STRESZCZENIE

Jakość i bezpieczeństwo zdrowotne konserw wieprzowych z dodatkiem wierzbówki kiprzycy (*E. angustifolium* L.)

W oparciu o dokonany przegląd literaturowy oraz dotychczasowy stan wiedzy, wysunięto następującą hipotezę badawczą: Zastosowanie liofilizowanego ekstraktu z wierzbówki kiprzycy w trakcie produkcji wieprzowej konserwy sterylizowanej pozwala na zredukowanie ilości azotanu(III) sodu (E 250) do 50 mg/kg.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie potencjału liofilizowanego ekstraktu wodnego z wierzbówki kiprzycy (*Epilobium angustifolium* L.) jako zamiennika azotanu(III) sodu oraz ocena możliwości jego zastosowania w produkcji wieprzowej konserwy sterylizowanej.

Weryfikacji tak sformułowanych założeń badawczych dokonano poprzez wykonanie następujących celów badawczych: (**I**) oceny bezpieczeństwa zdrowotnego sterylizowanej konserwy mięsnej z obniżonym dodatkiem azotanu(III) sodu, (**II**) omówienia potencjału ekstraktów roślinnych jako zamienników chemicznych substancji konserwujących, (**III**) zbadaniu wpływu dodatku liofilizowanego ekstraktu wodnego z wierzbówki kiprzycy na bezpieczeństwo zdrowotne konserwy sterylizowanej w trakcie przechowywania oraz (**IV**) poprzez ocenę potencjału prozdrowotnego wyrobu w oparciu o biologicznie aktywne peptydy - badania *in silico* i *in vitro*.

Podejście przedstawione w załączonych publikacjach dotyczy możliwości ograniczenia stosowania dodatku E 250 – azotanu(III) sodu – w sterylizowanym wyrobie mięsnym. Założono, że zupełna eliminacja w/w dodatku, który spełnia szereg dość istotnych funkcji w wyrobach mięsnych, może nie być w pełni wykonalna. Założono jednak, że suplementacja materiałem roślinnym może przyczynić się do zredukowania ilości $NaNO_2$ wprowadzanego do surowca mięsnego w czasie produkcji, co zostało zweryfikowane w trakcie badań *in vitro*.

Praca (**I**) dotyczyła redukcji dodatku azotanu(III) sodu o połowę w stosunku do obowiązujących przepisów prawnych (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego I Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r.) oraz jego eliminacji z produktu. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić o ile redukcja dodatku azotynu do 50 mg/kg pozwoliło na uzyskanie stabilnej i zbliżonej barwy do wyrobu kontrolnego, nie uzyskano satysfakcjonujących wyników związanych z potencjałem antyoksydacyjnym. Biorąc pod uwagę szeroki zakres działania azotanu(III) sodu stwierdzono, że przy zmniejszeniu jego

dodatku wyrób mięsny powinien być dodatkowo suplementowany. Niniejsze badanie posłużyło do opracowania następnej pracy (**II**) i zrealizowania kolejnego celu badawczego.

Charakterystykę dotyczącą wykorzystania surowców roślinnych w różnych grupach wyrobów mięsnych przedstawiono w artykule (**II**) pt. „Reduction of nitrite in meat products through the application of various plant-based ingredients". W niniejszej pracy zebrano dane dotyczące wpływu ekstraktów oraz proszków pochodzących z różnych rodzajów roślin na barwę, właściwości antyoksydacyjne, bezpieczeństwo mikrobiologiczne oraz cechy sensoryczne wyrobów mięsnych (zarówno tych poddanych obróbce termicznej jak i nie). W niniejszej pracy przedstawiono również źródła azotanów i azotynów w diecie człowieka, konsekwencje zdrowotne związane z ich spożyciem oraz poruszono temat obecnej sytuacji prawnej związanej z możliwością stosowania azotanu(III) sodu w produktach mięsnych. Opracowanie przyczyniło się do wyboru wierzbówki kiprzycy jako zamiennika azotanu(III) sodu i przeprowadzenia dalszych badań *in vitro* oraz *in silico* (**III** i **IV**).

