

KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, DANUTA KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA,
ANTONI GORYL

WPLYW DODATKU SZCZEPU *LACTOBACILLUS CASEI* LOCK 0900 I WARUNKÓW DOJRZEWANIA NA JAKOŚĆ FERMENTOWANYCH POŁĘDWIC PODCZAS PRZECHOWYWANIA

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu warunków dojrzewania na przeżywalność szczepu probiotycznego *Lb. casei* LOCK 0900 w poledwicach wieprzowych i na ich jakość sensoryczną podczas 180 dni przechowywania w warunkach chłodniczych, beztlenowych. Podjęto też próbę skonstruowania matematycznych modeli wzrostu i przeżywalności badanych bakterii.

Materiałem doświadczalnym był szczep probiotyczny *Lb. casei* LOCK 0900 i poledwice wieprzowe dojrzewające w różnych wariantach temperatury (16, 20 i 24 °C), następnie pakowane próżniowo i przechowywane w 4 °C przez 180 dni. Przygotowano próby kontrolne z dodatkiem glukozy i próby z dodatkiem szczepu probiotycznego i glukozy. Zakres badań obejmował analizy mikrobiologiczne, pomiar pH i ocenę sensoryczną (QDA). Oznaczenia wykonywano co 30 dni.

Stwierdzono, że pod względem mikrobiologicznym i sensorycznym najlepszą trwałość przechowalniczą wykazały poledwice z dodatkiem bakterii probiotycznych, wyprodukowane w temperaturze dojrzewania 20 °C (średnio 7,00 - 8,00 log jtk/g; sensoryczna jakość ogólna > 7 j.um.). Zadowolający model wzrostu i przeżywalności LAB podczas przechowywania skonstruowano w odniesieniu do poledwic dojrzewających w 24 °C (dopasowanie na poziomie C24 = 98 %, P24 = 96 %).

Słowa kluczowe: poledwice dojrzewające, probiotyki, przechowywanie, modele prognostyczne

Wprowadzenie

Surowo dojrzewające wyroby mięsne wyprodukowane z udziałem probiotycznych kultur startowych są bardzo wartościowymi produktami żywnościowymi, zarówno pod względem odżywczym, jak i sensorycznym. Na wysoką jakość wędlin surowo

Mgr inż. K. Neffe-Skocińska, prof. dr hab. D. Kołożyn-Krajewska, Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, dr A. Goryl, Katedra Ekonometrii i Badań Operacyjnych, Wydz. Zarządzania, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie, ul. Rakowicka 27, 31-510 Kraków

dojrzewających wpływa kilka czynników. Przede wszystkim jest to proces produkcyjny o ściśle kontrolowanym doborze surowca, przypraw czy odpowiednich kultur startowych, warunków fermentacji i dojrzewania produktu [15]. Bardzo ważny jest także zoptymalizowany proces poprodukcyjny, obejmujący dobór odpowiedniej metody pakowania i warunków przechowywania gotowego wyrobu – tak, aby produkt zachował jak najdłużej charakterystyczne walory smakowo-zapachowe, wysoką wartość odżywczą oraz odpowiedni poziom aktywnych bakterii probiotycznych.

Mikrobiologia prognostyczna kieruje się zasadą, że zachowanie danej populacji mikroorganizmów w badanym produkcie żywnościowym jest powtarzalne i zależy od czynników środowiskowych, np. pH, aktywności wody, zawartości NaCl i zawartości substancji konserwujących, zastosowanej technologii produkcji, czasu, temperatury oraz sposobu przechowywania. Matematyczne modelowanie zmienności bakterii względem danego czynnika środowiskowego było dotychczas wykorzystywane do określenia zachowań mikroorganizmów chorobotwórczych [6]. Obecnie zwraca się większą uwagę na przewidywanie wzrostu i przeżywalności dodawanych do żywności kultur startowych, głównie należących do grupy bakterii kwasu mlekowego, w tym o właściwościach probiotycznych. Z zakresu problematyki wędlin surowo dojrzewających nieliczne są prace naukowe dotyczące matematycznego prognozowania wzrostu i rozwoju mikroorganizmów startowych w kielbasach fermentowanych [1, 5].

Podjęte badania były kontynuacją prac dotyczących doboru optymalnych warunków prowadzenia procesu fermentacji polędwic wieprzowych z udziałem bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 [14, 18].

Celem pracy była ocena wpływu warunków dojrzewania polędwic wieprzowych na przeżywalność w nich szczepu probiotycznego *Lb. casei* ŁOCK 0900 i na ich jakość sensoryczną podczas 180 dni przechowywania w warunkach chłodniczych, beztlenowych. Podjęto też próbę skonstruowania matematycznych modeli wzrostu i przeżywalności badanych bakterii.

Material i metody badań

Material do badań stanowiły polędwice wieprzowe. Mięso pozyskiwano z młodych świń rasy wielka biała polska o masie przyżyciowej około 120 kg z podlubelskich zakładów mięsnych. Surowce mięsne bez wad jakościowych wykrawano z półtuszy wychładzanych w warunkach przemysłowych po 48 h od uboju. Mięso zaszczepiano bakteriami probiotycznymi *Lb. casei* ŁOCK 0900 i poddawano dojrzewaniu w trzech wariantach temp.: 16, 20 i 24 °C. Optymalizację warunków dojrzewania przeprowadzono w pierwszej części badań [18]. Szczep bakterii *Lb. casei* ŁOCK 0900 pochodził z kolekcji Politechniki Łódzkiej. Zastosowane bakterie mają udokumentowane właściwości probiotyczne (zgłoszenie patentowe P-382760) [7]. Proces produkcji polędwic został przeprowadzony w Katedrze Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością

Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W układzie doświadczenia, w przypadku każdej temperatury zaplanowano po dwa rodzaje prób: kontrolne z dodatkiem glukozy (C16; C20; C24) oraz próby z dodatkiem glukozy i szczepu probiotycznego *Lb. casei* ŁOCK 0900 (P16; P20; P24). Po zakończeniu procesu dojrzewania polędwice podzielono na równe części, zapakowano próżniowo i przechowywano w warunkach chłodniczych (4 ± 1 °C) przez 180 dni. Przeprowadzono trzy serie doświadczenia. Wykonywano analizy mikrobiologiczne, pomiar pH oraz ocenę sensoryczną polędwic wieprzowych co 30 dni, podczas półrocznego okresu przechowywania. Podjęto również próbę skonstruowania matematycznych modeli wzrostu i przeżywalności badanych bakterii podczas przechowywania.

