

## **WPLYW CHLORKU WAPNIA NA PROCES DOJRZEWANIA ODGLÓWIONEGO I PATROSZONEGO ŚLEDZIA BAŁTYCKIEGO SOLONEGO METODĄ ZALEWOWĄ\***

Edward Kołakowski, Bożena Bednarczyk, Katarzyna Mordziak,  
Agnieszka Woźniak

Akademia Rolnicza w Szczecinie

**Streszczenie.** Zbadano katalizujący wpływ chlorku wapnia na proces dojrzewania solonego śledzia bałtyckiego. Tusze śledzia, świeże lub mrożone/rozmrożone, zalewano 12-procentowym roztworem NaCl zawierającym 0, 0,1, 0,5 lub 1,0%, chlorku wapnia, stosując proporcję surowca do roztworu 1:1 (wagowo). Próby inkubowano przez 18 dni w temperaturze  $7\pm 1^\circ\text{C}$  i pobierano do badań po 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15 i 18 dobach dojrzewania. Oznaczano pH, zawartość wody i produkty hydrolizy białka (PHB), rozpuszczalne w 6-procentowym roztworze NaCl i w 5-procentowym kwasie trichlorooctowym (TCA), metodą biuretową i zmodyfikowaną metodą Lowry'ego, a także pożądalność sensoryczną mięsa. Stwierdzono, że dodatek chlorku wapnia do zalewy najbardziej intensyfikuje powstawanie PHB rozpuszczalnych w 6-procentowym roztworze NaCl, strącalnych w 5-procentowym TCA, w mniejszym zaś stopniu peptydów rozpuszczalnych w 5-procentowym roztworze TCA, natomiast prawie nie intensyfikuje powstawania tyrozyny. Działa także konserwująco na solonego śledzia, przedłużając szczególnie okres indukcyjny, przed fazą intensywnego wzrostu trimetylaminy. Chlorek wapnia poprawiał teksturę mięsa solonego śledzia bardziej efektywnie w wypadku surowca świeżego niż mrożonego/rozmrożonego. Efektywność ta zależała jednak wyraźnie od stężenia chlorku wapnia i czasu dojrzewania. Najlepszą teksturę wykazywały ryby dojrzewające w zalewie zawierającej 0,1% chlorku wapnia. Praktyczne stosowanie chlorku wapnia jako katalizatora procesu dojrzewania ryb solonych może być ograniczone ze względu na jego wyczuwalność sensoryczną w gotowym produkcie. Dlatego maksymalne stężenie chlorku wapnia w zalewie nie powinno przekraczać 0,5%.

**Słowa kluczowe:** solony śledź bałtycki, proces dojrzewania, chlorek wapnia, produkty hydrolizy białka, pożądalność sensoryczna

---

\* Pracę wykonano w ramach grantu KBN nr 5 PO6G 015 18

## WSTĘP

W pracy Kołakowskiego i in. [1998] wykazano, że w procesie dojrzewania odgłowionego i patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego metodą zalewową, uczestniczą, obok katepsyn, także  $\text{Ca}^{2+}$  – zależne proteiny cysteinowe, zwane kalpainami (EC. 3.4.22.17). Ponieważ kalpainsy występują głównie w dyskach Z białek miofibrylarnych [Koochmarai 1994], przypisuje się im główną rolę w poubojowym dojrzewaniu mięsa zwierząt rzeźnych [Ouali 1990, Uytterhaegen i in. 1994, Hopkins i Thompson 2001] i kształtowaniu tekstury mięsa ryb [Jiang 2000]. Chlorek wapnia, jako aktywator proteolizy w mięsie zwierząt rzeźnych, jest wprowadzany przeważnie podczas nastrzykiwania [Wheeler i in. 1993, Lansdell i in. 1995, Lawrence i in. 2003] lub marynowania [Pérez i in. 1998, Gonzales i in. 2001]. Prac dotyczących zastosowania chlorku wapnia do wspomagania procesu dojrzewania ryb solonych nie spotkano w piśmiennictwie, chociaż intensyfikujący wpływ chlorku wapnia na autolizę mięsa ryb świeżych jest udokumentowany [Jiang i in. 1995].

Celem niniejszej pracy było porównanie procesu dojrzewania patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego metodą zalewową, w 12-procentowym roztworze soli kuchennej z różną zawartością chlorku wapnia podczas przechowywania w temperaturze 7°C.

## MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na śledziu bałtyckim (*Clupea harengus* L.), odbywającym tarło w okresie wiosennym (IV-V), odłowionym w listopadzie 1999 roku na łowisku w okolicach Kołobrzegu. Ryby po dostarczeniu do laboratorium wykazywały oznaki ustępującego stężenia pośmiertnego. Średnia zawartość tłuszczu i wody w mięsie śledzia wynosiła odpowiednio:  $6,93 \pm 0,19\%$  i  $75,01 \pm 0,05\%$ .

Po odgłowieniu i wypatroszeniu ryb oraz usunięciu nerki, otrzymane tusze podzielono na dwie partie, z których jedną pobrano bezpośrednio do solenia, a drugą zapakowano w woreczki z folii PA/PE (po 1125 g), zamrożono w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$  i składowano przez 7 tygodni w temperaturze  $-19 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Jako zalewę stosowano 12-procentowy roztwór NaCl z dodatkiem 0,1, 0,5 i 1,0% bezwodnego  $\text{CaCl}_2$  (producent: Intern. Enzymes Ltd., England) o czystości p.a. Próbę kontrolną stanowił 12-procentowy roztwór NaCl bez dodatku chlorku wapnia. Stosunek wagowy ryby do solanki wynosił 1:1 (w każdym opakowaniu 1125 g tusz i 1125 g solanki).

Próby do badań (po 2 słoje) pobierano po 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15 i 18 dniach solenia w temperaturze  $7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Ryby wraz z solanką przenoszono na saszki z dederonu (materiał zawierający poliamid) umieszczone w dużych lejkach nad cylindrami miarowymi o pojemności 1000  $\text{cm}^3$  i pozostawiano do całkowitego oddzielenia części płynnych od stałych (ok. 15 min. w temp. 7°C). Tuszki odkórzano, filetowano, a otrzymane filety rozdrabniano w maszynce do mielenia mięsa typu EM-1 („Mesco” – Skarżysko Kamienna) o średnicy oczek sitka 3 mm i po wymieszaniu pobierano natychmiast do analiz.

