

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Romana KARAS

**STABILNOST ALTERNATIVNEGA PIGMENTA RAZSOLJENEGA
MESA IN NJEGOVA PRIMERNOST ZA KOAGULATE MESNIH
EMULZIJ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**STABILITY AND APPLICABILITY OF CURED MEAT
ALTERNATIVE PIGMENT IN MODEL MEAT EMULSION
COAGULATES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2008

Popravki:

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Analize so bile opravljene na Katedri za tehnologijo mesa in gotovih jedi, Katedri za vrednotenje živil, Katedri za kemijo in Katedri za biotehnologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete ter na Katedri za molekularno genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani in v laboratoriju za biofiziko Odseka za fiziko trdne snovi (F5) Instituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorja doktorske disertacije imenoval prof. dr. Božidarja ŽLENDRA.

Mentor: prof. dr. Božidar ŽLENDER

Somentorica: prof. dr. Veronika ABRAM

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Milan SCHARA
Institut Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi

Član: prof. dr. Božidar ŽLENDER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Veronika ABRAM
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Julijana KRISTL
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora: 03. 06. 2008

Delo je rezultat lastnega znanstveno raziskovalnega dela.

Doktorandka:

Romana KARAS

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	637.52.002:547.97 (043)=163.6
KG	mesni izdelki / mesne emulzije / mesni pigmenti / vgrajevanje mesnih pigmentov / inkapsulacija / mikrodelci / pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa / CCMP
AV	KARAS, Romana, univ. dipl. ing. živ. tehnol.
SA	ŽLENDER, Božidar (mentor) / ABRAM, Veronika (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij živilske tehnologije
LI	2008
IN	STABILNOST ALTERNATIVNEGA PIGMENTA RAZSOLJENEGA MESA IN NJEGOVA PRIMERNOST ZA KOAGULATE MESNIH EMULZIJ.
TD	Doktorska disertacija s področja živilstva
OP	XIV, 140 str., 26 pregl., 73 sl., 170 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen raziskave je bil sintetizirati in stabilizirati alternativni pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP), mu podaljšati obstojnost ter ga uporabiti kot barvni dodatek v modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz različno pigmentiranega piščančjega mesa. CCMP je bil sintetiziran iz govejega hemina s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO) in reducentov (Na-askorbat in vitamin E), pri čemer je bil izkoristek sinteze 18,0 %. Primerna oksidativna stabilnost pigmenta je bila dosežena z metodo inkapsulacije CCMP-ja v alginatno ovojnico v inkapsulatorju Inotech IE-50 R z razbitjem laminarnega toka 2 % raztopine Na-alginata s CCMP-jem skozi šobo 250 µm v premreževalno raztopino 0,3 M CaCl ₂ . Ca ioni so premrežili molekule alginata in nastali so mikrodelci. Na modelnih mesnih emulzijah iz belega (prsi) in temnega (bedra) piščančjega mesa, obarvanih z nitritno soljo ter svežim in staranim inkapsuliranim CCMP-jem, je bila analizirana osnovna kemijska sestava, senzorična kakovost (barva in njena stabilnost, tekstura, vonj in aroma), instrumentalno so bili izmerjeni parametri barve (vrednosti L*, a*, b*) in teksture (tlačna, rezna in strižno-tlačna trdnost), opravljena je bila tudi statistična obdelava rezultatov s programom SAS. Ugotovili smo, da sta bila senzorično in instrumentalno iz vrednotena odtenek rožnate barve in intenzivnost barve emulzij, obarvanih z inkapsuliranim CCMP-jem, boljša, stabilnost barve pa slabša v primerjavi z emulzijami z dodatkom nitrita. Intenzivnost barve emulzij, pripravljenih s staranim CCMP-jem je bila senzorično slabše ocenjena od emulzij, pripravljenih s svežim CCMP-jem. Instrumentalno izmerjene komponente barve so kazale višjo vrednost L* (svetlejšo barvo) emulzij z dodatkom nitrita, medtem ko je bila intenzivnost rdeče barve (vrednost a*) večja pri emulzijah z dodatkom CCMP-ja (ne glede na starost). Na vonj in okus emulzij različni dodatki za razvoj barve niso vplivali, je pa dodatek CCMP-ja povzročil grenak priokus. Tekstura emulzij z dodatkom CCMP-ja je bila manj čvrsta v primerjavi s tistimi z nitritom, prav tako so bile manj čvrste emulzije, pripravljene iz beder kot iz prsi. CCMP bi bilo smotno uporabiti pri proizvodnji bolj kakovostnih in s prehransko-zdravstvenega stališča bolj varnih mesnin, pri čemer bi bilo potrebno grenak priokus, ki verjetno izhaja iz dodanega fosfata v procesu sinteze CCMP-ja in pri izdelavi mesne emulzije, na nek način prekriti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 637.52.002:547.97 (043)=163.6
CX meat products / meat emulsions / meat pigments / incorporation of meat pigments / encapsulation / microparticles / pigment of cooked cured meat pigment / CCMP
AU KARAS, Romana
AA ŽLENDER, Božidar (supervisor) / ABRAM, Veronika (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Food Technology
PY 2008
TI STABILITY AND APPLICABILITY OF CURED MEAT ALTERNATIVE PIGMENT IN MODEL MEAT EMULSION COAGULATES.
DT Dissertation thesis
NO XIV, 140 p., 26 tab., 73 fig., 170 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of this research was to synthesise and stabilise an alternative thermally-processed i.e. cooked cured-meat pigment (CCMP), prolong its stability and use it as a colour additive in model meat emulsion coagulates, prepared from differently pigmented chicken meat. CCMP was synthesized by using bovine haemine, nitrite complex (nitrogen oxide-NO) and a reducing agents (Na-ascorbate and vitamine E). The recovery of synthesis was 18.0 %. Proper oxidative stability of pigment was achieved by efficient encapsulation of CCMP in alginate beads in Inotech IE-50 R encapsulator, which functions by breaking the laminar liquid jet of 2 % Na-alginate solution with CCMP into droplets using the 250 μm nozzle and 0.3 M CaCl_2 cross-linking scheme solution. Ca-iones crosslinked alginate molecules forming microparticles. The basic chemical composition, sensory properties (colour and its stability, texture, smell and flavour), instrumentally measured colour (L^* , a^* , b^*) and texture values (Warner-Bratzler, Shear Force, Kramer Force) on the model meat emulsion coagulates, prepared from white and dark chicken meat coloured with nitrite salt, fresh and aged CCMP were determined. The results were statistically analyzed with the SAS program. It was established that the sensorially and instrumentally evaluated rose-coloured hue and colour intensity of the emulsions, coloured with the encapsulated CCMP were better and the colour stability worse than in the nitrite salt case. The ageing of CCMP pigment deteriorated colour intensity of coagulate. The coagulate with nitrite salt exhibited brighter (higher L^* value) and redder colour than the coagulate with fresh and aged CCMP. Smell and flavour were not affected by different colour development agents; adding of CCMP caused a bitter off-flavour. The CCMP-coagulate texture was more tender than in the nitrite-coagulate; the coagulates made from thighs were more tender than those from breasts. The CCMP would be best used for the production of the meat products of higher quality and safer from the nutritional and health aspect, while taking steps to cover the bitter off-flavour, which probably derives from the added phosphate in the process of synthesizing CCMP and in the production of meat emulsions.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BELJAKOVINE MIŠIČNIH VLAKEN	3
2.2 BARVA MESA	4
2.2.1 Vsebnost mioglobina	6
2.2.2 Oblike mioglobina	7
2.3 KEMIJSKI POSTOPKI KONZERVIRANJA.....	15
2.3.1 Razsoljevanje	16
2.3.1.1 Pigmenti razsoljenega mesa in oblikovanje barve	17
2.3.1.2 Doziranje nitrata in nitrita.....	22
2.3.1.3 Vpliv nitrita na tvorbo arome.....	25
2.3.1.4 Antioksidativen učinek nitrita.....	25
2.3.1.5 Antimikroben učinek nitritov.....	26
2.3.1.6 Zdravstveni vidik uporabe nitrita.....	28
2.4 ALTERNATIVE NITRITA	30
2.4.1 Antimikrobno delovanje nadomestkov nitrita	31
2.4.2 Antioksidativna vloga nitrita in njegovih nadomestkov	32
2.5 PIGMENT TOPLOTNO OBDELANEGA RAZSOLJENEGA MESA (CCMP).....	33
2.5.1 Antioksidativni učinek CCMP-ja	37
2.5.2 Stabilizacija CCMP-ja	38
2.6 MESNE EMULZIJE	38
2.6.1 Potek oblikovanja emulzije	40
2.6.1.1 Razdevanje mesa	41
2.6.2 Toplotna obdelava mesne emulzije	42
2.6.2.1 Namen toplotne obdelave	42
2.6.2.2 Sprememba zgradbe razdetega mesa med toplotno obdelavo	43
2.6.3 Reakcije mišičnega barvila	43
2.6.4 Dejavniki oblikovanja barve mesne emulzije	45
2.6.4.1 Podtlak	45
2.6.4.2 Temperatura in čas toplotne obdelave	45
2.6.4.3 Vrednost pH.....	46
2.6.4.4 Pomožne snovi za razsoljevanje	46
2.6.4.5 Drugi dejavniki, ki vplivajo na nastanek in stabilnost barve	46
2.6.5 Tehnološki postopek izdelovanja barjenih klobas	47
2.7 SENZORIČNE IN INSTRUMENTALNE LASTNOSTI MESNIH EMULZIJ	48
2.7.1 Vizualne zaznave kakovosti mesne emulzije	48
2.7.2 Dejavniki, ki vplivajo na barvo piščančjega mesa	49

2.7.2.1	Senzorični deskriptorji za videz in barvo.....	49
2.7.2.2	Instrumentalno vrednotenje barve	50
2.7.3	Tekstura, vonj in aroma mesnih emulzij	51
2.7.3.1	Teksturni profil	51
2.7.3.2	Vonj in aroma	53
2.8	MIKRODELCI.....	53
2.8.1	Metode za izdelavo mikrodelcev	54
2.8.2	Vrednotenje mikrodelcev	54
2.8.3	Inkapsuliranje	55
2.8.4	Proizvodnja v večjem obsegu	55
2.8.4.1	“Vibrating nozzle“	56
2.8.5	Polimeri	56
2.8.6	Alginska kislina in alginati	56
2.8.6.1	Prednosti uporabe alginata pri izdelavi mikrodelcev	59
2.9	ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA (SPINSKA) RESONANCA	59
2.9.1	EPR paramagnetnih centrov z železovimi ioni.....	63
2.9.2	EPR spektrometer	67
3	MATERIAL IN METODE DELA	69
3.1	NAČRT POSKUSA	69
3.2	SINTEZA PIGMENTA TOPLOTNO OBDELANEGA RAZSOLJENEGA MESA	69
3.3	IZDELAVA MESNIH EMULZIJ IZ PIŠČANČJEGA MESA.....	70
3.3.1	Merjenje temperature svežega mesa	71
3.3.2	Merjenje vrednosti pH svežega mesa	71
3.3.3	Postopek izdelave mesnih emulzij.....	72
3.3.4	Predstavitev tehnoloških faz izdelave emulzij	73
3.4	SENZORIČNA ANALIZA	74
3.5	INSTRUMENTALNO MERJENJE BARVE MESNIH EMULZIJ	75
3.6	DOLOČANJE OSNOVNE KEMIJSKE SESTAVE MESNIH EMULZIJ.....	76
3.6.1	Določanje vsebnosti vode s sušenjem.....	76
3.6.2	Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi	76
3.6.3	Določanje vsebnosti maščob po Weibullu in Stoldt	76
3.6.4	Določanje vsebnosti beljakovin z metodo po Kjeldahlu	76
3.7	INSTRUMENTALNO MERJENJE REOLOŠKIH LASTNOSTI EMULZIJ	77
3.8	ANALIZA SINTETIZIRANEGA CCMP-ja S POMOČJO ELEKTRONSKE PARAMAGNETNE RESONANCE	77
3.8.1	Opis EPR spektrometra.....	77
3.8.2	Material in priprava vzorcev	78
3.9	VGRAJEVANJE CCMP-ja V RAZLIČNE SISTEME.....	79
3.9.1	Disperzija v polivinilnem alkoholu	79
3.9.2	Vgrajevanje v polimerne nanodelce z emulzijsko difuzijsko metodo.....	79
3.9.3	Vgrajevanje v trdne lipidne nanodelce.....	79
3.10	INKAPSULACIJA SINTETIZIRANEGA CCMP-ja	79
3.10.1	Inkapsulator Inotech IE-50 R	79
3.10.2	Princip delovanja	82
3.10.3	Potrebni materiali za izdelavo mikrodelcev.....	84
3.10.4	Priprava raztopine polimera.....	85
3.10.5	Izdelava mikrodelcev	85
3.10.5.1	Princip razbitja laminarnega toka	85

3.10.5.2	Princip metode kapljanja	85
3.10.5.3	Premreževanje mikrodelcev	86
3.10.5.4	Spiranje mikrodelcev	86
3.10.5.5	Sušenje mikrodelcev na papirju	86
3.11	STATISTIČNA ANALIZA	86
4	REZULTATI	88
4.1	SINTEZA PIGMENTA TOPLOTNO OBDELANEGA RAZSOLJENEGA MESA (CCMP)	88
4.2	IZRAČUN IZKORISTKA SINTEZE CCMP-ja	88
4.3	IZRAČUN VSEBNOSTI UPORABLJENEGA CCMP-ja PRI IZDELAVI KOAGULATOV MESNIH EMULZIJ	89
4.4	KVANTITATIVNA ANALIZA PIGMENTA CCMP-ja IN NJEGOVA STABILNOST	89
4.4.1	EPR spekter hemina raztopljenega v dveh različnih topilih	89
4.4.2	Vpliv dodatka Na-tripolifosfata pri sintezi CCMP-ja na obliko EPR spektra pri različnih temperaturnih merjenjih (topilo aceton)	90
4.4.3	EPR spekter sveže sintetiziranega CCMP-ja, raztopljenega v dveh različnih topilih	90
4.4.4	Vpliv frekvence modulacije na EPR spektre vzorcev CCMP-ja	91
4.4.5	Vpliv temperature merjenja na obliko EPR spektra CCMP-ja, raztopljenega v acetonu	91
4.4.6	EPR spektri CCMP-ja, ki je bil sintetiziran z dodatkom bakra v različnih oblikah	92
4.4.7	EPR spektri CCMP-ja, ki je bil sintetiziran z dodatkom različnih količin vitamina E	93
4.5	VGRAJEVANJE CCMP-ja V RAZLIČNE SISTEME	95
4.5.1	Disperzija v polivinilnem alkoholu	95
4.5.2	Vgrajevanje v poliakrilatne nanodelce z emulzijsko difuzijsko metodo	96
4.5.3	Vgrajevanje v trdne lipidne nanodelce	97
4.6	INKAPSULACIJA CCMP-ja V ALGINATNE MIKRODELCE	98
4.6.1	Vgrajevanje CCMP-ja	98
4.6.1.1	Razbitje laminarnega toka pri uporabi šobe 250 μm	98
4.6.1.2	Princip metode kapljanja pri uporabi šobe 500 μm	100
4.6.1.3	Vrednotenje stabilnosti vgrajenega CCMP-ja	101
4.7	KEMIJSKI PARAMETRI	103
4.8	SENZORIČNE LASTNOSTI	105
4.9	INSTRUMENTALNI PARAMETRI BARVE	110
4.10	INSTRUMENTALNI PARAMETRI TEKSTURE	115
4.11	KORELACIJE MED SENZORIČNIMI LASTNOSTMI IN INSTRUMENTALNIMI PARAMETRI	118
5	RAZPRAVA	120
6	SKLEPI	124
7	POVZETEK	125
8	SUMMARY	127
9	VIRI	130

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1	Tri najpomembnejše oblike mioglobina in njihove barve (Hamm, 1975)..... 7
Preglednica 2	Odvisnost barve mesa od parcialnega tlaka kisika (Potthast, 1987)..... 10
Preglednica 3	Vpliv količine metmioglobina na oblikovanje barve pri mesnih izdelkih (Wirth, 1985; Potthast, 1987)..... 11
Preglednica 4	Spremembe barve na površini mesa v odvisnosti od oblike mioglobina (Lawrie, 1979)..... 14
Preglednica 5	Vsebnost nitrita in nitrata v mesu, začimbah in pitni vodi (Wirth, 1985). 24
Preglednica 6	Učinek nitrita na oksidativno stabilnost mesa (podatki so kot TBK vrednosti) (Gray in Crackel, 1992)..... 26
Preglednica 7	Instrumentalna analiza barve izdelkov z dodatkom določene količine NaNO ₂ in CCMP-ja (Shahidi in Pegg, 1990)..... 35
Preglednica 8	Vsebnost pigmenta in dodanega CCMP-ja glede na vrsto mesa (Shahidi in Pegg, 1991)..... 35
Preglednica 9	Vsebnost skupnega hemoprotein pigmenta v posameznih vrstah in oblikah mesa in potreben dodatek pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) z namenom doseči rožnato barvo živila (Pegg in Shahidi, 2000). 36
Preglednica 10	Oblikovanje barve barjenih klobas v odvisnosti od temperature in časa toplotne obdelave (Wirth, 1985)..... 45
Preglednica 11	Lastnosti alginske kisline in njenih soli monovalentnih kationov (McGinity in Repka, 2002). 57
Preglednica 12	Sestava mesnih emulzij. 72
Preglednica 13	Osnovni izračunani statistični parametri za kemijsko sestavo emulzij iz piščančjega mesa. 104
Preglednica 14	Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na kemijske parametre emulzij iz piščančjega mesa. 104
Preglednica 15	Testiranje razlik v kemijski sestavi emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki za razvoj barve, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$). 105
Preglednica 16	Osnovni izračunani statistični parametri za senzorične lastnosti emulzij iz piščančjega mesa. 106
Preglednica 17	Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na senzorične lastnosti emulzij iz piščančjega mesa. 106
Preglednica 18	Testiranje razlik v senzorični kakovosti emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$). 107
Preglednica 19	Osnovni izračunani statistični parametri instrumentalne analize barve emulzij iz piščančjega mesa. 111
Preglednica 20	Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na instrumentalne parametre barve emulzij iz piščančjega mesa..... 111
Preglednica 21	Testiranje razlik v instrumentalno izmerjeni barvi emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$). 112

Preglednica 22	Osnovni izračunani statistični parametri instrumentalne analize teksture emulzij iz piščančjega mesa.	115
Preglednica 23	Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na instrumentalne parametre teksture emulzij iz piščančjega mesa.	117
Preglednica 24	Testiranje razlik v instrumentalno izmerjeni teksturi emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	117
Preglednica 25	Tesnost povezave med senzoričnimi lastnostmi barve in instrumentalno izmerjenimi parametri barve (Pearsonovi korelacijski parametri, R).....	118
Preglednica 26	Tesnost povezave med senzoričnimi lastnostmi teksture in instrumentalno izmerjenimi parametri teksture (Pearsonovi korelacijski parametri, R).....	119

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1	Model mioglobina (Campbell, 1995)..... 5
Slika 2	Model mioglobina pri visoki resoluciji. Prikazani so samo α ogljikovi atomi. Hem skupina je prikazana z rdečo in dva ključna ostanka histidina z zeleno (Stryer, 1995). 5
Slika 3	Model hemoglobina (Campbell, 1995)..... 5
Slika 4	Kvartarna struktura hemoglobina (Campbell, 1995)..... 6
Slika 5	Odtenci rdeče barve mišičnine pri raznih vrstah mesa: govedina, mlada govedina, teletina, svinjina, perutnina (Bučar, 1997)..... 6
Slika 6	Sprememba pigmenta v sveži mišičnini – mioglobin, oksimioglobin in metmioglobin (N – pomeni dušikov atom v pirolovem obroču porfirina) (Hamm, 1975). 8
Slika 7	Oblike mioglobina na primeru mišičnine govede: mioglobin, oksimioglobin in metmioglobin (Tri oblike mioglobina, 1997)..... 8
Slika 8	Medsebojna povezava pigmentov svežega mesa (Pegg in Shahidi, 2000)..... 9
Slika 9	Strukturna formula hema (Rahelić, 1978) 9
Slika 10	Primerjava nativne reducirane oblike mioglobina z oksimioglobinom pri govejem mesu (Bučar, 1997)..... 10
Slika 11	Osnovna kemijska reakcija oblikovanja barve razsoljenega mesa (Bučar in sod., 1989)..... 12
Slika 12	Kemijski mehanizem razsoljevanja (Pegg in Shahidi, 2000). 12
Slika 13	Nekatere specifične kemijske reakcije, ki so rezultat dodatka nitrita v meso (Pegg in Shahidi, 2000)..... 13
Slika 14	Oblikovanje pigmenta razsoljenega mesa (Wilson, 1981). 18
Slika 15	Reakcijski mehanizem tvorbe nitrozomioglobina (Bučar in sod., 1989). 19
Slika 16	Kemične spremembe mioglobina v razsoljenem mesu (Gašperlin, 1998) 20
Slika 17	Reakcije mioglobina in hemoglobina z nitrozirnim sredstvom (Shahidi in Pegg, 1992 in 1993a)..... 20
Slika 18	Kemijska struktura mononitrozilmioglobina in dinitrozilmioglobina (Pegg in Shahidi, 1996; Pegg in sod., 1996). 21
Slika 19	Kemijska strukturna formula nitrozomioglobina (Potthast, 1987)..... 21
Slika 20	Priprava pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) iz hemina izoliranega iz govejih rdečih krvnih celic (Pegg in Shahidi, 1997 in 2000). 37
Slika 21	Shematska predstavitev emulgatorja s hidrofilnim (polarna glava) in hidrofobnim delom. (a) Orientiranost molekul emulgatorja, ki so adsorbirane na oljno kapljico v oljno-vodni emulziji (b) orientiranost v vodno-oljni emulziji (Clark, 1993)..... 40
Slika 22	Shematski prikaz mikrokapsule in mikrosfere (Burgess in Hickey, 2007). 54
Slika 23	Stereokemična struktura GG, MM in MG blokov (Kovač in Krbavčič, 1999)..... 57
Slika 24	Stereokemična struktura GG bloka s Ca^{2+} ioni (Kovač in Krbavčič, 1999)..... 58
Slika 25	Struktura jajčne posode (Kovač in Krbavčič, 1999). 58
Slika 26	Energijski nivoji nitroksidnega radikala v magnetnem polju (Marsh, 1981)..... 62

Slika 27	Razporeditev elektronov fero in feri iona (Pegg in Shahidi, 1997).....	64
Slika 28	Cepitev 3d orbital v oktaedrično, tetragonalno ali romboidno simetrijo (Pegg in Shahidi, 1997).....	64
Slika 29	Razporeditev 3d elektronov feri in fero iona v d orbitale za različno močna elektrostatična polja okoli železovega iona za šest koordinatni oktaedrični kompleks (Pegg in Shahidi, 1997).....	65
Slika 30	Značilen EPR spekter petkoordinatnega nitrozohema: sintetični nitrozoprotohem dimetil ester v acetonu pri 77 °K (Bonnett in sod., 1980).....	66
Slika 31	Tipični EPR spekter šestkoordinatnega nitrozohema, šesti ligand je dušik. Nitrozoprotohem v piperidinu pri 93 °K (Bonnett in sod., 1980).....	66
Slika 32	EPR spektri raztopin pri 77 °K prikazujejo pet ali šest koordinatno obliko železovega iona v hemoglobinu. (A) Pripravljen pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) v acetonu (po centrifugiranju brez prisotnih delcev), (B) CCMP v piridinu, (C) CCMP v acetonu (brez centrifugiranja delci prisotni) (Pegg in Shahidi, 1997).	67
Slika 33	Splošna shema EPR spektrometra (Wertz in Bolton, 1972).....	68
Slika 34	Posamezne faze sinteze pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP-ja).....	69
Slika 35	Sinteza CCMP-ja iz hemin klorida (Shahidi in Pegg, 1993).....	70
Slika 36	Tehnološke faze izdelave emulzij.	73
Slika 37	CIE L*, a*, b* - barvni prostor (Murray, 1992).	75
Slika 38	Fotografija EPR spektrometra Bruker ESP 300 E.....	78
Slika 39	Kontrolna enota z reakcijsko posodo.	80
Slika 40	Shematska predstavitev sistema koncentrične šobe.	81
Slika 41	Sistem koncentrične šobe iz nerjavečega jekla.	82
Slika 42	Shematski prikaz inkapsulatorja IE-50 R.....	83
Slika 43	EPR spekter čistega hemina.	89
Slika 44	Spreminjanje intenzitete EPR spektrov CCMP-ja z dodatkom Na-tripolifosfata (desno) ali brez njega (levo) s časom merjenja.....	90
Slika 45	Značilen tripletni signal Fe ²⁺ -NO kompleksa EPR spektra CCMP-ja.....	91
Slika 46	Oblika EPR spektra značilnega tripleta CCMP-ja glede na temperaturo merjenja.	92
Slika 47	Primerjava oblike EPR spektrov CCMP-ja, sintetiziranega z dodatkom bakra v različnih oblikah (koščki Cu žice zgoraj levo, Cu žica zgoraj desno in granule Cu spodaj).	93
Slika 48	Časovna odvisost stabilnosti pigmenta CCMP-ja, pripravljenega z različnimi dodatki vitamina E.	94
Slika 49	Specifičen EPR spekter CCMP-ja v polivinilnem alkoholu.....	95
Slika 50	Spremembe EPR spektrov za pigment CCMP vgrajen v poliakrilatne nanodelce med shranjevanjem na zraku in sobni temperaturi.....	96
Slika 51	EPR spekter vgrajenega CCMP-ja v trdne lipidne nanodelce brez značilnega trojnega razcepa.....	97
Slika 52	Inkapsuliran CCMP.....	98
Slika 53	Posamični mikrodelci CCMP-ja v 2 % alginatu takoj po pripravi.....	99
Slika 54	Inkapsuliran CCMP skladiščen v vodi (a), v raztopini 0,3 M CaCl ₂ (b).	99
Slika 55	Mikrodelci CCMP-ja v 2 % alginatu, sušeni na zraku 24 ur.....	99

Slika 56	Zlepljeni mikrodenci CCMP-ja takoj po pripravi.	100
Slika 57	EPR spekter CCMP-ja v 2 % alginatu premreženim s Ca^{2+}	101
Slika 58	Stabilnost CCMP-ja pri različnih koncentracijah alginata v tekočem dušiku (a) in pri sobni temperaturi (b).	102
Slika 59	Stabilnost CCMP-ja v alginatu različnih koncentracij (a) 1,5 %, b) 2 %, c) 2,5 % in d) 3 % alginat), skladiščenega v tekočem dušiku in pri sobni temperaturi.	102
Slika 60	Stabilnost CCMP-ja v alginatu različnih koncentracij (a) 1,5 %, b) 2 %, c) 2,5 % in d) 3 % alginat), skladiščenega 6 ur v tekočem dušiku in pri sobni temperaturi.	103
Slika 61	Prsa (levo – nitrit, desno – CCMP; sveži rez).	108
Slika 62	Bedra (levo – nitrit, desno – CCMP; sveži rez).	108
Slika 63	CCMP (levo prsa, desno bedra; sveži rez).	108
Slika 64	Sveži rez – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).	109
Slika 65	15 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).	109
Slika 66	30 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).	109
Slika 67	45 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).	110
Slika 68	60 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).	110
Slika 69	Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev emulzij, izdelanih iz piščančjih prsi, prikazana glede na vzorce z nitritom (sveži rez).	113
Slika 70	Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev emulzij, izdelanih iz piščančjih beder, prikazana glede na vzorce z nitritom (sveži rez).	114
Slika 71	Grafični prikaz instrumentalno izmerjene tlačne trdnosti pri prsah z dodatkom mikrodencov CCMP-ja.	115
Slika 72	Grafični prikaz instrumentalno izmerjene rezne trdnosti Warner-Bratzler pri prsah z dodatkom mikrodencov CCMP-ja.	116
Slika 73	Grafični prikaz instrumentalno izmerjene strižno-tlačne trdnosti (Kramer) pri prsah z dodatkom CCMP-ja.	116

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A = hiperfina sklopitveni tenzor
ADI = sprejemljivi dnevni vnos (Acceptable Daily Intake)
 a_w = aktivnost vode
B = gostota magnetnega polja
BHA = butilhidroksianizol
BHT = butilhidroksitoluen
BMW kakovost = bleda mehka vodena mišičnina
C = nasičenost barve
CCMP = pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (Cooked cured meat pigment)
D = vpliv dodatka za oblikovanje barve (nitrit, CCMP – svež ali staran)
E 249 = kalijev nitrit
E 250 = natrijev nitrit
E 251 = natrijev nitrat
E 252 = kalijev nitrat
EDTA = etilendiaminotetraacetat
 e_{ijklm} = rezidualni ostanek pri statistični obdelavi podatkov
EPR = elektronska paramagnetna resonanca
F = empirični faktor za preračunavanje dušika v beljakovine za meso = 6,25
FAO = The Food and Agriculture Organization
G = α -L-guloronska kislina
g = spektroskopski cepitveni tenzor
GDL = glukono-delta-lakton
GMP = smernice oziroma načela dobre prakse
GRAS status = generally recognized as safe
H = kot barvnega odtenka
h = Planckova konstanta
HbNO = nitrozohemoglobin
JECFA = Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives
KV = koeficient variabilnosti
M = molarost raztopine (mol/l)
M = β -D-manuronska kislina
M = vpliv vrste mišice (prsa, bedra)
M^{*}D = vpliv interakcije med vrsto mišice in dodatkom za oblikovanje barve
Maltrin M-250 = maltodekstrin
max = maksimalna vrednost
Mb = mioglobin
MbO₂ = oksimioglobin
metMb = metmioglobin
metMbNO = nitrozometmioglobin
 m_l = projekcija jedrskega spina
min = minimalna vrednost
 m_s = projekcija elektronskega spina
n = število obravnavanj
NADPH = nikotinamidadeninukleotidfosfat
NH = nitrit hladilnik (4 °C)

N-LOK = modificiran škrob
NOC = nitrozamini in nitrozabilne snovi
NOMb = nitrozomioglobin
NS = nitrit sobna temperatura ($\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
NSR = nitrit sveži rez
 $P \leq 0,001$ = statistično zelo visoko značilno
 $P \leq 0,01$ = statistično visoko značilno
 $P > 0,05$ = statistično neznačilno
 $P \leq 0,05$ = statistično značilno
 P_{450} = citokrom P_{450}
Pa = Pascal
PAR = vpliv paralelke oziroma ocenjevalca
PG = propil galat
PON = vpliv ponovitve
S = kvantno število za spin elektrona
sd = standardni odmik
StCCMPH = starani inkapsuliran CCMP hladilnik ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
StCCMPS = starani inkapsuliran CCMP sobna temperatura ($\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
StCCMPSR = starani inkapsuliran CCMP sveži rez
SvCCMPH = sveži inkapsuliran CCMP hladilnik ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
SvCCMPS = sveži inkapsuliran CCMP sobna temperatura ($\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
SvCCMPSR = sveži inkapsuliran CCMP sveži rez
SVV = sposobnost mesa za vezanje vode
T = Tesla = 10^4 Gauss = enota za magnetno poljsko jakost
TBHQ = 2-terciarni-butil-hidroksikinon
TBK = tiobarbiturna kislina
TČS kakovost = trda čvrsta suha mišičnina
 T_H = rezina mesne emulzije v hladilniku ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
 T_O = sveža rezina mesne emulzije
 T_S = rezina mesne emulzije pri sobni temperaturi ($\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
vrednost a^* = odtenek rdeče barve vzorca (vrsta mesa)
vrednost b^* = odtenek rumene barve vzorca (oksigenacija)
vrednost L^* = svetlost barve vzorca (kakovost mišičnine)
WHC = sposobnost za vezanje vode (Water holding capacity)
WHO = Svetovna zdravstvena organizacija (The World Health Organization)
 \bar{x} = povprečna vrednost
 y_{ijklm} = ijklm-to opazovanje
 β = Bohrov magneton
 μ = magnetni moment paramagnetnega centra
 ν = frekvenca mikrovalov
 τ_C = rotacijski korelacijski čas

1 UVOD

Današnja prehranska spoznanja z vidika zdravega prehranjevanja jasno poudarjajo vlogo in pomen živil, ki ne vsebujejo snovi, za katere je dokazano, da so zdravju škodljive. Znano je, da je človek izpostavljen kancerogenim spojinam, ki izvirajo iz mnogih in različnih virov. Prehrana ima poleg vseh ostalih nevarnostnih dejavnikov in načina življenja (kajenje, poklicna izpostavljenost kancerogenim spojinam v različnih vrstah industrije, izpušni plini, stres, telesna neaktivnost) brez dvoma pomembno vlogo pri nastajanju civilizacijskih bolezni, med katerimi je rak pogosta in usodna bolezen. Zato se potrošniki tako v svetu kot tudi pri nas, čedalje bolj zavedajo, kako pomembna je zdrava prehrana in toliko bolj se želijo izogniti vsem tveganjem.