Badania mikrobiologiczne wykonywano przy użyciu automatycznego systemu do pomiaru liczby drobnoustrojów – TEMPO[®] (bioMérieux, Francja), który pozwala uzyskać poziom wiarygodności wyników zgodny z wytycznymi [2] i [22]. Do oznaczeń mikrobiologicznych używano testów TEMPO[®] LAB, służących do określania liczby bakterii kwasu mlekowego w produktach żywnościowych. Inkubacja testów zaszczipionych badaną próbą przebiegała w temp. 37 °C, przez 40 h. Wyniki badań podano w logarytmie jednostek tworzących kolonie w jednym gramie produktu [log jtk/g]. Natomiast pomiary pH prowadzono w aparacie ELMETRON CP551 [21].

Analizę sensoryczną wykonywano metodą Ilościowej Analizy Opisowej (QDA) [19, 20]. Wyróżniki sensoryczne zostały wybrane i zdefiniowane przez zespół oceniający w dyskusji panelowej. Wybrano 5 wyróżników zapachu (wędzonego mięsa, suszonego mięsa, ostrego, starego tłuszczu, inny), 8 wyróżników smaku (wędzonego mięsa, suszonego mięsa, słony, gorzki, przechowalniczy, piekący, kwaśny, inny), 2 wyróżniki barwy (ton barwy, jednolitość barwy) i wyróżnik określający soczystość. W ocenie określano też jakość ogólną produktu. Zespół oceniający oceniał intensywność wybranych wyróżników jakości sensorycznej polędwicy surowo dojrzewającej. Oceny były nanoszone na niestrukturowaną skalę graficzną (0 – 10 jednostek umownych).

Matematyczny model wzrostu i przeżywalności LAB w polędwicach wieprzowych surowo dojrzewających, podczas 180 dni przechowywania w warunkach chłodniczych, beztlenowych przedstawiono za pomocą funkcji nieliniowej:

$$y = a + bx \ln x + cx^{2.5} + dx^2 + \zeta$$

gdzie:

y – zmienna zależna [log jtk/g],

x – czas przechowywania [dni],

ζ – addytywne zakłócenie losowe (składnik losowy),

a, b, c, d – parametry modelu prognostycznego.

Jakość otrzymanego modelu oceniano następującymi charakterystykami:

R^2 – współczynnik determinacji (im bliższy 1, tym bardziej dopasowany model) wskazujący, jaka część zmienności zmiennej zależnej została wyjaśniona zmiennością zmiennej niezależnej [0; 1]

$adj. R^2$ – zmodyfikowany współczynnik determinacji; współczynnik skorygowany liczbą stopni swobody [0; 1], przedstawiony równaniem:

$$adj. R^2 = 1 - \left[(1 - R^2) \cdot \frac{n-1}{n-k} \right]$$

gdzie:

n – liczba obserwacji,

k – liczba szacowanych parametrów.

Opracowanie matematyczno-statystyczne wyników mikrobiologicznych przeprowadzono za pomocą pakietów Microsoft Excel oraz Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Matematyczne, alternatywne modele wzrostu i przeżywalności testowano w programie TableCurve 2D (SYSTAT Software Inc.). Analizowane były wyniki przeżywalności bakterii LAB, w tym szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900 w badanych połówkach wieprzowych. Uzyskane wyniki analizy sensorycznej QDA przedstawiono graficznie w postaci wykresów biegunowych.

Wyniki i dyskusja

Po zakończeniu procesu dojrzewania średnia liczba bakterii kwasu mlekowego, będących naturalną mikroflorą środowiskową, we wszystkich badanych próbach kontrolnych (C16, C20, C24) wynosiła 4,00 log jtk/g. W ciągu 180 dni chłodniczego przechowywania próżniowo zapakowanych produktów zaobserwowano wzrost liczby tych bakterii w próbach kontrolnych, które wcześniej były poddane dojrzewaniu w temp. 20 i 24 °C (C20, C24). Obniżenie liczby LAB stwierdzono tylko w przypadku próby C16 (tab. 1).

W przypadku prób połówki wieprzowych z dodatkiem szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900, bezpośrednio po zakończeniu procesu dojrzewania, stwierdzono znacząco wyższą, niż w próbach kontrolnych, liczbę bakterii kwasu mlekowego, co może świadczyć o dobrym wzroście, a tym samym o zdominowaniu naturalnej mikroflory mięsa przez dodane bakterie probiotyczne. Najwyższą liczbę bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900, utrzymującą się przez cały okres półrocznego przechowywania, stwierdzono w próbach połówki dojrzewających w 20 °C (średnio 7,00 – 8,00 log jtk/g), przy czym największy wzrost zaobserwowano po 30 i 120 dniach przechowywania. Ostatniego dnia przechowywania liczba bakterii kwasu mlekowego, w stosunku do pozostałych wariantów prób połówki, była także najwyższa i wynosiła $7,14 \pm 0,44$ log jtk/g (tab. 1). Dodatkowo zaobserwowano zależność pomiędzy wysoką

liczbą LAB (7,00 -8,00 log jtk/g) i niską wartością pH (około 5,50 - 5,65) tych polędwic. Wartość pH była w tym przypadku najniższa w porównaniu z produktami dojrzewającymi w temp. 16 i 24 °C (zakres od 5,50 do 5,65), co może być dodatkowym potwierdzeniem dobrej przeżywalności bakterii LAB, w tym dodanego szczepu o właściwościach probiotycznych, podczas całego okresu przechowywania.

Pozostałe próby polędwic wieprzowych z dodatkiem szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900, po procesie dojrzewania w temp. 16 i 24 °C, charakteryzowały się dużo słabszą przeżywalnością bakterii kwasu mlekowego w czasie przechowywania, (średnio 5,00 – 6,00 log jtk/g). W obu przypadkach badanych prób polędwic, na koniec okresu przechowywania zaobserwowano obniżenie liczby LAB średnio do 4,00 log jtk/g. Także wartość pH była wyższa w przypadku tych polędwic (tab. 1).