Badania (**III**) dotyczyły sprawdzenia wpływu dodatku różnych ilości wodnego, liofilizowanego ekstraktu z wierzbówki kiprzycy (*E. angustifolium* L.) na fizykochemiczne, mikrobiologiczne oraz sensoryczne właściwości konserwy wieprzowej podczas 6 miesięcy przechowywania (4 °C). W niniejszej pracy zostały również wykonane badania dotyczące charakterystyki samego ekstraktu – pozwoliły one na ocenę składu chemicznego, potencjału antyoksydacyjnego oraz właściwości antymikrobiologicznych. Doświadczenie wykazało dość wysoką zdolność inhibicji wolnych rodników (szczególnie DPPH, mniejsza skuteczność została zaobserwowana wobec rodników $ABTS^{\cdot+}$); dominującym komponentem ekstraktu okazała się być oenoteina B. Ekstrakt okazał się być szczególnie skuteczny wobec bakterii Gram dodatnich; co ciekawe, odnotowano również brak jego wpływu na bakterie kwasu mlekowego. Dodatek ekstraktu do wyrobu mięsnego przyczynił się do zwiększenia potencjału antyoksydacyjnego ($ABTS^{\cdot+}$, DPPH, TBARS) konserw, który okazał się być zależny od ilości zaaplikowanego liofilizatu. W tym kontekście zauważono również, że dodatek ekstraktu w ilościach 150 mg/kg oraz 1000 mg/kg pozwolił na uzyskanie bardziej satysfakcjonujących wyników w porównaniu do innych prób, w szczególności do próby kontrolnej, zawierającej dodatek azotanu(III) sodu w ilości 100 mg/kg (zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008). Jednakże, odnotowano niższą stabilność antyoksydacyjną w przypadku konserwy z dodatkiem wierzbówki kiprzycy w najwyższej ilości. Dodatek 1000 mg/kg liofilizatu przełożył się również na negatywne noty w czasie oceny sensorycznej. Produkt został zaakceptowany przez panel testujący jednakże pojawiły się uwagi co do obecności nietypowego, niezidentyfikowanego posmaku.

Wobec powyższego, konserwy – zarówno próby z dodatkiem ekstraktu z wierzbówki kiprzycy jak i wyrób kontrolny – zostały poddane badaniom związanym z określeniem ich aktywności peptydów bioaktywnych *in vitro* oraz *in silico* (**IV**). Badania zostały przeprowadzona bezpośrednio po produkcji (dzień zero) oraz po sześciu miesiącach chłodniczego (4° C) przechowywania tj. po 180 dniach.

Liczba sekwencji zidentyfikowanych peptydów okazała się być największa dla próby kontrolnej, jednakże dla prób liofilizowanych ekstraktem z wierzbówki, odnotowano wzrost liczb sekwencji w czasie przechowywanie; najwyższy okazał się być dla prób zawierających ekstrakt w ilościach 100 mg/kg oraz 1000 mg/kg (wzrost, kolejno, o 233 oraz 211 sekwencji). Spadek został odnotowany dla próby zawierającej najniższą dawkę ekstraktu - wskazuje to na stabilizację protein przez obecność większych ilości liofilizatu. Podczas przechowywania, prawdopodobnie w czasie dość intensywnych przemian białek, doszło do zmian profilu podobnych sekwencji wśród pięciu wariantów konserw – w efekcie, po sześciu miesiącach przechowywania, otrzymano 99 sekwencji peptydów, wśród których zidentyfikowano 74 fragmenty. Fragmenty te cechowały się 24 różnymi biologicznie aktywnymi właściwościami, wśród których dominującą była zdolność do inhibicji enzymu konwertującego angiotensynę (ACE-I), zdolność do hamowania peptydazy dipeptydylowej IV (DPP_IV) a także właściwości antyoksydacyjne, które zostały potwierdzone poprzez wykonane stosownych badań ($ABTS^+$, FRAP, chelatowanie jonów żelaza(II)). Sprawdzono również zdolność wchłaniania z jelita grubego za pomocą Caco-2, które okazało się dość znaczne.