V predelavi mesa ima proces razsoljevanja mesa z nitritno soljo dolgo tradicijo. Proces nitrozacije mišičnega pigmenta mioglobina je namenjen oblikovanju termostabilnega pigmenta nitrozomioglobina oziroma denaturiranega nitrozomiohromogena, ki mesnemu izdelku daje značilno barvo in aromo. Rezidualni nitrit v izdelku hkrati učinkuje antimikrobno, predvsem inhibira termofilne anaerobne bakterije kot nevarne povzročitelje alimentarnih infekcij ter učinkuje kot antioksidant. Nitrit je hkrati toksičen in lahko v razsoljenem mesu ali v prebavnem traktu človeka reagira s sekundarnimi in tudi nekaterimi terciarnimi amini in pri tem se tvorijo kancerogeni N-nitrozamini. Možne rešitve, glede zmanjševanja nastanka nitrozaminov ali celo njihove eliminacije, se kažejo v zmanjševanju količine dodatka nitrita v izdelkih in v iskanju zamenjave (alternative) nitrita, ki bi slednjega nadomestila v vseh pogledih. Prav ta problematika je bila povod za našo raziskavo.

Kot prispevek k bolj zdravi prehrani je bil cilj moje naloge proučiti možnost zamenjave nitrita z alternativnim pigmentom toplotno obdelanega razsoljenega mesa (Cooked cured meat pigment – CCMP), določiti stabilnost tega pigmenta in podaljšati njegovo obstojnost, glede na to, da na zraku hitro oksidira v feri obliko, ki nima značilne rdeče barve. Stabilizacija pigmenta bi bila tako nujno potrebna in kot taka velik korak v inovativnosti in doprinos k razvoju tega specifičnega strokovnega področja. Temu bi nato sledila proizvodnja bolj kakovostnih in s prehransko-zdravstvenega stališča bolj varnih mesnin. Pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa ima funkcijo barvila, je brez zaostankov nitrita in brez nevarnosti tvorbe zdravju škodljivih snovi. Pri proučevanju smo se usmerili v pripravo pigmenta v določenem nosilcu s pomočjo različnih pomožnih snovi na osnovi predhodnih študij (osnovnih fizikalno-kemijskih testov za kompatibilnost obeh spojin – CCMP in izbranega nosilca) in z različnimi metodami. Nosilni sistemi, kot so mikrodelci in nanodelci, predstavljajo eno od najobetavnejših tehnologij razvoja tako v prehranski industriji kot tudi v biotehnologiji. Običajno tehniko za imobilizacijo spojin predstavlja njihovo zajetje v gelirane sfere – najpogosteje je to inkapsulacija v alginatno ovojnico (z ustrežno koncentracijo raztopine alginata in izbrano premreževalno raztopino).

Tovrstni izdelki bodo v prihodnosti predstavljali vedno večji tržni delež, kar je posledica zahtev vedno bolj osveščenih porabnikov. V prihodnje lahko v tem pogledu pričakujemo vedno bolj zahtevne porabnike, ki bodo z vidika zdrave prehrane za bolj varne izdelke pripravljene odšteti tudi več denarja. Potemtakem ne gre za vprašanje ali je nitrit zaželjena in potrebna sestavina mesnin, temveč gre bolj za vprašanje, koliko ga lahko v njih

zmanjšamo in s kakšnimi postopki, da bi bila hkrati senzorična kakovost in sprejemljivost izdelka čim bolj primerljiva tisti z dodatkom nitrita.

1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA

Sama sinteza CCMP je relativno nezahtevna, čeprav mora potekati v redukcijskem okolju zaradi nestabilnosti tega pigmenta na zraku, kar je ključnega pomena za njegovo uporabnost v mesnih izdelkih. Predpostavili smo, da bi bila možna zaščita pigmenta pred oksidacijo ne samo prisotnost reducentov, ampak tudi vgrajevanje CCMP-ja v različne sisteme. Zato naj bi s primerno metodo vgrajevanja poskusili stabilizirati pigment do uporabe v modelnih koagulatih mesnih emulzij iz mehansko ločenega piščančjega mesa. Predpostavljali smo, da bo učinek obarvanja mesne emulzije s CCMP odvisen tudi od vsebnosti mioglobina, ki je različna v t.i. belem in temnem piščančjem mesu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BELJAKOVINE MIŠIČNIH VLAKEN

Beljakovine so najpomembnejša sestavina mesa s prehranskega in tehnološkega vidika. Glede na temeljne fiziološke značilnosti ločimo rdeča, bela in vmesna – intermediarna mišična vlakna. Mišično vlakno je kot osnovna enota skeletnih mišic skupek miofibril povezanih z vezivom (Valin in Ouali, 1992). Miofibrile so tanke niti, premera 1-2 μm , ki potekajo čez celo mišično vlakno in ležijo tesno druga ob drugi (Honikel, 1992).

- **Rdeča mišična vlakna** (aerobna) so manjšega premera od belih mišičnih vlaken, v njih poteka predvsem oksidativna razgradnja. Njihovo krčenje je razmeroma počasno in dolgotrajno. Vsebujejo veliko mitohondrijev, mioglobina (zato so bolj intenzivno obarvana) in manj glikogena ter glikogen-fosforilaze.
- **Bela mišična vlakna** (anaerobna) imajo večji premer in manjšo oksidativno razgradnjo. Hitro se krčijo, vendar je skrčenje kratkotrajno. Imajo malo mitohondrijev, mioglobina (so svetlejša) in veliko glikogena ter glikogen-fosforilaze.
Pri mišicah prežvekovalcev je delež rdečih mišičnih vlaken višji v primerjavi z belimi mišičnimi vlakni kot pa pri prašičjem ali perutninskem mesu.
- **Vmesna – intermediarna vlakna** so vlakna, kjer je prisotnih več podtipov med rdečimi in belimi vlakni. Krčijo se hitreje kot rdeča in počasneje kot bela mišična vlakna.
- Poznana so tudi **orjaška vlakna**, za katera poreklo in vloga v mišici niso pojasnjeni.

Beljakovine mišičnih vlaken delimo v beljakovine mišičnih kontraktilnih niti (miofibrilarne), beljakovine plazme (sarkoplazemske) in strome skeletnega mišičnega vlakna. Najpomembnejši **miofibrilarni beljakovini** sta miozin in aktin, saj prispevata od 55 do 60 % k skupni količini beljakovin v mišičnini. Med **sarkoplazemskimi beljakovinami** so najpomembnejši mišični pigment mioglobin in proteolitični encimi, ki sodelujejo v procesih zorenja mesa.

V pusti mišičnini vseh vrst živali je od 18 do 22 % beljakovin. Od tega je približno 10 % miofibrilarnih (topne v 0,6 M KCl), 6 % sarkoplazemskih in subcelularnih (topne v vodi ali 0,1 M KCl) in 2 % vezivno-tkivnih (Valin in Ouali, 1992). Sodobna delitev deli sarkoplazemske beljakovine na štiri strukturne komponente: nuklearna (jedrna), mitohondrijska, mikrozomska in citoplazemska frakcija.

Mišično barvilo mioglobin je del citoplazemske frakcije. Mioglobin sestavlja beljakovinski del globin in nebeljakovinski (tetrapirolni) del z ionom železa.

2.2 BARVA MESA

Barva je tista lastnost hrane, ki da potrošniku prvi vtis o izdelku in soodloča pri izbiri in nakupu. Lepa barva lahko tudi zavaja ali pa razočara. Dober "make-up" pogosto prikriva povprečnost ali pa celo precejšnje napake. Brez dvoma je barva kot znak kakovosti pogosto precenjena. Sestava, svežost in predvsem okus so objektivno pomembnejše značilnosti mesa, kakor tudi mesnega izdelka, čeprav ni nujno, da obstaja neposredna povezava med barvo in temi lastnostmi (Shahidi in Pegg, 1990 in 1991a; Clydesdale, 1991). Toda izkušnje kažejo, da je potrebno barvi pri proizvodnji posvetiti posebno pozornost. Po veljavnih predpisih se svežemu mesu ne sme dodati noben aditiv, ki bi ohranil ali izboljšal njegovo barvo. Pri barvi mesa in izdelkov so zaželeni rožnati, svetlo ali temno rdeči toni. Odenki barve sežejo od rjavo-rdečih preko sivo-rjavih do sivo-zelenih tonov.

Po Renner in Labadie (1992) je barva svežega (presnega) mesa odvisna od vsebnosti mišičnega pigmenta, od njegovega kemijskega stanja (reducirana, oksigenirana ali oksidirana oblika) in od strukturnih lastnosti mišičnih proteinov (fizikalnih lastnosti mesa).

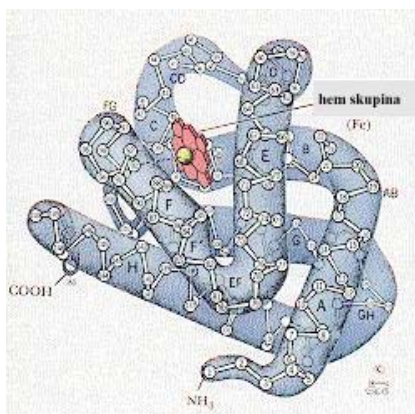
Na barvo svežega mesa najbolj vpliva morfološka struktura mišičnine, s katero je povezana sposobnost mišičnine za absorpcijo kisika (odvisna je od vsebnosti mioglobina), razpršitev (odvisna od hrapavosti površine mesa, marmoriranosti in vsebnosti vezivnega tkiva) in odboj vpadne svetlobe (odvisna je od sijaja na površini) (Murray, 1992).

Nosilec značilne barve svežega mesa je osnovni pigment mišičnega tkiva – **mioglobin**. Na splošno je ta barva določena z 95 % deležem mioglobina in 5 % deležem krvnega pigmenta, hemoglobina (Potthast, 1987). Mioglobin predstavlja 1 % vseh mišičnih beljakovin, je osnovni pigment in nosilec značilne mikavne rdeče barve svežega mesa kakor tudi kasneje izdelkov iz njega. Prav zaradi tega je njegov pomen pri barvi, kot pomembni senzorični lastnosti mesa, odločilen. Količina hemoglobina v mišici je odvisna od stopnje izkrvavitve. Mioglobin tako ni edini pigment v mišici, niti ni biološko najpomembnejši. V mišicah so še številni drugi pigmenti, ki so pomembni v živem tkivu, k oblikovanju barve mesa pa prispevajo le malo ali nič, ker jih je zelo malo.

Mioglobin in hemoglobin sta kemijsko kromoproteina, ki se med seboj komaj razlikujeta po svoji kemijski sestavi, uvrščata se med hemoproteine. Kemijsko je mioglobin sestavljen iz brezbarvnega globina (beljakovinske komponente) in obarvane prostetične skupine – hema in ima molsko maso 17 800 g/mol (slika 1 in 2). Hemoglobin ima molsko maso 66 000 g/mol in je sestavljen iz štirih globinov in štirih molekul hema (slika 3 in 4). Barvili se razlikujeta v svoji fiziološki funkciji: hemoglobin je odgovoren za transport kisika v krvi, mioglobin pa služi kot akceptor (prevzemnik) in zaloga (depo) kisika za potrebe metabolizma mišičnega vlakna; funkcionalno je mioglobin povezan s hemoglobinom (Bučar in sod., 1989; Potthast, 1987). Mioglobin sprejema kisik od hemoglobina ter ga prenaša na citokrom-oksidade. V kapilarnem območju tako na ta način olajša prenos kisika iz krvi v celice.

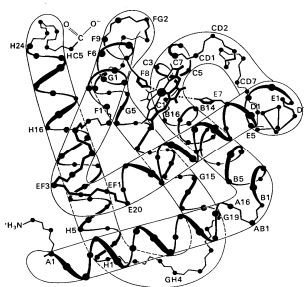
Hem (slika 9) je porfirinski obroč, ki je sestavljen iz štirih pirolovih obročev, med seboj povezanih. V središču je dvovalentni Fe ion, povezan z N-atomi pirolovih obročev preko

dveh kovalentnih in dveh koordinativnih vezi. Centralni atom železa ima koordinativno število šest, dve koordinativni vezi sta torej še prosti. Eno teh prostih koordinativnih vezi v mioglobinu in hemoglobinu zasede polipeptid globin, ki je vezan na Fe^{2+} preko dušika v imidazolni skupini histidinske molekule. Zadnje prosto vezivno mesto služi za vezavo spojin kot so O_2 , NO , CO itd. in je tako na voljo za reverzibilne in ireverzibilne reakcije. Hem vsebuje dvovalentno Fe (Fe^{2+}), ki se lahko oksidira in preide v Fe^{3+} . To spojino imenujemo hemin (Potthast, 1987).



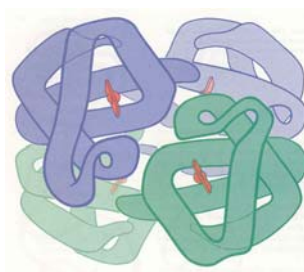
Slika 1 Model mioglobina (Campbell, 1995).

Figure 1 Model of myoglobin (Campbell, 1995).



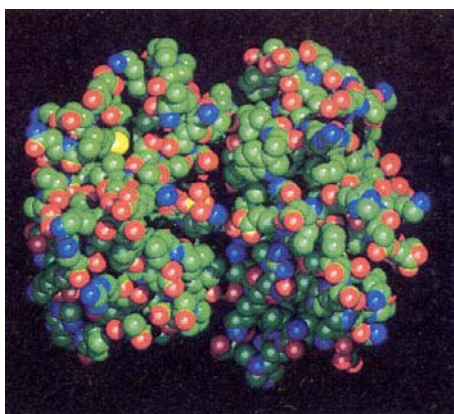
Slika 2 Model mioglobina pri visoki resoluciji. Prikazani so samo α ogljikovi atomi. Hem skupina je prikazana z rdečo in dva ključna ostanka histidina z zeleno (Stryer, 1995).

Figure 2 A myoglobin model at high resolution. Only α carbon atoms are shown. The heme group is in red colour and two key residuals of histidine are in green (Stryer, 1995).



Slika 3 Model hemoglobina (Campbell, 1995).

Figure 3 Model of hemoglobin (Campbell, 1995).



Slika 4 Kvartarna struktura hemoglobina (Campbell, 1995).

Figure 4 The quinary structure of hemoglobin (Campbell, 1995).

2.2.1 Vsebnost mioglobina

Vsebnost mišičnega pigmenta – mioglobina v svežem mesu je odvisna od (Livingston in Brown, 1981; Potthast, 1987; Bučar in sod., 1989):

- živalske vrste (goveje meso ima v povprečju dvojno vsebnost mioglobina: goveda 4-20 mg/100 g, prašiči 1-3 mg/100 g, jagnjeta 1-3 mg/100 g),
- pasme (meso primitivnih pasem je zaradi več mioglobina temnejše),
- starosti živali (meso starejših živali ima več mioglobina: teleta 1-3 mg/100 g – rožnata barva mišičnine, mlada goveda 4-10 mg/100 g – svetlordeča barva mišičnine, stara goveda 10-20 mg/100 g – temnordeča barva mišičnine),
- prehrane (zeleno krma prispeva k višji vsebnosti mioglobina),
- anatomske lokacije (mišice stegna so temnejše od mišic hrbta),
- aktivnosti mišice (rdeče mišice so odgovorne za gibanje, so aktivnejše, imajo intenziven oksidativen metabolizem in zato je njihovo meso temnejše – ima večjo vsebnost mioglobina; bele mišice pa zaradi manjše obremenitve odgovarjajoče manj mioglobina),
- prisotnosti železa v prehrani,
- posredno tudi od spola živali in stopnje zamaščenosti (bolj marmorirana mišičnina ženskih živali je svetlejša).



Slika 5 Odtenki rdeče barve mišičnine pri raznih vrstah mesa: govedina, mlada govedina, teletina, svinjina, perutnina (Bučar, 1997).

Figure 5 Nuances of the red colour of muscle tissue of various kinds of meat: beef, corn beef, veal, pork, poultry (Bučar, 1997).

Že na prvi pogled tako ločimo temnejše goveje meso (če izvzamemo meso telet) od svetlejšega prašičjega (slika 5). Kunci in perutnina imajo tako ne glede na starost zelo svetlo meso v primerjavi z mesom klavne živine, ki ima svetlo meso le v mladosti.

Vsebnost barvila določenega mesa se sicer na grobo lahko oceni vizualno, toda absolutno zanesljivo tako ocenjevanje ni. Tako vsebuje meso mladih bikov veliko manj mioglobina, kot bi lahko domnevali po temni barvi, medtem ko ima meso starejšega goveda pogosto več mioglobina, kot se da oceniti po videzu (Wirth, 1985).

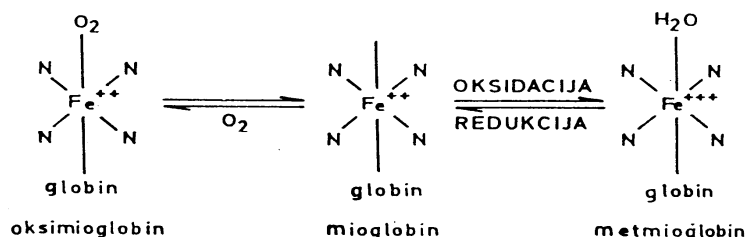
2.2.2 Oblike mioglobina

Mioglobin je kemijsko in reakcijsko izredno aktivna spojina, kar ustreza njegovi funkciji v živem organizmu, to je sprejemanje in skladiščenje kisika. Tudi po zakolu so v ospredju reakcije kisika na mišičnem pigmentu, ki vplivajo na odtenek barve mesa. Barva mesa je tako določena z razmerjem med posameznimi kemijskimi stanji mioglobina, pri čemer so vsa stanja v dinamičnem ravnotežju. Pri svežem, presnem, termično neobdelanem mesu je barva določena z dvema oksidacijskima stanjema centralnega Fe atoma v hemu. Tako se mioglobin pojavlja v treh oblikah: nativni mioglobin (reduciran mioglobin ali deoksimioglobin) – je temno rdeč, škrlatno rdeč oziroma purpuren in je globoko v notranjosti mišice, oksimioglobin – je svetlo rdeče barve in je sinonim za “cvetenje“ mesa, ko je le-to izpostavljeno zraku in se na mioglobin veže kisik in metmioglobin, ki je sivo rjav in neatraktiven, je pa posledica oksidacije mioglobina s kisikom (preglednica 1, slika 7). V mioglobinu, oksimioglobinu in metmioglobinu je hematinsko jedro celo, globin je v nativnem stanju, medtem ko sta barva in oksidacijsko število železovega atoma različni (v mioglobinu in oksimioglobinu je železo v fero obliki in ima oksidacijsko število 2+, v metmioglobinu pa je v feri obliki z oksidacijskim številom 3+) (slika 8). Če je v mišičnini govejega mesa prisotno 60 % mioglobina je ta purpurno rdeče barve, pri 60 % oksimioglobina je barva svetlo rdeča oziroma v primeru 60 % prisotnosti metmioglobina je barva mišičnine sivo rjava (slika 6) (Wirth, 1985).

Preglednica 1 Tri najpomembnejše oblike mioglobina in njihove barve (Hamm, 1975).

Table 1 Three most significant forms of myoglobin and their respective colours (Hamm, 1975).

oblika mioglobina	oksidacijsko število železovega atoma	barva mesa
mioglobin (Mb)	Fe ²⁺	škrlatno rdeča
oksimioglobin (MbO ₂)	Fe ²⁺ - O ₂	svetlordeča
metmioglobin (metMb)	Fe ³⁺ - H ₂ O	sivorjava



Slika 6 Sprememba pigmenta v sveži mišičnini – mioglobin, oksimioglobin in metmioglobin (N – pomeni dušikov atom v pirolovem obroču porfirina) (Hamm, 1975).

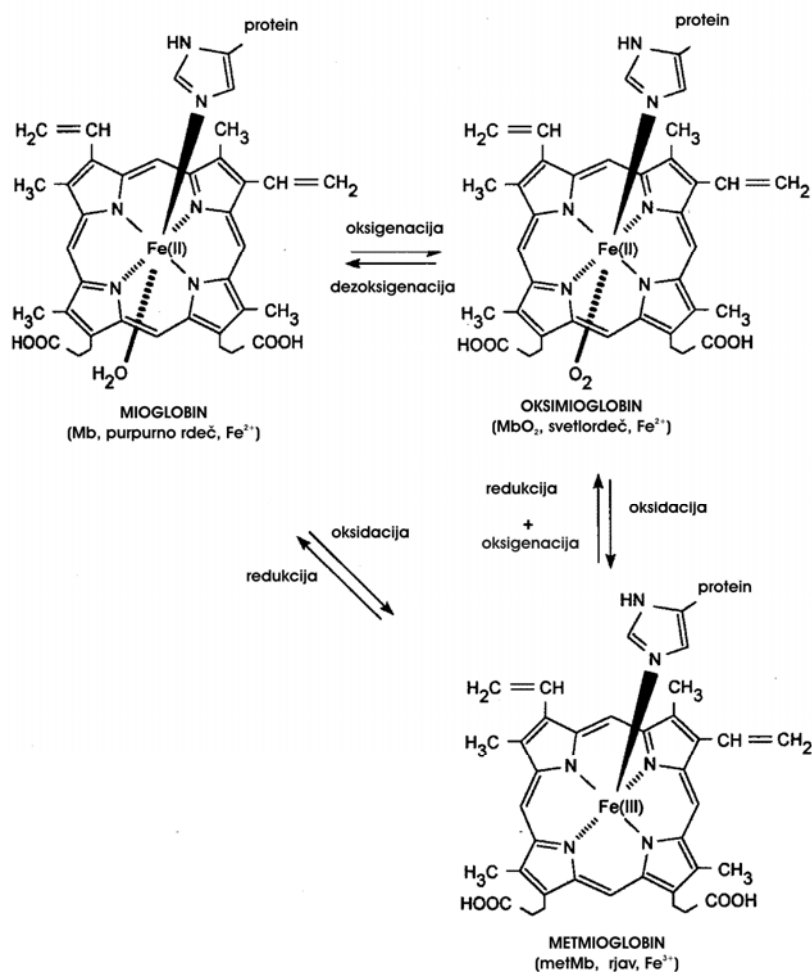
Figure 6 The change in the pigment in fresh muscle tissue – myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin (N – stand nitric atom in pirolic ring of the porphyrin) (Hamm, 1975).



Slika 7 Oblike mioglobina na primeru mišičnine goved: mioglobin, oksimioglobin in metmioglobin (Tri oblike mioglobina, 1997).

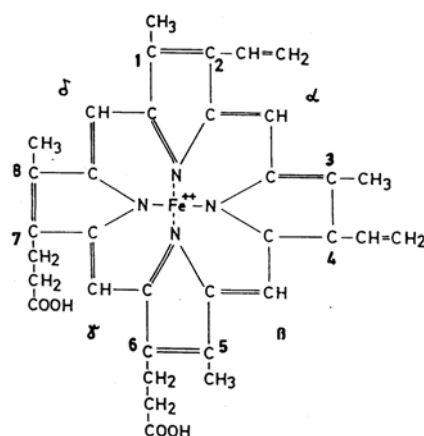
Figure 7 The forms of myoglobin on the case of bovine muscle tissue: myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin (Three forms of myoglobin, 1997).

Nativna reducirana oblika mioglobina (Mb) imenovana tudi dezoksimioglobin je oblika mioglobina, pri kateri je železo dvovalentno (slika 7), meso pa purpurno rdeče barve. Jakost rdeče barve mišičnine je odvisna zlasti od vsebnosti mioglobina v mišičnini, ki je različna v raznih vrstah in zvrsteh mesa: v perutnini, svinjini in teletini je mioglobina sorazmerno malo, zato je barva mišičnine svetlordeča ali rožnata, v mišičnini ovac in govedu je mioglobina precej več, torej je barva bolj temno rdeča. Pri isti vrsti mesa na vsebnost mioglobina vpliva zlasti starost živali, razlike v vsebnosti pa so lahko velike med mišicami in celo med raznimi deli iste mišice (Bučar, 1997). Tvorba mioglobina v živalskem telesu je v povezavi z zadovoljivo oskrbo z železom.



Slika 8 Medsebojna povezava pigmentov svežega mesa (Pegg in Shahidi, 2000).

Figure 8 The interconnection of fresh meat pigments (Pegg and Shahidi, 2000).



Slika 9 Strukturna formula hema (Rahelić, 1978) .

Figure 9 The structural formula of haem (Rahelić, 1978).

Mioglobin omogoča, da se lahko na njegove proste vezi reverzibilno, ob visokem parcialnem tlaku, veže prosti molekularni kisik iz zraka (selektivno se veže na mesto vode), ki se tako skladišči na hem (slika 9) molekulah in pri tem nastane **oksimioglobin (MbO₂)** z nespremenjeno valenco železa (dvovalentno – Fe⁺⁺) (Livingston in Brown, 1981; Potthast, 1987; Bučar in sod., 1989; Clydesdale, 1991). Proces poteče relativno hitro, ponavadi je končan v manj kot pol ure, kajti mioglobin ima veliko afiniteto do kisika. Pri vezavi kisika na mioglobin je barvni ton tako atraktivno svetlo rdeč, to je stanje, ki ga lahko vidimo na površini sveže odrezanega mesa. Čim manj je vezanega kisika, tem temnejši je barvni ton. Do nastanka tega pigmenta pride pri govejem mesu, če kos mišičnine položimo nezavrt na hladno – po eni do dveh urah opazimo, da poprej baržunasto rdeča površina reza postane svetlordeča in svetlejša plast sega nekaj milimetrov v globino; tako meso je za porabnika zelo vabljivo (slika 10). Pravimo, da se meso okisiči oziroma meso vzcvete (proces se imenuje oksigenacija). Cvetenje je zanesljivo znamenje, da je meso normalne kakovosti in higiensko neoporečno.



Slika 10 Primerjava native reducirane oblike mioglobina z oksimioglobinom pri govejem mesu (Bučar, 1997).

Figure 10 The comparison of the native reduced forms of myoglobin with oxymyoglobin in bovine meat (Bučar, 1997).

Svetlordeča barva oksimioglobina sega tako daleč v globino, dokler je razmerje med oksimioglobinom in mioglobinom 1:1, oziroma dokler ni raven kisika praktično 0, oziroma dokler je parcialni tlak kisika večji od $5,332 \times 10^5$ Pa (Potthast, 1987). Na globini, kjer je parcialni tlak kisika $5,332 \times 10^5$ Pa, se tvori metmioglobin, še globlje pa ostane mioglobin škrlatne oziroma purpurne barve (preglednica 2).

Preglednica 2 Odvisnost barve mesa od parcialnega tlaka kisika (Potthast, 1987).

Table 2 The correlation between meat colour and oxygen partial pressure (Potthast, 1987).

parcialni tlak kisika	barva mesa
$pO_2 > 5,332 \times 10^5$ Pa	povečuje se količina oksimioglobina
$pO_2 = 5,332 \times 10^5$ Pa	sivo rjava barva metmioglobina
$pO_2 < 5,332 \times 10^5$ Pa	povečuje se količina mioglobina

Na debelino sloja oksimioglobina poleg parcialnega tlaka kisika na površini mesa vplivata še hitrost difuzije kisika in poraba kisika. Z zniževanjem temperature od 20 °C na 0 °C se poveča globina oksimioglobinskega sloja. Tudi barva površine mesa je tako dlje časa

svetlordeča, če se meso hrani pri nižji temperaturi. Hlajenje preprečuje "odcvetenje", saj je pri nižjih temperaturah difuzija kisika v meso večja, ker se kisik bolje topi v vodi pri nizki temperaturi. Znižanje temperature tudi zmanjša aktivnost respiratornih encimov, ki so v mesu, s tem je poraba kisika manjša.

Oksigenacija ni odvisna le od vrste mišice in s tem povezane različne respiratorne aktivnosti, temveč tudi od morfološke strukture mišičnine, toplotne obdelave in zunanjih dejavnikov, kot so temperatura in razpoložljivost kisika. Mišice z nizko respiratorno aktivnostjo imajo globlji oksigeniran sloj in so tudi barvno stabilnejše od mišic z visoko respiratorno aktivnostjo (Renerre in Talmant, 1981).

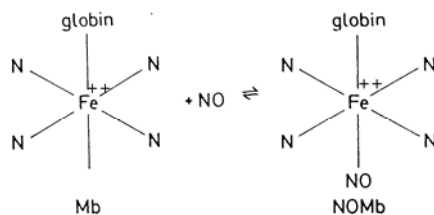
V primeru, da je oksimioglobin dolgo podvržen parcialnemu tlaku kisika okoli $5,332 \times 10^5$ Pa, se pojavi tretja oblika, to je **metmioglobin (metMb)**, saj pride do oksidacije, pri čemer atom železa odda en elektron in preide v trovalentno obliko (Fe^{+++}), kjer ne more več vezati kisika. Po daljšem času izpostavitve omenjenemu tlaku se notranji sloji počasi oksidirajo in metmioglobin se razširja proti površini. Odtенок barve takega mesa je nezaželen – od rjavo rdeče do sivo rjave tudi črne barve (preglednica 3). V svežem mesu je oksidacija v metmioglobin v bistvu pogojena z redukcijsko kapaciteto mišice, razpoložljivim kisikom (penetracija kisika in respiracija), s stopnjo avtooksidacije in z nizkim parcialnim tlakom kisika (Renerre in Labas, 1987). Oksidacija je hitrejša s toplotno obdelavo ali z dodatkom kuhinjske soli. Beljakovinska komponenta pigmenta začne denaturirati pri 40 °C, proces je hiter med 55 in 65 °C, ko pa je temperatura med 70 in 75 °C je mioglobin več ali manj že ves prešel v metmioglobin, ki je sive barve. Toplotno obdelano meso, ki ni bilo prej razsoljeno, je na prerezu sivo rjavo, enako velja tudi za mesne izdelke. Barva slednjih je potemtakem vedno mešanica metmioglobina in zaželenih rdečih spojin barvila (mioglobin, oksimioglobin oziroma nitrozomioglobin). Pomemben cilj proizvajalcev mesnin mora biti čim večje zmanjšanje deleža metmioglobina. Do oblikovanja metmioglobina iz mioglobina ali oksimioglobina pride zaradi nizke vrednosti pH, visoke temperature, soli in UV sevanja.

Preglednica 3 Vpliv količine metmioglobina na oblikovanje barve pri mesnih izdelkih (Wirth, 1985; Potthast, 1987).