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) stanowią część mikroflory surowo dojrzewających produktów mięsnych [11, 14]. Czynnikiem środowiskowym, który ma największy wpływ na wzrost i rozwój drobnoustrojów w produktach żywnościowych są zmiany temperatury otoczenia, w którym rozwija się określona populacja bakterii. Wzrost i rozwój dodanego szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900 do badanych polędwic był zależny nie tylko od występowania konkurencyjnych bakterii kwasu mlekowego, ale również od temperatury prowadzenia procesu dojrzewania mięsa. Dodatkowo, po zakończeniu fermentacji i dojrzewania zapakowane próżniowo polędwice z dodatkiem szczepu probiotycznego zostały poddane przechowywaniu chłodniczemu. W tym momencie dalszy wzrost i rozwój bakterii kwasu mlekowego, w tym dodanego szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900, mógł być zaburzony poprzez przeniesienie do skrajnie odmiennych warunków środowiskowych (brak dostępu tlenu i obniżenie temp. do 4 °C).

Gwałtowne schłodzenie wywołuje u wielu gatunków bakterii tzw. „zimny szok”, odpowiedzialny za powstawanie licznych białek CSP (*cold-shock protein*; $7 \cdot 10^3$ Da) w komórkach bakteryjnych [26, 27]. Białka CSP umożliwiają zarówno bakteriom naturalnie występującym w surowcu, jak i dodanym do produktu organizmom startowym, adaptację do warunków chłodniczych oraz dalszy, ale z reguły wolniejszy wzrost [28]. Nagłe obniżenie temperatury spowalnia też większość reakcji metabolicznych zachodzących w komórkach bakterii, co również umożliwia im dostosowanie się do nowych warunków środowiskowych [4]. Bakterie kwasu mlekowego obecnie są zaliczane do psychrotrofów, czyli do grupy mikroorganizmów zdolnych do wzrostu w niskiej temperaturze, co jest istotne ze względów technologicznych, ponieważ mogą rozwijać się w produktach mięsnych w chłodniach [4]. Z uwagi na odczyn środowiska (pH = 6), dużą zawartość białka i witamin, głównie z grupy B, mięso i produkty mięsne mogą być bardzo dobrym środowiskiem do rozwoju drobnoustrojów, w tym bakterii kwasu mlekowego o właściwościach probiotycznych [24]. Z drugiej strony, intensywność wzrostu populacji bakteryjnej zależy od cyklu rozwojowego drobnoustrojów, który

Tabela 1

Liczba bakterii kwasu mlekowego (LAB) i wartości pH w badanych próbach poledwic surowo dojrzewających podczas 180 dni przechowywania.

Count of lactic acid bacteria (LAB) and pH values in studied samples of dry fermented loins during 180 days of storage.

Wyszczególnienie Specification	Czas przechowywania Storage time [dni] / [days]	C16*	P16*	C20*	P20*	C24*	P24*
LAB [log jtk/g]	0	4,84 ± 0,65	6,65 ± 0,70	4,15 ± 0,61	8,00 ± 0,70	4,79 ± 0,84	6,49 ± 0,57
	30	6,27 ± 0,84	5,31 ± 0,72	4,48 ± 0,65	8,04 ± 0,78	4,91 ± 0,80	7,02 ± 0,47
	60	6,25 ± 0,91	5,19 ± 0,77	5,08 ± 0,65	7,93 ± 0,77	5,50 ± 1,01	5,99 ± 0,47
	90	6,14 ± 0,60	6,32 ± 0,58	7,03 ± 0,66	7,22 ± 0,73	6,48 ± 0,68	6,26 ± 0,62
	120	4,78 ± 0,69	5,97 ± 0,72	6,46 ± 0,77	8,00 ± 0,43	6,70 ± 0,69	6,34 ± 0,96
	150	5,22 ± 0,88	5,55 ± 0,61	5,54 ± 0,92	7,74 ± 0,33	6,43 ± 0,64	6,02 ± 0,63
	180	5,20 ± 0,89	4,72 ± 0,47	5,46 ± 0,56	7,14 ± 0,44	6,40 ± 0,74	4,48 ± 0,73
Wartości pH/ pH values	0	5,69 ± 0,03	5,67 ± 0,02	5,74 ± 0,05	5,50 ± 0,02	5,73 ± 0,06	5,59 ± 0,03
	30	5,83 ± 0,07	5,79 ± 0,06	5,62 ± 0,28	5,50 ± 0,04	5,63 ± 0,16	5,66 ± 0,04
	60	5,83 ± 0,1	5,81 ± 0,05	5,78 ± 0,07	5,57 ± 0,08	5,68 ± 0,18	5,81 ± 0,06
	90	5,93 ± 0,05	5,87 ± 0,09	5,64 ± 0,14	5,64 ± 0,04	5,64 ± 0,04	5,77 ± 0,07
	120	5,94 ± 0,07	5,82 ± 0,11	5,89 ± 0,05	5,65 ± 0,09	5,84 ± 0,04	5,75 ± 0,12
	150	5,83 ± 0,12	5,82 ± 0,11	5,79 ± 0,05	5,58 ± 0,10	5,80 ± 0,12	5,77 ± 0,11
	180	5,91 ± 0,05	5,98 ± 0,07	5,81 ± 0,07	5,63 ± 0,07	5,77 ± 0,14	5,83 ± 0,12

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wynik średni ± odchylenie standardowe/ mean value ± standard deviations;

* oznacza w tej samej kolumnie różnice statystycznie istotne przy $p < 0,05$ względem czasu przechowywania / denotes mean values in the same column that are significantly different at $p < 0.05$ as regards storage time.

obejmuje sześć różnych faz (lag-faza, log-faza, okres zwolnionego wzrostu, faza równowagi, faza zamierania, faza logarytmicznego zamierania) [4, 8]. W przetwórstwie i przechowywaniu żywności fermentowanej, w tym probiotycznej, za najkorzystniejszy etap rozwoju bakterii uważa się fazę równowagi, w której liczba bakterii jest względnie stała. Dochodzi do równowagi pomiędzy obumieraniem a namnażaniem się komórek bakteryjnych (równowaga dynamiczna) oraz do osiągnięcia maksymalnego

stężenia biomasy przez cały okres trwania fazy stacjonarnej [13]. Uzyskane wyniki badań wskazują, że najlepszymi warunkami do wzrostu i rozwoju LAB, w tym szczepu *Lb. casei* LOCK 0900, była temp. 20 °C przez 21 dni. Pozwoliło to na utrzymanie na stałym poziomie liczby LAB, w tym dodanego szczepu o właściwościach probiotycznych, przez cały okres przechowywania produktu.