W rozdrobnionym mięsie solonego śledzia bałtyckiego oznaczano:

– pH, metodą potencjometryczną z użyciem pH-metru N5 170E (TELEKO, Polska),

– wodę, metodą suszenia próbki o masie ok. 5 g przez ok. 6 h w temperaturze 105°C, w suszarce uniwersalnej SML 32/250 („Zelmet”, Polska),

– tłuszcz, metodą pakiecikową [Znaniński i in. 1963], w aparacie Soxhleta, stosując jako rozpuszczalnik eter naftowy,

– azot ogólny, metodą Kjeldahla w aparacie Kjeltec System 1026 („Tekator”, Szwecja); masa pobranej próbki do spalania wynosiła 0,5 g dla mięsa i 10 ml dla solanki; próbki umieszczano w kolbach szklanych z dodatkiem mieszaniny selenowej, zalewano stężonym kwasem siarkowym (10 ml) i spalano w piecu Digestion System 6 1007 Diga-ster („Tekator”) w temperaturze 400°C,

– lotne zasady, metodą mikrodyfuzji w naczynkach Conwaya [Conway 1947], oznaczając oddzielnie ogólną ilość lotnych zasad (LZ) i ilość trimetylaminy (TMA) w odbiałczonych ekstraktach, po uprzednim związaniu amoniaku aldehydem mrówkowym,

– produkty hydrolizy białka (PHB), metodą Gornala i in. [1949] oraz zmodyfikowaną metodą Lowry’ego, z podziałem na „peptydy” i „tyrozynę” [Kołąkowski i in. 2000, Kołąkowski 2001], w:

- *solankowym ekstrakcie mięsa* uzyskanym poprzez homogenizację 20 g rozdrobnionego mięsa solonego z 200 ml 6-procentowego roztworu NaCl, w szklanym słoiku o pojemności 450 ml; homogenizację przeprowadzono 2 razy po 15 s z przerwą 5 min, w robocie laboratoryjnym typu MPW-302 (Mechanika Precyzyjna, Warszawa) nastawionym na 75% wartości maksymalnych obrotów (ok. 9700 obr/min), następnie homogenat poddawano odwirowaniu przez 10 min w 4000 obr/min,

- *odbiałczonym ekstrakcie mięsa* uzyskanym poprzez homogenizację 50 g rozdrobnionego mięsa solonego z 200 ml 5-procentowego TCA, postępując podobnie jak przy solankowym ekstrakcie mięsa; tak otrzymany homogenat sączono przez sączek ilościowy średni do suchej kolby.

Prowadzono również organoleptyczną ocenę produktu, którą wykonywał 7-osobowy zespół, wyspecjalizowany w ocenie produktów rybnych.

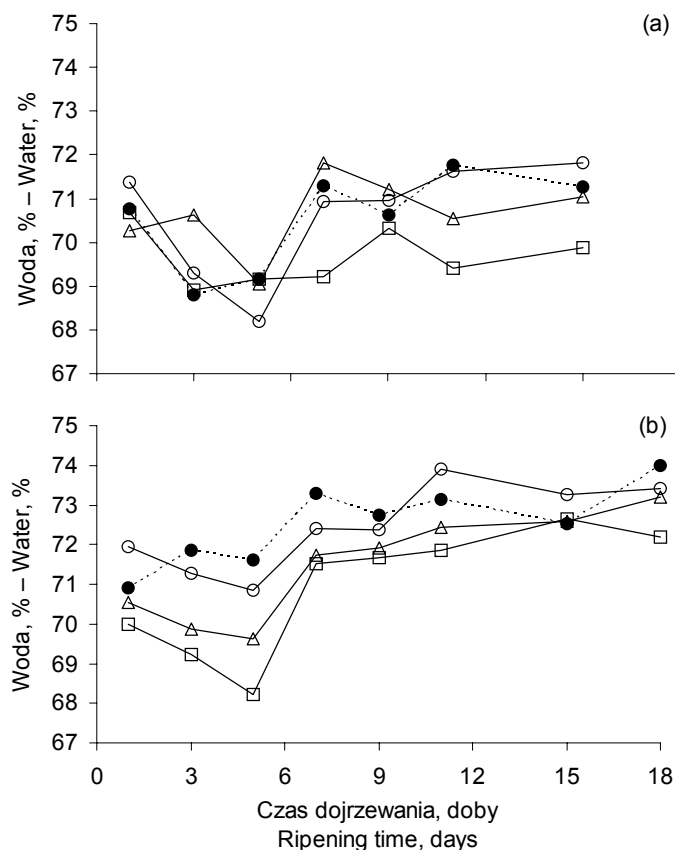
## WYNIKI

### Zawartość wody

W śledziach solonych w 12-procentowym roztworze chlorku sodu z dodatkiem chlorku wapnia zawartość wody w mięsie była przeważnie niższa niż w solonych w samym roztworze chlorku sodu. Było to szczególnie widoczne w mięsie ryb poddanych mrożeniu przed soleniem (rys. 1). Utrata wody zachodziła najszybciej podczas pierwszych 5 dni solenia i była tym większa im wyższe było stężenia chlorku wapnia w zalewie. Jednak w stężeniu 0,1-procentowym chlorku wapnia różnice pomiędzy próbą właściwą a kontrolną były w większości oznaczeń niewielkie.

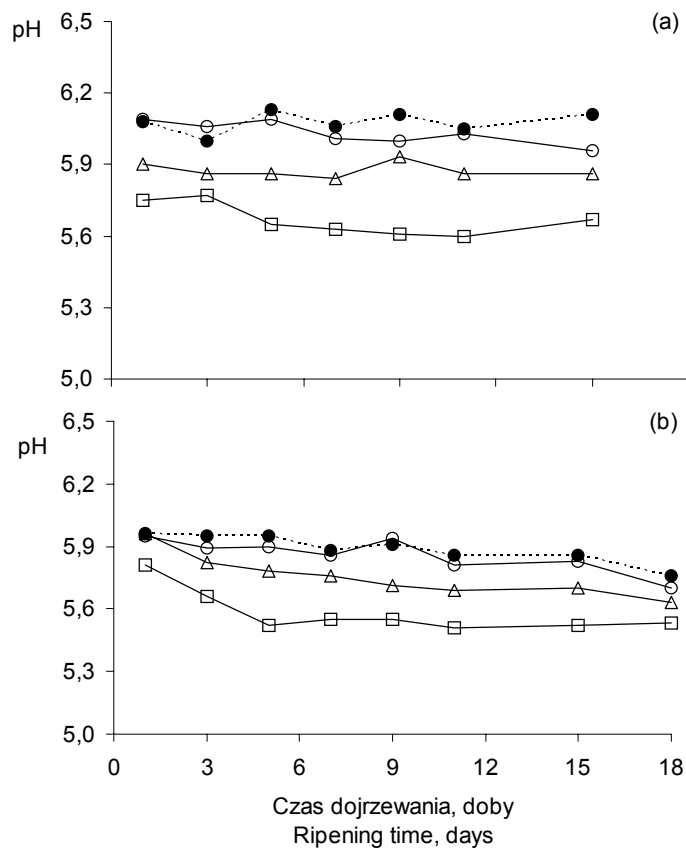
### Zmiany pH

Średnia wartość pH mięsa, w całym okresie dojrzewania w 12-procentowym roztworze soli bez dodatku chlorku wapnia, wynosiła w świeżych śledziach solonych 6,08,



