna surowiec mięsny zdzierany jest z powierzchni kości. Następnie tkanki miękkie, które przedostały się do bębna z powierzchni kości, są z niego odbierane (Magda, 2012; Szymański i Łaszkiewicz, 2017).

Rynek produktów mięsnych zarówno w Polsce, jak i na świecie, niezmiennie ewoluuje. Zwiększa się świadomość konsumentów w zakresie dbałości o środowisko i wzrasta zainteresowanie produktami z czystą etykietą. Również wymagania konsumentów są coraz wyższe, więc zadaniem producentów z branży mięsnej jest produkcja wyrobów wysokiej jakości. W przypadku MOM, który często budzi kontrowersje wśród konsumentów, badania przeprowadzone przez Bończak i wsp. (2022) pokazały, że opinia na temat tego surowca jest dość krytyczna i wynika głównie z braku informacji lub fragmentarycznej i niepoprawnej wiedzy, dotyczącej charakterystyki i pochodzenia surowca. Produkty z dodatkiem mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM) stanowią szeroką ofertę wśród gotowanych lub pieczonych produktów mięsnych i podrobowych (np. kielbasy, parówki, konserwy, mielonki, pasztetowe, pasztety) oraz wyrobów garmazeryjnych i dań gotowych (krokiety, hamburgery, pulpety, klopsy) (Botka-Petrak i wsp., 2011; Cegiełka i wsp., 2014; Tolik i wsp., 2015). MOM, głównie wysokociśnieniowy, jest także wykorzystywany do produkcji karmy dla zwierząt domowych (Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady, 2010). Poza różnicami w składzie chemicznym, produkty z dodatkiem MDOM charakteryzują się również większą zdolnością zatrzymywania wody oraz emulgowania, a także nieco innym profilem smakowo-zapachowym, wynikającym z przyspieszonego procesu utleniania tłuszczu w tych produktach (Mountney i Parkhurst, 1995; USDA FSIS, 1995). Zastosowanie MDOM w przetwórstwie mięsa niesie ze sobą wymierne korzyści, ponieważ w procesie mechanicznego odkostniania, niskim kosztem pozyskuje się białko, a wartość odżywcza, choć nieco się różni, to zbliżona jest do wartości mięsa drobiowego wykrawanego ręcznie. Ponadto, dzięki mechanicznemu procesowi odkostniania, minimalizuje się ilość odpadów podczas obróbki drobiu, a przy tym zmniejszona jest utrata cennego białka jadalnego (USDA FSIS, 1995).

4.2. Właściwości fizykochemiczne i jakość mikrobiologiczna mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie

Wartość odżywcza MDOM różni się w porównaniu z mięsem oddzielonym ręcznie. Choć MDOM jest bogaty w odżywcze białko, o profilu aminokwasowym porównywalnym z całym mięśniem (Froning, 1976), jest uważany za znacznie mniej funkcjonalny surowiec niż inne surowce pochodzące z produktów drobiowych z całych mięśni (Daros i wsp.,

2005). Mięso oddzielone mechanicznie zawiera mniej białka oraz więcej tłuszczu, wapnia, żelaza i popiołu (Michalski, 2007). Zawartość składników odżywczych w MOM może być zróżnicowana ze względu na sposób pozyskiwania mięsa, gatunek zwierzęcia czy części tuszy, z której je pozyskano. W badaniach Abdullah i Al-Najdawi (2005) oznaczono zawartość wapnia w mięsie z kurczaka oddzielonym mechanicznie na poziomie 0,163 % w mięsie ze skórą i 0,23 % w mięsie bez skóry. Zawartość wapnia w mięsie drobiowym oddzielanym ręcznie była niższa i wynosiła w mięsie ze skórą 0,017 % i 0,014 % w mięsie bez skóry. Podobne wyniki przedstawili Serdaroğlu i Yildiz Turp (2005). Bełkot i wsp. (2013) wykazali zawartość wapnia w MDOM z kurcząt na poziomie 0,18 %, w MDOM z gęsi na poziomie 0,03 %, natomiast w mięsie oddzielonym ręcznie w przypadku obydwu gatunków zawartość wapnia wynosiła 0,01 %. Zawartość wapnia jest limitowana w MOM uzyskanym techniką nieniszczącą struktury kości, a jego dopuszczalny poziom to 0,1 % (Tabela 1).

W MDOM pozyskanym w procesie niszczącym strukturę kości, ze względu na obecność cząstek kości i szpiku kostnego, występuje większa ilość związków mineralnych takich jak fosfor i fluor. Dopuszczalna zawartość tych związków w produktach mięsnych nie jest normalizowana w przepisach, dlatego należy mieć to na uwadze, by produkt wyprodukowany z dodatkiem MDOM nie zagrażał zdrowiu konsumenta (Michalski, 2007).

Z racji zwiększonej zawartości tłuszczu, skóry i szpiku kostnego w MDOM, charakteryzuje się ono wyższą zawartością cholesterolu w porównaniu z mięsem oddzielonym ręcznie. W badaniach Serdaroğlu i Yildiz Turp (2005) oznaczono zawartość cholesterolu w MDOM na poziomie 63,6 mg/100 g, a w mięsie odkostnionym ręcznie 56,9 mg/100 g.

W procesie mechanicznego odkostniania, szczególnie wysokociśnieniowym, następuje uszkodzenie tkanek mięśniowych, które w wyniku ekspozycji na tlen atmosferyczny są bardziej podatne na jęłczenie. W związku ze zwiększonym utlenianiem lipidów, MDOM może charakteryzować się wyższą zawartością produktów peroksydacji niekorzystnych dla zdrowia (Trindade i wsp., 2004; Viuda-Martos i wsp., 2012; Sözen i Hecer, 2013). W badaniach Małachowskiej i wsp. (2015) parówki z dodatkiem MDOM charakteryzowały się wysokim udziałem nasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, ponadto zaobserwowano wyższą proporcję n-6/n-3.

MDOM, zwłaszcza wysokociśnieniowy, charakteryzuje się ciemniejszą barwą oraz wyższym pH, co jest efektem wyższej zawartości barwników hemowych pochodzących ze szpiku kostnego (Trindade i wsp., 2004; Nagel i wsp., 2013). Wartość pH MDOM wynosi średnio od 6,5 do 7,0, natomiast pH mięsa drobiowego wykrawanego ręcznie z piersi wynosi 5,8-5,9, a mięsa z ud 6,2-6,3 (Trindade i wsp., 2004; Stangierski i wsp., 2008). Wysokie pH wpływa na większą wodochłonność mięsa, ale może mieć niekorzystny wpływ na jakość mikrobiologiczną, gdyż przyspiesza psucie mięsa (Trindade i wsp., 2004).

Mikroflora mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie to głównie bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, chorobotwórcze szczepy *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* oraz bakterie saprofityczne, głównie z rodzaju *Pseudomonas*, które rozwijają się w niskiej temperaturze i powodują psucie surowca. Duże zanieczyszczenie wynika z tego, że do produkcji MDOM kierowane są elementy tuszy ze skórą, co sprzyja rozwojowi mikroflory (Walczycka, 2005; Michalski, 2009; Nagel i wsp., 2013; Nowicka i wsp., 2014).

Przepisy Unii Europejskiej określają wytyczne jedynie dla mięsa pozyskanego techniką nieniszczącą struktury kości. Dla tego surowca zostało wprowadzone kryterium bezpieczeństwa – pałeczki z rodzaju *Salmonella* nieobecne w 10 g oraz ustalono kryteria higieny procesu – liczba bakterii tlenowych od 5 do 6 log jtk/g i *E. coli* od 1 do 2 log jtk/g (Rozporządzenie Komisji (WE) 1441/2007).

Jakość mikrobiologiczną MDOM determinuje wiele czynników. Do najważniejszych należą: higiena podczas przetwarzania tusz, stopień zanieczyszczenia na początkowym etapie produkcji, zachowanie właściwych parametrów procesu podczas odkostniania (Publikacja 2; Yuste i wsp., 2002; Viuda-Martos i wsp., 2012).

Jakość surowca użytego do produkcji MDOM wpływa na jakość produktów z niego wytworzonych, dlatego ważne jest przestrzeganie restrykcyjnych zasad w celu utrzymania dobrej jakości. MDOM kierowany jest do przerobu natychmiast po produkcji, a jeśli nie jest to możliwe, zostaje schłodzony do 2 °C i może być przechowywany w tym stanie maksymalnie 24 h. Szczegółowe wytyczne dla MOM nisko- i wysokociśnieniowego przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wymogi w zakresie higieny MOM po produkcji

	MOM – proces niskociśnieniowy	MOM – proces wysokociśnieniowy
Przechowywanie w przypadku braku natychmiastowego wykorzystania	Opakowanie jednostkowe i zbiorcze, schłodzenie do maksymalnie 2 °C lub zamrożenie do temperatury wewnętrznej T < -18 °C	Opakowanie jednostkowe i zbiorcze, schłodzenie do maksymalnie 2 °C w przypadku przetworzenia w ciągu 1 do 24 godzin; W pozostałych przypadkach, zamrożenie w ciągu 12 godzin od wytworzenia, osiągnięcie temperatury wewnętrznej T < - 18 °C w ciągu 6 godzin. Przechowywanie zamrożonego MOM maksymalnie przez 3 miesiące w temperaturze < -18°C.
Wykorzystanie	Jeżeli podmiot prowadzący przedsiębiorstwo spożywcze wykonał analizy, których wynik potwierdza spełnienie przez MOM kryteriów mikrobiologicznych dotyczących mięsa mielonego*: - w przetworach mięsnych, które wyraźnie nie są przeznaczone do spożycia bez uprzedniej obróbki termicznej - w produktach mięsnych Jeżeli MOM nie spełnia kryteriów mikrobiologicznych: wyłącznie w produktach mięsnych poddanych obróbce termicznej, produkowanych w zatwierdzonych zakładach	Wyłącznie w produktach mięsnych poddanych obróbce termicznej, produkowanych w zatwierdzonych zakładach
Zawartość wapnia**	Nie przekracza 0,1 % (=100 mg/100 g lub 1000 ppm) świeżego produktu	Nie określono

* Nieobecność pałeczek *Salmonella* w 25 g (pięć próbek), jeżeli jest przeznaczone do spożycia w stanie surowym lub pochodzi z mięsa drobiowego. Nieobecność pałeczek *Salmonella* w 10 g (pięć próbek), jeżeli pochodzi z mięsa gatunków zwierząt innych niż drób i jest przeznaczone do spożycia po ugotowaniu.

** Zgodnie z art. 4 rozporządzenia Komisji (WE) nr 2074/2005 z dnia 5 grudnia 2005 r. i załącznikiem IV do tego rozporządzenia zawartości wapnia w MOM nieprzekraczającej 0,1 % (100 mg/100 g lub 1000 ppm) i oznaczonej standardową metodą nie uważa się za istotnie wyższą niż w przypadku mięsa mielonego.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady, 2010 oraz Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z późn. zm.

Badania przeprowadzone w polskich zakładach przetwórczych wskazują na problem w utrzymaniu odpowiedniej jakości mikrobiologicznej MDOM, przez co wykorzystanie MOM niskociśnieniowego ogranicza się jedynie do produktów poddanych obróbce cieplnej (Michalski, 2006; Pomykała i Michalski, 2008; Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady, 2010). Względem MOM wysokociśnieniowego nie określono kryterium bezpieczeństwa i może być użyty wyłącznie do produktów poddanych obróbce cieplnej (Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady, 2010).

4.3. Metody utrwalania mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie stosowane w praktyce przemysłowej

Ze względu na duże ryzyko zanieczyszczenia mikrobiologicznego niezbędne jest natychmiastowe wykorzystanie MDOM lub odpowiednia jego konserwacja. Najszybszym sposobem i najbardziej rozpowszechnionym w praktyce przemysłowej jest mrożenie i przechowywanie w temperaturze od -18°C do -30°C . Mięso oddzielone mechanicznie po rozdrobieniu formowane jest w bloki o grubości maksymalnej 15 cm i wadze ok. 10 kg, pakowane w folię i zamrażane do -30°C . Głęboko mrożony MDOM może być przechowywany do 3 miesięcy (Grabowski i Kijowski, 2018). Metody szybkiego zamrażania, które w krótkim czasie obniżają temperaturę MDOM, zmniejszają utlenianie lipidów i ograniczają wpływ oksydacji na jakość produktu końcowego (Barbut i wsp., 1990).

Na jakość surowca poddanego zamrażaniu, poza parametrami tego procesu, wpływa także wiele dodatkowych czynników, jak np. jakość pozyskanego surowca, warunki procesu odkostniania i warunki przechowywania (Gambuteanu i wsp., 2013; Cegińska i wsp., 2016). Proces mrożenia, mimo szeregu zalet, może wpłynąć negatywnie na niektóre parametry mięsa, takie jak wodochłonność, wyciek, barwa czy rozpuszczalność białek. Wpływa również negatywnie na cechy sensoryczne spowodowane przemianami fizycznymi, chemicznymi, enzymatycznymi i mikrobiologicznymi (Thielke, 2005; Chwastowska-Siwiecka i Skiepmo, 2013).

Drugą metodą, najczęściej stosowaną w przemyśle, jest peklowanie świeżego MDOM azotanem (III) sodu. Głównym celem tego procesu jest działanie bakteriostatyczne, szczególnie w kierunku *Clostridium botulinum*, jak również innych bakterii, jak np. *Salmonella enterica* czy *Listeria* spp. Badania wskazują, że dodatek azotanu (III) sodu na

poziomie 80-150 mg/kg na początku procesu peklowania zapewnia bakteriostatyczne działanie (Sebranek i Bacus, 2007; Lücke, 2008; Sindelar i Milkowski, 2011). Dodatkowo azotan (III) sodu wpływa na kształtowanie barwy, smaku i zapachu produktu (Pegg i Shahidi, 2000; Sebranek i Bacus, 2007; Lücke, 2008; Sindelar i Milkowski, 2011). Azotan (III) sodu w kwaśnym środowisku tkanki mięśniowej przekształcany jest w kwas azotawy. Tlenek azotu, utworzony z kwasu azotawego, reaguje z mioglobina i powstaje nitrozylomioglobina, ciemnoczerwony pigment. Podczas obróbki cieplnej nitrozylomioglobina jest przekształcana w nitrozylomiochromogen, stabilny związek o różowej barwie (Pegg i Shahidi, 2000; Ursachi i wsp., 2020).

Safa i wsp. (2017) stwierdzili, że azotany (III) ograniczają utlenianie lipidów i opóźniają jęłczenie, a tym samym zapobiegają pojawianiu się niepożądanego profilu smakowego podczas przechowywania. Zdolność azotanów (III) do zmniejszania utleniania lipidów wynika z reakcji tlenku azotu z tlenem i reaktywnymi formami tlenu, co ogranicza reakcje autooksydacji lipidów. Ponadto tlenek azotu wiąże i stabilizuje żelazo w hemie, ograniczając jego działanie prooksydacyjne. Efekt antyoksydacyjny azotanu (III) sodu obserwowano przy jego zastosowaniu na poziomie 40 mg/kg (Alahakoon i wsp., 2015).

Choć od lat azotan (III) sodu budzi wiele obaw, jak dotąd nie znaleziono substancji, która byłaby tak samo funkcjonalna w przetwarzaniu mięsa. Głównym powodem ograniczenia stosowania azotanów (III) w przetwórstwie mięsa są N-nitrozoaminy (NAs). Powstają one w określonych warunkach (środowisko kwaśne, wysoka temperatura), w wyniku reakcji tlenku azotu, powstającego z azotanów (III), z aminami drugorzędowymi, powstałymi w wyniku degradacji białek (Pegg i Shahidi, 2000; Ursachi i wsp., 2020). Zastosowanie przeciwutleniaczy tj. kwasu askorbinowego lub erytrobionowego i ich soli pozwala na zmniejszenie lub zahamowanie potencjalnego tworzenia nitrozoamin (Sindelar i Milkowski, 2011). N-nitrozodimetyloamina (NDMA), N-nitrozodietyleoamina (NDEA), N-nitrozopiperidyna (NPYR) i N-nitrozopiperidyna (NPIP) to jedne z najczęściej występujących nitrozoamin w produktach mięsnych (Flores i wsp., 2019). Część tych substancji prawo Unii Europejskiej zalicza do kategorii 1B, czyli substancji o domniemanym działaniu rakotwórczym. W krajach UE nie ustalono maksymalnych dopuszczalnych limitów dla N-nitrozoamin w produktach spożywczych. W USA obowiązuje limit całkowitej zawartości lotnych N-nitrozoamin dla wędlin na poziomie 10

µg/kg (Pegg i Shahidi, 2000). Rozwiązanie legislacyjne w Unii Europejskiej zmierzają do ograniczenia stosowania azotanów (III) w produkcji wędlin (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 257/2010). Niektóre kraje np. Dania mają już wewnętrzne regulacje obniżające poziom stosowania azotanu (III) sodu ze 150 mg/kg do 60 mg/kg w wybranych grupach produktów mięsnych (Decyzja Komisji (UE) 2018/702; Decyzja Komisji (UE) 2015/826). Istotne obniżenie dodatku azotanu (III) sodu może ograniczyć jego przydatność w przedłużeniu trwałości farszów z MDOM. W związku z potencjalnymi ograniczeniami celowe jest poszukiwanie nowych i skutecznych sposobów utrwalania tego surowca.

Badania wskazują na alternatywne sposoby utrwalania MDOM, które były podejmowane przez innych badaczy. Hać-Szymańczuk i wsp. (2014) zastosowali dodatek preparatów z szałwii w celu zahamowania rozwoju drobnoustrojów. Najlepszy efekt bakteriostatyczny uzyskano przy zastosowaniu olejku eterycznego z szałwii. W badaniach Tuboly i wsp. (2003) uzyskano pozytywny efekt bakteriostatyczny w MDOM stosując metodę wysokich ciśnień. Z kolei Gomes i wsp. (2003) zastosowali promieniowanie gamma w celu poprawy jakości mikrobiologicznej MDOM. Efekt bakteriostatyczny po naświetleniu utrzymywał się maksymalnie do 10 dni. Innowacyjne sposoby utrwalania MDOM pokazują nowe możliwości, jednakże w praktyce przemysłowej mogą pojawić się trudności w zaadaptowaniu tych metod w zakładach produkcyjnych przetwarzających MDOM na dużą skalę.

4.4. Zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej jako biokonserwantów w przemyśle mięsnym

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB z ang. Lactic Acid Bacteria) stanowią obszerną grupę Gram-dodatnich bakterii o zbliżonych właściwościach morfologicznych, metabolicznych i fizjologicznych. Do grupy bakterii kwasu mlekowego należą głównie względnie beztlenowe, nie posiadające cytochromów, nieprzetrwalnikujące, katalazoujemne pałeczki lub ziarniaki, zróżnicowane pod względem wielkości. LAB pochodzą z rzędu *Lactobacillales*, do którego zalicza się 6 rodzin bakterii: *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* i *Streptococcaceae* (Ludwig i wsp., 2009). Do LAB należą drobnoustroje z rodzajów: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*. Ze względu na

produkcję kwasu mlekowego i podobne środowiska występowania, do bakterii mlekowych ostatnio zalicza się również rodzaj *Bifidobacterium* (Ludwig i wsp., 2009; Jurkowski i Błaszczuk, 2012). Cechą wspólną tych mikroorganizmów jest wytwarzanie kwasu mlekowego, który jest głównym produktem fermentacji mlekowej. Bakterie te wykorzystują zarówno cukry proste, disacharydy, jak i niektóre oligo- i polisacharydy jako źródła węgla. W wyniku fermentacji produkują od 0,6 do 3% kwasu mlekowego. Bakterie fermentacji mlekowe mogą rosnąć w środowisku o zakresie pH od 4,0 do 9,6 (optimum 5,5 – 6,2) i zawartości soli nawet do 6,5%, w szerokim zakresie temperatur od 2 do 53 °C, niemniej większość hodowli prowadzi się w optymalnej dla nich temperaturze 35-37 °C (Ludwig i wsp., 2009; Gajewska i Błaszczuk, 2012; Vinderola i wsp., 2019).