Utrzymanie fazy stacjonarnej podczas całego okresu przechowywania produktu jest możliwe m.in. dzięki dobraniu optymalnych warunków środowiskowych (temperatura, pH, atmosfera przechowywania, wystarczający dodatek glukozy) niezbędnych do wzrostu bakterii. W przypadku prób polędwicz z dodatkiem bakterii probiotycznych, poddanych dojrzewaniu w temp. 16 °C (P16), można przypuszczać, że populacja bakterii kwasu mlekowego znajdowała się w końcowym etapie lag-fazy, ewentualnie na początku fazy wzrostu logarytmicznego. Temp. 16 °C okazała się za niska, co mogło powodować zbyt wolne namnażanie się badanych bakterii. Zapakowanie próżniowe i przeniesienie polędwicz do temperatury chłodniczej mogło dodatkowo spowodować zimny szok, a tym samym złą przeżywalność LAB przez 180 dni przechowywania.

Temperatura 24 °C procesu dojrzewania trzeciego wariantu polędwicz wieprzowych z dodatkiem szczepu *Lb. casei* LOCK 0900 również nie stworzyła optymalnych warunków do przeżywania bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepu o właściwościach probiotycznych w czasie przechowywania. W tym przypadku badana populacja bakterii najprawdopodobniej znajdowała się w zaawansowanej fazie dynamicznego wzrostu logarytmicznego, o czym może świadczyć liczba LAB = 7,00 log jtk/g po 30 dniach przechowywania. Jednak brak osiągnięcia fazy równowagi wzrostu badanych bakterii przed przeniesieniem do warunków chłodniczych, beztlenowych mógł być przyczyną niestabilnej przeżywalności LAB w ciągu 180 dni przechowywania. Optymalna temperatura wzrostu i przeżywalności mikroflory jelitowej LAB wynosi 30 – 40 °C [15]. W badaniach własnych zaobserwowano, że zbyt wysoka temperatura (24 °C) wpłynęła niekorzystnie na zmiany sensoryczne polędwicy (rys. 1), powodując jej nadmierne wysuszenie w warstwie powierzchniowej, a tym samym prawdopodobnie utrudniła rozwój badanych drobnoustrojów. Jednak wzrost i rozwój bakterii może być ograniczony lub wstrzymany przez przekroczenie optymalnej granicy jednego z czynników środowiskowych (pH, a_w , atmosfera przechowywania, inny przebieg procesów proteolizy białek i oksydacji tłuszczu) [28], a nie tylko poprzez negatywny wpływ samej temperatury. Bakterie mogą rozwijać się do momentu wyczerpania się węglowodanów, aminokwasów lub innych substancji pokarmowych, nagromadzenia się substancji szkodliwych hamujących wzrost, np. nadtlenu wodoru oraz niekorzystnego stężenia jonów wodoru, odpowiedzialnego za kwasowość czynną podłoża [12]. Optymalne pH umożliwiające wzrost i przeżywalność bakterii kwasu mlekowego wynosi 4,5 – 7,0 [12]. Kwasowość (pH) mięsa 24 h po uboju wynosi od 6,0 do 6,5 [16]. W przedstawionych badaniach własnych obniżenie pH do 5,50 po procesie dojrzewa-

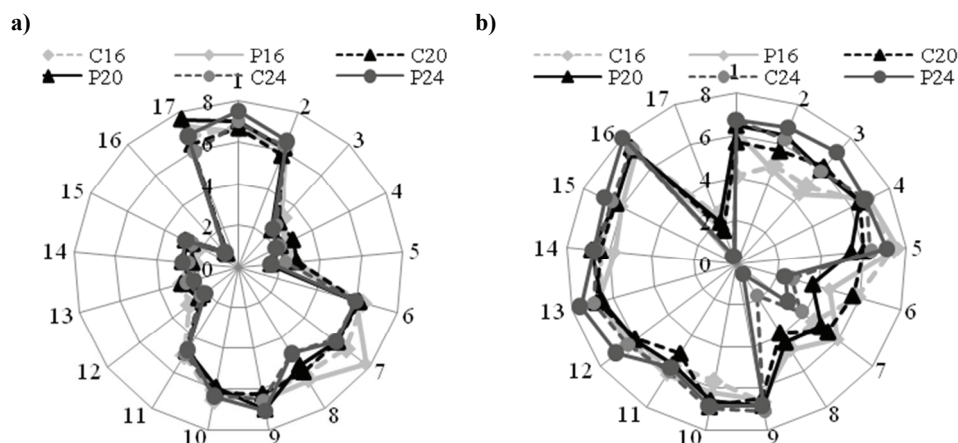
nia w temp. 20 °C i utrzymywanie się na stałym poziomie w czasie przechowywania jest dodatkowym potwierdzeniem dobrej przeżywalności bakterii *Lb. casei* ŁOCK 0900. Sakhare i Narasimha [23] stwierdzili, że obniżenie kwasowości jest kluczowym czynnikiem utrzymania stabilności mikrobiologicznej suchych fermentowanych produktów mięsnych podczas przechowywania. Natomiast Lorenzo i wsp. [17] zaobserwowali po procesie fermentacji niższe wartości pH w mięsie mielonym niż w całych kawałkach mięsa wykorzystywanych odpowiednio do produkcji kiełbas lub szynek dojrzewających. Również Arihara i Itoh [3] oraz Wójciak i wsp. [28] stwierdzili niższe pH w kiełbasach dojrzewających z dodatkiem szczepów probiotycznych (około 4,5).

W przeprowadzonej analizie sensorycznej wykazano, że dodatek kultur startowych o właściwościach probiotycznych, optymalne warunki dojrzewania mięsa i półroczny okres przechowywania miały wpływ na jakość ogólną badanych połówkow surowo dojrzewających. Wszystkie warianty prób połówkow z dodatkiem *Lb. casei* ŁOCK 0900 po 30 dniach przechowywania charakteryzowały się bardzo dobrą jakością ogólną (powyżej 7 j.um.), znacząco wyższą niż prób kontrolnych, czyli bez dodatku bakterii probiotycznych (rys 1a). Wysoka jakość ogólna badanych połówkow utrzymywała się do 90 dni przechowywania chłodniczego. Dopiero po upływie 120 dni stwierdzono obniżenie jakości ogólnej, która na koniec okresu przechowywania we wszystkich badanych połówkowach określona została jako niska. Mimo to warto zaznaczyć, że po 6 miesiącach przechowywania najwyższą jakością ogólną charakteryzowały się próby dojrzewające w temp. 20 i 16 °C (rys. 1b).