Rys. 1. Zmiany zawartości wody w mięsie patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym (a) lub po uprzednim mrożeniu (b) w 12-procentowym roztworze NaCl bez- (-●-) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (—○—), 0,5% (—△—), 1,0% (—□—)  
 Fig. 1. Changes of water content in headed and gutted Baltic herring, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (-●-) or with 0.1% (—○—), 0.5% (—△—), and 1.0% (—□—) addition of calcium chloride

a w mrożonych/rozmrzniętych śledziach solonych 5,89. Dodatek chlorku wapnia do zalewy powodował obniżenie pH mięsa ryb solonych w stosunku do próby kontrolnej. W stężeniu 0,1, 0,5 i 1,0-procentowym CaCl<sub>2</sub> obniżyło się ono średnio w świeżych rybach solonych do pH odpowiednio: 6,03, 5,87 i 5,67, a w mrożonych/rozmrzniętych rybach solonych do pH odpowiednio: 5,86, 5,76 i 5,58 (rys. 2). Może to świadczyć o katalizowaniu przez chlorek wapnia reakcji odpowiedzialnych za neutralizację kationowych grup białek mięśniowych podczas solenia, np. poprzez sieciujące działanie transglutaminazy [Kołakowski i Sikorski 2001]. Z przebiegu krzywych wynika, że w śledziu solonym po uprzednim zamrożeniu i rozmrożeniu reakcje te zachodziły najszybciej w początkowym okresie solenia (do 5 dni), zaś w śledziu solonym w stanie świeżym – w dalszym okresie solenia (6-12 dni) (rys. 2).

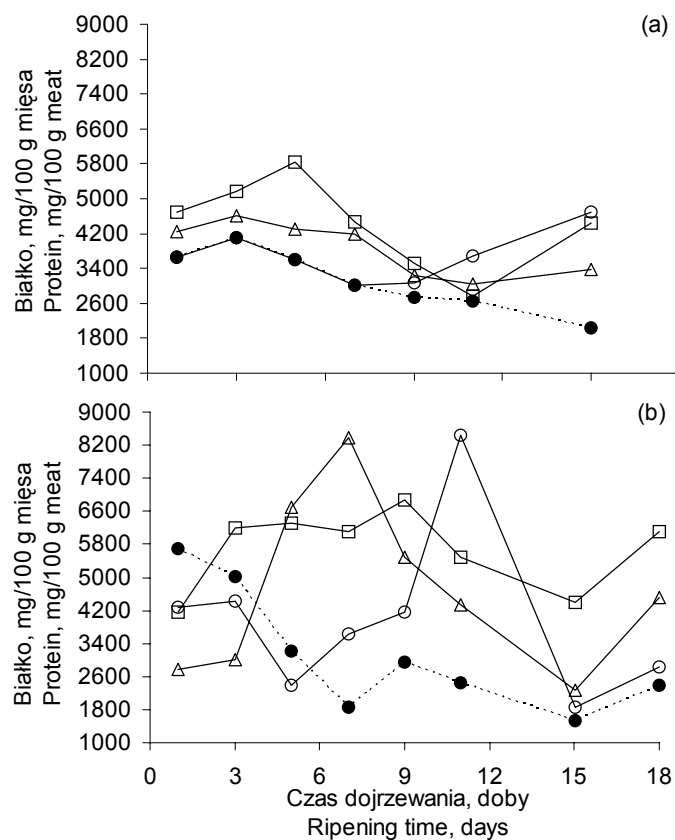


Rys. 2. Zmiany pH mięsa patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym (a) lub po uprzednim mrożeniu (b) w 12-procentowym roztworze NaCl bez- (-●-) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (—○—), 0,5% (—△—), 1,0% (—□—)

Fig. 2. Changes in pH of gutted Baltic herring meat, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (-●-) or with 0.1% (—○—), 0.5% (—△—), and 1.0% (—□—) addition of calcium chloride

### Intensywność proteolizy

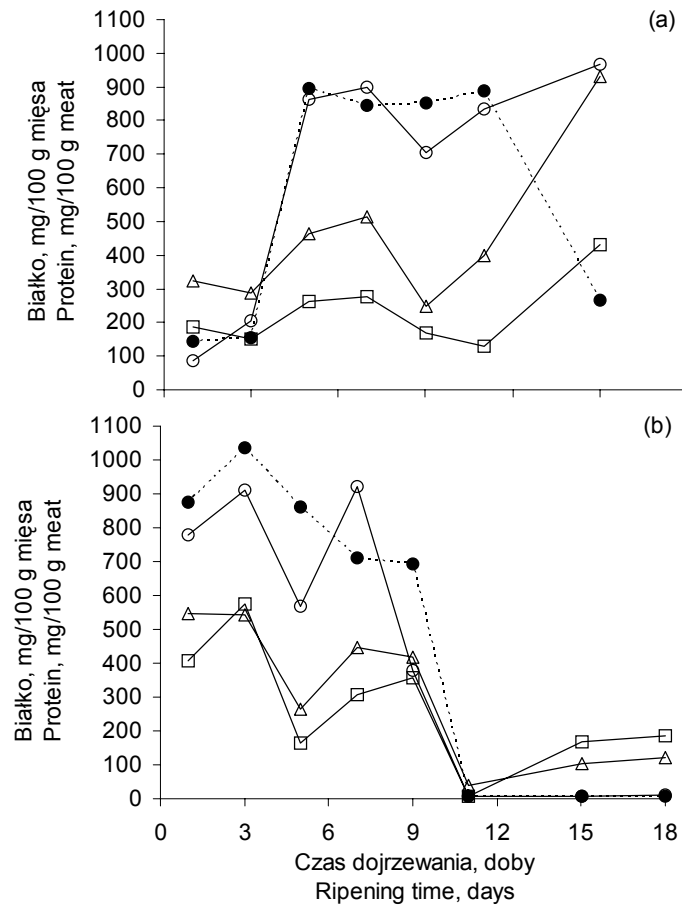
Dodatek chlorku wapnia do zalewy najbardziej intensyfikował powstawanie w mięsie PHB rozpuszczalnych w 6-procentowym roztworze NaCl (rys. 3), w mniejszym zaś stopniu powstawanie peptydów rozpuszczalnych w 5-procentowym roztworze TCA (rys. 4 i 5), natomiast prawie wcale nie intensyfikował powstawania „tyrozyny” (rys. 6) w stosunku do próby kontrolnej. Dynamika tych zmian była jednak nieco inna w rybach solonych w stanie świeżym i solonych po zamrożeniu i rozmrożeniu. W tych ostatnich, początek fazy intensywnego zwiększania się ilości PHB rozpuszczalnych w 6-procentowym roztworze NaCl („białko”) był fazowo opóźniony, zgodnie z malejącym stężeniem chlorku wapnia w zalewie (1,0 > 0,5 > 0,1%) i przypadają odpowiednio po 1, 3 i 5