W oparciu o wielofazowe podejście, w 2020 roku dokonano reklasyfikacji rodzaju *Lactobacillus* na 25 rodzajów, w tym rodzaj *Lactobacillus*, który obejmuje organizmy przystosowane do gospodarza, określone jako grupa *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* i 23 nowe rodzaje: *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* i *Lentilactobacillus*. Zaproponowano także zmianę opisu rodziny *Lactobacillaceae* obejmującej wszystkie rodzaje, które wcześniej należały do rodzin *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae*. Ogólny termin „lactobacilli” pozostanie użyteczny do oznaczania wszystkich organizmów, które zostały sklasyfikowane jako *Lactobacillaceae* do 2020 roku (Zheng i wsp., 2020).

Bakterie fermentacji mlekowej stosowane są na szeroką skalę w przemyśle spożywczym. LAB w dużej mierze są wykorzystywane w produkcji żywności fermentowanej. Nadają produktom specyficzny smak i aromat, a dzięki produkcji kwasów organicznych, w tym głównie kwasu mlekowego, powodują szybkie zakwaszenie surowca, przez co zwiększają bezpieczeństwo żywności. Ponadto produkcja kwasu octowego, etanolu, związków aromatycznych, bakteriocyn, egzopolisacharydów oraz enzymów, przyczynia się do poprawy trwałości, tekstury i cech sensorycznych produktu końcowego (Leroy i De Vuyst, 2004).

Bakterie kwasu mlekowego najbardziej rozpowszechnione są w branży mleczarskiej, ale znajdują coraz szersze zastosowanie także w branży mięsnej, głównie w produkcji wędlin fermentowanych i dojrzewających (Rubio i wsp., 2007; Perez-Chabela i wsp., 2008; Dolatowski i Kołożyn-Krajewska, 2010; Neffe-Skocińska i wsp., 2013; Okoń i Dolatowski, 2014). Niektóre szczepy LAB wykazują właściwości termotolerancyjne (Victoria-León i wsp., 2006) i mogą mieć zastosowanie także w produktach mięsnych poddawanych obróbce cieplnej (Bredholt i wsp., 2001; Enan, 2006; Perez-Chabela i wsp., 2008; Martinez-Romero i wsp., 2016).

Zepsucie mikrobiologiczne jest definiowane jako dostrzegalna zmiana biochemiczna zachodząca w produkcie spożywczym, wywołana przez mikrobiotę osiagającą najwyższą gęstość komórek spośród mikroorganizmów występujących w danym produkcie, a zatem zmiany są generalnie przypisywane dominującej grupie drobnoustrojów (Huis in't Veld, 1996). LAB stanowią grupę, która jest silnie powiązana ze świeżym mięsem i gotowanymi produktami mięsnymi, ale reprezentuje kontrowersyjną grupę gatunków drobnoustrojów, które albo przyczyniają się do wytwarzania ofensywnych metabolitów i późniejszego obniżenia jakości sensorycznej mięsa (Huis in't Veld, 1996; Labadie, 1999) lub mogą służyć jako środki bioochronne ze szczepami niektórych gatunków wykazujących zmniejszoną zdolność psucia i działanie hamujące wobec mikroorganizmów powodujących psucie (Vasilopoulos i wsp., 2010; Chaillou i wsp., 2014).

Biokonserwacja polega na przedłużeniu okresu przechowywania oraz zwiększenia bezpieczeństwa żywności, przy wykorzystaniu naturalnej mikroflory i/lub jej produktów antybakteryjnych (Plessas i wsp., 2007; Pothakos i wsp., 2015). LAB bardzo dobrze wpisują się w tę definicję, ponieważ mają naturalną zdolność dominowania mikroflory wielu produktów spożywczych podczas przechowywania, co umożliwia ich szerokie zastosowanie w bioprotekcji (Balciunas i wsp., 2013; Rzepkowska i wsp., 2017a). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa LAB powiązana jest między innymi z produkcją pozakomórkowych substancji białkowych wykazujących znaczące działanie bakteriobójcze i/lub bakteriostatyczne zwanych bakteriocynami (Rzepkowska i wsp., 2017a). Ponadto, w celu zapewnienia odpowiednich warunków rozwoju bakterie te wytwarzają szereg substancji przeciwdrobnoustrojowych uwalnianych poza komórkę, jak np. kwasy organiczne, nadtlenuk wodoru, diacetyl, CO₂ (Gomes i wsp., 2003; Dolatowski i Kołożyn-

Krajewska, 2010; Rzepkowska i wsp., 2017a). LAB oraz ich metabolity wykazujące aktywność antagonistyczną względem niepożądaną mikroflory, mogą być z powodzeniem wykorzystane w procesach technologicznych stosowanych w celu przedłużenia trwałości produktów mięsnych (Rzepkowska i wsp., 2017a; Todorov i wsp. 2007). Zastosowanie LAB oraz ich metabolitów w połączeniu z innymi metodami utrwalania żywności w tzw. technologii płatków również może przyczynić się do znaczącej poprawy bezpieczeństwa zdrowotnego produktów spożywczych i przedłużenia ich trwałości (Budde i wsp., 2003; Todorov i wsp. 2007; Melero i wsp. 2013).

5. CEL PRACY, HIPOTEZY BADAWCZE I ZAKRES PRACY

5.1. Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego (LAB) na jakość mikrobiologiczną i przydatność technologiczną mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie (MDOM) oraz trwałość i jakość produktów wytworzonych z jego udziałem.

5.2. Hipotezy badawcze

1. Szczepy bakterii kwasu mlekowego (LAB), wyizolowane z produktów pochodzenia zwierzęcego, wpływają hamująco na wzrost drobnoustrojów w mięsie drobiowym odkostnionym mechanicznie (MDOM).
2. Mięso drobiowe odkostnione mechanicznie, poddane bioutrwalaniu bakteriami kwasu mlekowego, jest przydatnym surowcem w technologii produkcji wyrobów z mięsa drobiowego.
3. Wybrane szczepy bakterii kwasu mlekowego mogą być uznane za biokonserwanty, wpływające na wydłużenie trwałości przetworów drobiowych z udziałem MDOM.

5.3. Zakres pracy

Zakres pracy i metody badań, realizowane w poszczególnych publikacjach zostały przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Zakres pracy i metody badań

Etap badań	Temat	Metody	Publikacja
ETAP WSTĘPNY	Analiza aktualnego stanu wiedzy dotyczącego jakości mięsa oddzielonego mechanicznie i metod jego utrwalania – uzasadnienie podjęcia tematu badań		P1
ETAP I	<p>1. Badania modelowe farszów z MDOM, wytworzonych z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego</p> <p>1.1. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne i przydatność technologiczną niepeklowanych i peklowanych farszów z MDOM, przechowywanych w warunkach chłodniczych.</p> <p>1.2. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną niepeklowanych i peklowanych farszów z MDOM, przechowywanych w warunkach chłodniczych.</p> <p>1.3. Wybór jednego szczepu bakterii do dalszych badań i określenie warunków jego zastosowania.</p>	<p>6.2.1</p> <p>6.2.2</p> <p>6.2.3</p> <p>6.2.4*</p> <p>6.2.9</p> <p>6.2.6</p> <p>6.2.9</p>	P2, P3
ETAP II	<p>2. Badania jakości i trwałości produktów wytworzonych z dodatkiem MDOM poddanego bioutrwalaniu bakteriami kwasu mlekowego</p> <p>2.1. Określenie wpływu wybranego szczepu bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne oraz jakość sensoryczną modelowych produktów mięsnych poddanych obróbce cieplnej.</p> <p>2.2. Ocena wpływu wybranego szczepu bakterii kwasu mlekowego na trwałość mikrobiologiczną modelowego produktu mięsnego poddanego obróbce cieplnej.</p> <p>2.3. Identyfikacja przy użyciu metod fenotypowych szczepów bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z produktu modelowego oraz porównanie z próbką wzorcową (zastosowanym szczepem bakterii kwasu mlekowego).</p>	<p>6.2.1</p> <p>6.2.2</p> <p>6.2.3</p> <p>6.2.5</p> <p>6.2.6</p> <p>6.2.8</p> <p>6.2.9</p> <p>6.2.6</p> <p>6.2.9</p> <p>6.2.7</p>	P4

*dotyczy farszów peklowanych [Publikacja P3]

Źródło: opracowanie własne na podstawie [Publikacje 1-4] Łaszkiewicz i wsp. (2019a, 2019b, 2021a, 2021b).

6. MATERIAŁ DO BADAŃ I METODY BADAŃ

6.1. Materiał do badań

6.1.1. Surowiec mięsny [P2, P3, P4]

Surowiec mięsny do wykonania modelowych farszów i produktów stanowił MDOM pozyskany poprzez odkostnienie niemrożonych korpusów z kurczaka w separatorze AM2C (Quimper, Francja) (średnica otworów 1 mm) w warunkach przemysłowych. MDOM był dzielony na bloki po 10 kg, mrożony do temperatury -18°C i przechowywany w tej temperaturze przez 2-4 dni. MDOM wykorzystano do przygotowania farszów oraz modelowych produktów, których sposób wytworzenia opisano w pkt. 6.1.3. i 6.1.4. Do wytworzenia farszów MDOM był rozmrażany w warunkach chłodniczych ($4 - 6^{\circ}\text{C}$) przez około 24 h [Publikacje P2, P3 i P4].

6.1.2. Szczepy bakterii kwasu mlekowego [P2, P3, P4]

Do badań w pierwszym etapie [Publikacje P2 i P3] zastosowano trzy szczepy bakterii kwasu mlekowego: *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 wyizolowany z ekologicznego surowego, dojrzewającego schabu wieprzowego, *Levilactobacillus brevis* KL5 wyizolowany z ekologicznej kiełbasy surowej, dojrzewającej oraz *Lactiplantibacillus plantarum* S21 wyizolowany z ekologicznej serwatki kwasowej. Szczepy pochodziły z kolekcji mikroorganizmów Zakładu Higieny i Zarządzania Jakością Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie i zostały wybrane na podstawie badań Rzepkowska i wsp. (2017a; 2017b) W celu odpowiedniego ożywienia i przygotowania szczepów do badań każdorazowo rozmrażano hodowle bakterii kwasu mlekowego, które przechowywano w stokach z 20% dodatkiem glicerolu w temp. -80°C . Każdą z hodowli mieszano, a następnie pobierano po 20 μl każdego ze szczepów i przenoszono do wcześniej przygotowanych sterylnych probówek z dodatkiem 5 ml jałowego bulionu MRS (Merck, Niemcy). Probówki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C . Następnie pobierano po 1 ml 24 godzinnej hodowli, przenoszono do 9 ml świeżego, jałowego bulionu MRS (Merck, Niemcy) oraz poddawano ponownej inkubacji w tych samych warunkach. Następnie hodowle odwirowywano w wirówce J2-21 (Beckman, Dania) (4500 obr./min., 2313 x g), supernatant usuwano, a bakterie zawieszano w 0,85% roztworze NaCl. Otrzymaną biomasę bakteryjną wprowadzono z 0,85% roztworem soli fizjologicznej do

farszu mięsnego w celu uzyskania stężenia bakterii na poziomie ok. 10^7 jtk/g. Wszystkie czynności wykonywane były w sterylnych warunkach, przy użyciu jałowego sprzętu.

W drugim etapie badań [P4] w doświadczeniu zastosowano szczep *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1, który został wybrany na podstawie badań z poprzedniego etapu [P2 i P3]. Szczep został przygotowany w ten sam sposób jak w poprzednim etapie, tak aby koncentracja bakterii w farszu wynosiła ok. 10^7 jtk/g. Uzyskana biomasa bakteryjna zawieszona w roztworze soli fizjologicznej wprowadzana była do farszów z MDOM, z których następnie wyprodukowano kiełbasy.

6.1.3. Modelowe farsze z MDOM [P2, P3]

W pierwszym etapie badań, w doświadczeniu pierwszym [P2] przygotowano cztery warianty farszów z MDOM: K, L1, L2 i L3 (Tabela 3). Wariant kontrolny (K) nie zawierał dodatku bakterii kwasu mlekowego. Do farszu L1 dodano *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 w liczbie 10^7 jtk/g, do farszu L2 dodano *Levilactobacillus brevis* KL5 w liczbie 10^7 jtk/g, a do farszu L3 zastosowano *Lactiplantibacillus plantarum* S21 w liczbie 10^7 jtk/g.

Tabela 3. Receptura modelowych farszów niepeklowanych z surowego MDOM [Publikacja P2]

Składnik receptury/wariant doświadczalny	K	L1	L2	L3
MDOM [kg]	10	10	10	10
Biomasa bakteryjna zawieszona w roztworze soli fizjologicznej [kg]	-	0,476	0,476	0,476
Sól fizjologiczna [kg]	0,476	-	-	-

Źródło: [Publikacja 1] Łaszkiewicz i wsp. (2019a)

W doświadczeniu drugim [P3] przygotowano pięć wariantów farszów z MDOM poddanych peklowaniu (Tabela 4) [Publikacja P3 – Tabela 1]: C150 - kontrola z azotanem (III) sodu w dawce 150 mg/kg, C50 - kontrola z azotanem (III) sodu w dawce 50 mg/kg, PL1 - zastosowano *L. plantarum* SCH1 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg, PL2 - zastosowano *L. brevis* KL5 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg oraz PL3 - zastosowano *L. plantarum* S21 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg.

Tabela 4. Receptura modelowych farszów peklowanych z surowego MDOM [Publikacja P3]

Składnik receptury/wariant doświadczalny	C150	C50	PL1	PL2	PL3
MDOM [kg]	10	10	10	10	10
Sól [kg]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Azotan (III) sodu [kg]	0,0016	0,00053	0,00053	0,00053	0,00053
Biomasa bakteryjna zawieszona w roztworze soli fizjologicznej [kg]	-	-	0,476	0,476	0,476
Sól fizjologiczna [kg]	0,476	0,476	-	-	-

Źródło: [Publikacja 1] Łaskiewicz i wsp. (2021a)

Składniki farszów niepeklowanych i peklowanych mieszano przez 3 minuty do uzyskania jednolitej konsystencji w mieszalniku Keripar (Troy, Ohio, USA). Farsze zamykano w puszki o gramaturze 190 g w celu ograniczenia zanieczyszczeń mikrobiologicznych i przechowywano w temp. 4-6°C przez 7 dni. Badania farszów wykonano po 24 godzinach oraz po 4 i 7 dniach chłodniczego przechowywania. Doświadczalne produkcje farszów z MDOM przeprowadzono w hali póltechnicznej Zakładu Technologii Mięsa i Tłuszczu IBPRS-PIB w Warszawie.

6.1.4. Modelowy produkt mięsny z MDOM poddany obróbce cieplnej [P4]

W drugim etapie badań [P4] przygotowano dwa warianty farszów z MDOM do produkcji modelowego produktu mięsnego poddanego obróbce cieplnej: C – wariant kontrolny wytworzony z MDOM peklowanego azotanem (III) sodu w dawce 50 mg/kg, L – wariant wytworzony z MDOM peklowanego azotanem (III) sodu w dawce 50 mg/kg z dodatkiem *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 w liczbie 10^7 jtk/g farszu (Tabela 5) [Publikacja P4 – Tabela 1]. W wariacie C do 10 kg rozmrożonego MDOM dodano roztwór soli fizjologicznej bez bakterii. Do MDOM w wariacie L dodano biomasę bakteryjną zawieszoną w roztworze soli fizjologicznej. Następnie MDOM (C i L) wymieszano oddzielnie w mieszalce (N-50G, Hobart Corporation, Troy, Ohio, USA) przez 1 minutę i pozostawiono w pojemnikach polipropylenowych (pojemność 48 l) na 4 dni w chłodni w temperaturze 4°C. Czas i warunki przechowywania ustalono na podstawie

badan w farszach z MDOM [P2 i P3]. Nastepnie do MDOM (C i L) dodano wode/lod, azotan (III) sodu (50 mg/kg), przyprawy, substancje dodatkowe (Tabela 5) [Publikacja 4 – Tabela 1] i kutrowano w kutrze K40 (Seydelmann, Stuttgart, Niemcy) do osiagniecia temperatury farszu 10°C. Farsze z MDOM nadziewano w oslonki polprzepuszczalne (DAT SCHAUB, Suchy Las, Polska) i poddano osadzaniu w temperaturze 20-25°C przez 45 minut. Nastepnie nadziane kielbasy byly wedzone goracym dymem 56-65°C przez 50 minut i dalej parzone w temperaturze 70-72°C w komorze wędzarniczo-parzelniczej (Vemag, Warszawa, Polska) do uzyskania wewnatrz batonu 70°C. Gotowe produkty wstepnie wystudzono woda do temperatury 15-20°C, a nastepnie dochładzano zimnym powietrzem w chłodni do temperatury 4-6°C.

Tabela 5. Receptura modelowego farszu uzytego do produkcji kielbasy z MDOM [Publikacja P4]

Składnik receptury/wariant doświadczalny	C	L
MDOM [kg]	100,00	100,00
Biomasa bakteryjna zawieszona w roztworze soli fizjologicznej [kg]	-	1,25
Sól fizjologiczna [kg]	1,25	-
Woda/lód [kg]	30,00	30,00
Azotan (III) sodu [kg]	0,0070	0,0070
Trifosforan sodu (Tari P-31: 57% P ₂ O ₅) [kg]	0,33	0,33
Askorbinian sodu [kg]	0,05	0,05
Chlorek sodu [kg]	2,30	2,30
Białko SUPRO 595 [kg]	2,00	2,00
Skrobia ziemniaczana [kg]	2,50	2,50
Karagen GPI 250X [kg]	0,40	0,40
Pieprz naturalny czarny [kg]	0,25	0,25
Majeranek [kg]	0,07	0,07
Czosnek świeży [kg]	0,05	0,05
Razem [kg]	137,96	137,96

Źródło: [Publikacja 2] Łaszkiwicz i wsp. (2021b)

Badania modelowych kiełbas z MDOM wykonano po przeprowadzonej obróbce cieplnej i wychłodzeniu (po produkcji) oraz po 1 i 3 tygodniach przechowywania. Produkcje doświadczalne przeprowadzono w hali póltechnicznej Zakładu Technologii Mięsa i Tłuszczu IBPRS-PIB w Warszawie.

6.2. Metody badań

6.2.1. Pomiar pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego [P2, P3, P4]

Próbki o masie 10 g homogenizowano z 50 ml wody destylowanej w celu określenia pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (redox) przy użyciu blendera o mocy 800 W (Bosch, Niemcy) przez 1 minutę przy prędkości równej 14000 obr./min. Do pomiaru pH zastosowano pH-metr cyfrowy Mettler Delta 350 z automatyczną kompensacją temperatury (Mettler Toledo, Szwajcaria) oraz elektrodę szklano-kalomelową In Lab Cool (Mettler Toledo, Szwajcaria). Wartość redox określano przy użyciu elektrody In Lab Redox Pro (Mettler Toledo, Szwajcaria). Otrzymaną wartość redox (mV) przeliczono na wartość potencjału redox w stosunku do standardowej elektrody wodorowej EH (mV). W tym celu do wartości odczytu uzyskanej za pomocą urządzenia dodano wartość potencjału elektrody odniesienia w temperaturze 20°C: $E_{ref} = 207 \text{ mV}$.

6.2.2. Zawartość azotanów (III) i azotanów (V) [P2, P3, P4]

Zawartość azotanów (III) i (V) została oznaczona wg PN-EN 120414:2006 ze zmianą Siu & Henshall (1998). Próbkę o masie 10 g umieszczono w kolbie miarowej i dodano wodę dejonizowaną do objętości 50 ml. Zhomogenizowaną próbkę ogrzewano i utrzymywano temperaturę pomiędzy 70°C a 80°C przez 20 min. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej do próbki dodano wodę dejonizowaną do końcowej objętości 100 ml i wymieszano. Supernatant przesączono przez filtry strzykawkowe z octanu celulozy (CA) (Alfatec Technology, Zagrzeb, Chorwacja) o wielkości porów 0,45 µm. Następnie przesącz zebrano do analizy chromatograficznej.

Azotany (III) i (V) rozdzielono w warunkach izokratycznych - 10 mmol/l wodorotlenku sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska) przez 20 min., a następnie płukano kolumnę 50 mmol/l wodorotlenkiem sodu przez 10 min. i równoważono 10 mmol/l wodorotlenek sodu przez 5 min. Objętość nastrzyku wynosiła 25 µl, a szybkość przepływu eluentu wynosiła 1,5 ml/min. Anality wykrywano stosując detekcję UV przy 225 nm.