Table 3 The influence of the quantity of metmioglobin on the formation of colour in meat products (Wirth, 1985; Potthast, 1987).

delež metmioglobina od skupne količine pigmenta (%)	barva izdelka
< 30 %	intenzivno svetlo rdeča
30–50 %	rdeča
50–60 %	rjavo rdeča
60–70 %	rdečo rjava
> 70 %	zelena, rjava

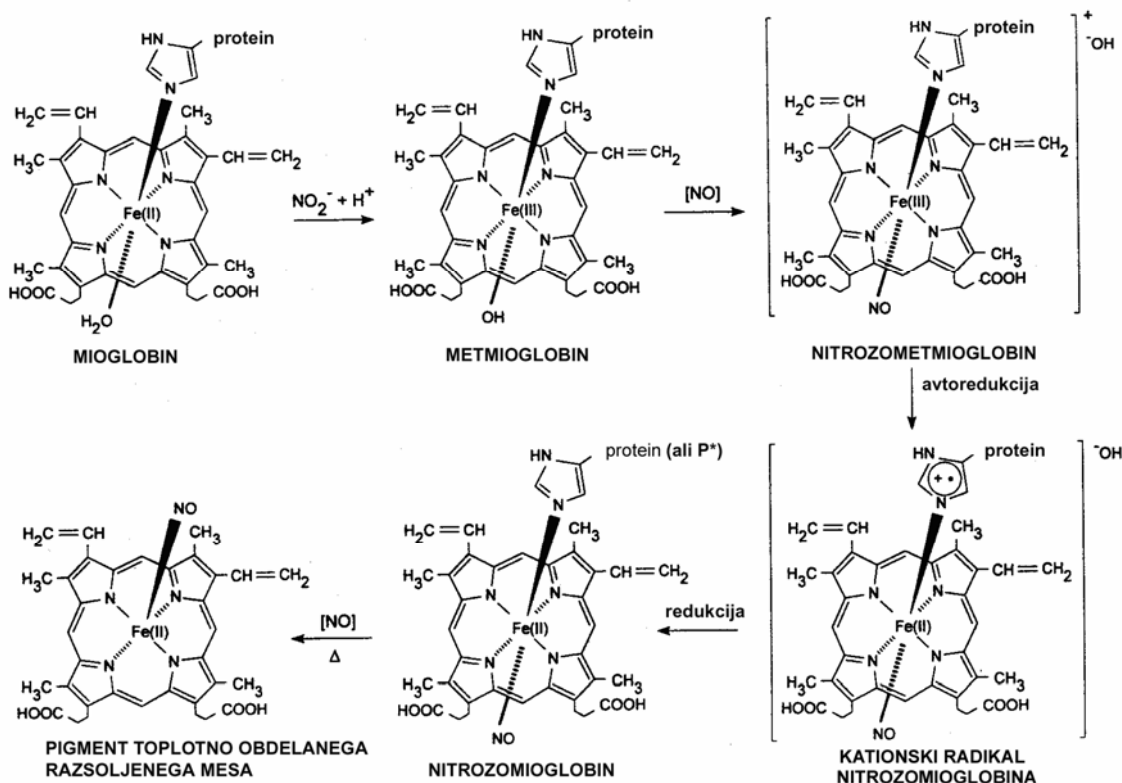
Pri postopku razsoljevanja se mesu dodaja nitritna ali nitratna sol (mešanica kuhinjske soli in nitrita oziroma redkeje nitrata), mioglobin reagira z ogljikovim monoksidom in pojavi se četrta oblika mioglobina **nitrozomioglobin (NOMb)**. Meso ostane svetlo rdeče barve tudi po toplotni obdelavi (slika 11).



Slika 11 Osnovna kemijska reakcija oblikovanja barve razsoljenega mesa (Bučar in sod., 1989).

Figure 11 The basic chemical reaction of creating the cured meat colour (Bučar et al., 1989).

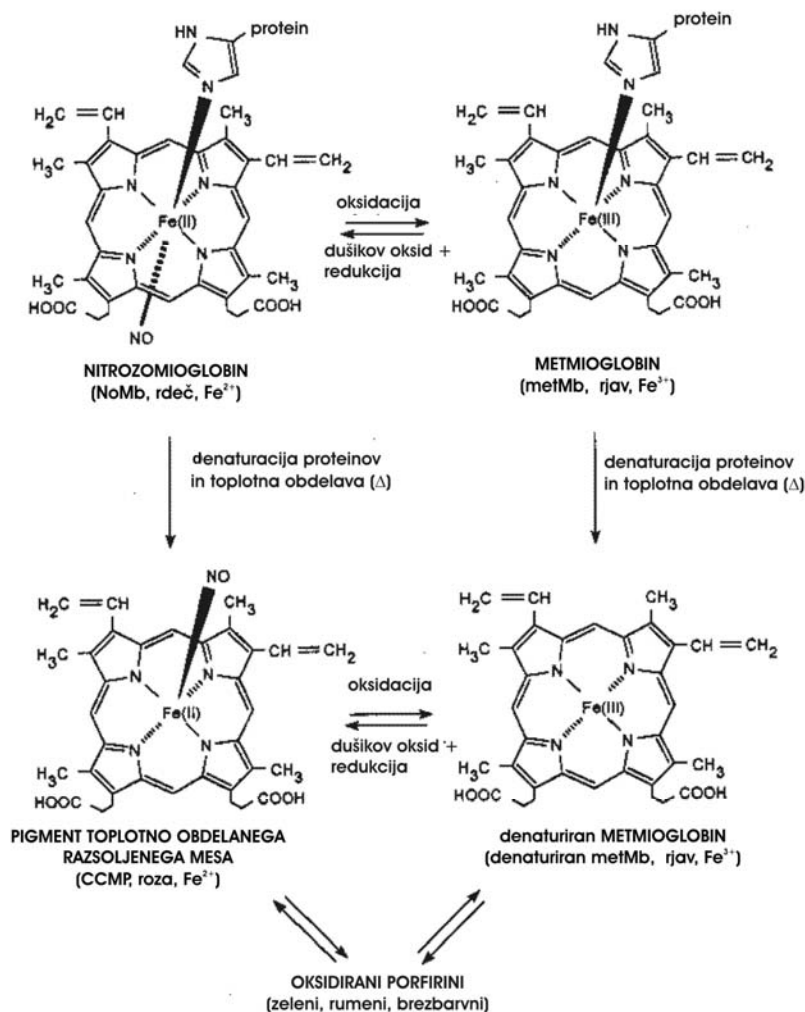
Med toplotno obdelavo se mioglobin najprej denaturira v rjavi in sivo rjavi pigment **miohemokromogen** in nato v sivo rjav denaturiran metmioglobin (**miohemikromogen**). Barva toplotno obdelanega mesa je odvisna od temperature in od obsega denaturacije proteina. Ko se razsoljeno meso toplotno obdela, beljakovinska komponenta pigmenta denaturira, enako kot pri svežem nerazsoljenem mesu in tvori se rožnat **nitrozomiokromogen** (slika 12 in 13). Na oblikovanje barve toplotno obdelanega mesa ne vplivajo le hem- pigmenti. Med dolgotrajnejšo pripravo pri višji temperaturi oksidira hem, polimerizirajo se tudi maščobe, ogljikovi hidrati in beljakovine.



Slika 12 Kemijski mehanizem razsoljevanja (Pegg in Shahidi, 2000).

Figure 12 The chemical mechanism of the curing process (Pegg and Shahidi, 2000).

Rezultat oksidacije mioglobina v navzočnosti reducirajočih agensov sta dva druga pigmenta, oba zelene barve. Če je reducent sulfhidrilna skupina, nastane **sulfmioglobin**. To je hem pigment, v katerem se nahaja žveplo in je predvsem znak bakterijskega kvara mesa. Bakterije proizvajajo oksidazo, ki katalizira nastanek H_2S , ki deluje z mišičnim barvilom in se kaže v obliki rumeno zelene diskoloracije. Če pa je reduktivni agens askorbat (preveliko doziranje) ali kakšna druga sulfhidrilna skupina, nastane **koleglobin hem pigment**, v katerem je oksidiran porfirinski obroč.



Slika 13 Nekatero specifične kemijske reakcije, ki so rezultat dodatka nitrita v meso (Pegg in Shahidi, 2000).

Figure 13 Some specific chemical reactions, which are a result of adding nitrite to meat (Pegg and Shahidi, 2000).

Preglednica 4 Spremembe barve na površini mesa v odvisnosti od oblike mioglobina (Lawrie, 1979).

Table 4 The changes of colour on the surface of meat in relation to the forms of myoglobin (Lawrie, 1979).

pigment	način oblikovanja	Fe	oblika hema	oblika globina	barva
mioglobin	redukcija metmioglobina, deoksigenacija oksimioglobina	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	nativen	škrlatno rdeč
oksimioglobin	oksidacija mioglobina	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	nativen	svetlordeč
metmioglobin	oksidacija mioglobina ali oksimioglobina	Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan	nativen	rjavordeč
nitrozomioglobin	vezava mioglobina z NO ₂	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	nativen	svetlordeč (rožnat)
metmioglobin-nitrit	vezava metmioglobina z večjo količino nitrita	Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan	nativen	rdeč
globin hemokromogen	učinek toplote in denaturacijskih sredstev na mioglobin in oksimioglobin, obsevanje hemikromogena	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	denaturiran	rdeč tudi rjav
globin hemikromogen	učinek toplote in denaturacijskih sredstev na mioglobin in oksimioglobin, metmioglobin in hemokromogen	Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan	denaturiran	rjav (včasih sivkast)
nitrozomiokromogen	učinek toplote na nitrozomioglobin	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	denaturiran	svetlordeč (rožnat)
sulfmioglobin	učinek H ₂ S in kisika na mioglobin	Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan zmanjšan	denaturiran	zelen
holeglobin	učinek H ₂ O ₂ na mioglobin ali oksimioglobin, učinek askorbinske kisline ali drugih reductentov na oksimioglobin	Fe ⁺⁺ ali Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan zmanjšan	denaturiran	zelen
verdohem	učinek večjih količin reagentov kot pri holeglobinu	Fe ⁺⁺⁺	porfirinski obroč odprt	denaturiran	zelen
žolčni pigmenti	učinek večjih količin reagentov kot pri heleglobinu	Fe odsoten	porfirinski obroč razpade veriga pirolov	odsoten	rumen ali brez barve

2.3 KEMIJSKI POSTOPKI KONZERVIRANJA

Kemijski postopki konzerviranja podaljšujejo obstojnost živil živalskega izvora z inhibiranjem in/ali uničenjem mikroorganizmov (pa tudi z inhibicijo kemijskih procesov, npr. oksidacije). Kemijske spojine, ki se uporabljajo kot konzervansi, morajo biti popolnoma neškodljive zdravju ljudi in morajo ustrezati vsem obstoječim predpisom. Kot snovi za konzerviranje mesa v mesnih izdelkih se uporabljajo predvsem sestavine razsolice (kuhinjska sol, nitritna/nitratna sol, polifosfati – v toplotno obdelanih izdelkih) in dodatki (ogljikovi hidrati: mono- in disaharidi, šibke organske kisline in njihove soli: askorbinska kislina/askorbati, eritorbinska kislina/eritorbati). Šibke organske kisline v ustreznih količinah vplivajo na okus, posredno znižujejo tudi vrednost pH v izdelku (običajno na 4,5 oziroma 4,0) in tako indirektno vplivajo na mikroorganizme – delujejo kot konzervansi. Delovanje konzervansov na mikroorganizme je specifično in je odvisno od živila, konzervansa kot tudi od vrste in skupine mikroorganizmov. Kvasovke in plesni so občutljive na večje število konzervansov kot bakterije, izjema je nitrit, na katerega so kvasovke in plesni odporne (Janetschke, 1992). Skupaj z nižjo aktivnostjo vode pa šibke organske kisline inhibirajo predstavnike rodov *Bacillus*, *Clostridium*, *Salmonella* in *Staphylococcus aureus*. V prisotnosti kislin se lahko nemoteno razmnožujejo laktobacili in tako postanejo dominantna mikroflora (Sinell, 1992).

Uporaba natrijevega nitrita, kot edinstvenega konzervansa za zaščito mesa, sega daleč nazaj, v čas 3 000 let pred našim štetjem v Mezopotanijo. V tistem času so konzervirali meso samo s kuhinjsko soljo. Kuhinjska sol, s katero so obdelali meso, je kot nečistoče vsebovala še druge soli, med drugimi tudi natrijev nitrat (Shahidi in Pegg, 1993), zaradi katerega se je po toplotni obdelavi razvila stabilna rdeča barva mesa. Meso obdelano s tovrstno soljo je bilo tudi bolj mikrobiološko obstojno in je imelo specifično aromo. Šele konec 19. stoletja so ugotovili, da se nitrat s pomočjo bakterij reducira v nitrit in da je prav nitrit in ne nitrat odgovoren za značilno rožnato barvo razsoljenega mesa (Hotchkiss in Cassens, 1987; Wirth, 1991; Ramarathnam in Rubin, 1994). Nitrit je tako pravo sredstvo za razsoljevanje, nitrat pa ima pri tem le posreden učinek. V živilski industriji nitrata in nitrite uporabljajo tako kot aditiv – konzervans za zagotavljanje mikrobiološke varnosti in za poudarjanje barve živila – mesnih izdelkov.

V sedanjem času razlikujemo soljenje in razsoljevanje. **Soljenje** pomeni obdelavo mesa s čisto kuhinjsko – jedilno soljo (NaCl), **razsoljevanje** pa je prepajanje mesa z mešanico kuhinjske soli (NaCl) in nitrata ali nitrita oziroma morebiti še drugih snovi (pospeševalcev razsoljevanja). A se še danes poleg nitrita in nitrata za izboljšanje okusa uporablja kuhinjska sol.

Soljenje in pozneje razsoljevanje je bilo prvotno namenjeno konzerviranju in je poleg prekajevanja in sušenja imelo velik pomen v časih, ko je hlajenje in zmrzovanje bilo možno le v zimskih mesecih. Zaradi razvoja hladilne tehnike in raznih drugih postopkov konzerviranja, se kuhinjska sol čedalje manj uporablja pri postopkih konzerviranja. Razsoljevanje ima velik vpliv na barvo, okus, sočnost, pravilno slanost itd. Torej je razsoljevanje danes predvsem proces oblikovanja značilnega in termostabilnega mesnega pigmenta ter specifične arome, kar je potisnilo učinek konzerviranja v ozadje (Bučar in sod., 1989).

2.3.1 Razsoljevanje

Razsoljevanje je postopek prepajanja mesa z mešanico kuhinjske soli, natrijevega ali kalijevega nitrita (NaNO_2 ali KNO_2) in natrijevega ali kalijevega nitrata (NaNO_3 ali KNO_3 , lahko je ta tudi amonijev ali kalcijev) z nekaterimi drugimi dodatki (ogljikovimi hidrati, polifosfati, askorbinsko kislino idr.), ki imajo vsak svojo funkcijo v celotnem procesu. Je eden od osnovnih procesov v tehnologiji predelave mesa. Novejša spoznanja kažejo, da razsoljevanje nima več temeljne funkcije konzerviranja, temveč je to predvsem zaradi dodatka nitrita proces oblikovanja značilnega in termostabilnega pigmenta (nitrozomioglobina) s privlačno rožnato barvo ter specifične arome in teksture razsoljenega mesa. Đorđević in sod. (1980) navajajo, da na značilno aromo razsoljenega mesa bolj vpliva NaCl kot NaNO_2 , ki sam ne oblikuje te arome, kot dodatek k NaCl pa jo izboljšuje.

Značilnosti nitratne soli (soliter je domače ime za NaNO_3 ali KNO_3):

Dobre strani:

- nitratna sol sama po sebi ni strupena (ni toksična) za razliko od nitrita,
- mesu daje v ugodnih pogojih lepo, stabilno, trajno značilno rdečo barvo.

Slabe strani:

- nitratne soli nastopajo kot oksidanti (oksidirajo maščobe),
- nadzor redukcije nitrata v nitrit tekom tehnološkega postopka ni enostaven (čas, količina),
- nitratna sol inhibira rast nekaterih koristnih bakterij, ki delujejo med samo proteolizo (zorenjem) mesa.

Zato se v praksi zelo pogosto uporablja namesto nitratne nitritna sol (NaNO_2 ali KNO_2) za katero so dokazali, da 1 g mioglobina v mesu rabi nekje 3,6 mg NO (dušikovega monoksida, ki nastane iz nitrita). V mešanici razsola, ki se uporablja v mesni industriji je tega nitrita okrog 1 %.

Značilnosti nitritne soli

Dobre strani:

- barva razsoljenega mesa se zelo hitro razvije; pri postopku ne potrebujemo nobenega posrednika, ki bi spremenil nitrat v nitrit,
- barva, ki jo da nitrit je nekoliko svetlejša od barve, ki jo da nitrat; je pa barva izdelka enakomernejša, senzorično lepša in atraktivnejša,
- za oblikovanje barve so potrebne zelo majhne količine, kar je vsekakor bolj ekonomično kot pri uporabi nitrata,
- nitrit oblikuje vonj in okus ter tako prispeva k tipični aromi razsoljenih izdelkov,
- izboljša teksturo razsoljenega mesnega izdelka,
- nitrit učinkuje kot antioksidant (na ta način stabilizira sam mesni pigment),
- nitrit ima antimikrobni učinek (učinkuje bakteristatično, baktericidno) – inhibira rast spor bakterije *Clostridium botulinum* in tako preprečuje oblikovanje nevarnega toksina, s čimer se zmanjša tveganje za botulizem. To je eden temeljnih vzrokov, zakaj v svetu še danes uporabljajo nitrit,
- preprečuje oblikovanje t. i. "warmed-over flavor", kar pomeni pogreta ali postana aroma,
- nitrit je v slanica in mesu mnogo lažje nadzorovati kot pa nitrat.

Slabe strani:

- toksičnost,
- v prevelikih količinah povzroči hudo diskoloracijo v mesu (rjavo zelenkaste pa tudi črne diskoloracije),
- poveča razvoj nekaterih termorezistentnih bakterij,
- nitritna sol je razmeroma nestabilna – v prisotnosti določenih substanc (npr. saharoze) se hitro razgradi.

Nitrit deluje kot antioksidant na tri načine:

- oblikuje močan kompleks s hem pigmenti,
- reagira direktno s prostim heminskim Fe^{3+} iz denaturiranih hem pigmentov,
- v manjši meri stabilizira nenasičene lipide (fosfolipide) v membranah.

Kemijske interakcije med nitritom in sestavinami mesa, vključujoč proteine in maščobe, še niso povsem pojasnjene zaradi zelo reaktivnega nitrita. Belovič (1995) poroča, da 5-15 % nitrita reagira z mioglobinom, 1-10 % postane dušikov oksid (plin), 5-15 % se veže s sulfhidrilno skupino, 1-5 % se veže z lipidi in 20-30 % se veže s proteini. Druge reakcije lahko vključujejo nitrozacijo amino spojin in tvorbo organskih nitritov in nitratov.

Temeljni smoter razsoljevanja je:

- oblikovanje značilnega termostabilnega mesnega pigmenta (barve),
- oblikovanje specifičnih senzoričnih lastnosti razsoljenega mesa (aroma, tekstura) s pomočjo NaCl, nitrata ali nitrita,
- konzervirajoči učinek,
- antioksidativen učinek, saj zadržuje žarkost in upočasni lipidno oksidacijo.

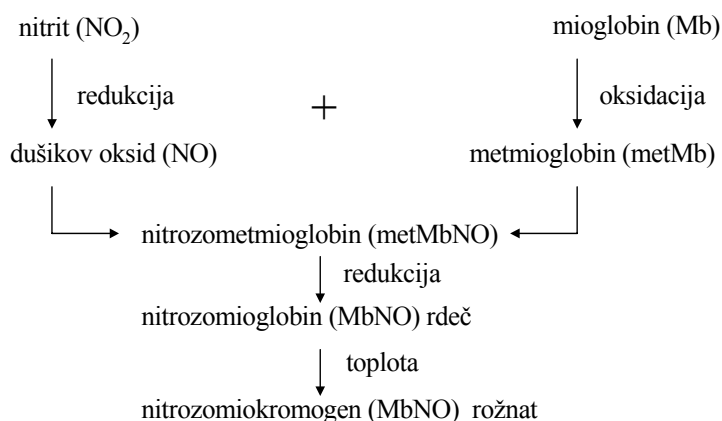
Po načinu prepajanja mesa s snovmi za razsoljevanje razlikujemo tri temeljne postopke:

- mokro razsoljevanje: to je polaganje mesa v razsolico oziroma prelivanje mesa z razsolico,
- suho razsoljevanje: to je natiranje in posipavanje mesa z razsolom oziroma vmešavanje razsola v razdeto meso,
- kombinirano razsoljevanje: to je vbrizgavanje razsolice v meso in dodatno mokro oziroma suho razsoljevanje, lahko pa je to tudi vbrizgavanje razsolice v meso in dodatno gnetenje mesa.

Prva dva postopka sta kot samostojni metodi dolgotrajna in se uporabljata le še za razsoljevanje manjših kosov mesa. Kombinirana metoda je hitra, traja le nekaj dni in se uporablja za razsoljevanje večjih kosov mesa (Bučar in sod., 1989).

2.3.1.1 Pigmenti razsoljenega mesa in oblikovanje barve

Znano je, da je nitrozomioglobin pigment razsoljenega mesa in da ta nastane v reakciji med nitritom in mišičnim pigmentom mioglobinom, glej sliko 14. Sama reakcija nastanka nitrozomioglobina je kompleksna, kar je razumljivo glede na veliko reaktivnost najpomembnejših komponent mišičnih vlaken in nitrita, ki sodelujejo v procesu (Sofos in Raharjo, 1995).

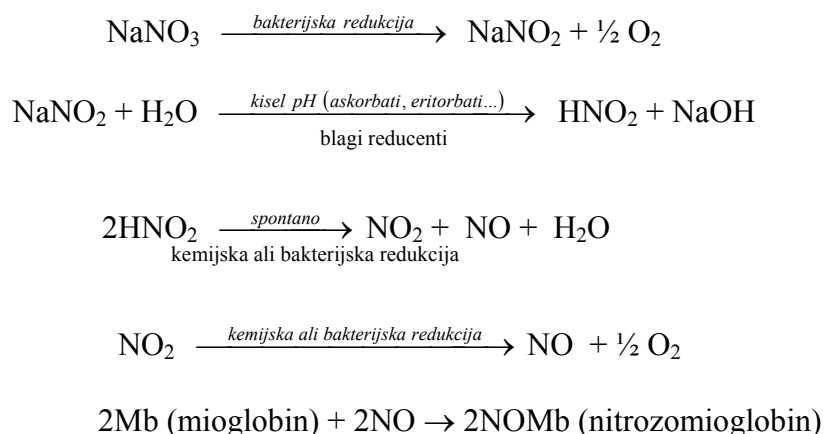


Slika 14 Oblikovanje pigmenta razsoljenega mesa (Wilson, 1981).

Figure 14 The formation of the cured meat pigment (Wilson, 1981).

Osnovni mehanizem nastajanja nitrozomioglobina je redukcija metmioglobina v mioglobin, ki se nato oblikuje v nitrozomioglobin kompleks s povezovanjem direktno z dušikovim monoksidom (NO) (slika 15). NO nastane z redukcijo nitrita. Nitrit je dodan direktno v razsolico ali pa nastane z bakterijsko redukcijo iz nitrata. Natrijev nitrit se pri nizki vrednosti pH (kislo okolje) mesa razgradi do dušikove (III) kisline (HNO₂). Dušikova (III) kislina se z delovanjem redukcijskih bakterij reducira do dušikovega monoksida (NO). NO reagira z mioglobinom, tako da se veže na železo v hemu porfirinskega obroča in nastane nitrozomioglobin. Nastali nitrozomioglobin vsebuje dvovalentno železo analogno kot oksimioglobin, vendar s to razliko, da je kisik zamenjan z NO (Skvarča, 1992). Nitrozomioglobin s svojo značilno rožnato barvo (Savić, 1979) je na zraku nestabilen in možne so hitre diskoloracije (Varnam in Sutherland, 1995). S segrevanjem (v času sušenja ali toplotne obdelave) se denaturira globin, ne spremeni pa se obarvana komponenta pigmenta. Na ta način nastane rdeč nitrozomiokromogen, ki daje toplotno obdelanemu razsoljenemu mesu zaželeno stabilno rdečo barvo (Sinell, 1992; Shahidi in Pegg, 1993a).

Redukcijo nitrata v nitrit povzročijo mikroorganizmi. Razsoljevanje z nitratom je brezpogojno vezano na določeno vrsto bakterij, ki so sposobne za to pretvorbo, to so nitrat reducirajoče bakterije. Ta ugotovitev je usmerila proces razsoljevanja k direktni uporabi nitrita, saj le-ta deluje hitreje, bolj zanesljivo in njegove reakcije je lažje oceniti (Wirth, 1985). Redukcija nitrita preko dušikove kisline v dušikov monoksid poteče predvsem s spojinami mesa, ki delujejo kot reducenti, ali preko učinka mikroorganizmov in posebnih spojin reducentov za redukcijo nitrata v nitrit (slika 15 in 16).



Slika 15 **Reakcijski mehanizem tvorbe nitrozomioglobina (Bučar in sod., 1989).**
Figure 15 **The reaction of the mechanism the formation of nitrosomyoglobin (Bučar et al., 1989).**

Tvorba dušikovega oksida iz nitrita in njegova reakcija z mišičnim barvilom – mioglobinom ter nastanek nitrozomioglobina s ciljem oblikovanja značilne rdeče barve razsoljenega mesa so odvisni od:

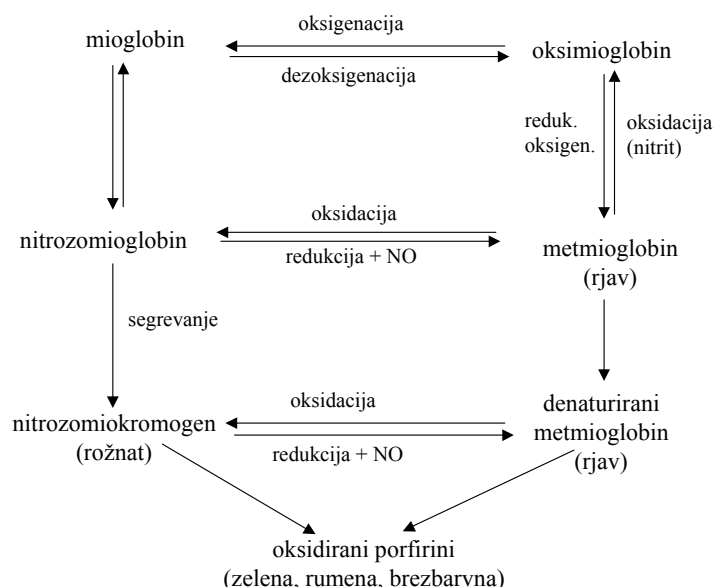
- količine dodanega nitrita, ki je odvisna od vsebnosti mioglobina v mišici,
- temperature razsoljevanja (zviševanje temperature do 80 °C pospeši, še višja temperatura pa upočasni nastajanje barve razsoljenega mesa),
- vrednosti pH mesa in razsolice,
- dodatka reduktivnih sredstev (pospešujejo redukcijo nitrita v NO in tako nastanek nitrozomioglobina) in
- od stanja uporabljene surovine (proces razsoljevanja so počasnejši v predhodno zamrznjenem mesu).

Nastanek zadovoljive barve razsoljenega mesa je v znatni meri odvisen predvsem od uporabljene tehnologije.

Enaka reakcija kot poteka na mišičnem barvilu, poteka tudi na krvnem barvilu – hemoglobinu, ki se nahaja v mišičnem tkivu in v krvni plazmi.

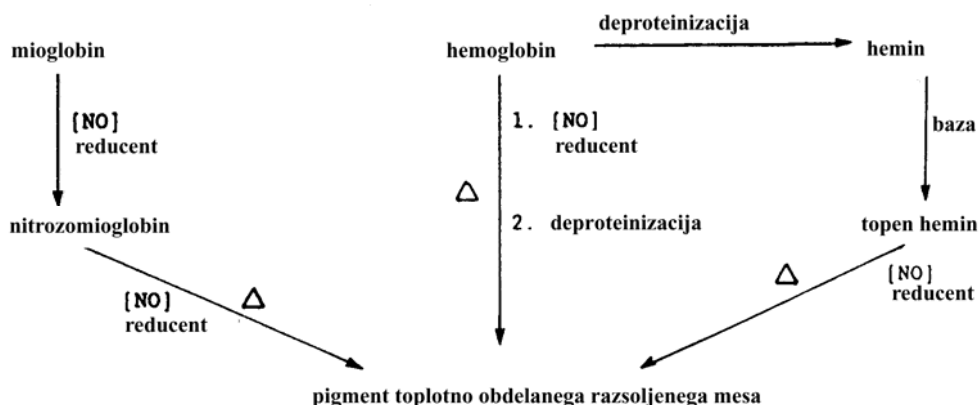
Prevladuje mnenje, da se reakcija nastanka nitrozomioglobina začne z oksidacijo Fe v mioglobinu, ki iz fero (2+) preide v feri (3+) obliko. Tako pri reagiranju mioglobina ali hemoglobina, ki vsebujeta kisik, se pravi oksimioglobina ali oksihemoglobina z nitritom, nastane nitrat in oksidiran pigment – metmioglobin oziroma methemoglobin. To reakcijo potrjuje analitično določen nitrat v izdelkih, ki so bili razsoljeni le z nitritom. Nastali metmioglobin z različnimi encimskimi in neencimskimi reakcijami v aerobnih ali anaerobnih razmerah preide v nitrozomioglobin (MbNO) (slika 17), medtem ko iz methemoglobina nastane nekaj nitrozohemoglobina (HbNO). Kisik in visoke temperature ne vplivajo na nitrozomioglobin oziroma nitrozohemoglobin. To pomeni, da toplotno obdelan razsoljen mesni izdelek ohrani rožnato barvo, medtem ko samo soljen dobi sivo belo do sivo rjavo barvo. Nitrit namreč tako lahko reagira tudi z rezidualnim hemoglobinom, prisotnim v

krvi, toda v dosti manjši meri kot z mioglobinom (Goutefongea, 1992; Varnam in Sutherland, 1995). Med toplotno obdelavo se nitrozomioglobin konvertira v nitrozomiokromogen (slika 17), pri tem se verjetno cepi vez globin – Fe in denaturira protein, na Fe pa se veže še en NO (Goutefongea, 1992). Ker pa se predpostavlja, da je nitrozomioglobin mononitrozo kompleks (Varnam in Sutherland, 1995), bi se morala druga molekula NO vezati na denaturiran protein. Narava kompleksa protein – nitrit ni znana, možno pa je, da nitrozomioglobin vsebuje proteinski radikal, ki pri denaturaciji reagira z NO ali s samim nitritom (Varnam in Sutherland, 1995). Pri nitrozomioglobinu in nitrozometmioglobinu sta hema nedotaknjena in protein v nativni obliki, toda barva in valenca železa sta drugačni. Pri segrevanju globin denaturira, hema ostaneta nedotaknjena. Nitrozomioglobin je relativno stabilen pigment na učinkovanje svetlobe, kisika in toplote.



Slika 16 Kemične spremembe mioglobina v razsoljenem mesu (Gašperlin, 1998)

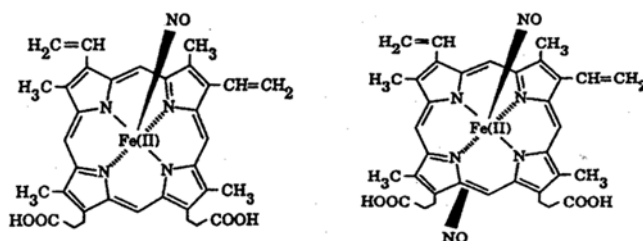
Figure 16 The chemical changes of myoglobin in cured meat (Gašperlin, 1998).



Slika 17 Reakcije mioglobina in hemoglobina z nitrozirnim sredstvom (Shahidi in Pegg, 1992 in 1993a).

Figure 17 The reactions of myoglobin and haemoglobin with a nitrosation agent (Shahidi and Pegg, 1992 and 1993a).