Rys. 3. Zmiany zawartości białka, oznaczonego metodą biuretową, w solankowym ekstrakcie mięsa patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym (a) lub po uprzednim mrożeniu (b) w 12-procentowym roztworze NaCl bez- (-●-) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (—○—), 0,5% (—△—), 1,0% (—□—)

Fig. 3. Changes in biuret method-assayed protein content in brine extract of gutted Baltic herring meat, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (-●-) or with 0.1% (—○—), 0.5% (—△—), and 1.0% (—□—) addition of calcium chloride

dniach solenia (rys. 3 b). Maksimum zawartości „białka” w próbach z dodatkiem 0,5% i 0,1% CaCl<sub>2</sub> przypadają po odpowiednio 7 i 11 dobach dojrzewania. Natomiast w próbie z dodatkiem 1% CaCl<sub>2</sub> zarówno intensywność zwiększania się ilości białek, jak również ich ilość były mniejsze niż w próbach z niższymi stężeniami chlorku wapnia (rys. 3 b). W rybach solonych w stanie świeżym, przyrost ilości białka rozpoczynał się bez fazowego opóźnienia, był jednak mniej intensywny i występował tylko w próbach z dodatkiem 1 i 0,5% chlorku wapnia, podczas gdy próba z dodatkiem 0,1% chlorku wapnia wykazywała w pierwszym tygodniu dojrzewania podobny przyrost białka jak próba kontrolna (rys. 3 a). Różnice pomiędzy próbą kontrolną a próbą z dodatkiem 0,1% CaCl<sub>2</sub> pojawiły się dopiero w drugim tygodniu dojrzewania. Także osiągnięta ilość

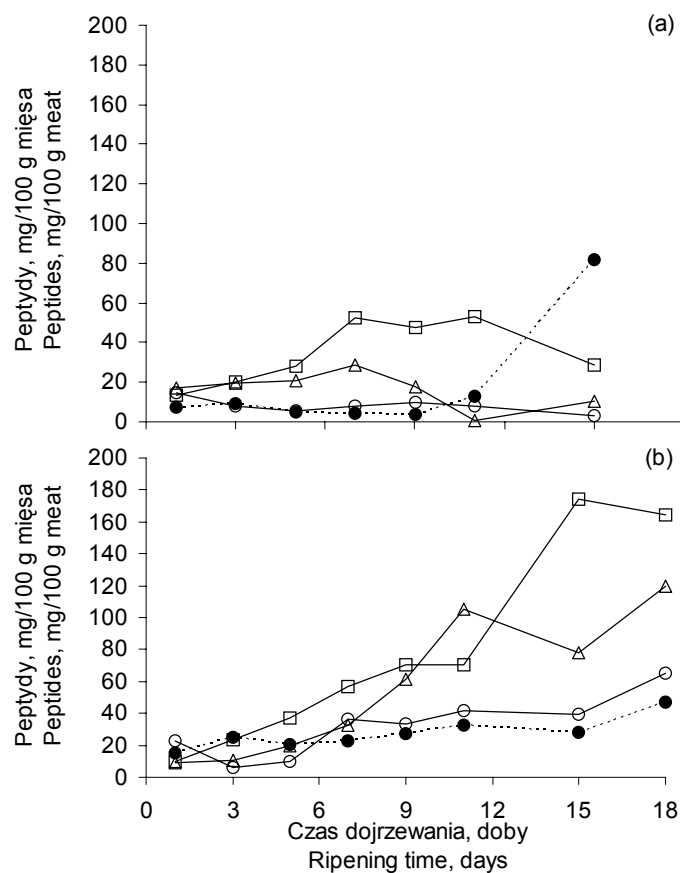


Rys. 4. Zmiany zawartości białka, oznaczonego metodą biuretową, w odbiałczonym ekstrakcie solankowym mięsa patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym (a) lub po uprzednim mrożeniu (b) w 12-procentowym roztworze NaCl bez- (-●- -) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (—○—), 0,5% (—△—), 1,0% (—□—)

Fig. 4. Changes in biuret method-assayed protein content in deproteinated brine extract of gutted Baltic herring meat, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (-●- -) or with 0.1% (—○—), 0.5% (—△—), and 1.0% (—□—) addition of calcium chloride

białka w fazie największego wzrostu była w śledziach solonych w stanie świeżym znacznie mniejsza niż w śledziach solonych po zamrożeniu i rozmrożeniu.

W przeciwieństwie do TCA-strącalnych PHB, ilość rozpuszczalnych w 5-procentowym TCA produktów hydrolizy białka, dających dodatnią reakcję z odczynnikiem biuretowym, nie zwiększała się pod wpływem chlorku wapnia. Wręcz przeciwnie – ich ilość w próbach z dodatkiem 1,0 i 0,5% chlorku wapnia była wyraźnie mniejsza niż w próbie kontrolnej (rys. 4), zaś w próbie z dodatkiem 0,1% chlorku wapnia była zbliżona do próby kontrolnej (rys. 4).