Do wykonania oznaczeń zastosowano chromatograf cieczowy Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy) wyposażony w detektor UV z kolumną analityczną IonPac® AS11-HC 4 x 250 mm (Thermo Fisher Scientific, USA) i przedkolumną AG11-HC 4 x 50 mm (Thermo Fisher Scientific, USA). Zawartość azotanów (III) i (V) w badanych próbkach wyrażono jako sole NaNO_2 i NaNO_3 w mg/kg.

6.2.3. Pomiar barwy [P2, P3, P4]

Do pomiaru barwy został użyty spektrofotometr sferyczny (CR-300, Konica Minolta, Tokyo, Japan) z otworem pomiarowym o średnicy 25,4 mm. Wyznaczone współrzędne trójchromatyczne wyrażone zostały w systemie CIE $L^* a^* b^*$, gdzie L^* oznacza jasność, a^* chromatyczność w zakresie czerwieni i zieleni oraz b^* chromatyczność w zakresie koloru żółtego i niebieskiego. Przy pomiarze zastosowano obserwator standardowy CIE: 2° , illuminant D65, obszar pomiaru 8 mm. Jako źródło odniesienia zastosowano wzorzec bieli ($L^* = 95,87$, $a^* = -0,49$, $b^* = 2,39$).

6.2.4. Analiza zawartości nitrozylobarwników [P3]

Zawartość nitrozylobarwników oznaczono metodą Hornseya (1956) i wyrażono w ppm hematyny. W celu przeprowadzenia ekstrakcji odważono 5 g (z dokładnością 0,01g) rozdrobnionego produktu do zlewki i dodano do niego 20 ml acetonu oraz 1,5 ml wody destylowanej. Całość homogenizowano przez 30 sekund przy prędkości noży 12000 obr/min.. Po tym czasie homogenat odwirowano, a supernatant filtrowano przez sącdek szklany (Whatman GF/A) i mierzono absorbancję przesącza na spektrofotometrze Hitachi U2900 (Hitachi, Tokio, Japonia), przy długości fali 540 nm wobec próby odczynnikowej.

6.2.5. Oznaczenie ogólnej zawartości barwników hemowych i stężenia nitrozylomioglobiny [P4]

Ogólną zawartość barwników hemowych oraz stężenie nitrozylomioglobiny oznaczono metodą Hornseya (1956). Wartość absorbancji filtratów mierzono spektrofotometrem (U-2900, Hitachi, Tokio, Japonia). Całkowitą zawartość barwników hemowych zmierzono w ppm hematyny i obliczono mnożąc absorbancję przy 640 nm przez 680. Stężenie nitrozylomioglobiny (NO-Mb) obliczono, mnożąc absorbancję przy 540 nm przez 290 i na koniec wyrażono w g/100 g wg wzoru:

$$\text{NOMb (g/100 g)} = \frac{\text{NO – Mb (ppm)}}{\text{ogólna zawartość barwników hemowych (ppm)}} \times 100$$

6.2.6. Badania mikrobiologiczne [P2, P3, P4]

Zakres badań mikrobiologicznych farszów niepeklowanych, farszów peklowanych oraz kiełbas z MDOM w pierwszym okresie badań (po produkcji) obejmował: ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę bakterii fermentacji mlekowej, liczbę *E. coli*, liczbę *Enterobacteriaceae*, liczbę gronkowców koagulazo-dodatnich oraz obecność *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. w 25 g. Zakres i metodykę badań mikrobiologicznych opisano poniżej:

- ogólna liczbę drobnoustrojów w 1 g wg PN-EN ISO 4833-1:2013-12 + Ap1:2016-11 (pożywka PCA, inkubacja 30°C±1°C, 72 h ± 3 h);
- liczba mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej w 1 g wg PN-ISO 15214:2007 (pożywka MRS, inkubacja 30°C±1°C, 72 h ± 3 h);
- liczba *Escherichia coli* w 1 g wg PN-EN ISO 16649-2:2004 (podłoże agar TBX, inkubacja 44°C±1°C, 18-24 h),
- liczba *Enterobacteriaceae* w temp. 37°C w 1 g wg PN-ISO 21528-2:2017-08 (podłoże VRBD, inkubacja 37°C ± 1°C, 24 h ± 2 h);
- liczba gronkowców koagulazododatnich w 1 g wg PN-EN ISO 6888-2:2001 + A1:2004 (pożywka agarowa z plazmą króliczą i fibrynogenem (RPF), inkubacja 37°C±1°C, 18-24 h);
- obecność *Salmonella* spp. w 25 g wg PN-EN ISO 6579-1:2017-04 (Inkubacja w workach w zbuforowanej wodzie peptonowej (WPZ) 37°C ± 1°C, 18 h ± 2 h. Po inkubacji posiew 0,1 ml do RVS - inkubacja 41,5°C ± 1°C, 24 h± 3 h oraz posiew 1,0 ml do MKTT - inkubacja 37°C±1°C, 24 h ± 3 h. Po inkubacji posiew na pożywki stałe: XLD i RA, inkubacja 37°C ± 1°C, 24 h ± 3 h);
- obecność *Campylobacter* spp. w 25 g wg PN-EN ISO 10272-1:2017-08 (Inkubacja w atmosferze mikroaerofilnej w 37°C ± 1°C, od 4 h do 6 h, na pożywce płynnej BOLTON. Następnie inkubacja w temperaturze 41,5°C ± 1°C, 44 h ± 4 h. Do wykrywania obecności *Campylobacter* zastosowano szybki test serologiczny Singlepath *Campylobacter*).

Do oznaczeń pobierano 10 g próbki w przypadku oznaczeń ilościowych lub 25 g w przypadku oznaczeń jakościowych, po wymieszaniu produktu i zawieszano w 90 lub 225 ml wody peptonowej, następnie wykonywano szereg rozcieńczeń i wysiewano na poszczególne podłoża.

W przypadku farszów z MDOM, gdy nie stwierdzono w nich obecności wybranych drobnoustrojów, nie oznaczano ich w dalszym etapie badań przechowalniczych.

W badaniach mikrobiologicznych kiełbas z MDOM w przypadku *E. coli* i gronkowców koagulazo-dodatnich, gdy nie stwierdzono ich obecności w kiełbasie po produkcji oraz po 1 tygodniu przechowywania chłodniczego, nie oznaczano ich po 3 tygodniach przechowywania. Natomiast w przypadku *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp., gdy nie stwierdzono ich obecności w kiełbasie po produkcji, nie oznaczano ich w kolejnych okresach badań przechowalniczych. Pozostałe badania mikrobiologiczne wykonano w produktach po produkcji oraz po 1 i 3 tygodniach przechowywania w 4°C.

6.2.7. Biochemiczna identyfikacja LAB w modelowych kiełbasach z MDOM [P4]

Próby kiełbas posiano na płytki z pożywką stałą MRS. Po inkubacji posiewów pobrano losowo z płytek po 10 kolonii dla każdej z prób. Z pobranych kolonii przygotowano hodowle w bulionie MRS (LabM, Heywood, UK). Przynależność wyizolowanych szczepów bakterii do rodzaju *Lactobacillus* potwierdzono barwieniem Grama i obserwacją wyglądu komórek pod mikroskopem oraz testem na obecność katalazy. Identyfikację na poziomie gatunku prowadzono przy użyciu testów API 50 CH (bioMérieux Polska Sp. z o.o, Warszawa, Polska), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Otrzymane profile biochemiczne (wyniki fermentacji węglowodanów) odczytane za pomocą bazy apiweb™, pozwoliły przyporządkować do konkretnego gatunku badane izolaty, które porównano z profilem szczepu *L. plantarum* SCH1, użytego w doświadczeniu.

6.2.8. Ocena sensoryczna modelowych kiełbas z MDOM [P4]

Ocenę sensoryczną przeprowadzono metodą Quantitative Descriptive Profile (QDP) wg normy ISO 13299:2016. Zadaniem oceniających było określenie intensywności każdego z wymienionych wyróżników jakości i naniesienie swojej oceny na odpowiednią niestrukturowaną skalę graficzną (0-10 j.u.). Do porównania sensorycznej jakości

modelowych produktów mięsnych w ocenie sensorycznej po produkcji zastosowano: 4 wyróżniki smaku (peklowanego mięsa, kwaśny, tłuszczowy, słony, gdzie 0 - najmniej intensywny, 10 - najbardziej intensywny), 3 wyróżniki zapachu (peklowanego mięsa, kwaśny/ostry, tłuszczowy, gdzie 0 - najmniej intensywny, 10 - najbardziej intensywny) oraz cechy takie jak: pożądalność zapachu, ton barwy, kruchość, soczystość, pożądalność smaku, jakość ogólna, gdzie 0 - najmniej pożądaną, 10 - najbardziej pożądaną. Do porównania sensorycznej jakości modelowych produktów mięsnych w ocenie sensorycznej po 3 tygodniach przechowywania zastosowano: 2 wyróżniki zapachu (wędkonkowy, tłuszczowy, gdzie 0 - najmniej intensywny, 10 - najbardziej intensywny), oraz cechy takie jak: pożądalność zapachu, ton barwy, kruchość, pożądalność smaku, jakość ogólna, gdzie 0 - najmniej pożądaną, 10 - najbardziej pożądaną. Ocenę sensoryczną kiełbas po 3 tygodniach przechowywania ograniczono do 7 wyróżników ze względu na nieakceptowalny smak i zapach produktu w wariancie kontrolnym.

Próbki przed oceną przechowywane były w pomieszczeniu w temperaturze $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 30 minut. Oceniający otrzymywali każdorazowo zakodowane trzycyfrowym kodem próbki kiełbas z MDOM, w plastikowym pojemniku z pokrywką o pojemności 250 ml, naczynie z wodą do płukania jamy ustnej i kartę oceny. Każdy pojemnik zawierał dwa plastry, po jednym z dwóch różnych batonów kiełbas. Oceny zostały przeprowadzone z udziałem 8 - osobowego przeszkolonego zespołu w pracowni do analiz sensorycznych z wydzielonymi stanowiskami do indywidualnych ocen, przy sztucznym oświetleniu. Ocena jakości sensorycznej produktów modelowych została wykonana po produkcji oraz po 3 tygodniach przechowywania.

6.2.9. Analiza statystyczna [P2, P3, P4]

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach $n=3$. W doświadczeniu z farszami z MDOM niepeklowanymi [P2] oraz w doświadczeniu z modelowymi produktami mięsnymi [P4] dla każdego parametru zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), najpierw pomiędzy wariantami w każdym z trzech okresów przechowywania, a następnie pomiędzy czasem przechowywania prób dla każdego z wariantów, stosując program statystyczny STATGRAPHICS 4.1 (Manugistics Inc., USA). Do określenia istotności średnich wartości dla porównań wielokrotnych zastosowano test Fishera ($P < 0,05$).

W doświadczeniu z farszami z MDOM peklowanymi [P3] przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji gdzie uwzględniono dwa czynniki: dodatek LAB i okres przechowywania wraz z ich interakcjami. Do określenia istotności średnich wartości dla porównań wielokrotnych zastosowano test post-hoc Bonferroniego ($P < 0,05$). Do obliczeń wykorzystano pakiet Statistica w wersji 13 (StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków, Polska).

7. WYNIKI I DYSKUSJA

7.1. Badania modelowe farszów z MDOM, wytworzonych z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego [P2, P3]

7.1.1. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne i przydatność technologiczną niepeklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P2]

Badania nad mięsem oddzielonym mechanicznie prowadzone są w szerokim zakresie od wielu lat, jednakże niewielu badaczy podejmowało temat zastosowania bakterii kwasu mlekowego w innym aspekcie niż poprawa jakości mikrobiologicznej. Badanie cech fizykochemicznych oraz przydatności technologicznej MDOM miało na celu sprawdzenie czy mięso poddane bioutrwalaniu nie utraci właściwości mających istotne znaczenie w dalszych etapach obróbki technologicznej, takich jak np. odpowiednie pH, potencjał oksydoredukcyjny czy barwa.

Badania własne wykazały, że dodatek bakterii kwasu mlekowego do niepeklowanych farszów z mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie nie miał wpływu na kluczowe cechy surowca warunkujące jego przydatność do celów technologicznych, czyli tzw. przydatność technologiczną. W Publikacji 2 w Tabeli 1 przedstawiono zmiany pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w farszach z MDOM w czasie 7 dni chłodniczego przechowywania, które badano po 1, 4 i 7 dniach. Istotnie statystycznie obniżenie pH względem pozostałych próbek zaobserwowano w wariacie L1 z dodatkiem szczepu *L. plantarum* po 1 dniu przechowywania. W kolejnych dniach chłodniczego przechowywania obserwowano obniżanie pH, jednak różnice zarówno pomiędzy wariantami, jak i okresami przechowywania były niewielkie, stąd można wnioskować, że nie miały one wpływu na wodochłonność surowca w dalszych etapach obróbki.

W badaniach Szymańskiego i wsp. (2017) stwierdzono istotny wpływ LAB na kwasowość farszów z rozdrobnionego mięsa z szynki wieprzowej. Można przypuszczać, że rodzaj surowca mógł wpłynąć na działanie bakterii kwasu mlekowego, ponieważ MDOM zawiera stosunkowo więcej tłuszczu, kolagenu oraz charakteryzuje się niższą aktywnością wodną, wobec czego środowisko dla tych bakterii było nietypowe dla ich rozwoju (Michalski, 2006; Michalski, 2009; Trindade i wsp., 2004).

Badanie potencjału oksydacyjno-redukcyjnego wykazało, że wartość ORP w całym okresie przechowywania utrzymywała się na zbliżonym poziomie w każdym z wariantów. Istotny statystycznie wzrost ORP po 4 dniach przechowywania zaobserwowano jedynie w wariancie L3. Brak różnic w potencjale wskazuje na stabilność oksydacyjną farszów z MDOM, co jest ważnym czynnikiem w surowcu o dużej zawartości tłuszczu. Po 4 i 7 dniach przechowywania w wariantach z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego wartość potencjału redoks była na niższym poziomie w porównaniu z wariantem kontrolnym. Podobne spostrzeżenia opisali Wójciak i wsp. (2014) w badaniach kiełbas dojrzewających z dodatkiem LAB.

W farszach z MDOM wykonano badania zawartości azotanów (V) i (III), choć nie były one poddane peklowaniu, niemniej jednak azotany (V) mogą występować w mięsie przerobowym i kulinarnym (Cierach, 2007; Duda, 1998; Lammarino i Taranto, 2012). Jak podają autorzy, mogą one pochodzić z różnych źródeł, np. z wody, a są to wartości na poziomie około 10-15 mg/kg. W badaniach własnych farszów z MDOM nie stwierdzono obecności azotanów (V) i (III), co świadczyło o braku zanieczyszczeń surowca tymi związkami.

W badaniach parametrów barwy wykazano udział szczepu *L. brevis* KL5 w procesach barwotwórczych zachodzących w mięsie. Wartości parametrów barwy przedstawiono w Publikacji 2 – Tabela 2. W wariancie z dodatkiem *L. brevis* KL5 (L2) stwierdzono najwyższą wartość parametru $a^*=22,76$, a więc największy udział barwy czerwonej w próbce po 7 dniach przechowywania. Można przypuszczać, że jest to zjawisko związane z mechanizmem syntezy NO z L-argininy przez LAB. Badania pokazują, że niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego mają zdolność wytwarzania NO przez syntezę z L-argininy. W przypadku bakterii tlenek azotu (II) pełni szereg istotnych funkcji, jest cząsteczką sygnałową, aktywuje lub dezaktywuje enzymy. Mechanizm przekształcania L-argininy w przemianach komórki bakteryjnej polega na utlenieniu z udziałem tlenu cząsteczkowego grupy iminowej reszty guanidynowej L-argininy. Reakcja zachodzi dwuetapowo. W pierwszym etapie L-arginina jest hydroksylowana z udziałem tlenu i koenzymu (NADPH), następnie powstały związek pośredni utleniany jest do cytruliny i tlenku azotu. Reakcja katalizowana jest przez kilka izoform enzymu syntazy tlenku azotu (Christensen i wsp., 1999; Morita i wsp., 1997; Wójciak i Dolatowski, 2015). Badania

wskazują, że niektóre szczepy LAB wykazują zdolność do przemiany formy barwnika z $MbFe^{3+}$ do $MbFe^{2+}$, co wpływa na zmianę barwy mięsa surowego niepeklowanego z brązowej na jasnoczerwoną (Li i wsp., 2016; Zhang i wsp., 2007). Najniższym udziałem składowych barw $a^*=19,45$ i $b^*=8,38$ oraz statystycznie istotnie najwyższą ($P < 0,05$) wartością parametru $L^*=53,88$, opisującego jasność wyrobu, po 7 dniach przechowywania charakteryzował się wariant L1 z *L. plantarum* SCH1. W farszach L1 i L3 po 4 dniach przechowywania jasność L^* istotnie obniżyła się, a następnie po 7 dniach przechowywania istotnie wzrosła ($P < 0,05$).

Podsumowując, można stwierdzić, że najlepsze właściwości technologiczne wykazał wariant z dodatkiem *L. brevis* KL5, ponieważ poza stabilnym pH i potencjałem redox, charakteryzował się atrakcyjniejszą barwą, co z punktu widzenia konsumenta odgrywa ważną rolę podczas wyboru produktu końcowego. Niemniej jednak, wybierając szczep do kolejnego etapu badań należało spojrzeć szerzej na jego cechy, także pod kątem mikrobiologicznym.

7.1.2. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną niepeklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P2]

Próby zastosowania bakterii kwasu mlekowego w mięsie oddzielonym mechanicznie opisali, kilkadziesiąt lat temu, Raccach (1977) oraz Raccach i Baker (1978), którzy wykazali w badaniach możliwość przedłużenia przydatności MDOM z 4 do 7 dni oraz mięsa mielonego z piersi kurczaka z 8 do 12 dni, przy zastosowaniu szczepów *Pediococcus cerevisiae* i *Lactobacillus plantarum* oraz hamujący wpływ tych LAB na *Pseudomonas*, *Salmonella typhimurium* oraz *Staphylococcus aureus* w MDOM poddanych obróbce cieplnej. Ci sami badacze, w 1979 roku, opisali także sposób redukcji liczebności bakterii psychrotrofowych w niepeklowanym drobiowym mięsie oddzielonym mechanicznie, przechowywanym w warunkach chłodniczych przez 7 dni, przez zaszczepienie surowca kulturami startowymi *Pediococcus cerevisiae* i *Lactobacillus plantarum* w liczbie $2 \cdot 10^9$ jtk/g. Po 7 dniach przechowywania w niepeklowanym drobiowym mięsie oddzielonym mechanicznie, zaszczepionym kulturą startową, liczba bakterii psychrotrofowych utrzymywała się poniżej poziomu 10^7 jtk/g (Raccach i Baker, 1979). Natomiast Hecer i Sözen (2011) podjęli próbę zastosowania kwasu mlekowego

w MDOM na poziomie 0,2% i 0,3% w celu poprawy jakości mikrobiologicznej. Po 3 dniach przechowywania liczba *Escherichia coli* wynosiła $3,4 \cdot 10^3$ jtk/g w próbie z 0,2% kwasu mlekowego oraz $1,7 \cdot 10^3$ jtk/g w próbie z 0,3% kwasu mlekowego, natomiast w próbie kontrolnej $7,1 \cdot 10^3$ jtk/g.

W badaniach własnych w pierwszej kolejności wykonano wstępne badania jakości mikrobiologicznej surowca, które wykazały, że w porównaniu z normą PN-A-86522:1992, użyty MDOM nie spełniał kryterium ogólnej liczby drobnoustrojów oraz pałeczek z grupy *coli*. Ogólna liczba drobnoustrojów wyniosła 6,30 log jtk/g, a liczebność *Escherichia coli* wynosiła 2,04 log jtk/g. Norma dopuszczała ogólną liczbę drobnoustrojów na poziomie $1 \cdot 10^6$ jtk/g (czyli 6 log jtk/g), a pałeczki z grupy *coli* powinny być nieobecne w 0,001 g. W surowcu nie wykryto obecności *Salmonella* spp. oraz *Campylobacter* spp., a liczebność gronkowców koagulazo-dodatnich wynosiła < 10 jtk/g. Ponadto oznaczono liczebność *Enterobacteriaceae* na poziomie 3,83 log jtk/g. W badaniach wstępnych oznaczono także liczebność mezofilnych bakterii kwasu mlekowego, która wynosiła 4,18 log jtk/g.