Na początku okresu przechowywania profile smakowo-zapachowe wszystkich badanych produktów surowo dojrzewających były bardzo podobne (rys. 1a). Po 30 dniach przechowywania wszystkie próby charakteryzowały się niską intensywnością odczuwania cech negatywnych, czyli zapachu ostrego, starego, innego oraz takich posmaków, jak: gorzki, przechowalniczy, piekący, kwaśny i inny. Najdłużej oceny te utrzymywały się do 150 dni przechowywania połówkow z dodatkiem bakterii *Lb. casei* ŁOCK 0900 (P20 i P24). Po 180 dniach przechowywania wszystkie badane wyróżniki sensoryczne były oceniane negatywnie, w przypadku każdej próby połówkow. Najniższą jakością sensoryczną charakteryzowały się próby dojrzewające w temp. 24 °C (C24 i P24). Szczególnie niską jakością charakteryzowały się połówkowice z dodatkiem bakterii probiotycznych (P24). Oceniono je jako zbyt suche, o niejednolitej barwie, bardzo mocno wyczuwalnym zapachu starego tłuszczu i o bardzo intensywnym smaku przechowalniczym, jełkim, jak również gorzkim, piekącym i kwaśnym. Również wyróżnik sensoryczny „smak inny” był wyraźnie wyczuwany.

Fadda i wsp. [11] stwierdzili, że typowy smak i zapach fermentowanych produktów mięsnych zależy od optymalizacji procesu dojrzewania, który pozwala uzyskać równowagę pomiędzy związkami lotnymi (ketony, aldehydy) i nielotnymi (aminokwasy, peptydy lub cukry), wytwarzanymi w przemianach metabolicznych bakterii mle-

kowych. We wcześniejszych badaniach [14] wykazano, że dodatek bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* Bauer ma pozytywny wpływ na jakość sensoryczną fermentowanych poledwicz zarówno po dojrzewaniu, jak i po półrocznym przechowywaniu. Również Zdolec i wsp. [29] stwierdzili, że dodatek bakterii probiotycznych nie ma negatywnego wpływu na jakość sensoryczną kielbas dojrzewających.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

Zapach: / Smell: 1 – z. wędzonego mięsa, charakterystyczny dla dojrzewającego mięsa / smoked meat smell typical of dry fermented meat; 2 – z. suszonego mięsa, charakterystyczny dla dojrzewającego mięsa / dried meat smell typical of dry fermented meat; 3 – z. ostry, drażniące wrażenie przy wachaniu / sharp smell, irritating impression when smelling; 4 – z. starego tłuszczu, wrażenie związane ze zmianami oksydacyjnymi w tłuszczu; brak świeżości / rancid smell, off-flavour associated with oxidative changes in fat; lack of freshness; 5 – z. inny, pozostałe wrażenia nie wymienione w karcie oceny / other smell, other sensations not shown in the assessment card.

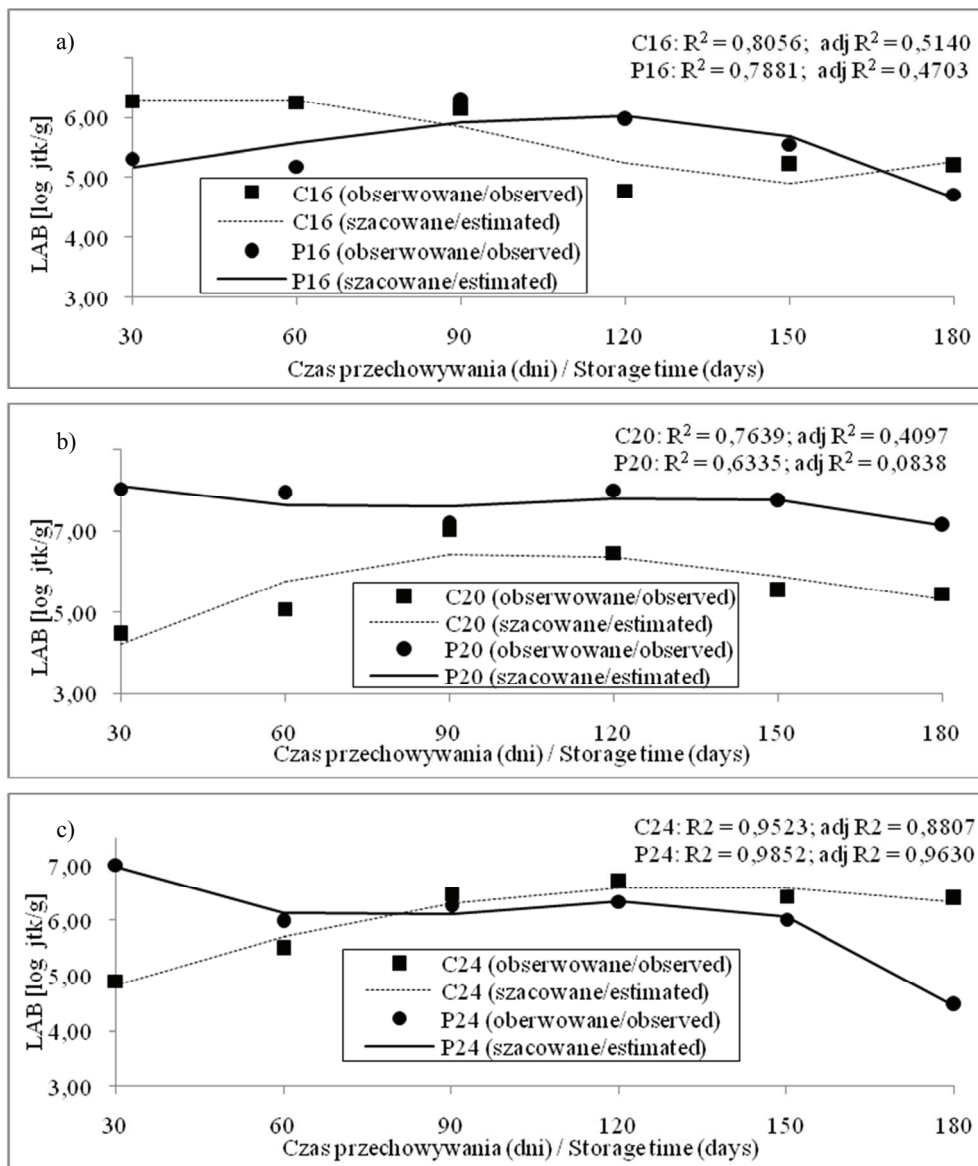
Wygląd i tekstura: / Appearance and texture: 6 – ton barwy, intensywność barwy czerwonej charakterystycznej dla mięsa / meat colour hue, intensity of red colour characteristic for meat; 7 – jednolitość barwy, równomierne rozłożenie barwy czerwonej charakterystycznej dla dojrzewającego mięsa / colour homogeneity, uniform distribution of red colour typical for dry fermented meat; 8 – soczystość, wrażenie obecności soku mięsnego w trakcie żucia w ustach / juiciness, impression of meat juice in mouth when chewing.