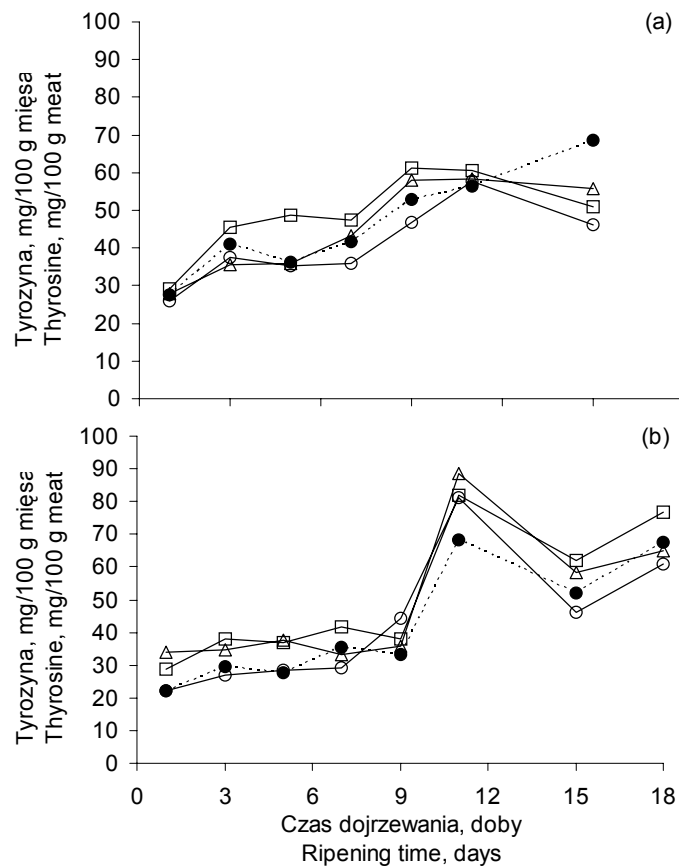


Rys. 5. Zmiany zawartości peptydów, oznaczonych zmodyfikowaną metodą Lowry'ego, w odbiałczonym ekstrakcie solankowym mięsa patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym (a) lub po uprzednim mrożeniu (b) w 12-procentowym roztworze NaCl bez- (-●-) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (—○—), 0,5% (—△—), 1,0% (—□—)

Fig. 5. Changes in modified Lowry method-assayed peptide content in deproteinated brine extract of gutted Baltic herring meat, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (-●-) or with 0.1% (—○—), 0.5% (—△—), and 1.0% (—□—) addition of calcium chloride

Jednak ilość peptydów, oznaczonych zmodyfikowaną metodą Lowry'ego w odbiałczonym ekstrakcie solankowym mięsa, zwiększała się podczas solenia bardziej intensywnie w próbach z chlorkiem wapnia niż w próbie kontrolnej. Szczególnie dotyczyło to drugiej połowy okresu dojrzewania. Intensywność wzrostu w próbach właściwych była w przybliżeniu proporcjonalna do stężenia chlorku wapnia w zalewie (rys. 5).





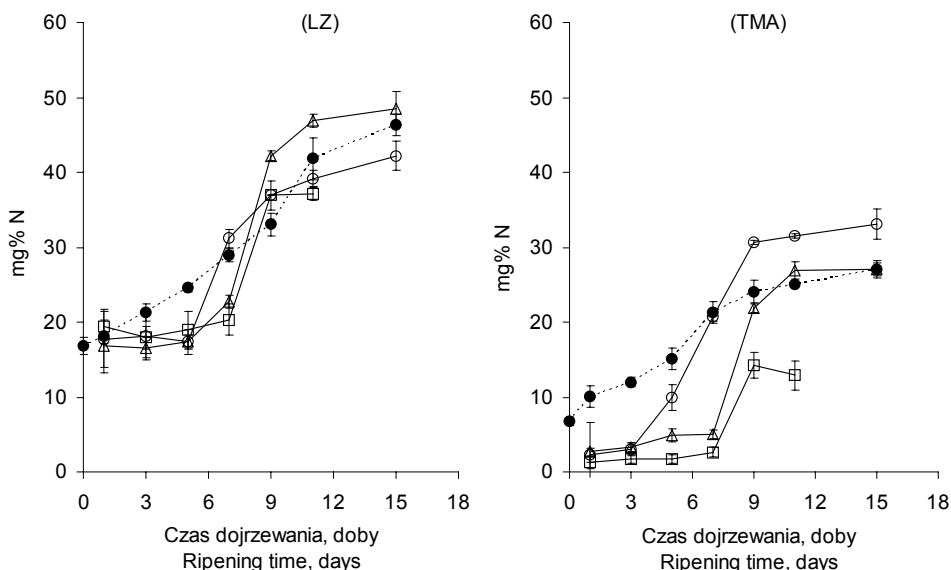
Rys. 6. Zmiany zawartości tyrozyny, oznaczonej zmodyfikowaną metodą Lowry'ego, w odbiałczonym ekstrakcie solankowym mięsa patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym (a) lub po uprzednim mrożeniu (b) w 12-procentowym roztworze NaCl bez- (-●-) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (—○—), 0,5% (—△—), 1,0% (—□—)

Fig. 6. Changes in modified Lowry method-assayed tyrosine content in deproteinated brine extract of gutted Baltic herring meat, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (-●-) or with 0.1% (—○—), 0.5% (—△—), and 1.0% (—□—) addition of calcium chloride

Ilość PHB, oznaczanych pod nazwą „tyrozyna”, zwiększała się w próbach z dodatkiem chlorku wapnia podobnie jak w próbie kontrolnej, chociaż tendencja większej ich zawartości w próbach właściwych była zauważalna przynajmniej w kilku kolejnych oznaczeniach, szczególnie przy wyższym stężeniu CaCl<sub>2</sub> (rys. 6).

### Ilość lotnych zasad

Lotne zasady oznaczano tylko w próbach z surowca świeżego. Przebieg zmian dotyczących lotnych zasad wskazuje na konserwujące działanie chlorku wapnia szczególnie w początkowym okresie dojrzewania. Przedłużenie okresu indukcyjnego w stosunku do próby kontrolnej było proporcjonalne do stężenia chlorku wapnia w zalewie (rys. 7).



