

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

mgr inż. Olaf Horbańczuk

Wpływ sposobu pakowania i okresu
przechowywania
na wybrane cechy jakości mięsa strusi,
procesy oksydacyjne oraz na potencjał
trawienia *in vitro*

The effect of the packaging method and shelf life on chosen
characteristics, oxidative processes of ostrich meat and on the *in vitro*
digestibility potential

Praca doktorska
Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem:

Promotor I: **dr hab. Jarosław Wyrwisz, prof. SGGW**
Katedra Techniki i Projektowania Żywności
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor II: **dr hab. Artur Jóźwik, prof. PAN**
Instytut Genetyki
i Biotechnologii Zwierząt
Polska Akademia Nauk

Warszawa, 2022

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowania dla moich Promotorów Pracy – Pana dr hab. Jarosława Wyrwisa, prof. SGGW oraz Pana dr hab. Artura Józwicka, prof. IGiBZ PAN za opiekę merytoryczną, zaangażowanie, życzliwość i cenne uwagi.

Pamięci Profesora Jamesa Salesa z Uniwersytetu w Cape Town, wybitnego światowego naukowca, Wielkiego Przyjaciela.

Oświadczenie promotora pracy

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

Data Podpis promotora pracy

Data Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadomy odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

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

Data Podpis autora pracy



Diamantowy
Grant

Praca doktorska została zrealizowana w ramach projektu:

”Wpływ sposobu pakowania i okresu przechowywania na cechy fizykochemiczne, wartość odżywczą i procesy oksydacyjne mięsa strusi z uwzględnieniem trawienia *in vitro*”

nr Projektu DI2017 0038 47

finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki
(dawnie Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego)

w ramach VII edycji Programu Diamantowy Grant

w Katedrze Techniki i Projektowania Żywności

Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka

SGGW w Warszawie

Streszczenie

Wpływ sposobu pakowania i okresu przechowywania na wybrane cechy jakości mięsa strusi, procesy oksydacyjne oraz na potencjał trawienia *in vitro*

Dysertacja doktorska obejmuje 4 publikacje, a jej celem było określenie wpływu sposobu pakowania (*vacuum* i 2 warianty MAP) i okresu przechowywania (do 16 dni) na cechy fizykochemiczne, wartość odżywczą, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, procesy oksydacyjne mięsa strusi oraz na potencjał trawienia *in vitro*. Wykazano, że rodzaj pakowania i czas przechowywania istotnie wpływają na profil kwasów tłuszczowych, głównie WNKT tj. n-3: C18:3, EPA i DHA (najmniejsze zmiany w mięsie pakowanym próżniowo), cechy fizykochemiczne, jakość mikrobiologiczną, poziom oksydacji mięsa strusi, jak i po trawieniu *in vitro*. Istotnie największy wyciek naturalny stwierdzono w mięsie pakowanym w *vacuum*. Najniższą ogólną liczbę drobnoustrojów stwierdzono w *vacuum*, a następnie w MAP1 i MAP2. Poziom aktywności enzymatycznej SOD, GPx i GR w mięsie zmniejszył się głównie po 12 dniu przechowywania w 3 systemach pakowania. Pakowanie mięsa strusi w MAP1 i MAP2 powodowało w surowym i po trawieniu *in vitro* wzrost poziomu MDA, 4HNE, heksanalu i PCC podczas przechowywania, a wartości tych parametrów w *vacuum* były na zbliżonym poziomie.

Słowa kluczowe: mięso strusie, pakowanie, przechowywanie, procesy oksydacyjne, wartość odżywcza, trawienie *in vitro*

Summary

The effect of the packaging method and shelf life on chosen quality characteristics, oxidative processes of ostrich meat and *in vitro* digestibility potential

The doctoral thesis consists of 4 peer-reviewed papers. The aim of the study was to assess the influence of packaging methods (*vacuum* and 2 options of MAP) and storage time (up to 16 days) on the physico-chemical properties, nutritional value, activity of antioxidant enzymes and oxidative processes of ostrich meat and on *in vitro* digestibility potential. Type of packaging system and storage duration, had a significant effect on fatty acid profile PUFA's i.e., n-3: C18:3, EPA, DHA (the lowest changes were noted in *vacuum*), physicochemical characteristics, microbiological quality, oxidation level of ostrich meat and after *in vitro* digestion. The highest drip loss was observed in *vacuum*. The lowest total viable count of bacteria load was identified in *vacuum* followed by MAP1 and MAP2. The SOD, GPx and GR enzymes level activity in meat decreased after 12 days in 3 packaging systems. In raw ostrich meat and after *in vitro* digestion, an increase in level of MDA, 4HNE, hexanal, PCC was caused during storage time in MAP1 and MAP2, whereas the values for these parameters in *vacuum* were maintained at a similar level.

Keywords: ostrich meat, packaging, storage time, oxidative processes, nutritive value, *in vitro* digestion

Spis treści

1.	Wstęp i uzasadnienie podjęcia tematu pracy doktorskiej.....	16
2.	Cel i zakres pracy doktorskiej	19
3.	Hipotezy badawcze	21
4.	Materiał i metodyka	22
4.1.	Materiał badawczy	22
4.2.	Metodyka badawcza.....	23
4.2.1.	Skład podstawowy.....	23
4.2.2.	Analiza kwasów tłuszczowych.....	24
4.2.3.	pH.....	24
4.2.4.	Pomiar składowych barwy L*, a*, b*	24
4.2.5.	Wyciek naturalny	25
4.2.6.	Siła cięcia WBSF	25
4.2.7.	Wyciek cieplny.....	25
4.2.8.	Analiza mikrobiologiczna	25
4.2.9.	Analiza aktywności dysmutazy nadtlenkowej (SOD).....	26
4.2.10.	Analiza aktywności glutationowej peroksydazy (GPx)	26
4.2.11.	Analiza aktywności reduktazy glutationowej (GR)	26
4.2.12.	Potencjał zmiatania wolnego rodnika DPPH	27
4.2.13.	Trawienie <i>in vitro</i>	28
4.2.14.	Oznaczenie poziomu dialdehydu malonowego (MDA).....	28
4.2.15.	Oznaczanie 4-hydrokso-2-nonenalu (4-HNE) i heksanal (HEX) w mięsie przed i po trawieniu <i>in vitro</i>	28
4.2.16.	Oznaczenia poziomu grup karbonylowych	29
4.2.17.	Analiza statystyczna.....	29
5.	Syntetyczne omówienie publikacji.....	30
5.1.	Publikacja I.....	30
5.2.	Publikacja II	35
5.3.	Publikacja III.....	38
5.4.	Publikacja IV.....	41
6.	Stwierdzenia i wnioski	46
7.	Literatura	47
8.	Załączniki:.....	56

Niniejszą pracę stanowi cykl czterech spójnych tematycznie publikacji:

1. **Horbańczuk O.K.***, Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* 24 (22), 4128.
100 pkt MNiE, IF= 4,41
Udział własny: 65%
2. **Horbańczuk O.K.***, Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* 26 (11):3445.
100 pkt MNiE, IF= 4,41
Udział własny: 60%
3. **Horbańczuk O.K.***, Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. *Biomolecules* 11(9):1338.
100 pkt. MNiE, IF= 4,88
Udział własny: 65%
4. **Horbańczuk O.K.***, Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Animal Science Papers and Reports*, 39, 3, 251-259.
100 pkt MNiE, IF= 1,07
Udział własny: 65%

Łączna liczba punktów wg listy MNiE: 400

Łączna wartość współczynnika IF: 14,77

***Autor korespondencyjny**

1. Wstęp i uzasadnienie podjęcia tematu pracy doktorskiej

W ostatnich latach zaobserwowano w świecie wzrost zainteresowania mięsem strusi [Al-Kalifa i Al-Nasre, 2014; Horbańczuk i Wierzbicka, 2016]. Światowy rynek strusiego mięsa zyskuje na popularności wraz z rosnącą świadomością konsumentów, którzy poszukują nowej alternatywy dla tradycyjnego czerwonego mięsa [Cooper i wsp., 1999; Kawka i wsp., 2012; Poławska i wsp., 2014, 2016; Naveena i Kiran, 2014]. W Europie to właśnie Polska jest jednym z liderów w produkcji tego mięsa z eksportem na poziomie ok. 500 ton rocznie, a przychody ze sprzedaży i eksportu tego surowca są obecnie u nas wyższe aniżeli ze sprzedaży jagnięciny.

Wzrost zainteresowania mięsem strusim wiąże się m.in. z faktem, iż jest to produkt odznaczający się wysokimi walorami dietetycznymi i odżywczymi [Sales, 1994, Sales i wsp., 1998; Horbańczuk i Wierzbicka, 2017]. Mięso to charakteryzuje się niską zawartością tłuszczu (poniżej 2 mg/100g) i niższą kalorycznością w porównaniu z wołowiną oraz wysokim udziałem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [Paleari i wsp., 1998; Sales i wsp., 1998; Girolami i wsp., 2003; Zdanowska-Sąsiadek i wsp., 2018], wyższym niż mięso kurcząt brojlerów czy wołowina. Stosunek nasyconych kwasów tłuszczowych do jednonienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) wynosi w mięsie strusi jak 1:1:1, co jest bardzo korzystne z żywieniowego punktu widzenia [Hoffman i wsp., 2005; Antunes i wsp., 2018]. Poziom cholesterolu w mięsie strusim jest niższy w porównaniu z wołowiną oraz mięsem drobiowym [Karklina i Kivite, 2007; Petracci i Cavani, 2012]. Mięso strusi odznacza się wysokim pH (ok. 6), wyższym w porównaniu z wołowiną czy wieprzowiną, ciemnoczerwoną barwą [Sales, 1996, 1998; Sales i Mellet, 1996; Hoffman i wsp., 2007, 2022] i bardzo wysoką zawartością żelaza, szczególnie w porównaniu z mięsem kurcząt brojlerów, a także wołowiną. Dodatkowo jest bogate w selen, witaminy z grupy B, biologiczne czynniki peptydy takie jak anseryna [Majewska i wsp., 2009; Horbańczuk i Wierzbicka, 2016].

Stosunkowo wysokie pH oraz wysoka zawartość składników odżywczych np. WNKT i żelaza wpływają niekorzystnie na mięso podczas przechowywania powodując, że mięso strusie jest podatne na procesy oksydacyjne [Sales i wsp., 1997; Hoffman i wsp., 2007, 2008, 2014; Filgueras i wsp., 2010, 2011a, b, 2014; Leygonie i wsp., 2011a, 2011b, 2020; Jóźwik i wsp., 2013, 2015; Brenesselova i wsp., 2014]. Zmiany oksydacyjne kwasów tłuszczowych prowadzą do przekształcania się wodorotlenków w krótkołańcuchowe aldehydy, ketony oraz inne produkty utleniania lipidów, które są odpowiedzialne za procesy psucia się żywności podczas przechowywania [Rennere i wsp., 1996]. Utlenianie lipidów jest ważnym czynnikiem wpływającym na trwałość mięsa podczas przechowywania [Dal Bosco i wsp., 2018]. Procesy

utleniania mięsa mają związek z degradacją żelaza i uwalnianiem pierścienia porfirynowego, co powoduje przekształcanie się żelaza hemowego w gorzej przyswajalne żelazo niehemowe [Lombardi-Boccia i wsp., 2002; Esteves i wsp., 2005; Ramos i wsp., 2009; Nair i wsp., 2014].

Utlenianie lipidów wzrasta w okresie przetwarzania i przechowywania mięsa powodując przebarwienia, utratę wody, powstawanie nieprzyjemnego aromatu i wady jego tekstury [Richards i wsp., 2002; Thomas i wsp. 2004], wpływając negatywnie na długość terminu przydatności do spożycia mięsa. Intensywna czerwona barwa świeżego mięsa może być czynnikiem zachęcającym do zakupu, lecz ewentualne zmiany wynikające z procesów oksydacyjnych wpływają negatywnie na jego akceptację konsumencką. Po dojrzewaniu mięsa następuje druga faza, w której dochodzi do degradacji białek z nagromadzeniem niskocząsteczkowych związków azotowych oraz nieznacznego wzrostu pH [Koréneková i wsp., 2014]. Utlenienie białek odpowiedzialne jest za wiele zmian biologicznych, w tym fragmentacji i agregacji, obniżenia strawności białek, obniżenia biodostępności aminokwasów [Sante-Lhoutellier i wsp., 2008; Naveena i wsp., 2015; Moczowska i wsp., 2017a, 2017b; Hu i wsp., 2018]. Aktywne formy tlenu atakują boczny łańcuch aminokwasowy, mogą przekształcać go w pochodne związków karbonylowych [Filgueras i wsp., 2012]. Wysokie pH końcowe powoduje ciemną barwę mięsa, wysoką wodochłonność oraz skraca termin przydatności do spożycia mięsa [Botha i wsp., 2006, 2007; Capita i wsp., 2006; Binsi i wsp., 2015]. Produkty utleniania powstające podczas okresu przechowywania, jak również w czasie procesu trawienia mięsa niekorzystnie wpływają na stan zdrowia konsumentów. Można je analizować w oparciu o metodę trawienia mięsa *in vitro*, która symuluje fizjologiczne warunki trawienia *in vivo* i jest przydatna do badań służących określeniu poziomu biodostępności związków odżywczych i absorpcji antyodżywczych [Bornhorst i Singh, 2014; Van Hecke i wsp., 2014, 2015, 2017b, 2019; Lucas-González i wsp., 2018; Nieva-Echevarría i wsp., 2018; Li i wsp., 2020].

Jednym z rozwiązań mających na celu zachowanie wysokiej jakości m.in. wartości odżywczych mięsa strusi może być zastosowanie odpowiedniego rodzaju opakowania, które chroniłoby je przed niekorzystnymi zmianami zachodzącymi podczas przechowywania m.in. pakowanie próżniowe (*vacuum*) oraz z wykorzystaniem modyfikowanej atmosfery gazów (MAP) - [Zakrys-Waliwander i wsp., 2011, 2012; Łopacka i wsp., 2015, 2017; Sakowska i wsp., 2016; Wyrwisz i wsp., 2016]. Pakowanie próżniowe zapewnia warunki beztlenowe wewnątrz opakowania, może powodować wydłużenie okresu przydatności do spożycia i zapewnia stabilną barwę. MAP wydłuża okres trwałości w warunkach pakowania z udziałem tlenu i może wpływać na atrakcyjniejszą jasnoczerwoną barwę dzięki utlenowaniu mioglobiny

[Martinez i wsp., 2005; Veberg i wsp., 2006; Balamatsia i wsp., 2007, Gonzalez-Montalvo i wsp., 2007; Ntzimani i wsp., 2008; Kim i wsp., 2010; Lagerstedt i wsp., 2011; Danijela i wsp., 2013]. Jednak do tej pory badania dotyczące jakości mięsa strusiego, obejmujące rodzaj opakowania, przechowywania i długości okresu przydatności do spożycia są nadal ograniczone. Wciąż mało jest danych w tym zakresie, a problem dotyczący doboru rodzaju opakowania dla tego surowca podczas przechowywania jest szczególnie istotny w odniesieniu do składników bioaktywnych i odżywczych np. kwasów tłuszczowych, szczególnie WNKT, utleniania lipidów i białek czy bezpieczeństwa mikrobiologicznego [Vázquez i wsp., 2004; Hoffman i wsp., 2014, 2022; Horbańczuk i Wierzbicka, 2018; Leygonie i wsp., 2020].

Wydłużenie terminu przydatności do spożycia tego mięsa oraz ochrona składników odżywczych, a także aspekt bezpieczeństwa żywności i przydatność technologiczna mięsa są ważnym elementem dla dalszego rozwoju tej nowej gałęzi przemysłu mięsnego, gdyż w szerszej perspektywie może to przyczynić się m.in. do ograniczania strat podczas produkcji i obrotu tym mięsem. Zapobieganie stratom mięsa poprzez wydłużenie okresu *shelf-life* (okres trwałości wynikający z zastosowania odpowiedniego opakowania) tylko o 1-2 dni daje w USA oszczędności rzędu ca. 1 mld USD rocznie [Łopacka i Lipińska, 2015]. Rynek krajowy posiada produkt wysokiej jakości, który powinien być konkurencyjny z ogólnie dostępnym w Europie mięsem strusi z RPA. Oczekiwany jest wzrost konkurencyjności krajowego sektora strusiego w Europie i w świecie. Wysoka wartość odżywcza i technologiczna mięsa strusi przy założeniu wydłużenia okresu jego przechowywania do spożycia jest ważna także z punktu widzenia zdrowia człowieka. Jest to istotny aspekt przy rosnącym zainteresowaniu mięsem strusi i ma duże znaczenie dla potencjalnych konsumentów. Jednakże aktualna wiedza w tym zakresie jest nadal ograniczona, szczególnie w porównaniu do danych dotyczących wołowiny czy mięsa kurcząt brojlerów. Dlatego podjęcie się badań w tym zakresie ma także duże znaczenie zarówno z punktu widzenia przemysłu, producentów, jak również i konsumentów.

W przedstawionej pracy skoncentrowano się na określeniu wpływu sposobu pakowania i okresu przechowywania na wybrane cechy jakości mięsa strusi, procesy oksydacyjne oraz na potencjał trawienia *in vitro*. Należy podkreślić, że realizowana tematyka badań ściśle wpisuje się w założenia strategicznych i priorytetowych obszarów badawczych Programu Ramowego Unii Europejskiej Horyzont 2020 i Horyzont Europa oraz Krajowego Programu Badań MEiN i Krajowych Inteligentnych Specjalizacji w obszarze Żywność Wysokiej Jakości oraz obecnie w Europejską Strategię Zielonego Ładu, unijną Strategię *Farm 2 Fork* obejmujących jakość życia ludzi z uwzględnieniem aspektów bezpieczeństwa żywności oraz wysokiej jakości żywności mającej korzystne oddziaływanie na zdrowie człowieka.

2. Cel i zakres pracy doktorskiej

Celem pracy było określenie zmian obejmujących cechy fizykochemiczne, wartość odżywczą i procesy oksydacyjne mięsa strusi zależnie od sposobu pakowania (*vacuum* oraz 2 warianty pakowania z modyfikowaną atmosferą (MAP) i okresu przechowywania. Określenie zmian oksydacyjnych lipidów i białek w mięsie strusi prowadzono także w oparciu o metodę trawienia *in vitro*, bowiem procesowi temu towarzyszy również powstawanie związków prowadzących do zmian metabolicznych niekorzystnie wpływających na zdrowie człowieka.

Zakres pracy obejmował następujące etapy:

Etap I. Obejmował określenie zmian składu kwasów tłuszczowych w mięsie strusi w zależności od rodzaju opakowania i okresu przechowywania oraz podstawowy skład tego mięsa.

Publikacja I:

Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules*, 24 (22), 4128. IF = 4,41

Etap II. Dotyczył charakterystyki cech fizycznych i jakości mikrobiologicznej mięsa strusia w zależności od rodzaju opakowania i czasu przechowywania.

Publikacja II:

Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* 26 (11):3445. IF= 4,41

Etap III. Analizowano aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych w mięsie strusia w zależności od rodzaju pakowania i okresu przechowywania.

Publikacja III:

Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. *Biomolecules* 11(9):1338, IF = 4,88

Etap IV. Obejmował ocenę zmian oksydacyjnych lipidów i białek w surowym mięsie strusi, jak i po trawieniu *in vitro* przechowywanym przez 16 dni we wspomnianych 3 wariantach pakowania tj. *vacuum* oraz modyfikowana atmosfera (MAP) w dwóch kombinacjach gazów.

Publikacja IV:

Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Animal Science Papers and Reports* 39, 3, 251-259, IF = 1,07

3. Hipotezy badawcze

- H1. Mięso strusie odznaczające się dużą zawartością składników odżywczych (m.in. WNKT) oraz wysokim pH jest podatne na procesy oksydacyjne i obniżenie jakości podczas przechowywania.
- H2. Sposób pakowania spowalnia niekorzystne zmiany oksydacyjne zachodzące w mięsie strusi w czasie przechowywania, które wpływają na jego cechy jakościowe m.in. wartość odżywczą, co zostanie zweryfikowane również za pomocą metody trawienia *in vitro*.

4. Materiał i metodyka

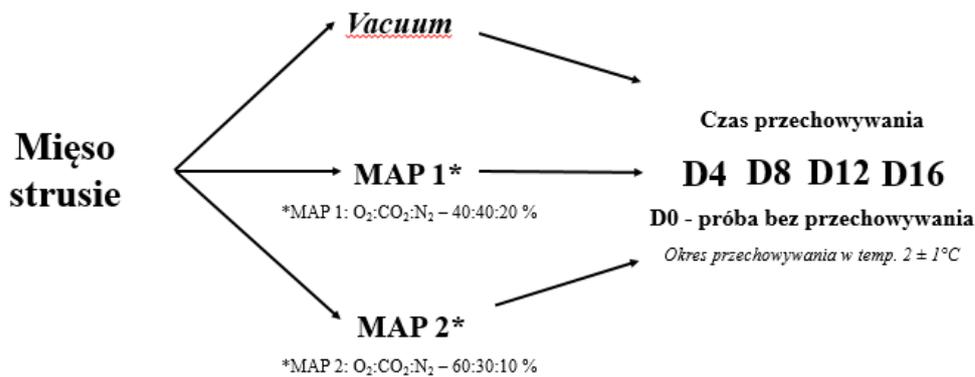
4.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiło mięso strusie pochodzące od ptaków utrzymywanych na fermach krajowych. Strusie w wieku 11-12 miesięcy, o masie ok. 90-95 kg były ubijane w zatwierdzonych rzeźniach spełniających wymogi UE. Po uboju, rozbiórce tuszy i podziale na elementy zostały pobrane mięśnie (*Musculus iliofibularis*), które podzielono na masie próby ok. 150 g i zapakowane w systemie:

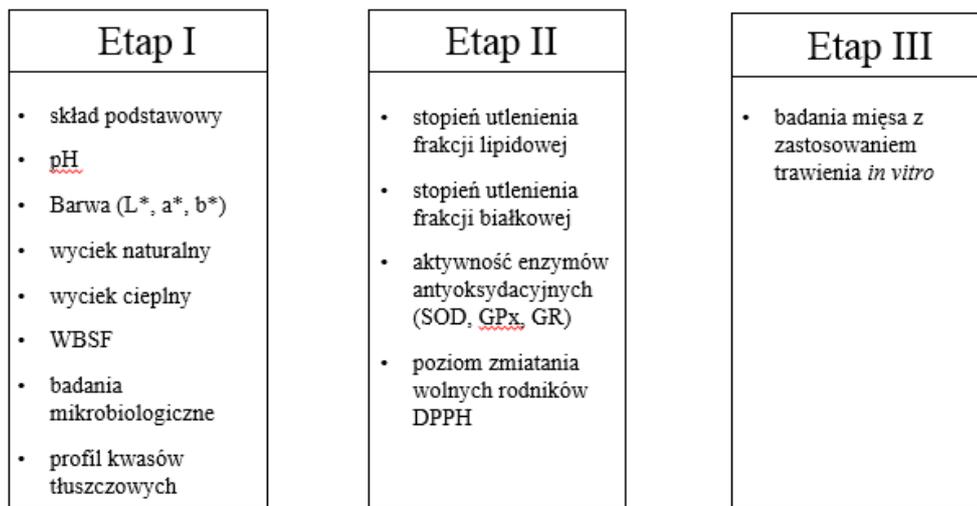
- a) *vacuum* (pakowanie próżniowe), Opakowanie próżniowe. Każda próbka mięsa (bezpośrednio po porcjowaniu) została indywidualnie zapakowana w poliamidowe/polietylenowe (PA/PE) worki (grubość: 90 μ m; wymiary 20/70 mm; przepuszczalność O₂: 50 cm³/m²/24 h; przepuszczalność CO₂; przepuszczalność pary wodnej: 6–8 g/m²/24 h) przy użyciu próżniowej maszyny pakującej Vac-20SL2A (Edesa Hostelera S.A., Barcelona, Hiszpania) Podciśnienie w opakowaniu wynosiło 2,5 kPa.
- b) pakowanie z modyfikowaną atmosferą (MAP) w dwóch wariantach mieszanki gazów, odpowiednio:
 - MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂,
 - MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

Próbki mięsa zostały umieszczone na tackach (wymiaru 187 × 137 × 50 mm) wykonanych z politereftalanu etylenu/polietylenu (PET/PE), zamknięte folią będącą laminatem politereftalanu etylenu o grubości 44 μ m z polipropylenem + antifog (PET/PP + AF) o maksymalnej przepuszczalności tlenu nieprzekraczającej 10 cm³/m²/24 h/bar (EC04, Corenso, Helsinki, Finlandia). Próbki zapakowano za pomocą maszyny pakującej M3 (Sealpack, Oldenburg, Niemcy).

Próby przechowywanego w temperaturze $2 \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 16 dni z uwzględnieniem przeprowadzenia analiz w dniach "0", 4, 8, 12, 16 (8 próbek w każdej grupie). Schemat doświadczenia przedstawiono na rysunku 1, a badania składały się z 3 etapów, co zostało przedstawione na rysunku 2.



Rysunek 1. Schemat doświadczenia obejmującego badania w oparciu o mięso strusie.



Rysunek 2. Schemat i zakres przeprowadzonych badań w pracy.

4.2. Metodyka badawcza

4.2.1. Skład podstawowy

Badania zawartości procentowej białka, tłuszczu, wody i popiołu przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru bliskiej podczerwieni NIRFlex N-500 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria). Pomiar wykonano w zakresie długości fal 780-2500 nm, w trybie reflaktacji. Metoda pomiaru polegała na detekcji w bliskiej podczerwieni odbitych promieni od próbki i odniesieniu uzyskanych wyników do wartości referencyjnych zapisanych w modelu kalibracyjnym (metoda pomiarowa jest znormalizowaną i akredytowaną metodą oznaczeń składu mięsa, nr akredytacji: AB1398). Próbkę została przed analizą zhomogenizowane, następnie rozprowadzono 0,5 cm warstwę próbki równomiernie na szklanych szalkach Petriego i umieszczono w module pomiarowym NIRFlex Solids. Każdą próbkę przeskanowano sześciokrotnie, a uzyskane wartości uśredniono.

4.2.2. Analiza kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe wyekstrahowano z homogenizowanych próbek (5 g) mięśni za pomocą mieszaniny chloroform-metanol (2:1 v/v). Tłuszcz z mięsa (tłuszcz śródmięśniowy) wyizolowano metodą Folcha [1957] w celu oznaczenia składu kwasów tłuszczowych. Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) analizowano za pomocą chromatografu gazowego GC-7890 AGILENT wyposażonego w 60 m kolumnę kapilarną o średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 0,20 μm . Próbkę 1 μl wstrzyknięto w stosunku podziału 1:40. Jako gaz nośny zastosowano hel o natężeniu przepływu 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Poszczególne kwasy tłuszczowe zidentyfikowano porównując czasy retencji z czasami standardowej mieszaniny FAME (SUPELCO 37 Component FAME Mix, SIGMA-ALDRICH Co) i wyrażono jako procent (%) FAME. Do przygotowania roztworu podstawowego zastosowano standardową mieszaninę zawierającą wszystkie kwasy tłuszczowe. Krzywe kalibracyjne sporządzono ze wszystkich roboczych zestawów wzorców przez rozcieńczenie połowy objętości n-heksanem. Analizowano kwasy tłuszczowe nasycone (od C14:0 do C18:0), kwasy jednonienasycone (od C14:1 do C20:1) i wielonienasycone kwasy tłuszczowe od C18:2 do C 22:6. Spośród kwasów n 3 analizowano kwas linolenowy (C 18:3) oraz kwasy EPA i DHA.

4.2.3. pH

Wartość pH mierzono przy użyciu przenośnego pH-metru TESTO 205 (Testo Inc., Niemcy), uprzednio skalibrowanego na certyfikowanych buforach o pH 4.00 i 7.00. Wartość pH została określona poprzez pomiar bezpośredni poprzez wkłucie się w mięsień (głębokość = 2 cm) zgodnie z normą PN-ISO 2917:1999. Pomiar wykonano w sześciu powtórzeniach, a uzyskane wartości uśredniono.

4.2.4. Pomiar składowych barwy L^* , a^* , b^*

Instrumentalny pomiar barwy w systemie CIELAB ($L^*a^*b^*$) mięsa strusiego została określona z użyciem kolorymetru Konica Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japonia). L^* - jasność barwy, a^* - nasycenie barwy od zielonej (-) do czerwonej (+), b^* - nasycenie barwy od niebieskiej (-) do żółtej (+). Próby po otwarciu i wyjęciu z opakowania poddawano ekspozycji na tlen atmosferyczny (*blooming*) przez 30 min w stałych warunkach chłodniczych ($2 \pm 1^\circ\text{C}$). Do pomiaru wykorzystano głowicę o średnicy 8 mm, illuminant D65 oraz obserwator standardowy 2°. Urządzenie uprzednio skalibrowano na płytce kalibracyjnej ($L^* = 98,45$, $a^* = -0,10$, $b^* = -0,13$). Dla każdej próbki wyniki przedstawiono jako wartości

średniej z dziesięciu pomiarów, zebranych na losowo wybranych obszarach z powierzchni każdej próbki, osiągając wykluczenie wpływu niejednorodności prób.

4.2.5. Wyciek naturalny

Wyciek naturalny (D_L) został określony poprzez uwzględnienie masy próbki przed zapakowaniem i przechowywaniem (M_0) oraz po okresie przechowywania (M_1). Wyciek naturalny został obliczony zgodnie ze wzorem (1):

$$D_L = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

4.2.6. Siła cięcia WBSF

Próbki mięsa (100 ± 10 g) gotowano pojedynczo w zamkniętych workach z PA/PE zanurzonych w łaźni wodnej (Memmert, WNE 14, Schwabach, Germany) w temperaturze 80°C , do osiągnięcia temperatury 73°C wewnątrz próbki. Następnie zostały schłodzone i przechowane przez noc w $2 \pm 1^\circ\text{C}$ w szafie chłodniczej. Z każdej próby pobierano walcze rdzenie poprzez wycięcie ich równolegle do orientacji włókien mięśniowych (średnica $1,27$ cm, długość $2,5 \pm 0,2$ cm). Analiza instrumentalna WBSF (*Warner-Bratzler shear force*) została przeprowadzona odpowiednio w 0, 4, 8, 12 i 16 dniu przechowywania z wykorzystaniem uniwersalnej maszyny testującej Instron (Model 5965, Norwood, MA, USA) z przystawką do testu przecinania WB elementem tnącym w kształcie litery V (głowica: max. obciążalność 500 N i prędkość 200 mm/min.).

4.2.7. Wyciek cieplny

Wartość wycieku cieplnego (CL) została określona poprzez uwzględnienie masy próbki (M_i) przed oraz po obróbce cieplnej (procedura obróbki była tożsama jak w punkcie 4.2.6.) i wystudzeniu próbki do temperatury otoczenia (M_f), zgodnie ze wzorem (2):

$$CL = \left(1 - \frac{M_f}{M_i}\right) \cdot 100\% \quad (2)$$

4.2.8. Analiza mikrobiologiczna

Analizy mikrobiologiczne mięsa strusia z uwzględnieniem ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby *Enterobacteriaceae* w 1g, liczby *Escherichia coli* w 1g, obecność *Salmonella spp.* oraz pleśni i drożdży, były wykonywane co cztery dni przechowywania. Próbki mięsa pobrane były dla każdego systemu pakowania, a następnie transportowane w warunkach chłodniczych do akredytowanego laboratorium, gdzie dokonywano pomiarów zgodnie z normą PN-EN ISO 4833-1:2013-12 dla ogólnej liczby drobnoustrojów, z normą PN-EN ISO 6579-

1:2017-04 dla *Salmonelli spp.*, z normą PN-EN ISO 21528-2:2017-08 dla *Enterobacteriaceae*, z normą PN-ISO 16649-2:2004 dla *Escherichia coli*, z normą PN-ISO 21527-1:2009 dla pleśni i drożdży.

4.2.9. Analiza aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

1 g mięsa został poddany homogenizacji w 5 ml 20 mM buforu HEPES (pH 7,2, 1mM EDTA, 210 mM mannitolu, 70 mM sacharozy na 1 g tkanki), który wcześniej schłodzono do temperatury 4°C. Wirowanie homogenatów prowadzono w $2,500 \times g$ przez 15 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany supernatant poddano analizie zgodnie z procedurą przedłożoną przez producenta testu Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, Michigan 48108 USA). Analiza ta pozwala na sumaryczne oznaczenie wszystkich trzech typów SOD obecnych w tkankach. Odczytu absorbancji w trzech długościach fali (λ 440, 450, 460) dokonano przy użyciu czytnika mikroplitek Synergy4 firmy Biotek (Winooski, Vermont 05404 USA). Obliczenia aktywności SOD zostały wykonane przy użyciu programu Gen5. Aktywność SOD wyrażono w U/ml.

4.2.10. Analiza aktywności glutationowej peroksydazy (GPx)

Próbkę mięsa homogenizowano w 5 ml schłodzonego do 4°C buforu składające się z 50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA oraz 1mM dithiothreitolu. Próby wirowano w $10.000 \times g$ przez 10 minut w temperaturze 4°C. Aktywność GPx oznaczono przy użyciu testu Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, Michigan 48108 USA). Odczytu absorbancji oraz pomiaru kinetyki reakcji dokonano przy użyciu czytnika mikroplitek Synergy4 firmy Biotek (Winooski, Vermont 05404 USA) w 340 nm (długość fali). Aktywność GPx została wyrażona w nmol/min/ml.