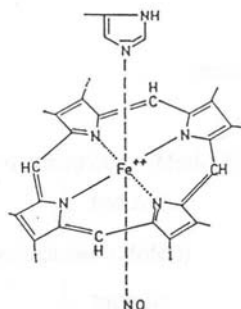
Kemijska struktura toplotno obdelanega razsoljenega mesa je bila predmet raziskav že prejšnja leta. V začetku so namreč predpostavljali, da se globin med toplotno obdelavo odcepi od mioglobina in sta za vezavo NO tako možni dve vezivni mesti. Tako bi naj bil pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa dinitrozomiokromogen s koordinacijskim številom Fe 6 (slika 18). Pri tem pa raziskovalci niso upoštevali možnosti, da druga molekula nitrita lahko (bolj verjetno kot pa s hemom) reagira s proteinom (Killday in sod., 1988, Pegg in sod., 1996). Bonnett in sod. (1980) so s pomočjo EPR nakazali, da je pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa mononitrozomiokromogen s koordinacijskim številom Fe 5. Predpostavljali so, da je ta pigment fizično ujet v matriks denaturiranega proteina. Tudi druge študije so potrdile kemijsko strukturo mononitrozomiokromogena kot pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa s svojo značilno barvno stabilnostjo (Potthast, 1987; Killday in sod., 1988; Jankiewicz in sod., 1994; Shahidi in Pegg, 1995; Pegg in sod., 1996; Pegg in Shahidi, 1996).



Slika 18 Kemijska struktura mononitrozilmioglobina in dinitrozilmioglobina (Pegg in Shahidi, 1996; Pegg in sod., 1996).

Figure 18 The chemical structure of the mononitrosylmyoglobin and dinitrosylmyoglobin (Pegg in Shahidi, 1996; Pegg in sod., 1996).

Raziskovalci so mnenja, da pri tvorbi nitrozomioglobina (slika 19) sodeluje le del dodanega nitrita, znaten del pa ostaja nespremenjen, se pravi, da ostane kot rezidualni nitrit, del se oksidira v nitrat, del pa direktno ali preko razgradnih produktov reagira s sestavinami mesa, pri čemer nastajajo razne spojine, med drugim tudi N-nitrozamini (Hotchkiss, 1987).



Slika 19 Kemijska strukturalna formula nitrozomioglobina (Potthast, 1987).

Figure 19 The chemical structural formula of nitrosomyoglobin (Potthast, 1987).

Podatki o rezidualnem nitritu v končnih izdelkih so različni. Sofos in Raharjo (1995) omenjata, da naj bi se med proizvodnjo izgubilo okoli 50 % nitrita, med skladiščenjem

izdelka pa naj bi se ta količina še zmanjšala. Cassens (1997) pa je mnenja, da se lahko na koncu proizvodnega procesa analitično določi le od 10 do 20 % od dodanega nitrita.

Pri oblikovanju barve je pomembna tudi konverzija pigmenta, razmerje skupnega pigmenta v izdelku proti skupnemu pigmentu v surovini. Čim večja je konverzija pigmenta, tem intenzivnejša je barva, seveda odvisno tudi od lastnosti mišičnine.

2.3.1.2 Doziranje nitrata in nitrita

Količina nitrita je odvisna predvsem od vrste izdelka in temperature razsoljevanja. Na splošno velja, da je za večje kose mesa in tiste z bolj izrazito barvo potrebno več nitrita, in obratno. Prav tako na količino dodanega nitrita vpliva tudi vsebnost maščobnega tkiva. Izdelkom z več maščobnega tkiva se dodaja manj nitrita.

Pri nizkih temperaturah se doda nekoliko več nitrita kot običajno, saj nizka temperatura upočasnjuje delovanje reduktivnih bakterij. Temperatura v prostorih, kjer poteka razsoljevanje, naj ne bi presegla 6 °C (Wirth, 1991).

Pomembno je zlasti to, da je pri uporabi nitrata nemogoče predvideti, koliko se ga bo pretvorilo v nitrit, kar močno poveča verjetnost prevelikega odmerka, ki lahko povzroči poslabšanje kakovosti končnega izdelka. Zato se za uravnavanje dodanega nitrita v praksi najbolj poudarja uporaba nitrita skupaj s kuhinjsko soljo v obliki t. i. nitritne soli za razsoljevanje. Takemu dodajanju nitrita se daje prednost, saj so količine dodanega nitrita omejene s slanostjo kuhinjske soli oziroma izdelka, z ozirom na to, da nitritne soli za razsoljevanje vsebujejo od 0,5 do 0,6 % natrijevega nitrita (Savić, 1979; Đorđević in sod., 1980; Wirth, 1991). Sol za razsoljevanje lahko proizvajajo samo določeni proizvajalci, ki imajo za to dovoljenje. Nitrat sam po sebi ni toksičen, vendar se mora zaradi možnosti prehoda v nitrit njegovi uporabi in shranjevanju posvečati veliko pozornosti.

Včasih se je nitrat pogosteje uporabljal, saj je bil čas tehnološkega procesa razsoljevanja daljši in je bilo tako dovolj časa, da se je s pomočjo odgovarjajočih bakterij (denitrificirajočih bakterij), ki so prišle v razsolico z vodo, s kuhinjsko soljo in mesom reduciral v nitrit. Nevarnost uporabe nitrata je v tem, da lahko iz njega nastanejo nedovoljene količine nitrita. Maksimalna dovoljena količina prostega nitrita je odvisna od vrste mesnega izdelka. V mnogih državah poskušajo omejiti ali celo prepovedati uporabo nitrata (Shahidi in Pegg, 1993 in 1993a). Mikrobiološka konverzija nitrata v nitrit je počasna in jo je težko nadzorovati (Sofos in Raharjo, 1995). Zato se v sodobni industrijski praksi vedno bolj uporablja nitrit, ki ga je mogoče natančneje dozirati in lažje nadzorovati. Ker pa obstajajo tudi take bakterije, ki reducirajo nitrit, je potrebno predvideti tudi to izgubo. Količina nitrita, ki nastane z denitrifikacijo, je odvisna od števila in vrste bakterij ter vrednosti pH in koncentracije soli v slanici (Bučar in sod., 1989; Skvarča, 1992).

2.3.1.2.1 Zakonske določbe glede nitrata

Strokovnjaki ocenjujejo, da znaša dnevni vnos nitratov (NO_3^-) v človeški organizem v okviru evropske diete 50-150 mg/dan in je odvisen predvsem od dnevno zaužite količine zelenjave. Tudi pitna voda je lahko pomemben vir nitratov, seveda na območjih, kjer pitna voda vsebuje več nitratov od predpisane meje. Po ocenah od 80 do 90 % nitratov

zaužijemo z zelenjavo. Z mesnimi izdelki zaužijemo v povprečju okrog 10 % skupnega vnosa nitrata in od 60 do 90 % nitrita. Vnos nitrata in nitrita s sadjem in mlečnimi izdelki je zanemarljiv. Sami nitrati so zdravju relativno neškodljivi, vendar se je treba zavedati, da se po zaužitju lahko spremenijo v nitrite, ki lahko povzročijo methemoglobinemijo. Nitriti so v želodcu lahko prekursorji za NOC (NOC – N-nitroso spojine = nitrozamini in nitrozabilne snovi), ki so po merilih mednarodne agencije za raziskavo raka večinoma razvrščeni v skupino rakotvornosti 2 B (možna rakotvorna snov), nekatere pa 2 A (verjetna rakotvorna snov).

JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) je postavila ADI (Acceptable Daily Intake, sprejemljivi dnevni vnos) za nitrate v višini 0-3,7 mg/kg telesne teže/dan kar znaša od 0 do 259 mg nitrata na dan pri posamezniku. Kljub temu pa JECFA meni, da glede na pozitivne učinke uživanja zelenjave ni upravičeno, da bi se izpostavljenost nitratom preko zelenjave ocenjevala izključno po kriteriju ADI (IPCS INCHEM, 2008).

2.3.1.2.2 Zakonske določbe za razsoljevanje

Nitrit in nitrat, kot množično uporabljena aditiva pri razsoljevanju mesa, sodita v skupino aditivov, katerih uporaba je zakonsko določena oziroma omejena. Natrijev nitrit (NaNO_2) je blede rumena, v vodi topna kristalinična sol natrija in dušikove (III) kisline. Nitrit je zelo toksična snov. Pri uživanju večjih količin te soli lahko nastopi inhibicija dihanja, lahko pa povzroča tudi gastrointestinalne motnje, v nekaterih primerih celo smrt, ker se veže na hemoglobin v krvi in blokira dovod kisika v telo (posameznim tkivom). To ima lahko za posledico t. i. "notranjo zadušitev". Glede na priporočila Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je dovoljena dnevna količina zaužitega nitrita največ 0,4 mg/kg telesne teže. Druga nevarnost uporabe nitrita je reakcija med rezidualnim nitritom in sekundarnimi ter terciarnimi amini, pri čemer nastajajo kancerogeni nitrozamini.

Po Pravilniku o aditivih za živila, njegovih spremembah in dopolnitvah (2004, 2005, 2006 in 2008) je v Sloveniji v mesnih izdelkih dovoljena največja vsebnost kalijevega nitrita (E 249), ki se jo lahko doda med proizvodnjo (izražena kot NaNO_2) 150 mg/kg (150 ppm ali 0,015 %) oziroma natrijevega nitrita (E 250) v primeru steriliziranih mesnih izdelkov 100 mg/kg. Največja dovoljena vsebnost ostanka (izražena kot NaNO_2) v primeru tradicionalnih mesnih izdelkov, izdelanih po postopku mokrega ali suhega razsoljevanja znaša 175 mg/kg. Pri natrijevem (E 251) ali kalijeve (E 252) nitratu je največja dovoljena vsebnost, ki se ju lahko doda med proizvodnjo (izražena kot NaNO_3) toplotno neobdelanih mesnih izdelkov 150 mg/kg, tradicionalnih mesnih izdelkov, izdelanih po postopku mokrega razsoljevanja in drugih tradicionalnih soljenih mesnih izdelkov 300 mg/kg, v primeru mariniranega slanika ali sprata pa 500 mg/kg. Največja dovoljena vsebnost ostanka (izražena kot NaNO_3) v primeru tradicionalnih mesnih izdelkov, izdelanih po postopku suhega razsoljevanja znaša 250 mg/kg. Z oznako "za v živilih" se nitrit lahko prodaja samo v mešanici s soljo ali nadomestkom soli.

Tudi v številnih drugih državah obstajajo norme glede uporabe nitrita. Na Norveškem je od leta 1973 prepovedano dodajanje nitrata in nitrita ali pa se izdajajo enoletna dovoljenja za uporabo nitrita v določenih vrstah sira, ribjih izdelkih, razsoljenih kosih mesa in nekaterih vrstah trajnih izdelkov. Maksimalna dovoljena količina nitrita v Rusiji pri termično obdelanih mesnih izdelkih je do 15 ppm, v trajnih klobasah pa 30 ppm, torej veliko manj

kot v Sloveniji. V Belgiji, Švici, Franciji in na Danskem, Švedskem ter Poljskem je količina nitrita v gotovih izdelkih približno enaka kot v Sloveniji, medtem ko Madžarska ne dovoljuje več kot 150 ppm nitrita (Belovič, 1995). V ZRN je za barjene klobase dovoljena le še uporaba nitritne soli. Ker se k barjenim klobasam dodaja v povprečju 2,0 % nitritne soli, se v njih lahko pričakuje cca. 80 ppm nitrita. V končnih izdelkih sme preostanek nitrita skupaj z nitratom znašati 100 ppm (izraženo kot nitrit), kar je popolnoma smotno, saj ima izdelek primerno barvo že, če je tega dodatka od 40 do 50 ppm. Ta relativno visoka dovoljena meja je potrebna, ker lahko z vodo prispe v izdelek precejšnja količina nitrata (Wirth, 1985).

Minimalne potrebne količine nitrita pri barjenih klobasah so po ocenah Wirtha (1991) od 30 do 50 ppm, pri čemer je nastanek zadovoljive barve razsoljenega mesa v znatni meri odvisen od tehnologije razsoljevanja (vrednost pH, temperatura, prisotnost kisika in reducentov).

V tej zvezi je zanimivo vprašanje, v kakšnem obsegu se odražajo vplivi nitrita ali nitrata, same surovine in dodatki v mesnem izdelku na končno bilanco nitrita in nitrata (izraženo kot nitrit). Ta vpliv se v raziskavah ponavadi zanemari: goveje, prašičje in telečje meso vsebuje praviloma le sledi nitrita (1-2 ppm). Vsebnost nitrata je v povprečju 5 ppm in je prav tako nizka (preglednica 5). Med razsoljevanjem se količina nitrita, glede na količino dodanega, lahko izgubi tudi do 50 % (Pearson in Dutson, 1987).

Preglednica 5 Vsebnost nitrita in nitrata v mesu, začimbah in pitni vodi (Wirth, 1985).

Table 5 The content of nitrite and nitrate in meat, spices and potable water (Wirth, 1985).

surovina	nitrit v ppm	nitrat v ppm
goveje meso	0-1	2-10
telečje meso	0-1	2-6
svinjina	0-1	2-8
začimbe	0-1	5-2000
pitna voda	0-3	2-50 do 200

Razsoljevanje kot metoda se zaradi vsebnosti rezidualnega nitrita v končnem izdelku v svetu ne opušta. NO_2^- je strupen za človeški organizem. Nevaren je tisti del nitrita, ki je ostal prost, nevezan (to je rezidualni nitrit, ki lahko reagira z amini in tvori nitrozamine, ki imajo kancerogeno učinkovanje). Nevarnost njihove prisotnosti je povečana v izdelkih, ki so toplotno obdelani. V hrani želimo, da je nitratorov čim manj, pa tudi sami moramo skrbeti, da jih z njo čim manj zaužijemo. V tehnologiji je mogoče nitrit nadomestiti v smislu njegovega učinkovanja na barvo, ni pa mogoče nadomestiti njegovega baktericidnega učinka.

Dokazano je bilo, da spadajo nitrozamini (spojina nastala iz produkta razgradnje nitrita in amina) med najaktivnejše kancerogene substance (Dakić in sod., 1980; Archer, 1982; Gray in Pearson, 1984). Nevarnost obstaja, ker se vse nastale količine NO ne vežejo na mioglobin in ostajajo proste za reakcijo z drugimi komponentami mesa, z možnostjo tvorbe nitrozamina. Z nadaljnimi raziskavami je bilo potrjeno, da pri strokovno izvedenem

procesu razsoljevanja in pri uporabi higiensko neoporečne surovine ni nevarnosti za tvorbo nitrozaminov. Nevarnost nastane, ko se razsoljuje meso, ki ni popolnoma sveže in se je že začela razgradnja proteinov ter tvorba aminov. Nitrit se lahko v tem primeru veže na amine in tvori nitrozamine. Pri tem delujejo izrazito katalitično visoke temperature toplotne obdelave (nad 160 °C). Zaradi tega se ne priporoča ali celo prepoveduje pečenje razsoljenega mesa.

2.3.1.3 Vpliv nitrita na tvorbo arome

Poleg ustvarjanja zelene stabilne barve razsoljenega mesa, nitrit v manjši meri izboljša tudi aromo mesa. Pri učinkovanju nitrita na meso in mesne izdelke nastaneta tipičen vonj in okus, ki se jasno razlikujeta od proizvodov, obdelanih le s kuhinjsko soljo. Pri tem pa je aroma toplotno obdelanih razsoljenih mesnih izdelkov drugačna kot aroma surovih razsoljenih izdelkov. Pri višjih temperaturah nastanejo drugačne ali dodatne spojine, ki povzročajo spremembo arome in okusa. Znano je, da aroma pri razsoljevanju nastane z reakcijo mnogih snovi v mesu z nitritom oziroma dušikovim oksidom. Najpogosteje z NO reagirajo alkoholi, aldehidi, inozin, hipoksantin in posebej žveplove spojine. Za tvorbo tipične arome razsoljenega mesa zadostuje 20-40 ppm nitrita, odvisno seveda od izdelka (Wirth, 1991). Aroma mesnih izdelkov razsoljenih z nitritom je drugačna od tistih, ki so razsoljeni z nitratom (Smulders in sod., 1992).

O interakciji nitrita in mesnih sestavin, ki vplivajo na aromo, je zelo malo raziskav. Čeprav je nitrit v tesni povezavi z aromo razsoljenega mesa, kemične spremembe, ki povzročajo to posebno aromo, še niso pojasnjene. Ni specifične komponente ali komponent, ki bi imele značilno aromo razsoljenega mesa.

2.3.1.4 Antioksidativen učinek nitrita

Nitrit je pomembno antioksidativno sredstvo in s svojim delovanjem varuje maščobe pred oksidacijo. Minimalna potrebna količina nitrita še ni znana. Proizvodi obdelani samo s kuhinjsko soljo hitreje izgubijo okus, kar velja predvsem za barjene klobase, kjer se pri proizvodnji primeša mnogo kisika. Z nitritom obdelani proizvodi dosežejo daljšo trajnost, ker nitrit upočasni oksidacijo lipidov in razvoj nezaželjene arome (Đorđević in sod., 1980; Wirth, 1985).

Pri določeni vsebnosti (okrog 150 mg/kg) nitrit inhibira oksidativne spremembe v toplotno obdelanem mesu. Ta inhibicija je, gledano skozi vrednosti tiobarbiturne kisline (TBK), odvisna od vrste mesa in je dvakrat manjša v govejem in piščančjem mesu ter kar petkrat manjša v svinjini (Gray in Crackel, 1992) (preglednica 6).

Preglednica 6 Učinek nitrita na oksidativno stabilnost mesa (podatki so kot TBK vrednosti) (Gray in Crackel, 1992).

Table 6 The effect of nitrite on the oxidative stability of meat (the data are expressed as TBK values) (Gray and Crackel, 1992).

vrsta mesa / način obdelave	brez nitrita	z nitritom	razlika
piščanci			
presni, 0 dni	2,52	1,36	1,16
toplotno obdelani, 0 dni	3,58	1,06	2,52
presni, 48 h/4 °C	5,52	1,47	4,05
toplotno obdelani, 48 h/4 °C	6,98	3,05	3,93
svinjina			
presna, 0 dni	1,52	0,85	0,67
toplotno obdelana, 0 dni	1,83	0,72	1,11
presna, 48 h/4 °C	2,48	1,42	1,06
toplotno obdelana, 48 h/4 °C	7,85	1,64	6,21
govedina			
presna, 0 dni	0,92	0,66	0,26
toplotno obdelana, 0 dni	1,07	0,75	0,32
presna, 48 h/4 °C	1,84	1,17	0,67
toplotno obdelana, 48 h/4 °C	4,12	2,06	2,06

2.3.1.5 Antimikroben učinek nitritov

Razsoljevanje ima izrazitejšo protimikrobno delovanje od soljenja. Poleg zniževanja vrednosti a_w delujeta nitrat in nitrit oziroma produkti njune razgradnje direktno protimikrobno, čeprav je tudi pri razsoljevanju bakteriostatski učinek pomembnejši od baktericidnega. Medtem ko nitrat, pa čeprav pri visokih koncentracijah, ne učinkuje na mikroorganizme, ima nitrit že v razmeroma nizkih koncentracijah inhibični učinek na rast različnih vrst bakterij. Učinkuje na potencialno patogene mikroorganizme, zavira rast in razvoj mikroorganizmov, zlasti anaerobnih in aerobnih sporogenih bakterij. V kombinaciji z drugimi komponentami razsola ima tudi antimikrobni učinek na rast spor bakterij *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* in drugih klostridijev, *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus* (Shahidi in Pegg, 1990). Za nitritne soli so najbolj občutljivejši predstavniki iz rodu *Clostridium* – razmnoževati se prenehajo v prisotnosti 5 % soli za razsoljevanje. Bacili za isti učinek potrebujejo 10 %, mikrokoki pa 16 % te soli. Pri koncentraciji od 4 do 6 % soli v mesu lahko salmonela preživi 4 do 6 mesecev, povzročitelji rdečice prašičev 30 dni, bruceloze pa 21 dni. Virusi slinavke in parkljevke ter virusi svinjske kuge so neobčutljivi za te sestavine. V ustreznih razsolinah pri 15 °C in bogatih s saprofitno mikrofloro bakterija *Staphylococcus aureus* ne tvori toksina. Ne razmnožuje se niti *Clostridium botulinum*, čeprav spore preživijo. Ko dosežejo optimalne pogoje, vzkljujejo in tvorijo toksine. Sestavine razsolice mnogo izraziteje delujejo na parazite. Tako *Cisticercus cellulose* izgine v 14 dneh v 25 % razsolici. Običajne koncentracije soli za razsol inaktivirajo toksoplazme in sarkosporidije, učinek na trihinele je slabše proučen (Sinell, 1992).

Določene skupine in vrste mikroorganizmov dobro prenašajo proces razsoljevanja. Lahko se razmnožujejo in postanejo dominantne vrste. Sem sodijo: predstavniki rodu *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*), *Lactobacillus*, *Micrococcus* in določene skupine kvasovk. V razsoljenih mesnih izdelkih mikrokoki reducirajo nitrat v nitrit, laktobacili razgrajujejo ogljikove hidrate v kisline in tako znižujejo vrednost pH ter ustvarjajo ugodne pogoje za razgradnjo nitrita. Tako mikrokoki in laktobacili z neposrednim in posrednim delovanjem pripomorejo k oblikovanju značilne in stabilne barve razsoljenega mesa. Raziskave so pokazale, da je za uspešno inhibicijo bakterij *Salmonella* spp. v obarjenih klobasah pri 8 °C v 20 dneh potrebno najmanj 62 ppm nitrita. V čajni klobasi je za isti učinek potrebno 101 ppm nitrita. Pri 30 °C niti 150 ppm nitrita ni dovolj za inhibiranje bakterije *Clostridium sporogenes* (Quintavalla in sod., 1999). Iz zgoraj navedenega je razvidno, da je za uspešno inhibitorno delovanje nitrita, poleg njegove koncentracije neobhoden istočasen vpliv drugih dejavnikov, ki preprečujejo razmnoževanje mikroorganizmov.

Nitrit je pomemben zaradi antibakterijskega učinka, ker preprečuje razmnoževanje sporogenih mikroorganizmov, razvoj gram negativnih bakterij, vključno s salmonelami, posebno v proizvodih iz surovega mesa in pri rekontaminaciji barjenih klobas, pakiranih v vakuumu ali brez vakuuma. Nitrit zmanjša toplotno odpornost spor. V toplotno obdelanih izdelkih nitrit preprečuje kalitev spor. Raziskovalci so mnenja, da produkti razkroja nitrita med toplotno obdelavo reagirajo z drugimi spojinami in pri tem oblikujejo določene protimikrobne komponente (Perigo faktor) (Böhmer in Hildebrandt, 1996). Nitrit v koncentracijah od 80 do 150 ppm upočasni in pri koncentracijah > 200 ppm inhibira razmnoževanje *Clostridium botulinum* in *Salmonella* spp. Med toplotno obdelavo se v mesu tvorijo produkti, rezidualni nitrit se tvori z mesnimi komponentami v komplekse, ki inhibitorno učinkujejo na rast sporogenih anaerobov, pri čemer so Clostridiji najpomembnejši.

Med termično obdelavo razsoljenega mesa se nitrit veže na proteine in na ta način tvori spojine, katere na specifičen način delujejo na bakterije, med drugim tudi na *Clostridium botulinum*. Te spojine zavirajo njegovo rast in inhibirajo toksigenozo. Torej so nitriti nujni tudi zaradi antibakterijskega delovanja, ker preprečujejo razmnoževanje sporogenih mikroorganizmov, razvoj gramnegativnih bakterij, vključujoč tudi salmonele. Za inhibicijo patogenih bakterij je potreben dodatek nitritov od 80 do 150 ppm (Wirth, 1991). Pri ocenjevanju učinka nitrita na konzerviranje je potrebno upoštevati tudi druge dejavnike, kot so a_w , vrednost pH in temperatura. Na obstojnost proizvodov vplivata predvsem toplotna obdelava in temperatura.

Mikrobiocidni učinek nitrita je zelo pomemben. Da se zavre delovanje bakterij je minimalna količina potrebnega nitrita v izdelku 80 ppm, za razvoj barve pa potrebujemo dosti manjšo količino nitrita, tako v primeru hrenovk zadošča že 30 ppm nitrita. V primeru, da se skozi tehnološki postopek uporablja manjša količina nitrita, se mora ta uporabljati z dodatkom kisline, saj se le tako lahko zagotovi isti baktericidni učinek, kot če bi se uporabila večja količina nitrita.

2.3.1.6 Zdravstveni vidik uporabe nitrita

2.3.1.6.1 Toksikologija nitrita

2.3.1.6.1.1 Reaktivnost in varnost nitrita

Nitrit je topen v vodi in močno reaktiven, posebno pri nizki vrednosti pH, spremeni se v svojo prvotno obliko, dušikovo kislino. Lewis (1989) je opisal natrijev nitrit kot človeški strup tako v hrani kot tudi pri prehrani. Pri človeku povzroči spremembo motorične aktivnosti, komo, padec krvnega tlaka, širjenje arterij ali ven, želodčno slabost ali bruhanje in krvno methemoglobinemijo, mutagene učinke, draženje oči, povečano tveganje za raka in tvorbo kancerogenih nitrozaminov. Vendar je večina teh toksičnih učinkov povzročenih le ob prekoračitvi uporabljenih agensov in manj zaradi fizioloških pogojev. Methemoglobinemija je bolezen pri kateri je hemoglobin v oksidirani obliki (methemoglobin) in zaradi tega ne more vezati kisika. Kot posledica nastaja pomanjkanje kisika v tkivih, ki se kaže kot modra obarvanost kože in sluznic, glavobol, slabost, občutek pomanjkanja zraka. Za nastanek methemoglobinemije zaradi izpostavljenosti nitratom /nitritom v prehrani so najbolj občutljivi dojenčki do 4. meseca starosti. V tem starostnem obdobju še vedno ni razvit encimski sistem, ki bi bil sposoben reducirati methemoglobin v hemoglobin.

Tvorba N-nitrozo spojin v določenih razsoljenih mesnih izdelkih je bila odkrita v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, kar je povzročilo intenzivne raziskave, da bi razvili alternative za nitrit v razsoljenih mesnih izdelkih. Zaradi tega je po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije dopustni dnevni vnos nitrita v organizem človeka do največ 0,4 mg nitrita/kg telesne teže (Dakić in sod., 1980).

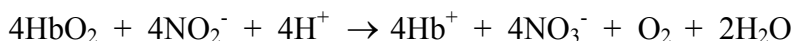
Nitrozamini so kancerogeni, mutageni in toksični za mnoge živalske vrste, tudi za človeka. Najpogosteje izzovejo spremembe na jetrih, pljučih, želodcu, mozgu in perifernem živčnem sistemu (Vombergar in sod., 1989).

2.3.1.6.1.2 Akutna toksičnost

Nitrat ni reaktiven in ni toksičen, vendar to lahko postane zaradi redukcije v nitrit, ki je reaktiven (Archer, 1982; Hill, 1991). Nitrit je lahko toksičen direktno ali s tvorbo N-nitrozo spojin. Akutni toksični učinek nitrita nastane zaradi njegove sposobnosti oksidacije oksihemoglobina v methemoglobin, ki ne more vezati in transportirati kisika s krvjo do celic po vsem telesu (Watson, 1993). Hemoglobin je železo vsebujoč kompleks proteina, ki se nahaja v eritrocitih, kjer funkcionira kot prenašalec kisika. Če se veže s kisikom, tvori rdeč oksihemoglobin, ki se hitro razkrajja, da bi sprostil kisik za tkivo (Hill, 1991). Hemoglobin se spremeni v rjav methemoglobin po oksidaciji z nitritom in ni več sposoben vezati kisika. Vsak z methemoglobinom vezan kisik je močno vezan in neuporaben. Reducirajoči sistemi v živih celicah vzdržujejo nivo methemoglobina pri 1-2 % celotnega hemoglobina. Nivo methemoglobina manj kot 10 % od celotnega hemoglobina je navadno asimptomatičen, toda nad 10 % povzroči cianozo ali pomodrelo kožo in rjavo kri (Hill, 1991). Če se spremeni večji delež hemoglobina v methemoglobin, prizadeta oseba pade v komo in lahko celo umre. Splošno sprejeta raven methemoglobina, ki povzroči smrt, je 60 % od celotnega krvnega hemoglobina (Hill, 1991).

1 gram NaNO_2 lahko prevede 1 885 gramov hemoglobina v methemoglobin (Vombergar in sod., 1989).

Sprememba oksihemoglobina v methemoglobin sledi reakciji (Belovič, 1995):



Smrtna doza nitrita je po ocenah od 2 do 9 g, povprečno 4 g kot natrijev nitrit. Prvi znaki pri oralni zastrupitvi se razvijejo po 15-45 minutah (Aquanno in sod., 1981).

2.3.1.6.1.3 Mutagenost nitritov

N-nitrozo spojine se tvorijo z nitrozacijo organskih amino spojin in so navadno deljene na N-nitrozamine in N-nitrozamide (Archer, 1982; Hill, 1991). Nitrozamini nastanejo iz sekundarnih aminov, ki vsebujejo dialkil, alkilaril in diaril substituenti. Nitrozamidi se tvorijo z nitrozacijo N-alkiluree, N-alkilkarbamata, enostavnih N-alkilamidov. N-nitrozamini so stabilne spojine, medtem ko so N-nitrozamidi nestabilni pri vrednosti pH nad 2, hitro razpadejo pri vrednosti pH = 7 in se pri kuhanju uničijo.

Nitrozo (-NO) skupina lahko reagira tudi z atomi dušika, ogljika ali žvepla. Posebno pozornost posvečamo tako N-nitrozo skupini (N-NO), ki je kancerogena v številnih spojinah, ki jo vsebujejo (Watson, 1993; Sofos in Raharjo, 1995).

2.3.1.6.2 *Zmanjševanje količine nitrita*

Mnogi avtorji so se ukvarjali s problemom zmanjševanja količine nitrita v različnih proizvodih s ciljem poiskati minimalne količine dodanega nitrita, ki še ne vplivajo na spremembo senzoričnih lastnosti. Posebej pozorni so bili na razvoj barve, arome in antibakterijski učinek nitrita. Z zmanjševanjem dodane količine nitrita bi lahko vplivali na količino rezidualnega nitrita v razsoljenih proizvodih.

Rašeta in sod. so že leta (1975) poudarili, da je nesmiselno izključiti nitrit iz razsoljenega mesa, dokler se zanj ne najde enakovredna zamenjava. Smiselno je namreč iskati druge možnosti za reševanje tega problema v mesni industriji, kajti če že ne odpravimo posledic, ki jih povzročata nitrit, jih lahko vsaj omilimo. V industriji mesa se običajno ne uporabljajo odgovarjajoče količine nitrita, običajno so te večje kot je potrebno. Tako so v končnih izdelkih večje količine prostega nitrita, katerega del je tako na razpolago za tvorbo nitrozaminov. Vsled tega so se lotili reševanja problema zmanjševanja količine nitrita v hrenovkah. Iskali so minimalne količine nitrita, ki so potrebne za nastanek značilne, dovolj intenzivne in stabilne rožnatordeče barve nadeva. Eksperimentalno so ugotovili, da se v proizvodnji hrenovk lahko doseže značilna barva z znatno manjšimi količinami nitrita (30-50 ppm), pri čemer je za doseg določenega antibakterijskega učinka potrebno povežati vsebnost nitrita. Pri doziranju 200 ppm nitrita hrenovkam so le-te imele nezaželjeno barvo. Količina rezidualnega nitrita v hrenovkah je odvisna predvsem od količine dodanega nitrita. Hrenovka z dodatkom 200 ppm nitrita je vsebovala 125 ppm prostega nitrita, hrenovka z 30 ppm nitrita pa le 23 ppm prostega nitrita. Na zmanjšanje količine nitrita v barjenih klobasah lahko vpliva tudi dodatek askorbinske kisline.