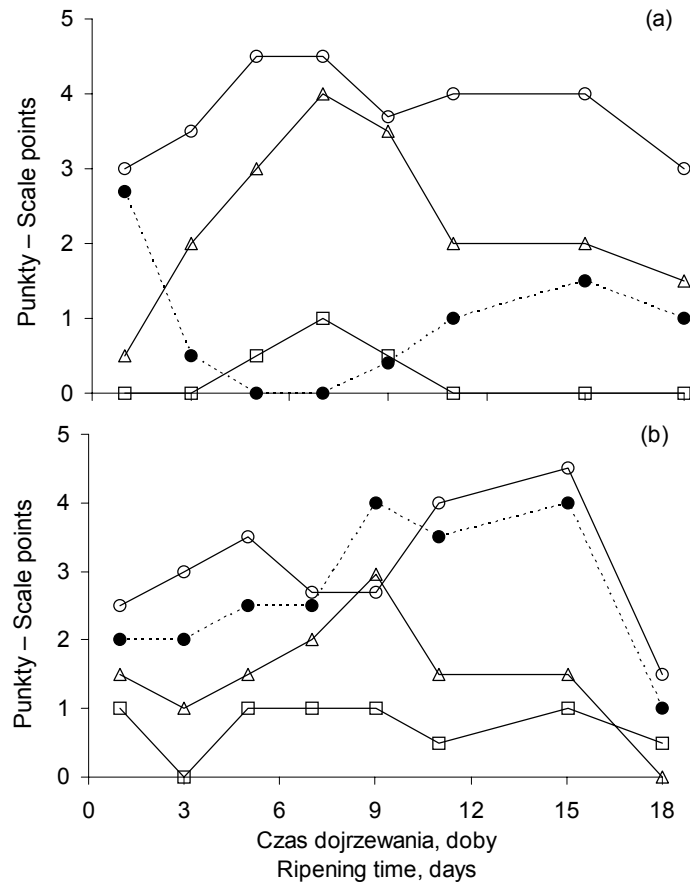
Rys. 7. Całkowita zawartość lotnych zasad (LZ), w tym trimetyloaminy (TMA), w mięsie patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym w 12-procentowym roztworze NaCl bez (- -●- -) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (-○-), 0,5% (-△-), 1,0% (-□-)

Fig. 7. Total content of VAB (including TMA), in gutted Baltic herring meat, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (- -●- -) or with 0.1% (-○-), 0.5% (-△-), and 1.0% (-□-) addition of calcium chloride

### Pożądalność sensoryczna produktu

Śledzie solone w 12-procentowym roztworze NaCl, bez dodatku chlorku wapnia, dojrzewały do średniego poziomu pożądalności sensorycznej (powyżej 3 pkt.) tylko wtedy, gdy surowiec pobrany do solenia był uprzednio mrożony i rozmrożony. Natomiast śledź solony w stanie świeżym nie osiągał dostatecznej pożądalności sensorycznej nawet po długim okresie solenia, chociaż niewielka poprawa tekstury mięsa w okresie pomiędzy 10 a 15 dniem dojrzewania była zauważalna (rys. 8).

Chlorek wapnia, jako dodatek poprawiający teksturę mięsa solonego śledzia, był bardziej efektywny w wypadku ryb świeżych niż ryb mrożonych/rozmrożonych. Efektywność ta zależała jednak wyraźnie od stężenia chlorku wapnia i czasu dojrzewania półproduktu. Najlepszą teksturę wykazywały ryby dojrzewające w zalewie z dodatkiem 0,1% chlorku wapnia. Pożądalność sensoryczna po pierwszym tygodniu dojrzewania osiągała powyżej 4 pkt u ryb solonych w stanie świeżym i 3-3,5 pkt u ryb solonych



Rys. 8. Pożądalność półproduktu otrzymanego z patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w stanie świeżym (a) lub po uprzednim mrożeniu (b) w 12-procentowym roztworze NaCl bez- (-●- -) lub z dodatkiem chlorku wapnia: 0,1% (—○—), 0,5% (—△—), 1,0% (—□—)  
 Fig. 8. Desirability of half-product manufactured from gutted Baltic herring, ripened fresh (a) or after freezing/thawing (b) in 12% NaCl solution, pure (-●- -) or with 0.1% (—○—), 0.5% (—△—), and 1.0% (—□—) addition of calcium chloride

w stanie mrożonym. Natomiast po 2 tygodniach dojrzewania pożądalność sensoryczna wyrównała się dla obydwu rodzajów surowca i wynosiła ok. 4 pkt. W dalszym okresie składowania ryb (powyżej 2 tygodni) obserwowano szybkie pogorszenie pożądalności sensorycznej we wszystkich próbach, szczególnie zaś w śledziach solonych po mrożeniu i rozmrożeniu. Wzrost pożądalności sensorycznej śledzi inkubowanych w roztworze zawierającym 0,5% chlorku wapnia zachodził o ok. 2 dni wolniej niż w 0,1-procentowym roztworze chlorku wapnia. Maksymalny poziom pożądalności sensorycznej półproduktu w próbie z dodatkiem 0,5% chlorku wapnia przypadał po ok. 1 tygodniu dojrzewania i osiągnął średnio 3,5 pkt w śledziach solonych w stanie świeżym i ok. 3 pkt

w stanie rozmrożonym. W dalszym okresie dojrzewania (powyżej 1 tygodnia) obserwowano szybki spadek pożądalności sensorycznej (rys. 8), głównie z powodu wzrostu twardości mięsa i wyczuwalności chemicznego posmaku.

Próby z najwyższym stężeniem chlorku wapnia (1%) zostały ocenione najniżej pod względem pożądalności sensorycznej półproduktu, głównie z powodu zbyt twardej tekstury mięsa i silnej wyczuwalności chemicznego posmaku.

Z danych tych wynika, że dla uzyskania właściwej pożądalności półproduktu z ogłowionych i patroszonych śledzi bałtyckich, solonych metodą zalewową w 12-procentowym roztworze NaCl, stężenie chlorku wapnia w roztworze nie powinno przekraczać 0,5% i wynosić co najmniej 0,1%.

## DYSKUSJA

Szybsze oddawanie wody z mrożonego/rozmrożonego śledzia niż ze świeżego, do zalewy podczas solenia w 12-procentowym roztworze NaCl z dodatkiem chlorku wapnia, wiąże się prawdopodobnie z zamrażalniczą denaturacją białek miofibrylarnych. Może ona ułatwiać zarówno bezpośrednie sieciowanie białek miofibrylarnych pod wpływem jonów wapnia [Saeki i in. 1992], jak również sprzyjać sieciowaniu białek pod wpływem  $\text{Ca}^{2+}$ -zależnej transglutaminazy [Kołakowski i Sikorski 2001]. W poprzednich badaniach wykazano, że nadmiernemu nasileniu tych reakcji zawsze towarzyszy bardzo wyraźne zjawisko synerezy białek [Kołakowski i Pasich 2003].