Smak: / Flavour: 9 – s. wędzonego mięsa, charakterystyczny dla dojrzewającego mięsa / smoked meat flavour typical for dry fermented meat; 10 – s. suszonego mięsa, charakterystyczny dla dojrzewającego mięsa / dried meat flavour typical for dry fermented meat; 11 – s. słony, podstawowa jakość smaku / salty flavour, basic quality of taste; 12 – s. gorzki, podstawowa jakość smaku / bitter flavour, basic quality of taste; 13 – s. przechowalniczy, brak świeżości / storage-related flavour, lack of freshness; 14 – s. piekący, podstawowa jakość smaku / stinging flavour, basic quality of taste; 15 – s. kwaśny, podstawowa jakość smaku / sour flavour, basic quality of taste; 16 – s. inny, pozostałe wrażenia nie wymienione w karcie oceny / other flavours, other sensations not listed in the assessment card.

Jakość ogólna: / Overall quality: 17 – ogólne wrażenie uwzględniające wszystkie badane wyróżniki / general impression of sensory quality based on all tested attributes.

Rys. 1. Wybrane wyniki akceptacji sensorycznej poledwicz z dodatkiem (P16; P20; P24) lub bez (C16; C20; C24) szczepu *Lb. casei* ŁOCK 0900; po (a) 30 i (b) 180 dniach przechowywania.

Fig. 1. Selected results of sensory acceptance of loins with *Lb. casei* ŁOCK 0900 strain added (P16; P20; P24) or without it (C16; C20; C24); after (a) 30 and (b) 180 days of storage.



Rys. 2. Wartości zaobserwowane (punkty) i szacowane (krzywa) przez model, obrazujące przeżywalność bakterii LAB podczas przechowywania w temp. 4 °C w polędwicach po dojrzewaniu w temp. (a) 16 °C, (b) 20 °C, (c) 24 °C.

Fig. 2. Reported values (points) and estimated values (curve) of model to show survival of LAB during storage at 4°C in loins after ripening at temperature of (a) 16°C, (b) 20°C, (c) 24°C.

Przedstawione wyniki wskazują, że dobór optymalnej temperatury procesu dojrzewania gwarantuje nie tylko najefektywniejszy wzrost i przeżywalność bakterii kwa-

su mlekowego, w tym dodanego szczepu *Lb. casei* LOCK 0900, w badanych połędwicach podczas przechowywania, ale również wysoką jakość sensoryczną ocenianych produktów mięsnych.

Na podstawie wyników analiz mikrobiologicznych podjęto próbę oszacowania matematycznych modeli wzrostu i przeżywalności bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepu *Lb. casei* LOCK 0900, podczas 180 dni przechowywania chłodniczego połędwic surowo dojrzewających. Powszechnie stosowane w mikrobiologii prognostycznej pierwszorzędowe funkcje nieliniowe, takie jak model Gomperta lub model logistyczny oraz ich modyfikacje, nie pasowały do opisanego zachowań badanej populacji bakterii [30]. Trudność ta wynikała z przebiegu zmienności liczby bakterii kwasu mlekowego, zarówno w próbach kontrolnych, jak i w próbach z dodatkiem szczepu o właściwościach probiotycznych, podczas przechowywania, co mogło być spowodowane m.in. obecnością naturalnej mikroflory konkurencyjnej. Podjęto w związku z tym próbę opisu matematycznego za pomocą modeli wielomianowych [30].

W niniejszej publikacji przedstawiono jeden, wybrany model nieliniowy, który pod względem jakości aproksymacji najlepiej prognozuje zachowanie bakterii w badanych połędwicach wieprzowych. Porównanie wartości zaobserwowanych z wartościami teoretycznymi modelu, określającymi przeżywalność LAB w próbach kontrolnych i w próbach z dodatkiem bakterii probiotycznych, przedstawiono na rys. 2. Przebieg zmienności badanej populacji bakterii, podczas 180 dni przechowywania w przypadku połędwic po dojrzewaniu w temp. 16 °C, odbiega od typowego s-kształtnego wzrostu bakterii. Zmienność liczby bakterii LAB w próbach kontrolnych, jak i w próbach zaszczepionych probiotykiem, została wyjaśniona przez proponowany model w 80 % (rys. 2a).

Zachowanie badanej populacji bakterii w połędwicach dojrzewających w temp. 20 °C zostało scharakteryzowane zmiennością czasu przechowywania, odpowiednio w przypadku próby kontrolnej w 76 %, a próby zaszczepionej w 63 % (rys 2b). Pod względem technologicznym połędwice z dodatkiem szczepu probiotycznego charakteryzowały się najlepszym wzrostem i stabilną przeżywalnością bakterii LAB. Po 90 dniach chłodniczego przechowywania zaobserwowano nieznaczne obniżenie liczby bakterii kwasu mlekowego z 7,93 do 7,22 log jtk/g, co mikrobiologicznie jest nieistotne. Jednak od strony interpretacji matematycznej wynik ten zaburza liniowy przebieg krzywej wzrostu LAB, powodując tym samym, że dopasowanie modelu dla C20 i P20, liczone współczynnikiem determinacji R^2 , jest niewystarczające, a oceny większości parametrów obciążone są nadmiernymi błędami średnimi.