4.2.11. Analiza aktywności reduktazy glutationowej (GR)

Próbkę homogenizowano w 5 ml schłodzonego do 4°C buforu składające się z 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,4 oraz 1 mM GSSG, 1 mM EDTA, 0.16 mM NADPH. Po homogenizacji próby wirowano w $10.000 \times g$ przez 10 minut w temperaturze 4°C. Następnie supernatant zbierano do analiz przechowując go w temperaturze +4°C. Aktywność GR oznaczono przy użyciu testu Glutathione reductase (GR) assay kit (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, Michigan 48108 USA). Odczytu absorbancji oraz pomiaru kinetyki reakcji dokonano przy użyciu czytnika mikroplitek Synergy4 firmy Biotek (Winooski,

Vermont 05404 USA) w 340 nm (długość fali). Aktywność GR została wyrażona w nmol/min/ml

4.2.12. Potencjał zmiatania wolnego rodnika DPPH

Potencjał antyoksydacyjny analizowanych prób określono przy pomocy metody Brand-Williamsa i wsp., (1999), która wykorzystuje syntetyczny wolny rodnik 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). 1 g tkanki homogenizowano w 10 ml zimnego (4°C) czystego etanolu ($\geq 99,9\%$). Homogenaty umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 2 godziny, w temperaturze 40°C. Kolejny etap przygotowania próbki obejmował wirowanie w $4.000 \times g$ przez 15 minut w 4°C. Do 0,5 ml uzyskanego supernatantu dodano 0,5 ml etanolowego roztworu 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (0,5 mM), który wcześniej został odpowiednio rozcieńczony, aby uzyskać absorbancje roztworu na poziomie 0,9, przy długości fali 517 nm. Próbki starannie wymieszano i pozostawiono w ciemnym miejscu na 30 minut w celu stabilizacji koloru. Pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu spektrofotometru Cary WinUV (Varian Inc., Australia), przy długości fali 517 nm. Obliczenia potencjału zmiatania wolnego rodnika DPPH przeprowadzono przy użyciu wzoru (3):

$$\% \text{inhibicji} = 100 \cdot \frac{(A_0 - A_{\text{sr.}})}{A_0} \quad (3)$$

gdzie:

$A_{\text{sr.}}$ - średnia wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego próbkę biologiczną,

A_0 - absorbancja roztworu rodnika DPPH.

Zrealizowano pomiary aktywności antyrodnikowej przy wykorzystaniu stabilnego rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Badanie polegało na oznaczeniu zdolności do unieczynnienia rodnika DPPH za pomocą antyoksydantu zawartego w ekstrakcie z algi *Haematococcus pluvialis*. Zdolność antyoksydacyjną ekstraktu zmierzono spektrofotometrycznie (Shimadzu-UV-1800) przy długości fali 517 nm i wyjściową absorbancję rodnika DPPH oraz absorbancję rodnika DPPH po reakcji z ekstraktem. Całkowitą zdolność antyoksydacyjną obliczono wg wzoru (4):

$$I = 100 \cdot \frac{(Abs_k - Abs_p)}{Abs_k} \quad (4)$$

gdzie, I- inhibicja (%)- zdolność do neutralizacji wolnych rodników, Abs_k - absorbancja próbki kontrolnej, Abs_p - absorbancja próbki badanej.

4.2.13. Trawienie *in vitro*

Trawienie *in vitro* zostało przeprowadzone zgodnie z procedurą dla analizy procesów oksydacyjnych zachodzących podczas pasażu w układzie pokarmowym (Van Hecke i wsp. 2018). Trawienia wykonano w czterech powtórzeniach. Mięso strusie (4,5 g) inkubowano kolejno: w temperaturze 37°C przez 5 min z 6 ml śliny, 2 h z 12 ml soku żołądkowego (początkowe pH żołądka = 2,5, końcowego pH żołądka = 3,5), następnie przez 2 h z 2 ml buforu wodorowęglanowego (1 M, pH = 8,0), z 12 ml soku z dwunastnicy i z 6 ml soku z żółci (pH = 6,5). Po zakończeniu procesu, próbki zhomogenizowano za pomocą ultra-turrax (9500 rpm) i przechowywano je w temperaturze -80°C do dalszej analizy.

4.2.14. Oznaczenie poziomu dialdehydu malonowego (MDA)

Próby homogenizowano w 2 ml schłodzonego do 4°C buforu fosforanowego z dodatkiem 20 µl BHT (*butylated hydroxytoluene*) w acetonitrylu. Wirowanie prób przebiegało się w 10 000 × g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Próby wirowano w 1 000 × g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Analizę poziomu MDA w tkance mięśniowej przed i po trawieniu *in vitro* mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 532 nm. Co odpowiada najwyższej absorpcji TBARS (kwasu tiobarbiturowego) po hydrolizie z NaOH prób biologicznych. Poziom absorpcji został przeliczony na odpowiednia wartość MDA (nmol MDA/ml) oraz wykorzystaniem 1,1,3,3-tetrametoksypropanu jako standardu [VanHecke i wsp. 2017a].

4.2.15. Oznaczanie 4-hydroksy-2-nonenalu (4-HNE) i heksanal (HEX) w mięsie przed i po trawieniu *in vitro*

Poziomy 4-HNE i heksanal (HEX), analizowano z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC z detekcją fluoroscencyjną (1220 Infinity II LC wraz z detektorem FL, Agilent, Santa Clara, CA 95051 USA), zmodyfikowaną metodą Van Hecke i wsp. [2017a]. Homogenaty prób biologicznych przed i po trawieniu poddano ekstrakcji w mieszaninie CHCl₃:MeOH (2:1, v/v) z NaCl (0,9%). Po ekstrakcji zebraną fazę (CHCl₃) i suszono pod azotem. Po ekstrakcji próby oddano derywatacji z wykorzystaniem odczynnika cykloheksanodionowego (CHD - siarczan amonu roztworzony w kwasie octowym) oraz roztworu MeOH. Następnie całość inkubowano przez godzinę w temperaturze 60°C. Przed nastrzykiem próby filtrowano (0,2 µm filtr z membraną celulozową). Rozdział przeprowadzono na kolumnie Supelcosil LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm, kat. 58295 Supelco®), stosując stopniową elucję 50% tetrahydrofuran od 0-40 min. Derywatyzowane aldehydy wykrywano za

pomocą detektora fluorescencyjnego przy długości fali wzbudzenia 380 nm i długości fali emisji 446 nm. Aldehydy oznaczono ilościowo przy użyciu krzywej standardowej i wyrażono jako pmol aldehydów/ ml roztworu.

4.2.16. Oznaczenia poziomu grup karbonylowych

Próby mięsa homogenizowano w buforze fosforanowym pH 6,5. Następnie dodano kwasu trichlorooctowego (TCA) w celu deproteinizacji. Odbiałczony supernatant usuwano a osad po przemyciu w mieszaninie etanolem/octan etylu (1:1) rozpuszczono w roztworze 6 M guanidyny. W tak przygotowanych próbkach absorbancję (w porównaniu z próbką kontrolną) określano przy długości fali 280 i 370 nm. Do obliczenia poziomu grup karbonylowych użyto oprogramowania Cary Varian 50Bio (Santa Clara, CA, USA). Poziom grup karbonylowych nmol/mg białka.

4.2.17. Analiza statystyczna

Uzyskane dane zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem jedno- i wieloczynnikowej analizy wariancji w schemacie wewnątrzgrupowym (powtarzane pomiary), w celu zbadania wpływu czynników (zmiennych niezależnych): rodzaju pakowania i czasu przechowywania (czynnik powtarzalny), a także ich interakcji, na wszystkie zmierzone parametry (zmiennie zależne). Do przeprowadzenia analizy wykorzystano PROC GLIMMIX z SAS v 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), w tym opcję korekty Tukeya (oznaczenie różnic między grupami). Do rozpoznania istotnych efektów ustalono różnicę dla przedziału $p < 0,05$, która została obliczona z wykorzystaniem opcji LSMEANS procedury GLIMMIX. Trend istotnego efektu uwzględniono dla $p < 0,10$. Identyfikacja strusi (liczba ptaków) została uwzględniona w modelu jako czynnik losowy. W zbiorze danych nie było wartości odstających, rozkład wyników zmiennych zależnych w każdej z analizowanych grup był zbliżony do rozkładu normalnego, co sprawdzono test Shapiro-Wilka, a wariancje w porównywanych grupach były do siebie podobne (homogeniczność wariancji), co zweryfikowano testem Levene'a. Trafność modeli została przetestowana przy użyciu kryterium informacyjnego Akaike. W przypadku wszystkich analiz, wyniki podane zostały jako średnia wartość \pm standardowy błąd pomiaru (SEM - *standard error of the mean*).

5. Syntetyczne omówienie publikacji

5.1. Publikacja I

Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* 24 (22), 4128.

Cel artykułu: określenie zmian składu kwasów tłuszczowych w mięsie strusi w zależności od rodzaju opakowania i okresu przechowywania oraz jego podstawowy skład chemiczny.

Szczegóły założeń metodycznych realizowanych badań i szczegółowe wyniki badań wraz z tabelami zostały przedstawione i opublikowane w artykule z listy JCR (publikacja nr 1).

Skład chemiczny mięsa strusia jako wstępna charakterystyka analizowanych próbek przedstawiono w Tabeli 1. Zawartość tłuszczu w mięsie strusi wyniosła średnio 1,95 g/100 g tkanki, natomiast białka 21,5 g/100 g. W porównaniu z wołowiną i wieprzowiną mięso strusie charakteryzuje się niższą zawartością tłuszczu. Mięso to zawiera również nieznacznie wyższy poziom białka niż w wołowinie [Paleari i wsp., 1998; Sales i Mellet, 1998].

Tabela 1. Skład podstawowy (g /100 g mięsa) surowego mięsa strusiego (średnia wartość \pm SE).

Parametr	Średnia wartość (g/100 g)
Zawartość wody	75,40 \pm 0,26
Tłuszcz	1,95 \pm 0,03
Białko	21,50 \pm 0,11
Popiół ogółem	1,15 \pm 0,01

Zmiany profilu kwasów tłuszczowych w mięsie strusi w zależności od rodzaju opakowania i okresu przechowywania przedstawiono w tabelach 2-5. Zawartość poszczególnych nasyconych kwasów tłuszczowych w mięsie strusim nie różniła się istotnie w zależności od metody pakowania oraz czasu przechowywania (z wyjątkiem kwasu C16:0), co zostało zaprezentowane w tabeli 2. Istotne różnice zarejestrowano w zawartości kwasu C16:0 pomiędzy 0 i 16 dniem przechowywania, lecz tylko dla MAP2, przy czym dla *vacuum* różnica wyniosła - 0,2%, a dla MAP1 - 0,4%.

Tabela 2. Udział procentowy nasyconych kwasów tłuszczowych (NKT) (%) w sumie kwasów tłuszczowych ogółem w zależności od rodzaju opakowaniu i czasu przechowywania (średnia wartość \pm SEM).

Kwas tłuszczowy (%)	Metoda pakowania	Dzień				
		0	4	8	12	16
C14:0	MAP1	0,57 \pm 0,121	0,57 \pm 0,093	0,57 \pm 0,093	0,57 \pm 0,09	0,58 \pm 0,116
	MAP2	0,57 \pm 0,121	0,57 \pm 0,085	0,58 \pm 0,122	0,59 \pm 0,106	0,58 \pm 0,122
	<i>Vacuum</i>	0,57 \pm 0,121	0,57 \pm 0,097	0,57 \pm 0,076	0,57 \pm 0,055	0,58 \pm 0,052
C15:0	MAP1	0,021 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001
	MAP2	0,021 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,020 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,019 \pm 0,002
	<i>Vacuum</i>	0,021 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,021 \pm 0,001	0,021 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001
C16:0	MAP1	21,37 \pm 0,205	21,44 \pm 0,101	21,53 \pm 0,124	21,59 \pm 0,121	21,71 \pm 0,141b
	MAP2	21,37 \pm 0,205B	21,42B \pm 0,10	21,45B \pm 0,155	21,52B \pm 0,123	22,72 \pm 0,071Aa
	<i>Vacuum</i>	21,37 \pm 0,205	21,42 \pm 0,123	21,47 \pm 0,101	21,5 \pm 0,094	21,54 \pm 0,148b
C17:0	MAP1	0,12 \pm 0,004	0,12 \pm 0,002	0,13 \pm 0,002	0,12 \pm 0,002	0,11 \pm 0,001
	MAP2	0,12 \pm 0,004	0,11 \pm 0,002	0,11 \pm 0,003	0,11 \pm 0,002	0,11 \pm 0,001
	<i>Vacuum</i>	0,12 \pm 0,004	0,12 \pm 0,002	0,12 \pm 0,002	0,11 \pm 0,002	0,11 \pm 0,001
C18:0	MAP1	9,81 \pm 0,078	9,84 \pm 0,089	9,87 \pm 0,082	9,9 \pm 0,057	9,99 \pm 0,076
	MAP2	9,81 \pm 0,078	9,88 \pm 0,012	9,91 \pm 0,04	9,95 \pm 0,097	10,25 \pm 0,112
	<i>Vacuum</i>	9,81 \pm 0,078	9,83 \pm 0,094	9,85 \pm 0,023	9,88 \pm 0,125	9,92 \pm 0,125

Średnie wartości różniące się literami dla dnia w wierszach (A, B, C) i dla systemu pakowania w kolumnach (a, b, c), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

Podobne tendencje zaobserwowano dla większości analizowanych jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (JNKT - tabela 3), gdzie stwierdzono brak istotnego wpływu rodzaju opakowania oraz czasu przechowywania na profil tych kwasów. Wyjątkiem były kwasy - palmitynowy (C16:1) oraz eikozenowy (C20:1n9), których zawartość zmniejszyła się podczas przechowywania dla MAP2 (spadek dla C16:1 z 7,90% do 7,06% w 16 dniu, przy jednocześnie mniejszych spadkach ich wartości dla MAP1 oraz *vacuum*). Zbliżone tendencje dla kwasu palmitynowego zaobserwowano także w mięsie drobiowym przechowywanym przez okres 6 dni w temperaturze 4°C w eksperymencie przeprowadzonym przez Conchillo i wsp. [2004]. Z kolei w badaniach Poławskiej i wsp. [2014], w których mięso strusie zapakowano w *vacuum* oraz skin-pack i przechowywano do 14 dni nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu

jednonienasyconych kwasów tłuszczowych w zależności od sposobu pakowania i okresu przechowywania.

Tabela 3. Udział procentowy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (JNKT) (%) w sumie kwasów tłuszczowych ogółem w zależności od rodzaju opakowaniu i czasu przechowywania (średnia wartość \pm SEM).

Kwas tłuszczowy (%)	Metoda pakownia	Dzień				
		0	4	8	12	16
C14:1	MAP1	0,08 \pm 0,001	0,09 \pm 0,001	0,09 \pm 0,002	0,08 \pm 0,001	0,06 \pm 0,002
	MAP2	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,001	0,07 \pm 0,001	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,001
	Vacuum	0,08 \pm 0,001	0,08 \pm 0,002	0,07 \pm 0,001	0,08 \pm 0,001	0,06 \pm 0,001
C15:1	MAP1	0,17 \pm 0,011	0,17 \pm 0,002	0,17 \pm 0,002	0,16 \pm 0,007	0,16 \pm 0,007
	MAP2	0,17 \pm 0,011	0,17 \pm 0,004	0,16 \pm 0,009	0,15 \pm 0,002	0,15 \pm 0,005
	Vacuum	0,17 \pm 0,011	0,17 \pm 0,01	0,17 \pm 0,003	0,16 \pm 0,006	0,16 \pm 0,002
C16:1	MAP1	7,9 \pm 0,093A	7,92 \pm 0,07A	7,59 \pm 0,088AB	7,33 \pm 0,065AB	7,15 \pm 0,071Bb
	MAP2	7,9 \pm 0,093A	7,87 \pm 0,012A	7,7 \pm 0,037A	7,41 \pm 0,14B	7,06 \pm 0,062Bb
	Vacuum	7,9 \pm 0,093A	7,93 \pm 0,081A	7,65 \pm 0,056AB	7,52 \pm 0,11B	7,43 \pm 0,075Ba
C18:1 n9t	MAP1	0,25 \pm 0,009	0,25 \pm 0,003	0,26 \pm 0,011	0,28 \pm 0,009	0,27 \pm 0,011
	MAP2	0,25 \pm 0,009	0,27 \pm 0,006	0,27 \pm 0,005	0,28 \pm 0,012	0,28 \pm 0,008
	Vacuum	0,25 \pm 0,009	0,25 \pm 0,005	0,26 \pm 0,01	0,26 \pm 0,003	0,27 \pm 0,006
C18:1 n9c	MAP1	29,96 \pm 0,152	30,02 \pm 0,167	29,75 \pm 0,177	29,29 \pm 0,138	28,98 \pm 0,164
	MAP2	29,96 \pm 0,152	30,05 \pm 0,22	29,94 \pm 0,168	29,72 \pm 0,137	29,56 \pm 0,127
	Vacuum	29,96 \pm 0,152	29,93 \pm 0,144	29,75 \pm 0,145	29,41 \pm 0,104	29,18 \pm 0,086
C20:1 n9	MAP1	0,21 \pm 0,015B	0,23 \pm 0,006B	0,26 \pm 0,009AB	0,27 \pm 0,009AB	0,3 \pm 0,009Aa
	MAP2	0,21 \pm 0,015	0,23 \pm 0,008	0,26 \pm 0,011	0,25 \pm 0,015	0,24 \pm 0,004b
	Vacuum	0,21 \pm 0,015B	0,21 \pm 0,004B	0,23 \pm 0,004AB	0,25 \pm 0,007AB	0,27 \pm 0,006Aab

Średnie wartości różniące się literami dla dnia w wierszach (A, B, C) i dla systemu pakowania w kolumnach (a, b, c), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

Wyniki badań własnych wskazują, iż rodzaj pakowania oraz czas przechowywania istotnie wpływa na profil kwasów tłuszczowych, szczególnie na wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w tym kwasy omega 3 - C18:3, C20:5 (EPA) oraz C22:6 (DHA) – tabela nr 4.

Tabela 4. Udział procentowy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) (%) w sumie kwasów tłuszczowych ogółem w zależności od rodzaju opakowaniu i czasu przechowywania (średnia wartość \pm SEM).

Kwasy tłuszczowe (%)	Metoda pakowania	Dzień				
		”0”	4	8	12	16
C18:2 n6c	MAP1	18,70 \pm 0,10	18,61 \pm 0,12	18,23 \pm 0,09	17,97 \pm 0,18	17,61 \pm 0,11
	MAP2	18,70 \pm 0,10	18,71 \pm 0,14	18,04 \pm 0,12	17,73 \pm 0,20	17,2 \pm 0,11
	<i>Vacuum</i>	18,70 \pm 0,10	18,67 \pm 0,01	18,44 \pm 0,07	18,11 \pm 0,11	17,92 \pm 0,17
C18:3 n3	MAP1	1,98 \pm 0,04	1,97 \pm 0,02	1,94 \pm 0,04	1,89 \pm 0,02a	1,83 \pm 0,03a
	MAP2	1,98 \pm 0,04A	1,95 \pm 0,01A	1,89A \pm 0,02A	1,75 \pm 0,06Bb	1,46 \pm 0,03Cb
	<i>Vacuum</i>	1,98 \pm 0,04	1,97 \pm 0,03	1,95 \pm 0,02	1,93 \pm 0,03a	1,94 \pm 0,03a
C20:2 n6	MAP1	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00
	MAP2	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	0,17 \pm 0,00	0,18 \pm 0,00
	<i>Vacuum</i>	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,00	0,19 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00
C20:3 n6	MAP1	0,21 \pm 0,01A	0,21 \pm 0,00A	0,19 \pm 0,01A	0,17 \pm 0,00AB	0,15 \pm 0,00B
	MAP2	0,21 \pm 0,01A	0,21 \pm 0,02A	0,19 \pm 0,01A	0,15 \pm 0,00Bb	0,14 \pm 0,00Bb
	<i>Vacuum</i>	0,21 \pm 0,01	0,21 \pm 0,00	0,20 \pm 0,00	0,19 \pm 0,006a	0,18 \pm 0,00a
C20:4 n6	MAP1	5,44 \pm 0,05	5,42 \pm 0,07	5,34 \pm 0,07	5,30 \pm 0,09	5,23 \pm 0,05a
	MAP2	5,44 \pm 0,05A	5,35A \pm 0,06A	5,19 \pm 0,03A	5,04 \pm 0,06B	4,79 \pm 0,13bB
	<i>Vacuum</i>	5,44 \pm 0,05	5,41 \pm 0,05	5,39 \pm 0,02	5,34 \pm 0,06	5,32 \pm 0,07a
C20:5 (EPA)	MAP1	0,57 \pm 0,01A	0,55 \pm 0,02A	0,53 \pm 0,02A	0,5 \pm 0,01Aa	0,43 \pm 0,01Bc
	MAP2	0,57 \pm 0,01A	0,57 \pm 0,01A	0,55 \pm 0,02A	0,42 \pm 0,01Bb	0,33 \pm 0,01Cb
	<i>Vacuum</i>	0,57 \pm 0,01	0,56 \pm 0,01	0,55 \pm 0,01	0,52 \pm 0,02a	0,51 \pm 0,01a
C22:6 (DHA)	MAP1	0,67 \pm 0,02A	0,64 \pm 0,01A	0,62 \pm 0,02A	0,59 \pm 0,02B	0,45 \pm 0,01Cb
	MAP2	0,67 \pm 0,02A	0,63 \pm 0,01A	0,61 \pm 0,02A	0,53 \pm 0,01Bb	0,25,09Cc
	<i>Vacuum</i>	0,67 \pm 0,02	0,67 \pm 0,01	0,65 \pm 0,01	0,63 \pm 0,02a	0,65 \pm 0,09a

Średnie wartości różniące się literami dla dnia w wierszach (A, B, C) i dla systemu pakowania w kolumnach (a, b, c), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

W przypadku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT/PUFA), w tym kwasów omega 3, które są najcenniejsze dla zdrowia człowieka najmniejsze zmiany (dla C18:3) zanotowano w mięsie strusim pakowanym próżniowo, a następnie dla wariantu z modyfikowaną atmosferą o obniżonej zawartości tlenu i wyższej zawartości azotu (MAP1). Największe zmiany w tym zakresie odnotowano dla MAP2. Podobne tendencje zaobserwowano dla kwasów EPA i DHA (tabela 4). W mięsie pakowanym w MAP1 poziom EPA utrzymywał się na zbliżonym poziomie do 12 dnia przechowywania, po czym nastąpił istotny spadek w 16 dniu. Podobne zależności zarejestrowano w MAP2. W przypadku DHA pogorszenie wartości zaobserwowano głównie między 12 a 16 dniem przechowywania, głównie w MAP2 (tabela 4). Spadek zawartości PUFA w okresie przechowywania mięsa zanotowano także w badaniach prowadzonych przez Echarte i wsp. [2004] na wieprzowinie

oraz Dal Bosco i wsp. [2004] w mięsie króliczym już po 8 dniach przechowywania. Natomiast w badaniach z wykorzystaniem wołowiny Mahecha i wsp. [2009] wykazali zmniejszenie koncentracji PUFA dopiero po 14 dniu przechowywania tego mięsa. Stosunek kwasów n6/n3 nie uległ zmianie podczas przechowywania dla mięsa pakowanego w systemie *vacuum*, dalej w MAP1, natomiast najmniej stabilny okazał się dla MAP2 to jest z wyższą zawartością tlenu - tabela 5. Największe zmiany w profilu kwasów tłuszczowych dla wszystkich rodzajów opakowania zaobserwowano między 12, a 16 dniem przechowywania.

Tabela 5. Udział procentowy w tłuszczowych (%) sumie kwasów tłuszczowych ogółem oraz stosunek kwasów tłuszczowych (średnia wartość \pm SEM) w zależności od rodzaju opakowaniu i czasu przechowywania.

Kwasy tłuszczowe (%)	Metoda pakowania	Dzień				
		”0”	4	8	12	16
SFA	MAP1	31,33 \pm 0,21	31,42 \pm 0,15	31,55 \pm 0,14	31,62 \pm 0,14	31,8 \pm 0,16b
	MAP2	31,33 \pm 0,21B	31,43 \pm 0,11B	31,48 \pm 0,18B	31,59 \pm 0,18B	33,08 \pm 0,09Aa
	<i>Vacuum</i>	31,33 \pm 0,21	31,39 \pm 0,19	31,46 \pm 0,09	31,52 \pm 0,19	31,58 \pm 0,24b
MUFA	MAP1	38,56 \pm 0,16	38,69 \pm 0,16	38,11 \pm 0,21	37,41 \pm 0,13	36,91 \pm 0,19
	MAP2	38,56 \pm 0,16	38,68 \pm 0,21	38,39 \pm 0,20	37,88 \pm 0,20	37,36 \pm 0,17
	<i>Vacuum</i>	38,56 \pm 0,16	38,57 \pm 0,16	38,13 \pm 0,16	37,66 \pm 0,13	37,37 \pm 0,12
PUFA	MAP1	28,48 \pm 0,10A	28,30 \pm 0,16A	27,70 \pm 0,14AB	27,24 \pm 0,18Ba	26,38 \pm 0,16Cb
	MAP2	28,48 \pm 0,10A	28,30 \pm 0,17B	27,31 \pm 0,13Cb	26,39 \pm 0,16Db	24,69 \pm 0,21Ec
	<i>Vacuum</i>	28,48 \pm 0,10A	28,41 \pm 0,14A	28,08 \pm 0,07a	27,61 \pm 0,13Ba	27,61 \pm 0,13Ba
PUFA n6	MAP1	24,21 \pm 0,11A	24,1 \pm 0,16A	23,63 \pm 0,14AB	23,33 \pm 0,18B	22,90 \pm 0,12Ba
	MAP2	24,21 \pm 0,11A	24,13 \pm 0,19A	23,30 \pm 0,13B	22,85 \pm 0,19B	22,07 \pm 0,20Cb
	<i>Vacuum</i>	24,21 \pm 0,11A	24,15 \pm 0,13A	23,90 \pm 0,07AB	23,52 \pm 0,12B	23,52 \pm 0,12Ba
PUFA n3	MAP1	3,21 \pm 0,04A	3,16 \pm 0,02A	3,09 \pm 0,04A	2,98 \pm 0,02Aa	2,72 \pm 0,04Bb
	MAP2	3,21 \pm 0,04A	3,14 \pm 0,03A	3,05 \pm 0,04A	2,69 \pm 0,06bB	2,05 \pm 0,03Cc
	<i>Vacuum</i>	3,21 \pm 0,04	3,20 \pm 0,03	3,15 \pm 0,03	3,08 \pm 0,04a	3,08 \pm 0,04a
PUFA n6/n3	MAP1	7,55 \pm 0,12	7,63 \pm 0,07B	7,66 \pm 0,11B	7,84 \pm 0,10a	8,43 \pm 0,09Ab
	MAP2	7,55 \pm 0,12C	7,68 \pm 0,10C	7,66 \pm 0,13C	8,53 \pm 0,23Bb	10,78 \pm 0,13Aa
	<i>Vacuum</i>	7,55 \pm 0,12	7,55 \pm 0,07	7,60 \pm 0,09	7,65 \pm 0,11a	7,65 \pm 0,11c

Średnie wartości różniące się literami dla dnia w wierszach (A, B, C) i dla systemu pakowania w kolumnach (a, b, c), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że rodzaj pakowania oraz czas przechowywania istotnie wpływają na profil kwasów tłuszczowych. Spośród wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy n-3 tj. kwasu linolenowego (C18:3), EPA (C20:5) i DHA (C22:6) najmniejsze zmiany w ich składzie podczas przechowywania zarejestrowano w mięsie strusim pakowanym próżniowo, następnie w MAP1, a najgorsze wyniki uzyskano w MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂).

5.2. Publikacja II

Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* 26 (11):3445.

Cel artykułu: charakterystyka cech fizycznych i jakości mikrobiologicznej mięsa strusia w zależności od rodzaju opakowania i czasu przechowywania.

Wyniki badań wskazują, że systemy pakowania obejmujące pakowanie próżniowe i pakowanie w atmosferze modyfikowanej (MAP) z zastosowaniem dwóch kombinacji gazów: MAP1 (40% O₂/ 40% CO₂/ 20% N₂) i MAP2 (60% O₂/30 % CO₂/10% N₂) i czas przechowywania miały wpływ na cechy fizyczne i jakość mikrobiologiczną mięsa strusia, a mianowicie na pH, barwę (L*, a*, b*) – tabela 6. Początkowa wartość pH mięsa (5,99) zmniejszyła się pod koniec czasu przechowywania dla MAP1 do 5,81, podczas gdy w *vacuum* było stabilne od początku przechowywania do 12 dnia, po czym wzrosło do 6,08 w 16 dniu. Wzrost pH może być spowodowany zaawansowaną proteolizą zachodzącą w długo przechowywanym mięsie pakowanym próżniowo [Alonso-Calleja i wsp. 2014; Cruzen i wsp., 2014].

Tabela 6. pH oraz barwa (L*, a*, b*) mięsa strusi w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania (średnia wartość ± SEM).

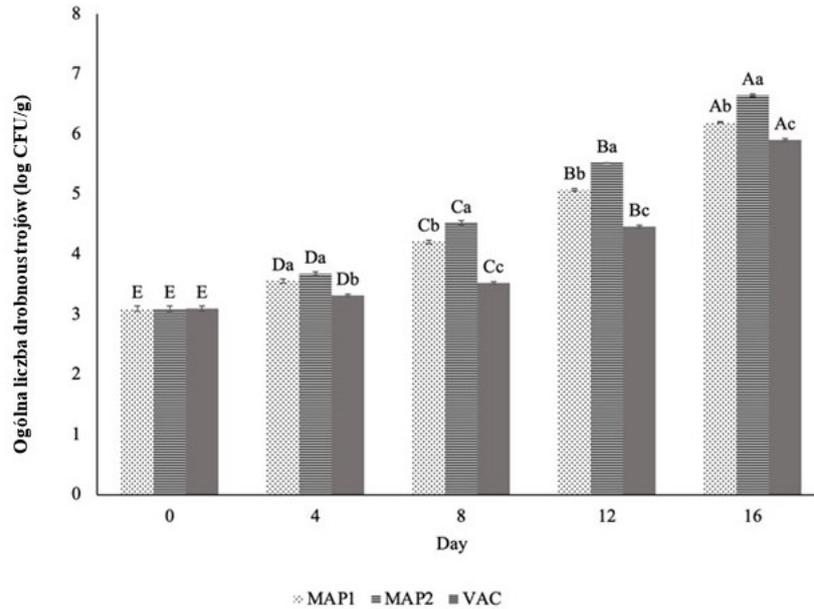
Parametr	Metoda pakowania	Dzień				
		0	4	8	12	16
pH	MAP1	5,99 ± 0,00 ^A	5,90 ± 0,00 ^{A,B}	5,89 ± 0,00 ^{A,B,b}	5,85 ± 0,00 ^{B,b}	5,81 ± 0,01 ^{B,b}
	MAP2	5,99 ± 0,00	5,95 ± 0,00	5,92 ± 0,00 ^{a,b}	5,91 ± 0,01 ^{a,b}	5,93 ± 0,01 ^{a,b}
	<i>Vacuum</i>	5,99 ± 0,00 ^B	5,98 ± 0,00 ^B	6,02 ± 0,01 ^{A,b,a}	6,00 ± 0,01 ^{A,B,a}	6,08 ± 0,00 ^{A,a}
L*	MAP1	36,99 ± 0,12 ^B	36,30 ± 0,15 ^{B,b}	41,02 ± 0,49 ^{A,a}	40,66 ± 0,19 ^{A,a}	40,75 ± 0,10 ^{A,a}
	MAP2	36,99 ± 0,12 ^C	39,50 ± 0,07 ^{B,a}	40,41 ± 0,07 ^{B,a}	41,06 ± 0,07 ^{A,a}	41,60 ± 0,11 ^{A,a}
	<i>Vacuum</i>	36,99 ± 0,12 ^{A,B}	37,39 ± 0,13 ^{A,b}	36,85 ± 0,09 ^{A,B,b}	36,29 ± 0,10 ^{B,b}	34,22 ± 0,20 ^{C,b}
a*	MAP1	19,97 ± 0,39 ^B	21,13 ± 0,11 ^{A,a}	20,73 ± 0,11 ^{A,B,a}	20,56 ± 0,11 ^{A,B,a}	20,50 ± 0,06 ^{A,B,a}
	MAP2	19,97 ± 0,39 ^B	21,75 ± 0,28 ^{A,a}	20,74 ± 0,18 ^{B,a}	20,74 ± 0,19 ^{B,a}	20,64 ± 0,06 ^{B,a}
	<i>Vacuum</i>	19,97 ± 0,39 ^A	19,47 ± 0,16 ^{A,B,b}	18,97 ± 0,21 ^{B,b}	19,12 ± 0,26 ^{A,B,b}	19,58 ± 0,21 ^{A,B,b}
b*	MAP1	8,43 ± 0,07 ^B	9,90 ± 0,21 ^{A,a,b}	9,93 ± 0,08 ^{A,a,b}	9,87 ± 0,07 ^{A,a,b}	9,93 ± 0,05 ^{A,a}
	MAP2	8,43 ± 0,07 ^B	10,80 ± 0,05 ^{A,a}	10,68 ± 0,04 ^{A,a}	10,41 ± 0,10 ^{A,a}	10,31 ± 0,07 ^{A,a}
	<i>Vacuum</i>	8,43 ± 0,07	8,18 ± 0,08 ^b	8,21 ± 0,12 ^b	8,11 ± 0,14 ^b	8,01 ± 0,03 ^b

Średnie wartości różniące się literami dla dnia w wierszach (A, B, C) i dla systemu pakowania w kolumnach (a, b, c), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

W odniesieniu do barwy mięsa, wartość jasności L^* wzrosła podczas przechowywania dla MAP1 i MAP2 odpowiednio z 36,99 do 40,75 i 41,60, podczas gdy zmniejszyła się dla *vacuum* do 34,22. Te same tendencje odnotowano dla wartości a^* (nasycenie barwy czerwonej) i wartości b^* (nasycenie barwy żółtej). Wartość a^* w badanych mięśniach strusi istotnie wzrosła ($p \leq 0,05$) w 4 dniu przechowywania w MAP1 oraz w MAP2, prawdopodobnie z powodu konwersji mioglobiny do postaci oksymoglobiny [Danijela i wsp. 2013]. We wszystkich systemach pakowania obserwowano wzrost wycieku naturalnego wraz z czasem przechowywania. Istotnie największy wyciek naturalny stwierdzono w mięsie strusim pakowanym w systemie *vacuum* (3,62% w 16 dniu) w porównaniu do systemów pakowania MAP2 i MAP1, gdzie zarejestrowano najmniejszy wyciek (2,71% w 16 dniu przechowywania) – tabela 7. Również Leygonie i wsp. [2012] w pakowanym mięsie strusi zanotowali wzrost wycieku naturalnego podczas przechowywania. Natomiast Zakrys –Waliwander i wsp. [2012] w badaniach przeprowadzonych z udziałem wołowiny zarejestrował większy wyciek naturalny w mięsie pakowanym w MAP, ale o bardzo wysokiej koncentracji tlenu O_2 to jest 80%, aniżeli w *vacuum*.