Podobne rezultate je dobil tudi Wirth (1991), ki je ugotovil, da je za razvoj tipične barve razsoljenega mesa potrebnega 30-50 ppm nitrita, za razvoj arome razsoljenega mesa pa 20-40 ppm nitrita (odvisno od izdelka), medtem ko je za inhibicijo škodljivih mikroorganizmov (*Clostridium botulinum*, salmonelle, stafilokoki) potrebno 80-150 ppm nitrita.

Z zmanjševanjem količine nitrita se je v izdelkih znižala tudi raven prostega, rezidualnega nitrita. Za popolno izključitev le teh se je bilo treba zateči k iskanju alternative nitrita.

2.4 ALTERNATIVE NITRITA

Že pred leti so poudarjali, da bi bilo potrebno odkriti spojino za popolno zamenjavo z nitritom, ki bi zagotovila proizvodu take značilnosti kot nitrit in ne bi predstavljala zdravstvenih problemov. Zaskrbljenost glede potencialnih škodljivih učinkov nitrita v hrani (predvsem tvorba nitrozaminov) je bila vzrok raziskavam o alternativah za ta mnogonamenski prehranski aditiv, vendar je zamenjava nitrita zaradi njegove večnamenskosti zelo težavna in zato je zelo majhna možnost, da bi se našla ena sama spojina, ki bi nadomestila vse njegove funkcije (O'Boyle in sod., 1991; Shahidi in Pegg, 1992). Nadomestek za nitrit bi tako moral imeti antimikrobni učinek (na bakterijo *Clostridium botulinum*), vlogo pri nastanku značilne termostabilne barve razsoljenega mesa (rožnatordeča), antioksidacijski učinek, ki prepreči nastanek slabe arome ter vlogo pri oblikovanju arome in teksture razsoljenega mesa (Hui in sod., 2001).

Leta 1974 so v mesnih emulzijah namesto nitrita uporabili pigmente rdeče pese – betalaine. Klobase s temi pigmenti so bile temnejše, imele so slabšo aromo, po eno in dvotedenskem skladiščenju pa se njihova barva in mikrobiološka slika nista statistično razlikovali od tistih, pripravljenih z nitritom. Barva klobas z betalaini je bila med skladiščenjem celo bolj stabilna od tistih z nitritom (Stevanović, 1998). Pri zmletem puranjem mesu so ugotovili, da S-nitrozocistein sicer lahko razvije barvo razsoljenega mesa, glede na možno tvorbo N-nitrozaminov pa to ni primeren substitut za nitrit.

Da bi našli alternativo nitrita so Dymicky in sod. (1975) testirali več kot 300 spojin, ki bi lahko imele zmožnost tvorbe barve razsoljenega mesa. Najbolj učinkoviti so bili 3-acil piridini.

Leta 1975 so v Ameriki izdelali breznitritno mešanico aditivov za razsoljevanje. Ta alternativa razsola je vsebovala antimikrobno sredstvo metilparaben, t-butilhidroksikinon kot antioksidant in polifosfate kot preprečevalce lipidne avtooksidacije in razvoja neželjene arome. Za razvoj značilne rožnate barve so uporabili eritrozin – močno sintetično barvilo. Hrenovke s takšno mešanico aditivov so imele barvo in aromo razsoljenega mesa in so bile stabilne pri 3 °C 4 tedne. Priporočili pa so tudi druge večkomponentne mešanice za preprečevanje oblikovanja N-nitrozaminov v razsoljenih izdelkih. Te so vključevale zlasti askorbate in α - tokoferol (Shahidi in Pegg, 1993).

Leta 1982 je ameriška Nacionalna akademija znanosti priporočila, da bi bilo potrebno zmanjšati izpostavljenost ljudi N-nitrozaminom in da bi bilo potrebno razviti dolgoročne

razvojnne strategije za nitritne nadomestke. To je bil še izrazitejši povod za iskanje alternativ, čeprav je bila verjetnost, da bi našli mešanico komponent, ki bi delovala kot nitrit, majhna (Shahidi in Pegg, 1993). Najbolj učinkovito so vsebnost N-nitrozaminov zmanjšali z zniževanjem vsebnosti nitrita. Ugotovili so tudi, da je antimikrobni učinek nitrita slab pri doziranju pod 100 ppm nitrita. Vrhu tega so v nekaterih državah celo prepovedali nitrat pri razsoljevanju, predvsem zaradi onemogočene kontrole redukcije nitrata v nitrit. S pomočjo raziskovanj so nekako le prišli do zaključka, da je najbolj učinkovito preprečevanje tvorbe N-nitrozaminov z izključitvijo nitrita in z uporabo raznih alternativ, ki imajo vse večjo veljavo zlasti po letu 1992 (Shahidi in Pegg, 1993).

Glavni pigment, odgovoren za barvo toplotno obdelanega razsoljenega mesa, je nitrozomiokromogen (Killday in sod., 1988). Ta pigment je mogoče proizvesti in ga dodajati mesu, da bi se izognili dodajanju nitrita zaradi tvorbe barve (Shahidi, 1991).

Kot alternative nitrita so bili s stališča barve v minulem obdobju poleg dušikovih heterocikličnih in aromatičnih snovi (nikotinska kislina, purinski derivati, tetrazol, heterociklične komponente – purini, pirimidini, pirazini, triazin...), katerih glavni problem je bila oksidacijska nestabilnost in to, da so bili derivati nikotinske kisline vazodilatatorji uporabljeni tudi naravni pigmenti. Med slednjimi je bilo največ raziskav narejenih z naslednjimi komponentami: betalaini (betacianini, betaksantini), angkak (fermentiran riž), pigmenti rdeče paprike, β -karoten, kurkumin, kohienal (karminska kislina) in večkomponentne mešanice, sestavljene iz eritrozina, antioksidanta, antimikrobne komponente in CCMP-ja, seveda tudi samostojni poskusi z nitroziranim govejim ali ovčjim heminom – CCMP.

2.4.1 Antimikrobno delovanje nadomestkov nitrita

Nitrit je pomemben v razsoljenem mesu tudi kot antimikrobni dejavnik, ki prepreči rast bakterije *Clostridium botulinum*. Uporaba drugih antimikrobnih dejavnikov zahteva dopolnjevanje z drugimi aditivi, da bi zagotovili ustrezno barvo in aromo tradicionalnih aditivov.

Kalijev sorbat – bela kristalinična spojina z GRAS statusom (generally recognized as safe) je imel pri dodatku 2 600 mg kalijevega sorbata/kg termično obdelanega mesa enakovreden učinek kot dodatek 156 mg nitrita/kg termično obdelanega mesa. V kombinaciji s 40 mg NaNO₂/kg mesa so zmanjšali tvorbo N-nitrozaminov iz 100 μ g na manj kot 5 μ g/kg termično obdelanega mesa. Senzorična analiza termično obdelanega mesa obdelanega s 120 mg nitrita/kg mesa in drugega z uporabo 40 mg nitrita/kg mesa v kombinaciji z 2 600 mg kalijevega sorbata/kg mesa ni pokazala razlik v barvi in aromi (Shahidi in Pegg, 1993). Nizin je učinkovit antibiotulinski dejavnik pri 75 mg/kg, toda aktivnost nizina se izgubi pri hladnem skladiščenju in to vse do stopnje, ko več ne učinkuje antibiotulinsko. BHA (butil hidroksianizol) zavira rast bakterije *Clostridium botulinum* pri 50 mg/kg, a se izgubi med sekljanjem. Natrijev hipofosfit je pri 3 000 mg/kg (oziroma 1 000 mg natrijevega hipofosfita/kg mesa skupaj z dodatkom 40 mg nitrita/kg mesa) enakovreden dodatku 120 mg nitrita/kg mesa in je tako enako učinkovito antibiotulinsko sredstvo, saj je blagega okusa, dobro topen in ima prav tako GRAS status (Shahidi in Pegg, 1993; Smith, 1993; Wood in sod., 1995).

Organske kisline, posebno mlečna kislina, so prav tako učinkovite (Shahidi, 1991). Mlečnokislinske bakterije imajo znatno moč pri proizvodnji varnih alternativnih proizvodov z malo ali nič nitrita. Uporaba mlečne kisline, natrijevega in kalijevega laktata ali mlečnokislinskih bakterij zniža vrednost pH razsoljenega mesa in s tem poveča mikrobiološko obstojnost. Odlično zaščito pred tvorbo toksina botulina v breznitritni slanini so odkrili z uporabo laktoze in mlečnokislinskih bakterij. Zmanjšana količina dodanega nitrita skupaj z uporabo starter kultur je dala zadovoljive rezultate (Shahidi in Pegg, 1993). Tudi fosfati, čeprav prvotno uporabljeni za vezavo vode v hrani, imajo antimikrobni in antibotulinski učinek.

Z namenom zmanjšati količino N-nitrozaminov so proučevali učinke nitrita pri doziranju 10-40 g nitrita/kg mesne emulzije. Raziskovali so tudi uporabo antimikrobnega sredstva skupaj z zmanjšano vsebnostjo nitrita (Shahidi in Pegg, 1993). Prišli so do zaključkov, da mora biti ta komponenta:

- vsaj tako učinkovita kot sam nitrit,
- varna,
- termostabilna,
- učinkovita pri nizkem dodatku,
- ne sme razvijati nezaželjene arome.

Ugotovljeno je bilo, da bi bil ester parahidroksibenzojeve kisline lahko dober kandidat, čeprav je njegov učinek proti bakteriji *Clostridium botulinum* vprašljiv (Shahidi in Pegg, 1993).

Učinkovito antibotulinsko aktivnost so ugotovili tudi pri uporabi 1 250-2 500 mg metil- in etilestrov fumarne kisline/kg termično obdelanega mesa. Tudi v senzoričnih lastnostih se vzorci niso razlikovali od tistih z nitritom (Shahidi in Pegg, 1993). Z uporabo 50 mg butiliranega hidroksianizola/kg mesa so ugotovili inhibitorni učinek na rast spor bakterije *Clostridium botulinum* tipa A in B.

Eden od možnih pristopov za kontrolo mikrobiološke aktivnosti v mesu je tudi uporaba nizkih do srednjih doz (do 50 kGray) γ -žarkov pri nizkih temperaturah. γ -žarki se lahko uporabijo kot kompletna zamenjava za nitrit ali pa za zmanjšanje količin dodanega nitrita, ki je potreben za antimikroben učinek.

To je le nekaj alternativ nitritu z vidika antimikrobnega učinka. Kot najboljša se je izkazala uporaba laktata in radiacijska sterilizacija (Shahidi in Pegg, 1993). Pri nas je razširjena uporaba laktata, medtem ko uporaba radiacijske sterilizacije zakonsko ni dovoljena.

2.4.2 Antioksidativna vloga nitrita in njegovih nadomestkov

V razsoljenem mesu deluje nitrit kot antioksidant in inhibira nastanek višjih aldehydov kot je heksanal (Igene in sod., 1985). Gray in Pearson (1984) sta ugotovila, da imajo poleg nitritov antioksidativni učinek tudi natrijev askorbat, natrijev tripolifosfat, pigment CCMP in drugi antioksidanti. Pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa – CCMP se lahko proizvede iz hemoglobina krvi. Ta pigment nastane z nitrozacijo hemina ali rdečih krvnih

celic ob prisotnosti redukcijskih agensov (Shahidi in sod., 1984), stabilizira pa se lahko z inkapsulacijo ali s sušenjem (Smith, 1993).

Pri proučevanju vpliva različnih antioksidantov na oksidacijo lipidov v toplotno obdelanem zmletem mesu prašičev so ugotovili, da sta med preiskovanimi antioksidanti zelo učinkovita butiliran hidrokislanizol in 2-terciarni-butilhidrokinon, celo pri manjšem dodatku (30 ppm). Zelo dobro antioksidativno sposobnost sta pokazala tudi askorbil acetat in askorbil palmitat (Stevanović, 1998).

Antioksidativen učinek nitrita se poveča v prisotnosti druge antioksidativne snovi oziroma njene spojine. To so lahko sintetični antioksidanti: BHT, BHA, TBHQ, PG, α -tokoferol, trihidroksibutirofenon, katehol, askorbinska kislina in njene soli, eritorbinska kislina ali naravni antioksidanti (ekstrahirani iz dišavnic in pri porabnikih bolje sprejeti): rožmarin (z antioksidativnimi snovmi kot so: karnozol, rozmanol, rozmarikinin, rozmaridifenol), origano (kavna kislina in rozmarinska kislina,...), timijan (kurkumin), žajbelj, klinčki (evgenol, galna kislina), ingver (gingerol, zingeron), gorčica (sinapinska in parahidroksibenzojska kislina, flavoni, flavonoli). Tovrstni učinek poleg Na-askorbata izkazujejo še sekvestranti (polifosfati in etilendiamino tetraocetna kislina - EDTA) (Gray in Crackel, 1992).

Sekvestranti se dodajajo za povečanje stabilnosti lipidov. Antioksidativna vloga sekvestrantov je posledica njihove sposobnosti, da se vežejo s kovinskimi ioni (predvsem s fero ioni, ki so glavni prooksidanti v mesnih sistemih) v komplekse, ki v odvisnosti od njihove stabilnosti, imobilizirajo kovinske ione in tako zavlačujejo začetek oksidacije. Pri raziskavah vpliva različnih sekvestrantov na oksidacijo lipidov v toplotno obdelanem zmletem mesu prašičev so ugotovili, da so katehol, EDTA, dietilentriaminopentaocetna kislina, Na-pirofosfat in v manjši meri Na-tripolifosfat bistveno zmanjšali TBK vrednosti, medtem ko so imeli drugi sekvestranti le neznamenit vpliv. Za sekvestrante avtorji predlagajo še mono-Na-fosfat, di-Na-fosfat, Na-heksametafosfat, citrsko in salicilno kislino, natrijeve soli oksalne in mlečne kisline, glicin, cistein, itd. (Stevanović, 1998).

Najboljša antioksidativna kombinacija sekvestrantov in antioksidantov (3 000 ppm Na-tripolifosfata, 550 ppm Na-askorbata in 30 ppm t-butilhidrokinona ali butiliranega hidrokislanizola), ki so jo uporabili v kuhanem prašičjem mesu, je zamenjala vlogo nitrita tako glede oksidativne stabilnosti kot tudi senzorične ocene arome. Učinkovita zaščita pred oksidacijo pa je tudi kombinacija Na-askorbata, Na-tripolifosfa, Na-heksametafosfa ali Na-pirofosfata (Stevanović, 1998).

2.5 PIGMENT TOPLOTNO OBDELANEGA RAZSOLJENEGA MESA (CCMP)

Ena od najpomembnejših senzoričnih lastnosti razsoljenega mesa je nedvomno njegova atraktivna barva, ki v večini primerov vpliva na potrošnike, tako da lepo barvo povezujejo tudi z dobro kakovostjo izdelka (Shahidi in Pegg, 1991).

Leta 1983 je kanadska skupina raziskovalcev začela načrtno raziskovati alternativo nitrita. Ker ni bilo verjetno, da bi našli eno samo spojino, ki bi nadomestila vse naloge nitrita, so

imeli namen razviti večkomponentni sistem za razsoljevanje, ki bi kopiral vsako od ključnih lastnosti nitrita. V prvi fazi so hoteli razviti alternativo za barvo kuhanega razsoljenega mesa, v drugi fazi antioksidant in v tretji fazi antimikrobno sredstvo. Alternativni pigment CCMP so sintetizirali direktno iz govejih rdečih krvnih celic ali iz hemina (lahko tudi ovčjih celic) (Shahidi in sod., 1982; Shahidi in Pegg, 1988, 1991, 1993 in 1993a; Pegg in Shahidi, 1997), kot nitrozirajoče sredstvo so uporabili NaNO_2 , kot reducent pa Na-ditionit. Pri sami sintezi so morali biti prisotni reducenti, ki so ohranili železov ion v železovem porfirinskem kompleksu v fero obliki in pospešili konverzijo nitrita v NO (Shahidi in Pegg, 1993 in 1993a; Jankiewicz in sod., 1994; Pegg in Shahidi, 1996 in 1997; Pegg in sod., 1996; Arneith, 1998).

V nadaljnjih raziskavah sta Shahidi in Pegg (1990) (preglednica 7) s svojo raziskovalno skupino ugotovila, da je med vsemi proučevanimi reducenti Na-askorbat najbolj primeren reducent in 0,2 M acetatni pufer z vrednostjo $\text{pH}=6,5$ najbolj primeren medij za sintezo alternativnega pigmenta, kot nitrozno sredstvo pa plin NO. V poskusu sta mletemu mesu dodala določeno količino NaNO_2 in CCMP ter opravila instrumentalno analizo barve na videz enakih izdelkov. Pigment pripravljen na ta način je mletemu mesu podelil barvo razsoljenega mesa. Sicer pa je bil nestabilen: razkroj se je na svetlobi in zraku začel po 4-6 urah, v temi in v prisotnosti zraka pa po 30 oziroma 36 urah. Avtorja sta tudi ugotovila, da se CCMP ne tvori, če ni prisotnih reducentov, saj le ti ohranjajo železov atom v železovem porfirinskem kompleksu v fero obliki in pospešijo konverzijo nitrita v NO.

Ko so v poskusu uporabili tri tipe mišic (s temno, svetlo in vmesno barvo) brez dodatka za razvoj barve so ugotovili, da ima manjša vsebnost nativnega mioglobina v mesu za posledico višje L^* vrednosti (bolj svetla) in nižje a^* vrednosti (manj rdeča). Vzorci z dodanim nitritom in tudi z dodanim alternativnim pigmentom razsoljenega mesa so imeli znatno višje vrednosti a^* od kontrolnih brez dodatka za razvoj barve. Vzorci z dodanim alternativnim pigmentom (12, 18, 24 ppm CCMP) so bili tako rahlo temnejši (nižje vrednosti L^*) in bolj rdeči (višje vrednosti a^*) od odgovarjajočih, razsoljenih z nitritom (25, 50, 156 ppm NaNO_2). S senzorično analizo pa ocenjevalci razlike v barvi niso zaznali, zaznali pa so razlike v aromi teh dveh izdelkov. Oksidacija lipidov je bila v 6-tedenskem testu skoraj popolnoma preprečena tako v nitritnem kot tudi v brez-nitritnem mesnem sistemu z dodanim CCMP-jem. Instrumentalno izmerjene vrednosti L^* , a^* in b^* vzorcev z 12 in 18 ppm CCMP se statistično niso kaj dosti razlikovale od tistih s 156 ppm nitrita. Mesni vzorci, tretirani s 24 ppm tega pigmenta so bili temnejši in bolj rožnato rdeči v primerjavi s kontrolnim vzorcem (156 ppm nitrita). Zato sta avtorja CCMP smatrala za najboljšo možno alternativo nitrita, kar se tiče razvoja barve (preglednica 7).

Shahidi in Pegg (1991 in 1991a) sta v svojih raziskavah ugotovila, da je za doseg optimalne (značilne) barve razsoljenega mesa, k mesu z višjo vsebnostjo mioglobina potrebno dodati odgovarjajočo večjo količino CCMP-ja (preglednica 8). Tako je potrebno količino dodanega CCMP-ja prilagoditi vsebnosti mišičnega pigmenta v mesu. Shahidi in Pegg (1990) sta ugotovila, da je CCMP nestabilen na svetlobi in v prisotnosti kisika, popolnoma stabilen pa je pri nadtlaku NO. Ker so sintezo CCMP-ja izpeljali v odsotnosti nitrita, je bila možnost nastanka rezidualnega nitrita in s tem kancerogenih N-nitrozaminov izključena.

Preglednica 7 Instrumentalna analiza barve izdelkov z dodatkom določene količine NaNO₂ in CCMP-ja (Shahidi in Pegg, 1990).

Table 7 The instrumental analysis of the colour of the product with the added quantity of NaNO₂ and CCMP (Shahidi and Pegg, 1990).

vzorec	dodatek	vrednost L [*]	vrednost a [*]	vrednost b [*]
1	NaNO ₂ , 25 ppm	58,7	12,4	8,7
2	NaNO ₂ , 50 ppm	58,5	12,7	8,7
3	NaNO ₂ , 156 ppm	58,2	13,3	8,6
4	CCMP, 12 ppm	57,4	13,2	8,7
5	CCMP, 18 ppm	57,1	13,5	8,4
6	CCMP, 24 ppm	56,5	13,8	8,4

Preglednica 8 Vsebnost pigmenta in dodanega CCMP-ja glede na vrsto mesa (Shahidi in Pegg, 1991).

Table 8 The content of pigment and added CCMP with respect to the kind of meat (Shahidi and Pegg, 1991).

vrsta mesa	pigment (mg/g)	CCMP (mg/kg)
svinjina	1,2	8,0
jagnjetina	2,1	12,0
govedina	4,5	36,0
piščančja prsa	0,4	6,0

V naslednji raziskavi so proučevali barvo različnih vrst mesa (goveje, piščančje, ovčje, prašičje, tjujenje, polenovka) z različnimi dodatki CCMP-ja in nitrita. Vrednost L^{*}, a^{*} in b^{*} mesa, tretiranega s CCMP-jem so bile odvisne od vsebnosti mioglobina kot tudi od količine dodanega CCMP-ja. Če se za izdelavo mesnih emulzij uporabi velik delež govejega mesa ali kakšnega drugega mesa z relativno visoko vsebnostjo mioglobina (preglednica 9), je lahko barva dodanega alternativnega pigmenta prekrita z naravnimi rjavimi pigmenti toplotno obdelanega mesa. To je posledica tega, ker je CCMP primarno barvni dodatek in ne konvertira mioglobina v pigment razsoljenega mesa, kot je to pri uporabi nitrita. Namesto tega mora CCMP prekriti barvo kuhanega nerazsoljenega mesa, da lahko končnemu izdelku zagotovi barvo razsoljenega mesa. Prav zaradi tega je CCMP primeren za izdelavo klobas oziroma izdelkov, ki vsebujejo v glavnem meso z malo mioglobina, kot je piščančje, puranje, prašičje in ribje (Rubin in sod., 1992; Stevanović in sod., 1997 in 2000; Stevanović, 1998; Pejkovski, 2000; Pegg in sod., 2000).

Pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) je možno izdelati tudi iz hemina, izoliranega iz mehansko separiranega mesa tjuinov, ki je bogat vir hemoproteinov. Tako sintetiziran CCMP so dodali k različnim vrstam mesa (prašičje, goveje in tjujenje) (preglednica 9). Vrednosti L^{*}, a^{*} in b^{*} se niso razlikovale od odgovarjajočih, tretiranih z nitritom (Stevanović, 1998).

V celih kosih mesa, kot je npr. šunka, je težko doseči enakomerno porazdelitev dodanega CCMP-ja. To je posledica le delne topnosti CCMP-ja v vodi oziroma razsolici in kompleksne strukture mesa oziroma perimizija – mišične ovojnice, ki predstavlja glavno oviro za transport CCMP-ja v notranjost kosa mesa. Ta problem je uspelo znanstvenikom

premagati s skrbno kontrolo velikosti delcev vgrajenega pigmenta, s spremenjenim načinom vbrizgavanja razsolice, gnetenjem kosov mesa pred in po vbrizgavanju razsolice in s kuhanjem v vodni kopeli v hermetično zaprtih vrečah (Stevanović, 1998).

V nedavnih študijah toplotno obdelanega razsoljenega mesa so raziskovalci dokazali, da je pigment, ki se tvori v toplotno obdelanem razsoljenem mesu po kemični strukturi identičen sintetiziranemu CCMP-ju, torej mononitrozomiokromogenu (Stevanović, 1998) (slika 20).

Preglednica 9 Vsebnost skupnega hemoprotein pigmenta v posameznih vrstah in oblikah mesa in potreben dodatek pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) z namenom doseči rožnato barvo živila (Pegg in Shahidi, 2000).

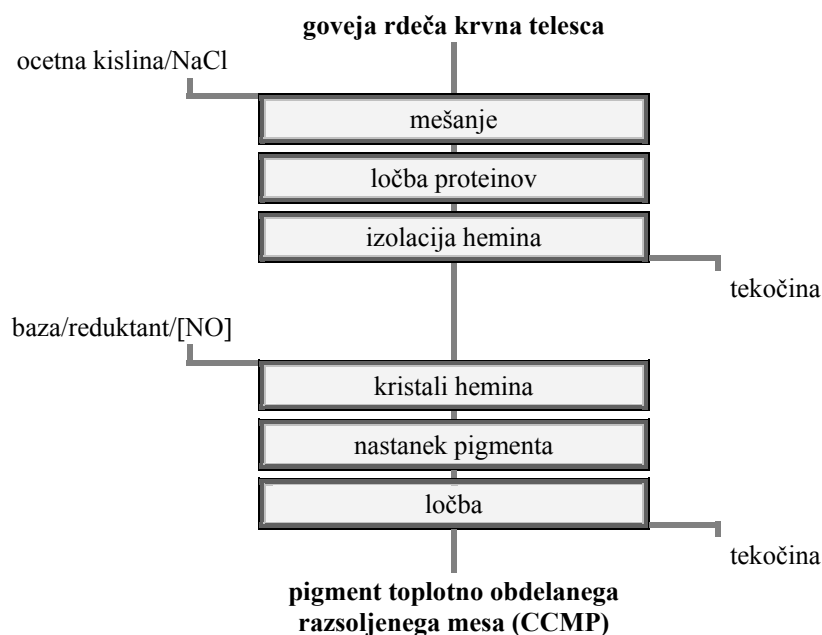
Table 9 The content of total hemoprotein pigment in certain kinds and shapes of meat and the necessary addition of pigment to the cooked cured meat (CCMP) with the aim to achieve a deep purplish red colour of the meat product (Pegg and Shahidi, 2000).

vrsta	skupni pigment (mg Mb eq/g)	CCMP (mg/kg)
svinjina	1,2	8,0
jagnjetina	2,1	12,0
govedina	4,5	36,0
tjulen	59,0	48,0
surimi (tjulen)	19,3	24,0
piščančje prsi	0,4	6,0
mehansko odkoščeno piščančje meso	1,0	12,0
surimi (polenovka)	0,0	0,0

Vsi primeri vsebujejo 20 % (w/w) destilirane vode in 550 mg/kg natrijevega askorbata. Skupni pigment je bil določen po metodi Rickansrud in Henrickson (1967) in je podan kot mg mioglobina ekvivalenta na gram živila.

Kumperger (1997) je v diplomski nalogi ugotovil, da se pri koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz svinjine (bela vrsta mišic) razvije primeren odtенок barve pri dodatku CCMP-ja sintetiziranega iz 60 mg hemina, pri koagulatih iz rdečih vrst mišic pa niti dodatek CCMP, ki je bil pripravljen iz 120 mg hemina ni zagotovil ustrezne barve. Z dodatkom CCMP niso dosegli zelene arome razsoljenega mesa. Koagulati z dodatkom CCMP so vsebovali zanemarljivo malo rezidualnega nitrita. Z določenim dodatkom CCMP-ja lahko pri koagulatih, pripravljenih iz belih mišic praktično nadomestimo nitrit. Povišanje vsebnosti CCMP-ja vodi k potemnenju izdelka (nižja vrednost L^*) in k nastanku bolj rdečkaste barve (višja vrednost a^*). CCMP se kaže s stališča razvoja primerne barve kot možna, zdravju prijazna alternativa za nitrit.

Raziskovanja številnih avtorjev so tako šla v smer iskanja takega dodatka, ki razvije približno enako barvo kot nitrit, a nima stranskega učinka, to je tvorbe kancerogenih nitrozaminov. In to pigment toplotno obdelanega mesa (CCMP) nedvomno je.



Slika 20 Priprava pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) iz hemina izoliranega iz govejih rdečih krvnih celic (Pegg in Shahidi, 1997 in 2000).

Figure 20 The preparation of the thermally-processed/cooked cured meat pigment (CCMP) prepared from hemin isolated prepared from the bovine red blood cells (Pegg and Shahidi, 1997 and 2000).

2.5.1 Antioksidativni učinek CCMP-ja

Številne raziskave so pokazale, da ima CCMP v modelnih mesnih sistemih slabše antioksidativne lastnosti kot nitrit (Shahidi in Pegg, 1993a). Z raziskavami vpliva dodatka CCMP na TBK vrednosti so Rubin in sod. (1985) ugotovili, da ima CCMP antioksidativne lastnosti, in sicer večje pri višjem dodatku. Antioksidativna aktivnost CCMP-ja pri dodatku 18-24 ppm je podobna tisti s 25 ppm NaNO₂. Če so mesnim sistemom dodali poleg pigmenta še sol, sladkor, askorbat in Na-tripolifosfat, so bile TBK vrednosti po petih tednih skladiščenja 3-krat manjše oziroma take kot v mesnih sistemih, obdelanih s 150 ppm nitrita.

CCMP, dodan v kuhano zmleto prašičje meso, je kazal antioksidativne lastnosti, ki so se povečevale z višjim dodatkom: pri dodatku 18-24 ppm je CCMP izkazal boljši antioksidativni učinek kot dodatek 200 ppm tokoferola (Shahidi in sod., 1987).

Dodatek 12 mg CCMP-ja in 550 mg Na-askorbata na kg mesa je imel tak antioksidativen učinek kot 50 mg Na-nitrita/kg mesa. Dodatek tripolifosfata k tej kombinaciji (CCMP in Na-askorbat) je še povečal oksidativno stabilnost (Shahidi, 1991).

Mehanizem, s katerim CCMP deluje kot antioksidant, ni znan. Možno je, da spojine železovega porfirina z NO delujejo v prvih stopnjah reakcije in vežejo proste radikale in tako inhibirajo oksidacijo lipidov (Shahidi in sod., 1987).

2.5.2 Stabilizacija CCMP-ja

V industrijski proizvodnji se izdelan pigment CCMP nikjer na svetu še ne uporablja, zato so za razvoj praktičnega postopka, primerne za komercialno uporabo potrebne še dodatne raziskave (Shahidi in Pegg, 1993). Največjo oviro pri tem predstavlja problem stabilnosti samega pigmenta, saj je izjemno občutljiv na svetlobo in kisik.

Številni raziskovalci so poskušali CCMP stabilizirati s pomočjo fluorescentne svetlobe (Pegg in Shahidi, 1989), γ -žarkov (Shahidi in sod., 1991), prenasičene raztopine NO, ki je vsebovala 2 % askorbinsko kislino (Shahidi in sod., 1982; Shahidi in Pegg, 1990) in s pomočjo inkapsulacije (Shahidi in Pegg, 1991b in 1993; O'Boyle in sod., 1991 in 1992) z različnimi ogljikovimi hidrati. Med testiranimi materiali za inkapsulacijo so β -ciklodekstrin, N-LOK (modificiran škrob) in Maltrin M-250 (maltodekstrin) dali najboljše rezultate. Dodatek 30-40 ppm tako inkapsuliranega pigmenta je mesnim sistemom oblikoval barvo, ki se ni razlikovala od mesnih sistemov, obdelanih z nitritom ali tistih z dodatkom 12 ppm sveže pripravljene CCMP-ja. V hladilniku ($T = 2-4^{\circ}\text{C}$) je tako inkapsuliran pigment ostal stabilen 18 mesecev. Delci pigmenta morajo biti pred inkapsulacijo čim manjši in kar se da enake velikosti (okoli $2\ \mu$), v primeru da je pigment namenjen za vbrizgavanje v cele kose mesa (Rubin in sod., 1992). Najbolj primerna tehnika za inkapsulacijo je razprševalno sušenje ("spray drying") (O'Boyle in sod., 1992; Shahidi in Pegg, 1993). Stabiliziran posušen CCMP so skladiščili v vakuumu v temnih kontejnerjih (Shahidi in Pegg, 1993 in 1993a).

2.6 MESNE EMULZIJE

Po Pravilniku o kakovosti mesnih izdelkov, popravku in spremembah (2004, 2005, 2006) ter Pravilniku o kakovosti perutninskih mesnih izdelkov (2005) je mesna emulzija homogena zmes, pridobljena iz mesnega testa z dodatkom vode in mastnine (tudi rastlinske maščobe ali olja) med homogenizacijo v kutru ali kako drugače. Beljakovine mesa imajo osnovno vlogo emulgatorjev, lahko pa se dodajajo tudi drugi emulgatorji živalskega, rastlinskega ali anorganskega izvora (mlečne, jajčne, sojine, kvasne beljakovine in ostala sredstva za vezanje vode).