Wyniki dalszych badań mikrobiologicznych niepeklowanych farszów z MDOM przedstawiono w Tabeli 3 w Publikacji P2. We wszystkich wariantach farszów MDOM obserwowano wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów w czasie przechowywania. W przypadku wariantów z dodatkiem LAB wzrost OLD z pewnością był po części wynikiem tego działania. W tych próbach liczebność bakterii kwasu mlekowego utrzymywała się na zbliżonym poziomie w całym okresie przechowywania.

Podczas przechowywania chłodniczego obserwowano stopniowe hamowanie wzrostu *E. coli* w farszu L1 z *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1. Zastosowanie *L. plantarum* SCH1 wpłynęło również hamująco na rozwój *Enterobacteriaceae* po 4 dniach przechowywania w porównaniu z pozostałymi wariantami. W wariacie L1 stwierdzono istotnie najniższą liczebność *Enterobacteriaceae* (4,56 log jtk/g) po 4 dniach przechowywania, natomiast w wariacie kontrolnym, w tym samym czasie, *Enterobacteriaceae* oznaczono na poziomie 6,26 log jtk/g. Można przypuszczać, że inhibujące działanie względem niekorzystnej mikroflory było związane z produkcją bakteriocyn (plantarycyny) i/lub innych metabolitów uwalnianych poza komórkę bakterii (Gong i wsp., 2010; Rzepkowska i wsp., 2017b). Źródło wyizolowania, jakim było środowisko mięsne, prawdopodobnie również mogło wpływać na łatwiejszą adaptację

L. plantarum SCH1 do warunków panujących w farszu z MDOM, w porównaniu ze szczepem *L. plantarum* S21 wyizolowanym z serwatki kwasowej.

W badaniach Rzepkowskiej i in. (2017a; 2017b) obserwowano wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową szczepów LAB (m.in. *L. plantarum* SCH1 i *L. brevis* KL5 oraz *L. plantarum* S21) względem *E. coli* i *P. fluorescens*, badaną metodą dyfuzyjno-krażkową na płytkach z selektywnym podłożem. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa zastosowanych szczepów LAB potwierdziła się także w badaniach własnych na modelowych farszach z MDOM w odniesieniu do *E. coli*. Po 7 dniach przechowywania, w ocenie technologicznej farszów z MDOM, stwierdzono nieakceptowalny zapach świadczący o zepsuciu surowca. Liczebność bakterii *E. coli* w tym czasie była najniższa w każdym z wariantów w porównaniu do liczebności tych bakterii po 1 i 4 dniach przechowywania. Zmiany liczby bakterii *E. coli* po 7 dniach przechowywania mogły być spowodowane zdominowaniem mikroflory farszów z MDOM przez inne drobnoustroje obecne w farszach. Wskazywała na to wysoka ogólna liczebność drobnoustrojów w tym okresie przechowywania.

Podsumowując, trudno porównywać uzyskane wyniki jakości mikrobiologicznej farszów z normą PN-A-86522:1992, ponieważ nie przewidywała ona bioprotekcji surowca. Wprowadzenie bakterii kwasu mlekowego do MDOM spowodowało wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów. Po 7-dniowym okresie przechowywania we wszystkich wariantach z dodatkiem LAB ogólna liczba drobnoustrojów przekraczała granicę dopuszczoną w normie, a liczba *E. coli* wynosiła od 2,09 do 2,32 log jtk/g. W przypadku bakterii z grupy *coli*, obserwowano stopniową redukcję liczebności *E. coli* w farszu L1, niemniej nie zostało spełnione kryterium założone w normie.

7.1.3. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne i przydatność technologiczną peklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P3]

W praktyce przemysłowej w celu utrwalenia MDOM stosuje się proces peklowania azotanem (III) sodu. Utrwalanie MDOM jest związane przede wszystkim z bakteriostatycznym działaniem azotanów (III), które są dodawane na odpowiednim poziomie, w połączeniu z innymi substancjami, głównie z chlorkiem sodu (Lücke, 2008; Sindelar i Milkowski, 2011). Ponadto, peklowanie odgrywa istotną rolę w kształtowaniu

barwy, smaku i zapachu produktów z udziałem MDOM (Cammak et al., 1999; Majou i Christieans, 2018).

Zastosowana dawka azotanu (III) sodu 50 mg/kg została dobrana m.in. w związku z doniesieniami na temat ograniczenia w stosowaniu azotanów (III) w produkcji wędlin oraz na podstawie regulacji obowiązujących w Danii, gdzie poziom dodatku azotanu (III) sodu obniżono ze 150 do 60 mg/kg. Mając na uwadze, że obniżenie dodatku azotanu (III) sodu może ograniczyć jego przydatność w przedłużeniu trwałości farszów z MDOM, w badaniach własnych zastosowano, jako dodatkowy płótek, biokonserwację.

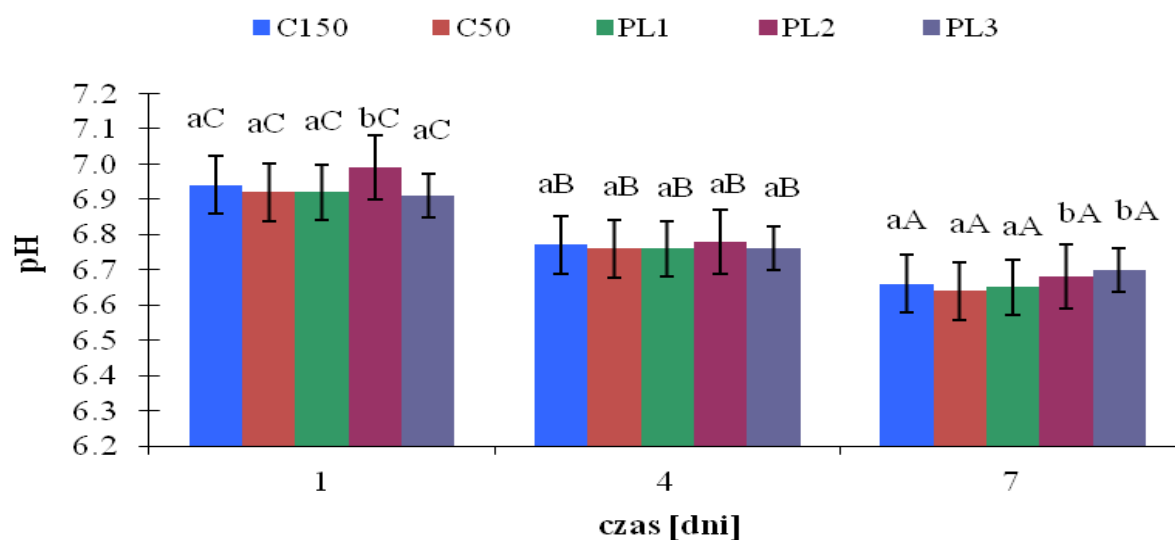
Zastosowanie azotanów (III) w konserwacji produktów mięsnych odgrywa kluczową rolę w hamowaniu rozwoju bakterii *Clostridium botulinum* i zapobieganiu wytwarzaniu toksyn botulinowych (Majou i Christieans, 2018; Sebranek i Bacus, 2007; Sindelar i Milkowski, 2011). W niniejszych badaniach własnych nie analizowano skuteczności przeciwbakteryjnej stosowania *L. plantarum* SCH1 i azotanu (III) sodu w zmniejszonej ilości (50 mg/kg) przeciwko *C. botulinum*. Właściwości azotanu (III) sodu, które czynią go również skutecznym związkiem przeciwbotulinowym, zależą od jego interakcji z kilkoma innymi czynnikami (sól, pH, obróbka cieplna, poziom zarodników, poziom azotanów (III) wprowadzanych podczas produkcji oraz poziomy azotanów (III) resztkowych w mięsie) (Sebranek, 2009; Sebranek i Bacus, 2007). Lövenklev i wsp. (2004b) wykazali, że zastosowanie NaNO_2 w dawce 45,0 mg/kg skutecznie hamuje ekspresję genu *C. botulinum*. Również inne badania wykazały, że stosowanie NaNO_2 w ilości 37,5 mg/kg lub 75,0 mg/kg razem z NaCl w ilości 2,5% całkowicie hamuje wzrost *C. botulinum* w środowisku beztlenowym (Lövenklev i wsp., 2004a).

W badanych farszach z MDOM poddanych peklowaniu, dodatek LAB oraz czas przechowywania miały istotny wpływ na wartość pH ($P < 0,001$). Stwierdzono interakcję między dodatkiem LAB a czasem przechowywania dla wartości pH ($P < 0,01$), co pokazano na Rys. 1a [Publikacja 3 – Tabela 2]. Dodatek LAB do farszów z MDOM skutkowało niewielkimi, ale istotnymi ($P < 0,05$) różnicami w kwasowości farszów i zaobserwowano je między wariantami po pierwszym dniu przechowywania. Kwasowość farszów była wyższa przy dłuższym czasie przechowywania ($P < 0,05$). Dynamika zmian pH była podobna we wszystkich wariantach. Wzrost kwasowości farszów miał prawdopodobnie związek z aktywnością metaboliczną dodanych LAB lub dzikich szczepów bakterii

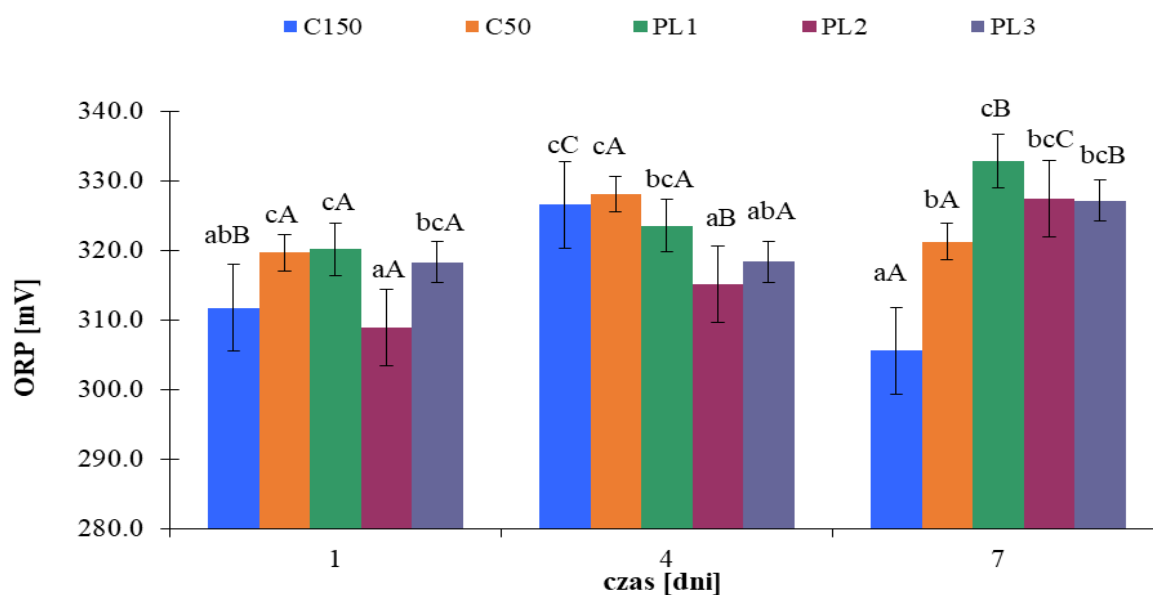
obecnych w MDOM (Ha i wsp., 2003). Bakterie kwasu mlekowego mogą fermentować cukry do kwasu mlekowego lub innych kwasów organicznych (Balciunas i wsp., 2013). Po 7 dniach przechowywania wartość pH farszów nie różniła się istotnie ($P > 0,05$). Biorąc pod uwagę, że stwierdzone różnice w pH między wariantami w trzech okresach przechowywania były niewielkie (0,02 - 0,08) można wnioskować, że nie miały one wpływu na wodochłonność surowca.

MDOM różni się składem chemicznym od mięsa wykrawanego ręcznie i charakteryzuje się m.in. wysoką zawartością tłuszczu, wysoką zawartością kolagenu oraz niską aktywnością wody (Mayer i wsp., 2007). Można przypuszczać, że środowisko, w jakim znalazły się bakterie kwasu mlekowego nie było korzystne dla ich rozwoju. Stosunkowo niska zawartość cukrów w MDOM mogła mieć również wpływ na ograniczoną produkcję wybranych metabolitów, w tym kwasu mlekowego, przez zastosowane LAB (Ha i wsp., 2003).

Zaobserwowano istotny ($P < 0,001$) wpływ dodatku LAB, jak i czasu przechowywania na wartość potencjału redoks. Stwierdzono również interakcję między zastosowaniem LAB a czasem przechowywania ($P < 0,001$), co przedstawiono na Rys. 1b [Publikacja 3 – Tabela 2]. Nie stwierdzono istotnych różnic ($P > 0,05$) w wartościach ORP między wariantami w 1. i 4. dniu przechowywania. Istotnie ($P < 0,05$) najniższą wartość ORP zaobserwowano w próbie kontrolnej C150 po 7 dniach przechowywania. W wariacie kontrolnym C50 wartość potencjału redox podczas przechowywania oscylowała w granicach 319,7 - 328,1 mV. W wariacie kontrolnym C150 (NaNO_2 150 mg/kg) potencjał redox po 4 dniach przechowywania wzrósł od 311,8 mV do 326,6 mV i następnie obniżył się o 21,0 mV po 7 dniach przechowywania, uzyskując najniższą wartość spośród wszystkich wariantów ($P < 0,05$). Azotan (III) sodu ma silne właściwości przeciwutleniające (Sebranek, 2009), dlatego przypuszczać można, że dodatek większej ilości NaNO_2 przyczynił się do istotnego obniżenia potencjału redox farszów z MDOM po 7 dniach przechowywania. W próbach z dodatkiem LAB (PL1, PL2, PL3) zaobserwowano wzrost wartości ORP podczas przechowywania. Jednak istotne ($P < 0,05$) różnice w wartościach ORP podczas przechowywania stwierdzono tylko w przypadku PL2.



(a)



(b)

Rysunek 1. Zmiany pH (a) i ORP (b) w farszach peklowanych z MDOM podczas chłodniczego przechowywania.

C150 - kontrola z azotanem (III) sodu w dawce 150 mg/kg, C50 - kontrola z azotanem (III) sodu w dawce 50 mg/kg, PL1 - zastosowano *L. plantarum* SCH1 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg, PL2 - zastosowano *L. brevis* KL5 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg; PL3 - zastosowano *L. plantarum* S21 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg

Źródło: opracowanie własne

W badaniach Libery i wsp. (2014) dodatek bakterii *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, *Lactobacillus acidophilus* Bauer, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 nie wpłynął istotnie na potencjał redox baleronów surowo dojrzewających. Można przypuszczać, że metabolity wytwarzane przez bakterie kwasu mlekowego chronią lipidy przed utlenianiem podczas przechowywania chłodniczego (Libera i wsp., 2014). W przypadku MDOM, w którym nastąpiło uszkodzenie tkanki mięśniowej podczas procesu odkastniania, a lipidy uległy częściowemu utlenieniu, uszkodzone tkanki są dużo bardziej podatne na utlenianie (Stiebing, 2002). Ponadto MDOM charakteryzuje się większą zawartością barwników hemowych w porównaniu z mięsem wykrawanym ręcznie (Daros i wsp., 2005). Barwniki hemowe mogą inicjować procesy utleniania lipidów, a produkty utleniania lipidów sprzyjają utlenianiu barwników (Skibsted, 1996; Faustman i wsp., 1999).

W badaniach własnych [Publikacja 3] wykazano, że dodatek LAB do MDOM i czas przechowywania miały wpływ ($P < 0,001$) na zawartość NaNO_2 w badanych farszach. Stwierdzono interakcję pomiędzy dodatkiem LAB i czasem przechowywania na zawartość NaNO_2 w farszach ($P < 0,001$), co przedstawiono w Publikacji 3 – Tabela 3. Stwierdzono, że zawartość NaNO_2 w próbach doświadczalnych istotnie obniżała się w czasie przechowywania, co wskazuje na reakcję dodanych azotanów (III) z barwnikami hemowymi i innymi składnikami MDOM (Honikel, 2008). Stwierdzono, że zawartość azotanu (III) sodu w próbach MDOM peklowanych w dawce 50 mg/kg (C50, PL1, PL2, PL3) była zbliżona po 1 i 4 dniach przechowywania. Po 1 dniu przechowywania zawartość azotanu (III) sodu w tych wariantach doświadczalnych kształtowała się od 35,6 do 40,4 mg/kg, natomiast po 4 dniach przechowywania wahała się od 28,2 do 30,1 mg/kg. Po 7 dniach przechowywania istotnie najniższą zawartość NaNO_2 (18,8 mg/kg) wykazano w MDOM, w którym zastosowano dodatek *Levilactobacillus brevis* KL5 (PL2) ($P < 0,05$). Azotany (III) mogą być zredukowane przez niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w procesie denitryfikacji (Hames, 2012). W wariantcie kontrolnym C150 stwierdzono, że po 4 dniach przechowywania zawartość azotanu (III) sodu istotnie obniżyła się do 112,6 mg/kg, a po 7 dniach przechowywania wzrosła do 122,0 mg/kg ($P < 0,05$). Wzrost zawartości azotanów (III) po 7 dniach w wariantcie C150 tłumaczyć można redukcją przez bakterie azotanów (V) powstałych w wyniku reakcji dysmutacji (Honikel, 2008; Hames, 2012). Efektywność procesu peklowania mięsa zależy od wielu czynników, w tym

od składu surowcowego (Honikel, 2008). Wysoka zawartość tłuszczu i białek kolagenowych w MDOM (Botka-Petrak i wsp., 2011) może utrudnić dostęp tlenu azotu do barwników hemowych i przez to wpłynąć na końcowy efekt peklowania (Mancini i Hunt, 2005).

Stwierdzono istotny wpływ ($P < 0,001$) dodatku LAB i czasu przechowywania oraz wykazano interakcję tych dwóch czynników ($P < 0,001$) na zawartość NaNO_3 w peklowanych farszach z MDOM. Po 1 dniu przechowywania zawartość azotanów (V) we wszystkich próbach doświadczalnych była zbliżona (13,4 – 15,5 mg/kg). Po 4 dniach stwierdzono wzrost zawartości NaNO_3 we wszystkich wariantach, jednak istotne ($P < 0,05$) różnice zaobserwowano w próbach C150, C50 i PL2. Istotnie ($P < 0,05$) najwyższą zawartość azotanów (V) stwierdzono w C150 (27,8 mg/kg), a najniższą w PL3 (15,1 mg/kg). Wzrost zawartości azotanów (V) w farszach był spowodowany dysmutacją kwasu azotowego wytworzonego z azotanów (III) dodanych do MDOM oraz wtórnymi reakcjami tlenu azotu wytworzonego w reakcji (Honikel, 2008). Zawartość NaNO_3 , w każdym wariantcie, znacząco ($P < 0,05$) zmniejszyła się po 7 dniach przechowywania. Najwyższy poziom azotanów (V) potwierdzono w C150 (15,4 mg/kg). W pozostałych wariantach zawartość azotanów (V) była na podobnym poziomie (7,3-9,0 mg/kg). Redukcja azotanów (V) w MDOM mogła odbywać się przy udziale enzymów bakteryjnych (Honikel, 2008). Ponadto niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* są zdolne do biochemicznej przemiany azotu w tlenek azotu przy udziale reduktazy azotynowej, zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych (Xu i Verstraete, 2001).

Dodatek LAB do MDOM oraz czas przechowywania farszów miał również istotny wpływ na jasność (L^*) oraz parametr a^* barwy farszów peklowanych. W przypadku parametru b^* jedynie czas przechowywania wpłynął istotnie na jego zmiany ($P < 0,001$). Zaobserwowano interakcję między dodatkiem LAB a czasem przechowywania w przypadku wszystkich parametrów barwy: L^* ($P < 0,001$), a^* ($P < 0,001$) oraz b^* ($P < 0,01$). Wyniki poszczególnych parametrów barwy przedstawiono w Publikacji 3 – Tabela 4. Uzyskane wyniki pokazały, że dodatek LAB miał istotny ($P < 0,05$) wpływ na jasność farszów na początku eksperymentu (po 1 dniu). Po 7 dniach przechowywania zaobserwowano wzrost L^* w wariantach PL1 i PL2 w porównaniu do wartości po 4 dniach przechowywania.