W przypadku badań mikrobiologicznych najniższą ogólną liczbę drobnoustrojów w przechowywanym mięsie strusi stwierdzono w *vacuum*, następnie w MAP1, a najwyższą w MAP2 (rysunek 3). Wyższą ogólną liczbę drobnoustrojów (TVC) dla mięsa strusi podczas przechowywania w systemie MAP zanotowali Bingol i wsp. [2012]. Trzeba dodać, że początkowa wartość TVC w mięsie strusi w dniu 0 była u tych badaczy wyższa (ponad 4 log CFU/g) w porównaniu z badaniami w niniejszej dysertacji (3,1 log CFU/g), a mięso strusie było przechowywane w temperaturze wyższej o 2°C (+ 4°C). Należy tutaj podkreślić, że strusie w Polsce są od wielu lat ubijane w specjalnych ubojniach posiadających certyfikat UE, a zdecydowana większość krajowej produkcji jest eksportowana do Europy Zachodniej i musi spełniać specjalne wymogi higieniczne i wymagania sanitarne w tym zakresie [Horbańczuk i Wierzbicka 2017]. Mięso strusi produkowane w Polsce cieszy się dużym uznaniem i jest na nie duży popyt szczególnie ze strony krajów europejskich m.in. Szwajcaria oraz Francja i Wielka Brytania. W przypadku *Enterobacteriaceae*, *E. coli* *Salmonelli spp.* oraz pleśni i drożdży nie stwierdzono obecności w badanych próbkach dla wszystkich trzech wariantów pakowania, przez cały okres przechowywania do 16 dni.



Rysunek 3. Ogólna liczba drobnoustrojów (log CFU/g) w mięsie strusim w zależności od rodzaju opakowania oraz czasu przechowywania (średnia wartość \pm SEM). Średnie wartości oznaczone literami dla każdego dnia (A–E) i dla systemu pakowania (a–d), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

Tabela 7. Wyciek naturalny (%), wyciek cieplny (%) i siła cięcia WBSF (N) w mięsie strusim w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania (średnia wartość \pm SEM).

Parametr	Metoda pakowania	Dzień				
		”0”	4	8	12	16
Wyciek naturalny (drip loss)	MAP1	-	1,43 \pm 0,01 B,c	1,65 \pm 0,01 B,c	2,21 \pm 0,01 A,B,c	2,71 \pm 0,00 A,c
	MAP2	-	1,61 \pm 0,00 B,b	2,01 \pm 0,01 A,B,b	2,50 \pm 0,00 A,b,b	3,33 \pm 0,01 A,b
	Vacuum	-	1,80 \pm 0,02 C,a	2,18 \pm 0,03 B,C,a	2,60 \pm 0,03 B,a	3,62 \pm 0,01 A,a
Wyciek cieplny (cooking loss)	MAP1	32,95 \pm 0,24	34,48 \pm 0,23	35,51 \pm 0,11	36,10 \pm 0,01	36,31 \pm 0,05
	MAP2	32,95 \pm 0,24	34,73 \pm 0,01	35,64 \pm 0,02	36,23 \pm 0,20	36,35 \pm 0,04
	Vacuum	32,95 \pm 0,24 B	35,02 \pm 0,11 A, B	36,21 \pm 0,29 A, B	36,65 \pm 0,18 A	37,61 \pm 0,39 A
Siła cięcia (WBSF)	MAP1	33,28 \pm 0,32	31,87 \pm 0,18	31,40 \pm 0,19	30,92 \pm 0,22 a	30,22 \pm 0,03 a
	MAP2	33,28 \pm 0,32	31,77 \pm 0,15	31,66 \pm 0,30	31,29 \pm 0,17 a	31,07 \pm 0,25 a
	Vacuum	33,28 \pm 0,32 A	30,39 \pm 0,14 B	30,29 \pm 0,08 B	28,59 \pm 0,15 C,b	28,38 \pm 0,08 C,b

Średnie wartości oznaczone literami dla każdego dnia w wierszach (A, B, C) i dla systemu pakowania w kolumnach (a, b, c), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że rodzaj pakowania oraz czas przechowywania istotnie wpływają na cechy fizykochemiczne i jakość mikrobiologiczną mięsa strusi. Istotnie największy wyciek naturalny stwierdzono w mięsie strusim pakowanym w *vacuum* w porównaniu do systemów pakowania MAP2 oraz MAP1. Najniższą ogólną liczbę drobnoustrojów stwierdzono w *vacuum*, następnie w MAP1, a najwyższą w MAP2. Wartość pH zmniejszyła się pod koniec czasu przechowywania dla MAP1, podczas gdy w *vacuum* była stabilna do 12 dnia i lekko wzrosła w dniu 16. Z kolei barwa mięsa tj. wartość L* wzrosła dla MAP1 i MAP2, podczas gdy spadła dla *vacuum*. Te same tendencje odnotowano dla barwy czerwonej (a*) i barwy żółtej (b*).

5.3. Publikacja III

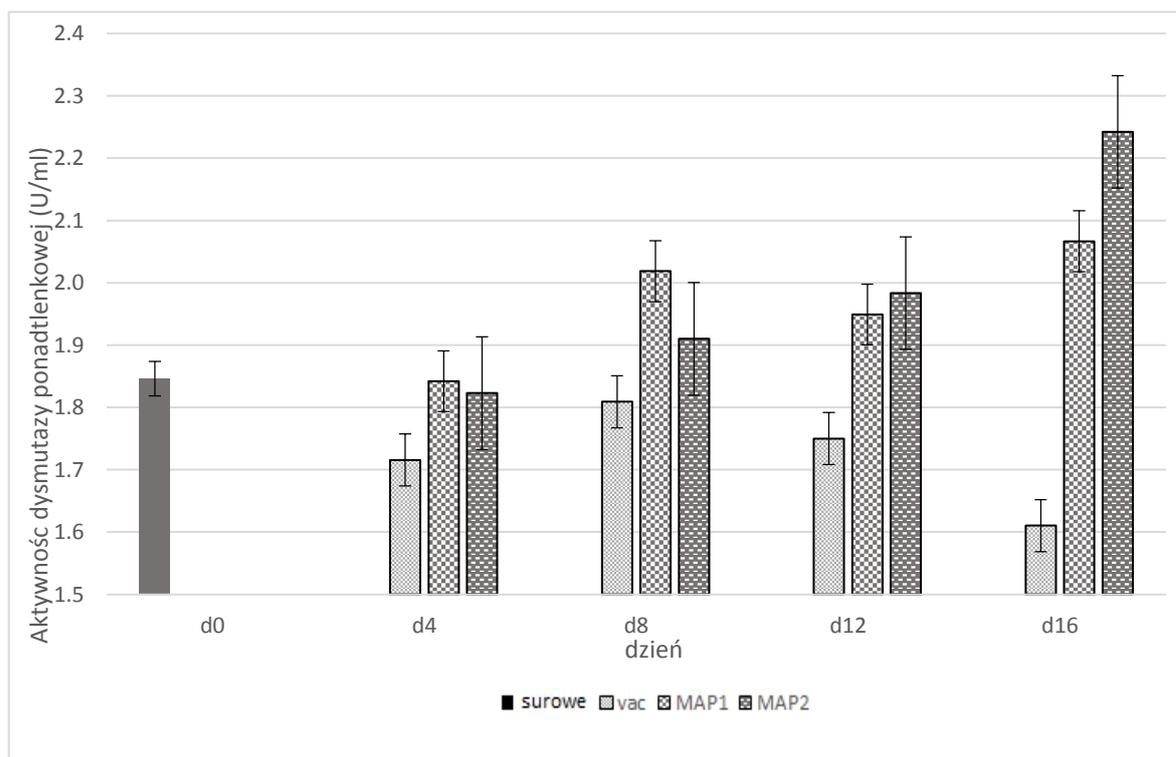
Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. *Biomolecules* 11(9):1338.

Cel artykułu: ocena aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych w mięsie strusia w zależności od rodzaju pakowania i okresu przechowywania.

Identyfikacja parametrów stresu oksydacyjnego oraz profilu antyoksydacyjnego została przeprowadzona w homogenatach mięśni strusi zgodnie odpowiednimi metodykami dedykowanym dla poszczególnych parametrów. Przeprowadzono analizę aktywności enzymów antyoksydacyjnych - peroksydazy glutationowej (GPx, E.C. 1.11.1.9); reduktazy glutationowej (GSRd, E.C. 1.6.4.2), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD E.C. 1.15.1.1), która została określona z wykorzystaniem dedykowanych mikropłytek do badań immunochemicznych typu EIA/ELISA oraz czytnika BioTek Synergy™4. Całkowita pojemność antyoksydacyjna próbek mięsa została zweryfikowana na podstawie analizy potencjału zmiatania wolnego rodnika DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych.

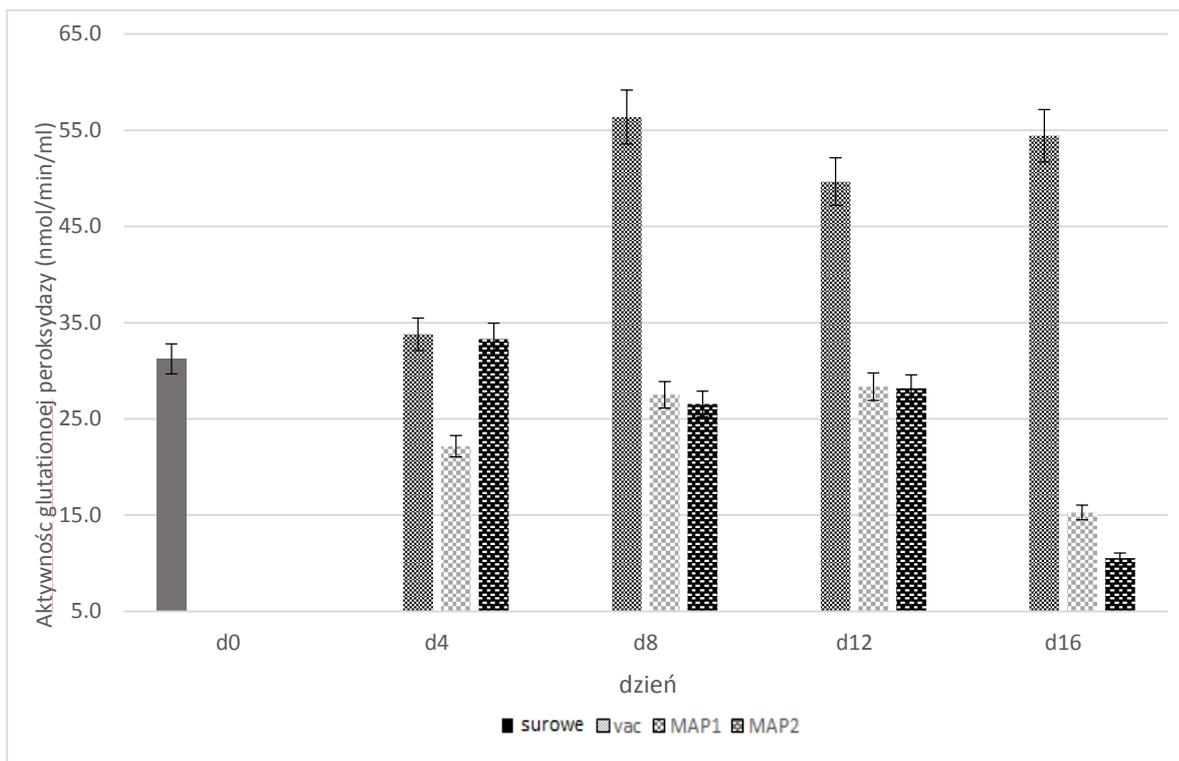
Szczegóły założeń metodycznych realizowanych badań i szczegółowe wyniki badań wraz z tabelami zostały przedstawione i opublikowane w artykule z listy JCR (publikacja nr 3). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej (GPx) i reduktazy glutationowej (GSR) i DPPH przedstawiono na wykresach 4-7. Wykazano, że najniższy poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) podczas przechowywania zaobserwowano w mięśniach strusia pakowanych *vacuum* w porównaniu z MAP1 i MAP2

(rysunek 4), co może wynikać z faktu, że w metodzie pakowania próżniowego ze względu na warunki beztlenowe procesy powstawania wolnych rodników uległy ograniczeniu. Podobną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) podczas przechowywania wykazano w badaniach mięsa nandu [Filgueras i wsp. 2010], natomiast Renerre i wsp. [1996] wykazali wyższą aktywność tego enzymu w wołowinie w porównaniu z otrzymanymi wynikami. Z kolei w *vacuum* odnotowano największy wzrost aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) zwłaszcza do 8 dnia przechowywania i parametr ten osiągnął wartość maksymalną (54,3) - rysunek 5. Wartość peroksydazy glutationowej wzrosła także do 8 dnia przechowywania w MAP1. W przypadku reduktazy glutationowej (GR) zaobserwowano stabilizację w poziomie aktywności tego enzymu w próbach z systemu pakowania próżniowego między 12, a 16. dniem przechowywania, podczas gdy w MAP1 uległ on dalszemu obniżeniu (rysunek 6). Z kolei wartość DPPH pozostała stabilna do 8 dnia przechowywania, a po tym okresie stwierdzono spadek tego parametru, który osiągnął najniższą wartość w 12 dniu przechowywania dla wszystkich rodzajów systemów pakowania (rysunek 7).



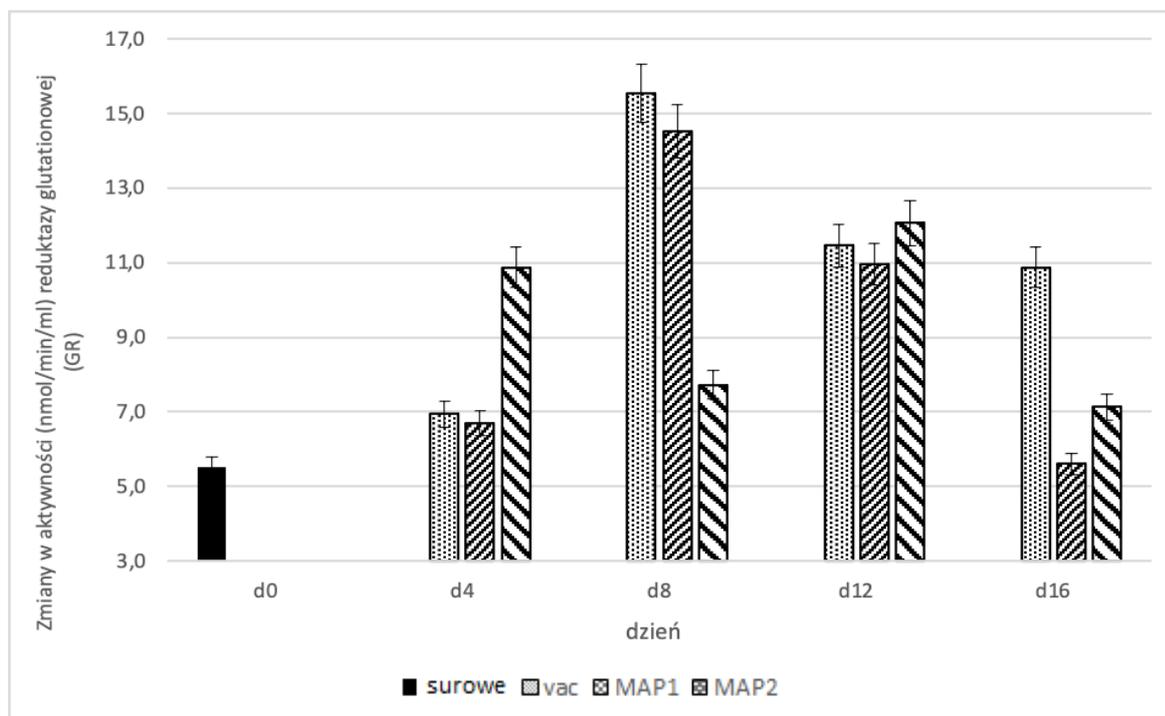
Rysunek 4. Zmiany w aktywności (U/ml) dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w mięsie strusim w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.



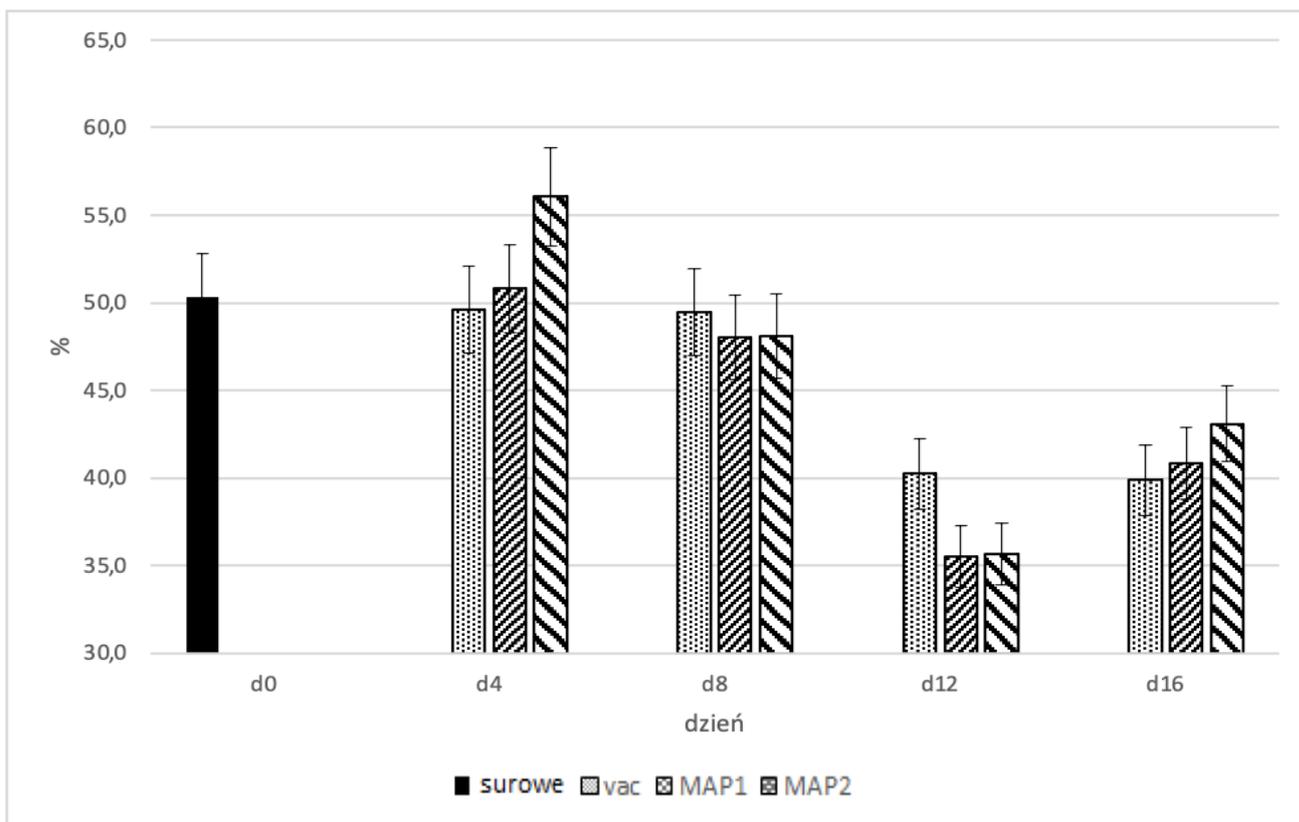
Rysunek 5. Zmiany w aktywności (nmol/min/ml) peroksydazy glutationowej (GPx) w mięsie strusim w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.



Rysunek 6. Zmiany w aktywności (nmol/min/ml) reduktazy glutationowej (GR) w mięsie strusim w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.



Rysunek 7. Zmiany (%) potencjału zmiatania wolnego rodnika DPPH w mięsie strusim w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂.

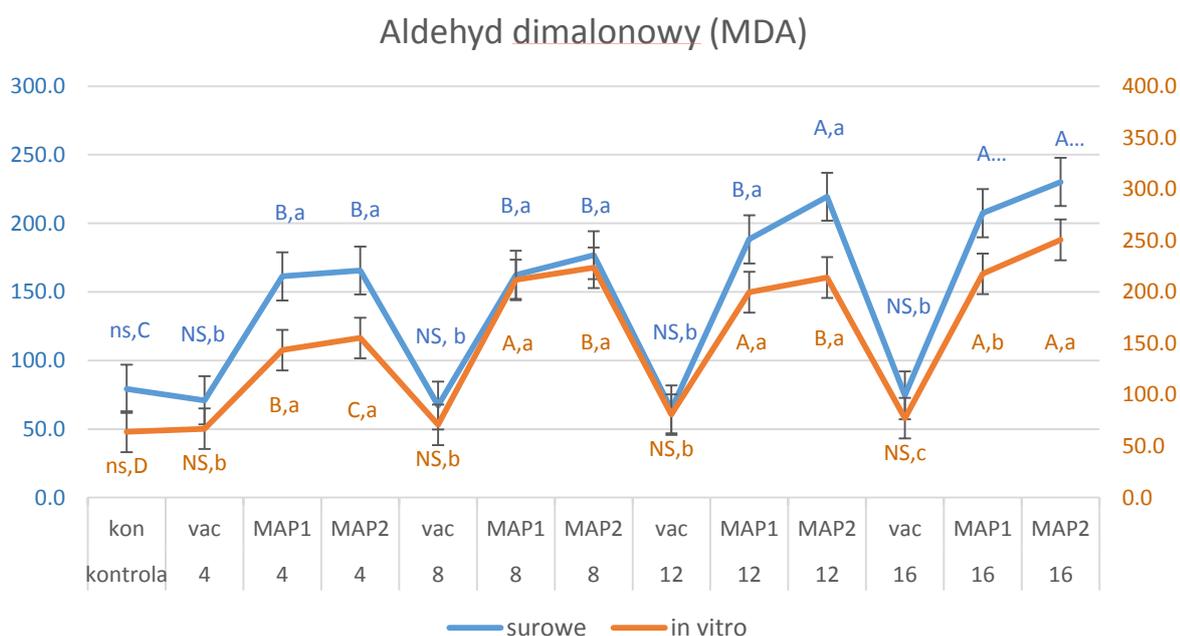
Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że poziom aktywności enzymatycznej dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej w mięsie strusi zmniejszył się głównie po okresie 8-12 dni przechowywania w 3 systemach pakowania z wyjątkiem MAP1 i MAP2 w przypadku SOD i GPx w *vacuum*, co wskazuje na obniżenie potencjału antyoksydacyjnego w mięśniach strusia. Z kolei wzrost aktywności enzymów GPx w systemie próżniowym może być spowodowany większym powinowactwem do neutralizacji powstałych wtórnych wolnych rodników w badanych mięśniach strusi.

5.4. Publikacja IV

Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwick A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Animal Science Papers and Reports* 39, 3, 251-259.

Celem artykułu była ocena zmian oksydacyjnych lipidów i białek w surowym mięsie strusi, jak i po trawieniu *in vitro* przechowywanym przez 16 dni w 3 wariantach pakowania tj. *vacuum* oraz modyfikowana atmosfera (MAP) w dwóch kombinacjach gazów.

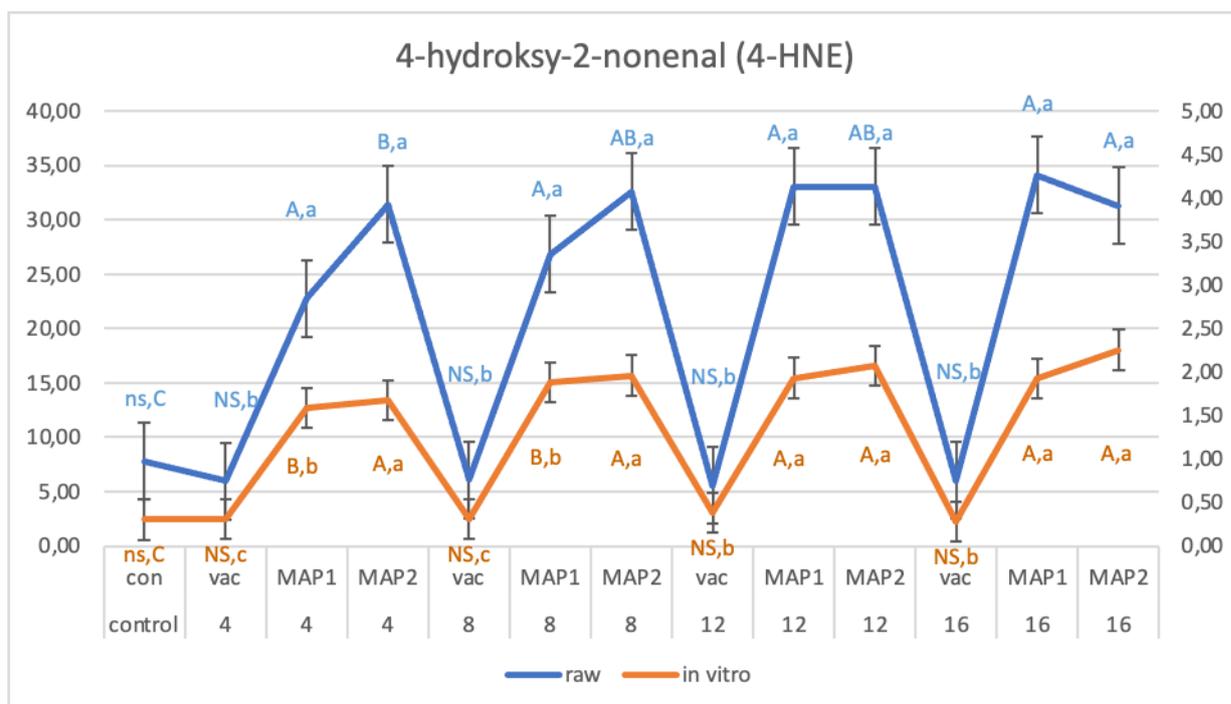
Produkty utleniania powstające podczas procesów trawienia mięsa niekorzystnie wpływają na stan zdrowia konsumentów. Dlatego ważne są badania z tego zakresu. Utlenianie lipidów zostało określone z wykorzystaniem takich parametrów jak: aldehyd dimalonowy (MDA), 4-hydroksy-2-nonenal (4-HNE) i heksanal (HEX), a utlenianie białek w oparciu głównie o grupy karbonylowe (PCC). Szczegóły założeń metodycznych realizowanych badań i szczegółowe wyniki badań wraz z tabelami zostały przedstawione i opublikowane w artykule z listy JCR (publikacja nr 4). Na podstawie uzyskanych wyników wykazano zależności pomiędzy poziomem utleniania lipidów wyrażonym w oparciu o takie parametry jak: MDA (wykres 8), HEX (wykres 9), 4-HNE (wykres 10) i a sposobem pakowania i okresem przechowywania mięsa strusia surowego oraz po trawieniu *in vitro*.



Rysunek 8. Wartość aldehydu dimalonowego (MDA) (nmol /g) w surowym mięsie oraz po trawieniu *in vitro*, w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania. Średnie wartości różniące się literami dla dnia (A, B, C, D) i dla systemu pakowania (a, b, c), wykazywały istotne różnice na poziomie $p < 0.05$. Oznaczenia: NS i ns wskazują na brak istotnych różnic statystycznych wobec grupy kontrolnej.

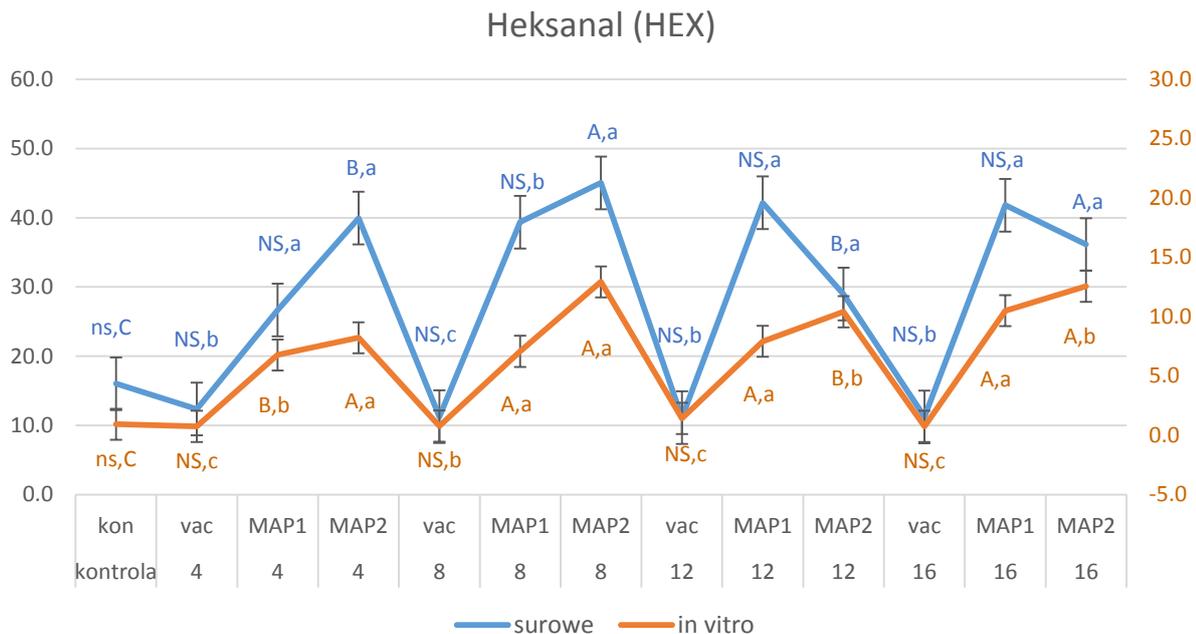
MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂, vac – pakowanie próżniowe.

W przypadku MAP1 i MAP2 w surowym mięsie strusi, jak również po trawieniu in vitro zaobserwowano istotny wzrost poziomu MDA, w czasie przechowywania, podczas gdy wartości tego parametru w próbkach w *vacuum* utrzymywały się na zbliżonym poziomie. Wartość MDA w surowym mięsie strusi w *vacuum* była stabilna podczas 16-dniowego przechowywania (nie stwierdzono istotnych różnic w tym zakresie). Podobne wyniki dla mięsa strusi pakowanego w *vacuum* i MAP przechowywanego w 2°C przez 8 dni uzyskali Fernandez-Lopez i wsp. [2006]. Ponadto w badaniach Seydima i wsp. [2006], w których mięso strusi, było pakowane próżniowo i przechowywane w temperaturze 4°C do 9 dni wystąpiły mniejsze zmiany utleniania lipidów w porównaniu z mięsem pakowanym w systemie bez modyfikowania atmosfery. Wartość 4-HNE wzrosła w MAP1 i MAP2, natomiast w VAC była zbliżona podczas przechowywania (rysunek 9). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi dla mięsa gęsi przechowywanego w *vacuum* i MAP, gdzie wyższe tempo utleniania lipidów stwierdzono w MAP [Orkus i wsp. 2017]. W przypadku HEX (rysunek 10) wartości tych parametrów wzrosły podczas przechowywania. Sobral i wsp. [2020] wykazali w badaniach mięsa kurcząt brojlerów, że poziom HEX w po trawieniu in vitro był dla MAP1 i MAP2 ponad trzy razy wyższy w 16 dniu przechowywania. Z kolei poziom PCC (rysunek 11) w mięsie surowym pakowanym w MAP1 i MAP 2 zwiększył się także w czasie przechowywania, ale w mniejszym stopniu w porównaniu z analizowanymi wskaźnikami oksydacji lipidów.



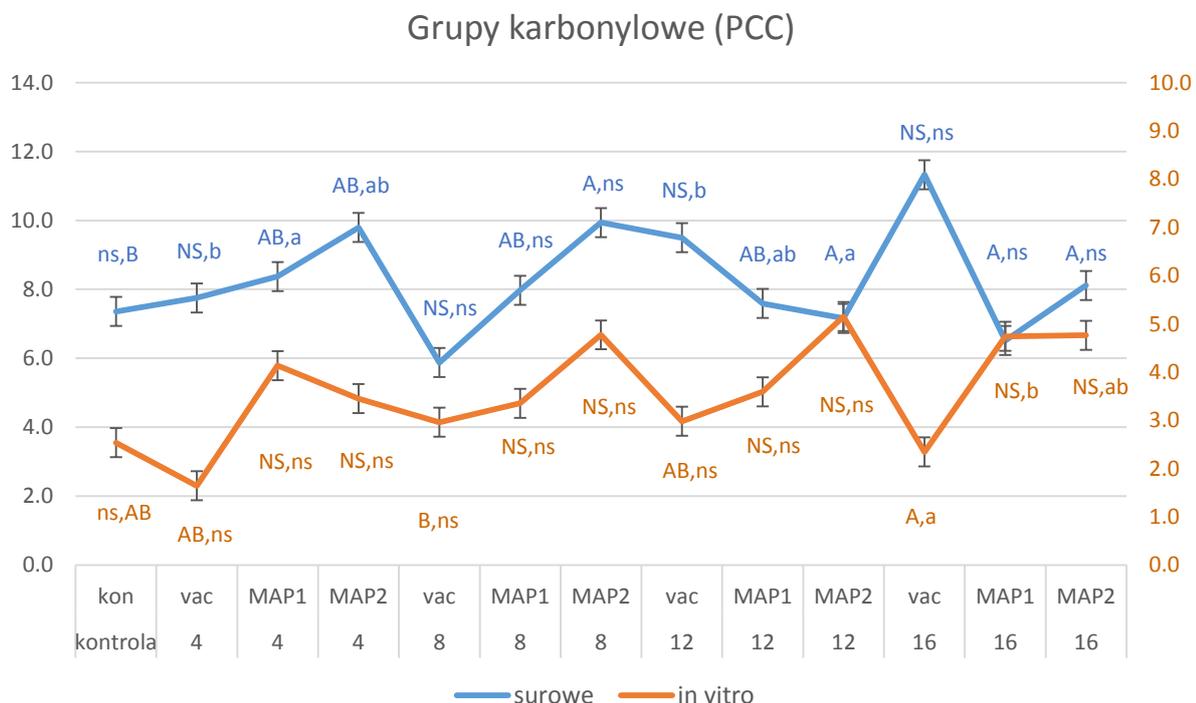
Rysunek 9. Wartość 4-hydrokso-2-nonenalu (4-HNE) (µmol/kg mięsa) w surowym mięsie oraz po trawieniu in vitro, w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania. Średnie wartości oznaczone literami dla każdego dnia (A, B, C), NS - brak istotności) i dla systemu pakowania (a, b, c, ns - brak istotności), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂, MAP2: 60% O₂/30% CO₂/10% N₂, vac – pakowanie próżniowe.