Niniejsze badania wskazują na pozytywny wpływ ekstraktów roślinnych na stabilizację oraz profil peptydów bioaktywnych.

1. Nie jest możliwa całkowita eliminacja azotanu(III) sodu z receptury konserwy wieprzowej sterylizowanej bez wpływu na pogorszenie jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego produktu.
2. Możliwa jest redukcja dodatku azotanu(III) sodu do 50 mg/kg w recepturze konserwy wieprzowej sterylizowanej bez wpływu na pogorszenie jakości mikrobiologicznej (nieobecne bakterie patogenne *C. botulinum, L. monocytogenes, Salmonella*) i sensorycznej produktu oraz niektórych właściwości fizykochemicznych (barwa, tekstura, aktywność wody).
3. Zastosowanie w recepturze konserwy wieprzowej sterylizowanej dodatku azotanu(III) sodu w ilości 50 mg/kg spowodowało istotne obniżenie aktywności antyoksydacyjnej oraz wzrost zawartości wtórnych produktów utleniania lipidów.

4. Zastosowanie w recepturze konserwy wieprzowej sterylizowanej dodatku azotanu(III) sodu w ilości 50 mg/kg z jednoczesną suplementacją ekstraktem wierzbówki kiprzycy (100-1000 mg/kg) spowodowało istotny wzrost aktywności antyoksydacyjnej oraz obniżenie zawartości wtórnych produktów utleniania lipidów.
5. Dodatek ekstraktu z wierzbówki kiprzycy (*E. angustifolium* L.) w ilości 150 i 1000 mg/kg w połączeniu ze zmniejszonym do 50 mg/kg dodatkiem azotanu(III) sodu wpływa na obniżenie zawartości N-nitrozoamin i amin biogennych w produkcie.
6. Dodatek ekstraktu z wierzbówki kiprzycy (*E. angustifolium* L.) w ilości 100 i 150 mg/kg w połączeniu ze zmniejszonym do 50 mg/kg dodatkiem azotanu(III) sodu nie wpłynął negatywnie na wyróżniki sensoryczne oceniane zarówno po produkcji jak i po 180 dniowym przechowywaniu.
7. Dodatek ekstraktu z wierzbówki kiprzycy (*E. angustifolium* L.) w ilości 150 i 1000 mg/kg w połączeniu ze zmniejszonym do 50 mg/kg dodatkiem azotanu(III) sodu zwiększał potencjał antyoksydacyjny peptydów w konserwie po 180 dniach przechowywania.
8. Konserwa mięsna suplementowana ekstraktem ziołowym może być uznana za potencjalne źródło peptydów bioaktywnych.
9. W konserwie wieprzowej sterylizowanej rekomenduje się stosowanie liofilizowanego ekstraktu z wierzbówki kiprzycy (*E. angustifolium* L.) w ilości 150 mg/kg w celu uzyskania cech jakościowych najbardziej zbliżonych do produktu z dodatkiem 100 mg/kg azotanu(III) sodu.

Odniesienia do publikacji

I. **Karolina Ferysiuk**, Karolina M. Wójciak (2020) The Possibility of Reduction of Synthetic Preservative E 250 in Canned Pork. Foods, (9) 1869, 1–20.

II. **Karolina Ferysiuk**, Karolina M. Wójciak (2020) Reduction of Nitrite in Meat Products Through the Application of Various Plant-Based Ingredients. Antioxidants, (9), 1–28.

III. **Karolina Ferysiuk**, Karolina M. Wójciak, Monika Trząskowska (2022) fortification of low-nitrite canned pork with willow herb (*Epilobium angustifolium* L.).

IV. **Karolina Ferysiuk**, Paulina Kęska, Karolina M. Wójciak (2022). Effect of willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) extract addition to canned meat with reduced amount of nitrite on the antioxidant and other activities of peptides. Food & Function.

SUMMARY

Safety of meat product
with addition of willow herb (*E. angustifolium* L.) extract

Conclusions

Based on the review of the literature and the current state of knowledge, the following research hypothesis was put forward: The use of freeze-dried willow herb extract during the production of sterilized pork allows to reduce the amount of sodium nitrate (E 250) to 50 mg/kg.