Inaczej jest w przypadku prób połędwic wieprzowych kontrolnych (C24) i z dodatkiem szczepu *Lb. casei* LOCK 0900 (P24), dojrzewających w temp. 24 °C, charakteryzujących się najlepszymi parametrami dopasowania i akceptowanymi cechami stochastycznymi ocen parametrów (rys. 2c). Opracowany model może być bez trudu

szacowany za pomocą klasycznej metody najmniejszych kwadratów. Wysokie wartości współczynników determinacji R^2 wskazują na dobre dopasowanie modeli do danych doświadczalnych i na wysoki procent wyjaśnienia zmiennej zależnej (liczba LAB w log jtk/g) przez zmienność zmiennej objaśniającej (czas przechowywania). W przypadku modeli prób polędwic z dodatkiem szczepu probiotycznego, wysokim wartościom współczynników determinacji towarzyszą precyzyjnie oszacowane parametry, wszystkie statystycznie istotnie różniące się od zera ($p < 0,05$). Z formalno-statystycznego względu modele dotyczące prób zaszczepionych są modelami dobrymi.

Na trudności związane z modelowaniem liczby bakterii kwasu mlekowego w produktach mięsnych surowo dojrzewających zwracają uwagę inni autorzy [5, 6, 9]. Devlieghre i wsp. [9] badali przeżywalność bakterii *Lactobacillus sake* w gotowanym produkcie mięsnym pakowanym w atmosferze modyfikowanej. Na zmienne niezależne, warunkujące wzrost badanej populacji bakterii wybrano aktywność wody, temperaturę i stężenie CO_2 . W badaniach zastosowano modele matematyczne Ratkowsky'ego i powierzchni odpowiedzi (drugorzędowe modele linearne o charakterze funkcji wielomianowej). Zastosowane modele matematyczne również nie szacowały w sposób satysfakcjonujący zmienności badanych bakterii. Jedynie modele powierzchni odpowiedzi charakteryzowały się silniejszą korelacją, lecz nadal przedstawiały nielogiczne prognozy przeżywalności bakterii przy niskiej aktywności wody. Natomiast Bello i Sanchez-Fuertes [5] wskazali na możliwość zastosowania modyfikacji modelu matematycznego Gompertza w celu opisania przeżywalności bakterii *Lactobacillus* spp. podczas dojrzewania hiszpańskiej kielbasy surowej w warunkach kontrolowanych, w komorze dojrzewalniczej oraz w warunkach naturalnych. Autorzy nie modelowali jednak matematycznie zmienności zachowania bakterii kwasu mlekowego podczas przechowywania produktu.

Cayré i wsp. [6] za pomocą modeli matematycznych opisali wpływ trzech temperatur przechowywania (0, 8 i 15 °C) na wzrost bakterii kwasu mlekowego w gotowanej kielbasie. Na podstawie badań przechowalniczych kielbasy, pakowanej w film o niskiej przepuszczalności tlenu, do uzyskanych wyników zmienności LAB dopasowano model Gompertza oraz modele Arrheniusa i równania pierwiastka kwadratowego. Należy jednak zaznaczyć, że bakterie kwasu mlekowego w mięsnych produktach gotowanych są mikroflorą niepożądaną, odpowiedzialną za zepsucie.

Matematyczne modele wzrostu i przeżywalności bakterii mlekowych znajdują bardziej uzasadnione zastosowanie w przypadku produktów żywnościowych, które przed wprowadzeniem kultury startowej poddawane są pasteryzacji, czyli są pozbawione mikroflory konkurencyjnej. Wykazali to Zielińska i wsp. [30] (fermentowany napój sojowy) i Trząskowska i wsp. [25] (fermentowany napój marchwiowy).

Matematycznie trudno jest skonstruować dokładny model prognostyczny opisujący przeżywalność bakterii kwasu mlekowego w surowych produktach mięsnych, prze-

de wszystkim ze względu na różnorodną mikroflorę. W przypadku dodawania bakterii o właściwościach probiotycznych do produktów pasteryzowanych uzyskuje się matematyczne modele o bardzo dobrym stopniu dopasowania. Mięso jest surowcem charakteryzującym się swoją naturalną mikroflorą, w skład której wchodzi m.in. bakterie z rodzaju *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* oraz wspomniane wcześniej LAB [10]. Specyfika produkcji wędlin surowo dojrzewających związana jest z brakiem obróbki cieplnej, a tym samym z brakiem możliwości uzyskania sterylnego produktu, który stanowiłby idealne środowisko do rozwoju dodanych bakterii startowych o właściwościach probiotycznych. Znane w literaturze modele matematyczne dotyczą głównie przeżywalności czystej kultury bakterii [30].

Innym rozwiązaniem do przewidywania zachowania wybranej grupy bakterii spośród całej mikroflory znajdującej się w produkcie żywnościowym mogą być prognostyczne sieci neuronowe, które pozwalają najprecyzyjniej przewidzieć wzrost mikroorganizmów. Sztuczne sieci neuronowe uwzględniają dynamikę zachowań badanej populacji mikroorganizmów, na którą, obok czynników biogennych i abiogennych, duży wpływ mają interakcje pomiędzy poszczególnymi grupami drobnoustrojów. Kierunek ten będzie uwzględniony w dalszych badaniach autorów.

Wnioski

1. Największą przeżywalność bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepu o właściwościach probiotycznych *Lactobacillus casei* LOCK 0900, utrzymującą się przez 180 dni przechowywania, zaobserwowano w przypadku polędwic wieprzowych dojrzewających przez 3 tygodnie w temp. 20 °C.
2. Na początku okresu przechowywania wszystkie próby polędwic z dodatkiem szczepu *Lactobacillus casei* LOCK 0900 charakteryzowały się znacząco wyższą jakością sensoryczną w porównaniu z próbami kontrolnymi. Po 180 dniach przechowywania chłodniczego jakość ogólna wszystkich wariantów badanych polędwic surowo dojrzewających określona została jako niska.
3. Zadowalający model wzrostu i przeżywalności bakterii kwasu mlekowego podczas przechowywania chłodniczego skonstruowano w przypadku polędwicy poddanej dojrzewaniu w temp. 24 °C (dopasowanie na poziomie C24 = 98 %, P24 = 96 %).