Rysunek 10. Wartość heksanal (HEX) ($\mu\text{mol/kg}$ mięsa) w surowym mięsie oraz po trawieniu in vitro, w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania. Średnie wartości oznaczone literami dla każdego dnia (A, B, C, NS - brak istotności) i dla systemu pakowania (a, b, c, ns - brak istotności), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O_2 /40% CO_2 /20% N_2 , MAP2: 60% O_2 /30% CO_2 /10% N_2 , vac – pakowanie próżniowe.



Rysunek 11. Wartość grupy karbonylowe (PCC) (nmol DNPH/mg białka) w surowym mięsie oraz po trawieniu in vitro, w zależności od rodzaju pakowania oraz czasu przechowywania. Średnie wartości oznaczone literami dla każdego dnia (A, B, C, NS - brak istotności) i dla systemu pakowania (a, b, c), istotne różnice dla $p < 0,05$.

MAP1: 40% O_2 /40% CO_2 /20% N_2 , MAP2: 60% O_2 /30% CO_2 /10% N_2 , vac – pakowanie próżniowe.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że rodzaj pakowania oraz czas przechowywania istotnie wpływają na poziom oksydacji lipidów i białek w mięsie strusi, jak również po trawieniu *in vitro*. W przypadku MAP1 i MAP2 w surowym mięsie strusia zaobserwowano istotny wzrost poziomu MDA, 4HNE oraz heksanalu (HEX) podczas przechowywania, podczas gdy wartości tych parametrów w *vacuum* utrzymywały się na zbliżonym poziomie. Podobne tendencje zaobserwowano dla mięsa strusi po trawieniu *in vitro*.

6. Stwierdzenia i wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Rodzaj pakowania oraz czas przechowywania istotnie wpływają na profil kwasów tłuszczowych, cechy fizykochemiczne, jakość mikrobiologiczną, poziom oksydacji lipidów i białek w mięsie strusi, jak również po trawieniu *in vitro*.
2. Najmniejszymi zmianami składu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy n-3 tj. kwasu linolenowego (C18:3), EPA (C20:5) i DHA (C22:6) podczas przechowywania charakteryzowało mięso strusie pakowane próżniowo, większymi w MAP1 (40% O₂/40% CO₂/20% N₂), a największymi pakowane w MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂).
3. Pakowanie mięsa strusiego w *vacuum* w porównaniu do systemów MAP2 oraz MAP1 powodowało podczas przechowywania uzyskanie największego wycieku naturalnego, ale stabilnej wartości pH do 12 dnia przechowywania oraz najniższej ogólnej liczby drobnoustrojów (TVC). W MAP1, gdzie zastosowano niższą koncentrację O₂ (40%) i wyższą CO₂ (40%) stwierdzono niższą wartość TVC w porównaniu do systemu MAP2, co mogło mieć związek m.in. z odnotowywanym niższym pH mięsa strusia przechowywanego w MAP1.
4. Pakowanie mięsa strusia w MAP1 i MAP2 w porównaniu do *vacuum*, zwiększało jasność barwy, nasycenie barwy czerwonej a* i żółtej, co wiąże się z uzyskiwaniem bardziej atrakcyjnej barwy dla konsumenta-
5. Poziom aktywności enzymatycznej SOD, GPx i GR w mięsie strusi zmniejszył się głównie po okresie 12 dni we wszystkich badanych systemach pakowania z wyjątkiem SOD w MAP1 i GPx w *vacuum*, co wskazuje na obniżenie potencjału antyoksydacyjnego w mięśniach strusia.
6. Mięso strusie uprzednio zapakowane w systemie MAP1 i MAP2 charakteryzowało się istotnym wzrostem poziomu MDA, 4HNE oraz heksanalu (HEX) już po 4 dniach przechowywania, podczas gdy wartości tych parametrów w *vacuum* utrzymywały się na zbliżonym niskim poziomie. Podobne tendencje zaobserwowano dla mięsa strusi po trawieniu *in vitro*.

7. Literatura

1. Antunes I.C., Ribeiro M.F., F B Pimentel F.B., Alves S.P., Oliveira M.B.P.P., Bessa R.J.B., Quaresma M.A.G., 2018. Lipid profile and quality indices of ostrich meat and giblets, *Poultry Science* 97, 3, 1073-1081.
2. Al-Kalifa H., Al-Nasre A., 2014. Ostrich meat: Production quality parameters and nutritional comparison to other types of meats. *Journal of Applied Poultry Research* 23, 784-790.
3. Alonso-Calleja C., Martinez-Fernandez B., Prieto M., Capita R., 2014. Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiology* 21, 241–246.
4. Balamatsia C. C., Patsias A., Kontominas M. G., Savvaidis I. N., 2007. Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere-packaged chicken fillets: correlation with microbiological and sensory attributes. *Food Chemistry* 104, 1622–1628.
5. Bingol E.B., Ergun O., 2012. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. *Meat Science* 88, 774–785.
6. Binsi P.K., Viji P., Visnuvinayagam S., Ninan G., Sangeeta G., Triveni A., Ravishankar C.N., 2015. Microbiological and shelf-life characteristics of eviscerated and vacuum-packed freshwater catfish (*Ompok pabda*) during chill storage. *Journal Food Science and Technology* 52, 1424–1433.
7. Bornhorst G.M., Singh R.P., 2014. Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual Review of Food Science and Technology* 5, 111-132.
8. Botha S.S.C., Hoffman L.C., Britz T.J., 2006. Effect of hot-deboning on the physical quality characteristics of ostrich meat. *South African Journal of Animal Science* 36, 3, 197-208.
9. Botha S.St.C., Hoffman L.C., Britz T.J., 2007. Physical meat quality characteristics of hot-deboned ostrich (*Struthio camelus var. Domesticus*) Muscularis gastrocnemius, pars interna during post-mortem aging. *Meat Science* 75, 709–718.
10. Brand-Williams W., 1999. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28 1231-1237.

11. Brenesselova M., Korenekova B., Macanga J., Marcincak S., Jevinova P., 2014. Effect of vacuum packaging conditions on the quality, biochemical changes and the durability of ostrich meat. *Meat Science* 101, 42–47.
12. Capita R., Diaz-Rodriguez N., Prieto M., Alonso-Calleja C., 2006. Effects of temperature, oxygen exclusion, and storage on the microbial loads and pH of packed ostrich steaks. *Meat Science* 73, 498–502.
13. Conchillo A., Ansorena D., Astiasarán I., 2004. The effect of cooking and storage on the fatty acid profile of chicken breast. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 301–330.
14. Cooper R.G., 1999. Ostrich meat, an important product of the ostrich industry: a southern African perspective. *World's Poultry Science Journal* 55, 4.
15. Cruzen S.M., Paulino P.V.R., Lonergan S.M., Huff-Lonergan E., 2014. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. *Meat Science* 96, 854–861.
16. Dal Bosco A., Castellini C., Bianchi L., Mugnai C., 2014. Effect of dietary α -linolenic acid and vitamin E on the fatty acid composition, storage stability and sensory traits of rabbit meat. *Meat Science* 66, 407–413
17. Dal Bosco A., Mattioli S., Cullere M., Szendrő Z., Gerencsér Z., Matics Z., Castellini C., Szin M., Dalle Zotte A., 2018. Effect of diet and packaging system on the oxidative status and polyunsaturated fatty acid content of rabbit meat during retail display. *Meat Science* 143, 46–51.
18. Danijela S.Z., Vera L.L., Ljubinko L.B., Lato P.L., Vladimir T.M., Neveena H.M., 2013. Effect of specific packaging conditions on myoglobin and meat color. *Food and Feed Research* 40, 1–10.
19. Echarte M., Conchillo A., Ansorena D., Astiasarán I., 2004. Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish patés. *Food Chemistry* 86, 47–53
20. Esteves M., Ventanas S., Cava R., 2005. Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect on color and texture deterioration. *Journal of Food Science* 70, 427–432.
21. Fernandez-Lopez J., Jimenez S., Sayas-Barbera E., Sendra E., Perez-Alvarez J.A., 2006. Quality characteristics of ostrich (*Struthio camelus*) burgers. *Meat Science* 73, 295–303.
22. Filgueras R.S., Gatellier P., Zambiasi R.C., Sante-Lhoutellier V., 2011a. Effect of frozen storage duration and cooking on physical and oxidative changes in *M.*

- gastrocnemius pars interna* and *M. iliofiburalis rhea americana*. Meat Science 88, 645–651.
23. Filgueras R.S., Gatellier P., Aubry L., Thomas A., Bauchard D., Durand D., Zambiasi R.C., Sante-Lhoutellier V., 2010. Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air-and vacuum-packed storage: influence of muscle on oxidative processes. Meat Science 86, 665–673.
 24. Filgueras R.S., Astruc T., Labas R., Venien A., Peyrin F., Zambiasi R.C., Sante-Lhoutellier V., 2012. Relationship between histochemical. structural characteristics and oxidative stability of rhea limb muscles. Food Chemistry 132, 1387-1394.
 25. Filgueras R.S., Gatellier P., Ferreira C., Zambiasi R.C., Sante-Lhoutellier V., 2011b. Nutritional value and digestion rate of rhea meat proteins in association with storage and cooking processes. Meat Science 89, 6-12.
 26. Folch J., Lee M., Sloane Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry 22, 226–497.
 27. Girolami, A., Marsico I., D’Andrea G., Braghieri A., Napolitano F., Cifuni G.F., 2003. Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of ostrich meat as influenced by age at slaughter and muscle type, Meat Science 64, 309-315.
 28. Gonzalez-Montalvo B., Capita R., Guevara-Franco J.A., Prieto M., Alonso-Calleja C., 2007. Influence of oxygen exclusion and temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed ostrich steaks throughout refrigerated storage. Meat Science 76, 201–209.
 29. Li C., Yu W., Wu P., Chen X.D., 2020. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. Trends in Food Science & Technology 96, 114-126.
 30. Hoffman L.C., Joubert M., Brand T.S., Manley M., 2005. The effect of dietary fish oil rich in n-3 fatty acids on the organoleptic, fatty acid and physicochemical characteristics of ostrich meat. Meat Science 70, 45-53.
 31. Hoffman L.C., Jones M., Muller N., Joubert E., Sadie A., 2014. Lipid and protein stability and sensory evaluation of ostrich (*Struthio camelus*) droëwors with the addition of rooibos tea extract (*Aspalathus linearis*) as a natural antioxidant. Meat Science 96, 3, 1289-1296
 32. Hoffman L.C., Botha S.St.C., Britz T.J., 2007. Muscle pH and temperature changes in hot- and cold-deboned ostrich (*Struthio camelus* var. *domesticus*) *Muscularis*

- gastrocnemius. pars interna and Muscularis iliofibularis* during the first 23 h *post-mortem*. *Meat Science* 75, 343-349.
33. Hoffman L.C., Muller M., Cloete S.W.P., Brand M., 2008. Physical and sensory meat quality of South African Black ostriches (*Struthio camelus* var. *domesticus*). Zimbabwean Blue ostriches (*Struthio camelus australis*) and their hybrid. *Meat Science* 79, 365-374.
 34. Hoffman L.C., Pretorius K., Gouws P.A., Jeannine Marais J., Needham T., 2022. Muscle yields and physical meat quality characteristics of hot- vs. cold-deboned ostrich (*Struthio camelus*) meat, *Meat Science* 187.
 35. Hu L., Ren S., Qing Shen Q., Ye X., Chen J., Ling J., 2018. Protein oxidation and proteolysis during roasting and in vitro digestion of fish (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Science and Food Agriculture* 98, 5344-5351.
 36. Horbańczuk O.K., Wierzbicka A., 2016. Technological and Nutritional Properties of Ostrich, Emu, And Rhea Meat Quality. *Journal of Veterinary Research* 60, 3, 279-286.
 37. Horbańczuk O.K., Wierzbicka A., 2017. Effects of Packaging Methods on Shelf Life of Ratite Meats. *Journal of Veterinary Research* 61, 3, 279-285.
 38. Józwick A., Poławska E., Strzałkowska N., Niemczuk K., Łysek-Gładysińska M., Kamińska A., Michalczuk M., 2013. Effect of linseed. rapeseed. and vitamin E long term upplementation on the activity of the lysosomal enzymes in ostrich liver. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 57, 573-578.
 39. Józwick A., Poławska E., Zdanowska-Sąsiadek <https://www.degruyter.com/view/j/bvip.2015.59.issue-1/bvip-2015-0012/bvip-2015-0012.xml> - [aff1](#) Z., Lipińska P., Kawka M., Guzek D., Strzałkowska N., 2015. Oxidative stability of ostrich meat related to duration of linseed and lucerne supplementation to the bird's diet. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59, 1, 79–83.
 40. Karklina D., Kivite J., 2007. The nutritional value of ostrich meat produced Latvia. *Proceedings of the XIV World Ostrich Congress. Riga, Latvia. 19-20 October 2007*, 83-85.
 41. Kawka M., Parada R., Jaszczak K., Horbańczuk J.O., 2012. The use of microsatellite polymorphism in genetic mapping of the ostrich (*Struthio camelus*). *Molecular Biology Reports* 39, 3369-3374.

42. Kim Y.H., Huff-Lonergan E., Sebranek J.G., Lonergan S.M., 2010. High-oxygen modified atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein polymerization. *Meat Science* 85, 759–767.
43. Koréneková B., Nagy J., Smulders F.J.M., Paulsen P., Mačanga J., Popelka P., Marcinčák S., Korének M., 2014. Lactic Acid Concentration and Ph Values in Muscles of European Brown Hare. In: *Trends in Game Meat Hygiene, From Forest to Fork*. Edited By Paulsen P., Bauer A., Smulders F.J.M. The Netherlands, *Wageningen Academic Publishers*.
44. Lagerstedt Å., Ahnström M. L., Lundström K., 2011. Vacuum skin pack of beef - a consumer friendly alternative. *Meat Science* 88, 391–396.
45. Leygonie C., Britz T.J., Hoffman L.C., 2011a. Oxidative stability of previously frozen ostrich *Muscularis iliofibularis* packaged under different modified atmospheric conditions. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 1171–1178.
46. Leygonie C., Britz T.J., Hoffman L.C., 2011b. Protein and lipid oxidative stability of fresh ostrich *M. iliofibularis* packaged under different modified atmospheric packaging conditions. *Food Chemistry* 127, 1659–1667.
47. Leygonie C., Britz T.J., Hoffman L.C., 2012. Meat quality comparison between fresh and frozen/thawed ostrich *M. iliofibularis*. *Meat Science* 91, 364–368.
48. Leygonie C., Hoffman L.C., 2020. Effect of Different Combinations of Freezing and Thawing Rates on the Shelf-Life and Oxidative Stability of Ostrich Moon Steaks (*M. Femorotibialis medius*) under Retail Display Conditions. *Foods* 9, 1624. <https://doi.org/10.3390/foods9111624>.
49. Lombardi-Boccia G., Martinez-Dominguez B., Aguzzi A., Rincon-Leon F., 2002. Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. *Food Chemistry* 78, 4, 505-510.
50. Lucas-González R., Viuda-Martos M., Pérez-Alvarez J.A., Fernández-López J., 2018. *In vitro* digestion models suitable for foods: opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International* 107, 423-436.
51. Łopacka J., Lipińska A., 2015. Zmiany oksydacyjne zachodzące w czasie przechowywania mięsa wołowego w modyfikowanej atmosferze gazów oraz obróbki termicznej i ich potencjalne skutki zdrowotne. *Problemy Higieny i Epidemiologii* 96, 4, 719 -726.

52. Łopacka J., Póltorak A., Wierzbicka A., 2017. Effect of reduction of oxygen concentration in modified atmosphere packaging on bovine *M. longissimus lumborum* and *M. gluteus medius* quality traits. *Meat Science* 124, 1–8.
53. Mahecha L., Nuernberg K., Nuernberg G., Ender K., Hagemann E., Dannenberger D., 2009. Effects of diet and storage on fatty acid profile, micronutrients and quality of muscle from German Simmental bulls. *Meat Science* 82, 365–371.
54. Majewska D., Jakubowska M., Ligocki M., Tarasewicz Z., Szczerbińska D., Karamucki T., Sales J., 2009. Physiochemical characteristics. proximate analysis and mineral composition of ostrich meat as influence by muscle. *Food Chemistry*. 117, 207-211.
55. Martinez L., Djenane D., Cilla I., Beltran J. A., Roncales P., 2005. Effect of different concentrations of carbon dioxide and low concentration of carbon monoxide on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 71, 563–570.
56. Moczowska M., Póltorak A., Montowska M., Pospiech E., Wierzbicka A., 2017a. The effect of the packaging system and storage time on myofibrillar protein degradation and oxidation process in relation to beef tenderness. *Meat Science* 130, 7–15.
57. Moczowska M., Póltorak A., Wierzbicka A., 2017b. The effect of ageing on changes in myofibrillar protein in selected muscles in relation to the tenderness of meat obtained from cross-breed heifers. *International Journal of Food Science and Technology* 52, 1375–1382.
58. Naveena B.M., Kiran M., 2014. Emu Meat: New Source of Healthier Meat Towards Niche Market. *Food Reviews International* 30, 22–35.
59. Naveena B.M., Muthukumar P.S., Kulkarni V.V., Praveen Kumar Y., Usha Rani K., Kiran M., 2015. Effect of aging on the physicochemical. textural. microbial and proteome changes in emu (*Dromaius novaehollandiae*) meat under different packaging conditions. *Journal of Food Processing and Preservation* 39, 2497-2506.
60. Nieva-Echevarría B., Goicoechea E., Guillén M.D., 2018. Food lipid oxidation under gastrointestinal digestion conditions: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1538931>.
61. Ntzimani A. G., Paleologos E. K., Savvaidis I. N., Kontominas M. G., 2008. Formation of biogenic amines and relation to microbial flora and sensory changes in smoked turkey breast fillets stored under various packaging conditions at 4 °C. *Food Microbiology* 25, 509–517

62. Nair M.N., Suman S.P., Li S., Joseph P., Beach C.M., 2014. Lipid oxidation-induced oxidation in emu and ostrich myoglobins. *Meat Science* 96 984-993.
63. Orkusz A., Haraf G., Okruszek A., Wereńska-Sudnik M., 2017. Lipid oxidation and color changes of goose meat stored under vacuum and modified atmosphere conditions. *Poultry Science* 96, 3, 731-737.
64. Paleari M.A., Camisasca S., Beretta G., Renon G., Corsico P., Bertolo G., Crivelli G., 1998. Ostrich Meat: Physico-chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. *Meat Science* 48, 205-210.
65. Petracci M., Cavani C., 2012. Muscle Growth and Poultry Meat Quality Issues. *Nutrients* 4, 1, 1-12.
66. Poławska E., Póltorak A., Wyrwisz J., Wierzbička A., Gutkowska K., Pomianowski J., Zdanowska-Sąsiadek Z., Wójcik A., Kawka M., Raes K., 2014. The physical traits and fatty acids profile of ostrich meat enriched in n3 fatty acids as influenced by duration of refrigerated storage and type of packaging. *Animal Science Papers and Reports* 32, 351–358.
67. Poławska E., Zdanowska-Sąsiadek Ż., Horbańczuk J.O., Pomianowski J., Jóźwik A., Tolik D., Ras K., De Smet S., 2016. Effect of dietary organic and inorganic selenium supplementation on chemical, mineral and fatty acid composition of ostrich meat. *CyTa Journal of Food* 14, 1, 84-87.
68. Ramos A., Cabrera M.C., Del Puerto M., Saadoun A., 2009. Minerals, Haem and non-haem iron contents of rhea meat. *Meat Science* 81, 116-119.
69. Rennere M., Dumont F., Gatellier P., 1996. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Science* 43, 111–121.
70. Richards M.P., Modra A.M., Li R., 2002. Role of Deoxyhemoglobin in Lipid Oxidation of Washed Cod Muscle Mediated by Trout, Poultry and Beef Hemoglobins. *Meat Science* 62, 157–163.
71. Sales J., 1994. Identification and improvement of quality characteristics of ostrich meat [Ph. thesis]. Stellenbosch: University of Stellenbosch.
72. Sales J., 1996 Histological, biophysical, physical and chemical characteristics of different ostrich muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70, 109-114.
73. Sales J., Mellet F.D., 1996. Post-mortem pH decline in different ostrich muscles *Meat Science* 42, 2, 235-238.
74. Sales J., 1998. Fatty acid composition and cholesterol content of different ostrich muscles, *Meat Science* 49, 4, 489-492.

75. Sales J., Navarro J.L., Bellis L., Manero A., Lizurume M., Martella M.B., 1997 Carcase and component yields of rheas. *British Poultry Science* 38, 378-380.
76. Sales J., Navarro J.L., Bellis L., Manero A., Lizurume M., Martella M.B., 1998. *Post Mortem* pH decline as influenced by species in different rhea muscles. *The Veterinary Journal* 155, 209-211.
77. Sakowska A., Guzek D., Sun D.W., Wierzbicka A., 2016. Effects of 0.5% carbon monoxide in modified atmosphere packaging on selected quality attributes of *M. Longissimus dorsi* beef steaks. *Journal of Food Process Engineering* doi:10.1111/jfpe.12517.
78. Sante-Lhoutellier V., Astruc T., Marinova P., Greve E., Gatellier P., 2008. Effect of Meat Cooking on Physicochemical State and In Vitro Digestibility of Myofibrillar Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1488–1494.
79. Seydim A.C., Acton J.C., Hall M.A., Dawson P.L., 2006. Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Science* 73, 503–510.
80. Sobral M.M.C., Casal S., Faria M.A., Cunha S.C., Ferreira I. M.P. L.V. O., 2020. Influence of culinary practices on protein and lipid oxidation of chicken meat burgers during cooking and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food and Chemical Toxicology* 141, 111401.
81. Thomas A.R., Gondoza H., Hoffman L.C., Oosthuizen V., Naudé R.J., 2004. The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat Science* 67, 113–120.
82. Van Hecke T., Basso V., De Smet S., 2018. Lipid and protein oxidation during in vitro gastrointestinal digestion of pork under helicobacter pylori gastritis conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 49, 13000-13010.
83. Van Hecke T., Ho P.L., Goethals S., De Smet S., 2017a. The potential of herbs and spices to reduce lipid oxidation during heating and gastrointestinal digestion of a beef product. *Food Research International* 102, 785-792.
84. Van Hecke T., Van Camp J., De Smet S., 2017b. Oxidation during digestion of meat: interactions with the diet and helicobacter pylori gastritis, and implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16, 2, 214-233.
85. Van Hecke T. Goethals S., Vossen E., De Smet S., 2019. Long-chain n-3 PUFA content and n-6/n-3 PUFA ratio in mammal, poultry, and fish muscles largely explain differential protein and lipid oxidation profiles following in vitro gastrointestinal digestion. *Molecular Nutrition & Food Research* 63, 22, 1900404.

86. Van Hecke T., Vossen E., Hemeryck L., Vanden Bussche J., Vanhaecke L., De Smet S., 2015. Increased oxidative and nitrosative reactions during digestion could contribute to the association between well-done red meat consumption and colorectal cancer. *Food Chemistry* 187, 29-36.
87. Van Hecke T., Vossen E., Vanden Bussche J., Raes K., Vanhaecke L., 2014. Fat content and nitrite-curing influence the formation of oxidation products and NOC-Specific DNA adducts during *in vitro* digestion of meat. *PLoS ONE* 9(6): e101122. doi:10.1371/journal.pone.0101122.
88. Vázquez B. I., Carriera L., Franco C., Fente C., Cepeda A., Barros-Velázquez J., 2004. Shelf-life extension of beef retailcuts subjected to an advanced vacuum skin packaging system. *European Food Research and Technology* 218, 118–122.
89. Veberg A., Sorheim O., Moan J., Iani V., Juzenas P., Nilsen A. N., Wold J. P., 2006. Measurement of lipid oxidation and porphyrins in high oxygen modified atmosphere and vacuum-packed minced turkey and pork meat by fluorescence spectra and images. *Meat Science* 73, 511–520.
90. Wyrwisz J., Moczowska M., Kurek M., Stelmasiak A., Póltorak A., Wierzbicka A., 2016. Influence of 21 days of vacuum-aging on color, bloom development, and WBSF of beef semimembranosus. *Meat Science* 122, 48–54.
91. Zakrys-Waliwander, P.I.; O’Sullivan, M.G.; Walsh, H.; Allen, P.; Kerry, J.P., 2011. Sensory comparison of commercial low and high oxygen modified atmosphere packed sirloin beef steaks. *Meat Science*, 88, 198–202.
92. Zakrys-Waliwander P.I., O’Sullivan M.G., O’Neill E.E., Kerry J.P., 2012. The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine *M. longissimus dorsi* muscle during chilled storage. *Food Chemistry*, 131, 527–532.
93. Zdanowska-Sąsiadek Ź., Marchewka J., Horbańczuk J.O., Wierzbicka A., Lipińska, P., Jóźwik A., 2018. Nutrients composition in fit snacks made from ostrich, beef and chicken dried meat. *Molecules* 23, 1267.

8. Załączniki:

1. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 1
2. Publikacja 1 - **Horbańczuk O.K.**, Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* 24 (22), 4128.

3. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 2
4. Publikacja 2 - **Horbańczuk O.K.**, Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* 26(11):3445.

5. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 3
6. Publikacja 3 - **Horbańczuk O.K.**, Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. *Biomolecules* 11(9):1338.

7. Oświadczenia o współautorstwie autorów publikacji 4
8. Publikacja 4 - **Horbańczuk O.K.**, Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Animal Science Papers and Reports* 39, 3, 251-259.

Publikacje:

Praca nr 1

Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* 24 (22), 4128. IF= 4.41

Praca nr 2

Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* 26(11):3445. IF= 4.41

Praca nr 3

Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. *Biomolecules* 11(9):1338. IF = 4.88

Praca nr 4

Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Animal Science Papers and Reports* 39, 3, 251-259. IF= 1.07

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Olaf Horbańczuk
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 014
olaf_horbanczuk@sggw.edu.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. Molecules 24 (22), 4128 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji pracy, prowadzeniu badań, analizie wyników, dyskusji wyników oraz opracowaniu wyników, co stanowi 65 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Małgorzata Moczowska
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 36 699
malgorzata_moczowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności
i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. Molecules 24 (22), 4128 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu badań i pomocy merytorycznej, co stanowi 10% całej pracy.

Podpis



Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Joanna Marchewka
Postępu 36A, Jastrzębiec,
05-552 Magdalenka
j.marchewka@igbzpan.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. Molecules 24 (22), 4128 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie wyników, obliczeniach statystycznych, co stanowi 10 % całej pracy.


Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Atanas G. Atanasov
Spitalgasse 23, 1090 Wiedeń, Austria,
Medical University of Vienna
Atanas.Atanasov@dhps.lbg.ac.at

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. Molecules 24 (22), 4128 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 5 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Marcin Kurek
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 078
marcin_kurek@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności
i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Moczowska M., Marchewka J., Atanasov A.G., Kurek M.A., 2019. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* 24 (22), 4128 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał nadzorze merytorycznym i prowadzeniu badań, co stanowi 10 % całej pracy.

Podpis



Article

The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage

Olaf K. Horbańczuk ^{1,*}, Małgorzata Moczowska ¹ , Joanna Marchewka ²,
Atanas G. Atanasov ^{2,3,4}  and Marcin A. Kurek ¹

¹ Division of Engineering in Nutrition, Department of Technique and Food Product Development, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW) 159c Nowoursynowska, 02-776 Warsaw, Poland; malgorzata_moczowska@sggw.pl (M.M.); marcin_kurek@sggw.pl (M.A.K.)

² Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, 05-552 Jastrzebiec, Poland; j.marchewka@ighz.pl (J.M.); atanas.atanasov@univie.ac.at (A.G.A.)

³ Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, 23 Acad. G. Bonchev str., 1113 Sofia, Bulgaria

⁴ Department of Pharmacognosy, University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

* Correspondence: olaf_horbanczuk@sggw.pl; Tel.: +48-22-59-37-078

Received: 4 October 2019; Accepted: 13 November 2019; Published: 15 November 2019



Abstract: Ostrich meat is a high-quality dietetic product, however, it is very sensitive to deterioration during storage. The aim of this study was to assess the effect of packaging systems on the fatty acid (FA) profiles in ostrich meat during refrigerated storage. The systems were: Vacuum packaging (VP) and modified atmosphere packaging (MAP) in two combinations of gases: MAP1 (40% O₂/40% CO₂/20% N₂) and MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂). Samples were taken from the *M. iliofibularis* (IF) muscles of eight ostriches in each treatment group. The packs were stored in a refrigerator at 2 °C and analyzed at 0, 4, 8, 12 and 16 days. The packaging conditions and storage time had an impact on the concentration of bioactive compounds such as polyunsaturated fatty acids (PUFA), including n-3 such as C18:3, C20:5 (EPA) and C22:6 (DHA). The least changes in composition of n-3 and the sum of PUFA were recorded in ostrich meat packaged in vacuum, followed by that packaged using MAP1 and MAP2. The sum of n-6 PUFAs decreased significantly by 2.1% for MAP2, and only by 0.7% for vacuum packaging as the experiment progressed. A significant deterioration of these compounds was observed in all package systems, especially from day 12 until day 16 of storage.

Keywords: ostrich meat; PUFA; vacuum; modified atmosphere packaging; storage time

1. Introduction

A growing demand for ostrich meat has been observed globally over the last decades [1–5]. Popularity of ostrich meat can be attributed to the fact that it is recognized as a dietetic product, characterized by low fat levels (less than 2 mg/100 g) [6], a lower calorific value of 390 kJ/100 g as compared to beef (517 kJ/100 g), as well as a high share of polyunsaturated fatty acids (PUFA) [4]. For example, the PUFA content in ostrich meat (24–38% sum of fatty acids in total) reached higher levels compared to chicken meat –19% and beef –4.8% (sum of fatty acids in total) [7]. In addition, the ratio of saturated fatty acids (SFA) to monounsaturated fatty acids (MUFA) to PUFA in ostrich meat is often 1:1:1, which is very important from a dietetic point of view. Cholesterol content in ostrich meat is also lower in comparison to beef and chicken meat, with 54 mg/100 g as reported for raw ostrich meat [4]. Moreover, ostrich meat is high in iron (4 mg/100 g), selenium, vitamin B, and biologically active peptides, such as anserine [8–10]. Therefore, this type of meat has gained the appreciation of consumers that are aware of its high dietary quality. However, the abundance of

nutrient compounds in ostrich meat, including bioactive molecules such as PUFAs makes this meat highly susceptible to oxidation processes [11–17]. The oxidative deterioration of PUFAs causes the formation of hydroperoxides, which leads to formation of aldehydes, ketones, and other oxygenated compounds, which are then considered to be responsible for the decrease of meat quality during storage. Lipid oxidation is an important factor related to shelf life and consumer acceptance of fresh meat [7]. One of the possible measures of retaining the optimal ostrich meat composition may include the use of an effective packaging type to protect its nutritional properties [16]. However, up to date research on ostrich meat shelf life quality, packaging type and its behavior during storage in relation to its bioactive molecule composition, especially PUFAs, is still lacking. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of packaging systems: Vacuum packaging (VP) and modified atmosphere packaging (MAP) in two combinations of gases: MAP1 (40% O₂/40% CO₂/20% N₂) and MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂), on the fatty acid profiles of ostrich meat during refrigerated storage of up to 16 days.

2. Results and Discussion

2.1. Chemical Composition

The chemical composition of ostrich meat as an initial characterization of samples based on NIR spectroscopy is presented in Table 1. The data are in agreement with Hoffman et al. [6], who found ostrich meat contained 21.65%, 1.95%, and 1.2% of protein, fat and ash, respectively. Similar values in the proximate composition of ostrich meat were also reported by Majewska et al. [18].

Table 1. Chemical composition (g/100 g edible portion) of raw ostrich meat (Mean ± SE).

Parameters	Mean ± SE ^a
Moisture	75.40 ± 0.26
Fat	1.95 ± 0.03
Protein	21.50 ± 0.11
Ash	1.15 ± 0.01

^a Standard error.

2.2. Fatty Acid Profile

As shown in Table 2, the concentration of individual SFA in ostrich meat did not differ significantly depending on the storage duration and type of packaging (except for C16:0). The significant changes in C16:0 levels between day 0 and 16 were only observed when meat was packaged under MAP2 conditions, while for vacuum packaging the change was by only 0.2%, followed by a 0.4–1% change in MAP (Table 2). The same effects were observed for MUFA (Table 3). These fatty acids were not generally affected by the type of packaging and storage duration. Only the palmitoleic acid (C16:1) and eicosenoic acid (C20:1 n9) were influenced by the packaging conditions and storage duration, and decreased over the course of storage time for MAP2 (C16:1 decreased from 7.90 percent on the initial day to 7.00 percent on day 16, while the decrease for MAP1 and vacuum system was seen to a lesser extent). Similar tendencies regarding palmitoleic acid were reported by Conchillo et al. [17] in chicken meat during 6 days of storage time at the temperature of 4 °C. The results of our investigation are also in agreement with the study carried out on ostrich meat packaged in vacuum and skin pack, and stored up to 14 days by Polawska et al. [19], in which there were no significant differences in MUFA values between the two systems of packaging: Vacuum vs skin pack.

Table 2. Saturated fatty acids (SFA) composition (%) in the estimated total sum of fatty acid (FA) (mean \pm SE) in ostrich meat as related to the type of packaging and refrigerated storage.