Po klasični definiciji je emulzija grobo disperzni sistem tekoče/tekoče, sestavljen iz dveh, med seboj nemešljivih tekočin, pri katerih je ena dispergirana v drugi (prva – disperzni medij, disperzna faza oziroma interna ali diskontinuirna faza, ki je voda in v njej raztopljen snovi; druga – disperzno sredstvo ali eksterna, kontinuirna faza, ki je maščoba) v obliki finih kapljic, ki so sferične oblike. Celotni sistem se opiše kot koloidni sistem.

Lastnosti koloidnega sistema so v veliki meri odvisne od lastnosti kontinuirne faze in od deleža te faze v disperzni fazi. Koloidna raztopina je po navadi imenovana "sól" in vsebuje delce, ki so sestavljeni iz posameznih velikih molekul ali skupin majhnih molekul, katerih

velikost je med velikostjo majhnih molekul in velikostjo vidnih delcev. Vse vrste koloidnih sistemov so podobne sólom in vsebujejo dve različni fazi, kjer disperzna faza vsebuje delce premera, ki je ponavadi večji od $0,1\mu\text{m}$. Disperzna faza je lahko trdna, tekoča ali plinasta, vendar so v vsakem primeru lastnosti koloidnega sistema odvisne od zunanje površine disperzne faze (Karas, 1999).

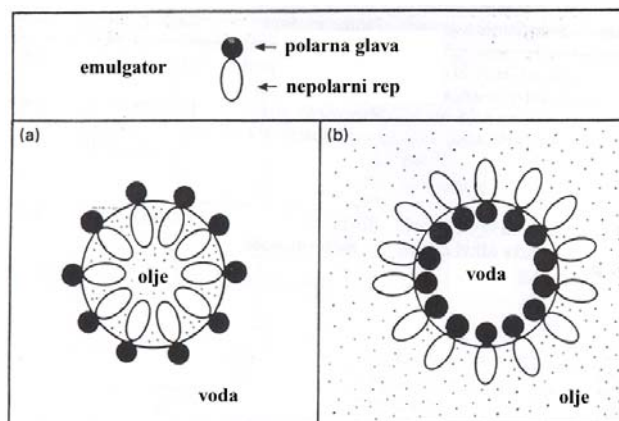
Na drugi strani pa trdne snovi, dispergirane v tekoči fazi označujemo kot suspenzije. Glede na ti dve definiciji takoimenovane "mesne emulzije" niso prave emulzije, zato bi bilo bolje, če bi jih označili kot mesne suspenzije. Dejansko so vse mesne emulzije sestavljene iz večfaznih sistemov, v katerih je kontinuirna faza (imenovana matriks) kompleksna koloidna vodna raztopina soli in v vodi topnih proteinov. Trdne sestavine kot so v vodi netopni proteini, maščobne kapljice, druge netopne sestavine mišičnega tkiva in začimbe so dispergirane in imobilizirane v matriksu (Kretzschmar, 1992).

Kontinuitna faza – matriks je v primeru mesne emulzije vodna raztopina soli in beljakovin in hkrati tudi medij, v katerem so razpršene tudi netopne beljakovine in drugi delci mišičnega tkiva ter delci vezivnega tkiva. Če je v matriksu razpršena maščoba v obliki drobnih delcev nastane večfazni sistem, v tehnologiji poznan kot mesna emulzija.

Ko se pri proizvodnji barjenega programa mesnin, mesnemu testu (homogenizirano meso), pripravljene v kutru doda razdeto mastnino (slanino ali rastlinsko olje), druge komponente (svinjske kožice, krvna plazma idr.), vodo ali led, aditive in začimbe ter se z razdevanjem nadaljuje, se razdenejo maščobne kapljice in osvobodene kapljice maščobe dispergirajo po mesnem testu. Mesne beljakovine, raztopljene v solni raztopini, oblikujejo okrog maščobnih kapljic membrane, ki preprečujejo konfluiranje oziroma združevanje kapljic v večje kaplje in ločevanje iz sistema. Pri tem lahko mišična vlakna povsem izginejo, kar povzroči močno spremembo strukture mesa. Ostali del miofibrilarnih beljakovin ustrezno nabrekne in z drugimi beljakovinami tvori matriks. V membranah so beljakovinske molekule orientirane tako, da je polarni del v stiku z vodo, nepolarni pa z maščobo. Na topnost v raztopini soli topnih beljakovin in po tej poti na emulgativno moč vplivajo vrednost pH, ionska jakost, trajanje sekljanja mišičnine in temperatura (Plestenjak, 1983).

Mesni proteini se zaradi narave aminokislinskih stranskih verig (nekateri od njih so lipofilni, drugi hidrofilni) kažejo kot pravi – naravni emulgatorji (Kretzschmar, 1992) (slika 21). Na splošno v emulzijah na površini ene in druge nemešljive tekočine obstaja površinska napetost, ki deluje v smeri ločevanja sistema. Če so v neki emulziji površine zelo velike, je s tem velika tudi površinska napetost, kar pomeni, da je za oblikovanje emulzije potrebno mnogo energije. Čim večja je površinska napetost, več energije je potrebno in večja je težnja delov emulzije proces obrniti nazaj, to je destabilizirati emulzijo. Emulgatorji so površinsko aktivne snovi, ki zmanjšajo površinsko napetost in tako olajšajo nastanek emulzije, oziroma emulzijo stabilizirajo (Wilson, 1981). Poglavitna emulgatorja v mesni emulziji sta v raztopini soli topni beljakovini aktin in miozin. Emulgivno sposobnost kaže predvsem miozin, medtem ko v vodi topne beljakovine sarkoplazme in netopne beljakovine vezivnega tkiva delujejo emulgivno zelo omejeno. Koagulirane beljakovine nimajo emulgivne sposobnosti. Mesna emulzija je osnova za barjene klobase (Bučar in sod., 1989).

Aktin in miozin sta strukturni, nitasti beljakovini mišičnega vlakna, oviti z nežno vezivnotkivno membrano – sarkolemo. Dokler je ta membrana nedotaknjena, sta beljakovini sposobni vezati le nativno vodo v mišični celici in zelo malo ali nič dodane vode. Zato je potrebno sarkolemo poškodovati in sprostiti celično vsebino. Le tako odpuščeni fragmenti strukturnih beljakovin absorbirajo dodano vodo, nabreknejo in oblikujejo mrežo proteinskega gela.



Slika 21 Shematska predstavitev emulgatorja s hidrofilnim (polarna glava) in hidrofobnim delom. (a) Orientiranost molekul emulgatorja, ki so adsorbirane na oljno kapljico v oljno-vodni emulziji (b) orientiranost v vodno-oljni emulziji (Clark, 1993).

Figure 21 A schematic presentation of emulgator with a hydrophile (polar head) and a hydrophobe section. (a) The orientation of the molecules of the emulgator, which are adsorbed on the oil droplet in oil-water emulsion (b) the orientation in the water-oil emulsion (Clark, 1993).

2.6.1 Potek oblikovanja emulzije

Za stabilno mesno emulzijo je temeljno raztopiti del miofibrilarnih beljakovin – emulgatorjev. To se doseže s homogeniziranjem pustega mesa v kutru ob dodajanju vode in kuhinjske soli. Ko je pusto meso do neke mere že razdeto, se doda še mastnina. Med nadaljnim razdevanjem se del beljakovin raztopi v raztopini soli. Te beljakovine ovijejo mastne kapljice in oblikujejo okrog njih nekakšno kapsulo. Ostali del beljakovin nabrekne in z drugimi beljakovinami mišic oblikuje tako imenovani matriks. V tem trenutku je emulzija stabilizirana, kasneje med toplotno obdelavo pa membrane in matriks koagulirajo.

Potrebno je pravilno razmerje med beljakovinami, maščobo in vodo, da med toplotno obdelavo ne pride do izločanja sestavin. V kolikor je proteinski film pretanek ali predelek za vgrajevanje maščobe, se med segrevanjem pretrga. Ujeti mastni delci se sprostijo in zlivajo v večje kapljice, kar se konča z izcejo maščobe. Zato je izrednega pomena zadostna sprostitev aktomiozina iz puste mišičnine (Wirth, 1985).

Za emulzijski sistem obstajata dva pogoja: premer kapljic mora biti manjši od 10 µm in delci morajo biti enakomerno razporejeni v beljakovinskem matriksu.

2.6.1.1 Razdevanje mesa

2.6.1.1.1 Sekljanje

Pod sekljanjem mesa razumemo vse postopke oziroma stopnje razdevanja, po katerih so koščki mesa tolikšni, da jih je mogoče vizualno razločevati ali pod mikroskopom pri manjših povečavah razpoznati vlakna. Med sekljanjem v strojih se prerežejo mišična vlakna in iz njih se izliva njihova vsebina. Beljakovine miofibril postanejo bolj dostopne.

2.6.1.1.2 Homogeniziranje

Postopek, pri katerem delci mesa niso več vidni in zgradba mesa pod mikroskopom ni več razpoznavna, imenujemo homogeniziranje. Takšen proces je mogoč le ob nizki temperaturi, torej ob dodajanju vode oziroma ledu.

Ko pusto meso razdevamo v kutru, kjer pride do porušanja mikrostrukture mesa, se pojavi ob dodajanju ledu in kuhinjske soli nabrekanje miofilamentov. V raztopini soli topni beljakovini aktin in miozin preideta v raztopino oziroma ju le-ta ekstrahira iz ostale homogenizirane mišičnine. Tako se oblikuje mesno testo, polizdelek, s sposobnostjo zlepljanja presnih kosov mesa (Bučar in sod., 1989).

Na stiku površine nožev in mesa pride do trenja in s tem do dvigovanja temperature emulzije, kar povzroči denaturacijo mesnih beljakovin. V praksi se pazi, da temperatura nadeva ne prekorači 12 °C. Stroj mora biti pravilno nastavljen, surovine morajo imeti čim nižjo temperaturo, doda se lahko voda v obliki ledu, da se ne dviguje temperatura emulzije. Če se masa pregreje lahko pride do porušanja homogenosti same emulzije, izdelek je lahko pokvarjen.

Pri izdelovanju mesnih emulzij mora biti tako optimalna stopnja razdetosti in optimalna končna temperatura. Ta dva parametra v enaki meri vplivata na stabilnost mesnih emulzij. Vsak stroj za emulgiranje (kuter, pretočni kuter, koloidni mlin) ima lasten optimum glede trajanja emulgiranja in končne temperature za največjo stabilnost emulzije. Hitrejši stroji ponavadi dajejo stabilne emulzije v nižjem temperaturnem območju, ker je proces sekljanja hitrejši.

2.6.1.1.3 Razdevanje v vakuumu

Prisotnost zraka (kisika) v mesnih emulzijah povzroča nezaželjene kemijske reakcije, ki negativno vplivajo na kakovost končnega izdelka.

V mesnih emulzijah povzroča zrak naslednje spremembe:

- poslabšanje barve zaradi tvorbe metmioglobina (preveč blede, sivkasta barva, slaba obstojnost barve),
- napake v aromi (postana, žarka aroma),
- napake v teksturi (rahla, mehka tekstura),
- pretirana luknjičavost na prerezu mesne emulzije.

Škodljiv vpliv kisika lahko zmanjšamo z uporabo vakuumskega kutra. Tako se v mesne emulzije vnese manj zraka, zato emulzije postanejo bolj čvrste in goste. Mesne emulzije

izdelane v vakuumskem kutru imajo boljšo aromo, hitreje se razvije bolj značilna in enakomerna barva razsoljenega mesa in obstojnost barve je boljša.

Izboljšanje arome in okusa pripisujejo maščobam, ki so zaščitene pred hitrimi oksidativnimi spremembami, hitrejši razvoj barve pa bolj učinkoviti uporabi NO, ki nastane iz nitrita, ko je delno odstranjen kisik, ki prav tako "tekmuje" za NO. Vakuumski postopek sekljanja torej omogoča uporabo manjših količin nitrita za oblikovanje željene barve končnega proizvoda (Stevanović, 1993).

Temperatura mesnih emulzij je v proizvodnji hrenovk zelo pomemben parameter, saj je merjenje le-te med obdelavo v kutru še vedno edini način nadzora strukture mesnih emulzij. Za maksimalno stabilnost emulzije se priporoča pred dodajanjem maščobe (živalskega ali rastlinskega izvora) najnižja temperatura mesne gmote 3 °C in najvišja 11 °C. Končna temperatura emulzije naj znaša od 10 do 16 °C (Bučar in sod., 1989). Višje temperature bi namreč povzročile denaturacijo beljakovin in s tem negativne posledice v smislu oblikovanja filmov, ki obkrožajo kapljice masti in ločbo maščobe iz emulzije.

V tradicionalni proizvodnji hrenovk je čas mehanske obdelave prekratek, da se zrahlja matriks, ki vsebuje veliko pustega mesa. To povzroči primanjkljaj maščobe, ki bi zrahljal emulzijo. Če vzamemo večjo količino svežega mesa, se čas mehanske obdelave skrajša. Hkrati lahko presežemo dovoljeno končno temperaturo, kar lahko povzroči delno denaturacijo beljakovin in posledično nestabilno mesno emulzijo. Z uporabo zmrznjenega mesa se temu izognemo, ker s tem podaljšamo čas mehanske obdelave in ne presežemo dovoljene končne temperature emulzije (Brauer, 1993).

2.6.2 Toplotna obdelava mesne emulzije

2.6.2.1 Namen toplotne obdelave

Toplotna obdelava emulzij je po Stevanović (1993) potrebna za:

- koagulacijo in oblikovanje značilne proteinske strukture,
- uničenje mikroorganizmov,
- inaktivacijo encimov,
- oblikovanje zaželenih senzoričnih lastnosti (barve, arome, teksture).

Na dobit priprave, teksturo, barvo in mikrobiološko varnost emulzij pomembno vpliva vrsta toplotnega postopka, relativna vlažnost, hitrost segrevanja in končna središčna temperatura v izdelku.

Pri mesnih emulzijah obstaja problem, da je na eni strani visoka temperatura potrebna za mikrobiološko varnost izdelka, na drugi strani pa začne mesna emulzija želirati že nad 74 °C. Tako se mora v izdelku iz mesne emulzije doseči središčna temperatura med 72 in 74 °C (Hoogenkamp, 1989).

Izbira pravilne toplotne obdelave (barjenja) vpliva na kakovost in stroške proizvodnje. Počasno segrevanje se veliko uporablja v mesni industriji, da se izboljša mehkooba mesa in zmanjša izguba mase toplotne obdelave. Sposobnost vezave vode in maščobe je odvisna od stopnje toplotne obdelave. Ugotovili so, da počasno segrevanje ustvari med beljakovinami

močnejše vezi in boljšo razporeditev molekul v tridimenzionalnem gelu. Takšna struktura omogoča dobre vezalne in teksturne lastnosti mesnih emulzij (Cofrades in sod., 1997).

2.6.2.2 Sprememba zgradbe razdetega mesa med toplotno obdelavo

V razdetem ali homogeniziranem soljenem mesu, ko je zgradba mesa bolj ali manj porušena, se oblikuje tridimenzionalna beljakovinska mreža, ki jo sestavljajo deli mišičnih vlaken in miofibril, raztopljene beljakovine, nabrekli filamenti in druge sestavine mesa. Zaradi tridimenzionalne mreže se volumen mase bistveno ne zmanjša, pod pogojem seveda, da se gmota ne osušuje (nepropustni ovitki, zmerna temperatura, vlažni postopki).

Voda, ki jo beljakovine odpuščajo med segrevanjem, ostane bolj ali manj ukleščena v tridimenzionalno mrežo koaguliranih beljakovin. Splošni izraz za tako tvorbo je koagulum (gel). Najznačilnejši mesni koagulum sta tvorbi, ki se oblikujeta med segrevanjem mesnega testa in mesne emulzije. To je stabilni ireverzibilni koagulat mesne emulzije, ki emulziji omogoči čvrsto, elastično teksturo primerno za kasnejše narezovanje (Bučar in sod., 1989).

2.6.3 Reakcije mišičnega barvila

Razsoljevanje je potrebno za nastanek termostabilnega pigmenta in primerne strukture ter arome mesa. V tehnološkem postopku moramo razsoljevati veliko izdelkov. To je postopek prepajanja izdelka z vodno raztopino razsola, ki poleg navadne soli (NaCl) vsebuje še nitrat ali nitrit. Brez dodatka soli ni razsoljenega mesa, ker le-ta da optimalen okus razsoljenega mesa. Sol vpliva na sposobnost za vezanje vode (2,5 % je najprimernejša koncentracija) in je konzervans (izdelku podaljša obstojnost, saj se zmanjša mikrobiološki kvar). Če izdelek samo solimo, je njegova barva po toplotni obdelavi sivkasta. Prav zaradi tega se v proizvodnji mesnih izdelkov dodaja nitrit, ki oblikuje ustrezno barvo izdelka.

Nitrit med razsoljevanjem povzroči oksidacijo železa v mioglobinu iz fero v feri obliko in nastane metmioglobin. Specifična rdeča barva razsoljenega mesa nastaja z vezanjem NO (po redukciji nitrata v dušikov monoksid) na železo hema. Pri nativnem mioglobinu se na prosto valenco železa veže voda. Nastanek nitrozomioglobina daje mesu svetlo rdečo ali svetlo rožnato barvo, količina le tega pa je odvisna od vsebnosti mioglobina, vrednosti pH ter prisotnosti raznih katalizatorjev in inhibitorjev. Del reaktivnega NO vstopa v reakcijo z drugimi komponentami v mesu, kot so beljakovine, karboksilne, tiolne in hidroksilne skupine. Del nitrata prehaja v plinsko fazo ali pa ostane v končnem izdelku kot rezidualni nitrit. Pod vplivom višjih temperatur se beljakovinska komponenta nitrozomioglobina denaturira v nitrozomiokromogen, ki ima prav tako rdečo barvo, vendar je termostabilnejši. Nitrozomiokromogen lahko nastane tudi pod vplivom drugih dejavnikov, ki povzročijo denaturacijo beljakovinske komponente nitrozomioglobina. Med oblikovanjem barve se ves prisoten nitrit ne veže na komponente mesa. Koliko NO se bo vezalo na mioglobin je odvisno od temperature. Med oblikovanjem barve lahko pride do neželenih procesov. Možen je nastanek različnih nians rdeče barve oziroma nastanek nezaželenih tipov pigmentov. Prav tako se lahko med razsoljevanjem, v prisotnosti večjih količin nitrata, pigmenti oksidirajo v metmioglobin. NO ne vstopa v reakcijo z metmioglobinom in se po

razsoljevanju ohrani, oziroma nastane neatraktivna rjava barva razsoljenega mesa, barva metmioglobina.

Nastanek metmioglobina lahko preprečimo z dodatkom reducentov, med katerimi največkrat uporabimo askorbate ali eritorbate, v zadnjem času predvsem askorbinsko kislino. Askorbati se uporabljajo v koncentraciji do 0,5 %, odvisno od vrste izdelka. Askorbinska kislina oziroma njena natrijeva sol stimulira razgradnjo nitrita in pospeši nastanek značilne rožnato rdeče barve razsoljenega mesa, pri tem barvo tudi fiksira, ker učinkuje kot reducent in omejuje pojav različnih diskoloracij (obarvanj). Vpliva tudi na vonj in okus izdelka. Z njenim dodatkom se zmanjša nevarnost tvorbe nitrozaminov (ki se oblikujejo pri vrednosti $\text{pH} = 3,5$), vendar pa askorbinska kislina ne vpliva na obstojnost izdelka. V izdelkih znižuje tudi količino rezidualnega (preostalega) nitrita (Archer, 1982; Hotchkiss in Cassens, 1987; Kumperger, 1997).

Vloga uporabljene kisline v tehnološkem postopku je, da:

- reducira metmioglobin v mioglobin,
- deoksigenira oksimioglobin v mioglobin,
- tvori več NO pigmenta,
- na prerezu izdelkov vzdržuje reduktivne razmere in poveča obstojnost barve,
- pospeši razsoljevanje,
- zmanjša oksidacijo lipidov,
- inhibira oblikovanje nitrozaminov.

Za nevtralizacijo okusa po soli in nitritih se v tovrstne izdelke lahko dodaja tudi kuhinjski sladkor. Z dodatkom sladkorja dosežemo enakomernjšo razporeditev soli v mesu. V primeru kratkotrajnega razsoljevanja, ki traja samo nekaj ur in ga s pridom uporabljamo za proizvodnjo barjenih klobas, je v primeru uporabe toplega mesa učinek hidratacije boljši, če pa je bilo meso hladno, je bilo potrebno dodati polifosfate za izboljšanje sposobnosti mesa za vezanje vode (SVV), s pomočjo katerih dobimo boljšo lepljivost mase in nato tudi končnega izdelka. Sladkor pospeši razsoljevanje in izboljša barvo ter okus mesnega izdelka.

Natrijev kislil pirofosfat se lahko dodaja v koncentracijah do 0,5 %, zato da pospeši proces razsoljevanja mesnih emulzij, obenem pa rahlo zniža vrednost pH in s tem poveča kislost nadeva (od 0,2 do 0,5 enote). Alkalni polifosfati (natrijev tripolifosfat, natrijev heksametafosfat, tetranatrijev pirofosfat) se dodajajo v količini do 0,5 % za izboljšanje SVV, povečanje emulzijske sposobnosti miofibrilarnih beljakovin (v emulzijo lahko tako umešamo več maščob) in imajo antioksidativni učinek. Slaba stran dodatka polifosfatov v izdelek je ta, da v njem lahko puščajo trpek milnat priokus, v primeru prevelikega odmerka lahko emulzija postane preveč čvrsta, gumijasta. Pri uporabi surovine dobre kakovosti je uporaba polifosfatov neprimerna, saj so beljakovine zadosti dober emulgator. Fosfati zaustavijo ali upočasnijo razmnoževanje mikroorganizmov, kar je verjetno posledica nastanka spojin z večvalentnimi kovinskimi ioni (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}), ki jih pozneje primanjkuje za metabolizem bakterij. Če se ob polifosfatih dodajajo še askorbati, delujejo ti askorbati kot sinergisti (ojačajo antioksidativni učinek samega polifosfata) (Shahidi in Pegg, 1992 in 1993a).

2.6.4 Dejavniki oblikovanja barve mesne emulzije

2.6.4.1 Podtlak

Pri pripravi mesne emulzije je potrebno upoštevati škodljiv vpliv kisika na barvo in obstojnost barve pri barjenih klobasah (Wirth, 1985). Med pripravo emulzije s sekljanjem in mešanjem se v maso vnese precej zraka in s tem kisika. V mikroskopsko drobno, peneco maso beljakovin se vključijo tudi drobci masti in zračni mehurčki. Med segrevanjem se masa strdi in primešan zrak ostane ujet v koagulirani beljakovinski mreži. Pri kontaktu kisika z vsebino in s tem tudi z mišičnim in krvnim barvilom pride do intenzivnih kemijskih reakcij in možnost za nastanek metmioglobina je izredno velika. Pri proizvodnji barjenih klobas imamo različne možnosti uporabe vakuuma, in sicer pri: mletju surovine, mešanju surovine, polnjenju nadeva v ovitke in pakiranju končnih izdelkov.

Tako proizvedene barjene klobase imajo bolj intenzivno in obstojno rožnato-rdečo barvo. Slaba stran vakuumskega sekljanja pa je, da odstranitev zraka povzroči zgoščevanje mase in s tem zmanjšanje volumna oziroma bolj zbito (kompaktno) teksturo emulzije.

2.6.4.2 Temperatura in čas toplotne obdelave

Kot vse kemijske reakcije so tudi reakcije sestavin razsola z mioglobinom oziroma hemoglobinom odvisne od časa in temperature. Pri današnji proizvodnji so pogosto proizvodne faze racionalizirane in pospešene. Posledica tega je lahko slabo razvita barva. Vzrok je navadno prekratko časovno delovanje toplote, ki ne zadostuje za razvoj barve. Temperatura in čas toplotne obdelave sta drug od drugega odvisna, kar pomeni, čim nižja je temperatura procesa, toliko daljši mora biti čas učinkovanja.

Iz preglednice 10 je razvidno, da se razvije intenzivna roza barva pri toplotni obdelavi pri 70 °C šele po 110-ih minutah, medtem ko se intenzivna roza barva pri 75 °C razvije po 90-ih minutah. Vzrok pomanjkljive barve ali slabše obstojnosti barve barjenih klobas je pogosto nezadosten reakcijski čas za optimalno tvorbo barve. V tem primeru je potrebna povišana temperatura toplotne obdelave ali pa podaljšan čas, če ostane temperatura enaka.

Preglednica 10 Oblikovanje barve barjenih klobas v odvisnosti od temperature in časa toplotne obdelave (Wirth, 1985).

Table 10 The formation of colour of boiled sausages in relation to the temperature and length of thermal processing (Wirth, 1985).

T/t	70 °C	75 °C	80 °C	100 °C	110 °C
15'	zelena	zelena	šibka roza	svetla roza	roza
30'	zelena	šibka roza	svetla roza	roza	temna roza
45'	zelena	šibka roza	roza	močna roza	
60'	šibka roza	svetla roza	roza		
75'	svetla roza	roza	močna roza		
90'	roza	močna roza			
110'	močna roza				

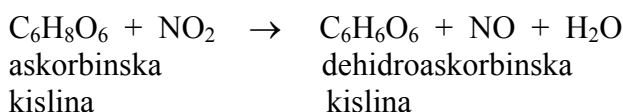
2.6.4.3 Vrednost pH

Razpad nitrita do dušikovega oksida, ki reagira z mioglobinom, je zelo pomembno odvisen od vrednosti pH nadeva. Reakcija poteka toliko bolj intenzivno, čim nižja je vrednost pH. Sveži nadev barjenih klobas ima vrednost pH med 5,8 in 6,1. Pri uporabi bazičnih ali šibko kislih dodatkov se lahko vrednost pH dvigne do 6,3 in višje. Kot optimum za zadovoljivo razgradnjo nitrita v mesnih izdelkih velja vrednost pH pod 5,7. Barjene klobase potemtakem niso v optimalnem področju vrednosti pH glede tvorbe dušikovega oksida in s tem tvorbe barve (Belovič, 1995).

Zniževanje vrednosti pH barjenim klobasam je možno z dodatkom kislin in njihovih soli (mlečna, citronska) ali glukono-delta-laktona (GDL). Z zniževanjem vrednosti pH se izboljša tvorba barve, sposobnost za vezanje vode pa se poslabša. Zaradi tega je potrebno iskati tehnološke kompromise.

2.6.4.4 Pomožne snovi za razsoljevanje

Najučinkovitejša za tvorbo in stabilizacijo barve barjenih klobas sta askorbinska kislina in natrijev askorbat ob dodatku 0,003-0,05 % (Belovič, 1995). Pri previsokem odmerku lahko opazimo celo škodljive reakcije (pozelenitev, lužnat okus). Askorbinska kislina je učinkovito redukcijsko sredstvo, ki iz dušikovega dioksida sprošča dušikov oksid:



S povečano količino dušikovega oksida se pospeši sprememba mioglobina v nitrozomioglobin. En del nastalega dušikovega oksida se zaradi prisotnosti kisika takoj spremeni v nitrat in je za nastanek barve neuporaben. Ta povečana tvorba nitrata se kaže tudi v višjem deležu preostanka nitrita in nitrata v določenih barjenih klobasah. Istočasno askorbinska kislina spremeni redoks potencial in prepreči poselitve na površini konzerviranih barjenih klobas (Belovič, 1995).

Pri barjenih klobasah, ki vsebujejo dovolj vode in imajo le majhno pufersko kapaciteto, je uporaba kislin, ki znižujejo vrednost pH, problematična zaradi pričakovane izgube SVV. Uporaba natrijevega askorbata v količini 0,05-0,07 % je smotrna. Senzorično so proizvodi z uporabo askorbinske kisline boljše ocenjeni, kot tisti z dodatkom natrijevega askorbata. Pri barjenih klobasah z mnogo mesa je raba kislin, ki znižujejo vrednost pH do 5,8 smotrna, za kar je potrebno cca. 0,1 % citronske ali mlečne kisline oziroma 0,3 % GDL (Belovič, 1995).

2.6.4.5 Drugi dejavniki, ki vplivajo na nastanek in stabilnost barve

V barjenih klobasah so prisotne tudi druge snovi, ki zmanjšajo intenzivnost rdeče barve. V prvi vrsti sta to razdeta maščoba in koža. Tudi voda ima razredčevalni učinek in zmanjšuje intenzivnost barve.

Pomanjkljivost pri razsoljenih barjenih klobasah je mogoče pripisati nekaterim vzrokom, ki učinkujejo v medsebojni povezanosti in odvisnosti:

- premalo mioglobina (količina in vrsta mesa),
- prekratek čas reakcije (temperatura, čas),
- preveč kisika (mletje, pakiranje, skladiščenje),
- brez ali premalo pomožnih snovi za razsoljevanje (askorbinska kislina, askorbat...),
- premalo razsolnih snovi.

2.6.5 Tehnološki postopek izdelovanja barjenih klobas

Kot barjene klobase, ki spadajo v skupino pasteriziranih mesnin, se po Pravilniku o kakovosti mesnih izdelkov (2004) označijo izdelki proizvedeni iz mesne emulzije in drugih sestavin živalskega izvora ter dodatnih surovin, ki so polnjeni v naravne ali umetne ovitke. Za izdelke kot so hrenovka, posebna in pariška klobasa Pravilnik predpisuje najmanj 8 % mišičnih beljakovin (brez beljakovin veziva) in največ 30 % maščob. Meso za proizvodnjo barjenih klobas se razsoli z dodatkom okrog 2 % nitritne soli, vendar ta količina soli in nitrita ni zadostna za uspešno znižanje vrednosti a_w in konzerviranje. Osnova izdelovanja vseh barjenih klobas je mesna emulzija, katere glavni del je mesno testo, ki ga dobimo s postopkom razdevanja. Med mehanskim razdevanjem strukture mesa se dodajajo aditivi, ki povzročijo topljenje miofibrilarnih beljakovin, tvorbo eksudata – lepka, ki zlasti po toplotni denaturaciji oblikuje matriks, ki sestavine nadeva med seboj povezuje. Na kakovost izdelka iz razdetega mesa vplivajo različni dejavniki:

- vrsta in kakovost surovine,
- uporabljeni aditivi,
- stopnja razdetosti samega tkiva.

Kot zelo pomemben dejavnik tvorbe dobre emulzije je vrednost pH mišičnine. Prav tako je pomembna SVV vrednost, kakor tudi razmerje med mišičnino in mastnino. Med aditivi uporabljamo razsol (NaCl, nitrit, sladkor, kisline) in sredstva za vezanje (polifosfati, jajčni beljak, brezmasno dehidrirano mleko, Na-kazeinat, sojine beljakovine, beljakovine kvasa). Čim višjo ima meso stopnjo razdetosti, tem večja je SVV mesa.

Iz zmlete surovine (mesa različnih vrst) in mastnine (maščob, ki so lahko živalskega ali rastlinskega izvora) se naredi mesno emulzijo s pomočjo razdevanja in mešanja v kutru. Temperatura med oblikovanjem emulzije ne sme preseči meje 19 °C (med razdevanjem moramo dodati vodo v obliki ledenega drobirja, če to ni dovolj je potrebno surovino predhodno namrzniti). Po oblikovanju emulzije sledi polnjenje viskoznega nadeva v ovitke s pomočjo ustreznih polnilnikov z določenim podtlakom (stopnja podtlaka je pomembna zaradi luknjičavosti, kakor tudi zaradi gumijaste teksture emulzije). Po polnjenju in frkanju ali sponkanju sledi faza počivanja, da nadev dozori. Temu sledi vroče prekajevanje (do 80 °C) – čas prekajevanja je odvisen od premera klobase. Po prekajevanju sledi postopek barjenja (vlažni postopek) do središčne temperature najmanj 70 °C (običajno 72 °C), nato se izdelek ohladi, čim bližje temperaturi 0 °C. Klobasa pripravljena na ta način je lahko obstojna tudi do enega meseca, če je temperatura skladiščenja pri temperaturi okoli 0 °C (Bučar in sod., 1989; Hoogenkamp, 1989).