Literatura

- [1] Aggelis G., Samelis J., Metaxopoulos J.: A novel modeling approach for predicting microbial growth in a raw cured product stored at 3°C and at 12°C in air. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **43**, 39-52.

- [2] American Public Health Association 4th Edition. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods, Chapter 19, Acid-Producing Microorganisms, § 19.522 Acidified MRS Agar, 2004.
- [3] Arihara K., Itoh M.: UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **56**, 227-230.
- [4] Baj J.: Kipiące życiem. W: Życie bakterii. Red. J. Baj i Z. Markiewicz. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001, ss. 245-265.
- [5] Bello J., Sanchez-Fuertes M.A.: Application of mathematical model to describe the behavior of the *Lactobacillus* spp. during the ripening of a Spanish dry fermented sausage (Chorizo). *Food Microbiol.*, 1995, **27**, 215-227.
- [6] Cayré M.E., Vignolo G., Garro O.: Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiol.*, 2003, **20**, 561-566.
- [7] Cukrowska B., Motyl I., Kozakova H., Schwarzer M., Górecki R.K., Klewicka E., Śliżewska K., Libudzisz Z.: Probiotic *Lactobacillus* strains: *in vitro* and *in vivo* studies. *Folia Microbiol.*, 2009, **54**, 533-537.
- [8] Dalgaard P., Koutsoumanis K.: Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *J. Microbiol. Methods*, 2001, **43**, 183-196.
- [9] Devlieghre F., van Belle B., Debevere J.: Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **46**, 57-70.
- [10] Doulgeraki A.I., Ercolini D., Villani F., Nychas G.J.: Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, **157**, 130-141.
- [11] Fadda S., López C., Vignolo G.: Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Sci.*, 2010, **86**, 66-79.
- [12] Gajewska J., Błaszczuk M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Microbiol.*, 2012, Dostępna w Internecie: <http://www.pm.microbiology.pl>.
- [13] Goździecki T.: Wymagania pokarmowe i dynamika wzrostu drobnoustrojów. W: Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym. Red. Z. Żakowska, H. Stobińska. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź 2000, ss. 132.
- [14] Jaworska D., Neffe K., Kołożyn-Krajewska D.: Survival during storage and sensory effect of potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* Bauer and *Lactobacillus casei* Bif3[®]/IV in dry fermented pork loins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **46**, 2491-2497.
- [15] Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J.: Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 2012, **47** (12), 1761-1772.
- [16] Lou W., Nakai S.: Artificial neural Network-based predictive model for bacterial growth in a simulated medium of modified-atmosphere-packed cooked meat products. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**(4), 1799-1804.
- [17] Lorenzo J.M., Fontán M.C.G., Cachaldora A., Franco I., Carballo J.: Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives. *Food Microbiol.*, 2010, **27**, 229-235.
- [18] Neffe-Skocińska K., Gierjekiewicz M., Kołożyn-Krajewska D.: Optymalizacja warunków procesu fermentacji polędwic surowo dojrzewających z dodatkiem bakterii probiotycznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **6** (79), 36-46.
- [19] PN-ISO 6658:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Wytyczne ogólne.
- [20] PN-ISO 11035:1999. Analiza sensoryczna. Identyfikacja i wybór deskryptorów do ustalania profilu sensorycznego z użyciem metod wielowymiarowych.
- [21] PN-ISO 2917:2001. Mięso i przetwory mięsne. Pomiar pH. Metoda odwoławcza.

- [22] Standard NF ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the numeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 °C.
- [23] Sakhare P.Z., Narasimha R.: Microbial profiles during lactic acid fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. *Food Control*, 2003, **14**, 1-5.
- [24] Toldra F., Reig M.: Innovations for healthier processed meats. *Trends Food Sci. Technol.*, 2011, **22**, 517-522.
- [25] Trzaskowska M., Kołożyn-Krajewska D., Goryl A.: Prognozowanie wzrostu i przeżywalności bakterii probiotycznych w fermentowanym soku marchwiowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **6 (55)**, 138-148.
- [26] Wittmann Ch., Krömer J.O., Kiefer P., Binz T., Heinzle E.: Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Analytical Biochem.*, 2004, **327**, 135-139.
- [27] Wouters J.A., Rombouts F.M., Kuipers O.P., de Vos W.M., Abee T.: The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, **23**, 165-173.
- [28] Wójciak K.M., Dolatowski Z.J., Kołożyn-Krajewska D., Trzaskowska M.: The effect of the *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain on the quality of dry-fermented sausage during chilling storage. *J. Food Quality*, 2012, **35**, 353-365.
- [29] Zdolec N., Hadziosmanovic M., Kozacinski L., Cvrtila Z., Filipovic I., Skrivanko M., Leskovic K.: Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Sci.*, 2008, **80**, 480-487.
- [30] Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D., Goryl A.: Modele przeżywalności bakterii potencjalnie probiotycznych *Lactobacillus casei* KN291 w fermentowanym napoju sojowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **5 (60)**, 126-134.

EFFECT OF *LACTOBACILLUS CASEI* LOCK 0900 PROBIOTIC STRAIN ADDITION AND RIPENING CONDITIONS ON QUALITY OF DRY FERMENTED PORK LOINS DURING STORAGE

Summary

The objective of the research study was to assess the effect of ripening conditions on the survival of *Lb. casei* LOCK 0900 probiotic strain in pork loins and on their sensory quality during 180 days of chilling storage under anaerobic conditions. Also, it was attempted to construct mathematical models of growth and survival of the bacteria studied.

The experimental material comprised *Lb. casei* LOCK 0900 probiotic strain and pork loins ripened at varying temperatures (16, 20, and 24 °C) and, next, vacuum packaged and stored at 4 °C for 180 days. Control samples with the addition of glucose and experimental samples with the addition of a probiotic strain and glucose were prepared. The scope of research included microbiological analyses, pH measurement, and sensory evaluation (QDA). The determinations were performed every 30 days.

It was found that the best storage stability, both in terms of microbiological and sensory quality, was obtained in the case of loins with probiotic bacteria added, which were produced at 20 °C temperature of ripening (7.00 – 8.00 log jtk/g on average; overall sensory quality > 7 c.u.). A satisfactory model of growth and survival of LAB was constructed for the loins, which ripened at 24 °C (matching at a level of C24 = 98 %, P24 = 96 %).

Key words: ripened loins, probiotics, storage, predictive models 