Fatty Acid (%)	Method	Day				
		0	4	8	12	16
C14:0	MAP1	0.57 \pm 0.12	0.57 \pm 0.09	0.57 \pm 0.09	0.57 \pm 0.09	0.58 \pm 0.12
	MAP2	0.57 \pm 0.12	0.57 \pm 0.09	0.58 \pm 0.12	0.59 \pm 0.11	0.58 \pm 0.12
	Vacuum	0.57 \pm 0.12	0.57 \pm 0.10	0.57 \pm 0.08	0.57 \pm 0.06	0.58 \pm 0.05
C15:0	MAP1	0.02 \pm 0.00				
	MAP2	0.02 \pm 0.00				
	Vacuum	0.02 \pm 0.00				
C16:0	MAP1	21.37 \pm 0.21	21.44 \pm 0.10	21.53 \pm 0.12	21.59 \pm 0.12	21.71 \pm 0.14b
	MAP2	21.37 \pm 0.21B	21.42B \pm 0.10	21.45B \pm 0.13	21.52B \pm 0.12	22.72 \pm 0.07Aa
	Vacuum	21.37 \pm 0.21	21.42 \pm 0.12	21.47 \pm 0.10	21.50 \pm 0.09	21.54 \pm 0.15b
C17:0	MAP1	0.12 \pm 0.00	0.12 \pm 0.00	0.13 \pm 0.00	0.12 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00
	MAP2	0.12 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00
	Vacuum	0.12 \pm 0.00	0.12 \pm 0.00	0.12 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00
C18:0	MAP1	9.81 \pm 0.08	9.84 \pm 0.09	9.87 \pm 0.08	9.90 \pm 0.06	9.99 \pm 0.08
	MAP2	9.81 \pm 0.08	9.88 \pm 0.01	9.91 \pm 0.04	9.95 \pm 0.10	10.25 \pm 0.11
	Vacuum	9.81 \pm 0.08	9.83 \pm 0.09	9.85 \pm 0.02	9.88 \pm 0.13	9.92 \pm 0.13

Mean values bearing different letters either for each day within rows (A, B) or between packaging systems within columns (a, b) differ significantly at $p < 0.05$. ND, not detectable = $[100 - \sum(\text{SFA} + \text{MUFA} + \text{PUFA})]$. MUFA - monounsaturated fatty acids, PUFA - polyunsaturated fatty acids. MAP1 (40% O₂/40% CO₂/20% N₂) and MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂).

Ostrich meat is a relatively rich source of valuable PUFAs including n-3, as compared to beef and chicken [20–22], which could be advantageous in its positive marketing. Intake of n-3 fatty acids reduces the incidence of coronary disease, and allows for greater antithrombotic and antiatherogenic effects than does the intake of the corresponding n-6 polyunsaturated fatty acids [4,23–25]. In the current study, the packaging conditions had a significant impact on the concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids (Table 4), especially on C18:3, C20:4, C20:5 (EPA - eicosapentaenoic acid), C22:6 (DHA - docosahexaenoic acid) which were influenced by the type of packaging and refrigerator storage duration. In the case of C18:3, the significant change was observed for MAP2 (Table 4). Up to day 8 of the experiment, the changes were not statistically significant, however, a decrease in fatty acid (FA) content resulting from the process of oxidation began to be noted between days 8, 12 and 16 of the experiment. It was noticed that vacuum packaging maintained the levels of DHA in ostrich meat without any changes over the course of the experiment. In the case of EPA, the decrease of its concentration over the 16 days of the experiment was also not statistically significant. On the other hand, MAP1 allowed the above mentioned FA levels to be maintained up to day 12, with a drop to 0.43% in EPA afterwards. When packaged using MAP2, the level of EPA decreased significantly from the initial 0.57% down to 0.33% on day 16. In line with this, a decrease in EPA during refrigerated storage was also shown in the study on chicken meat conducted by Conchillo et al. [17].

Table 3. MUFA composition (%) in the estimated total sum of FA (mean \pm SE) in ostrich meat as related to the type of packaging and refrigerated storage.

Fatty Acid (%)	Method	Day				
		0	4	8	12	16
C14:1	MAP1	0.08 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00
	MAP2	0.08 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00
	Vacuum	0.08 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00
C15:1	MAP1	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00	0.16 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01
	MAP2	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.00	0.16 \pm 0.01	0.15 \pm 0.00	0.15 \pm 0.01
	Vacuum	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.00	0.16 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01
C16:1	MAP1	7.90 \pm 0.09A	7.92 \pm 0.07A	7.59 \pm 0.09AB	7.33 \pm 0.07AB	7.15 \pm 0.07Bb
	MAP2	7.90 \pm 0.09A	7.87 \pm 0.01A	7.70 \pm 0.04A	7.41 \pm 0.14B	7.06 \pm 0.06Bb
	Vacuum	7.90 \pm 0.09A	7.93 \pm 0.08A	7.65 \pm 0.06AB	7.52 \pm 0.11B	7.43 \pm 0.08Ba
C18:1 n9t	MAP1	0.25 \pm 0.01	0.25 \pm 0.00	0.26 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01
	MAP2	0.25 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01
	Vacuum	0.25 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.26 \pm 0.00	0.27 \pm 0.01
C18:1 n9c	MAP1	29.96 \pm 0.15	30.02 \pm 0.17	29.75 \pm 0.18	29.29 \pm 0.14	28.98 \pm 0.17
	MAP2	29.96 \pm 0.15	30.05 \pm 0.22	29.94 \pm 0.17	29.72 \pm 0.14	29.56 \pm 0.13
	Vacuum	29.96 \pm 0.15	29.93 \pm 0.14	29.75 \pm 0.15	29.41 \pm 0.10	29.18 \pm 0.09
C20:1 n9	MAP1	0.21 \pm 0.02B	0.23 \pm 0.01B	0.26 \pm 0.01AB	0.27 \pm 0.01AB	0.30 \pm 0.01Aa
	MAP2	0.21 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.24 \pm 0.00b
	Vacuum	0.21 \pm 0.02B	0.21 \pm 0.00B	0.23 \pm 0.00AB	0.25 \pm 0.01AB	0.27 \pm 0.01Aab

Mean values bearing different letters either for each day within rows (A, B) or between packaging systems within columns (a, b) differ significantly at $p < 0.05$. ND, not detectable = $[100 - \sum(\text{SFA} + \text{MUFA} + \text{PUFA})]$.

Similar tendencies were reported for the sum of PUFA, including total n-3 PUFA (Table 5). The sum of n-6 PUFAs in our study decreased over the course of the experiment by 2.14% for MAP2, and only by 0.7% for vacuum packaging. This further influenced the n-6/n-3 ratio, which in the case of vacuum packaging did not change, but increased significantly for MAP2 (Table 5). A tendency for a decrease in the content of PUFA during storage was shown by Poławska et al. [18], who assessed the fatty acid profile of ostrich meat enriched in n-3 fatty acids, packaged in different types of packaging and stored in a refrigerator for 14 days. In the investigation conducted on beef meat by Mahecha et al. [26], a decrease in PUFA content of the longissimus muscle of German Simmental was demonstrated after 14 days of storage. A decline in the PUFA content during storage was also reported by Echarte et al. [27] in pork meat, as well as by Dal Bosco et al. [28] in rabbit meat after 8 days of storage. Interesting results were also obtained in another study done by Dal Bosco et al. [29] who investigated the effect of diet (enriched with linseed) and packaging system on the oxidative status and polyunsaturated fatty acid content of rabbit meat during 10 days of storage under chilled conditions. After linseed supplementation of the rabbit diet, the concentration of PUFA in fresh rabbit meat was significantly higher (36.9 vs 29.5% in total sum of FA) than in control group. However, the higher level of total PUFA's including C18:3, C20:5 (EPA) and C22:6 (DHA) determined a significantly higher lipid oxidation and the decrease in PUFA's content in meat during 10 days of storage. Thus, the results of our study are in agreement with the findings of Dal Bosco et al. [29]. On the other hand, the use of stereospecific analysis of FA in the study on rabbit meat done by D'Arco et al. [30] had positive effects on the FA profile, especially on the long chain PUFAs.

Table 4. PUFA composition (%) in the estimated total sum of FA (mean \pm SE) in ostrich meat as related to the type of packaging and refrigerated storage.

Fatty Acid (%)	Method	Day				
		0	4	8	12	16
C18:2 n-6c	MAP1	18.70 \pm 0.10	18.61 \pm 0.12	18.23 \pm 0.09	17.97 \pm 0.18	17.61 \pm 0.11
	MAP2	18.70 \pm 0.10	18.71 \pm 0.14	18.04 \pm 0.12	17.73 \pm 0.20	17.2 \pm 0.11
	Vacuum	18.70 \pm 0.10	18.67 \pm 0.01	18.44 \pm 0.07	18.11 \pm 0.11	17.92 \pm 0.17
C18:3 n-3	MAP1	1.98 \pm 0.04	1.97 \pm 0.02	1.94 \pm 0.04	1.89 \pm 0.02a	1.83 \pm 0.03a
	MAP2	1.98 \pm 0.04A	1.95 \pm 0.01A	1.89A \pm 0.02A	1.75 \pm 0.06Bb	1.46 \pm 0.03Cb
	Vacuum	1.98 \pm 0.04	1.97 \pm 0.03	1.95 \pm 0.02	1.93 \pm 0.03a	1.94 \pm 0.03a
C20:2 n-6	MAP1	0.19 \pm 0.01	0.19 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00	0.16 \pm 0.00
	MAP2	0.19 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	0.17 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00
	Vacuum	0.19 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.19 \pm 0.00	0.19 \pm 0.01	0.17 \pm 0.00
C20:3 n-6	MAP1	0.21 \pm 0.01A	0.21 \pm 0.00A	0.19 \pm 0.01A	0.17 \pm 0.00AB	0.15 \pm 0.00B
	MAP2	0.21 \pm 0.01A	0.21 \pm 0.02A	0.19 \pm 0.01A	0.15 \pm 0.00Bb	0.14 \pm 0.00Bb
	Vacuum	0.21 \pm 0.01	0.21 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00	0.19 \pm 0.006a	0.18 \pm 0.00a
C20:4 n-6	MAP1	5.44 \pm 0.05	5.42 \pm 0.07	5.34 \pm 0.07	5.30 \pm 0.09	5.23 \pm 0.05a
	MAP2	5.44 \pm 0.05A	5.35A \pm 0.06A	5.19 \pm 0.03A	5.04 \pm 0.06B	4.79 \pm 0.13bB
	Vacuum	5.44 \pm 0.05	5.41 \pm 0.05	5.39 \pm 0.02	5.34 \pm 0.06	5.32 \pm 0.07a
C20:5 (EPA)	MAP1	0.57 \pm 0.01A	0.55 \pm 0.02A	0.53 \pm 0.02A	0.5 \pm 0.01Aa	0.43 \pm 0.01Bc
	MAP2	0.57 \pm 0.01A	0.57 \pm 0.01A	0.55 \pm 0.02A	0.42 \pm 0.01Bb	0.33 \pm 0.01Cb
	Vacuum	0.57 \pm 0.01	0.56 \pm 0.01	0.55 \pm 0.01	0.52 \pm 0.02a	0.51 \pm 0.01a
C22:6 (DHA)	MAP1	0.67 \pm 0.02A	0.64 \pm 0.01A	0.62 \pm 0.02A	0.59 \pm 0.02B	0.45 \pm 0.01Cb
	MAP2	0.67 \pm 0.02A	0.63 \pm 0.01A	0.61 \pm 0.02A	0.53 \pm 0.01Bb	0.25 \pm 0.09Cc
	Vacuum	0.67 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01	0.65 \pm 0.01	0.63 \pm 0.02a	0.65 \pm 0.09a

Mean values bearing different letters either for each day within rows (A, B, C) or between packaging systems within columns (a, b, c) differ significantly at $p < 0.05$. ND, not detectable = $[100 - \sum(\text{SFA} + \text{MUFA} + \text{PUFA})]$.

Another study investigating the changes in fatty acid composition of ostrich meat enriched with linseed and rapeseed—packaged in vacuum, frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) and stored for 120 days [31]—showed a decrease in PUFA levels of the meat, as related to frozen storage duration. The results suggest that although freezing ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) is an acceptable method for preservation of ostrich meat enriched with n-3 fatty acids, it should only be done for up to 60 days, as the negative changes in PUFA profiles began to be observed only in the second period of storage (61–120 days).

Table 5. Sum of estimated FA (%) and FA ratio (mean \pm SE) in ostrich meat as related to the type of packaging and refrigerated storage.

Fatty Acid (%)	Method	Day				
		0	4	8	12	16
SFA	MAP1	31.33 \pm 0.21	31.42 \pm 0.15	31.55 \pm 0.14	31.62 \pm 0.14	31.8 \pm 0.16b
	MAP2	31.33 \pm 0.21B	31.43 \pm 0.11B	31.48 \pm 0.18B	31.59 \pm 0.18B	33.08 \pm 0.09Aa
	Vacuum	31.33 \pm 0.21	31.39 \pm 0.19	31.46 \pm 0.09	31.52 \pm 0.19	31.58 \pm 0.24b
MUFA	MAP1	38.56 \pm 0.16	38.69 \pm 0.16	38.11 \pm 0.21	37.41 \pm 0.13	36.91 \pm 0.19
	MAP2	38.56 \pm 0.16	38.68 \pm 0.21	38.39 \pm 0.20	37.88 \pm 0.20	37.36 \pm 0.17
	Vacuum	38.56 \pm 0.16	38.57 \pm 0.16	38.13 \pm 0.16	37.66 \pm 0.13	37.37 \pm 0.12
PUFA	MAP1	28.48 \pm 0.10A	28.30 \pm 0.16A	27.70 \pm 0.14AB	27.24 \pm 0.18Ba	26.38 \pm 0.16Cb
	MAP2	28.48 \pm 0.10A	28.30 \pm 0.17B	27.31 \pm 0.13Cb	26.39 \pm 0.16Db	24.69 \pm 0.21Ec
	Vacuum	28.48 \pm 0.10A	28.41 \pm 0.14A	28.08 \pm 0.07a	27.61 \pm 0.13Ba	27.61 \pm 0.13Ba
PUFA n-6	MAP1	24.21 \pm 0.11A	24.1 \pm 0.16A	23.63 \pm 0.14AB	23.33 \pm 0.18B	22.90 \pm 0.12Ba
	MAP2	24.21 \pm 0.11A	24.13 \pm 0.19A	23.30 \pm 0.13B	22.85 \pm 0.19B	22.07 \pm 0.20Cb
	Vacuum	24.21 \pm 0.11A	24.15 \pm 0.13A	23.90 \pm 0.07AB	23.52 \pm 0.12B	23.52 \pm 0.12Ba
PUFA n-3	MAP1	3.21 \pm 0.04A	3.16 \pm 0.02A	3.09 \pm 0.04A	2.98 \pm 0.02Aa	2.72 \pm 0.04Bb
	MAP2	3.21 \pm 0.04A	3.14 \pm 0.03A	3.05 \pm 0.04A	2.69 \pm 0.06bB	2.05 \pm 0.03Cc
	Vacuum	3.21 \pm 0.04	3.20 \pm 0.03	3.15 \pm 0.03	3.08 \pm 0.04a	3.08 \pm 0.04a
PUFA n-6/n-3	MAP1	7.55 \pm 0.12	7.63 \pm 0.07B	7.66 \pm 0.11B	7.84 \pm 0.10a	8.43 \pm 0.09Ab
	MAP2	7.55 \pm 0.12C	7.68 \pm 0.10C	7.66 \pm 0.13C	8.53 \pm 0.23Bb	10.78 \pm 0.13Aa
	Vacuum	7.55 \pm 0.12	7.55 \pm 0.07	7.60 \pm 0.09	7.65 \pm 0.11a	7.65 \pm 0.11c

Mean values bearing different letters either for each day within rows (A, B, C) or between packaging systems within columns (a, b, c) differ significantly at $p < 0.05$. ND, not detectable = $[100 - \sum(\text{SFA} + \text{MUFA} + \text{PUFA})]$.

3. Materials and Methods

3.1. Samples and Packaging

Meat samples were taken from the *Musculus iliofibularis* (IF) of ostriches slaughtered at the age of 10–12 months, at a weight range between 90 to 95 kg (8 in each group). The IF muscle was excised (including the removal of external fat and visible connective tissue) from the carcasses 24 h after slaughter and was cut into 2.5 cm thick steaks starting from the proximal side (sample weight: 150 ± 15 g). The steaks were then randomly assigned to one of three packaging conditions:

- Vacuum packaging systems: Each steak was packaged individually in polyamide/polyethylene (PA/PE) bags (thickness: 90 μm ; size: 20/70 mm; oxygen permeability: 50 $\text{cm}^3/\text{m}^2/24$ h; CO_2 permeability: 140 $\text{cm}^3/\text{m}^2/24$ h; water vapor permeability: 6–8 $\text{g}/\text{m}^2/24$ h) within 1 min after cutting, and vacuum packaged using a Vac-20SL2A packaging machine (Edesa Hostelera S.A., Barcelona, Spain). The in-package vacuum level was 2.5 kPa.
- Modified atmosphere packaging (MAP) in two combinations of gases, 40% O_2 /40% CO_2 /20% N_2 (MAP1) and 60% O_2 /30% CO_2 /10% N_2 (MAP2). The steaks were placed on polyethylene terephthalate/polyethylene (PET/PE) trays (parameters: 187 \times 137 \times 50 mm), and the film used was a 44 μm thick polyethylene terephthalate/cast polypropylene + antifog (PET/PPP + AF) laminate with maximum oxygen permeability not exceeding 10 $\text{cm}^3/\text{m}^2/24$ h/bar (EC04, Corenso, Helsinki, Finland). Samples were packaged with an M3 packaging machine (Sealpack, Oldenburg, Germany).

The packs were stored in a refrigerator at 2 °C for the duration of the experiment, for up to 16 days. Samples were collected in three independent replicates, and analyzed at 0 (24 h after slaughter), 4, 8, 12 and 16 days of storage.

3.2. Chemical Composition of Samples

NIR spectroscopy analysis was performed using NIRFlex Solids N-500 spectrophotometer (BUCHI Labortechnik GmbH, Switzerland) to examine the chemical composition of the samples. Results were expressed as percentage of protein, fat, moisture and ash. All six scans of each sample were examined for consistency and then averaged.

3.3. Fatty Acid Analyses

The fat from the meat (intramuscular fat) was isolated using the Folch [32] method to determine fatty acid composition. Fatty acids were extracted from homogenized samples (5 g) of muscles with the chloroform-methanol (2:1 *v/v*). Fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a GC-7890 AGILENT gas chromatograph equipped with a 60 m HEWLETT – PACKARD-88 capillary column (AGILENT J&W GC Columns, USA- Part Number: 112-8867E) with 0.25 mm inner diameter and 0.20 µm film thickness. A 1 µL sample was injected at a split ratio of 1:40. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 50 mL min⁻¹. The injector and detector were both maintained at 260 °C. Column oven temperature was programmed to increase from 140 °C (held for 5 min) at a rate of 4 °C min⁻¹ to 190 °C, and then to 215 °C at a rate 0.8 °C min⁻¹. Individual fatty acids were identified by comparison of retention times to those of a standard FAME mixture (SUPELCO 37 Component FAME Mix, SIGMA–ALDRICH Co), and expressed as the percentage (%) of FAME. A standard mixture containing all FAs was used to prepare the stock solution. Calibration curves were produced from all working standard sets by diluting half a volume with n-hexane. The stock solution of the internal standard was prepared by dissolving 0.1 g eicosanoic acid (C20:0) in 10 mL hexane.

3.4. Statistical Analysis

A generalized linear mixed model analysis (repeated measures ANOVA) was performed on all measured parameters including selected SFA, MUFA, PUFA and sum of fatty acid (%), and their ratio, in order to determine the effect of packaging treatment as a fixed factor and storage time as a repeated measure, as well as their interaction, on each variable. There were no outliers present in the dataset. Normality and homogeneity of residual variance assumptions were checked and met by all variables under investigation. A generalized linear mixed model analysis (repeated measures ANOVA) was performed on all measured parameters in order to determine the effect of packaging treatment and storage time on each variable. The validity of the models was tested using Akaike's information criterion. PROC GLIMMIX of SAS v 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the Tukey adjustment option was used to conduct the analysis. The least square means for all significant effects in the models ($p \leq 0.05$) were computed using the LSMEANS option. The trend of a significant effect was considered for $p < 0.10$.

4. Conclusions

The results of our study demonstrated that the type of packaging system: Vacuum packaging and modified atmosphere packaging in two combinations of gases: 40% O₂/40% CO₂/20% N₂ (MAP1) and 60% O₂/30%CO₂/10% N₂ (MAP2), as well as storage duration, had an impact on the fatty acid concentration, mainly PUFAs, including n-3 such as C18:3, C20:5 (EPA) and C22:6 (DHA). In the above mentioned packaging conditions, significant decreases in FA levels were shown in the last quarter of the storage period (from day 12 to day 16 of storage), while the highest oxidation stability related to the n-3 sums of PUFA was recorded in ostrich meat packaged under vacuum, followed by that packaged using MAP1 and MAP2.

Author Contributions: O.K.H. designed the experiments, contributed to data analysis, prepared the manuscript and designed study; M.M. and M.A.K. performed the experiments, contributed to data analysis and manuscript preparation; J.M. contributed to part of the data interpretation, A.G.A. contributed in reviewing the first draft. All authors critically reviewed and approved the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of Poland, project number DI 2017 003847 ‘Diamentowy Grant’.

Acknowledgments: The study was realized within the project ‘Diamentowy Grant’ (project number DI 2017 003847) of the Ministry of Science and Higher Education of Poland (agreement number: 0038/DIA/2018/47).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cooper, R.G.; Tomasik, C.; Horbańczuk, J.O. Avian influenza in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Poult. Biol. Rev.* **2007**, *18*, 87–92. [[CrossRef](#)]
2. Horbańczuk, J.O.; Tomasik, C.; Cooper, R.G. Ostrich farming in Poland—its history and current situation after accession to the European Union. *Avian Poult. Biol. Rev.* **2008**, *1*, 65–71. [[CrossRef](#)]
3. Poławska, E.; Tolik, D.; Horbańczuk, O.K.; Ciepłoch, A.; Raes, K.; De Smet, S. The effect of dietary oil seeds on the fatty acid profile and metabolism in ostrich liver. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2016**, *34*, 173–180.
4. Horbańczuk, O.K.; Wierzbicka, A. Effects of Packaging Solutions on Shelf-Life of Ratite Meats. *J. Vet. Res.* **2017**, *61*, 279–285. [[CrossRef](#)]
5. Naveena, M.B.; Kiran, M. Emu Meat: New Source of Healthier Meat Towards Niche Market. *Food Rev. Int.* **2013**, *30*, 1.
6. Hoffman, L.C.; Joubert, M.; Brand, T.S.; Manley, M. The effect of dietary fish oil rich in n-3 fatty acids on the organoleptic, fatty acid and physicochemical characteristics of ostrich meat. *Meat Sci.* **2005**, *70*, 45–53. [[CrossRef](#)]
7. Poławska, E.; Marchewka, J.; Cooper, R.G.; Sartowska, K.; Pomianowski, J.; Jóźwik, A.; Strzałkowska, N.; Horbańczuk, J.O. The ostrich meat – an updated review. II. Nutritive value. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2011**, *29*, 89–97.
8. Balog, A.I.; Almeida Paz, I.C.L. Ostrich (*Struthio camellus*) carcass yield and meat quality parameters. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* **2007**, *9*, 4. [[CrossRef](#)]
9. Sales, J.; Horbańczuk, J.O. Ratite Meat. *World. Poultry Sci. J.* **1999**, *54*, 59–67. [[CrossRef](#)]
10. Fernandez-Lopez, J.; Jimenez, S.; Sayas-Barbera, E.; Sendra, E.; Perez-Alvarez, J.A. Quality characteristics of ostrich (*Struthio camelus*) burgers. *Meat Sci.* **2006**, *73*, 295–303. [[CrossRef](#)]
11. Seydim, A.C.; Acton, J.C.; Hall, M.A.; Dawson, P.L. Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Sci.* **2006**, *73*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Botha, S.S.C.; Hoffman, L.C.; Britz, T.J. Physical meat quality characteristics of hot-deboned ostrich (*Struthio camelus* var. *Domesticus*) Muscularis gastrocnemius, pars interna during post-mortem aging. *Meat Sci.* **2007**, *75*, 709–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bingol, E.B.; Ergun, O. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 774–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Brenesselova, M.; Korenekova, B.; Macanga, J.; Marcincak, S.; Jevinova, P. Effect of vacuum packaging conditions on the quality, biochemical changes and the durability of ostrich meat. *Meat Sci.* **2015**, *101*, 42–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Leygonie, C.; Britz, T.J.; Hoffman, L.C. Meat quality comparison between fresh and frozen/thawed ostrich *M. iliofibularis*. *Meat Sci.* **2012**, *91*, 364–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Horbańczuk, O.K.; Wierzbicka, A. Technological and nutritional properties of ostrich, emu and rhea meat quality – a review. *J. Vet. Res.* **2016**, *60*, 279–286. [[CrossRef](#)]
17. Conchillo, A.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. The effect of cooking and storage on the fatty acid profile of chicken breast. *European. J. Lipid. Sci. Technol.* **2004**, *106*, 301–330. [[CrossRef](#)]
18. Majewska, D.; Jakubowska, M.; Ligocki, M.; Tarasewicz, Z.; Szczerbińska, D.; Karamucki, T.; Sales, J. Physicochemical characteristics, proximate analysis and mineral composition of ostrich meat as influenced by muscle. *Food Chem.* **2009**, *117*, 207–211. [[CrossRef](#)]

19. Poławska, E.; Póltorak, A.; Wyrwisz, J.; Wierzbicka, A.; Gutkowska, K.; Pomianowski, J.; Zdanowska-Sąsiadek, Ż.; Wójcik, A.; Kawka, M.; Raes, K.; et al. The physical traits and fatty acids profile of ostrich meat enriched in n3 fatty acids as influenced by duration of refrigerated storage and type of packaging. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2014**, *32*, 351–358.
20. Horbańczuk, J.O.; Sales, J.; Celeda, T.; Konecka, A.; Zięba, G.; Kawka, P. Cholesterol content and fatty acid composition of ostrich meat as influenced by subspecies. *Meat Sci.* **1998**, *50*, 385–388. [[CrossRef](#)]
21. Horbańczuk, J.O.; Cooper, R.G.; Józwick, A.; Klewicz, J.; Krzyżewski, J.; Malecki, I.; Chyliński, W.; Wójcik, A.; Kawka, M. Cholesterol content and fatty acid composition of fat from culled breeding ostriches (*Struthio camelus*). *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2003**, *21*, 271–275.
22. Hoffman, L.C.; Jones, M.; Muller, N.; Joubert, E.; Sadie, A. Lipid and protein stability and sensory evaluation of ostrich (*Struthio camelus*) droëwors with the addition of rooibos tea extract (*Aspalathus linearis*) as a natural antioxidant. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 1289–1296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Poławska, E.; Horbańczuk, J.O.; Pierzchała, M.; Strzałkowska, N.; Józwick, A.; Wójcik, A.; Pomianowski, J.; Gutkowska, K.; Wierzbicka, A.; Hoffman, L.C. Effect of dietary linseed and rapeseed supplementation on the fatty acid profiles in the ostrich. Part 1. Muscles. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2013**, *31*, 239–248.
24. Pogorzelska-Nowicka, E.; Atanasov, A.G.; Horbańczuk, J.; Wierzbicka, A. Bioactive Compounds in Functional Meat Products. *Molecules* **2018**, *23*, 2. [[CrossRef](#)]
25. Zdanowska-Sąsiadek, Ż.; Marchewka, J.; Horbańczuk, J.O.; Wierzbicka, A.; Lipińska, P.; Józwick, A.; Atanasov, A.G.; Huminiecki, L.; Sieroń, A.; Sieroń, K.; et al. Nutrients composition in fit snacks made from ostrich, beef and chicken dried meat. *Molecules* **2018**, *23*, 1267. [[CrossRef](#)]
26. Mahecha, L.; Nuernberg, K.; Nuernberg, G.; Ender, K.; Hagemann, E.; Dannenberger, D. Effects of diet and storage on fatty acid profile, micronutrients and quality of muscle from German Simmental bulls. *Meat Sci.* **2009**, *82*, 365–371. [[CrossRef](#)]
27. Echarte, M.; Conchillo, A.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish patés. *Food Chem.* **2004**, *86*, 47–53. [[CrossRef](#)]
28. Dal Bosco, A.; Castellini, C.; Bianchi, L.; Mugnai, C. Effect of dietary α -linolenic acid and vitamin E on the fatty acid composition, storage stability and sensory traits of rabbit meat. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 407–413. [[CrossRef](#)]
29. Dal Bosco, A.; Mattioli, S.; Cullere, M.; Szendrő, Z.; Gerencsér, Z.; Matics, Z.; Castellini, C.; Szin, M.; Dalle Zotte, A. Effect of diet and packaging system on the oxidative status and polyunsaturated fatty acid content of rabbit meat during retail display. *Meat Sci.* **2018**, *143*, 46–51. [[CrossRef](#)]
30. D’Arco, G.; Blasi, F.; Cossignani, L.; Di Giacomo, F.; Ciavardelli, D.; Ventura, F.; Scipioni, S.; Simonetti, M.S.; Damiani, P. Composition of meat and offal from weaned and fattened rabbits and results of stereospecific analysis of triacylglycerols and phosphatidylcholines. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 952–959.
31. Horbańczuk, J.O.; Poławska, E.; Wójcik, A.; Hoffman, L.C. Influence of frozen storage on the fatty acid composition of ostrich meat enriched with linseed and rapeseed. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2015**, *45*, 129–136. [[CrossRef](#)]
32. Folch, J.; Lee, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *22*, 226–497.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Olaf Horbańczuk
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 014
olaf_horbanczuk@sggw.edu.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* 26 (11):3445 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji pracy, prowadzeniu badań, opracowaniu wyników, co stanowi 60 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Artur Jóźwik
Postępu 36A, Jastrzębiec,
05-552 Magdalenka
a.jozwik@igbzpan.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Jóźwik A., Wyrwisz J., Marčhewka A., Wierzbicka A., 2021:–Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* 26 (11):3445 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie danych oraz opracowaniu wyników, co stanowi 15 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Jarosław Wyrwisz
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 078
jaroslaw_wyrwisz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności
i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. Molecules 26 (11):3445 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu doświadczenia oraz opracowaniu wyników, co stanowi 15 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Joanna Marchewka
Postępu 36A, Jastrzębiec,
05-552 Magdalenka
j.marchewka@igbzpan.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Jóźwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. Molecules 26 (11):3445 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu doświadczenia oraz opracowaniu wyników, co stanowi 5 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Agnieszka Wierzbicka
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 060
agnieszka_wierzbicka@sggw.edu.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Wierzbicka A., 2021. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. Molecules 26 (11):3445 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 5 % całej pracy.



Podpis

Article

Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time

Olaf K. Horbańczuk ^{1,*}, Artur Józwiak ², Jarosław Wyrwisz ¹, Joanna Marchewka ² and Agnieszka Wierzbicka ^{1,2}

¹ Department of Technique and Food Product Development, Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW), 159c Nowoursynowska, 02-776 Warsaw, Poland; jaroslaw.wyrwisz@sggw.edu.pl (J.W.); agnieszka_wierzbicka@sggw.edu.pl (A.W.)

² Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, 05-552 Jastrzębiec, Poland; aa.jozwiak@igbzpan.pl (A.J.); j.marchewka@igbzpan.pl (J.M.)

* Correspondence: olaf_horbanczuk@sggw.edu.pl

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of the packaging system type on the physical characteristics and microbial changes in ostrich meat during refrigerated storage. The applied packaging systems were vacuum packaging (VP) and modified atmosphere packaging (MAP) using two combinations of gases: MAP1 (40% O₂/40% CO₂/20% N₂) and MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂). Eight meat samples were obtained in three replicates for all parameters, except for pH, for which six replicates were obtained from the *M. ilifibularis* (IF) muscle, and were stored in a refrigerator at 2 °C and analyzed at 0, 4, 8, 12 and 16 days for the effect of packaging methods on physical meat quality. The initial pH (5.99) decreased at the end of the storage time for MAP1 to 5.81, whereas VP was stable from day 0 to 12 and increased up to 6.08 on day 16. Regarding meat color, the L* value increased during storage for MAP1 and MAP2 from 36.99 to 40.75 and 41.60, respectively, whereas it declined for VP to 34.22. The same tendencies were reported for redness (a*) and yellowness (b*). Drip loss was the lowest in MAP1 and highest in VP. The lowest total viable bacteria counts were identified in VP, as compared to MAP1 and MAP2.

Keywords: ostrich meat; microbial quality; color; pH; cooking loss; drip loss; shear force



Citation: Horbańczuk, O.K.; Józwiak, A.; Wyrwisz, J.; Marchewka, J.; Wierzbicka, A. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* **2021**, *26*, 3445. <https://doi.org/10.3390/molecules26113445>

Academic Editor: Carmen Cuadrado

Received: 16 April 2021

Accepted: 3 June 2021

Published: 6 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ostrich meat is recognized as a dietetic product with high nutritive value [1–3] and is becoming increasingly popular, not only in South Africa but also in Asia, South America, North America, and Europe [4–10]. Among European countries, Poland is one of the leaders in production of ostrich meat, exporting ca. 500 tons per year [11]. This meat, dark red in color, is characterized by higher pH (about 6) as compared to beef or pork [12–14]. The relatively high pH value of ostrich meat negatively affects the quality of this meat during storage [15–18]. In retail, meat is most often packed in vacuum and modified atmosphere packaging. Vacuum packaging provides anaerobic conditions inside the package, which leads to shelf-life extension and provides stable color [19,20]. MAP prolongs shelf life with aerobic packaging conditions and results in a more attractive bright red color due to myoglobin oxygenation [21]. Extended shelf life and meat safety aspects are very important both for the meat industry and for the consumers [20]. However, until now, investigation on ostrich meat quality, shelf life, packaging type and storage is still limited. Thus, the aim of the study was to assess the changes in the physical characteristics and microbial quality of ostrich meat packed in vacuum (VP) and modified atmosphere (MAP) using two combinations of gases, O₂:CO₂:N₂, i.e., 40:40:20 (MAP 1) and 60:30:10 (MAP 2), during refrigerated storage up to 16 days.

2. Results and Discussion

2.1. pH

The change in pH value as related to the storage time and type of packaging are presented in Table 1. In the case of the modified atmosphere (MAP1) packaging system using a combination of gases (O₂:CO₂:N₂, i.e., 40:40:20), the initial pH (5.99) on day 0 decreased at the end of storage time (on 16 day) to 5.81 ($p \leq 0.05$). The pH value was lower in MAP1 ($p \leq 0.05$) as compared to vacuum packaging on days 8, 12 and 16 (Table 1). A significant decrease in the pH value occurred in the samples stored in the MAP1 system ($p \leq 0.05$), probably due to the higher concentration of CO₂ (40%) in the package. CO₂, by dissolving in the aqueous phase of meat, builds carbonic acid, which lowers the pH of meat [22]. In vacuum packaging (VP), pH was stable between day 0 to 12, whereas it increased on the 16th day of storage up to 6.08 ($p \leq 0.05$). The increase in pH may be due to advanced proteolysis occurring in the vacuum-packed long-stored meat [23]. Proteins in meat with higher pH value have a higher water binding capacity, which could lead to a lower level of free water in the spaces between swelling muscle fibers [24].