2.7 SENZORIČNE IN INSTRUMENTALNE LASTNOSTI MESNIH EMULZIJ

Senzorična kakovost je ena ali pa je skupek večih lastnosti živil in hrane, ki jo merimo ali vrednotimo z enim ali več človeškimi čutili vida, tipa in okusa (Bučar in sod., 1989). Zajema lastnosti videza (barva, oblika, velikost, svetlost ...), teksture (mehkoba, sočnost, žvečljivost ...), vonja in okusa oziroma arome.

Vizualno zaznamo obliko, velikost, barvo, konzistenco ali teksturo, splošne podatke o izdelku in napake. Z okušanjem v ustih zaznamo značilnost, intenzivnost, polnost, harmoničnost okusov in možne napake. Aromo zaznamo med žvečenjem hrane v ustih kot skupen vtis vonjev, okusov in teksture.

S tipom (haptesteziya) in uporabo sile (kinesteziya) (s prsti in rokami, z ustnicami in v ustih pred in med žvečenjem hrane) zaznamo konzistenco tekočih živil in teksturo čvrstih živil.

2.7.1 Vizualne zaznave kakovosti mesne emulzije

Prvi vtis o kakovosti mesnega izdelka je pogled nanj in zato ima barva velik vpliv na sprejemljivost in je velikokrat celo odločilnega pomena (Skvarča, 2008). Barva je odvisna od vsebnosti pigmenta mioglobina, od oksidoredukcijskega stanja pigmenta in od strukture same mišice. Na količino mioglobina ter na barvo mesa pa vpliva vrsta živali, pri posamezni vrsti živali pa starost, spol, način krmljenja in izkoriščanje živali. Znotraj ene vrste živali vse mišice niso enake barve. Meso mlajših živali je svetlejše kot meso starejših. Barva mišic je odvisna tudi od njihove aktivnosti. Mišice, ki so za življenje bolj aktivne so bolj temne zaradi več pigmenta. Tudi stopnja zamaščenosti (marmoriranost) vpliva na barvo mesa. Mišičnina je svetlejše barve, če je marmorirana in obratno. Na odtenek barve vpliva tudi mikrostruktura mišičnine. Pri odprti mikrostrukturi mišičnine (BMW kakovost) je večina tekočine ekstracelularne in je meso svetlejše, zaradi večje refleksije svetlobe. Pri zaprti mikrostrukturi (TČS kakovost) je večina tekočine v celicah vezane na beljakovine (visoka vrednost pH) in medcelični prostori so majhni, zato se pri vpadu svetloba bolj absorbira in je meso temnejše. Na barvo vpliva tudi stopnja zasušenosti površine mesa ali mesnega izdelka (kar je odvisno od pogojev skladiščenja). Kadar površina izgubi določeno količino vode ter se zasuši, se koncentracija mioglobina poveča. Takšna površina postane tudi dokaj neravna in zato se reflektirana svetloba bolj razprši in zaradi tega izgleda meso ali izdelek temnejše barve (Rahelić, 1987). Barva je odvisna tudi od reaktivnega stanja mioglobina, od njegove stopnje denaturacije, kakor tudi od različnih zunanjih faktorjev (vpliv svetlobe, bakterij).

Monin in Ouali (1991) navajata, da je funkcija oziroma delovanje mišic najbolj očiten dejavnik za barvno razlikovanje med mišicami. Intenzivnost barve je odvisna od vsebnosti pigmenta in od mikrostrukture. Vsebnost pigmenta je v glavnem odvisna od funkcije mišic, mikrostruktura pa je v veliki meri odvisna od vrednosti pH. V določeni starosti je vsebnost pigmenta skoraj sorazmerna oksidativni aktivnosti.

Barva in izgled emulzije sta odvisna od uporabljene vrste mesa (npr. pri piščančjem mesu: bedra, prsi). Večina porabnikov ceni emulzijo z enakomerno smetanasto belo (belo meso prsi) oziroma rahlo svetlo rožnato (temno meso beder) barvo brez obarvanj (podplutbe in

krvavitve). V emulziji nikakor ne sme biti ostankov piščančje kože in tudi ne perja. Barva emulzij je tako lahko pokazatelj uporabljene vrste mišic pri proizvodnji. Mioglobin, ki daje barvo mesu, je v večji meri prisoten v rdečih, oksidativnih vlaknih; pri določeni starosti je vsebnost mioglobina tesno povezana z oksidativno aktivnostjo mišice. Višja vrednost pH in s tem manj odprta struktura ter hkrati večja vsebnost pigmenta v oksidativnih mišicah sta dejavnika, ki skupno določata barvo in s tem razlike v barvi med mišicami (Stevanović, 1993).

Barvo lahko določamo na različne načine: kemijsko z določanjem vsebnosti pigmenta mioglobina, senzorično z ocenjevanjem barve z različnimi lestvicami ali standardi in z instrumentalnim merjenjem barve: gre za merjenje odbojnosti svetlobe pri določeni valovni dolžini.

2.7.2 Dejavniki, ki vplivajo na barvo piščančjega mesa

Barva mesa zaklane živali je zelo značilna oznaka za njegovo kakovost. Poleg tega, da je to lastnost pasme, je odvisna še od drugih dejavnikov, kot so:

- količina podkožne masti (odvisna od energetske vrednosti krme),
- količina karotenoidov v krmi (karotenoidi obarvajo kožo rumeno; učinek barve se izrazi dva tedna po začetku krmljenja in preneha tri tedne po prekinitvi dodatka karotenoidov v krmo),
- mestnatost živali (slabo mesnate živali imajo temno rdeč do modrikast odtonek),
- uspešnost zakola (slaba izkrvavitev daje rdečo do modro obarvanost),
- postopek pri lovljenju in nakladanju živali (krvave podplutbe),
- stopnja svežosti (stari, slabo skladiščeni ali dalj časa odtajani piščanci so zelenkasti, najprej po trebuhu),
- temperatura v skladišču, ki močno niha ali pa temperatura vode pri postopku parjenja v klavnici, povzročata opekline na koži in slab izgled zaklane živali.

2.7.2.1 Senzorični deskriptorji za videz in barvo

Enakomernost barve

Na enakomernost barve razsoljenega mesa vplivajo številni dejavniki, zaradi tega prihaja večkrat do odstopanj, seveda odvisno tudi od vrste razsoljenega izdelka.

Značilnost in intenzivnost barve

Značilnost in intenzivnost barve sta senzorični lastnosti, ki ju je zelo težko ločiti, saj nanju vplivajo številni skupni faktorji (Chen, 1982; Đorđević, 1982). Ocenjujejo se nianse: svetlejša, temnejša barva in značilnost: tipična, netipična barva za določen izdelek.

Značilna in intenzivna barva razsoljenega mesa se oblikuje z dodatkom primerne količine nitrita oziroma nitrata. Nitrat običajno oblikuje nekoliko temnejšo barvo razsoljenega mesa, ki pa je obstojnejša. Pri uporabi nitrita je barva svetlejša, enakomernejša in se hitreje razvije.

Pri oblikovanju barve razsoljenega mesa nastajajo tudi številni prehodi in nianse pigmentov. Neznačilna barva se lahko razvije zaradi prisotnosti metmioglobina, neprimernih količin nitrita oziroma nitrata ali oksidacijskih procesov. K oblikovanju izrazite intenzivne barve razsoljenega mesa prispeva tudi dodatek sladkorja (Chen, 1982; Greenwood in sod., 1984).

Stabilnost barve

Stabilno barvo oblikuje dodatek nitrita, vendar stabilnost ni sorazmerna z zviševanjem koncentracije nitrita (Chen, 1982; Đorđević, 1982). Askorbinska kislina znižuje količino rezidualnega nitrita v končnem izdelku in izdelku oblikuje enakomernjšo ter stabilnejšo barvo (Sofos in Raharjo, 1995). Pogosta napaka je nestabilnost barve zaradi oksidacije. Inhibicija oksidacije nitrozomiokromogena je doseženo z dodatkom reducentov, izključitvijo zraka, svetlobe, prilagoditvijo vrednosti pH in dodatkom polifosfatov.

Videz nadeva na prerezu

Mesna emulzija ima lahko homogen prerez, brez vidnih koščkov veziva in brez luknjic ter diskoloracij ali nehomogen prerez z mnogo veziva in velikim številom luknjic in z diskoloracijami.

2.7.2.2 Instrumentalno vrednotenje barve

Barva mesa ali mesnine je odvisna od absorpcije, razpršitve in odboja svetlobe na površini, kot tudi od uporabljene barve svetlobnega vira. Absorpcija svetlobe je odvisna od vsebnosti mišičnih pigmentov (predvsem mioglobina) – v tem se razlikujejo vrste mesa. Razpršitev svetlobe je pogojena z dejavniki kot so hrapavost površine mesa, strukture, marmoriranost in vsebnost vezivnega tkiva. Odboj je proporcionalen s stopnjo leska – sijaja na površini, ki je lahko odraz različne strukture mesa (Murray, 1992). Zaradi teh dejavnikov je instrumentalno merjenje barve mesa pomembno in nam omogoča primerjanje med posameznimi vrstami mesa in raziskavami. Za primerjanje med posameznimi raziskavami je pomembno zelo natančno opisati pogoje, pri katerih je bilo meso obdelano in skladiščeno ter merjena barva (Cassens in sod., 1995).

2.7.2.2.1 Instrumentalno merjenje barve z aparatom Minolta

Človeško oko zazna vsako barvo kot kombinacijo rdeče, zelene in modre barve. Ta princip zaznavanja barv so izkoristili v tehnične namene in sestavili aparat za merjenje barv – kromometer.

Kromometer deluje na principu človeškega očesa. Barvo vzorca razdeli na tri komponente, ki jih predstavi s točko v določenem koordinatnem sistemu in poda rezultate v L^* , a^* in b^* koordinatah (Gašperlin, 1992 in 1998). Vrednost L^* določa svetlost vzorca oziroma na podlagi te lastnosti lahko določimo kakovost mišičnine, a^* in b^* pa določata odtenek barve. Na podlagi vrednosti a^* lahko določimo katere vrste je meso (višje vrednosti – meso bolj pigmentiranih vrst, nižje vrednosti a^* – meso manj pigmentiranih vrst). Z oksigenacijo se bistveno spremeni vrednost b^* .

Razlike posameznih komponent pomenijo:

+ a^* = bolj rdeč (manj zelen),

- a^* = bolj zelen (manj rdeč),

+ b^* = bolj rumen (manj moder),

- b^* = bolj moder (manj rumen),

višja L^* = vrednost pomeni svetlejšo barvo,

nižja L^* = vrednost pomeni temnejšo barvo,

Tri najpomembnejše lastnosti barve so barvni odtenek (angleško hue), nasičenost ali gostota (angleško chroma) in barvna vrednost (angleško value). Barvni odtenek (h) opisuje vizualni občutek glede na to, kateri barvi ali razmerju dveh zaznanih barv rdeče, rumene, zelene in modre se površina izkaže za podobno. Nasičenost barve opisuje intenzivnost osnovnih barv (C), pri tem se mora upoštevati tudi vsebnost bele svetlobe. Vrednost barvne razlike (ER) pa meri spremembo v treh komponentah barve: svetlost L^* , rdeče-zeleno a^* in rumeno-modro vrednost b^* (Boakye in Mittal, 1996).

Izmerjene vrednosti L^* , a^* in b^* se uporabljajo za izračun sprememb v vrednosti barvne razlike, svetlosti, barvnem odtenku in nasičenju barve (Moore, 1988). Iz vrednosti L^* , a^* in b^* lahko izračunamo ΔE , C in h. ΔE je vrednost barvne razlike, ki nam da celotno razliko v barvi med dvema izmerjenima vzorcema. Izračunamo jo z relacijo:

$$\Delta E = \left[(L - L_{ref})^2 + (a - a_{ref})^2 + (b - b_{ref})^2 \right]^{1/2}$$

Za referenčne vrednosti L^* , a^* in b^* se vzame vzorce koagulatov z dodatkom nitrita.

ΔE nam poda le absolutno razliko v barvi med dvema vzorcema, nič pa nam ne pove, kako se barva spremeni. To razliko v barvi lahko dopolnimo še z izračunom kota barvnega odtenka h (hue), ki nam predstavlja kot v ravnini a, b (ki teče v obratni smeri urinega kazalca), kjer se točka barve nahaja. Ta parameter nam torej pove, v katero smer se giblje odtenek barve, tako npr. b črta ustreza kotu barvnega odtenka $h = 90^\circ$. Kot barvnega odtenka izračunamo z relacijo:

$$h = \tan^{-1} (b/a)$$

C = (chromacity) je indeks nasičenja barve, ki nam pove, kakšna je skupna koncentracija vseh barv. V tridimenzionalnem koordinatnem sistemu L^* , a^* in b^* predstavljajo oddaljenost od izhodišča v ravnini a, b. Izračunamo ga z relacijo:

$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

2.7.3 Tekstura, vonj in aroma mesnih emulzij

2.7.3.1 Teksturni profil

2.7.3.1.1 Sočnost

Sočnost je pomembna senzorična lastnost, ki jo določa tipna zaznava. Na tipne receptorje v ustni votlini učinkuje iztisljiva tekočina, ki nastane med žvečenjem in se iztisne iz grizljaja

ter povzroči zaznavo mokrote oziroma suhosti. Količina iztisljive tekočine je odvisna od vrednosti pH in stopnje zamaščenosti mesa.

Monin in Ouali (1991) menita, da je sočnost, ki jo zaznamo kot količino izločenega soka med žvečenjem, odvisna od občutka sočnosti zaradi sproščene vode ob začetku žvečenja in od občutka sočnosti, ki je rezultat stimulacije izločanja sline zaradi učinka maščob. Zdi se, da končna vrednost pH, ki je v glavnem odločilna pri SVV, na sočnost mesa nima posebnega vpliva. Ugotavljata, da so podatki o povezavi med vsebnostjo intramuskularnih maščob in sočnostjo v literaturi dokaj nasprotujoči.

2.7.3.1.2 *Tekstura*

Tekstura mesa in mesnih izdelkov je izraz, ki zajema večje število lastnosti. Teksturne lastnosti so tiste, ki jih zaznamo pri oralnem preiskovanju in jih povzročajo dotiki, pritiski in gibanje na čutila v ustih, žrelu in požiralniku (med grizenjem, žvečenjem, požiranjem) (Skvarča, 2008). Teksturo sestavlja več komponent: mehkoča, sočnost, jedrost (prožnost, elastičnost), sila potrebna za prerez mesa ali izdelka prečno in vzdolž mišičnih vlaken, žvečljivost, količina nežvečljivega ostanka, gumijavost, testatost, gnevavost (plastičnost), rahlost, lomljivost, drobljivost, mazavost, občutek v ustih, mastnost, oljavost, obloženost ust (z maščobo, z delci), gladkost in drugo. Tekstura mesa in mesnih izdelkov je pomemben parameter njihove senzorične kakovosti, tržne vrednosti in kulinarične oziroma tehnološke uporabnosti.

2.7.3.1.2.1 Instrumentalne metode vrednotenja teksture

Instrumentalna analiza temelji na reoloških lastnostih hrane. Reologija je veja fizike, ki obravnava deformacije in tokove snovi. Ta deformacija ali tok se pojavi zaradi delovanja neke sile. Pri živilih so reološke lastnosti povezane z njihovimi teksturnimi lastnostmi. Instrumentalne metode vrednotenja teksture živil bazirajo na deformaciji in na tekočinskih lastnostih živil. Teksturne lastnosti živil so:

- mehanske (v povezavi s silo deformacije na živilo),
- geometrijske (v povezavi z velikostjo, obliko in usmeritvijo delcev v živilu),
- druge (v povezavi z zaznavo vlage, maščobe v živilu ...).

Možne osnovne vrste obremenitev pri instrumentalnem merjenju teksture mesne emulzije: kompresija, strig, tenzija ali nateg, rez, upogib, uklon, torzija. Pri rezu gre za uporabo ostrega rezila, ki prereže emulzijo (kar je simulacija delovanja naših zob).

Empirične aparate za mehansko merjenje teksture razdelimo v: penetrometre, kompresimetre, strižne aparate, rezne aparate, mastikometre, konzistometre, viskozimetre, ekstruzijske aparate, mešane naprave, mnogonamenske aparate.

Merjenje teksture mesa in mesnin lahko opravimo z različnimi instrumenti, katerih kontaktni nastavki povzročijo deformacije s silo striga, tlaka, reza ali njihovo kombinacijo. Najbolj uporabni in v dobri korelaciji s senzorično analizo teksture so: Warner-Bratzlerjev aparat (kovinska plošča s trikotnim izrezom, ki prereže (striže) vzorec), Kramerjev strižno-stiskalni aparat (sistem 5 kovinskih plošč prodira skozi vzorec), kompresimetri (bat, ki stiska natančno oblikovan vzorec), Volodkevičev rezni aparat (prerez oblikovanega

vzorca), ekstrudorji za merjenje teksture (konzistence, mazavosti) pastoznih izdelkov in penetrometri.

2.7.3.2 Vonj in aroma

Vonj in aroma sta verjetno najpomembnejša parametra senzorične kakovosti in sta med seboj tesno povezani lastnosti. Aroma zaznamo med žvečenjem hrane v ustih in je kompleten občutek vonja, teksture, temperature in vrednosti pH. Če meso ali mesni izdelek položimo v usta in ga žvečimo, poteka sočasno več procesov, ki se kombinirajo v zelo kompleksno zaznavo, imenovano aroma (Skvarča, 2008). Govorimo o značilni ali neznačilni aromi, polni ali prazni aromi, neharmonični aromi in napakah arome. Aroma termično obdelanih mesnih izdelkov se razvije med termično obdelavo. Razlike v aromi med izdelki iz različnih mišic lahko pojasnimo z razlikami v njihovi kemijski sestavi (Monin in Ouali, 1991). Predvsem je za aromo mesnega izdelka odločilna vsebnost intramuskularne maščobe, še posebej fosfolipidov (Mottram in Edwards, 1983) in stopnja termične obdelave (končna središčna temperatura) (Wood in sod., 1995).

2.8 MIKRODELICI

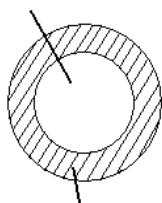
Mikrodelci je izraz s katerim v literaturi poimenujemo obe obliki (mikrokapsule in mikrosfere) in označuje delce mikrometrskih velikosti, sestavljene iz substance, ki jo inkapsuliramo in nosilne substance.

Glede na notranjo strukturo in obliko ločimo (Burgess in Hickey, 1994 in 2007):

- mikrokapsule v ožjem pomenu besede ali filmski tip mikrokapsul, kjer je jedro (substancia, ki jo inkapsuliramo) obdano z oblogo (slika 22A),
- mikrosfere ali matriks tip mikrokapsul so okrogli delci, kjer sta substancia, ki jo inkapsuliramo in nosilna snov razporejeni po celotnem volumnu (slika 22B).

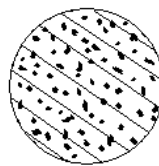
Mikrokapsule so tako majhni delci sferoidnih oblik, veliki od 1 μm do nekaj mm (Benton in Gardner, 1983). Jedro mikrokapsule predstavlja substancia, ki jo inkapsuliramo in je lahko tekoča, trdna ali plinasta. Obloga – ovojnica je običajno naravni ali sintezni polimer. Jedrni materiali so lahko pigmenti, vitamini, dišave, probiotične bakterije, encimi, olja, itd. Med naravne polimere (ki so lahko ustrezno derivatizirani) spadajo celulozni etri, želatina, hitozan, arabski gumi, škrob ipd., med sintetične pa derivati poliakrilne kisline (npr. Eudragiti, Carbopoli ...), polivinilpirolidon, poliamidi, polialkoholi, poliuretani, itd. Spojina se lahko iz jedra sprosti naenkrat, tako da se ovojnica zaradi različnih vplivov razgradi oziroma spojina sama difundira skozi prepustno ovojnico. Oba mehanizma sta lahko tudi združena (najprej difuzija, nato razgradnja).

Jedro s substanco, ki jo inkapsuliramo



obloga mikrokapsule

A: MIKROKAPSULA



B: MIKROSFERA

Slika 22 Shematski prikaz mikrokapsule in mikrosfere (Burgess in Hickey, 2007).

Figure 22 A schematic presentation of microcapsules and microspheres (Burgess in Hickey, 2007).

2.8.1 Metode za izdelavo mikrodelcev

Za izdelavo mikrodelcev se uporabljajo kemijske, fizikalno-kemijske in mehanske metode (Jackson in Lee, 1991; Krajnc, 2004; Burgess in Hickey, 2007):

Kemijske:

- medpovršinska polimerizacija,
- "in situ" polimerizacija.

Fizikalno-kemijske:

- metoda koacervacije,
- metode z odstranjevanjem topila,
- metode z ohlajevanjem dispergirane taline.

Mehanske:

- inkapsuliranje z razprševanjem,
- sušenje z razprševanjem,
- inkapsuliranje v dražirnih kotlih,
- centrifugalno prekrivanje.

2.8.2 Vrednotenje mikrodelcev

Mikrodelci, ki se uporabljajo v znanstvene namene, morajo ustrezati točno določenim zahtevam, zato je potrebno poznati metode, s katerimi lahko nadzorujemo njihovo kakovost.

Lastnosti mikrodelcev, ki jih najpogosteje določamo so:

- vsebnost spojine v mikrodelcih: odstranimo vse moteče substance in uporabimo ustrezno analitsko metodo za kvantitativno analizo spojine (npr. UV spektrofotometrijo),
- sproščanje spojine iz mikrodelcev: za vse mikrodelce je zelo pomembno, s kakšno hitrostjo se spojina sprošča, tudi za mikrodelce, pri katerih kontrola sproščanja ni osnoven namen inkapsuliranja. Kinetika sproščanja je odvisna od strukture mikrodelcev in od lastnosti spojine ter polimera, predvsem od njune topnosti (pri polimeru tudi od možnosti razpada) v mediju, kjer sproščanje poteka. Pomemben je

tudi mehanizem sproščanja, ki je tudi odvisen od strukture mikrodelcev ter lastnosti spojine in polimera. Spojina se lahko sprošča z difuzijo skozi membrano, z difuzijo iz polimernega matriksa, pri čemer lahko polimerni matriks nabreka, se raztaplja, razpada...

- velikost mikrodelcev: določamo s sejnalno analizo, z merjenjem odklona laserske svetlobe, z optično ali elektronsko mikroskopijo ali z elektronskim števcem (Coulter counter),
- druga testiranja: določanje površine, por, gostote, določanje debeline obloge, itd. ter testiranja, ki so vezana na specifično uporabo mikrodelcev, npr. vrednotenje bioadhezivnih sposobnosti.

2.8.3 Inkapsuliranje

Inkapsuliranje je kot metoda oblaganja delcev mikrometerskih velikosti v svetu že dolgo poznana, saj segajo prve aplikacije v zgodnja petdeseta leta prejšnjega stoletja. Postopek so prvič uporabili za izdelavo brezajnega kopirnega papirja, kasneje pa je prodril tudi na številna druga področja, kot so farmacija, prehrabena industrija, elektronika, fotografija, grafika... Zaradi uporabe na številnih področjih, poznamo danes veliko postopkov za pripravo mikrokapsul kot tudi mikrosfer. Njihova notranja struktura je odvisna od metode oziroma parametrov metode, s katero jih pripravimo (Bogataj in sod., 1988).

Z vgrajevanjem spojine v mikrokapsule, mikrosfere lahko povečamo stabilnost spojine, prekrijemo njen neprijeten okus ali vonj, zaščitimo spojine oziroma jedrne materiale pred zunanjimi vplivi, spremenimo agregatno stanje spojin (tekoče v trdno) in težo ali volumen ter ločimo reaktivne sestavine zmesi (preprečevanje inkompatibilnosti) (Sriamornsak in Nunthanid, 1998).

V zadnjih 15 letih je napredek v tehnologiji inkapsuliranja omogočil tudi vgrajevanje mikrobnih, živalskih in rastlinskih celic kot tudi encimov, proteinov, genov. Aplikacija teh produktov je široka in sega od odpadnih voda, zdravljenja različnih bolezni do človeških vsadkov. Možnost izdelave mikrodelcev s tekočim jedrom je prinesla nove tehnološke rešitve in izboljšave v prehrabeni industriji, farmaciji, biotehnologiji, kemični, tekstilni in kozmetični industriji, elektroniki, termografiji, agrikulturi ter grafiki. Skrbno je potrebno izbrati polimer in določiti njegove lastnosti še pred izdelavo, kontrolirati postopek in parametre izdelave, določiti porazdelitev velikosti in mehansko stabilnost delcev... (Kanawjia in sod., 1992, Sriamornsak, 1998; Koch in sod., 2003; Orive in sod., 2003; Gouin, 2004; Wang in sod., 2006).

2.8.4 Proizvodnja v večjem obsegu

V veliki večini raziskav, ki so bile vezane na vgrajevanje spojin, so se raziskovalci ukvarjali predvsem z uspešnostjo vgrajevanja. Le malo število raziskav pa se je do sedaj ukvarjalo z vgrajevanjem spojin, ki bi zagotavljalo proizvodnjo v večjem obsegu v skladu z GMP smernicami (Schwinger in sod., 2002).

Novejše metode, ki omogočajo proizvodnjo mikrodlecev v večjem obsegu so:

- “Vibrating nozzle“,
- “AirJet“,
- “JetCutter“.

2.8.4.1 “Vibrating nozzle“

Tehnika izdelave mikrodlecev temelji na razbitju laminarnega toka tekočine s pomočjo nihanja membrane z določeno frekvenco.

Kot polimer se za vgrajevanje spojin največkrat uporablja raztopina natrijevega alginata. Pri proizvodnji mikrodlecev v velikosti pod 300 μm je potrebna nižja viskoznost raztopine polimera. To pa povzroča manjšo mehansko odpornost proizvedenih mikrodlecev.

2.8.5 Polimeri

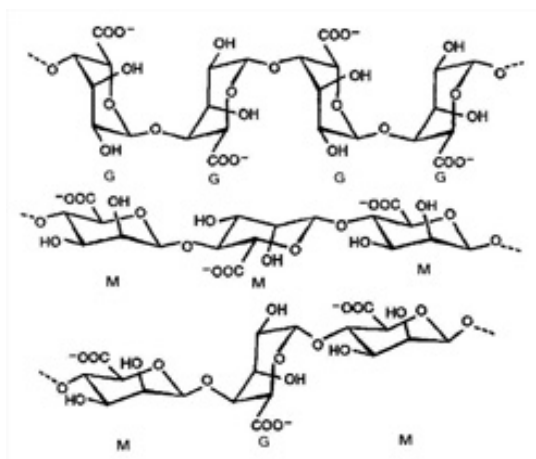
Vgrajevanje spojin je možno z izbiro ustreznega polimera, ki mora zagotavljati ustrezno mehansko stabilnost sistema, nuditi ustrezno mikrookolje, biti biorazgradljiv, imeti nizko ceno in z njim je možno doseči nadzorovano sproščanje (O’Loughlin in Lysaght, 2001; Gupta in Bansal, 2002; Orive in sod., 2003).

Polimere, ki lahko vključijo v svojo strukturo večje količine vode, imenujemo tudi hidrogeli. Hidrogeli so tridimenzionalno hidrofilne polimerne mreže, ki tvorijo ogrodje matriks sistema. To ogrodje se tvori s premreženjem polimernih enot. Povezave polimernih enot pa so lahko kemijske (kovalentna vez) ali pa fizikalne narave (ionske, hidrofobne interakcije, van der Waalove interakcije, vodikove vezi). Za pripravo hidrogelov uporabljamo različne naravne in sintetične polimere. Med naravne spadajo: alginat, hitozan, škrob, kolagen, želatina, itd. Med sintetične pa uvrščamo: polivinilpirolidon, derivate poliakrilne kisline, poliamide in druge (Jianlong in sod., 1999; Bos in sod., 2001).

2.8.6 Alginska kislina in alginati

Alginska kislina je linearen polimer iz dveh različnih uronskih kislin, α -L-guluronske kisline (G) in β -D-manuronske kisline (M). Gre za hidrofilni, koloidni polisaharid, ki se pojavlja kot strukturni element celične stene različnih vrst alg (The Merck Index, 2001; McGinity in Repka, 2002).

G in M enote se med seboj povezujejo in tvorijo polimerno verigo, pri čemer nastajajo trije tipi segmentov, ki jih imenujemo MM, GG in MG bloki (slika 23). GG bloki se povezujejo z α (1,4)-glikozidno vezjo, pri čemer nastanejo votlinska mesta, v katera se dobro prilegajo dvovalentni kovinski ioni. Pri MM verigi so monomeri povezani z β (1,4)-glikozidno vezjo in veriga ima strukturo podobno ravnemu traku. Pri MG povezavi pa polimerna veriga izgubi svojo običajno linearno strukturo in spremeni svojo smer v MG povezavi (Kovač in Krbavčič, 1999).



Slika 23 Stereokemična struktura GG, MM in MG blokov (Kovač in Krbavčič, 1999).

Figure 23 The stereochemical structure of GG, MM and MG blocks (Kovač and Krbavčič, 1999).

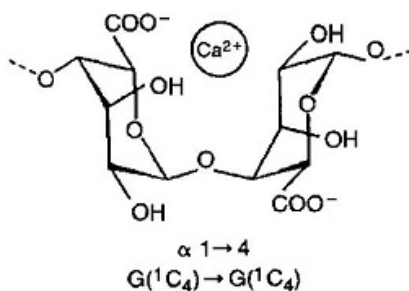
Alginska kislina ima polianionski značaj in je netopna v vodi (preglednica 11). Pri vrednosti pH medija nad 3 se alginska kislina pretvori v vodotopno sol. Popolna nevtralizacija nastopi pri vrednosti pH 4, pri kateri je celotna alginska kislina pretvorjena v ustrezno sol. Je brez okusa in je sposobna absorbirati 200-300 kratno količino vode glede na njeno maso (preglednica 11) (The Merck Index, 2001; McGinity in Repka, 2002).

Preglednica 11 Lastnosti alginske kisline in njenih soli monovalentnih kationov (McGinity in Repka, 2002).

Table 11 The characteristics of the alginate acid and its salts of monovalent cations (McGinity in Repka, 2002)..

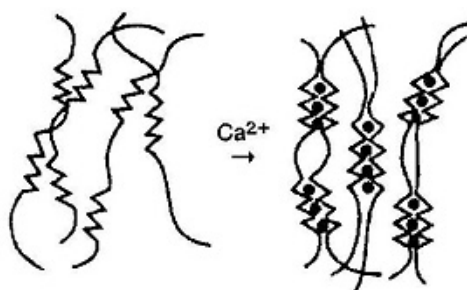
alginska kislina	soli alginske kisline monovalentnih kationov (alginati)
• netopna v vodi	• topne v hladni ali topli vodi
• v prisotnosti vode hitro nabrekne	• reagirajo z multivalentnimi kationi
• bel prašek brez vonja in okusa	• tvorijo termično ireverzibilne gele
	• tvorijo filme
	• stabilne v območju vrednosti pH od 4 do 10

Topnost soli alginske kisline (alginatov) je odvisna od prisotnih kationov. Alginati monovalentnih kationov (npr. Na^+ , K^+ , NH_4^+) so vodotopni in tvorijo v vodi viskozno koloidno raztopino s pseudoplastičnimi lastnostmi. V stiku z dvovalentnimi kovinskimi ioni, kot npr. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} ioni (razen Mg^{2+} ionov); pa ireverzibilno nastanejo elastični geli, ki v vodi niso topni. Kalcijevi ioni se ujamejo v votlinska mesta GG bloka in prečno povežejo karboksilne skupine polimernih verig (slika 24). Tako nastane gel s strukturo podobno jajčni posodi (slika 25). Cinkovi ioni pa se za razliko od kalcijevih vežejo v votlinska mesta MM in MG blokov.