Częściowe opóźnienie fazy intensywnego wzrostu PHB strącalnych w 5-procentowym TCA w mięsie mrożonych/rozmrożonych śledzi, w stosunku do solonych w stanie świeżym, należy prawdopodobnie tłumaczyć łatwiejszym wypłukiwaniem kalpain z mięsa ryb mrożonych/rozmrożonych, podczas zalewowego solenia. Jednak dynamika wzrostu PHB strącalnych w 5-procentowym TCA pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jest w rybach solonych po uprzednim mrożeniu znacznie większa niż w rybach świeżych, szczególnie jeżeli za wskaźnik porównawczy przyjmujemy poziom ilości białka w fazie maksimum (o ok. 95% więcej). Świadczy to o tym, że mrożenie sprzyja aktywności kalpain, prawdopodobnie poprzez zwiększenie podatności białek miofibrylarnych na ich aktywność lub poprzez inaktywację inhibitorów kalpain, jakimi są głównie kalpastatyny [Jiang 2000].

Przebieg zmian badanych frakcji azotowych wyraźnie świadczy o etapowości procesów proteolitycznych w czasie dojrzewania solonego śledzia bałtyckiego. W pierwszym etapie procesu dojrzewania powstają PHB o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej, strącalne w 5-procentowym TCA, podczas gdy w drugim etapie dominują związki o małej masie cząsteczkowej, rozpuszczalne w 5-procentowym TCA.

Etapowość proteolizy można tłumaczyć synergia kalpain z proteazami lizosomalnymi. PHB o większej masie cząsteczkowej, rozpuszczalne w 6-procentowym roztworze NaCl, lecz strącalne w 5-procentowym TCA, są generowane głównie przez aktywność kalpain, podczas gdy PHB rozpuszczalne w 5-procentowym TCA są bardziej typowe dla aktywności lizosomalnych proteinaz, głównie pod wpływem katepsyny B, która, obok degradacji ciężkiego łańcucha miozyny, jest zdolna do hydrolizy dużych peptydów do oligopeptydów, głównie tri- i dipeptydów [Jiang 2000]. Kalpainsy są prawdopodobnie dostarczycielami substratów dla lizosomalnych proteinaz cysteinowych.

Szczególnie wyraźnie jest to widoczne w próbach zawierających 0,1% chlorku wapnia w zalewie.

Intensyfikujący wpływ chlorku wapnia na powstawanie także TCA rozpuszczalnych peptydów, oznaczanych zmodyfikowaną metodą Lowry'ego, szczególnie w drugim i trzecim etapie dojrzewania (rys. 5), należy przypisać raczej spadkowi pH pod wpływem chlorku wapnia i wzmożonej aktywności katepsyn, niż aktywności kalpain. W najwyższym stężeniu chlorku wapnia pH mięsa solonego śledzia obniżyło się po 5 dobach dojrzewania do 5,5-5,6 (rys. 2). Spadek pH mięsa był zbliżony z rosnącym stężeniem chlorku wapnia i bardziej głęboki w śledziu solonym po uprzednim mrożeniu/rozrożeniu, niż solonym w stanie świeżym. Odpowiednio do spadku pH kształtowało się zwiększenie ilości peptydów (rys. 5). Udział katepsyn, obok kalpain, w procesie dojrzewania odgłowionego i patroszonego śledzia bałtyckiego potwierdzają również wyniki badań dotyczące dojrzewania tusz śledzia w roztworze soli kuchennej z dodatkiem kwasu octowego [Kołakowski i Bednarczyk 1998, Kołakowski i in. 1998].

Wysokie stężenie chlorku wapnia, w dłuższym czasie dojrzewania, wpływało negatywnie na pożądalność sensoryczną produktu i hamującą na proteolizę. Może to wiązać się z częściową inaktywacją enzymów lub denaturacją białek miofibrilarnych przez chlorek wapnia w wysokim jego stężeniu [Saeki i in. 1989]. Zjawisko to, przynajmniej w odniesieniu do hamowania proteolizy, było wyraźnie zauważalne w próbach z 1-procentowym dodatkiem  $\text{CaCl}_2$ . Dlatego można przyjąć, że maksymalne stężenie chlorku wapnia w 12-procentowym roztworze NaCl, podczas zalewowego solenia odgłowionego i patroszonego śledzia bałtyckiego, nie powinno przekraczać 0,5%, a optymalne stężenie powinno wynosić powyżej 0,1%. Dalsze uściślenie tych danych będzie przedmiotem następnej pracy.

## WNIOSKI

1. Obecność chlorku wapnia w zalewie przyspiesza proces dyfuzji wody z mięsa do solanki podczas początkowego okresu solenia (do ok. 5 dni), przy czym w rybach solonych po zamrożeniu i rozmrożeniu zmiany te wiążą się z większą utratą wody w mięsie (w stosunku do próby kontrolnej) niż w rybach pobranych do solenia w stanie świeżym.

2. Dodatek chlorku wapnia do zalewy powoduje, proporcjonalny do jego stężenia, spadek pH mięsa solonego śledzia w stosunku do próby kontrolnej. W tuszach uprzednio mrożonych, szybkość i głębokość spadku pH mięsa są większe niż w tuszach solonych w stanie świeżym.

3. Dodatek chlorku wapnia do zalewy najbardziej intensyfikuje powstawanie PHB rozpuszczalnych w 6-procentowym roztworze NaCl, strącalnych w 5-procentowym TCA, w mniejszym zaś stopniu peptydów rozpuszczalnych w 5-procentowym roztworze TCA, natomiast prawie nie intensyfikuje powstawania tyrozyny.

4. W procesie dojrzewania patroszonego śledzia bałtyckiego, solonego w 12-procentowym roztworze NaCl z dodatkiem chlorku wapnia, występują co najmniej dwa etapy proteolizy. W pierwszym etapie, trwającym do ok. 5 dni w świeżych śledziach solonych i do ok. 9 dni w mrożonych śledziach solonych, generowane są głównie PHB o dużej masie cząsteczkowej, strącalne w 5-procentowym TCA, natomiast w drugim etapie, trwającym odpowiednio 6-12 dni i 9-15 dni, generowane są głównie PHB o małej masie cząsteczkowej, rozpuszczalne w 5-procentowym TCA.

5. Chlorek wapnia działa konserwująco na solonego śledzia, przedłużając szczególnie okres indukcyjny przed fazą intensywnego wzrostu trimetylaminy w produkcji.

6. Praktyczne stosowanie chlorku wapnia jako katalizatora procesu dojrzewania ryb solonych może być ograniczone ze względu na jego wyczuwalność sensoryczną w gotowym produkcie. Dlatego maksymalne stężenie chlorku wapnia w zalewie nie powinno przekraczać 0,5%, podczas gdy niezbędne minimalne stężenie wynosi co najmniej 0,1%.