Table 1. pH and color coordinates (L*, a* and b*) of ostrich meat, as related to the type of packaging and refrigerated storage (mean value \pm SEM).

Parameter	Method	Day				
		0	4	8	12	16
pH	MAP1	5.99 \pm 0.00 ^A	5.90 \pm 0.00 ^{A,B}	5.89 \pm 0.00 ^{A,B,b}	5.85 \pm 0.00 ^{B,b}	5.81 \pm 0.01 ^{B,b}
	MAP2	5.99 \pm 0.00	5.95 \pm 0.00	5.92 \pm 0.00 ^{a,b}	5.91 \pm 0.01 ^{a,b}	5.93 \pm 0.01 ^{a,b}
	Vacuum	5.99 \pm 0.00 ^B	5.98 \pm 0.00 ^B	6.02 \pm 0.01 ^{A,b,a}	6.00 \pm 0.01 ^{A,B,a}	6.08 \pm 0.00 ^{A,a}
L*	MAP1	36.99 \pm 0.12 ^B	36.30 \pm 0.15 ^{B,b}	41.02 \pm 0.49 ^{A,a}	40.66 \pm 0.19 ^{A,a}	40.75 \pm 0.10 ^{A,a}
	MAP2	36.99 \pm 0.12 ^C	39.50 \pm 0.07 ^{B,a}	40.41 \pm 0.07 ^{B,a}	41.06 \pm 0.07 ^{A,a}	41.60 \pm 0.11 ^{A,a}
	Vacuum	36.99 \pm 0.12 ^{A,B}	37.39 \pm 0.13 ^{A,b}	36.85 \pm 0.09 ^{A,B,b}	36.29 \pm 0.10 ^{B,b}	34.22 \pm 0.20 ^{C,b}
a*	MAP1	19.97 \pm 0.39 ^B	21.13 \pm 0.11 ^{A,a}	20.73 \pm 0.11 ^{A,B,a}	20.56 \pm 0.11 ^{A,B,a}	20.50 \pm 0.06 ^{A,B,a}
	MAP2	19.97 \pm 0.39 ^B	21.75 \pm 0.28 ^{A,a}	20.74 \pm 0.18 ^{B,a}	20.74 \pm 0.19 ^{B,a}	20.64 \pm 0.06 ^{B,a}
	Vacuum	19.97 \pm 0.39 ^A	19.47 \pm 0.16 ^{A,B,b}	18.97 \pm 0.21 ^{B,b}	19.12 \pm 0.26 ^{A,B,b}	19.58 \pm 0.21 ^{A,B,b}
b*	MAP1	8.43 \pm 0.07 ^B	9.90 \pm 0.21 ^{A,a,b}	9.93 \pm 0.08 ^{A,a,b}	9.87 \pm 0.07 ^{A,a,b}	9.93 \pm 0.05 ^{A,a}
	MAP2	8.43 \pm 0.07 ^B	10.80 \pm 0.05 ^{A,a}	10.68 \pm 0.04 ^{A,a}	10.41 \pm 0.10 ^{A,a}	10.31 \pm 0.07 ^{A,a}
	Vacuum	8.43 \pm 0.07	8.18 \pm 0.08 ^b	8.21 \pm 0.12 ^b	8.11 \pm 0.14 ^b	8.01 \pm 0.03 ^b

Mean values bearing different letters either for each day within rows (A, B, C) or between packaging systems within columns (a, b, c) differ significantly at $p \leq 0.05$.

It should be noted that Fernandez-Lopez et al. [15], who carried out research on ostrich steaks stored in four different packaging types: air exposure, vacuum and two different modified atmosphere packages (MAP: 80% CO₂ + 20% N₂ and MAP + CO: 30% CO₂ + 69.8% argon + 0.2% CO), demonstrated a decline in pH in all types of packaging during storage time. Results similar to this study for vacuum-packed ostrich meat were obtained by Thomas et al. [25], who stored this meat up to 12 days at 4 °C.

2.2. Color Parameters

Overall, the L* (lightness) increased ($p \leq 0.05$) during the storage for MAP1 and MAP2 (from 36.99 to 40.75 and 41.60, respectively), while for VP it decreased from day 12 onwards (34.22; $p \leq 0.05$). The L* value was significantly higher ($p \leq 0.05$) in ostrich samples packed in the MAP1 and MAP2 systems from the eighth day of storage as compared to VP (Table 1).

The redness of the investigated ostrich muscles in MAP1 and MAP2 increased significantly ($p \leq 0.05$) on the fourth day of storage, likely due to myoglobin being converted into oxymyoglobin form. However, further storage caused a decrease in redness, which may be associated with a relatively high concentration of O₂, which leads to oxidation of oxymyoglobin (formed up to day 4) into metmyoglobin; this results in a lower redness

(lower a^*) [26]. The value of b^* was the lowest in the vacuum-packaging system compared to MAP2. Changes in muscle color during storage might be explained by the color of muscle tissue being conditioned by reflectance light of free water and the degree of oxidation of myoglobin [27]. A comparable trend of L^* was found by Leygonie et al. [28] in stored frozen vacuum-packed ostrich meat, but the a^* and b^* values were almost on the same level. Seydim et al. [16], in their research on the effect of packaging on shelf-life quality of ground ostrich meat, stated that in vacuum packages the meat was darker (lower L^*) as compared to 80% of O_2 in MAP packages (higher L^*). Similar changes in the a^* and b^* values in beef steaks packed in vacuum and MAP stored at 2 °C were reported by Łopacka et al. [29]. Filgueras et al. [30], in a study conducted on frozen vacuum-packed rhea meat stored for 180 days at −80 °C, reported a decline in L^* , a^* and b^* coordinates.

2.3. Drip Loss

The drip loss (%) of ostrich meat is shown in Table 2. Significant differences in drip loss ($p \leq 0.05$) depending on the type of packaging and storage time were observed. In all packaging systems, the drip loss steadily increased throughout storage time. The highest rate of water losses during storage, as expressed by the drip loss, was observed in vacuum-packed ostrich muscles from 1.80% on day 4 to 3.62% on day 16 ($p \leq 0.05$) as compared to the MAP1 and MAP2 packaging systems, where these values increased significantly in MAP1 from 1.43% on day 4 to 2.71% on the day 16, and in MAP2 from 1.61% on day 4 to 3.33% on the day 16. Moreover, only in case of the vacuum-packaging system were significant differences observed in the last period of the experimental storage, i.e., between day 12 and day 16.

Table 2. Drip loss (%), cooking loss (%) and tenderness as a WBSF (N) in ostrich meat, as related to the type of packaging and refrigerated storage (mean value \pm SEM).

Parameter	Method	Day				
		0	4	8	12	16
Drip loss	MAP1	-	1.43 \pm 0.01 ^{B,c}	1.65 \pm 0.01 ^{B,c}	2.21 \pm 0.01 ^{A,B,c}	2.71 \pm 0.00 ^{A,c}
	MAP2	-	1.61 \pm 0.00 ^{B,b}	2.01 \pm 0.01 ^{A,B,b}	2.50 \pm 0.00 ^{A,b,b}	3.33 \pm 0.01 ^{A,b}
	Vacuum	-	1.80 \pm 0.02 ^{C,a}	2.18 \pm 0.03 ^{B,C,a}	2.60 \pm 0.03 ^{B,a}	3.62 \pm 0.01 ^{A,a}
Cooking loss	MAP1	32.95 \pm 0.24	34.48 \pm 0.23	35.51 \pm 0.11	36.10 \pm 0.01	36.31 \pm 0.05
	MAP2	32.95 \pm 0.24	34.73 \pm 0.01	35.64 \pm 0.02	36.23 \pm 0.20	36.35 \pm 0.04
	Vacuum	32.95 \pm 0.24 ^B	35.02 \pm 0.11 ^{A,B}	36.21 \pm 0.29 ^{A,B}	36.65 \pm 0.18 ^A	37.61 \pm 0.39 ^A
WBSF	MAP1	33.28 \pm 0.32	31.87 \pm 0.18	31.40 \pm 0.19	30.92 \pm 0.22 ^a	30.22 \pm 0.03 ^a
	MAP2	33.28 \pm 0.32	31.77 \pm 0.15	31.66 \pm 0.30	31.29 \pm 0.17 ^a	31.07 \pm 0.25 ^a
	Vacuum	33.28 \pm 0.32 ^A	30.39 \pm 0.14 ^B	30.29 \pm 0.08 ^B	28.59 \pm 0.15 ^{C,b}	28.38 \pm 0.08 ^{C,b}

Mean values bearing different letters either for each day within rows (A, B, C) or between packaging systems within columns (a, b, c) differ significantly at $p \leq 0.05$.

Leygonie et al. [28] also noticed the increase in drip loss during storage time in frozen vacuum-packed ostrich meat stored for a month at −20 °C before thawing. However, Zakrys-Waliwander et al. [31], in their research on beef, found that drip loss was greater in MAP, but with a high oxygen level (80% of O_2) relative to vacuum. Muscle tissue shows maximum water absorption and binding capacity immediately after slaughtering, which is related to its unchanged structure [32]. During vacuum packaging, the pressure generated in the intermicellar structures of the muscles increases the loss of water from the meat outside, thus increasing the drip loss [33]. As a consequence, the relatively high drip loss and slightly elevated pH during storage in the vacuum system negatively affect the processing quality of the ostrich meat.

2.4. Cooking Loss

Losses which occur during cooking depend on the storage; generally, the rate of drip of meat juice is higher due to increased storage time [34]. However, for this parameter, a signif-

icant increase ($p \leq 0.05$) was observed only in the samples previously stored in the vacuum system on day 12 and 16 of refrigerated storage. This fact may be related to postmortem proteolysis, which leads to a weakening of the myofibrils that affect water distribution [35]. Similar tendencies were shown in the study conducted by Leygonie et al. [28].

2.5. WBSF

The initial WBSF value of ostrich meat in this study was 33.28 (N). The WBSF value decreased for all types of packaging during storage time (Table 2). Significant differences ($p \leq 0.05$) were observed only in VP on day 12 and 16 of storage. In both MAP1 and MAP2, there were no significant changes in WBSF during storage, which could be caused by the presence of O_2 in the packaging system. The higher oxygen content in packaging could increase protein aggregation and resulted in a lower proteolysis rate [36]. The higher value of WBSF in both packaging with modified atmosphere could be justified by a deceleration of proteolytic changes in muscles stored in the packaging with a modified atmosphere and higher oxygen concentration [37]. In relation to Destefanis et al. [38], who classified red meat into five groups of tenderness from very tender (WBSF < 32.96 N) to very hard (WBSF > 62.59 N), the ostrich meat samples in our study can be described as very tender after four days of storage, especially for the vacuum-packed samples (WBSF_{VP} = 30.39 N; WBSF_{MAP1} = 31.87 N; WBSF_{MAP2} = 31.77 N).

2.6. Microbial Quality

Changes in the counts of total viable count (TVC) are demonstrated in Figure 1. The TVC in the ostrich muscle samples significantly increased ($p \leq 0.05$) in each of the packaging methods during the experimental storage days. The lowest TVC was identified in VP, as compared to the two other methods. For the MAP2 packaging system, the TVC load was higher as compared to VP and MAP1, and on day 16 it increased to the level of 6.75 log CFU/g. The highest value of TVC in MAP2 can be associated with the highest concentration of the oxygen in this packaging system (60%), as compared to the other types of packaging. The relatively higher level of oxygen in this packaging system affected TVC growth, whereas CO_2 had antimicrobial effects [22]. In another study on ostrich meat, Seydim et al. [16] also demonstrated that, after 10 days of storage, TVC growth was higher where the level of oxygen was 80% (air package system) in comparison with MAP with a lower concentration of O_2 . It should be noted that an EU report [39] also stated that modified atmosphere packaging (MAP) systems have proven to enhance product quality by inhibiting the growth of bacteria or of some pathogens.

A higher value of TVC in MAP packaging systems was obtained by Bingol et al. [40] during the storage of ostrich meat at 10 days. However, the initial TVC at day 0 in their investigations was higher (over 4 log CFU/g) as related to our study (3.1 log CFU/g), and the ostrich meat was stored at 4 °C compared to 2 °C in the current research. Ostrich carcasses had higher total viable counts of bacteria than beef carcasses, indicating more processing contamination for ostrich slaughter in a small abattoir. Sanitation and temperature were stated as being the most critical factors affecting the shelf life of products with or without modified atmosphere packaging conditions [41]. Currently, ostriches are mainly slaughtered in a special abattoir with EU certification. For example, ostrich meat produced in Poland is mostly exported to Western Europe and must fulfill special hygienic and sanitation requirements [20]. Moreover, as was mentioned by Alonso-Calleja et al. [42], Capita et al. [43] and Gonzalez-Montalvo [44], the relatively high microbial load recorded in ostrich meat in comparison with other red meats has been attributed to the high pH of the ostrich meat, which creates a good environment for fast microbial spoilage in some packaging systems.

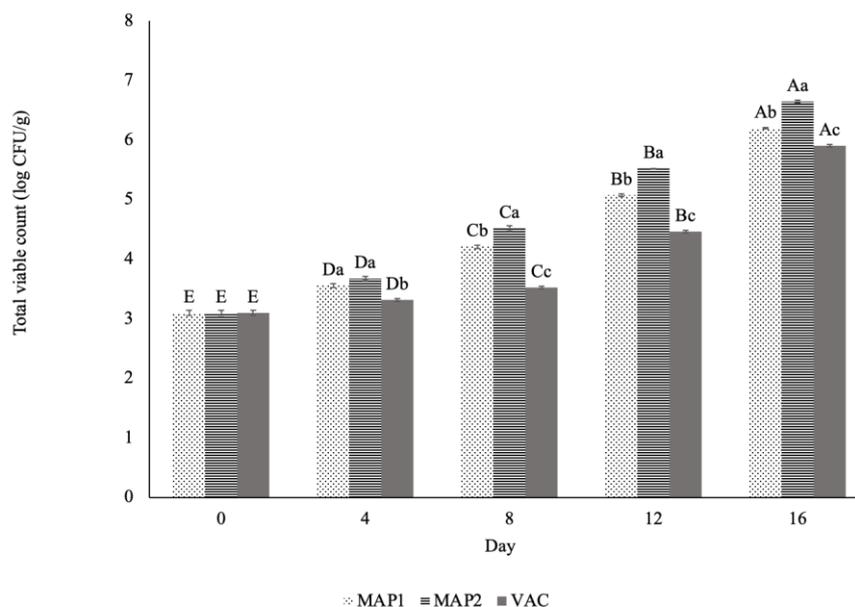


Figure 1. Total viable count (log CFU/g) in ostrich meat, as related to the type of packaging and refrigerated storage (mean value \pm SEM). Mean values bearing different letters either between days (A–E) or between packaging systems (a–d) differ significantly at $p \leq 0.05$.

3. Material and Methods

3.1. Samples and Packaging

Meat samples were obtained from the *M. iliofibularis* (IF) of 8 male ostriches, slaughtered at the age of 10–12 months, weighing from 90 to 95 kg. The slaughter procedure and carcass handling of the ostriches were described by Horbanczuk [45]. The IF muscle was excised (removal of external fat and visible connective tissue) from carcasses 24 h after slaughter and was cut, starting from the proximal side, into 2.5 cm thick steaks (sample weight: 150 g \pm 15 g). Then, each group of 8 steaks was cut into three parts and assigned to one of three packaging systems (vacuum packaging and two conditions of modified atmosphere packaging).

Vacuum-packaging systems: Each meat sample was packed individually in PA/PE bags (thickness 90 μ m (20/70), oxygen permeability 50 cm³/m²/24 h, CO₂ permeability 140 cm³/m²/24 h, and water vapor permeability 6–8 g/m²/24 h) within 1 min after cutting and vacuum-packaged using a Vac-20SL2A packaging machine (Edesa Hostelera S.A., Barcelona, Spain). The in-package vacuum level was 2.5 kPa.

Modified atmosphere packaging (MAP) was carried out with two combinations of gases, O₂:CO₂:N₂—40:40:20 (MAP1) and 60:30:10 (MAP2), respectively. The steaks were placed on PET/PE trays (parameters: 187 \times 137 \times 50 mm), and the film used was a 44 μ m thick PET/PP + AF laminate with maximum oxygen permeability not exceeding 10 cm³/m²/24 h/bar (EC04, Corenso, Helsinki, Finland). Meat samples were packed with an M3 packaging machine (Sealpack, Oldenburg, Germany).

The samples were stored in a refrigerator at 2 °C during the experiment for up to 16 days. Samples were collected in three independent replicates and analyzed at 0 (24 h after slaughter), 4, 8, 12 and 16 days of storage.

3.2. pH

The pH value of the muscles was measured in the middle part of each muscle, according to the PN-ISO 2917:1999 [46] standard. Results of the pH metric were obtained using a Testo 205 series pH meter equipped with a glass electrode, which was placed directly into the samples (2 cm deep into the steaks). Each measurement was performed in 6 repetitions, taking the mean value as the assay result.

3.3. Color Parameters

The instrumental color analysis of ostrich meat was performed using a Minolta CR-400 chromometer calibrated against a white plate ($L^* = 98.45$, $a^* = -0.10$, $b^* = -0.13$), using an 8 mm aperture illuminate D 65 (6500 K color temperature) at a standard observation of 2° . Meat color was expressed as: L^* (lightness ranged from 0 to 100), a^* (color axis ranged from greenness ($-a^*$) to redness ($+a^*$)), and b^* (color axis ranged from blueness ($-b^*$) to yellowness ($+b^*$)). Color measurements of the steak were taken from each location, including every quarter and the centers of the surfaces. Data were collected directly after opening the package [16] under refrigerated conditions ($2 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.4. Drip Loss

Muscle weight loss during storage time was determined on the basis of the difference in weight before storage (M_0) and after storage (M_1). All samples were gently blotted with tissue paper prior to weighing. Drip loss (D_L) was calculated using the equation:

$$D_L = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} \times 100\%$$

3.5. Warner–Bratzler Shear Force Determination (WBSF)

After the respective storage time, at 0 (24 h after slaughter), 4, 8, 12 and 16 days of storage meat samples were prepared for shear force analysis according to Wyrwicz et al. [47]. The steaks ($100 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$) were cooked individually in closed PA/PE bags immersed in a water bath (Memmert, WNE 14, Schwabach, Germany) at 80°C to achieve a final internal temperature of 73°C , and then were subsequently cooled down in cold water and stored overnight at $2 \pm 1^\circ\text{C}$. Instrumental measurement of WBSF was conducted using a universal testing machine, Instron (Model 5965, Norwood, MA, USA), with a Warner–Bratzler shear attachment, consisting of a V-notch blade, according to Wyrwicz et al. [27]. The cores (1.27 cm in diameter and $2.5 \pm 0.2 \text{ cm}$ in length) were obtained from each steak, parallel to the muscle fiber's orientation. A 500 N load cell was used, and the crosshead speed was set at 200 mm/min .

3.6. Cooking Loss

The percentage of cooking loss (CL) was determined through the measurement of sample mass before (M_i) and after heat treatment (80°C) after cooling to ambient temperature (M_f). CL was calculated according to the equation:

$$CL = \left(1 - \frac{M_f}{M_i}\right) \times 100\%$$

3.7. Microbial Quality

Microbiological analysis of the ostrich meat was carried out every four days of storage, including total viable bacteria (TVC). Meat samples were taken from each packaging system and transported under continued refrigeration to an accredited laboratory where measurements were performed in triplicate in accordance with the PN-EN ISO 4833-1:2013-12 [48] standard for TVC; results were expressed as \log_{10} CFU/g ostrich meat. The shelf life of the product was estimated on the basis of the limit of acceptability of 10^7 bacteria/g according to ICMSF (1986) [49].

3.8. Statistical Analysis

A generalized linear mixed-model analysis (repeated measures ANOVA) was performed on all measured parameters including physical and microbial parameters in order to determine the fixed effect of packaging treatment and storage time as a repeated measure, as well as their interaction. Ostriches' identity (bird number) was included in the model as a random factor. There were no outliers present in the dataset. Normality and

homogeneity of residual variance assumptions were checked using the Shapiro test and examination of the normal plot, and these were met by all variables under investigation. PROC GLIMMIX of SAS v 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the Tukey's adjustment option was used to conduct the analysis. The validity of the models was tested using Akaike's information criterion. The least square means for all significant effects in the models ($p \leq 0.05$) were computed using the LSMEANS option. For all analyses, results are reported as means \pm standard error of the mean (SEM).

4. Conclusions

The results from this study indicate that packaging systems including vacuum packaging (VP) and modified atmosphere packaging (MAP) using two combinations of gases: MAP1 (40% O₂/40% CO₂/20% N₂) and MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂), and storage time had an influence on the physical features and microbial quality of ostrich meat, namely, pH, color (L*, a*, b*) and drip loss, which was the least in MAP1. Both the MAP1 and MAP2 systems affected color lightening and stabilizing redness (a*). The lowest total viable count of bacteria load was identified in VP, in comparison to MAP1 and MAP2. These data may help the ostrich meat industry to improve their packaging and storage operations while providing consumers with the highest quality ostrich meat products.

Author Contributions: O.K.H. designed the experiments, contributed to data analysis, prepared the manuscript and designed study; J.W. and A.J. performed the experiments, contributed to data analysis and manuscript preparation; J.M. contributed to part of the data interpretation, A.W. contributed in reviewing the first draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded and realized within the project "Diamentowy Grant" (project number DI 2017 003847) of the Ministry of Science and Higher Education of Poland (agreement number: 0038/DIA/2018/47).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: I would like to express my deep gratitude to Thomas Van Hecke from Ghent University for the support, constructive remarks and useful critique of this research work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Horbańczuk, J.O.; Sales, J.; Celeda, T.; Konecka, A.; Zięba, G.; Kawka, P. Cholesterol content and fatty acid composition of ostrich meat as influenced by subspecies. *Meat Sci.* **1998**, *50*, 385–388. [[CrossRef](#)]
2. Horbańczuk, J.O.; Kawka, M.; Sacharczuk, M.; Cooper, R.G.; Boruszewska, K.; Parada, P.; Jaszczak, K. A search for sequence similarity between chicken (*Gallus domesticus*) and ostrich (*Struthio camelus*) microsatellite markers. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2007**, *25*, 283–288.
3. Poławska, E.; Tolik, D.; Horbańczuk, O.K.; Ciepłoch, A.; Raes, K.; De Smet, S. The effect of dietary oil seeds on the fatty acid profile and metabolism in ostrich liver. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2016**, *34*, 173–180.
4. Cooper, R.G.; Horbańczuk, J.O. Ostrich nutrition: A review from a Zimbabwean perspective. *Rev. Sci. Tech.* **2004**, *23*, 1033–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cooper, R.G.; Naranowicz, H.; Maliszewska, E.; Tennett, A.; Horbańczuk, J.O. Sex-based comparison of limb segmentation in ostriches aged 14 months with and without tibiotarsal rotation. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2008**, *79*, 142–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cooper, R.G.; Tomasik, C.; Horbańczuk, J.O. Avian influenza in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Poult. Biol. Rev.* **2007**, *18*, 87–92. [[CrossRef](#)]
7. Horbańczuk, J.O.; Tomasik, C.; Cooper, R.G. Ostrich farming in Poland—Its history and current situation after accession to the European Union. *Avian Poult. Biol. Rev.* **2008**, *1*, 65–71. [[CrossRef](#)]
8. Horbańczuk, J.O.; Poławska, E.; Wójcik, A.; Hoffman, L.C. Influence of frozen storage on the fatty acid composition of ostrich meat enriched with linseed and rapeseed. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **2015**, *45*, 129–136. [[CrossRef](#)]
9. Horbańczuk, O.K.; Moczowska, M.; Marchewka, J.; Atanasov, A.G.; Kurek, M. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* **2019**, *24*, 4128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Zdanowska-Saśiadek, Ż.; Marchewka, J.; Horbańczuk, J.O.; Wierzbicka, A.; Lipińska, P.; Józwick, A. Nutrients composition in fit snacks made from ostrich, beef and chicken dried meat. *Molecules* **2018**, *23*, 1267. [[CrossRef](#)]
11. Poławska, E.; Marchewka, J.; Cooper, R.G.; Sartowska, K.; Pomianowski, J.; Józwick, A.; Strzałkowska, N.; Horbańczuk, J.O. The ostrich meat—An updated review. II. Nutritive value. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2011**, *29*, 89–97.
12. Sales, J.; Horbańczuk, J.O. Ratite Meat. *Worlds Poult. Sci. J.* **1998**, *54*, 59–67. [[CrossRef](#)]
13. Sales, J.; Horbańczuk, J.O.; Dingle, J.; Coleman, R.; Sensik, S. Carcase characteristics emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Brit. Poult. Sci.* **1999**, *40*, 145–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Horbańczuk, O.K.; Wierzbicka, A. Technological and nutritional properties of ostrich, emu, and rhea meat quality. *J. Vet. Res.* **2016**, *60*, 279–286. [[CrossRef](#)]
15. Fernandez-Lopez, J.; Jimenez, S.; Sayas-Barbera, E.; Sendra, E.; Perez-Alvarez, J.A. Quality characteristics of ostrich (*Struthio camelus*) burgers. *Meat Sci.* **2006**, *73*, 295–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Seydim, A.C.; Acton, J.C.; Hall, M.A.; Dawson, P.L. Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Sci.* **2006**, *73*, 503–510. [[CrossRef](#)]
17. Botha, S.S.C.; Hoffman, L.C.; Britz, T.J. Physical meat quality characteristics of hot-deboned ostrich (*Struthio camelus var. Domesticus*) *Muscularis gastrocnemius*, pars interna during post-mortem aging. *Meat Sci.* **2007**, *75*, 709–718. [[CrossRef](#)]
18. Brenesselova, M.; Korenekova, B.; Macanga, J.; Marcincak, S.; Jevinova, P. Effect of vacuum packaging conditions on the quality, biochemical changes and the durability of ostrich meat. *Meat Sci.* **2015**, *101*, 42–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Jeremiah, L.E. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. *Food Res Int.* **2001**, *34*, 749–772. [[CrossRef](#)]
20. Horbańczuk, O.K.; Wierzbicka, A. Effects of packaging methods on shelf life of ratite meats. *J. Vet. Res.* **2017**, *61*, 279–285. [[CrossRef](#)]
21. Łopacka, J.; Półtorak, A.; Wierzbicka, A. Effect of reduction of oxygen concentration in modified atmosphere packaging on bovine *M. longissimus lumborum* and *M. gluteus medius* quality traits. *Meat Sci.* **2017**, *124*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Danijela, S.Z.; Vera, L.L.; Ljubinko, L.B.; Lato, P.L.; Vladimir, T.M.; Nevena, H.M. Effect of specific packaging conditions on myoglobin and meat color. *Food Feed Res.* **2013**, *40*, 1–10.
23. Cruzen, S.M.; Paulino, P.V.R.; Lonergan, S.M.; Huff-Lonergan, E. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 854–861. [[CrossRef](#)]
24. Page, J.K.; Wulf, D.M.; Schwotzer, T.R. A survey of beef muscle color and pH. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 678–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Thomas, A.R.; Gondoza, H.; Hoffman, L.C.; Oosthuizen, V.; Naudé, R.J. The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 113–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zakrys-Waliwander, P.I.; O’Sullivan, M.G.; Walsh, H.; Allen, P.; Kerry, J.P. Sensory comparison of commercial low and high oxygen modified atmosphere packed sirloin beef steaks. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 198–202. [[CrossRef](#)]
27. Wyrwisz, J.; Półtorak, A.; Poławska, E.; Pierzchała, M.; Józwick, A.; Zalewska, M. The impact of heat treatment methods on the physical properties and cooking yield of selected muscles from Limousine breed cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2012**, *30*, 339–351.
28. Leygonie, C.; Britz, T.J.; Hoffman, L.C. Meat quality comparison between fresh and frozen/thawed ostrich *M. iliofibularis*. *Meat Sci.* **2012**, *91*, 364–368. [[CrossRef](#)]
29. Łopacka, J.; Półtorak, A.; Wierzbicka, A. Effect of MAP, vacuum skin-pack, and combined packaging methods on physicochemical properties of beef steaks stored up to 12 days. *Meat Sci.* **2016**, *119*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Filgueras, R.S.; Gatellier, P.; Zambiasi, R.C.; Sante-Lhoutellier, V. Effect of frozen storage duration and cooking on physical and oxidative changes in *M. gastrocnemius* pars interna and *M. iliofibularis* rhea americana. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 645–651. [[CrossRef](#)]
31. Zakrys-Waliwander, P.I.; O’Sullivan, M.G.; O’Neill, E.E.; Kerry, J.P. The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine *M. longissimus dorsi* muscle during chilled storage. *Food Chem.* **2012**, *131*, 527–532. [[CrossRef](#)]
32. Monin, G. Recent methods for predicting quality of whole meat. *Meat Sci.* **1998**, *49*, 231–243. [[CrossRef](#)]
33. Payne, S.R.; Durhan, C.J.; Scott, S.M.; Devine, C.E. The effects of non-vacuum packaging systems on drip loss from chilled beef. *Meat Sci.* **1998**, *49*, 277–287. [[CrossRef](#)]
34. Kondjoyan, A.; Oillic, S.; Portanguen, S.; Gros, J.B. Combined heat transfer and kinetic models to predict cooking loss during heat treatment of beef meat. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 336–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Moczowska, M.; Półtorak, A.; Wierzbicka, A. The effect of ageing on changes in myofibrillar protein in selected muscles in relation to the tenderness of meat obtained from cross-breed heifers. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 1375–1382. [[CrossRef](#)]
36. Kim, Y.H.; Huff-Lonergan, E.; Sebranek, J.G.; Lonergan, S.M. High-oxygen modified atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein polymerization. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 759–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Moczowska, M.; Półtorak, A.; Montowska, M.; Pospiech, E.; Wierzbicka, A. The effect of the packaging system and storage time on myofibrillar protein degradation and oxidation process in relation to beef tenderness. *Meat Sci.* **2017**, *130*, 7–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Destefanis, G.; Brugiapaglia, A.; Barge, M.T.; Molin, E. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner-Bratzler shear force. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 153–156. [[CrossRef](#)]
39. European Commission. *Scientific Co-Operation on Questions Relating to Food. Task 2.2: Studies Relating to Temperature Control. Directorate-General III*; European Commission: Brussels, Belgium, 1996; pp. 31–33.

40. Bingol, E.B.; Ergun, O. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 774–785. [[CrossRef](#)]
41. Gill, C.O.; Jones, T.; Bryant, J.; Brereton, D.A. The microbiological conditions of the carcasses of six species after dressing at a small abattoir. *Food Microbiol.* **2000**, *17*, 233–239. [[CrossRef](#)]
42. Alonso-Calleja, C.; Martinez-Fernandez, B.; Prieto, M.; Capita, R. Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 241–246. [[CrossRef](#)]
43. Capita, R.; Diaz-Rodriguez, N.; Prieto, M.; Alonso-Calleja, C. Effects of temperature, oxygen exclusion, and storage on the microbial loads and pH of packed ostrich steaks. *Meat Sci.* **2006**, *73*, 498–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gonzalez-Montalvo, B.; Capita, R.; Guevara-Franco, J.A.; Prieto, M.; Alonso-Calleja, C. Influence of oxygen exclusion and temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed ostrich steaks throughout refrigerated storage. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 201–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Horbańczuk, J.O. *The Ostrich*; European Ostrich Group: Nykøbing Falster, Denmark, 2002; p. 176.
46. ISO 2917:1999. *Meat and Meat Products—Measurement of pH*; ISO: Geneva, Switzerland, 1999.
47. Wyrwisz, J.; Moczowska, M.; Kurek, M.; Stelmasiak, A.; Pótorak, A.; Wierzbicka, A. Influence of 21 days of vacuum-aging on color, bloom development, and WBSF of beef semimembranosus. *Meat Sci.* **2016**, *122*, 48–54. [[CrossRef](#)]
48. PN-EN ISO 4833-1:2013-12. *Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms*; ISO: Geneva, Switzerland, 2013.
49. Binsi, P.K.; Viji, P.; Visnuvinayagam, S.; Ninan, G.; Sangeeta, G.; Triveni, A.; Ravishankar, C.N. Microbiological and shelf-life characteristics of eviscerated and vacuum-packed freshwater catfish (*Ompok pabda*) during chill storage. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 1424–1433. [[CrossRef](#)]

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Olaf Horbańczuk
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 014
olaf_horbanczuk@sggw.edu.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. Biomolecules 11(9):1338 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji pracy, prowadzeniu badań, opracowaniu wyników, co stanowi 60 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Artur Jóźwik
Postępu 36A, Jastrzębiec,
05-552 Magdalenka
a.jozwik@igbzpan.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Jóźwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. Biomolecules 11(9):1338 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu badań i analizie wyników, co stanowi 10 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Jarosław Wyrwisz
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 078
jaroslaw_wyrwisz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności
i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Jóźwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. Biomolecules 11(9):1338 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie i opracowaniu wyników, co stanowi 10 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Joanna Marchewka
Postępu 36A, Jastrzębiec,
05-552 Magdalenka
j.marchewka@igbzpan.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Jóźwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. Biomolecules 11(9):1338 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie statystycznej, co stanowi 5 % całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

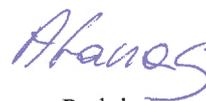
Warszawa, dn. 14.06.2022

Atanas G. Atanasov
Spitalgasse 23, 1090 Wiedeń, Austria,
Medical University of Vienna
Atanas.Atanasov@dhps.lbg.ac.at

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. Biomolecules 11(9):1338 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 5 % całej pracy.


Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

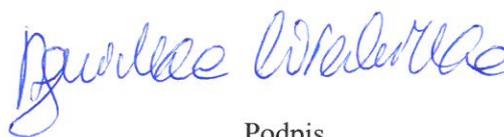
Warszawa, dn. 14.06.2022

Agnieszka Wierzbicka
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 060
agnieszka_wierzbicka@sggw.edu.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Józwik A., Wyrwisz J., Marchewka A., Atanasov A.G., Wierzbicka A., 2021. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. Biomolecules 11(9):1338 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 10 % całej pracy.