W badaniach Zhang i wsp. (2018) stwierdzono również wpływ *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus curvatus* na wzrost jasności barwy (L^*) pakowanej próżniowo surowej wołowiny po chłodniczym przechowywaniu. W badaniach własnych po 4 dniach przechowywania obserwowano istotne obniżenie ($P < 0,05$) wartości parametru b^* we wszystkich wariantach z dodatkiem LAB ($P < 0,05$). Po 7 dniach przechowywania we wszystkich wariantach zaobserwowano obniżenie parametru b^* , z wyjątkiem wariantu PL2 z dodatkiem *L. brevis* KL5, w którym wykazano wzrost parametru b^* (8,63). Wzrost wartości parametrów L^* i b^* w piersi z kurczaka z dodatkiem LAB obserwowano także w badaniach Kim i wsp. (2014). W przypadku parametru a^* , określającego udział czerwieni w tonie barwy, na początku przechowywania (1 dzień) najwyższą jego wartość zaobserwowano w wariacie C150. Największy udział barwy czerwonej po 7 dniach przechowywania zaobserwowano w wariacie PL2. Wpływ LAB na wzrost parametru a^* opisali również Zhang i wsp. (2018) w surowej wołowinie po 38 dniach przechowywania ($P < 0,05$). Wartość parametru a^* wzrosła istotnie ($P < 0,05$) podczas przechowywania we wszystkich wariantach doświadczalnych. Wzrost udziału barwy czerwonej związany był ze zwiększającym się stopniem przepeklowania surowca i ilością nitrozylowych pochodnych barwników hemowych w farszach z MDOM.

W badaniach własnych stwierdzono również istotny wpływ dodatku LAB oraz czasu przechowywania na zawartość barwników nitrozylowych. Zaobserwowano interakcję między czynnikiem dodatku LAB a czasem przechowywania ($P < 0,001$). Jednym z czynników decydujących o szybkości i wydajności procesu peklowania jest stężenie jonów wodorowych. Obniżenie pH wpływa na przereagowanie barwników hemowych (Mancini i Hunt, 2005; Faustman i wsp., 2010). Po 7 dniach przechowywania zawartość nitrozylobarwników istotnie wzrosła we wszystkich wariantach doświadczalnych ($P < 0,05$). Stwierdzono, że zawartość nitrozylobarwników w farszach z MDOM po przechowywaniu była najwyższa w wariantach PL2 i PL3 ($P < 0,05$). W przypadku wariantu PL2 wysoka zawartość nitrozylobarwników mogła być związana z niską zawartością NaNO_2 po 7 dniach przechowywania. Wskazuje to na wysoki stopień przereagowania barwników hemowych z dodanym azotanem (III) sodu (Sebranek i Bacus, 2007; Sindelar i Milkowski, 2011). Wariant PL2 z dodatkiem *L. brevis* KL5 charakteryzował się najniższą wartością ORP po 1 i 4 dniach przechowywania. Wyższa

redukcyjność środowiska MDOM mogła mieć wpływ na redukcję azotanu (III) sodu i generowanie większych ilości tlenu azotu. Tlenek azotu może wchodzić w reakcję z białkami hemowymi MDOM, w wyniku których powstaje kompleks nitrozylohemoglobina (Honikel, 2008). Wariant PL3 charakteryzował się zbliżoną wartością potencjału oksydacyjno-redukcyjnego do wariantu kontrolnego (C50), co wskazuje na zbliżoną redukcyjność środowiska farszów z MDOM. Sugeruje to, że mechanizm, który tłumaczyłby powstanie większej ilości nitrozylobarwników w próbie PL3 jest inny. Niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego mogą wytwarzać tlenek azotu poprzez syntezę z L-argininy (Zhang i wsp., 2007; Li i wsp., 2016). Powstawanie tlenu azotu na tej drodze obserwowano zarówno w środowisku z azotanami (III) i (V), jak i bez nich (Morita i wsp., 1997; Christensen i wsp., 1999).

7.1.4. Określenie wpływu wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego na jakość mikrobiologiczną peklowanych farszów z MDOM przechowywanych w warunkach chłodniczych [P3]

Badania mikrobiologiczne farszów MDOM rozpoczęto od badań wstępnych surowego farszu z MDOM, które opisano w podrozdziale 7.1.2. Wyniki badań mikrobiologicznych były typowe dla tego rodzaju surowca, co potwierdzało się w badaniach innych autorów. Zbliżony poziom OLD (5,86 log jtk/g) w MDOM oznaczyli Hać-Szymańczuk i wsp. (2014). W badaniach On i wsp. (2011) zaobserwowano wyższą OLD w MDOM (7,26 log jtk/g). Stosunkowo wysokie zanieczyszczenie mikrobiologiczne MDOM jest spowodowane dużym rozdrobieniem surowca, zanikiem struktury tkankowej oraz napowietrzeniem podczas procesu separacji, co sprzyja wzrostowi drobnoustrojów (Pomykała i Michalski, 2008). Oznaczona w badaniach własnych w MDOM liczba *E. coli* była wyższa niż limit 50 jtk/g jako kryterium higieny procesu dla MDOM ustanowione w Rozporządzenie Komisji (WE) 1441/2007. Niemniej parametr ten został ustanowiony dla MDOM pozyskiwanego techniką niskociśnieniową. W badaniach innych autorów liczba *E. coli* w MDOM wahała się od 3,54 do 3,72 log jtk/g (On i wsp., 2011). Natomiast liczba *Enterobacteriaceae* w MDOM wynosiła od 3,3 do 5,6 log jtk/g (Bijker i wsp., 1987; Hać-Szymańczuk i wsp., 2014). Również w badaniach Hać-Szymańczuk i wsp. (2014) nie stwierdzono obecności *Salmonella* spp. w 25 g MDOM. Wyniki innych autorów wskazują

jednak, że występowanie *Salmonella* spp. oraz *Campylobacter* spp. w MDOM jest dość powszechne (Pomykała i Michalski, 2008; On i wsp., 2011).

W badaniach na peklowanych farszach z MDOM dodatek LAB i czas przechowywania były czynnikami, które wpłynęły istotnie ($P < 0,001$) na liczbę OLD, LAB, *E. coli* i *Enterobacteriaceae*. Stwierdzono interakcję między dodatkiem LAB a czasem przechowywania w przypadku wszystkich prób (Rys. 2 [Publikacja 3 – Tabela 5]). Istotny ($P < 0,05$) wzrost OLD w farszach MDOM zaobserwowano wraz z upływem czasu przechowywania. Na początku przechowywania OLD w wariantach z bakteriami kwasu mlekowego była wyższa ze względu na dodatek bakterii, ale po 7 dniach przechowywania OLD w wariantach z LAB (PL2 i PL3) była niższa w porównaniu z wariantami kontrolnymi C150 i C50. Może to świadczyć o hamującym działaniu LAB na inne bakterie obecne w farszach MDOM. Liczba mezofilnych bakterii kwasu mlekowego w całym okresie przechowywania była na podobnym poziomie we wszystkich próbach doświadczalnych z dodatkiem bakterii kwasu mlekowego (7,19-7,71 log jtk/g). Istotnie ($P < 0,05$) wyższą liczbę LAB w całym okresie przechowywania zaobserwowano w przypadku wariantów z dodatkiem LAB. Po 7 dniach przechowywania zaobserwowano istotnie ($P < 0,05$) najwyższą liczbę LAB w wariacie PL1.

Potwierdzono istotny ($P < 0,05$) hamujący wpływ *L. plantarum* SCH1 (PL1) na *E. coli* w farszach MDOM przez cały okres przechowywania. W badaniach modelowych Rzepkowskiej i wsp. (2017a) udowodniono hamujący wpływ *L. plantarum* SCH1 i *L. brevis* KL5 na *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* i *P. fluorescens*. Można przypuszczać, że bakterie kwasu mlekowego wytwarzały metabolity hamujące wzrost *E. coli*. Gong i wsp. (2010) opisali hamujący wpływ bakteriocyny (plantarycyny MG) wytwarzanej przez *L. plantarum* na wzrost *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *S. Typhimurium*. Antagonistyczny wpływ LAB na patogeny Gram-ujemne może być również spowodowany produkcją kwasów organicznych i nadtlenu wodoru (Laslo i wsp., 2019). W wariacie kontrolnym C50 liczba *E. coli* po 1 i 4 dniach przechowywania wynosiła odpowiednio 2,14 i 1,67 log jtk/g. Okazało się, że dawka NaNO_2 (50 mg/kg) nie była wystarczająca do zahamowania wzrostu tej bakterii. Działanie hamujące wzrost *E. coli* po 4 i 7 dniach przechowywania zaobserwowano w wariacie kontrolnym C150 z maksymalną zawartością NaNO_2 (150 mg/kg). W badaniach przeprowadzonych

w poprzednim etapie, w farszach z MDOM niepeklowanych, zaobserwowano również hamujący wpływ *L. plantarum* SCH1 na *E. coli*. Niemniej jednak, działanie hamujące nie było tak silne. Zaobserwowano tam stopniową redukcję liczby *E. coli* z 2,28 log jtk/g (po 1 dniu przechowywania) do 1,94 log jtk/g (7 dni przechowywania) [Publikacja 1]. Przedstawione wyniki wskazują na synergiczną zmniejszoną ilość azotanu (III) sodu (50 mg/kg) z *L. plantarum* SCH1 na *E. coli* w farszach z MDOM. Po 7 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych OLD we wszystkich wariantach doświadczalnych wahała się od 7,97 do 8,42 log jtk/g, a farsz MDOM był już zepsuty. Po tym czasie liczba *E. coli* we wszystkich wariantach wynosiła poniżej 1 log jtk/g. We wszystkich wariantach zaobserwowano wzrost liczby *Enterobacteriaceae*. Można przypuszczać, że przyczyną mniejszej liczby *E. coli* była dominacja środowiska mięsnego przez inne bakterie (w tym inne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*). Wzrost bakterii ściśle zależy od warunków środowiskowych i dostępności składników odżywczych, co jest niezbędne dla ich wzrostu (Teusink i Molenaar, 2017). Znaczący wzrost *Enterobacteriaceae* po 7 dniach przechowywania zaobserwowano również w niepeklowanych farszach z MDOM z dodatkiem LAB [Publikacja 1]. Hać-Szymańczuk i wsp. (2014) zaobserwowali wzrost liczby *Enterobacteriaceae* niezależnie od metody utrwalania MDOM.

7.1.5. Wybór jednego szczepu bakteryjnego do dalszych badań i określenie warunków jego zastosowania [P2, P3]

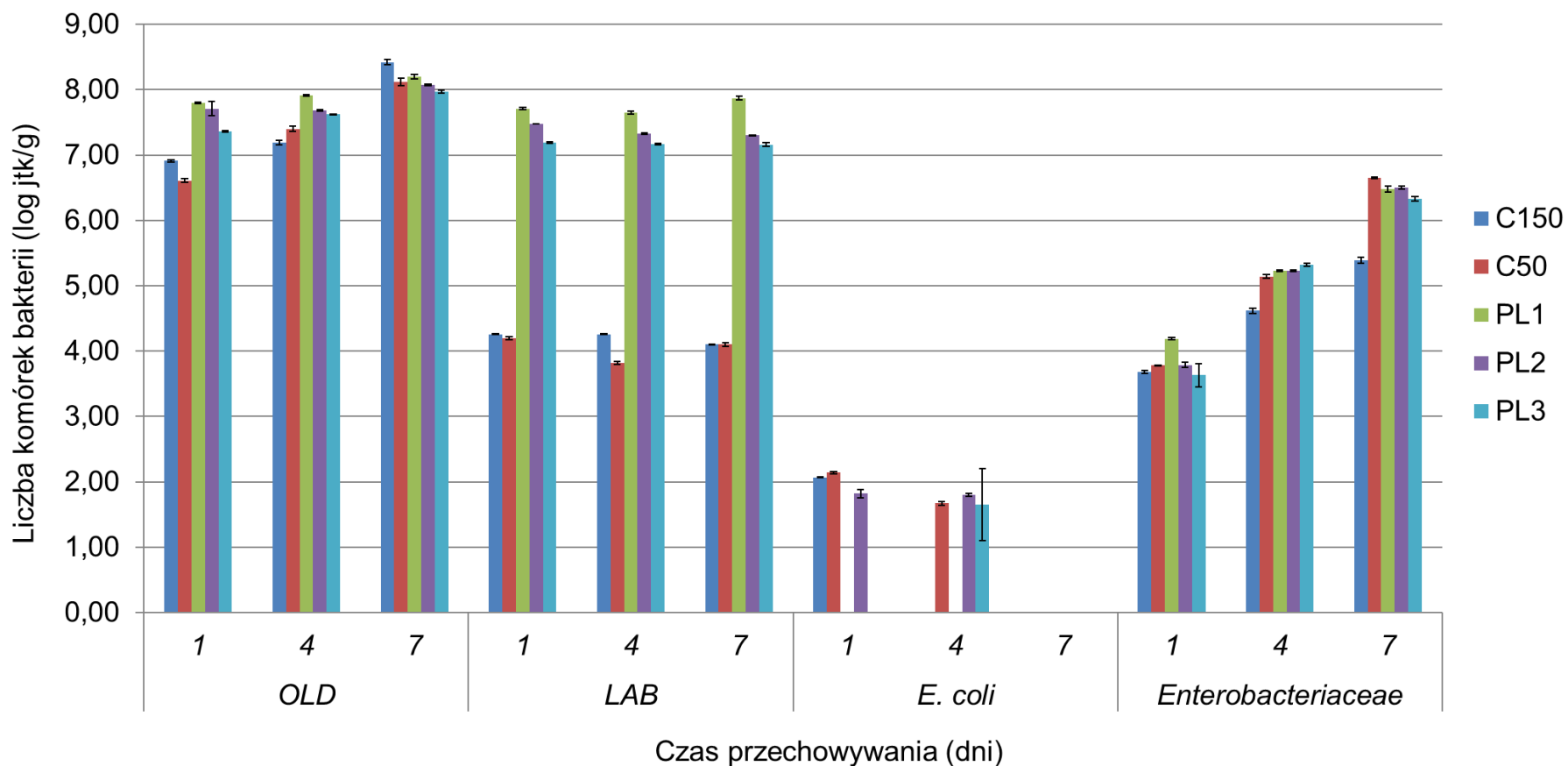
Spośród trzech szczepów zastosowanych w badaniach własnych [P2 i P3] został wybrany jeden, który zastosowano w kolejnym etapie pracy. Podstawowe kryteria wyboru szczepu do produkcji modelowego produktu mięsnego, poddanego obróbce cieplnej stanowiły parametr pH, który wpływa na zmiany wodochłonności mięsa, potencjał oksydoredukcyjny, który determinuje m.in. trwałość produktu oraz parametry barwy $L^*a^*b^*$, jako istotny czynnik, którym kierują się klienci przy wyborze gotowego produktu. Równie istotnym kryterium był wpływ dodanego szczepu LAB na jakość mikrobiologiczną farszu z MDOM. Celem założonym w badaniach własnych była poprawa jakości mikrobiologicznej mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie.

Wartości pH i ORP we wszystkich farszach z dodatkiem LAB były zbliżone do wartości pH i ORP w farszach kontrolnych. Wartość pH była typowa dla tego rodzaju surowca mięsnego. W przypadku farszu peklowanego z dodatkiem *Lactiplantibacillus*

plantarum SCH1 zaobserwowano, że dynamika zmian potencjału oksydacyjno-redukcyjnego była najniższa i nieistotna statystycznie wśród wariantów z dodatkiem LAB. W przypadku farszów niepeklowanych wariant L1 z dodatkiem *L. plantarum* SCH1 wyróżniał się najwyższą wartością parametru barwy L* opisującego jasność próbki. Z kolei w przypadku szczepu *L. brevis* KL5, zaobserwowano jego udział w procesach barwotwórczych, wariant z dodatkiem tego szczepu charakteryzował się istotnie wyższym udziałem barwy czerwonej (a*) po 7 dniach przechowywania.

W farszach peklowanych obserwowano wpływ dodatku LAB na barwę farszów we wszystkich wariantach. Podobnie jak w farszach niepeklowanych, wariant z dodatkiem *L. brevis* KL5 wyróżniał się wysokim udziałem barwy czerwonej. W czasie przechowywania zaobserwowano stopniowe hamowanie wzrostu *E. coli* przez szczep *L. plantarum* SCH1 w farszach niepeklowanych. Zaobserwowano także hamujące działanie *L. plantarum* SCH1 na wzrost *Enterobacteriaceae* po 4 dniach przechowywania. W farszach peklowanych potwierdzono hamujący wpływ *L. plantarum* SCH1 względem *E. coli*. W związku z najbardziej efektywnym działaniem bakteriostatycznym, jak również brakiem negatywnego wpływu na cechy fizykochemiczne farszów z MDOM, szczep *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 został wybrany do następnego etapu badań, czyli produkcji modelowego produktu mięsnego poddanego obróbce cieplnej.

Do badań zastosowano matrycę taką jak w przypadku produkcji farszów z MDOM peklowanych z zastosowaniem 50 mg/kg azotanu (III) sodu. Produkty gotowe przechowywano przez 21 dni, a badania przeprowadzono po produkcji (1 dzień) oraz po 1 i 3 tygodniach przechowywania w temperaturze 4°C.



Rysunek 2. Jakość mikrobiologiczna peklowanych farszów z MDOM w czasie przechowywania w warunkach chłodniczych (średnie±błąd standardowy).

C150 - kontrola z azotanem (III) sodu w dawce 150 mg/kg, C50 - kontrola z azotanem (III) sodu w dawce 50 mg/kg, PL1 - zastosowano *L. plantarum* SCH1 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg, PL2 - zastosowano *L. brevis* KL5 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg; PL3 - zastosowano *L. plantarum* S21 w liczbie 10^7 jtk/g z azotanem (III) sodu 50 mg/kg

Źródło: opracowanie własne

7.2. Badania jakości i trwałości produktów wytworzonych z dodatkiem MDOM poddanego bioutrwalaniu bakteriami kwasu mlekowego [P4]

7.2.1. Określenie wpływu wybranego szczepu bakterii kwasu mlekowego na wybrane cechy fizykochemiczne oraz jakość sensoryczną modelowych produktów mięsnych poddanych obróbce cieplnej [P4]

W wariancie kontrolnym C zaobserwowano wzrost pH podczas całego okresu przechowywania ($P < 0,05$). W wariancie L wzrost pH był obserwowany, ale tylko po 3 tygodniach przechowywania ($P < 0,05$). Niewielki wzrost wartości pH w czasie 3 tygodni chłodniczego przechowywania mógł wynikać z hydrolitycznych przemian białkowych, jakim podlega produkt poddany obróbce cieplnej i aktywności enzymów drobnoustrojów (Kumar i Tanwar, 2011). W całym okresie przechowywania nie odnotowano różnic w wartości pH pomiędzy wariantami ($P > 0,05$) (Tabela 6 [Publikacja 4 – Tabela 2]). Brak różnic w kwasowości prób po produkcji wskazuje na zbliżoną dynamikę zmian pH w MDOM surowym w czasie 4-dniowego chłodniczego przechowywania (4°C). W badaniach własnych w poprzednim etapie również stwierdzono tę zależność [Publikacja 1]. Stosunkowo niska zawartość cukrów w MDOM mogła mieć wpływ na ograniczoną produkcję wybranych metabolitów, w tym kwasu mlekowego, przez zastosowane LAB (Ha i wsp., 2003). W badaniach Vermeiren i wsp. (2004) również nie stwierdzono różnic w kwasowości pomiędzy peklowaną szynką poddaną obróbce cieplnej zaszczepioną *L. plantarum* (po gotowaniu), a próbą bez dodatku bakterii po 13 dniach chłodniczego przechowywania. Korelacja między ilością cukrów w podłożu a stopniem zakwaszenia produktu była również stwierdzona.