The aim of this dissertation was to determine the potential use of the lyophilized water extract of willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) as a substitute for sodium nitrate and to assess the possibility of its use in the production of sterilized pork.

The research assumptions formulated in this way were verified by performing the following research objectives: (I) assessing the health safety of sterilized canned meat with a reduced addition of sodium nitrate, (II) discussing the potential of plant extracts as chemical substitutes for preservatives, (III) examining the effect of a lyophilized additive water extract from kiprzyca willow for the health safety of canned food sterilized during storage and (IV) by assessing the health-promoting potential of the product based on biologically active peptides - *in silico* and *in vitro* tests.

The approach presented in the accompanying publications concerns the possibility of limiting the use of the additive E 250 – sodium nitrate – in a sterilized meat product. It was assumed that the complete elimination of the abovementioned additive, which fulfills a number of quite important functions in meat products, it may not be fully feasible. However, it was assumed that supplementation with plant material may contribute to reducing the amount of $NaNO_2$ introduced into the raw meat during production, which was verified during in vitro tests.

Paper (I) concerned the reduction of sodium nitrate addition by half in relation to the applicable legal provisions (Regulation of the European Parliament and of the Council (EC) No. 1333/2008 of December 16, 2008) and its elimination from the product. The conducted research made it possible to state if the reduction of the nitrite addition to 50 mg/kg allowed to obtain a stable and similar color to the control product, the satisfactory results related to the antioxidant potential were not obtained. Taking into account the wide range of action of sodium nitrate, it was found that with the reduction of its addition, the meat product should be

additionally supplemented. This study was used to develop the next work (II) and to achieve another research goal.

The characteristics of the use of plant raw materials in various groups of meat products are presented in the article (II) entitled "Reduction of nitrite in meat products through the application of various plant-based ingredients". In this study, data on the effect of extracts and powders from various types of plants on the color, antioxidant properties, microbiological safety and sensory properties of meat products (both heat-treated and not) were collected.
This paper also presents the sources of nitrates and nitrites in the human diet, health consequences related to their consumption, and discusses the current legal situation related to the possibility of using sodium nitrate in meat products. The study contributed to the selection of willow herb as a substitute for sodium nitrate and further *in vitro* and *in silico* (III and IV) studies.

The research (III) concerned the verification of the effect of the addition of various amounts of water-based, freeze-dried extract of willow herb (*E. angustifolium* L.) on the physicochemical, microbiological and sensory properties of the canned pork during 6 months of storage (4 °C). In this work, studies were also carried out on the characteristics of the extract itself – they allowed for the assessment of the chemical composition, antioxidant potential and antimicrobial properties. The experiment showed quite high ability to inhibit free radicals (especially DPPH, lower effectiveness was observed against $ABTS^{\cdot+}$ radicals); the dominant component of the extract turned out to be oenotein B. The extract turned out to be particularly effective against gram-positive bacteria; Interestingly, its lack of effect on lactic acid bacteria was also noted. The addition of the extract to the meat product contributed to the increase of the antioxidation potential ($ABTS^{\cdot+}$, DPPH, TBARS) of canned food, which turned out to be dependent on the amount of lyophilizate applied. In this context, it was also noticed that the addition of the extract in the amount of 150 mg/kg and 1000 mg/kg allowed to obtain more satisfactory results compared to other trials, in particular to the control sample containing the addition of sodium nitrate in the amount of 100 mg/kg (in accordance with the Regulation of the European Parliament and of the Council (EC) No. 1333/2008). However, lower antioxidant stability was noted in the case of canned food with the highest amount of willow herb. The addition of 1000 mg/kg of lyophilizate also resulted in negative scores during the sensory evaluation. The product was accepted by the testing panel, however, there were comments about the presence of an unusual, unidentified aftertaste.