Podpis

Article

The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration

Olaf K. Horbańczuk ^{1,*}, Artur Józwiak ², Jarosław Wyrwisz ¹, Joanna Marchewka ², Atanas G. Atanasov ^{2,3} and Agnieszka Wierzbicka ^{1,2}

- ¹ Department of Technique and Food Product Development, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW), 159c Nowoursynowska, 02-776 Warsaw, Poland; j.wyrwisz@sggw.edu.pl (J.W.); Agnieszka_Wierzbicka@sggw.edu.pl (A.W.)
- ² Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, 05-552 Jastrzębiec, Poland; aa.jozwiak@igbzpan.pl (A.J.); J.marchewka@igbzpan.pl (J.M.); Atanas.Atanasov@dhps.lbg.ac.at (A.G.A.)
- ³ Ludwig Boltzmann Institute for Digital Health and Patient Safety, Medical University of Vienna, Spitalgasse 23, 1090 Vienna, Austria
- * Correspondence: olaf_horbanczuk@sggw.edu.pl

Abstract: The aim of the study was to investigate the changes in the activity of antioxidant enzymes, i.e., superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity in ostrich meat, as influenced by various packaging systems and storage time under refrigeration. Three packaging methods were used: vacuum packaging (VP) and modified atmosphere packaging (MAP) in two combinations of gases, MAP1 (40% O₂/40% CO₂/20% N₂) and MAP2 (60% O₂/30% CO₂/10% N₂). Meat samples were taken from the *M. iliofibularis* (IF) muscles of eight ostriches in each treatment group. The meat samples were stored in a refrigerator in 2 °C and analyzed at days 0, 4, 8, 12 and 16. The lowest level of SOD activity during storage was observed in ostrich muscles packed in vacuum, as compared to MAP1 and MAP2. In turn, the highest increase in GPx activity was recorded in VP, especially up to day 8 of storage, when this parameter reached maximum value (54.37). GR increased up to the eighth day of storage in MAP1 and VP. Between the 12th and 16th days of storage, stabilization of the GR activity level was observed only in VP, while under MAP1, it further decreased. DPPH remained relatively stable until the eighth day of storage and after this period, a decrease in this parameter was recorded, reaching the lowest value on day 12 for all types of packaging systems.

Keywords: antioxidant enzymes; ostrich meat; type of packaging; storage time



Citation: Horbańczuk, O.K.; Józwiak, A.; Wyrwisz, J.; Marchewka, J.; Atanasov, A.G.; Wierzbicka, A. The Activity of Chosen Antioxidant Enzymes in Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Storage Time in Refrigeration. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1338. <https://doi.org/10.3390/biom11091338>

Academic Editor: Jose Manuel Lorenzo Rodriguez

Received: 3 August 2021

Accepted: 8 September 2021

Published: 10 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Meat contains multiple initiators and catalysts of oxidation. One of them is heme iron, a major catalyst for the initiation of lipid peroxidation by generation of hydroxyl radicals [1–3]. The oxidation level in meat depends also on its content of other prooxidants, especially polyunsaturated fatty acids [4]. It should be stressed that either iron or PUFAs are present in relatively large amounts in ostrich meat [5–13]. Thus, this meat type is highly vulnerable to oxidative changes [14–16]. Oxidation processes can decrease the nutritional quality of meat and lead to meat quality deterioration, which results in the development of off-flavors and rancidity [17,18]. Some oxidation products can be even toxic for consumers. Therefore, it is very important to prevent the inception of the oxidation processes and establishment of their potentially toxic products (Figure 1).

Endogenous antioxidant enzymes, e.g., superoxide dismutase (SOD) or glutathione peroxidase (GPx), can control the meat oxidation processes [19–21]. For example, GPx can decompose both hydrogen peroxides and lipoperoxides formed during lipid oxidation [22]. This enzyme is also active in post mortem muscle tissue [23] and plays an important role

during storage and processing of meat by preventing the oxidation of oxymyoglobin to metmyoglobin [24,25], which leads to negative changes in meat color. Generally, antioxidant enzymes' activity in meat can differ among production animal species and muscle types, as well as among different packaging conditions and systems [26–28]. However, in the currently available literature, there is a shortage of knowledge about the activity of antioxidant enzymes in ostrich meat in relation to the type of packaging and storage time. Thus, the aim of the study was to investigate the changes in the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and DDPH in ostrich muscles, as influenced by various packaging systems and storage time under refrigeration.

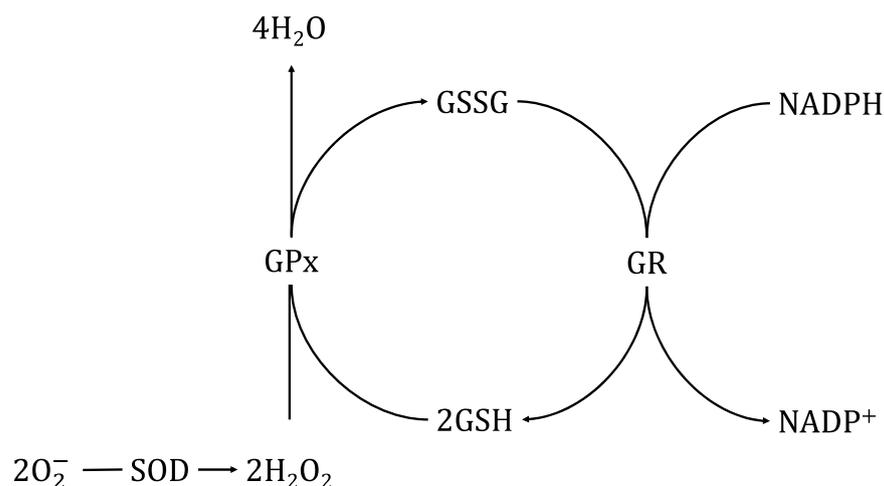


Figure 1. The roles of SOD, GPX and GR in the antioxidant defense enzyme system.

2. Material and Methods

2.1. Samples and Packaging

Meat samples were obtained from the *Musculus iliofibularis* (IF) of ostriches slaughtered at the age of 10–12 months, weighing between 90 to 95 kg (8 in each group). The IF muscle was excised and the external fat and visible connective tissue were removed from the carcasses 24 h after slaughter. The muscle was cut into 2.5 cm thick steaks starting from the proximal side (sample weight: 150 ± 15 g). Afterwards, the steaks were assigned randomly to one of the three packaging conditions. (a) In vacuum packaging systems, each steak was packaged individually in polyamide/polyethylene (PA/PE) bags (thickness: 90 μm ; size: 20/70 mm; CO_2 permeability: $140 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h}$; oxygen permeability: $50 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h}$; water vapor permeability: $6\text{--}8 \text{ g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) 1 min after cutting, and vacuum packed using a Vac-20SL2A packaging machine (Edesa Hosteler S.A., Barcelona, Spain). The in-package vacuum level was 2.5 kPa. (b) For modified atmosphere packaging (MAP) we used two gases combinations, 40% O_2 /40% CO_2 /20% N_2 (MAP1) and 60% O_2 /30% CO_2 /10% N_2 (MAP2). The steaks were placed on polyethylene terephthalate/polyethylene (PET/PE) trays (parameters: $187 \times 137 \times 50$ mm), and the film used was a 44 μm thick polyethylene terephthalate/cast polypropylene + antifog (PET/PP + AF) laminate with maximum oxygen permeability not exceeding $10 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h}/\text{bar}$ (EC04, Corenso, Helsinki, Finland). Samples were packed using a M3 packaging machine (Sealpack, Oldenburg, Germany). The packs were stored in a refrigerator at 2 $^\circ\text{C}$ for the duration of the experiment, for up to 16 days. Samples collected in three independent replicates were analyzed at 0 (24 h after slaughter), 4, 8, 12 and 16 days of storage.

2.2. Superoxide Dismutase (SOD) Assay Procedure

Muscle tissue perfusion was conducted in PBS buffer, at pH 7.4. Homogenization was executed in 5 mL of a 20 mM HEPES buffer (pH 7.2, 1 mM EDTA 210 mM mannitol, 70 mM sucrose per 1 g of tissue), chilled to 4 °C. After that, obtained homogenates were centrifuged at 2500 × g for 15 min at the temperature of 4 °C. To prevent uncontrolled reaction initiation, it is crucial to store samples on ice until the analysis will be started. Assay procedure was performed with the Superoxide Dismutase Assay Kit, Item No. 706002 (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA). Measurement of absorbance was made with the help of a microplate reader Synergy4 (Biotek; Winooski, VT 05404 USA). Total activity of SOD was expressed in U/mL.

2.3. Determination of Glutathione Peroxidase (GPx)

Perfusion of meat samples was performed using a PBS buffer, at pH 7.4. The tissue was homogenized in 5 mL of buffer, chilled to 4 °C, consisting of 50 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA and 1 mM DTT. Centrifuging of samples proceeded at 10,000 × g for 15 min at the temperature of 4 °C. The supernatant obtained was until the analysis stored on ice. In order to mark the activity of GPx in blood, the material was collected to individual sterile test tubes containing heparin (NH₄). The samples were centrifuged at 1,000 × g for 10 min at the temperature of 4 °C. The activity of GPx was marked using the Cayman Chemical Company test. The oxidation reaction of NADPH to NADP⁺ enables the detection of changes in absorbance (λ340). Reading of absorbance and measurement of reaction kinetics was performed using a microplate reader Synergy4 by Biotek. The results were calculated using the Gen5 software. The activity of GPx was expressed in nmol/min/mL.

2.4. Determination of Glutathione Reductase (GR)

Homogenized were 0.1 g tissues on ice in 0.5–1.0 mL cold assay buffer, or 1 × 10⁶ cells, or 0.2 mL, and in the next step centrifugation was performed at 10,000 × g for 15 min at 4 °C. The supernatant for assay was collected and stored on ice.

Glutathione reductase was assayed according to the method recommended from the Glutathione reductase (GR) assay kit (Cayman Chemical Company). The assay mixture consisted of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM GSSG, 1 mM EDTA, 0.16 mM NADPH and an appropriate amount of the enzyme source. NADPH oxidation was monitored at 340 nm. The enzyme activity was expressed as nmol/min per mg protein. A standard curve was constructed using pure glutathione reductase (Sigma G4751, St. Louis, MO, USA). Reading of absorbance and measurement of reaction kinetics was performed using a microplate reader Synergy4 by Biotek. The results were calculated using the Gen5 software. The activity of GR was expressed in nmol/min/mL.

2.5. Potential to Scavenge the Free DPPH Radical

The antioxidative activity of the analyzed samples was tested based on an assay procedure using a synthetic DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Muscle tissue perfusion was made with PBS buffer, pH 7.4. Afterwards, 1 g of the muscle was homogenized in 10 mL of cold (4 °C) ultra-pure ethanol. Homogenates were aerated with nitrogen and sealed. The prepared material was for 2 h extracted at the temperature of 40 °C in an ultrasonic bath. The tubes were next cooled and the samples were centrifuged at 4000 × g for 15 min at 4 °C. To 0.5 mL of thus prepared supernatant, 0.5 mL of an ethanolic solution of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (0.5 mM) was added, that had previously been diluted to ensure its absorbance of ca. 0.9 at the wavelength of λ = 517 nm. The samples were thoroughly mixed and left in a dark, cool place for 30 min for color stabilization. Extinction measurements were conducted using a Cary Win UV spectrophotometer (Varian Inc., New South Wales, Australia), at the wavelength of 517 nm.

2.6. Statistical Analysis

A generalized linear mixed-model analysis (repeated measures ANOVA) was performed on all measured parameters in order to determine the fixed effect of packaging treatment and storage time as a repeated measure, as well as their interaction. Ostriches' identity (bird number) was included in the model as a random factor. There were no outliers present in the dataset. Normality and homogeneity of residual variance assumptions were checked using the Shapiro test and examination of the normal plot, and these were met by all variables under investigation. PROC GLIMMIX of SAS v 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including Tukey's adjustment option was used to conduct the analysis. The validity of the models was tested using Akaike's information criterion. The least square means for all significant effects in the models ($p \leq 0.05$) were computed using the LSMEANS option. For all analyses, results are reported as means \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results and Discussion

The changes in the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and potential of free radical scavenging (DPPH), as influenced by various packaging systems and storage time under refrigeration are presented in Figures 2–5.

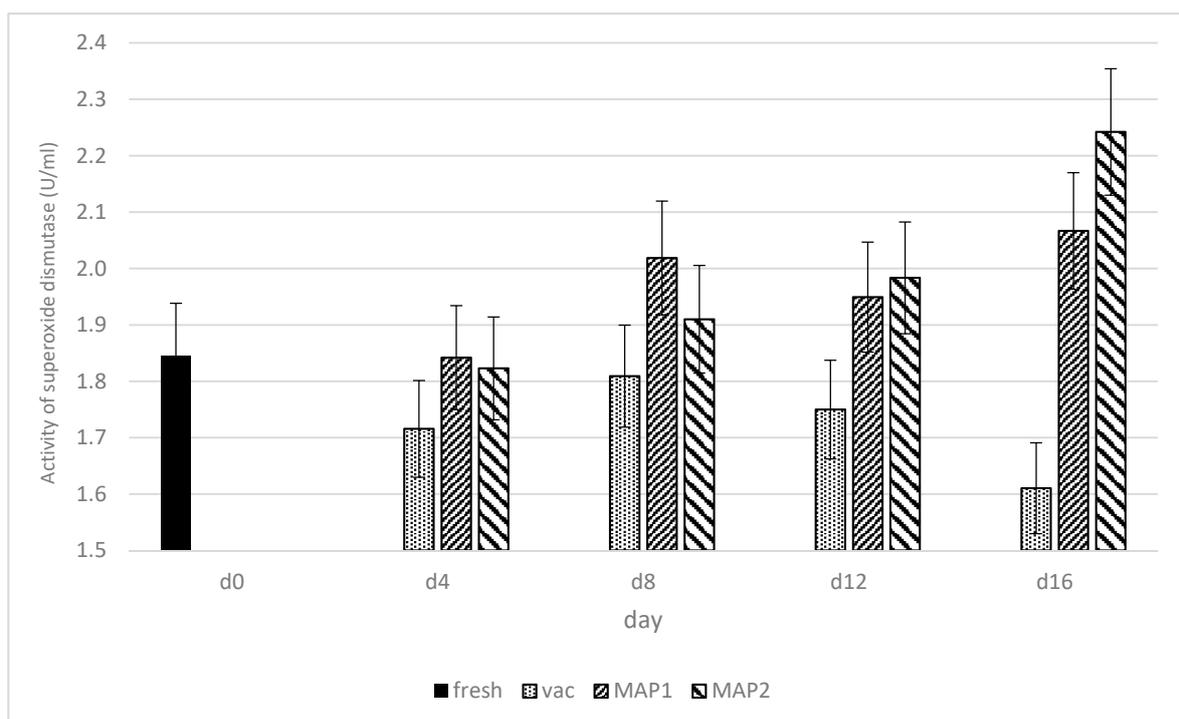


Figure 2. Changes in the activity (U/mL) of superoxide dismutase (SOD) in ostrich meat as influenced by the type of packaging and storage time in refrigeration.

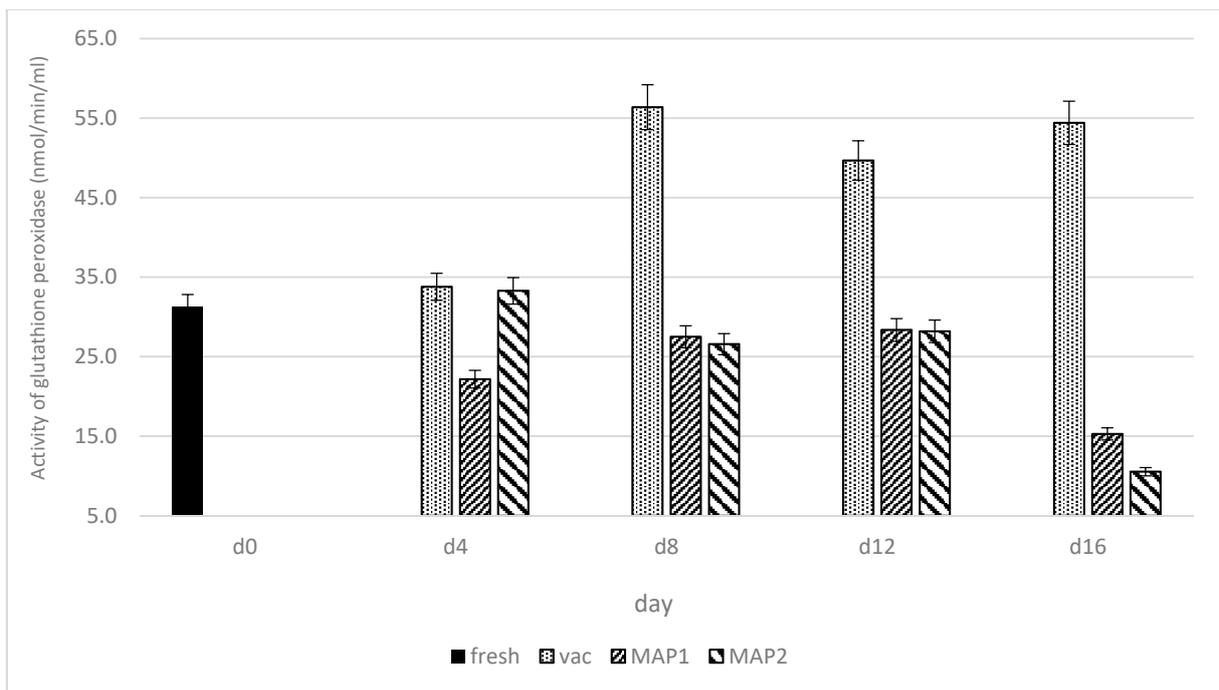


Figure 3. Changes in the activity (nmol/min/mL) of glutathione peroxidase (GPx) in ostrich muscles as influenced by the type of packaging and storage time in refrigeration.

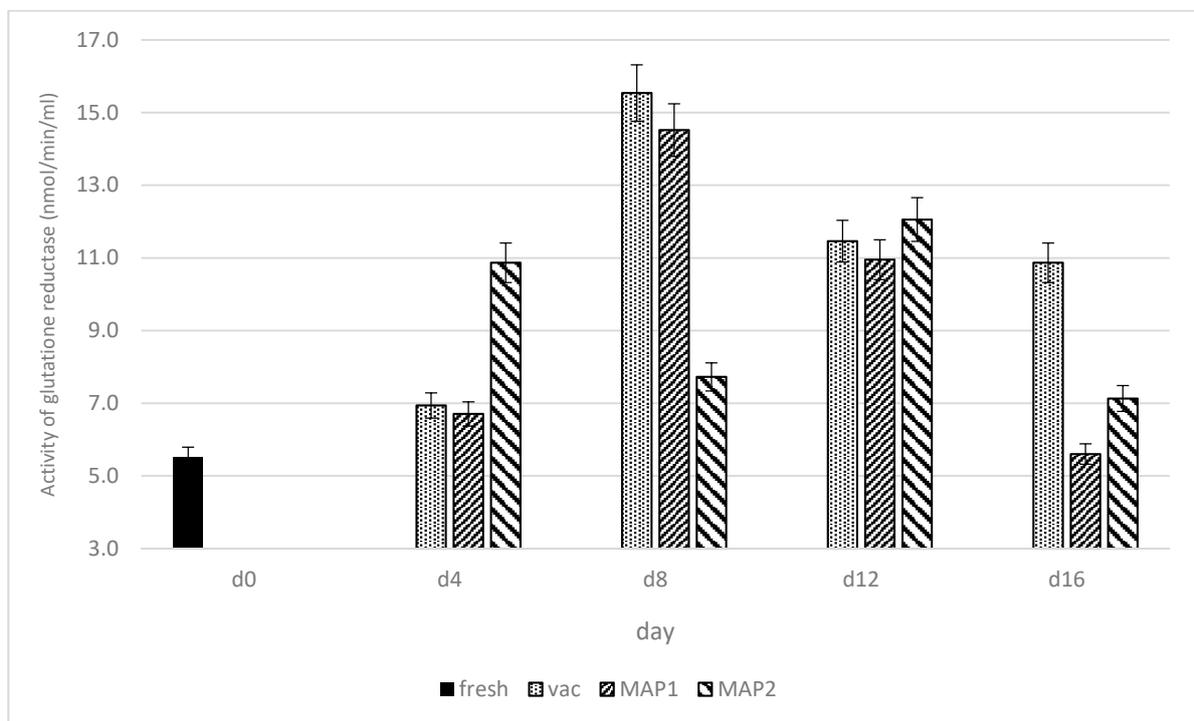


Figure 4. Changes in the activity (nmol/min/mL) of glutathione reductase (GR) in ostrich muscles as influenced by the type of packaging and storage time in refrigeration.

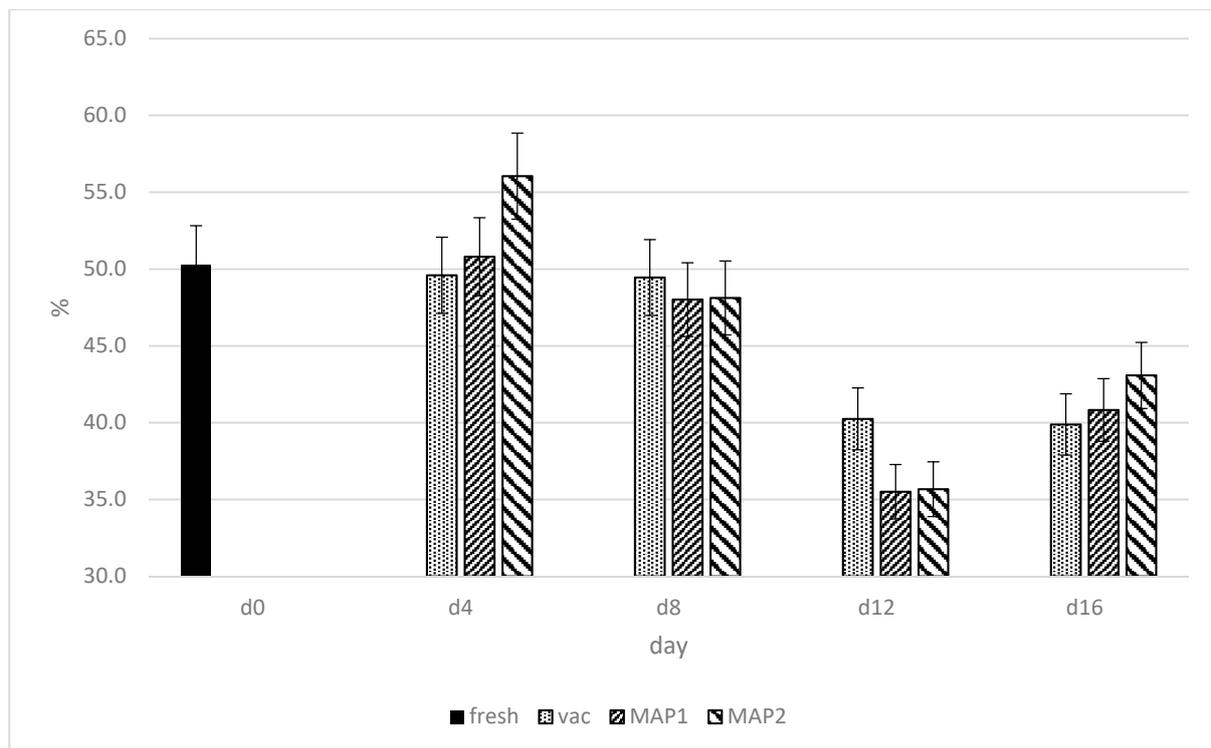


Figure 5. Changes (%) in the activity of DPPH free radical scavenging in ostrich muscles as influenced by the type of packaging and storage time in refrigeration.

Superoxide dismutase.

Meat contains endogenous antioxidants, as the live cells have several mechanisms of protection against oxidative processes, including antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), which plays an important role in protecting against damage by the superoxide anion radical [29]. According to Filgueras et al. [30], the extent of oxidative processes in meat is dependent on the balance between concentration of lipidic substances sensible to peroxidation (i.e., polyunsaturated fatty acids or PUFA) and antioxidant enzymes such as SOD or glutathione peroxidase (GPx). The activity levels of superoxide dismutase (SOD) are presented in Figure 2. Overall, the lowest level of SOD activity during the entire storage time was observed in ostrich muscles packed in vacuum, as compared to MAP1 and MAP2 packing methods. The lowest value of SOD was observed in vacuum on the 16th day of storage (1.65 U/mL), as compared to MAP1 (2.05 U/mL) and MAP2 (2.24 U/mL). Under MAP1 and MAP 2 packaging, SOD levels increased over the storage days in the current experiment. Under MAP1 SOD activity was significantly lower as compared to days 8 (2.00 U/mL), 12 (1.95 U/mL) and 16 (2.05 U/mL) of the experiment. Under MAP2, SOD activity was significantly lower on days 0–12 (1.85–1.99 U/mL), as compared to day 16 (2.24 U/mL) of the storage. On the contrary, the level of SOD in vacuum packaging decreased significantly between day 0 (1.85 U/mL) and day 16 (1.65 U/mL). Similar SOD activity was shown in studies of rhea meat by [31], ranging from 1.77–2.04 U/mL. In early studies by Renner et al. [23], higher SOD activity in bovine muscle (3.0 units 1 day postmortem) was found. It is probable that in vacuum packaging method, due to anaerobic conditions, the generation processes of free radical formation were reduced, whereas in MAP1 and MAP2, a rise in this parameter during storage was observed (Figure 2). It may indicate an increased, more intensive dismutation process and converting free radicals into a hydroxyl radical. Similar tendencies of decreased activity of SOD in VP during storage was shown by Pastsart et al. [31] in beef muscles at day 10 as compared to day 0. Moreover, Adeyemi [32] recorded decreased SOD activity for the vacuum-packed goat meat stored up to 8 days. However, results of our study are different from those obtained

for vacuum packed beef from Belgian Blue cattle stored at $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for up to 28 days after 7 days of display [33].

3.1. *Glutathione Peroxidase (GPx) and Glutathione Reductase (GR)*

Glutathione is the major metabolite involved in determining cellular redox state, while the enzymes responsible for glutathione metabolism are glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) [34–36]. An antioxidant function has been classically assigned to these enzymes. The activity levels of GPx and GR are presented in Figures 3 and 4. The highest increase in GPx activity occurred in ostrich muscles packed in vacuum, from day 4 (33.89 nmol/min/mL) of storage to day 8, when this parameter reached maximum value (54.37 nmol/min/mL). After day 8 of storage, the GPx activity stabilized in VP until the end of storage time (day 16; 48.4 nmol/min/mL) at a relatively high level in comparison to ostrich muscle on day 0 (31.67 nmol/min/mL). These data provide evidence that GPx may protect muscle tissue against degradation, and in consequence, against the deterioration of the meat quality. In research conducted by Watanabe et al. [37], the increasing activity levels of GPx during storage time were consistent in fish stored up to 5 days at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. According to these authors, a decrease in GPx activity can be related to the hydrolysis of this enzyme by intracellular proteinases during storage or due to enzyme denaturation [37]. Similar tendencies were shown by Daun [38], where GPx remained stable after storage time in vacuum packed beef (1.9 U/g) stored in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ up to 14 days, and vacuum-packed pork up to 4 days stored in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The increase in the activity of GPx enzymes in VAC may be caused by a higher affinity for the generation of secondary free radicals [39]. The rise in GPx may also be associated with greater protection against the occurrence of oxidation processes, which is not observed in MAP1 and MAP2. Overall, the GPx activity in MAP1 and MAP2 was lower and more stable, as compared to vacuum packaging, especially until day 12, while between 12 and 16 days of storage, a significant decrease in its activity was observed (Figure 3). On day 16, meat samples packed in MAP showed the lowest activities for GPx, which was an opposite trend to the superoxide dismutase activity (Figure 2). The observed tendency for the decrease in GPx activity in both MAPs was similar to the decrease found in chicken meat during refrigerated storage by Gheisari [40]. In our study, the higher activity of GPx for meat packed in VAC may also indicate that under vacuum conditions, antioxidant protection in the meat maturation processes is taken over by glutathione reductase (GR). In case of GR, its increased activity in ostrich muscles up to the eighth day of storage in vacuum (15.51 nmol/min/mL) and MAP1 (14.90 nmol/min/mL) was observed, which was probably associated with the existence of the muscle tissue protection mechanism against degradation and redox process reverse occurring in the ostrich meat during storage (Figure 4). GR activity under the storage continued after day 8 to day 12 indicated a decrease level of GR in MAP1 and VP (10.72 nmol/min/mL and 10.35 nmol/min/mL, respectively). However, the stabilization of the GR activity level between the 12th and 16th days of storage was observed only in vacuum, while under MAP1, further decrease in GR (5.66 nmol/min/mL) occurred (Figure 4).

3.2. *DPPH*

The percentage activity of DPPH free radical scavenging is presented in Figure 5. The potential of DPPH in ostrich meat was maintained on a relatively stable level up to the eighth day of storage, with no significant differences observed for MAP1 and vacuum packaging systems. These data suggest that during storage, free radicals were neutralized by increasing the activity of the antioxidant investigated enzymes. After this period (8 day), a decrease in DPPH was observed and the lowest level of this parameter was recorded on day 12 either in vacuum or MAP1 and MAP2 (Figure 5). The results of DPPH activity levels in the current study were generally consistent with those of Fasseas et al. [41], where overall DPPH activity of investigated beef meat samples decreased within storage time from 1 to day 12.

4. Conclusions

In conclusion, the current study was designed to assess the changes in the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, as well as DPPH, in ostrich muscles in relation to various packaging systems and storage time under refrigeration. Based on SOD, GPx and GR activity levels, the antioxidant protection potential of the cells in ostrich muscles generally decreased after 12 days of storage in all packaging systems except for MAP1 and MAP2 in the case of SOD and GPx in VP. The increase in the activity of GPx enzymes in VP may be caused by a higher affinity for the generation of secondary free radicals. In turn, the DPPH in ostrich meat was maintained on a relatively stable level until the eighth day of storage and after this period, a decrease in this parameter was reported, achieving its lowest value on day 12 under all types of packaging systems.