W obydwu wariantach kiełbas obserwowano wzrost potencjału redox w okresie przechowywania ($P < 0,05$) (Tabela 6 [Publikacja 4 – Tabela 2]). W całym okresie przechowywania istotnie wyższą ($P < 0,05$) wartością redox charakteryzował się wariant kontrolny C, co oznacza, że zastosowanie dodatku *L. plantarum* SCH1 mogło hamować procesy utleniania w gotowym produkcie. Duże rozdrobnienie surowca, zanik struktury tkankowej oraz napowietrzanie podczas procesu separacji powoduje, że MDOM jest bardziej podatny na utlenianie (Daros i wsp., 2005). LAB należą do organizmów względnie beztlenowych, jednak mogą one w niesprzyjających warunkach wykorzystywać tlen jako końcowy akceptor elektronów. Niemniej jednak, tlen może szkodliwie oddziaływać na

komórki bakterii kwasu mlekowego. Podczas redukcji tlenu w łańcuchu oddechowym powstają szkodliwe dla komórki rodniki hydroksylowe, nadtlenek wodoru oraz rodniki ponadtlenkowe. Reaktywne formy tlenu (ROS) atakują białka, lipidy i kwasy nukleinowe bezpośrednio przyczyniając się do śmierci komórki (Bolotin i wsp., 1999; Bolotin i wsp., 2001). Niektóre z LAB odpowiadają na stres tlenowy zwiększeniem syntezy enzymów przeciwutleniających (Sanders i wsp., 1995). W przypadku *L. plantarum* jest to pseudokatalaza zawierająca mangan (Igarashi i wsp., 1996). Drugim enzymem katalizującym rozkład nadtlenu wodoru jest peroksydaza glutationowa (Kulikowska-Karpińska i Moniuszko-Jakoniuk, 2004). Aktywność enzymów przeciwutleniających *L. plantarum* SCH1 w surowym farszu z MSPM, podczas chłodniczego przechowywania, przed gotowaniem mogła mieć wpływ na wartość potencjału redox w produkcie po obróbce cieplnej.

Najwyższe wartości potencjału redox w wariantach C i L zaobserwowano po 1 tygodniu przechowywania. Po 3 tygodniach przechowywania wartość potencjału redox w wariacie C była zbliżona (331,7 mV), natomiast w wariacie z dodatkiem *L. plantarum* SCH1 wartość potencjału redox istotnie obniżyła się z 322,4 mV do 311,6 mV ($P < 0,05$). Zaobserwowane obniżenie ORP w wariacie L może wskazywać na aktywność przeciwutleniającą *L. plantarum* SCH1 (Sanders i wsp., 1995).

Ogólna zawartość barwników hemowych nie różniła się istotnie pomiędzy wariantami kielbas z MDOM podczas przechowywania ($P < 0,05$) (Publikacja 4 – Tabela 3). Po produkcji ogólna zawartość barwników kształtowała się na poziomie 113,56 ppm w wariacie C oraz 116,51 ppm w wariacie L, a po 3 tygodniach przechowywania wynosiła odpowiednio 114,01 ppm oraz 112,20 ppm. W wariacie z dodatkiem *L. plantarum* SCH1 zawartość barwników hemowych istotnie obniżyła się po 3 tygodniach chłodniczego przechowywania względem ich poziomu po produkcji ($P < 0,05$). Biorąc pod uwagę fakt, że po 3 tygodniach chłodniczego przechowywania bakterie kwasu mlekowego były obecne w kielbasach, można przypuszczać, że wykorzystały do wzrostu hem ze środowiska mięsnego. Abriouel i wsp. (2004) stwierdzili, że *L. plantarum* CNRZ 1228 wykazywał aktywność hemo-zależnej katalazy w hodowli na pożywce MRS z dodatkiem 30 mM hematyny, podczas gdy na samym podłożu MRS nie wykazywał aktywności tego

enzymu. Hem dostarczony ze środowiska wpływa na szybszy wzrost *L. plantarum* i pozwala na dłuższe przeżycie bakterii (Lechardeur i wsp., 2011).

Tabela 6. Zmiany pH, ORP, zawartości azotanów (III) i (V), barwników, koncentracji nitrozylomioglobiny oraz parametrów barwy w kielbasach z MDOM podczas chłodniczego przechowywania [Publikacja 4]

Parametr	Próba	Czas przechowywania (tygodnie)		
		0	1	3
pH	C	6,72±0,01 ^{aA}	6,76±0,02 ^{aB}	6,80±0,01 ^{aC}
	L	6,74±0,02 ^{aAB}	6,72±0,02 ^{aA}	6,78±0,02 ^{aB}
ORP [mV]	C	284,3±3,0 ^{bA}	332,2±4,0 ^{bB}	331,7±2,5 ^{bB}
	L	271,5±2,9 ^{aA}	322,4±2,3 ^{aC}	311,6±2,8 ^{aB}
Azotan (III) sodu [mg/kg]	C	16,5±0,2 ^{aC}	15,4±0,1 ^{aB}	14,4±0,1 ^{aA}
	L	16,8±0,2 ^{aC}	15,7±0,1 ^{aB}	14,4±0,3 ^{aA}
Azotan (V) sodu [mg/kg]	C	62,2±4,9 ^{aB}	49,1±0,8 ^{aA}	65,4±2,4 ^{aB}
	L	66,4±3,0 ^{aB}	49,3±1,1 ^{aA}	67,1±0,6 ^{aB}
ogólna zawartość barwników [ppm]	C	113,56±0,68 ^{aB}	110,84±1,18 ^{aA}	114,01±0,39 ^{aB}
	L	116,51±1,96 ^{aB}	109,48±0,68 ^{aA}	112,20±1,80 ^{aA}
zawartość NOMb [g/100 g]	C	75,93 ^{bB}	78,84 ^{aB}	58,93 ^{aA}
	L	70,86 ^{aA}	76,29 ^{aA}	64,96 ^{bA}
L*	C	58,43±0,75 ^{aB}	57,74±0,63 ^{aA}	58,30±0,31 ^{aAB}
	L	58,82±0,48 ^{aB}	58,15±0,35 ^{aA}	58,41±0,39 ^{aAB}
a*	C	17,33±0,52 ^{aA}	16,93±0,38 ^{aA}	17,15±0,36 ^{aA}
	L	17,22±0,83 ^{aA}	17,09±0,29 ^{aA}	17,12±0,33 ^{aA}
b*	C	5,26±0,22 ^{aA}	5,49±0,22 ^{aB}	5,43±0,18 ^{aAB}
	L	5,36±0,25 ^{aA}	5,39±0,15 ^{aA}	5,48±0,09 ^{aA}
a*/b*	C	3,30±0,17 ^{aB}	3,09±0,13 ^{aA}	3,16±0,11 ^{aA}
	L	3,22±0,23 ^{aA}	3,17±0,09 ^{aA}	3,13±0,08 ^{aA}

C – wariant kontrolny wytworzony z MDOM, bez dodatku szczepu bakterii, L – wariant wytworzony z MDOM z dodatkiem *L. plantarum* SCH1 (10^7 jtk/g). Różne małe litery (a-b) w tej samej kolumnie wskazują na istotne różnice pomiędzy wariantami ($P < 0,05$). Różne duże litery (A-C) w tym samym wierszu wskazują na istotne różnice podczas przechowywania ($P < 0,05$).

Źródło: [Publikacja 4] Łaszkiwicz i wsp. (2021b)

Po produkcji wariant C charakteryzował się istotnie wyższą koncentracją nitrozylomioglobiny (NOMb) ($P < 0,05$). Niższa zawartość NOMb w wariacie L po produkcji mogła być związana z niekorzystnym działaniem H_2O_2 wytwarzanym przez LAB

na nitrozyłowe barwniki hemowe w farszu z MDOM (Abriouel i wsp., 2004). Po 3 tygodniach przechowywania tendencja była odwrotna, istotnie wyższy stopień koncentracji NOMb stwierdzono w wariancie L, gdzie zastosowano *L. plantarum* SCH1 ($P < 0,05$) (Publikacja 4 – Tabela 3). Istotnie niższy potencjał redox w próbie L, a co za tym idzie większa redukcyjność środowiska, prawdopodobnie miała wpływ na wyższą ilość nitrozylobarwników w wariancie L po przechowywaniu w porównaniu z wariantem kontrolnym (C) (Honikel, 2008). W obydwu wariantach doświadczalnych koncentracja nitrozylobarwników po 3 tygodniach przechowywania była niższa niż ta oznaczona bezpośrednio po produkcji. Redukcja ilości nitrozylobarwników w produktach mięsnych podczas przechowywania jest zjawiskiem znanym i związana jest z utlenianiem nitrozomiochromogenu (Benjamin i Collins, 2003).

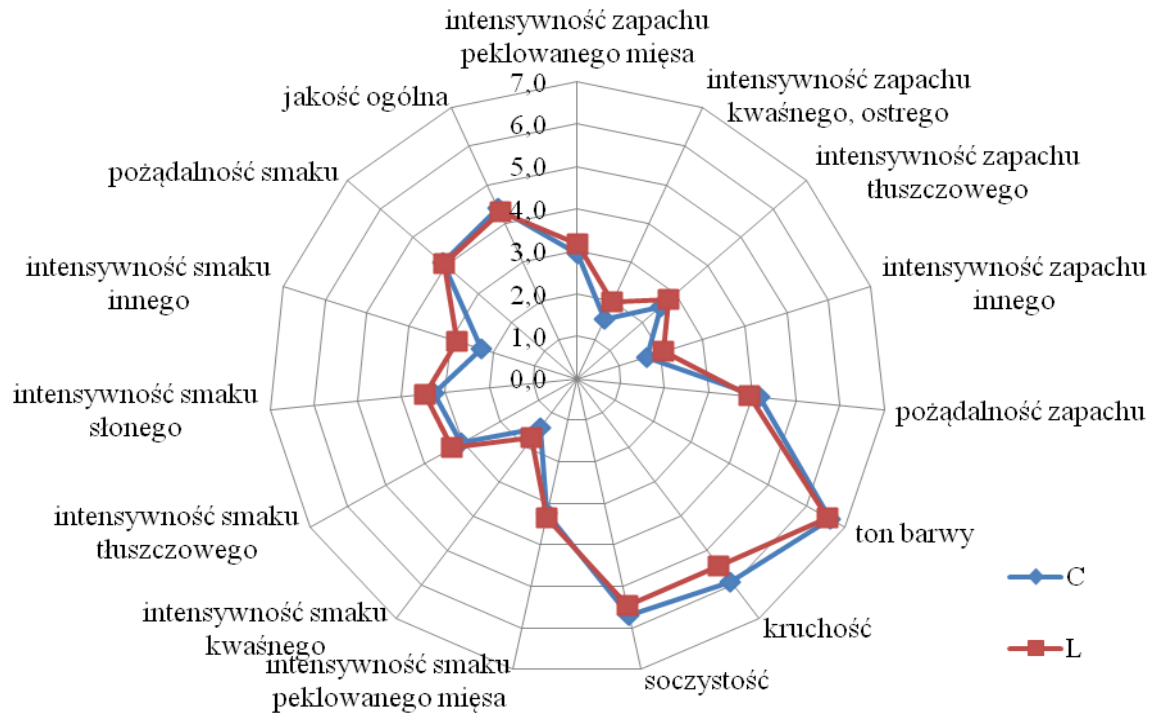
Dynamika przemian azotanów (V) i (III) w produktach mięsnych podczas przechowywania zależy od wielu czynników, w tym od kwasowości środowiska, potencjału redox, ilości substancji redukujących (Sindelar i Milkowski, 2011). W obydwu wariantach doświadczalnych obserwowano istotną statystycznie redukcję poziomu azotanów (III) podczas przechowywania ($P < 0,05$). Nie wykazano różnic w ilości NO_2^- pomiędzy wariantami w trakcie chłodniczego przechowywania ($P > 0,05$) (Tabela 6 [Publikacja 4 – Tabela 3]). W badaniach Terns i wsp. (2011) również zaobserwowano obniżenie poziomu azotanów (III) w peklowanych kiełbasach wieprzowych w trakcie 84 dni chłodniczego przechowywania. Podobne wyniki przedstawili Shin i wsp. (2017) w przypadku peklowanych pasztecików wieprzowych, przechowywanych w warunkach chłodniczych przez 28 dni. Redukcja azotanów (III) w farszach i produktach mięsnych jest związana z reakcją tych związków ze składnikami tkanki mięśniowej i tłuszczowej oraz substancjami dodatkowymi wprowadzanymi do farszów mięsnych (Barbieri i wsp., 2013).

Ilość azotanów (V) w kiełbasach po produkcji była zbliżona i wynosiła 62,2 mg/kg w wariancie C oraz 66,4 mg/kg w wariancie L. Zawartość azotanów (V) obniżyła się po 1 tygodniu przechowywania do ok. 49 mg/kg w obydwu wariantach doświadczalnych. Następnie zaobserwowano istotny wzrost ilości azotanów (V) do 65,4 mg/kg oraz 67,1 mg/kg odpowiednio w wariancie C i L po 3 tygodniach przechowywania ($P < 0,05$). Redukcja azotanów (V) w badanych produktach mięsnych mogła odbywać się przy udziale enzymów bakteryjnych. Natomiast obserwowany wzrost zawartości azotanów (V)

w produktach po przechowywaniu prawdopodobnie związany był z przemianami reszkowych azotanów (III) podczas chłodniczego przechowywania (Honikel, 2008). Zastosowanie bakterii kwasu mlekowego nie wpłynęło istotnie na zawartość azotanów (III) i azotanów (V) w wariancie L ($P > 0,05$).

Wartości parametrów barwy a^* i b^* produktów modelowych po produkcji i przechowywaniu były zbliżone i nie różniły się istotnie ($P > 0,05$). Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w jasności (L^*) w obydwu wariantach po przechowywaniu ($P < 0,05$). Najniższe wartości parametru L^* obserwowano po 1 tygodniu przechowywania i wynosiły one 57,74 w wariancie C oraz 58,15 w wariancie L. Podobne wyniki uzyskali Slima i wsp. (2017), którzy obserwowali obniżanie jasności w czasie 10 dni przechowywania peklowanych (50 mg/kg) surowych kiełbas wołowych bez istotnych różnic pomiędzy próbą kontrolną (bez dodatku bakterii) a próbą z dodatkiem *L. plantarum*. Najwyższy udział barwy czerwonej (a^*) odnotowano w wariancie C i L bezpośrednio po produkcji i wynosił 17,33 i 17,22 (Tabela 6 [Publikacja 4 – Tabela 4]). Wartość parametru b^* była zbliżona w obydwu wariantach doświadczalnych w całym okresie przechowywania i kształtowała się na poziomie od 5,26 do 5,49. Istotne obniżenie wartości wskaźnika a^*/b^* obserwowano w wariancie C po przechowywaniu, co wskazuje na obniżenie udziału barwy czerwonej w produktach (Slima i wsp., 2017). Zmniejszenie udziału barwy czerwonej w wariancie C może być związane z istotnym wzrostem potencjału redox i obniżeniu koncentracji NOMb w tej próbie po przechowywaniu (Heaton i wsp., 2000; Honikel, 2008) (Tabela 6 [Publikacja 4 – Tabela 3]).

Jakość sensoryczna kiełbas z MDOM po procesie produkcji kształtowała się na zbliżonym poziomie i nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy wariantami ($P > 0,05$). Zastosowanie bakterii kwasu mlekowego nie miało istotnego wpływu na pożądalność smaku i zapachu produktu, nie wpłynęło też na pozostałe cechy sensoryczne kiełbas ocenione bezpośrednio po produkcji ($P > 0,05$) (Rys. 3 [Publikacja 4 – Rys. 1]).



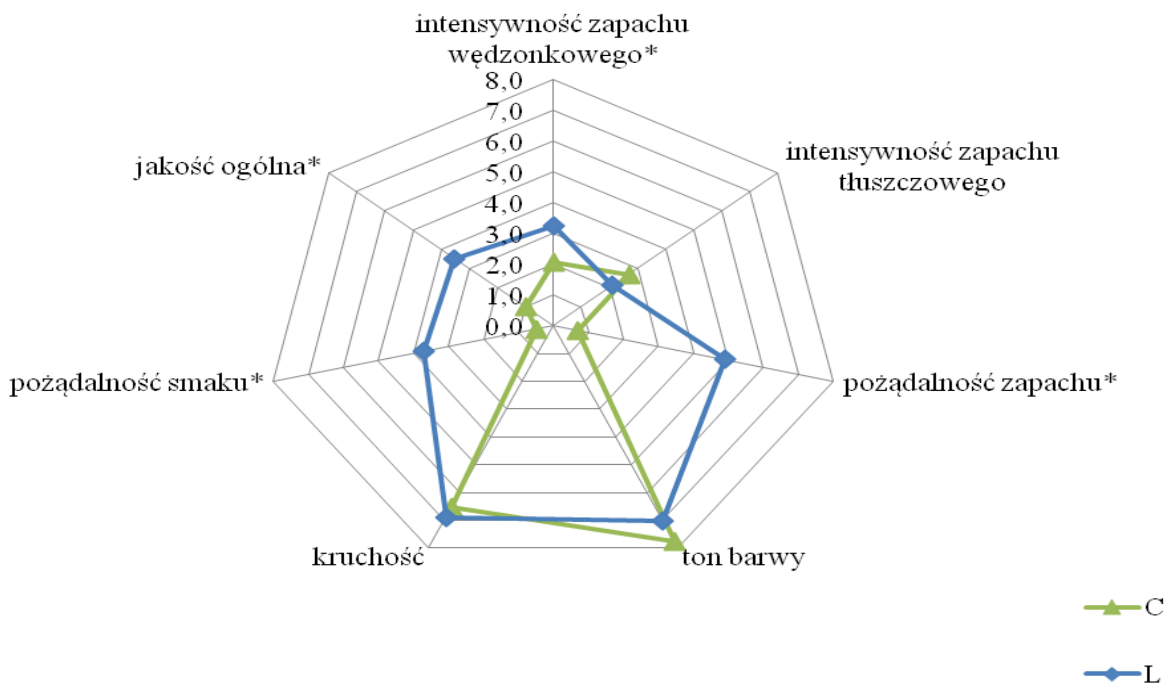
Rysunek 3. Jakość sensoryczna kielbas z MDOM po produkcji

C – kontrolna kielbasa z MDOM

L - kielbasa z MDOM z dodatkiem *L. plantarum* SCH1 w ilości 10^7 log jtk/g

Źródło: [Publikacja 4] Łaszkiwicz i wsp. (2021b)

Interesujące wyniki badań uzyskano w ocenie sensorycznej kielbas po 3 tygodniach przechowywania. W próbie kontrolnej ocena sensoryczna wykazała cechy świadczące o nieświeżości produktu. Z tego względu po 3 tygodniach chłodniczego przechowywania zostały ocenione tylko wybrane wyróżniki jakości kielbas modelowych (Rys. 4 [Publikacja 4 – Rys. 2]). W przypadku kielbasy z dodatkiem szczepu *L. plantarum* SCH1 nie stwierdzono cech dyskwalifikujących sensorycznie produkt. Smak i zapach kielbasy L charakteryzował się wysoką pożądalnością (Rys. 4 [Publikacja 4 – Rys. 2]).



Rysunek 4. Jakość sensoryczna kielbas z MDOM po 3 tygodniach chłodniczego przechowywania

C – kontrolna kielbasa z MDOM

L - kielbasa z MDOM z dodatkiem *L. plantarum* SCH1 w ilości 10^7 log jtk/g

*średnie wartości parametru różniące się istotnie ($P < 0,05$)

Źródło: [Publikacja 4] Łaszkiwicz i wsp. (2021b)

W badaniach Vermeiren i wsp. (2004) ocenione szynki peklowane z dodatkiem *L. plantarum* (rozprowadzonego na powierzchni produktu) zostały odrzucone przez panel sensoryczny po 13 dniach przechowywania ze względu na nieakceptowalny smak. Dodatek LAB, podobnie jak w badanych kielbasach modelowych z MDOM, nie wpłynął na barwę oraz ogólny wygląd tego produktu. Pérez-Chabela i wsp. (2008) stwierdzili wyższe noty w ocenie sensorycznej kielbasy z dodatkiem *L. plantarum* w porównaniu z wariantem kontrolnym ($P < 0,05$). Natomiast Victoria-León i wsp. (2006) zaobserwowali poprawę smaku i ogólnej jakości sensorycznej kielbas po obróbce cieplnej z dodatkiem *L. lactis* i *L. piscicola* (zaszczepionych przed plastrowaniem) po 2 dniach chłodniczego przechowywania, natomiast po 12 dniach kielbasy z dodatkiem LAB uzyskały niższe noty w porównaniu z próbą kontrolną.