In view of the above, the canned food – both the samples with the addition of kiprzyca willow extract and the control product – were subjected to tests related to the determination of

their activity of bioactive peptides in vitro and in silico (IV). The tests were carried out immediately after production (day zero) and after six months of refrigerated (4 °C) storage, i.e. after 180 days.

The number of sequences of the identified peptides turned out to be the highest for the control sample, however, for the samples freeze-dried with the willow herb extract, there was an increase in sequence numbers over the time of storage; the highest was found for samples containing the extract in amounts of 100 mg/kg and 1000 mg/kg (increase, successively, by 233 and 211 sequences). A decrease was noted for the sample containing the lowest dose of the extract - this indicates that the proteins were stabilized by the presence of larger amounts of lyophilizate. During storage, probably during quite intensive protein transformations, there were changes in the profile of similar sequences among the five canned variants - as a result, after six months of storage, 99 peptide sequences were obtained, among which 74 fragments were identified. These fragments were characterized by 24 different biologically active properties, the dominant among which was the ability to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE-I), the ability to inhibit dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and antioxidant properties, which were confirmed by appropriate tests ($ABTS^{\cdot+}$, FRAP, iron (II) ion chelation). The absorption capacity from the colon with Caco-2 was also tested and it turned out to be quite significant.

These studies show the positive effect of plant extracts on the stabilization and profile of bioactive peptides.

1. It is not possible to completely eliminate sodium nitrite from the recipe for sterilized canned pork without affecting the quality and health safety of the product itself.
2. It is possible to reduce the addition of sodium nitrite to 50 mg per kg in the recipe of canned pork without affecting the deterioration of the microbiological quality (absence of pathogenic bacteria *C. botulinum, L. monocytogenes, Salmonella*) and the sensory quality of the product and some physicochemical properties (e.g. color, texture, water activity).
3. Application of sodium nitrite in amount of 50 mg/kg in canned pork resulted in a significant decrease of antioxidant activity and an increase in the content of secondary lipid oxidation products.
4. The use of sterilized pork in the recipe of the addition of sodium nitrite in the amount of 50 mg/kg with simultaneous supplementation with willow herb extract (100-1000

mg/kg) resulted in a significant increase in antioxidant activity and a reduction in the content of secondary lipid oxidation products.

5. The addition of willow herb (*E. angustifolium* L.) extract in the amount of 150 and 1000 mg/kg in combination with the reduced addition of sodium nitrite (50 mg/kg) allow to reduce the content of N-nitrosamines and biogenic amines in the product.
6. The addition of willow herb (*E. angustifolium* L.) extract in the amount of 100 and 150 mg/kg in combination with the sodium nitrite in amount of 50 mg/kg did not adversely affect the sensory characteristics assessed both after production and after 180 days of storage.
7. The addition of willow herb (*E. angustifolium* L.) extract in the amount of 150 and 1000 mg/kg with addition of sodium nitrite (in amount of 50 mg/kg) allow to increase the antioxidant potential of peptides in product after 180 days of storage.
8. Canned meat supplemented with herbal extract may be considered as a potential source of bioactive peptides.
9. In sterilized pork, it is recommended to use freeze-dried willow herb (*E. angustifolium* L.) extract in the amount of 150 mg/kg in order to obtain the qualitative characteristics similar to the product with only sodium nitrite addition in amount of 100 mg/kg.

Reference to publication

I. **Karolina Ferysiuk**, Karolina M. Wójciak (2020) The Possibility of Reduction of Synthetic Preservative E 250 in Canned Pork. Foods, (9) 1869, 1–20.

II. **Karolina Ferysiuk**, Karolina M. Wójciak (2020) Reduction of Nitrite in Meat Products Through the Application of Various Plant-Based Ingredients. Antioxidants, (9), 1–28.

III. **Karolina Ferysiuk**, Karolina M. Wójciak, Monika Trząskowska (2022) fortification of low-nitrite canned pork with willow herb (*Epilobium angustifolium* L.).

IV. **Karolina Ferysiuk**, Paulina Kęska, Karolina M. Wójciak (2022). Effect of willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) extract addition to canned meat with reduced amount of nitrite on the antioxidant and other activities of peptides. Food & Function.