Author Contributions: Conceptualization, O.K.H. and A.J.; methodology, A.J. and O.K.H.; software, A.J.; validation, A.J., J.M. and J.W.; formal analysis, O.K.H., A.J.; investigation, O.K.H., A.J.; content supervision, A.W. and A.G.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded and realized within the project ‘Diamentowy Grant’ (project number DI 2017 003847) of the Ministry of Science and Higher Education of Poland (agreement number: 0038/DIA/2018/47).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Buettner, G.R.; Jurkiewicz, B.A. Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. *Radiat. Res.* **1996**, *145*, 532–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Morrissey, P.A.; Sheehy, P.J.A.; Galvin, K.; Kerry, J.P.; Buckley, D.J. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.* **1998**, *49*, 73–86. [[CrossRef](#)]
3. King, A.J.; Uijttenboogaart, T.G.; de Vries, A.W. α -Tocopherol, β -Carotene and Ascorbic Acid as Antioxidants in Stored Poultry Muscle in stored poultry muscle. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 1009–1012. [[CrossRef](#)]
4. Serpen, A.; Gökmen, V.; Fogliano, V. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Sci.* **2012**, *90*, 60–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cooper, R.G.; Horbańczuk, J.O. Ostrich nutrition: A review from a Zimbabwean perspective. *Rev. Sci. Tech.* **2004**, *23*, 1033–1042. [[CrossRef](#)]
6. Cooper, R.G.; Naranowicz, H.; Maliszewska, E.; Tennett, A.; Horbańczuk, J.O. Sex-based comparison of limb segmentation in ostriches aged 14 months with and without tibiotarsal rotation. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2008**, *79*, 142–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cooper, R.G.; Tomasik, C.; Horbańczuk, J.O. Avian influenza in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Poult. Biol. Rev.* **2007**, *18*, 87–92. [[CrossRef](#)]
8. Horbańczuk, J.O.; Sales, J.; Celeda, T.; Konecka, A.; Zięba, G.; Kawka, P. Cholesterol content and fatty acid composition of ostrich meat as influenced by subspecies. *Meat Sci.* **1998**, *50*, 385–388. [[CrossRef](#)]
9. Horbańczuk, J.O.; Kawka, M.; Sacharczuk, M.; Cooper, R.G.; Boruszewska, K.; Parada, P.; Jaszczak, K. A search for sequence similarity between chicken (*Gallus domesticus*) and ostrich (*Struthio camelus*) microsatellite markers. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2007**, *25*, 283–288.
10. Horbańczuk, J.O.; Tomasik, C.; Cooper, R.G. Ostrich farming in Poland—Its history and current situation after accession to the European Union. *Avian Poult. Biol. Rev.* **2008**, *1*, 65–71. [[CrossRef](#)]
11. Zdanowska-Saśiadek, Ż.; Marchewka, J.; Horbańczuk, J.O.; Wierzbicka, A.; Lipińska, P.; Józwiak, A. Nutrients composition in fit snacks made from ostrich, beef and chicken dried meat. *Molecules* **2018**, *23*, 1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sales, J.; Horbańczuk, J.O.; Dingle, J.; Coleman, R.; Sensik, S. Carcase characteristics emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Brit. Poult. Sci.* **1999**, *40*, 145–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sales, J.; Horbańczuk, J.O. Ratite Meat. *Worlds Poult. Sci. J.* **1998**, *54*, 59–67. [[CrossRef](#)]
14. Horbańczuk, O.K.; Wierzbicka, A. Technological and nutritional properties of ostrich, emu, and rhea meat quality. *J. Vet. Res.* **2016**, *60*, 279–286. [[CrossRef](#)]

15. Horbańczuk, O.K.; Wierzbicka, A. Effects of packaging methods on shelf life of ratite meats. *J. Vet. Res.* **2017**, *61*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Horbańczuk, O.K.; Józwiak, A.; Wyrwisz, J.; Marchewka, J.; Wierzbicka, A. Physical Characteristics and Microbial Quality of Ostrich Meat in Relation to the Type of Packaging and Refrigerator Storage Time. *Molecules* **2021**, *26*, 3445. [[CrossRef](#)]
17. Horbańczuk, O.K.; Moczowska, M.; Marchewka, J.; Atanasov, A.G.; Kurek, M. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* **2019**, *24*, 4128. [[CrossRef](#)]
18. McClements, D.J.; Decker, E.A. Lipids. In *Food Chemistry*, 4th ed.; Damodarin, S., Parkin, K., Fennema, O.R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2008; pp. 155–216.
19. Jensen, C.; Lauridsen, C.; Bertelsen, G. Dietary vitamin E: Quality and storage stability of pork and poultry. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 62–72. [[CrossRef](#)]
20. Terevinto, A.; Ramos, A.; Castroman, G.; Cabrera, M.C.; Saadoun, A. Oxidative status, in vitro iron-induced lipid oxidation and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rhea meat. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 706–710. [[CrossRef](#)]
21. Xu, L.; Zhang, H.; Yue, H.; Wu, S.; Yang, H.; Wang, Z.; Qi, G. Gas stunning with CO₂ affected meat color, lipid peroxidation, oxidative stress, and gene expression of mitogen-activated protein kinases, glutathione S-transferases, and Cu/Zn-superoxide dismutase in the skeletal muscles of broilers. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2018**, *9*, 37. [[CrossRef](#)]
22. Gatellier, P.; Mercier, Y.; Renner, M. Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of charolais bovine meat. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 385–394. [[CrossRef](#)]
23. Rennere, M.; Dumont, F.; Gatellier, P. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Sci.* **1996**, *43*, 111–121. [[CrossRef](#)]
24. Maraschiello, C.; Sárraga, C.; García Regueiro, J.A. Glutathione Peroxidase Activity, TBARS, and α -Tocopherol in Meat from Chickens Fed Different Diets. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 867–872. [[CrossRef](#)]
25. Petron, M.J.; Raes, K.; Claeys, E.; Lourenco, M.; Fremaut, D.; De Smet, S. Effect of grazing pastures of different botanical composition on antioxidant enzyme activities and oxidative stability of lamb meat. *Meat Sci.* **2007**, *75*, 737–745. [[CrossRef](#)]
26. Pradhan, A.A.; Rhee, K.S.; Hernandez, P. Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. *Meat Sci.* **2000**, *54*, 385–390. [[CrossRef](#)]
27. Pambuka, S.E.; Adebisi, A.P.; Muramoto, K.; Naude, R.J. Purification and partial characterisation of a matrix metalloproteinase from ostrich skeletal muscle, and its activity during meat maturation. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 481–488. [[CrossRef](#)]
28. Hernández, P.; Park, D.K.; Rhee, K.S. Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork. *Meat Sci.* **2002**, *61*, 405–410. [[CrossRef](#)]
29. Chan, K.M.; Decker, E.A. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1994**, *34*, 403–426. [[CrossRef](#)]
30. Filgueras, R.S.; Gatellier, P.; Aubry, L.; Thomas, A.; Bauchart, D.; Durand, D.; Zambiasi, R.C.; Santé-Lhoutellier, V. Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air- and vacuum-packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 665–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Pastsart, U.; De Boever, M.; Claeys, E.; De Smet, S. Effect of muscle and post-mortem rate of pH and temperature fall on antioxidant enzyme activities in beef. *Meat Sci.* **2013**, *93*, 681–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Adeyemi, K.D.; Sabow, A.B.; Shittu, R.M.; Karim, R.; Karsani, S.A.; Sazili, A.Q. Impact of chill storage on antioxidant status, lipid and protein oxidation, color, drip loss and fatty acids of semimembranosus muscle in goats. *CYTA—J. Food* **2016**, *14*, 405–414. [[CrossRef](#)]
33. Imazaki, P.H.; Douny, C.; Elansary, M.; Scippo, M.L.; Clinquart, A. Effect of muscle type, aging technique, and aging time on oxidative stability and antioxidant capacity of beef packed in high-oxygen atmosphere. *J. Food Process. Preserv.* **2018**, *42*, e13603. [[CrossRef](#)]
34. Lindmark-Månsson, H.; Chen, J.; Paulsson, M.; Aldén, G.; Ren, B.; Ladenstein, R. The effect of storage and heat treatment on glutathione peroxidase in bovine milk and whey. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 71–81. [[CrossRef](#)]
35. Hoac, T.; Daun, C.; Trafikowska, U.; Zackrisson, J.; Åkesson, B. Influence of heat treatment on lipid oxidation and glutathione peroxidase activity in chicken and duck meat, 2006. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2006**, *7*, 88–93. [[CrossRef](#)]
36. Yang, M.S.; Chan, H.W.; Yu, L.C. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology* **2006**, *226*, 126–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Watanabe, F.; Goto, M.; Abe, K.; Nakano, Y. Glutathione peroxidase activity during storage of fish muscle. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 734–735. [[CrossRef](#)]
38. Daun, C.; Johansson, M.; Önnings, G.; Åkesson, B. Glutathione peroxidase activity, tissue and soluble selenium content in beef and pork in relation to meat ageing and pig RN phenotype. *Food Chem.* **2001**, *73*, 313–319. [[CrossRef](#)]
39. Falowo, A.B.; Fayemi, P.O.; Muchenje, V. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 171–181. [[CrossRef](#)]
40. Gheisari, H.R.; Motamedi, H. Chloride salt type/ionic strength and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in cattle, camel and chicken meat. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 377–383. [[CrossRef](#)]
41. Fasseas, M.K.; Mountzouris, K.C.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.; Zervas, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1188–1194. [[CrossRef](#)]

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 14.06.2022

Olaf Horbańczuk
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 014
olaf_horbanczuk@sggw.edu.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and in vitro gastrointestinal digestion. Animal Science Papers and Reports, 39, 3, 251-259 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji pracy, prowadzeniu badań, opracowaniu wyników, co stanowi 65% całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 15.06.2022

Jarosław Wyrwisz
ul. Nowoursynowska 159c
02-776 Warszawa
22 59 37 078
jaroslaw_wyrwisz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności
i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and in vitro gastrointestinal digestion. Animal Science Papers and Reports, 39, 3, 251-259 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na-prowadzeniu badań oraz analizie wyników, co stanowi 10% całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 13.06.2022

Joanna Marchewka
Postępu 36A, Jastrzębiec,
05-552 Magdalenka
j.marchewka@igbzpan.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and in vitro gastrointestinal digestion. Animal Science Papers and Reports, 39, 3, 251-259 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na analizie statystycznej, co stanowi 5% całej pracy.


Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 16.06.2022

Michał Ławiński
Banacha 1a, 02-097 Warszawa,
michal.lawinski@wum.edu.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Józwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and in vitro gastrointestinal digestion. Animal Science Papers and Reports, 39, 3, 251-259 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze merytorycznym, co stanowi 10% całej pracy.



Podpis

Oświadczenie o współautorstwie

Warszawa, dn. 13.06.2022

Artur Jóźwik
Postępu 36A, Jastrzębiec,
05-552 Magdalenka
a.jozwik@igbzpan.pl

**Rada dyscypliny technologia żywności
i żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Horbańczuk O.K., Wyrwisz J., Marchewka J., Ławiński M., Jóźwik A., 2021. Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and in vitro gastrointestinal digestion. Animal Science Papers and Reports, 39, 3, 251-259 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji pracy oraz prowadzeniu badań, co stanowi 10% całej pracy.



Podpis

Lipid and protein oxidation in ostrich meat under various packaging types during refrigerated storage and *in vitro* gastrointestinal digestion*

Olaf K. Horbańczuk^{1}, Jarosław Wyrwisz¹, Joanna Marchewka²,
Michał Ławiński^{2,3}, Artur Józwick²**

¹ Department of Technique and Food Product Development, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW), 159c Nowoursynowska, 02-776 Warsaw, Poland

² Institute of Genetics and Animal Biotechnology of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Postępu 36A, 05-552 Magdalenka, Poland

³ Department of General Surgery, Gastroenterology and Oncology, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland

(Accepted September 25, 2021)

The aim of the study was to evaluate lipid and protein oxidation during refrigerated storage (0, 4, 8, 12 and 16 days) and *in vitro* gastrointestinal digestion of ostrich meat (*M. iliobularis*), which was packed either under vacuum (VP) or modified atmosphere (MAP) in two combination of gases O₂:CO₂:N₂, being 40:40:20 (MAP 1) and 60:30:10 (MAP 2). Lipid oxidation was assessed by malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), and hexanal (HEX), and protein oxidation was evaluated by the formation of protein carbonyl content compounds (PCC). In raw ostrich meat packed under both MAP conditions, an increase of MDA and 4-HNE levels was observed during storage, while the MDA value under vacuum was generally stable during 16-day storage. The PCC concentration under MAP1 and MAP2 after *in vitro* digestion was at the comparable level during the storage period. In summary, packaging and storage methods influenced the development of oxidation processes affecting the final quality of ostrich meat during storage.

KEY WORDS: *in vitro* digestion / lipid / meat / ostrich / packaging system / protein oxidation / storage

*The study was funded and realized within the project “Diamentowy Grant” (project number DI 2017 003847) of the Ministry of Science and Higher Education of Poland (agreement number: 0038/DIA/2018/47).

**Corresponding authors: olaf_horbanczuk@sggw.edu.pl

Ostrich meat is characterized by low fat level, with a high proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA) [Horbańczuk *et al.* 1998, 2018, 2019]. It becomes popular among consumers worldwide [Cooper *et al.* 2004, 2007, 2008, Horbańczuk *et al.* 2007, 2008, 2021ab]. This dark red meat is also characterized by higher pH (about 6) as compared to beef or pork [Sales and Horbańczuk 1998, Sales *et al.* 1999, Horbańczuk and Wierzbicka 2016, 2017]. Above mentioned features negatively affected the quality of ostrich meat during storage [Fernandez-Lopez *et al.* 2006]. Ostrich meat is also rich in heme iron, the pro-oxidative factor which may promote the degradation of lipids and proteins, leading to undesirable aromas and off-flavors during storage [Hoffman *et al.* 2014]. Lipid and protein oxidation in meat damages the cellular structures of the muscle, which results in loss of the meat quality and its decreased shelf life [Vuorela *et al.* 2005, Seydim *et al.* 2006].

The most common markers of oxidative processes are malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), hexanal (HXE) and protein carbonyl content (PCC). Malondialdehyde is formed during the decomposition of lipid hydroxides produced during peroxidation of polyunsaturated fatty acids (especially of long-chain polyunsaturated fatty acids), whereas, 4-HNE is the product of the oxidative breakdown of hydroperoxides derived from n-6 acids.

Oxidation continues during digestion in the gastrointestinal tract. Method of meat *in vitro* digestion simulates the physiological conditions of digestion *in vivo* and is very useful for studying and understanding changes, interactions, as well as the bioaccessibility of nutrients and non-nutritive compounds [Bornhorst *et al.* 2014, Van Hecke *et al.* 2014, 2015, 2017b, 2019, Lucas-González *et al.* 2018, Li *et al.* 2020]. The oxidation products emerging during the meat digestion processes may negatively affect health status of the consumers. The aim of the study was to assess the changes of lipid- (MDA, 4-HNE, HEX) and protein oxidation (PCC) during refrigerated storage of ostrich meat in various packaging types, i.e. vacuum (VP) and modified atmosphere (MAP) in two combination of gases O₂:CO₂:N₂ i.e. 40:40:20 (MAP 1) and 60:30:10 (MAP 2). In order to investigate the lipid and protein oxidation in ostrich meat also during gastrointestinal digestion, *in vitro* digestion model was applied.

Material and methods

Samples and packaging

Meat samples were obtained from the *M. iliofibularis* from ostrich (8 in each group) slaughtered at the age of 10-12 months, weighing between 90 and 95 kg. Muscles were collected from carcasses 24 h after slaughter. External fat and visible connective tissue were removed and muscles were cut starting from the proximal side into 2.5 cm thick steaks (sample weight: 150±15 g). Then, each group of steaks (from 8 ostriches) was either packed under vacuum or under two conditions of modified atmosphere packaging (MAP). Vacuum packaging was performed within 1 min after

cut by using a Vac-20SL2A packaging machine (Edesa Hosteler S.A., Barcelona, Spain), during which each steak was packed individually in polyamide/polyethylene bags (thickness 90 µm [20/70], oxygen permeability 50 cm³/m²/24 h, CO₂ permeability 140 cm³/m²/24 h, water vapor permeability 6-8 g/m²/24 h). The in-package vacuum level was 2.5 kPa. Modified atmosphere packaging (MAP) was performed in two combinations of O₂:CO₂:N₂ gases in ratios of 40:40:20 (MAP1) and 60:30:10 (MAP2). The steaks were placed on PET/PE trays (parameters: 187×137×50 mm), and the film used was a 44 µm thick PET/PP + AF laminate with maximum oxygen permeability not exceeding 10 cm³/m²/24 h/bar (EC04, Corenso, Helsinki, Finland). Samples were packed with an M3 packaging machine (Sealpack, Oldenburg, Germany). The muscle samples were stored in a refrigerator at 2°C and samples were collected on the days 0 (24 h after slaughter), 4, 8, 12 and 16 of refrigerated storage.

***In vitro* gastrointestinal digestion**

The *in vitro* digestions were performed according to a previously described protocol, specific for studying oxidation processes during passage in the gastrointestinal system [Van Hecke *et al.* 2018]. The digestions were performed in quadruplicate. In brief, 4.5 g of ostrich meat was sequentially incubated at 37°C for 5 min with 6 mL saliva, 2 h with 12 mL gastric juice (initial stomach pH of 2.5 to final stomach pH of 3.5), and 2 h with 2 mL bicarbonate buffer (1 M, pH 8.0), 12 mL duodenal juice, and 6 mL bile juice (small intestinal pH of 6.5). After completion, samples were homogenized with an ultra-turrax (9500 rpm) and aliquots were stored at -80°C for further analysis.

Oxidation products in meat and digests

Malondialdehyde (free + bound) was measured spectrophotometrically in meat and digests as TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) at 532 nm following the reaction with 2-thiobarbituric acid in an acid environment after hydrolysis with NaOH, extraction in 1-butanol, and quantification using a standard curve with 1,1,3,3-tetramethoxypropane and concentrations are expressed as nmol MDA/ml. [Van Hecke 2017a]. Unbound 4-HNE and HEX in raw ostrich meat and digests were measured by HPLC following their derivatization with cyclohexanedione, as previously described [Van Hecke 2017a] with slight modifications, and each compound was quantified with corresponding analytical standards. Concentrations of PCC in raw ostrich meat and digests were determined spectrophotometrically following reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine according to Ganhão *et al.* [2010]

Statistical analysis

A generalized mixed model analysis (repeated measures ANOVA) was performed on all measured parameters in order to determine the fixed effect of packaging treatment and storage time as a repeated measure, as well as their interaction, separately for the raw stored ostrich meat and *in vitro* digested ostrich meat (SAS v 9.4). Ostriches' identity (bird number) was included in the model as a random factor. There were

no outliers present in the dataset. Normality and homogeneity of residual variance assumptions were checked using the Shapiro test and examination of the normal plot, and these were met by all variables under investigation. The Tukey's adjustment option was used to conduct the analysis. For all analyses, results are reported as means \pm standard error of the mean (SEM).

Results and discussion

The changes in MDA, 4-HNE, HEX and PCC values in raw and after *in vitro* digestion ostrich meat samples, as influenced by type of packaging and refrigerated storage are shown in Figure 1-4.

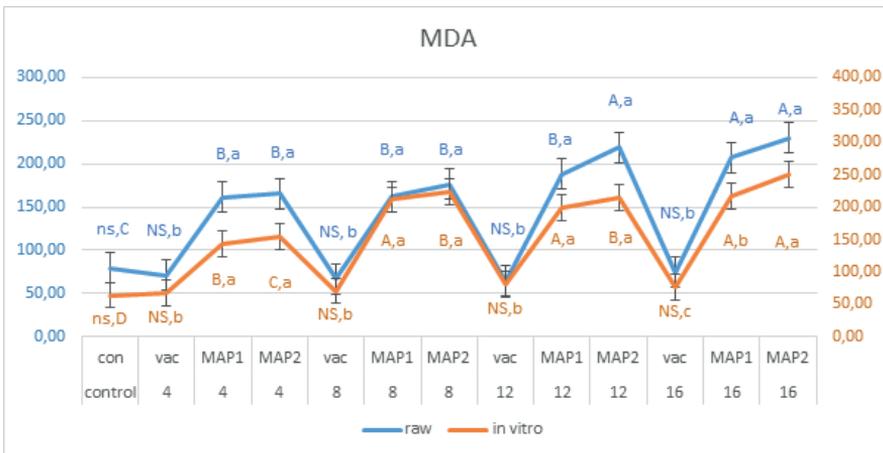


Fig. 1. Levels of MDA (nmol /g) in raw and *in vitro* digestion ostrich samples, as related to the type of packaging and refrigerated storage. Mean values bearing different letters for each day within the same packaging conditions (A, B, C, D), or between packaging systems within the same day (a, b, c), differ significantly at $p < 0.05$.

A significant increase of MDA and 4-HNE levels were observed along the storage of meat packed in MAP1 and MAP2. The MDA value in ostrich raw meat under vacuum was generally stable during 16-day storage, and no significant differences were observed across days of storage. Similar results for ostrich meat packed in vacuum and modified atmosphere without oxygen, stored at 2°C until day 8th was reached by Fernandez-Lopez *et al.* [2008]. Moreover, in the study conducted by Seydim *et al.* [2006] ostrich meat, which was vacuum packed and stored at 4°C up to 9 days, was characterized by lower changes regarding lipid oxidation processes as compared to air packaging system. Overall, the value of 4-HNE increased under MAP1 and MAP2, whereas in VAC system it was stable during storage. This is in line with the results obtained for goose meat stored under vacuum and modified atmosphere conditions which had a higher oxidation rate for MAPs than vacuum [Orkusz *et al.* 2017]. The

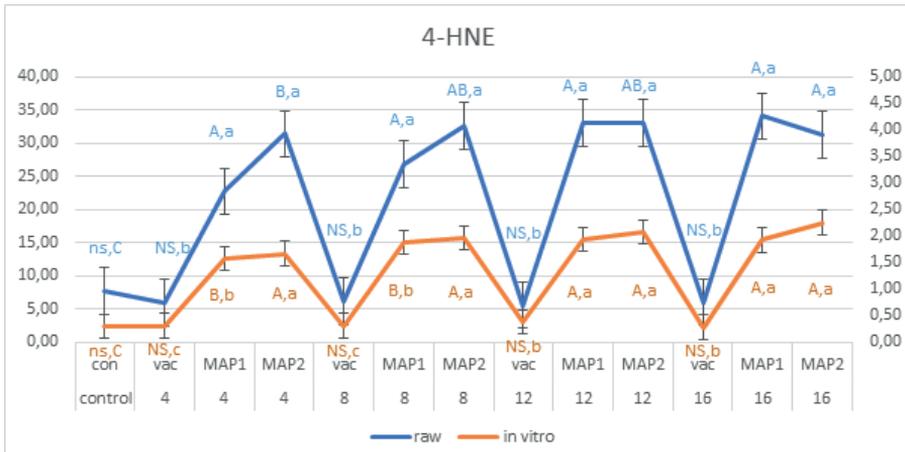


Fig. 2. Levels of 4-HNE ($\mu\text{mol/kg}$ meat) value in raw and in vitro digestion ostrich samples, as related to the type of packaging and refrigerated storage. Mean values bearing different letters for each day (A, B, C, NS-not significant) or between packaging systems (a, b, c, ns-not significant) differ significantly at $p < 0.05$.

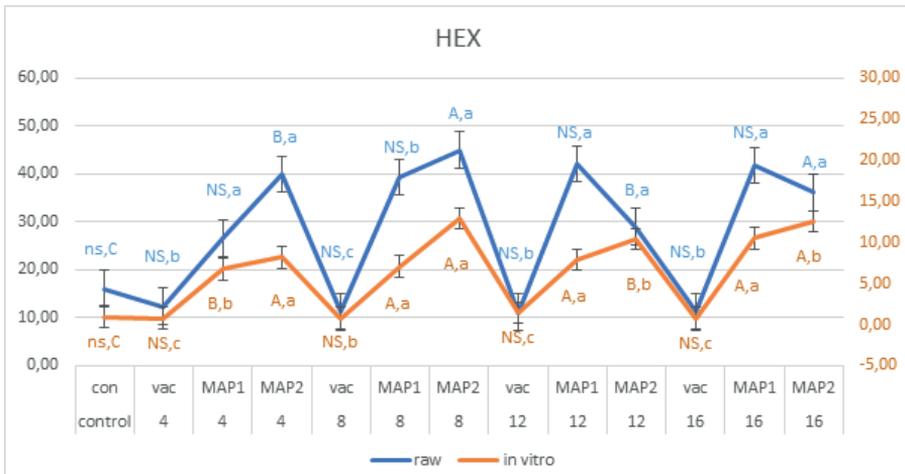


Fig. 3. Levels of HEX ($\mu\text{mol/kg}$ meat) value in raw and in vitro digestion ostrich samples, as related to the type of packaging and refrigerated storage. Mean values bearing different letters for each day (A, B, C, NS-not significant) or between packaging systems (a, b, c, ns-not significant) differ significantly at $p < 0.05$.

HEX under MAP1 raised during storage days, while under MAP2 on the 8th day, a statistically significant raise of this parameter level was observed, as compared to previous storage days. PCC level (Fig. 4) in raw meat samples under MAP2 grew unsteadily over the days until the level of 4.76 nmol DNPH/mg protein on the last storage day (16).

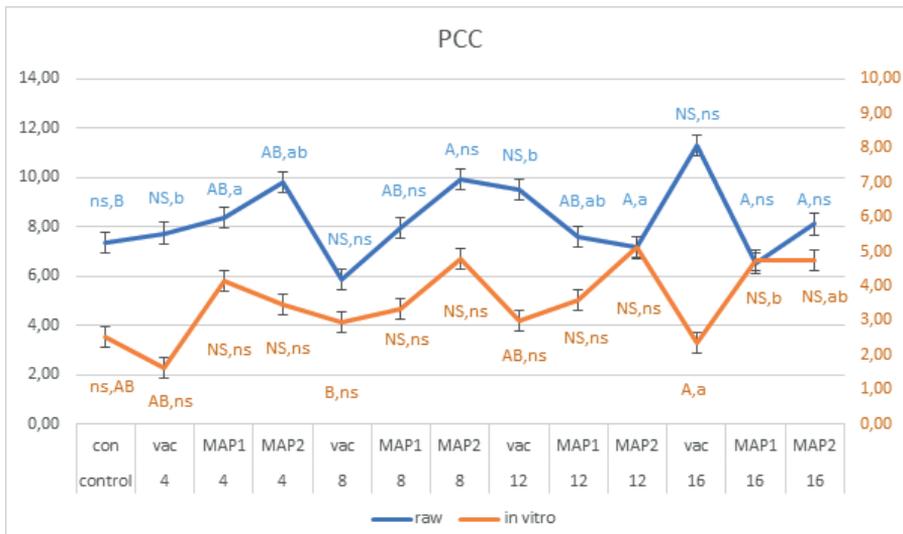


Fig. 4. Levels of PCC (nmol DNP/mg protein) levels in raw and in vitro digestion ostrich samples, as related to the type of packaging and refrigerated storage. Mean values bearing different letters for each day (A, B, C, NS-not significant) or between packaging systems (a, b, c, ns-not significant) differ significantly at $p < 0.05$.

Values of all measured parameters were significantly higher on all experimental days under both MAP types of packaging, as compared to vacuum one, except for days 8 and 12 for PCC, when no significant differences between methods were observed. These results are in line with shelf-life duration of vacuum-packed ostrich meat, as described by Capita *et al.* [2018].

The significant effect of the interaction between packaging method and day in *in vitro* digested ostrich meat samples was observed for the MDA and 4-HNE (Fig. 1 and 2). An increase of the MDA levels after *in vitro* digestion of the meat samples between all control points was observed under MAP 2 packaging method. Similarly, in MAP1 the MDA levels increased regularly over the experimental days, and no significant difference in the MDA levels were observed between day 8 and 12 (Fig. 1). 4-HNE levels were significantly lower under vacuum at the onset of the experiment (day 0), as compared to all other experimental days, both in MAP1 and MAP2 (Fig. 2). However, no significant differences in 4-HNE levels were observed along storage time in vacuum packed samples. The MDA values in MAP and MAP2 after digestion *in vitro* on the final experimental day (16) increased significantly in comparison with the day 0. In case of 4-HNE and HEX, their values raised significantly during storage time, either in samples after digestion process or in the raw ones. The results obtained in our study are generally in agreement with the results of digested chicken meat samples achieved by Sobral *et al.* [2020]. The value of HEX in the digested samples under MAP1 and MAP2 was over three times higher at the end of storage (day 16th),

as compared to the raw meat samples (Fig. 3). The PCC value for MAP1 and MAP2 after *in vitro* digestion was generally at the same level during the storage period (Fig. 4). Furthermore, according to results of Filgueras *et al.* [2011] the storage time had less impact than cooking on protein changes in rhea meat.

Conclusion

Based on obtained results in our study, it can be concluded that the effect of the interaction between packaging method and day in raw and after *in vitro* digestion of ostrich meat was observed for the MDA, 4-HNE and HEX parameters. In MAP 1 and MAP2 the increase of MDA and 4HNE levels was observed during storage, whereas the MDA value in ostrich raw meat in vacuum it was generally on the same level along 16-day storage. The value of 4-HNE overall increased in MAP1 and MAP2, whereas in VAC system it was stable during storage time. The PCC values for MAP1 and MAP2 after *in vitro* digestion were generally at the same level during the storage period.

Acknowledgments. *I would like to express my deep gratitude to Thomas Van Hecke from Ghent University for the support, constructive remarks and useful critique of this research work.*

REFERENCES

1. BORNHORST G.M., SINGH R.P., 2014 – Gastric digestion *in vivo* and *in vitro*: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 111-132.
2. CAPITA R., ÁLVAREZ-GONZÁLEZ T., ALONSO-CALLEJA C., 2018 – Effect of several packaging conditions on the microbiological, physicochemical and sensory properties of ostrich steaks during refrigerated storage. *Food Microbiology* 72, 146-156.
3. COOPER R.G., HORBAŃCZUK J.O., 2004 – Ostrich nutrition: a review from a Zimbabwean perspective. Monography. *Revue Scientifique et Technique de L Office International Des Epizooties* 23(3), 1033-1042.
4. COOPER, R.G.; NARANOWICZ, H.; MALISZEWSKA, E.; TENNETT, A.; HORBAŃCZUK, J.O., 2008 – Sex-based comparison of limb segmentation in ostriches aged 14 months with and without tibiotarsal rotation. *Journal of South African Veterinary Association* 79, 142-144.
5. COOPER R.G., TOMASIK C., HORBAŃCZUK J.O., 2007 – Avian influenza in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian and Poultry Biology Reviews* 18,3, 87-92.
6. ESCUDERO E., SENTANDREU M.A., TOLDRÁ F., 2010 – Characterization of peptides released by *in vitro* digestion of pork meat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58, 8, 5160-5165.
7. FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., SAYAS-BARBERÁ, E., MUÑOZ, T., SENDRA, E., NAVARRO, C., PÉREZ-ALVAREZ, J.A., 2008 – Effect of packaging conditions on shelf-life of ostrich steaks. *Meat Science* 78, 143-152.

8. FILGUERAS R.S., GATELLIER P., FERREIRAC., ZAMBIAZIR.C., SANTÉ-LHOUELLIER V., 2011 – Nutritional value and digestion rate of rhea meat proteins in association with storage and cooking processes. *Meat Science* 89, 6-12.
9. FILGUERAS R.S., GATELLIER P., ZAMBIAZI R.C., SANTÉ-LHOUELLIER V., 2012 – Effect of frozen storage duration and cooking on physical and oxidative changes in *M. Gastrocnemius pars interna* and *M. Iliofibularis* of rhea americana. *Meat Science* 88, 645-651.
10. GANHÃO R., MORCUENDE D., ESTÉVEZ M., 2010 – Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science* 85,3, 402-409.
11. HOFFMAN L.C., MAXINE JONES M. MULLER N., JOUBERT E., SADIE A., 2014 – Lipid and protein stability and sensory evaluation of ostrich (*Struthio camelus*) droëwors with the addition of rooibos tea extract (*Aspalathus linearis*) as a natural antioxidant. *Meat Science* 96, 1289-1296.
12. HORBAŃCZUK J., SALES J., CELEDA T., KONECKA A., ZIĘBA G., KAWKA P., 1998 – Cholesterol content and fatty acid composition of ostrich meat as influence by subspecies. *Meat Science* 50, 385-388.
13. HORBAŃCZUK J.O., KAWKA M., SACHARCZUK M, COOPER R.G., BORUSZEWSKA K., PARADA P., JASZCZAK K., 2007 – A search for sequence similarity between chicken (*Gallus domesticus*) and ostrich (*Struthio camelus*) microsatellite markers. *Animal Science Papers and Reports* 25, 283-288.
14. HORBAŃCZUK J.O, TOMASIK C, COOPER R.G, 2008 – Ostrich farming in Poland - its history and current situation after accession to the European Union. *Avian Poultry and Biology Reviews* 1, 65-71.
15. HORBAŃCZUK O.K., WIERZBICKA A., 2016 – Technological and nutritional properties of ostrich, emu, and rhea meat quality. *Journal of Veterinary Research* 60 (3), 279-286.
16. HORBAŃCZUK O.K., WIERZBICKA A., 2017 – Effects of packaging methods on shelf life of ratite meats. *Journal of Veterinary Research* 61 (3), 279-285.
17. HORBAŃCZUK O.K., MOCZKOWSKA M., MARCHEWKA J., ATANASOV A.G., KUREK M.A., 2019 – The Composition of fatty acids in ostrich meat influenced by the type of packaging and refrigerated storage. *Molecules* 24(22), 4128.
18. HORBAŃCZUK O.K., JÓŻWIK A., WYRWISZ, J., MARCHEWKA J., WIERZBICKA, A., 2021a – Physical characteristics and microbial quality of ostrich meat in relation to the type of packaging and refrigerator storage time. *Molecules* 26, 3445.
19. HORBAŃCZUK O.K., JÓŻWIK A., WYRWISZ J., MARCHEWKA J., ATANASOV A.G., WIERZBICKA A., 2021b – The activity of chosen antioxidant enzymes in ostrich meat in relation to the type of packaging and storage time in refrigeration. *Biomolecules* 11, 1338. <https://doi.org/10.3390/biom11091338>.
20. HU L., REN S., QING SHEN Q., YE X., CHEN J., LING J., 2018 – Protein oxidation and proteolysis during roasting and in vitro digestion of fish (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Science and Food Agriculture* 98, 5344-5351.
21. LI C., YU W., WU P., CHEN X.D., 2020 – Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology* 96, 114-126.
22. LUCAS-GONZÁLEZ R., VIUDA-MARTOS M., PÉREZ-ALVAREZ J.A., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., 2018 – In vitro digestion models suitable for foods: opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International* 107, 423-436.
23. NIEVA-ECHEVARRÍA B., GOICOECHEA E., GUILLÉN M.D., 2018 – Food lipid oxidation under gastrointestinal digestion conditions: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1538931>.

24. ORKUSZ A., HARAF G., OKRUSZEK A., WEREŃSKA-SUDNIK M., 2017 – Lipid oxidation and color changes of goose meat stored under vacuum and modified atmosphere conditions. *Poultry Science* 96, 3, 731-737.
25. PIECZYŃSKA M.D., YANG Y., PETRYKOWSKI S., HORBANČZUK O.K., ATANASOV A.G., HORBANČZUK J.O., 2020 – Gut Microbiota and its metabolites in atherosclerosis. *Development. Molecules* 25(3), 594.
26. POŁAWSKA E., TOLIK D., CIEPŁOCH A., HORBANČZUK O.K., RAES K., DE SMET S., 2016 – The effect of dietary oil seeds on the fatty acid profile and metabolism in ostrich liver. *Animal Science Papers and Reports* 34(2), 173-180.
27. SALES J., HORBANČZUK J.O., 1998 – Ratite Meat. *World's Poultry Science Journal* 54, 1, 59-67.
28. SALES J., HORBANČZUK J.O., DINGLE J., COLEMAN R., SENSIK S., 1999 – Carcase characteristics of emus (*Dromaius novaehollandiae*). *British Poultry Science* 40, 145-147.
29. SEYDIM A.C., ACTON J.C., HALL M.A., DAWSON P.L., 2006 – Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Science* 73 (3), 503-510.
30. SOBRAL M.M.C., CASAL S., FARIA M.A., CUNHA S.C., FERREIRA I. M.P. L.V. O., 2020 – Influence of culinary practices on protein and lipid oxidation of chicken meat burgers during cooking and in vitro gastrointestinal digestion. *Food and Chemical Toxicology* 141, 111401.
31. VAN HECKE T., BASSO V., DE SMET S., 2018 – Lipid and protein oxidation during in vitro gastrointestinal digestion of pork under helicobacter pylori gastritis conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 66, 49, 13000-13010, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04335>.
32. VAN HECKE T., HO P.L., GOETHALS S., DE SMET S., 2017a – The potential of herbs and spices to reduce lipid oxidation during heating and gastrointestinal digestion of a beef product. *Food Research International* 102, 785-792.
33. VAN HECKE T., GOETHALS S., VOSSSEN E., DE SMET S., 2019 – Long-chain n-3 PUFA content and n-6/n-3 PUFA ratio in mammal, poultry, and fish muscles largely explain differential protein and lipid oxidation profiles following in vitro gastrointestinal digestion. *Molecular Nutrition and Food Research* 63, 22, 1900404.
34. VAN HECKE T., VAN CAMP J., DE SMET S., 2017b – Oxidation during digestion of meat: interactions with the diet and helicobacter pylori gastritis, and implications on human health. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* 16, 2, 214-233.
35. VAN HECKE T., VOSSSEN E., HEMERYCK LY., VANDEN BUSSCHE J., VANHAECKE L., DE SMET S., 2015 – Increased oxidative and nitrosative reactions during digestion could contribute to the association between well-done red meat consumption and colorectal cancer. *Food Chemistry* 187, 29-36.
36. VAN HECKE T., VOSSSEN E., VANDEN BUSSCHE J., RAES K., VANHAECKE L., 2014 – Fat content and nitrite-curing influence the formation of oxidation products and NOC-Specific DNA adducts during in vitro digestion of meat. *PLoS ONE* 9(6): e101122. doi:10.1371/journal.pone.0101122.
37. VUORELA S., SALMINEN H., MÄKELÄ M., KIVIKARI R., KARONEN M., HEINONEN M., 2005 – Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 22, 8492–8497.
38. ZDANOWSKA-SĄSIADK Z., MARCHEWKA J., HORBANČZUK J.O., WIERZBICKA A., LIPIŃSKA P., JÓŻWIK A., 2018 – Nutrients composition in fit snacks made from ostrich, beef and chicken dried meat. *Molecules* 23, 1267.

Wyrażam zgodę na udostępnianie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW.

.....

(czytelny podpis autora)