7.2.2. Ocena wpływu wybranego szczepu bakterii kwasu mlekowego na trwałość mikrobiologiczną modelowych produktów mięsnych poddanych obróbce cieplnej [P4]

Ogólna liczba drobnoustrojów (OLD) po produkcji w wariancie C wynosiła 2,16 log jtk/g i była istotnie niższa niż w wariancie L (2,51 log jtk/g) ($P < 0,05$). Po 1 tygodniu przechowywania OLD była na podobnym poziomie i wynosiła 2,19 log jtk/g w wariancie C oraz 2,54 log jtk/g w wariancie L (Publikacja 4 – Tabela 5). W badaniach Zeleňáková i wsp. (2011) stwierdzono OLD w kiełbasach wieprzowych parzonych na poziomie ok. 4 log jtk/g. Podobne wartości OLD po produkcji (4,05 log jtk/g) oraz po 3 tygodniach (4,64 log jtk/g) zaobserwowano w badaniach Eskandari i wsp. (2013) w kiełbasach typu frankfurterki z dodatkiem azotanu (III) sodu na poziomie 40 ppm.

W kiełbasach po produkcji nie stwierdzono obecności bakterii *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. Liczba *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, gronkowców koagulazododatnich i LAB po produkcji wynosiła < 1 log jtk/g, co oznacza, że dawka ciepła zastosowana w obróbce termicznej produktu skutecznie zredukowała ich liczbę. Po 1 tygodniu przechowywania chłodniczego jakość mikrobiologiczna kiełbas nie zmieniła się.

Po 3 tygodniach przechowywania jakość mikrobiologiczna kiełbas uległa zmianie. W obydwu wariantach istotnie wzrosła ogólna liczba drobnoustrojów oraz zaobserwowano wzrost mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Liczba OLD w wariancie kontrolnym C (8,24 log jtk/g) była istotnie wyższa niż w wariancie L (7,31 log jtk/g), co może oznaczać, że zastosowany szczep hamował rozwój niepożądaną mikroflory. Odwrotną zależność obserwowano w przypadku liczby bakterii fermentacji mlekowej. W wariancie kontrolnym C stwierdzono istotnie niższy poziom LAB (5,23 log jtk/g) niż w wariancie L (5,92 log jtk/g) ($P < 0,05$). Wysoki poziom OLD w obu próbach mógł wynikać ze wzrostu LAB również w hodowli przy oznaczaniu OLD, co potwierdzają badania innych autorów (Pastias i wsp., 2006; Comi i wsp., 2016). Bakterie kwasu mlekowego to fakultatywne beztlenowce i mogą występować w wędlinach pakowanych próżniowo powodując ich psucie podczas długotrwałego przechowywania, może to wynikać z ich zdolności do dominacji w ogólnej żywej mikroflorze oraz odporności na ciepło (Feng i wsp., 1984).

7.2.3. Identyfikacja szczepów bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z produktów modelowych przy użyciu metod fenotypowych na poziomie gatunku oraz porównanie z próbką wzorcową [P4]

Można przypuszczać, że wzrost dodanych LAB obecnych w modelowych produktach z MDOM w początkowym okresie przechowywania był utrudniony, ze względu uszkodzenia komórek bakterii spowodowane działaniem ciepła podczas obróbki cieplnej. W standardowej technice hodowli oznaczane są jedynie komórki replikujące. Roszak i wsp. (1984) wykazali, że komórki mogą przechodzić w stan uśpienia, gdy warunki środowiskowe nie są dla nich sprzyjające (niedobór składników odżywczych, wahania temperatury, pH). Komórki VBNC (*viable but nonculturable*) nie wykazują zdolności do wzrostu i tworzenia kolonii na podłożach hodowlanych. Stan uśpienia jest stanem przejściowym, a komórka bakterii może przywrócić zdolność replikacji poprzez mechanizmy naprawcze (Fakruddin i wsp., 2013; Li i wsp., 2014; Zielińska i wsp., 2018), co najprawdopodobniej obserwowano w kielbasach po 3 tygodniach przechowywania. Hipotezę tę można potwierdzić cytometrią przepływową, ale w niniejszym badaniu przeprowadzono izolację i identyfikację na podstawie wstępnych badań fenotypowych i biochemicznych (Tabela 7; Tabela 8 [Publikacja 4 – Tabela 6]). Stwierdzono, że wyizolowane z prób kielbas bakterie to w większości pałeczki, Gram-dodatnie, katalazoujemne. W przypadku próby badawczej C - 4 spośród 10 izolatów wykluczono z dalszych badań, natomiast w przypadku próby badawczej L, wykluczono 1 izolat, ze względu na nietypowy dla *Lactobacillus* kształt komórek.

Izolaty bakterii zostały wstępnie przypisane do rodzaju *Lactobacillus* na podstawie wyglądu pod mikroskopem, barwienia metodą Grama i testu na katalazę, a następnie rodzaj gatunku został zidentyfikowany za pomocą zestawu 49 testów biochemicznych. Wykazano, że w przypadku próby kontrolnej (C) tylko jeden izolat wykazał zgodność z profilem aktywności biochemicznej szczepu SCH1, natomiast w przypadku próby L, 6 izolatów wykazało zgodność z gatunkiem *plantarum* (Tabela 8 [Publikacja 4 – Tabela 6]).

Tabela 7. Wyniki oceny fenotypowej izolatów

Próba	Izolat	Wygląd pod mikroskopem	Barwienie Grama	Test na obecność katalazy
C	1	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	2	ziarniaki	Gram-dodatnie	nb
	3	ziarniaki	Gram-dodatnie	nb
	4	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	5	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	6	ziarniaki	Gram-dodatnie	nb
	7	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	8	ziarniaki	Gram-dodatnie	nb
	9	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	10	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
L	1	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	2	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	3	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	4	ziarniaki	Gram-dodatnie	nb
	5	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	6	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	7	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	8	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	9	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne
	10	pałeczki	Gram-dodatnie	katalazo-ujemne

nb – nie badano

Źródło: opracowanie własne

Tabela 8. Wyniki oceny biochemicznej izolatów

Próba	Izolat	Rodzaj bakterii	Liczba zgodnych testów aktywności biochemicznych izolatu ze szczepem SCH1	Gatunek bakterii
C	1	<i>Lactobacillus</i>	40/49	<i>paracasei</i>
	2	nb	nb	nb
	3	nb	nb	nb
	4	<i>Lactobacillus</i>	41/49	<i>pentosus</i>
	5	<i>Lactobacillus</i>	48/49	<i>plantarum</i>
	6	nb	nb	nb
	7	<i>Lactobacillus</i>	45/49	<i>brevis</i>
	8	nb	nb	nb
	9	<i>Lactobacillus</i>	45/49	<i>brevis</i>
	10	<i>Lactobacillus</i>	41/49	<i>pentosus</i>
L	1	<i>Lactobacillus</i>	45/49	<i>plantarum</i>
	2	<i>Lactobacillus</i>	42/49	<i>rhamnosus</i>
	3	<i>Lactobacillus</i>	49/49	<i>plantarum</i>
	4	nb	nb	nb
	5	<i>Lactobacillus</i>	29/49	<i>buchneri</i>
	6	<i>Lactobacillus</i>	48/49	<i>plantarum</i>
	7	<i>Lactobacillus</i>	49/49	<i>plantarum</i>
	8	<i>Lactobacillus</i>	49/49	<i>plantarum</i>
	9	<i>Lactobacillus</i>	48/49	<i>plantarum</i>
	10	<i>Lactobacillus</i>	42/49	<i>rhamnosus</i>

nb – nie badano

Źródło: [Publikacja 4] Łaszkiwicz i wsp. (2021b)

Obecność bakterii z gatunku *L. plantarum* w próbce kiełbasy L sugeruje, że bakterie te mogły pozostać żywe, ale nie hodowalne (VBNC) po procesie technologicznym i po 3 tygodniach chłodniczego przechowywania zregenerowały się i przeszły w stan hodowalny. Nieznaczne różnice w profilach biochemicznych izolatów mogą świadczyć o tym, że bakterie w czasie lag fazy, przystosowując się do zewnętrznych warunków środowiska, uruchamiają lub wyciszają geny odpowiedzialne za określone właściwości (Li i wsp., 2014; Zielińska i wsp., 2018). Nie ulega jednak wątpliwości, że należy wykonać bardziej precyzyjne badania celem potwierdzenia wyników. W tym badaniu celem było wstępne potwierdzenie obecności bakterii *Lactobacillus* w próbkach i wykluczenie obecności innych, np. bakterii przetrwalnikujących, które mogłyby rosnąć na agarze MRS. Obecne

wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że gatunek bakterii *L. plantarum* został potwierdzony w wariacie L. Ponadto wcześniejsze badania wykazały również, że środowisko mięsne jest odpowiednie dla rozwoju bakterii *L. plantarum* SCH1 (Publikacja 3; Rzepkowska i wsp., 2017b), co jest zgodne z obecnymi wynikami badań.

8. STWIERDZENIA I WNIOSKI

8.1. Stwierdzenia

1. Zastosowanie szczepów *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 i S21 nie miało znaczącego wpływu na cechy technologiczne (pH, ORP, barwa) mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie.
2. Zaobserwowano pozytywny wpływ *Levilactobacillus brevis* KL5 na kształtowanie barwy surowych farszów z MDOM peklowanego i niepeklowanego.
3. Wykazano hamujący wpływ *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 na bakterie *E. coli* w surowych farszach z MDOM peklowanego i niepeklowanego.
4. Wykazano hamujący wpływ *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 na bakterie *Enterobacteriaceae* w surowych farszach z MDOM niepeklowanego.
5. Zastosowanie szczepu *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 miało istotny wpływ na obniżenie ogólnej liczby drobnoustrojów oraz zachowanie dobrej jakości sensorycznej kielbas z MDOM wytworzonych z jego udziałem, przechowywanych przez 3 tygodnie w warunkach chłodniczych.

8.2. Wnioski

1. Potwierdzono hipotezę pierwszą, że zastosowanie szczepów bakterii kwasu mlekowego, wyizolowanych z produktów pochodzenia zwierzęcego, wpływa hamująco na wzrost drobnoustrojów w mięsie drobiowym odkostnionym mechanicznie.
2. Potwierdzono hipotezę drugą, że mięso drobiowe odkostnione mechanicznie, poddane bioutrwalaniu bakteriami kwasu mlekowego, jest przydatnym surowcem w technologii produkcji wyrobów z mięsa drobiowego.
3. Wyniki badań wskazują na możliwość uznania wybranych szczepów bakterii kwasu mlekowego za biokonserwanty, wpływające na wydłużenie trwałości przetworów drobiowych z udziałem MDOM, co potwierdziło hipotezę trzecią.
4. Zastosowanie *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 wpłynęło na przedłużenie okresu przydatności do spożycia kielbas parzonych, wytworzonych z dodatkiem MDOM, peklowanym obniżoną w stosunku do dopuszczalnej, ilością azotanu (III) sodu, przy zachowaniu dobrej jakości sensorycznej i mikrobiologicznej.

9. SPIS LITERATURY

1. Abdullah B., Al-Najdawi R.: Functional and sensory properties of chicken meat from spent-hen carcasses deboned manually or mechanically in Jordan. *International Journal of Food Science and Technology* 2005, 40, 537–543.
2. Abriouel H., Herrmann A., Stärke J., Yousif N.M., Wijaya A., Tauscher B., Holzapfel W., Franz C.M.A.P.: Cloning and heterologous expression of hematin-dependent catalase produced by *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1228. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 70, 603–606.
3. Alahakoon A.U., Jayasena D.D., Ramachandra S., Jo, C.: Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science and Technology* 2015, 45, 37–49.
4. Balciunas E.M., Martinez F.A.C., Todorov S.D, Gombossy de Melo Franco B.D., Converti A., Pinheiro de Souza Oliveira R.: Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 2013, 32:134-142. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.11.025
5. Barbieri G., Bergamaschi M., Barbieri G., Franceschini M.: Kinetics of nitrite evaluated in a meat product. *Meat Science* 2013, 93, 282–286.
6. Barbut S., Kakuda Y., Chan, D.: Effects of carbon-dioxide, freezing and vacuum packaging on the oxidative stability of mechanically deboned poultry meat. *Journal of Poultry Science* 1990, 69, 1813–1815.
7. Bełkot Z., Ziomek M., Gondek M.: Wartość odżywcza odzyskanego mechanicznie mięsa kurcząt i gęsi. *Medycyna Weterynaryjna* 2013, 69, 499-504.
8. Benjamin N., Collins J.: Nitrite. In: *Food Preservatives*, 2nd ed.; Russell, N.J., Gould, G.W., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY, USA, 2003; Volume 6, pp. 102–118.
9. Bijker P.G.H, Logtestijn J.G., Mossel D.A.A.: Bacteriological quality assurance (BQA) of mechanically deboned meat (MDM). *Meat Science* 1987, 20, 237-252. DOI:10.1016/0309-1740(87)90080-5
10. Bolotin A., Mauger S., Malarne K., Ehrlich S.D., Sorokin A.: Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* 1999, 76, 27–76.

11. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weissen-Bach J., Ehrlich S.D., Sorokin A.: The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* 2001, 11, 1–23.
12. Bończak A., Florowski T., Florowska A., Słowiński M.: Mięso oddzielone mechanicznie jako składnik przetworów mięsnych – opinie konsumentów. *Przemysł Spożywczy*, 2022, 76, 22-28.
13. Botka-Petrak K., Hraste, A., Lucić H., Gottstein Ž., Đuras Gomerčić M., Jakšić S., Petrak T.: Histological and chemical characteristics of mechanically deboned meat of broiler chickens. *Veterinarski Arhiv* 2011, 81:273-283.
14. Bredholt S., Nesbakken T., Holck A.: Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *International Journal of Food Microbiology* 2001, 66:191-196. DOI:10.1016/s0168-1605(00)00519-5
15. Budde B.B., Hornbæk T., Jacobsen T., Barkholt V., Koch A.G.: *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83(2), 171-184.
16. Cegiełka A., Kuczyńska N., Pietrzak D.: Zastąpienie surowca wieprzowo-wołowego w kiełbasach homogenizowanych przez mięso drobiowe oddzielone mechanicznie, uzyskane po separacji wysoko- i niskociśnieniowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 3 (94), 123-135.
17. Cegiełka A., Zakrzewska U., Hać-Szymańczuk E.: The effect of time gaining on chemical composition and technological characteristics of mechanically separated turkey meat (MSM). *Nauka Przyroda Technologie* 2016, 10, 4, 54. DOI: 10.17306/J.NPT.2016.4.54.
18. Chaillou S., Christeians S., Rivollier M., Lucquin I., Champomier-Vergès M.C., Zagorec M.: Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science* 2014, 97(3), 332–338.
19. Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., Steele J.L.: Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999, 76, 217-246.

20. Chwastowska-Siwiecka I., Skiepmo N.: Jakość mięsa drobiowego podczas zamrażania i zamrażalniczego przechowywania. *Gospodarka Mięсна* 2013, 7, 8-16.
21. Cierach M.: Azotyny w procesie peklowania mięsa – funkcje, aspekty zdrowotne, peklowanie bezazotynowe. Część I. *Gospodarka Mięсна* 2007, 59 (4), 24-27.
22. Comi G., Andyanto D., Manzano M., Iacumin L.: *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus sakei* as bio-protective culture to eliminate *Leuconostoc mesenteroides* spoilage and improve the shelf life and sensorial characteristics of commercial cooked bacon. *Food Microbiology* 2016, 58, 16–22.
23. Daros F.G., Masson M.L., Amico S.C. The influence of the addition of mechanically deboned poultry meat on the rheological properties of sausage. *Journal of Food Engineering* 2005, 68, 185–189. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.030
24. Decyzja Komisji (UE) 2015/826 z dnia 22 maja 2015 r. dotycząca przepisów krajowych zgłoszonych przez Danię w sprawie dodawania azotynów do niektórych produktów mięsnych (notyfikowana jako dokument nr C (2015), 3526).
25. Decyzja Komisji (UE) 2018/702 z dnia 8 maja 2018 r. dotycząca przepisów krajowych zgłoszonych przez Danię w sprawie dodawania azotynów do niektórych produktów mięsnych (notyfikowana jako dokument nr C(2018) 2721).
26. Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D.: Bakterie probiotyczne w produktach mięsnych. *Przemysł Spożywczy* 2010, 21-25.
27. Duda Z.: Wybrane zagadnienia stosowania azotynu w przetwórstwie mięsa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1998, 3 (16), 5-42.
28. Enan, G.: Behaviour of *Listeria monocytogenes* LMG 10470 in poultry meat and its control by the bacteriocin Plantaricin UG 1. *International Journal of Poultry Science* 2006, 5: 355–359. DOI:10.3923/ijps.2006.355.359
29. Eskandari M.H., Hosseinpour S., Mesbahi G.R., Shekarforoush S.: New composite nitrite-free and low-nitrite meat-curing systems using natural colorants. *Food Science & Nutrition* 2013, 1, 392–401.
30. Fakruddin M.D., Mannan K.S.B., Andrews S.: Viable but nonculturable bacteria: Food safety and public health perspective. *ISRN Microbiology* 2013, 1–6.

31. Faustman C., Liebler D.C, McClure T.D, Sun Q.: α,β -unsaturated aldehydes accelerate oxymyoglobin oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47: 3140-3144. DOI:10.1021/jf990016c
32. Faustman C., Sun Q., Mancini R., Suman S.P.: Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* 2010, 86: 86–94. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.04.025
33. Feng C.H., Drummond L., Sun, D.W.: Modelling the growth parameters of lactic acid bacteria and total viable count in vacuum-packaged Irish cooked sausages cooled by different methods. *International Journal of Food Science and Technology* 2014, 49, 2659–2667.
34. Flores M., Mora L., Reig M., Toldrá F.: Risk assessment of chemical substances of safety concern generated in processed meats. *Food Science and Human Wellness* 2019, 8, 244–251.
35. Froning G.W.: Mechanically-deboned poultry meat. *Food Technology*, 1796, 30, 50–63.
36. Gajewska J., Błaszczuk M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Postępy Mikrobiologii* 2012, 51, 1, 55-65.
37. Gambuteanu C., Borda D., Alexe P.: The Effect of Freezing and Thawing on Technological. Properties of Meat: Review. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 2013, 19, 88-93.
38. Gomes H.dA., da Silva E.N., Cardello H.M.A.B., Cipolli K.M.V.A.B.: Effect of gamma radiation on refrigerated mechanically deboned chicken meat quality. *Meat Science* 2003, 65, 919–926.
39. Gong H., Meng X., Wang H.: Mode of action of plantaricin MG, a bacteriocin active against *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Basic Microbiology* 2010, 50: 37-45. DOI:10.1002/jobm.201000130
40. Grabowski T., Kijowski J. Wydawnictwo WNT, 2018, Praca zbiorowa pod redakcją Tadeusza Grabowskiego i Jacka Kijowskiego Mięso i przetwory drobiowe Technologia, higiena, jakość.
41. Groves K.: Evaluation of Simple Microscopy Protocol for Identifying Mechanically Separated Meat in Pork, Chicken and Turkey. *Leatherhead Food Research* 2011, 8, 1-52.