## PIŚMIENNICTWO

- Conway E.J., 1947. Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. Crosby Lockwood London.
- Gonzales C.B., Salitto V.A., Carduza F.J., Pazos A.A., Lasta J.A., 2001. Effect of calcium chloride marination on bovine Cutaneus trunci muscle. *Meat Sci.* 57, 251-256.
- Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Hopkins D.L., Thompson J.M., 2001. Inhibition of protease activity. Part 1. The effect on tenderness and indicators of proteolysis in ovine muscle. *Meat Sci.* 59, 175-185.
- Jiang S.-T., 2000. Enzymes and their effects on seafood texture. W: *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker. Inc. New York, 411-450.
- Jiang S.-T., Wang J.-H., Chen C.-S., Su J.-C., 1995. Substrate and calcium effects on the autolysis of tilapia muscle m-calpain. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(1), 119-120.
- Kołakowski E., 2001. Protein determination and analysis in food systems. W: *Chemical & Functional Properties of Food Proteins*. Red. Z.E. Sikorski. Technomic Publ. Co., Inc., Lancaster, Basel, 57-112.
- Kołakowski E., Bednarczyk B., 1998. Wpływ dodatku kwasu octowego na zmiany produktów hydrolizy białka w mięsie solonego śledzia bałtyckiego. W: XXIX Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN „Procesy technologiczne a jakość żywności”, Olsztyn 21-23 września 1998, 213-214.
- Kołakowski E., Bednarczyk B., Nowak B., 2000. Oznaczanie produktów hydrolizy białka zmodyfikowaną metodą Lowry'ego. W: Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN „Żywność w dobie ekspansji naukowej: potencjał, oczekiwania, perspektywy”. Poznań 14-15 września 2000, 125.
- Kołakowski E., Bednarczyk B., Tokarczyk G., 1998. Wpływ inhibitorów i katalizatorów enzymatycznych na dynamikę proteolizy w mięsie solonego śledzia bałtyckiego. W: XXIX Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN „Procesy technologiczne a jakość żywności” Olsztyn 21-23 września 1998, 212-213.
- Kołakowski E., Pasich M., 2003. Podatność na zamrażalnicze strukturowanie mechanicznie odkostnionego mięsa z płoci modyfikowanego preparatem transglutaminazy. W: XXXIV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN „Jakość polskiej żywności w przededniu integracji Polski z Unią Europejską” Wrocław 10-11 września 2003, 207.
- Kołakowski E., Sikorski Z.E., 2001. Transglutaminaza i jej wykorzystanie w przemyśle żywnościowym. *Żywn. Nauka Technol. Jakość* 8(2), 5-16.
- Koohmaraie M., 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.* 36, 93-104.
- Lansdell J.L., Miller M.F., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Ramsey C.B., 1995. Postmortem injection of calcium chloride effects on beef quality trails. *J. Anim. Sci.* 73, 1735-1740.
- Lawrence T.E., Dikeman M.E., Hunt M.C., Kastner C.L., Johnson D.E., 2003. Effects of calcium salts on beef longissimus quality. *Meat Sci.* 64, 299-308.
- Ouali A., 1990. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods* 1, 129-165.

- Pérez M.L., Escalona H., Guerrero I., 1998. Effect of calcium chloride marination on calpain and quality characteristics of meat from chicken, horse, cattle and rabbit. *Meat Sci.* 48, 125-134.
- Saeki H., Ozaki H., Nonaka M., Arai K., 1989. Denaturation of Alaska pollack myofibrils induced by  $\text{CaCl}_2$  at high ionic strength. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 55, 173-178.
- Saeki H., Shoji T., Hirata F., Nonaka M., Arai K., 1992. Effect of  $\text{CaCl}_2$  on gel forming ability and cross-linking reaction of myosin heavy chain in salt-ground meta of shipjack tuna, carp, and walleye Pollack. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 58, 2137-2146.
- Uytterhaegen L., Claeys E., Demeyer D., 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *J. Anim. Sci.* 72, 1209-1223.
- Wheeler T.L., Koohmaraie M., Lansdell J.L., Siragusa G.R., Miller M.F., 1993. Effects of post-mortem injection time, injection level and concentration of calcium chloride on beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 71, 2965-2974.
- Znanięcki P., Kołakowski E., Stępień S., 1963. Porównanie kilku metod oznaczania wody i tłuszczu w mięsie wieprzowym (kulinarnym bez kości). *Zesz. Nauk. WSR Olsztyn* 15, 267-280.

### EFFECTS OF CALCIUM CHLORIDE ON RIPENING OF HEADED AND GUTTED BRINE-SALTED BALTIC HERRING

**Abstract.** Catalytic effects of calcium chloride on ripening of salted Baltic herring were studied. Herring carcasses, fresh or frozen/thawed, were covered with 12% NaCl solution with 0, 0.1, 0.5 or 1.0% addition of calcium chloride; the fish brine weight ratio was 1:1. Samples were incubated for 18 days at  $7\pm 1^\circ\text{C}$  and assayed after 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15 and 18 days of ripening. The assays involved determination of pH, water content, and contents of protein hydrolysis products (PHP) soluble in 6% NaCl and in 5% trichloroacetic acid (TCA) (biuret and modified Lowry methods), as well as fish meat sensory desirability. Calcium chloride addition was found to primarily enhance the release of 6% NaCl-soluble, 5% TCA-precipitated PHP; the 5% TCA-soluble TCA release was less enhanced, while almost no tyrosine release enhancement could be detected. Calcium chloride enrichment was also found to act as a salted herring preservative by extending the induction phase, preceding that of intensive trimethylamine increase. Calcium chloride improved salted Baltic herring meat texture, the effect being more pronounced in fresh than in frozen/thawed fish. The best texture was shown by those fish ripened in 0.1% calcium chloride enriched brine. In practice, application of calcium chloride as a ripening catalyst can be limited by its sensory detection in the final product. For this reason, the maximum calcium chloride concentration in brine should not exceed 0.5%.

**Key words:** salted Baltic herring, ripening, calcium chloride, protein hydrolysis products, sensory desirability

*Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 19.04.2004 r.*

**Do cytowania - For citation:** Kołakowski E., Bednarczyk B., Mordziak K., Woźniak A., 2004. Wpływ chlorku wapnia na proces dojrzewania odgłowionego i patroszonego śledzia bałtyckiego solonego metodą zalewową. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 3(1), 123-137.