42. Ha M.Y., Kim S.W., Lee Y.W., Kim M.J., Kim S.J.: Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2003, 96: 134-140. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)90115-0
43. Hać-Szymańczuk E., Cegiełka A., Lipińska E., Ilczuk P.: Wpływ szalwii na jakość mikrobiologiczną oraz wartość wskaźnika TBA w mięsie drobiowym odzyskanym mechanicznie. *Medycyna Weterynaryjna* 2014, 70, 704-708.
44. Hammes W. P.: Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology* 2012, 29: 151-156. DOI:10.1016/j.fm.2011.06.016
45. Heaton K.M., Cornforth D.P., Moiseev I.V., Egbert W.R., Carpenter C.E.: Minimum sodium nitrite levels for 536 pinking of various cooked meats as related to use of direct or indirect-dried soy isolates in 537 poultry rolls. *Meat Science* 2000, 55, 321–329.
46. Hecer C., Sözen B.H.: Microbiology properties of mechanically deboned poultry meat that applied lactic acid, acetic acid and sodium lactate. *African Journal of Agricultural Research* 2011, 16, 3847-3852.
47. Honikel K.O.: The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* 2008, 78:68-76. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.05.030
48. Hornsey M.: The colour of cooked cured pork. I.-estimation of the nitric oxide-Haem pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1956, 8: 534-540. DOI:10.1002/jsfa.2740070804
49. Huis in't Veld J.H.: Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33(1), 1–18.
50. Igarashi T., Kono Y., Tanaka K.: Molecular cloning of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271, 29521–29524.
51. Jurkowski M., Błaszczuk M.: Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2012, 3(61), 493-504.
52. Kim S.H., Jayasena D.D., Kim H.J., Jo Ch., Jung S.: Effect of Adding Lactobacillus-Fermented Solution on Characteristics of Chicken Breast Meat. *Korean Journal of Poultry Science* 2014, 41:127-133. DOI:10.5536/KJPS.2014.41.2.127

53. KOMUNIKAT KOMISJI DO PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY w sprawie przyszłego zapotrzebowania na mięso odkostnione mechanicznie i jego wykorzystywania w Unii Europejskiej, w tym polityki informacyjnej wobec konsumentów. Bruksela, 2.12.2010. KOM 2010 704.
54. Kulikowska-Karpińska E., Moniuszko-Jakoniuk J.: The antioxidative barrier in the organism. *Polish Journal of Environmental Studies* 2004, 13, 5–13.
55. Kumar D., Tanwar V.K.: Effects of incorporation of ground mustard on quality attributes of chicken nuggets. *Journal of Food Science and Technology* 2011, 48, 759–762.
56. Labadie J.: Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 1999, 52(3), 299–305.
57. Lammarino M., Di Taranto A.: Nitrite and nitrate in fresh meats: A contribution to the estimation of admissible maximum limits to introduce in directive 95/2/EC. *Food Science and Technology International* 2012, 47, 1852-1858.
58. Laslo É., György É., Czíkó A.: Meat starter cultures: Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional sausages. *Acta Universitatis Sapientiae. Alimentaria* 2019, 12:54-69. DOI:10.2478/ausal-2019-0004
59. Lechardeur D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., Gaudu P., Gruss A.: Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 2011, 22, 143–149.
60. Leroy F., De Vuyst L.: Lactic Acid Bacteria as a functional starter culture for the food fermentation industry, *Trends in Food Science and Technology* 2004, 15 (2), 67-78.
61. Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P.: The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 2014, 5, 258.
62. Li P., Luo H., Kong B., Liub Q., Chen C.: Formation of red myoglobin derivatives and inhibition of spoilage bacteria in raw meat batters by lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosum*. *LWT – Food Science Technology* 2016, 68, 251-257. DOI:10.1016/j.lwt.2015.12.035
63. Libera J., Sionek B., Dolatowski Z.J.: Wpływ probiotyków na wybrane parametry fizykochemiczne i mikrobiologiczne surowo dojrzewających baleronów podczas przechowywania. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 2014, 577, 83-92.

64. Lövenklev M., Artin I., Hagberg O., Borch E., Holst E., Radström P.: Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type B. *Applied and Environmental Microbiology* 2004a, 70, 2928–2934.
65. Lövenklev M., Holst E., Borch E., Rådström P.: Relative neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum* type B, determined using quantitative reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2004b, 70, 2919-2927.
66. Lücke F.K.: Effect of the use of nitrite on safety and shelf life of cooked meats. *Fleischwirtschaft* 2008, 143:91-94.
67. Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B., Order II. *Lactobacillales* ord. nov. [w:] red. de Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W. *Bergey's manual of systematic bacteriology (The Firmicutes)*, Edycja nr 2, t. 3. Springer, 2009, Nowy Jork, s. 464.
68. Łaskiewicz B., Szymański P., Kołożyn - Krajewska D.: Impact of selected lactic acid bacteria strains on technological usability and microbiological quality of mechanically separated poultry meat. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2019a, 26: 122-134. DOI: 10.15193/zntj/2019/120/302
69. Łaskiewicz B., Szymański P., Kołożyn - Krajewska D.: Problemy jakości mięsa oddzielonego mechanicznie. *Medycyna Weterynaryjna* 2019b, 75 (3), 131-137. DOI:10.21521/mw.6157
70. Łaskiewicz B., Szymański P., Kołożyn-Krajewska D.: The effect of selected lactic acid bacterial strains on the technological and microbiological quality of mechanically separated poultry meat cured with a reduced amount of sodium nitrite. *Poultry Science*, 2021a, 100, 263-272. doi:10.1016/j.psj.2020.09.066
71. Łaskiewicz B., Szymański P., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Application of *Lactiplantibacillus plantarum* SCH1 for the Bioconservation of Cooked Sausage Made from Mechanically Separated Poultry Meat. *Applied Sciences*, 2021b, 11, 1576. doi:10.3390/app11041576
72. Magda F.: Separatory MOM w przemyśle mięsny. *Gospodarka Mięsna*, 2012, 4, 18-22.
73. Majou D., Christieans S.: Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Science* 2018, 145:273-284. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.06.013

74. Małachowska A., Kruszewski B., Obiedziński M.: Analiza jakości tłuszczu wybranych kiełbas drobno rozdrobnionych przeznaczonych dla dzieci. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm* 2015, XLII, 16-27.
75. Mancini R.A., Hunt M.C.: Current research in meat color. *Meat Science* 2005, 71:100-121. DOI:10.1016/j.meatsci.2005.03.003
76. Martinez-Romero R., Romero-Orozco R.M., Martinez-Romero H., Trejo-Estrada S.R., Lazo-Zamalloa O.: Biopreservation composition based on facultative heterofermentative lactobacteria for preventing and controlling the spoilage of fresh and cooked meat products. Canadian Intellectual Property Office. CA 2971392:1-39, 2016.
77. Mayer A.L., Smith J.S., Kropf D.H., Marsden J.L., Milliken G.A.: A comparison in the composition of recovered meat produced from beef neckbones processed using hand boning, a traditional Advanced Meat Recovery (AMR) system, and a Desinewated Minced Meat system. *Meat Science* 2007, 77:602-607. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.05.012
78. Melero B., Vinuesa R., Diez A. M., Jaime I., Rovira J.: Application of protective cultures against *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in chicken products packaged under modified atmosphere. *Poultry Science* 2013, 92, 1108-1116.
79. Michalski M.: Charakterystyka podstawowego składu mięsa drobiowego uzyskanego z mechanicznego odkastniania. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego* 2006, 56, 67-68.
80. Michalski M.: Wymagania i ocena jakościowa mięsa oddzielonego mechanicznie otrzymywanego techniką niszczącą oraz techniką nienaruszającą struktury kości. Materiały Konferencyjne XXXII Dni Przemysłu Mięsnego IBPRS pt. „Postęp w nauce o mięsie i technologii oraz nowe regulacje prawne w przemyśle mięsnym”. Warszawa, 26.11.2009, 2009, s. 6-15.
81. Michalski M.: Zawartość białka, fosforu, wody, tłuszczu, popiołu w MDOM-ie badanym w PIWet-PIB w 2006 roku. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego* 2007, XLV, 161-168.
82. Morita H., Yoshikawa H., Sakata R., Nagata Y., Tanaka H.: Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidinonitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Bacteriology* 1997, 179:7812-7815. DOI:10.1128/jb.179.24.7812-7815.1997

83. Mountney G.J., Parkhurst C.R.: Poultry Products Technology. Food Products Press, New York, 1995.
84. Nagel G.M., Bauermeister L.J., Bratcher C.L., Singh M., McKee S.R.: *Salmonella* and *Campylobacter* reduction and quality characteristics of poultry carcasses treated with various antimicrobials in a post-chill immersion tank. *International Journal of Food Microbiology* 2013, 165, 281-286.
85. Neffe-Skocińska K., Kołożyn-Krajewska D., Goryl A.: Wpływ dodatku szczepu *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 i warunków dojrzewania na jakość fermentowanych polędwic podczas przechowywania. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 2013, 6 (91), 45-59.
86. Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J.: Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 2014, 2 (93), 5-18.
87. Okoń A., Dolatowski Z.: Wpływ bakterii probiotycznych na profil wolnych aminokwasów i cechy sensoryczne polędwic wieprzowych surowo dojrzewających podczas przechowywania. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 2014, 3 (94), 92-107.
88. On S., Wong T.L., Hom B., Graham C., Paulin S.: Bacterial concentrations of poultry offal and in mechanically separated meat products at the processing plant. In New Zealand: Food Safety Authority; MAF Technical Paper No: 2011/59; Ministry of Agriculture and Forestry: Wellington, New Zealand, 2011.
89. Patsias A., Chouliara I., Badeka A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G.: Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: Microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology* 2006, 23, 423-429.
90. Pegg R.B., Shahidi, F.: The color of meat. In Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives, 1st ed.; Pegg, R.B., Shahidi, F., Eds.; Food & Nutrition Press Inc.: Trumbull (CT), USA, 2000, Volume 3, pp. 23-66.
91. Perez-Chabela M.L., Totosaus A., Guerrero I.: Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas 2008, 28(1), 132-138. DOI: 10.1590/S0101-20612008000100019

92. Petracci M., Mudalal S., Solglia F., Cavani C.: Meat quality in fast-growing broiler chickens. *World's Poultry Science Journal* 2015, 71, 363–374.
93. Pietrzak D., Słowiński M., Mroczek J.: Mięso drobiowe odkostnione mechanicznie. *Przemysł Spożywczy* 2011, 65, 7/8, 68-71.
94. Plessas S., Nouska Ch., Karapetsas A., Kazakos S., Alexopoulos A., Mantzourani I., Chondrou P., Fournomiti M., Galanis A., Bezirtzoglou E.: Isolation, characterization and evaluation of the pro biotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. *Food Chemistry* 2007, 226, 102-108.
95. PN-A-86522:1992. Mięso drobiowe oddzielone mechanicznie.
96. PN-EN 12014-3:2006. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości azotanów i/lub azotynów. Część 3. Spektrometryczne oznaczanie zawartości azotanów i azotynów w produktach mięsnych poenzymatycznej redukcji azotanów do azotynów.
97. PN-EN ISO 10272-1:2017-08. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 1: Metoda wykrywania.
98. PN-EN ISO 16649-2:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2. Metoda płytkowa w temperaturze 44 °C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo β -D-glukuronidu.
99. PN-EN ISO 21528-2:2017-08. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 2. Metoda liczenia kolonii.
100. PN-EN ISO 4833-1:2013-12 + Ap1:2016-11. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30 °C.
101. PN-EN ISO 6579-1:2017-04. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania, oznaczania liczby i serotypowania *Salmonella*. Część 1. Wykrywanie *Salmonella* spp.
102. PN-EN ISO 6888-2:2001 + A1:2004. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków) Część 2: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynogenem.
103. PN-ISO 15214:2007: Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.

104. PN-ISO 2917:2001. Mięso i przetwory mięsne. Pomiar pH. Metoda odwoławcza.
105. Pomykała R., Michalski M.: Jakość mikrobiologiczna mięsa drobiowego oddzielonego mechanicznie. *Acta Scientiarum Polonorum. Medicina Veterinaria* 2008, 7 (4), 43-49.
106. Pothakos V., Devlieghere F., Villani F., Björkroth J., Ercolini D.: Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science* 2015, 109, 66-74.
107. Raccach M., Baker R.C.: Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat. *Journal of Food Protection* 1978, 41:703-705.
108. Raccach M., Baker R.C.: The Effect of Lactic Acid Bacteria on Some Properties of Mechanically Deboned Poultry Meat. *Poultry Science* 1979, 58, 1, 144-147. DOI:10.3382/ps.0580144
109. Raccach M.: The control of spoilage and pathogenic microorganisms in poultry meat by lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, New York, 1977.
110. Roszak D.B., Grimes D.J., Colwell R.R.: Viable but non-recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic system. *Canadian Journal of Microbiology* 1984, 30, 334–338.
111. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (Dz. U. L 139 z 30.4.2004, str. 55).
112. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 257/2010 z dnia 25 marca 2010 r. ustanawiające program ponownej oceny dopuszczonych dodatków do żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 w sprawie dodatków do żywności.
113. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Dz. U. L 338 z 22.12.2005, str. 1).
114. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
115. Rubio B., Martínez B., Sánchez M.J., García-Cachán M.A.D., Rovira J., Jaime I.: Study of the shelf life of a dry fermented sausage “salchichon” made from raw material

enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and stored under modified atmospheres. *Meat Science* 2007, 76, 128–137, doi:10.1016/j.meatsci.2006.10.021.

116. Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D.: Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties, *International Journal of Food Science and Technology* 2017a, 52 (9): 1983-1994. DOI:10.1111/ijfs.13471

117. Rzepkowska A., Zielińska D., Ołdak A., Kołożyn-Krajewska D.: Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from polish raw fermented meat products. *International Journal of Food Properties* 2017b, 20(11):2736-2747. DOI:10.1080/10942912.2016.1250098

118. Safa H., Portanguen S., Mirade P.S.: Reducing the Levels of Sodium, Saturated Animal Fat, and Nitrite in Dry-Cured Pork Meat Products: A Major Challenge. *Food and Nutrition Sciences* 2017, 8, 419–443.

119. Sanders J.W., Leenhouts K.J., Haandrikman A.J., Venema G., Kok J.: Stress response in *Lactococcus lactis*: Cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology* 1995, 177, 5254–5260.

120. Sebranek G.J., Bacus J.N.: Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: What are the issues? *Meat Science* 2007, 77, 136–147. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.03.025

121. Sebranek G.J.: Basic Curing Ingredients. In *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality, and Applications*; Tarte, R., Ed.; Springer Science Business Media: New York, NY, USA, 2009; pp. 1–23.

122. Serdaroglu M., Yildiz Turp G.: Effects of deboning methods on chemical composition and some properties of beef and turkey meat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2005, 29, 797-802.

123. Shin D.M., Hwang K.E., Lee C.W., Kim T.K., Park Y.S., Han, S.G.: Effect of Swiss Chard (*Beta vulgaris* Var. *cicla*) as nitrite replacement on color stability and shelf-life of cooked pork patties during refrigerated storage. *Korean Journal of Food Science* 2017, 37, 418–428.

124. Sindelar J.J., Milkowski A.L.: Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use. American Meat Science Association. AMSA White Paper Series. 2011, 3:1-14.
125. Siu D., Henshall A.: Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. *Journal of Chromatography* 1998, 804:156-160. DOI:10.1016/s0021-9673(97)01245-4
126. Skibsted L.H.: Chemical changes in meat and meat products during storage, transportation and retail display-theoretical considerations. Pages 169-181 in *Meat quality and meat packaging*. Eds. S. A Taylor, A. Raimundo, M. Severini, and F. J. M. Smulders, ECCEAMST, Utrecht 1996.
127. Slima S.B., Ktari N., Trabelsi I., Triki M., Feki-Tounsi M., Moussa H., Makni I., Herrero A., Jiménez-Colmenero F., Ruiz-Capillas Perez C., et al.: Effect of partial replacement of nitrite with a novel probiotic *Lactobacillus plantarum* TN8 on color, physico-chemical, texture and microbiological properties of beef sausages. *LWT Food Science and Technology* 2017, 86, 219–226.
128. Sözen B.U., Hecer C.: Potential risk of mechanically separated poultry meat technology. *Akademik Gıda/ Academic Food Journal* 2013, 11, 59-63.
129. Stangierski J., Baranowska H.M., Rezler R., Kijowski J.: Enzymatic modification of protein preparation obtained from water-washed mechanically recovered poultry meat. *Food Hydrocolloid* 2008, 22, 1629-1636.
130. Stiebing A.: Separatorenfleisch im Kreuzfeuer der Kritik. *Fleischwirtsch* 2002, 82:8.
131. Szymański P., Łaskiewicz B., Maszewska A., Kern-Jędrychowski J., Moch P.: Sprawozdanie z realizacji tematu BST o symbolu: 500-01-ZMT-03 pt. Wpływ wybranych szczepów bakterii de nityfikujących i kwasu mlekowego zastosowanych w procesie peklowania mięsa z obniżoną dawką azotanu(III) sodu na wybrane cechy jakościowe modelowego produktu mięsnego poddanego obróbce cieplnej. Warszawa 2017.
132. Szymański P., Łaskiewicz B.: Problemy w identyfikacji mięsa oddzielonego mechanicznie. *Gospodarka Mięsna* 2017, 12, 30-36.
133. Terns M.J., Milkowski A.L., Claus J.R., Sindelar J.J.: Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science* 2011, 88, 454–461.

134. Teusink B., Molenaar D.: Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology* 2017, 6:7-13. DOI:10.1016/j.coisb.2017.07.005
135. Thielke S., Lhaft S.K., Kühne M.: Effects of aging prior to freezing on poultry meat tenderness. *Poult. Science* 2005, 84 (4), 607-612.
136. Todorov S.D., Koep K.S.C., Van Reenen C.A., Hoffman L.C., Slinde E., Dicks L.M.T.: Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and Springbok (*Antidorcas marsupialis*) with bacteriocinogenic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*. *Meat Science* 2007, 77(3), 405-412.
137. Tolik D., Słowiński M., Desperak K.: Wpływ zastosowania drobiowego mięsa oddzielonego mechanicznie oraz mięsa odścięgniętego na jakość pasztetów sterylizowanych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2015, 5 (102), 132 - 141.
138. Trindade M.A., de Felício P.E., Castillo C.J.C.: Mechanically separated meat of broiler breeder and white layer spent hens. *Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)* 2004, 61 (2), 234-239.
139. Tuboly E., Lebovicks V.K., Gaál Ö., Mészáros L., Farkas J.: Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* 2003, 56, 241-244.
140. Ursachi CŞ, Perța-Crişan S, Munteanu F-D.: Strategies to Improve Meat Products' Quality. *Foods* 2020, 9(12):1883. DOI:10.3390/foods9121883.
141. USDA-FSIS. 1995. Poultry Products Produced by Mechanical Separation and Products In Which Such Poultry Products Are Used; Final Rule. Vol. 60, No. 213, Friday, November 3, 1995, Rules and Regulations.
142. Vasilopoulos C., De Mey E., Dewulf L., Paelinck H., De Smedt A., Vandendriessche F., Leroy F.: Interactions between bacterial isolates from modified-atmosphere packaged artisan-type cooked ham in view of the development of a bioprotective culture. *Food Microbiology* 2010, 27(8), 1086–1094.
143. Vermeiren L., Devlieghere F., Debevere J.: Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 96, 149–164.

144. Victoria-León T., Totosa A., Guerrero I., Pérez-Chabela M.L. Efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2006, 5, 135-141.
145. Vinderola G., Ouwehand A., Salminen S., von Wright A.: *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. 5th ed. Vinderola, G.; Ouwehand, A.; Salminen, S.; von Wright, A. Eds.; Boca Raton: CRC Press, USA, 2019. DOI: 10.1201/9780429057465
146. Viuda-Martos M., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A.: Mechanical deboning. In *Handbook of Meat and Meat Processing*, 2nd ed.; Hui, Y., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2012; Volume 5, pp. 457–468.
147. Walczycka M.: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 2005, 2 (43), 61-72.
148. Wójciak K.M., Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D.: Stabilność oksydacyjna ekologicznej kiełbasy surowo dojrzewającej z dodatkiem probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* LOCK 0900 i serwatki kwasowej. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 2014, 2 (93), 93-109.
149. Wójciak K.M., Dolatowski Z.J.: Effect of acid whey on nitrosylmyoglobin concentration in uncured fermented sausage. *LWT – Food Science and Technology* 2015, 64, 713-719.
150. Xu J., Verstraete W.: Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001, 56:504–507. DOI:10.1007/s002530100616
151. Yuste J., Pla R., Capellas M., Mor-Mur, M.: Application of high-pressure processing and nisin to mechanically recovered poultry meat for microbial decontamination. *Food Control* 2002, 13, 451–455.
152. Zeleňáková L., Kunová S., Lopašovský L.: Evaluation of microbiological quality of cooked meat products during their shelf life. *Maso International Brno* 2011, 1, 15–20.
153. Zhang X., Kong B., Xiong Y.: Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation. *Meat Science* 2007, 77: 593-598. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.05.010
154. Zhang Y., Zhu L., Dong P., Liang R., Mao Y., Qiu S., Luo X.: Bio-protective potential of lactic acid bacteria: Effect of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus*

- on changes of the microbial community in vacuum-packaged chilled beef. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2018, 31(4):585-594. DOI:10.5713/ajas.17.0540
155. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz Ch.M.A.P., Harris H., Mattarell P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G.E., Gänzle M.G., Lebeer S.: A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020, 70 (4). DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.
156. Zielińska D., Ołdak A., Rzepkowska A., Zieliński K.: Enumeration and identification of probiotic bacteria in food matrices. In *Advances in Biotechnology for Food Industry*; Holban, A.M., Grumezescu, A.M., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 2018; Chapter 6; pp. 167–196.

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelni biblioteki Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie.

.....

(czytelny podpis autora)

ANEKS