Slika 24 Stereokemična struktura GG bloka s Ca^{2+} ioni (Kovač in Krbavčič, 1999).

Figure 24 The stereochemical structure of the GG block with Ca^{2+} ion (Kovač and Krbavčič, 1999).



Slika 25 Struktura jajčne posode (Kovač in Krbavčič, 1999).

Figure 25 The structure of an egg-shaped vessel (Kovač and Krbavčič, 1999).

Alginati so polimeri naravnega izvora in imajo lastnosti, ki omogočajo raznoliko uporabo. Spojine naravnega izvora imajo prednost pred sintezni, zaradi lahke dostopnosti, nizke cene in relativno majhne toksičnosti. Prav tako pa jih lahko na različne načine modificiramo, da dobijo želene lastnosti (Bhardway in sod., 2000).

Alginate pridobivajo z ekstrakcijo iz različnih alg in imajo različne kemijske in fizikalne lastnosti glede na vrsto alge in pogoje rasti. Zato proizvajalci težko zagotovijo enake kemijske in fizikalne lastnosti alginatov, kar pomembno vpliva na njihovo uporabnost. Stalnost sestave in kakovosti skušajo doseči z mešanjem alginatov iz različnih alg in alg z različnih krajev rasti kot tudi s kontroliranimi metodami pridobivanja (McGinity in Repka, 2002).

Razmerje manuronskih in guluronskih kislinjskih segmentov posameznih alginatov se razlikuje in variira glede na vrsto alge, iz katere je alginat izoliran. Razmerje je izredno pomembno, saj vpliva na tridimenzionalno strukturo polimera in posledično na reološke, ionsko izmenjevalne in gelirne lastnosti končnega izdelka. Alginati z večjim deležem guluronskih kislin tvorijo močne, vendar krhke, neelastične in porozne gele, katerih integriteta se ohrani precej časa. Med premreževanjem s Ca^{2+} ioni niso podvrženi znatnemu nabrekanju ali krčenju, zaradi omenjenih lastnosti pa zavirajo rast vgrajenih živih celic. Nasprotno pa alginati bogati z manuronsko kislino dajejo šibke, a bolj elastične in porozne gele. Med premreževanjem s Ca^{2+} ioni so podvrženi precejšnjemu nabrekanju oziroma krčenju, a so zato veliko bolj primerni za vgrajevanje živih celic. Običajno

razmerje vsebnosti manuronske in guluronske kisline (M/G), variira med 0,4 in 1,9. S povečevanjem tega razmerja, se povečuje tudi sproščanje vgrajenih molekul z nizko molekulsko maso (McGinity in Repka, 2002).

Alginati so netoksični, biorazgradljivi in ščitijo sluznico zgornjega prebavnega trakta, zato je njihova uporaba zelo razširjena tudi v prehrabeni industriji (Kovač in Krbavčič, 1999), se uporabljajo kot zgoščevalci in stabilizatorji različnih izdelkov, od sladoleda do piva.

Alginati se uporabljajo tudi v sistemih z nadzorovanim sproščanjem. V želodčnem soku se hidratiran Na-alginat pretvori v porozno, netopno alginsko kislino, ta pa se pretvori nazaj v topno obliko šele, ko je podvržena višjim vrednostim pH intestinalnega traku (tanko črevo). Te, od vrednosti pH odvisne lastnosti alginatov lahko izkoriščamo za optimizacijo profilov sproščanja. Za zagotovitev optimalnih profilov sproščanja se običajno uporablja alginat v 20-50 % koncentraciji, v kombinaciji z drugimi polimeri pa je njegova koncentracija običajno pod 20 %.

Zaradi kemizma in relativno milih pogojev premreževanja je postal alginat polimer, ki se največkrat uporablja za vgrajevanje različnih biološko aktivnih reagentov, kot so proteini, celice in DNA, kot tudi ostalih spojin. Proces inkapsulacije običajno zahteva uporabo 1-3 % raztopine Na-alginata (McGinity in Repka, 2002).

2.8.6.1 Prednosti uporabe alginata pri izdelavi mikrodelcev

- Alginat je pri peroralni aplikaciji netoksičen in ima zaščitni učinek na sluznico zgornjega prebavnega trakta.
- Posušeni alginatni mikrodelci lahko ponovno nabreknejo, zato jih lahko uporabljamo v sistemih za nadzorovano sproščanje.
- Ker je njihova sposobnost nabrekanja odvisna od vrednosti pH okolja, lahko inkapsuliramo spojine, ki so občutljive na želodčno kislino.

Difuzija skozi gel je odvisna tako od njegove poroznosti, kot od topnosti in molekulske mase spojine, ki se vgrajuje. Visoka poroznost alginatov ima za posledico hitro sproščanje nizko molekularnih spojin, razen če gre za slabo topne spojine. Tako so alginati za doseganje nadzorovanega sproščanja ustrežnejši pri vgradnji makromolekul oziroma spojin z nizko molekulsko maso, ki so vezane na makromolekule s kovalentnimi ali nekovalentnimi vezmi. Zato je za izdelavo mikrodelcev ustreznih lastnosti potrebna skrbna izbira alginata, pogojev geliranja, pomožnih snovi in izbira primerne obloge. Vse to daje alginatom široko uporabnost (Bruneton, 1999; Kovač in Krbavčič, 1999; Reis in sod., 2006).

2.9 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA (SPINSKA) RESONANCA

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) ali elektronska spinska resonanca (ESR) je resonančna spektroskopska metoda, s katero lahko zaznamo in opišemo paramagnetne centre v snovi – vzorcu in preko njih njihovo neposredno okolico ter dogajanje v njej (Weil in sod., 1994). S pomočjo EPR metode in lastnosti paramagnetnih snovi pridemo do informacij o interakcijah med elektroni, med elektroni in jedri ter o strukturi snovi in

gibanju paramagnetnih centrov. Paramagnetni centri so sistemi z enim ali z več kot enim nesparjenim elektronom in so lahko v vzorcu naravno prisotni (prosti radikali, ioni prehodnih kovin) ali so mu umetno dodani (spinski označevalci). Paramagnetni centri bioloških sistemov so radikali (v literaturi je še vedno uporabljeno ime prosti radikali), ki se pojavljajo kot vmesni produkti pri celični presnovi (kot npr. kisikovi radikali – superoksidni anionski in hidroksidni radikal) v trdni, tekoči ali plinasti fazi, ioni prehodnih elementov – kovin (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , V^+ , V^{3+} , V^{4+} in drugi), ioni lantanidov, sistemi s prevodnimi elektroni (prevodniki in polprevodniki) ter elektroni, ki so ujeti v vrzelih raznih poškodb v trdnih snoveh. Elektron si lahko predstavljamo kot majhen magnet – zaradi vrtenja okoli svoje osi ima elektron magnetni moment in v svoji okolici ustvarja magnetno polje. Magnetni moment je vzporeden z osjo vrtenja, smer pa je odvisna od smeri vrtenja elektrona (Marsh, 1981).

Elektronska paramagnetna resonanca deluje v mikrovalovnem frekvenčnem območju 9 GHz, oziroma pri valovni dolžini približno $\lambda \approx 3$ cm (X pas). To je tudi področje spektrometra Bruker ESP 300, nekateri spektrometri pa delujejo tudi v drugih frekvenčnih območjih (npr. 35 GHz). V mikrovalovnem frekvenčnem območju delujejo tudi radarji in mikrovalovne pečice.

Vrtenje elektrona okoli svoje lastne osi označuje spin elektrona. To je kvantnomehanska količina, opisana s kvantnim številom S , velikostjo $S = \frac{1}{2}$ in ustreznima možnima projekcijama spina $m_s = +\frac{1}{2}$ (najvišje energijsko stanje) ali $m_s = -\frac{1}{2}$ (najnižje energijsko stanje). Magnetni moment elektrona je podan z izrazom:

$$\mu = -\beta g S$$

μ ... magnetni moment elektronov v opazovanem centru,

g ... spektroskopski cepitveni tenzor – količina, ki opisuje interakcije med magnetnim momentom elektronov in zunanjim magnetnim poljem in je karakteristična za dano paramagnetno snov: za prost elektron je $g = 2.0023$; tenzor pomeni, da je jakost interakcije odvisna od smeri paramagnetnega centra glede na magnetno polje,

β ... Bohrov magneton – konstanta – velikost elektronskega magnetnega momenta, ki znaša $9,27 \times 10^{-24}$ J/T,

S ... kvantno število za spin elektrona.

Elektrona z nasprotnima projekcijama spinov v isti atomski orbitali tvorita elektronski par, oziroma elektronski par sta elektrona, ki se med seboj ločita po nasprotnih smereh vrtenja okrog lastne osi. Magnetna momenta takih elektronov sta torej nasprotna, zato se kompenzirata (izničita, uničita). Snov, ki ima elektronske pare, torej nima končnega magnetnega momenta – je diamagnetna. Snovi z nesparjenimi elektroni, kot so na primer prosti radikali, so paramagnetne. Mesta z nesparjenimi elektroni so paramagnetni centri in te lahko zaznamo z metodo EPR, če je koncentracija paramagnetnih centrov zadostna (najmanj 10^{-9} mol/l).

Paramagnetne snovi, ki vsebujejo nesparjene elektrone, postavimo v zunanje magnetno polje. Dokler snov ni bila izpostavljena magnetnemu polju, so bili nesparjeni elektroni v snovi poljubno usmerjeni in so imeli enako energijo. Ko snov postavimo v magnetno polje,

magnetni momenti paramagnetnih centrov interagirajo z zunanjim magnetnim poljem (Zeemanov efekt), ki povzroči razcep energijskih nivojev. Magnetni momenti elektronov, ki so bili prej neurejeni v vseh smereh, se uredijo, orientirajo v smeri magnetnega polja. Elektroni se obrnejo tako, da so njihovi magnetni momenti (μ) vzporedni s smerjo zunanjega magnetnega polja (slika 26) (elektroni s projekcijo spina $-\frac{1}{2}$, energija je minimalna) ali nasprotno usmerjeni (antiparalelni) (slika 26) (elektroni s projekcijo spina $\frac{1}{2}$, maksimalna energija) (Weber, 1991). Elektroni, ki so s poljem vzporedni, imajo zato nekoliko višjo energijo kot tisti, ki so obrnjeni v nasprotno smer.

$$E_1 = \mu_1 B = \frac{1}{2}(g \beta B)$$

$$E_2 = \mu_2 B = -\frac{1}{2}(g \beta B)$$

E ... energija elektronov,

B ... gostota zunanjega magnetnega polja (T).

Pod vplivom magnetnega polja se tako elektroni z enako energijo razcepijo na dva energijska nivoja (na dve podravni) (slika 26).

Energijsko razliko (ΔE) med tema dvema nivojema merimo z EPR. V ta namen snov v magnetnem polju obsevamo z elektromagnetnim valovanjem. Če deluje na paramagnetne centre v magnetnem polju elektromagnetno valovanje z energijo " $h\nu$ ", ki je enaka energijski razliki med tema dvema nivojema – elektronskima skupinama, pride do prehoda elektronov z enega energijskega nivoja na drugega in ob tem do absorpcije elektromagnetnega valovanja. Pri tem velja izraz, ki predstavlja resonančni pogoj:

$$E_1 - E_2 = \Delta E = g \beta B = h\nu$$

kjer je:

ΔE ... energijska razlika med elektronskima energijskima nivojema,

h ... Planckova konstanta,

ν ... frekvenca elektromagnetnega valovanja,

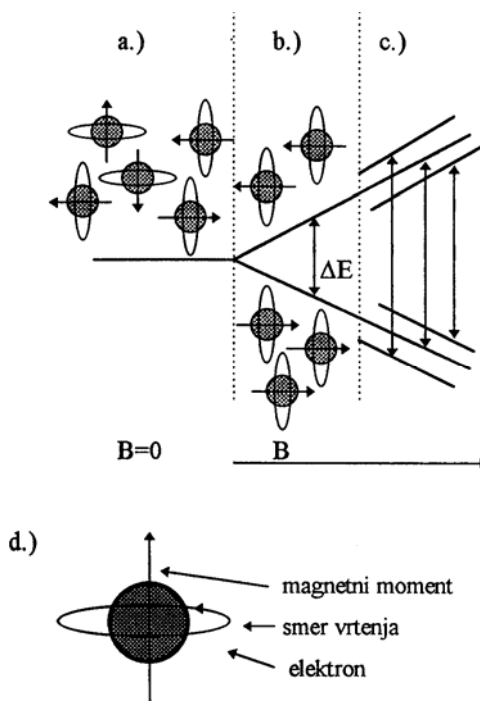
β ... Bohrov magneton,

g ... spektroskopski cepitveni tenzor,

B ... gostota zunanjega magnetnega polja (Marsh, 1981).

Nesparjeni elektroni so zelo občutljivi na vplive iz okolice. Jedra atomov, okrog katerih krožijo nesparjeni elektroni, imajo lahko od nič različen spin I in zato tudi svoj magnetni moment. Zaradi interakcije magnetnega momenta jedra in magnetnega momenta nesparjenega elektrona, se vsak energijski nivo elektrona še dodatno razcepi – razdeli na $2I + 1$ podnivojev – energijskih stanj, pri čemer je I velikost spina najbližjega jedra (Marsh, 1981). Pri spinskih označevalcih kroži nesparjeni elektron okrog dušikovega jedra ^{14}N , ki ima spin $I = 1$, zato dobimo tri podnivoje pri vsaki skupini elektronov. Opisuje jih jedrsko spinsko kvantno število m_I (za jedro dušika ima vrednosti 1, 0 in -1). To reakcijo

opišemo kot hiperfinski razcep, ki ga običajno izražamo v Gaussih (G) ali Teslih (T; $1 \text{ T} = 10^4 \text{ G}$) (Marsh, 1981). Seleksijska pravila za prehode elektronov so $|\Delta m_s| = 1$ in $|\Delta m_l| = 0$. Velikost hiperfinega razcepa je odvisna od notranjih elektrostatičnih polj in jakosti interakcije med obema magnetnima momentoma. Opišemo ga s tenzorjem hiperfine sklopitve A (ki je določen s tremi komponentami in je značilen za neko snov), jakost interakcije pa je odvisna od orientacije paramagnetnih centrov glede na magnetno polje (Marsh, 1981).



Slika 26 Energijski nivoji nitroksidnega radikala v magnetnem polju (Marsh, 1981).

Figure 26 Energy levels of nitroxyde radical in a magnetic field (Marsh, 1981).

Legenda: a) Osnovni energijski nivo nesparjenega elektrona brez magnetnega polja; b) Razcep energijskih nivojev elektrona zaradi interakcije magnetnega momenta elektrona z zunanjim magnetnim poljem (puščice ponazarjajo smer magnetnega momenta elektrona); c) Hiperfinski razcep energijskih nivojev elektrona zaradi interakcije magnetnega momenta elektrona z magnetnim momentom jedra dušika (puščice označujejo možne prehode elektronov med energijskimi nivoji, če je izpolnjen resonančni pogoj); d) Shematski prikaz elektrona in njegovega magnetnega momenta.

Energijski nivoji elektronov v primeru hiperfinega razcepa so podani z izrazom:

$$E_{(m_s, m_l)} = g \beta B m_s + A m_s m_l$$

m_s ... projekcija elektronskega spina,

m_l ... projekcija jedrskega spina,

A ... hiperfinski sklopitveni tenzor.

Glede na lastnosti tenzorjev "g" in "A" in iz položaja črt v EPR spektru dobimo informacije o naravi paramagnetnih centrov, o okolju, v katerem so paramagnetni centri in

o njihovi dinamiki. Pri kristalih iz kotne odvisnosti njihove lege glede na magnetno polje dobimo podatke o simetriji kristalnega polja. Iz oblike spektra pa dobimo informacijo o okolju.

V prahu (trdni snovi), kjer je gibanje paramagnetnih molekul počasno in so paramagnetni centri razporejeni v vse smeri, je EPR spekter vsota spektrov posameznih paramagnetnih centrov, zato je spekter širok. V neviskozni tekočini, kjer se molekule gibljejo hitro (izotropno), se velikost hiperfine sklopitve vseh centrov izenači, hiperfini razcep ima povprečno vrednost A_0 , spekter je ozek in oster. V bioloških sistemih je hitrost gibanja paramagnetnih centrov nekje vmes med opisanimi skrajnima primeroma. S spreminjanjem okolice paramagnetnega centra se spremeni tudi njegova dinamika in s tem oblika spektra EPR. Dinamiko paramagnetnega centra opišemo z rotacijskim korelacijskim časom τ_c . To je čas, ki je potreben, da molekula "pozabi", kako je bila v magnetnem polju orientirana prej (Marsh, 1981) ali drugače: čas, v katerem še obstaja korelacija med dvema orientacijskima stanjema molekule (Vrhovnik, 1997).

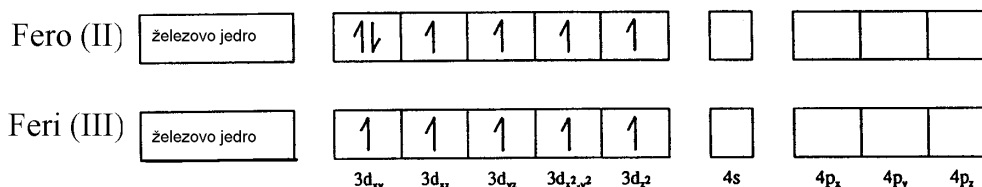
Z višanjem viskoznosti ali ohlajevanjem raztopin se gibanje molekul upočasni. Posledica so daljši korelacijski časi. V zamrznjenih raztopinah je gibanje molekul praktično ustavljeno, paramagnetni centri pa so orientirani v različnih smereh glede na magnetno polje. Dobimo EPR spekter, ki je vsota EPR spektrov za posamezne lege paramagnetnih centrov.

Za natančnejše določanje tenzorjev "g" in "A" in njihove dinamike se uporablja računalniško simuliranje EPR spektrov. S to metodo spreminjamo vrednosti komponent tenzorjev "g" in "A" ter po potrebi seštevamo različne vrste EPR spektrov, da dobimo čim boljše prileganje izračunanega EPR spektra eksperimentalnemu. Taka simulacija je zlasti nenadomestljiva pri EPR spektrih, ki so superpozicija večih. Na obliko EPR spektrov vpliva tudi polarnost topila. Z večanjem polarnosti topila se večja tenzor A, tenzor g pa se manjša.

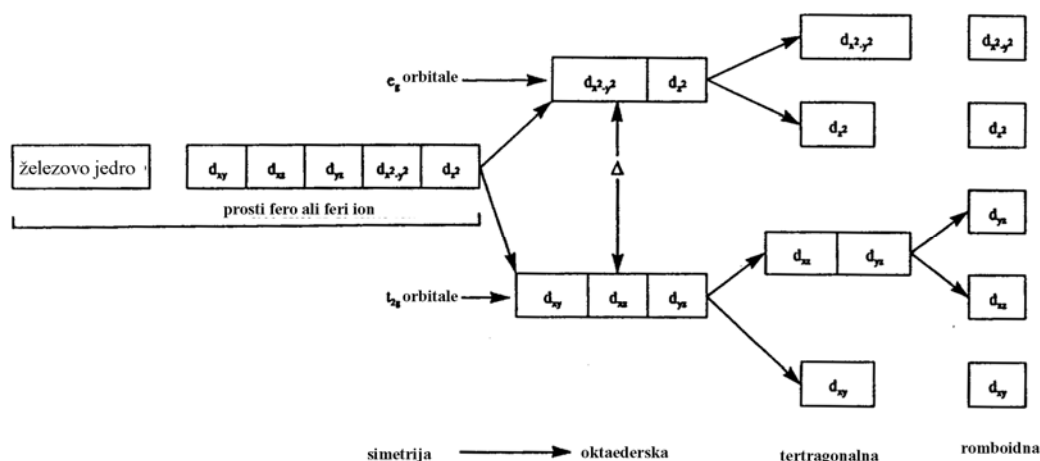
V kolikor se oblika spektra med meritvijo ne spreminja, lahko merimo neposredno amplitudo spektra, ki je proporcionalna koncentraciji snovi. V primeru, da se oblika spektra med meritvijo spreminja, je nujno, da merimo intenziteto spektra. V tem primeru moramo spekter (ki je prvi odvod absorpcijske krivulje) dvakrat integrirati, da dobimo intenziteto spektra. Ta je nato proporcionalna koncentraciji (Poole, 1996).

2.9.1 EPR paramagnetnih centrov z železovimi ioni

Železovi proteini so encimi, na katere je v raznih oblikah vezan železov ion. Igrajo pomembno vlogo v mnogih življenjskih procesih kot npr. pri prenosu in skladiščenju kisika. V nekaterih železovih proteinih so ioni železa vezani v porfirinskem obroču, npr. v citokromih in hemoglobinu. To so hem-železovi proteini. Železov ion v proteinih je lahko v obliki Fe^{3+} ali Fe^{2+} . V obeh primerih manjkajo elektroni v elektronski 3d lupini, ki je v prostem ionu 5-krat degenerirana. Fe^{3+} ima v 3d lupini 5 prostih elektronov, Fe^{2+} pa 6 (sliki 27 in 28).



Slika 27 Razporeditev elektronov fero in feri iona (Pegg in Shahidi, 1997).
Figure 27 The distribution of electrons of ferro and ferri ion (Pegg and Shahidi, 1997).



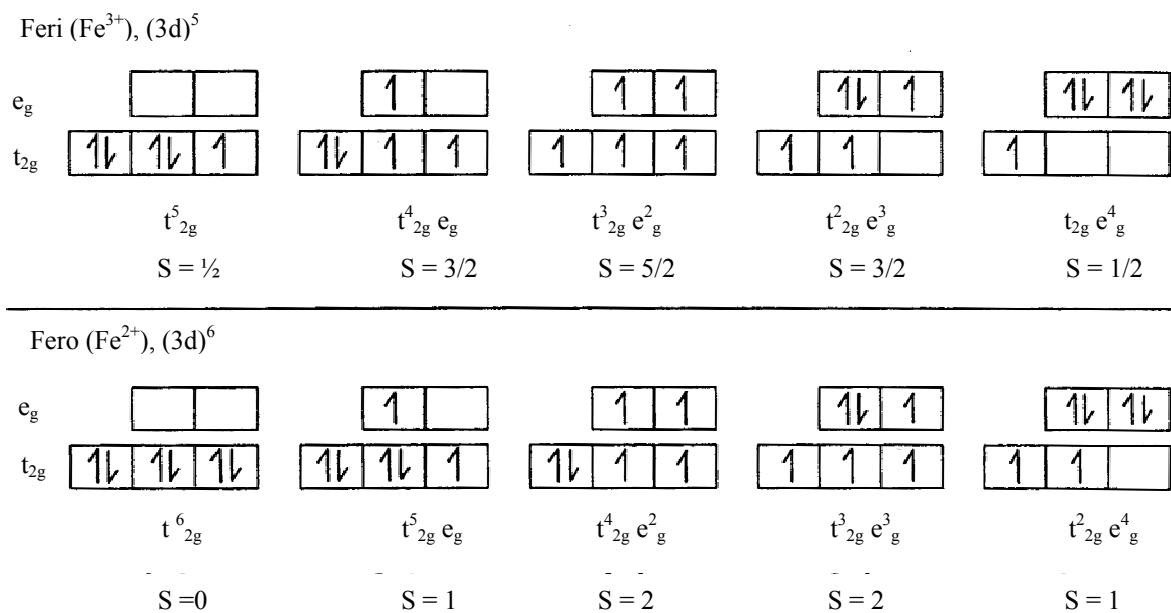
Slika 28 Cepitev 3d orbital v oktaedrično, tetragonalno ali romboidno simetrijo (Pegg in Shahidi, 1997).
Figure 28 Splitting the 3d orbitals in octahedric, tetragonal or rhomboid symmetry (Pegg and Shahidi, 1997).

V hem proteinih je železov ion v sredini bolj ali manj deformiranega oktaedra. V njegovih ogljiščih so štirje dušikovi atomi iz porfirinskega obroča. V petem ogljišču je atom iz proteinske molekule, preko katere je hem vezan s proteinom, v šestem ogljišču pa se lahko vežejo različne skupine: O₂, H₂O, CO₂, S, N ... Ioni v ogljiščih oktaedra tvorijo elektrostatsko polje, zaradi katerega se energijski nivoji železovega iona razcepijo (slika 28). Velikost razcepa in stopnja odpravljene degeneracije sta odvisna od simetrije in jakosti tega polja.

Kadar je vez med železovim ionom in sosednjimi atomi, ligandi ionska, je razcep med energijskimi nivoji majhen. Elektroni so razporejeni po petih 3d orbitalah tako, da je celoten spin maksimalen. To je primer šibkega polja ali visokospinski primer.

V primeru, ko so železovi ioni kovalentno vezani, je razcep med energijskimi nivoji tako velik, da je energijsko bolj ugodno, če elektroni najprej zasedejo niže ležeče orbitale in šele potem višje. To je primer močnega polja ali nizkospinski primer.

Če je oktaeder ligandov močno deformiran, se energijski nivoji dodatno razcepijo. Nastanejo kompleksi z vmesnimi spinskimi stanji.



Slika 29 Razporeditev 3d elektronov ferri in fero iona v d orbitale za različno močna elektrostatična polja okoli železovega iona za šest koordinatni oktaedrični kompleks (Pegg in Shahidi, 1997).

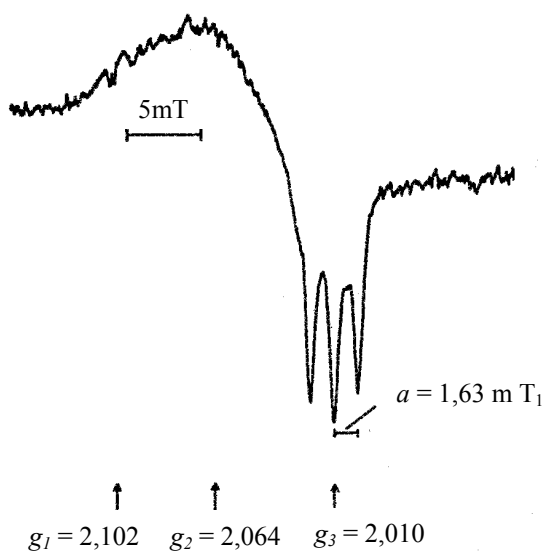
Figure 29 The distribution of 3d electrons of ferri and fero ion in d orbitals for six coordinate octahedral complex in electrostatic fields of different strength (Pegg and Shahidi, 1997).

Legenda: Maksimalni skupni spin (S) za vsak primer elektrostatičnega polja. Visoko spinski metmioglobin kompleks ima molekulo vode kot šesti ligand in ima $S = 5/2$. Nizko spinski železomioglobin kompleks, kot je nitrozomioglobin ima $S = 0$, medtem ko je deoksiferomioglobin s pet koordinatno kvadratno piramidalno simetrijo edini visoko spinski železomioglobin kompleks s $S = 2$.

Fe^{3+} v visokospinski formi ima $S = 5/2$, opazimo pa le en prehod, tako da je efektivni spin $S' = 1/2$. Glavne vrednosti tenzorja "g" so v območju: $g_{zz} = 6-8$, $g_{yy} = 3,4-3,9$, $g_{xx} = 1,3-1,8$. V nizkospinskem stanju Fe^{3+} je $S = 1/2$. Izmerjene vrednosti za g so v območju: $g_{zz} = 2,2-3,4$, $g_{yy} = 2,2-2,5$, $g_{xx} = 1,2-1,9$ (Šentjurc, 1981) (slika 29).

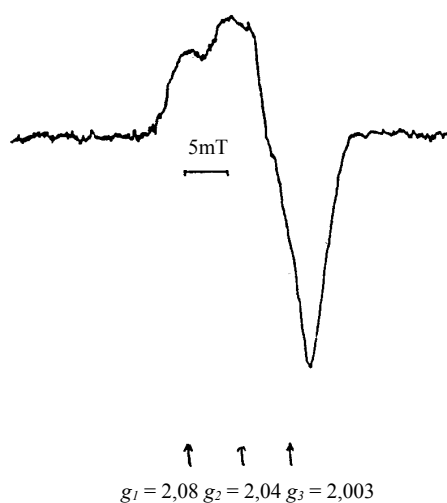
V kompleksih s Fe^{2+} običajno ni EPR absorbcije. Fe^{2+} v nizkospinskem stanju ima $S = 0$ in je torej diamagneten.

Na slikah 30 do 32 so podrobno predstavljeni EPR spektri pet ali šest koordinatne oblike. Značilni trojni razcep je zaradi hiperfine interakcije železovega iona z dušikom, katerega jedro ima spin $I = 1$.



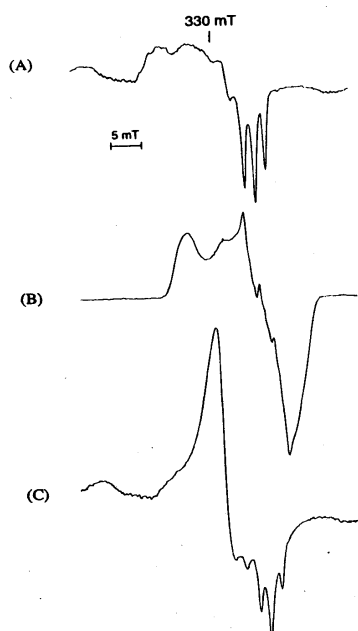
Slika 30 Značilen EPR spekter petkoordinatnega nitrozohema: sintetični nitrozoprotohem dimetil ester v acetonu pri 77 °K (Bonnett in sod., 1980).

Figure 30 A typical EPR spectrum five-coordinate nitroscheme: synthetic nitrosoprotohem dimethyl ester in acetone at 77 °K (Bonnett et al., 1980).



Slika 31 Tipični EPR spekter šestkoordinatnega nitrozohema, šesti ligand je dušik. Nitrozoprotohem v piperidinu pri 93 °K (Bonnett in sod., 1980).

Figure 31 A typical EPR spectrum of the six-coordinate of nitrosohem where the 6th ligand is nitrogen. Nitrosoprotohem in piperidin at 93 °K (Bonnett et al., 1980).



Slika 32 EPR spektri raztopin pri 77 °K prikazujejo pet ali šest koordinatno obliko železovega iona v hemoglobinu. (A) Pripravljen pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) v acetonu (po centrifugiranju brez prisotnih delcev), (B) CCMP v piridinu, (C) CCMP v acetonu (brez centrifugiranja delci prisotni) (Pegg in Shahidi, 1997).

Figure 32 The EPR spectra of solutions at 77 °K show a five-coordinate or six-coordinate forms. (A) A cooked cured meat pigment preparation (CCMP) in acetone (after the centrifuge without particles being present), (B) CCMP in pyridine, (C) CCMP in acetone (without centrifuging present particles) (Pegg in Shahidi, 1997).

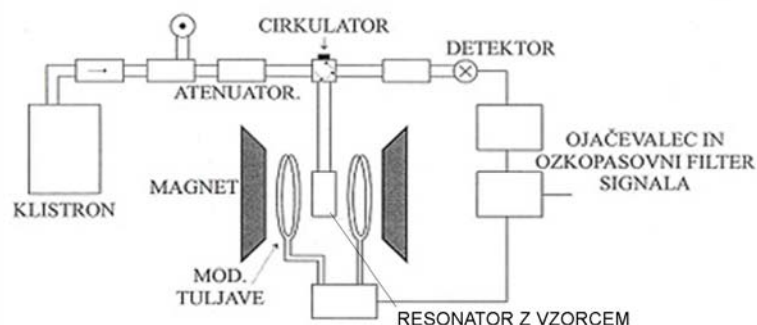
2.9.2 EPR spektrometer

Osnovna zamisel EPR spektrometra je podobna tisti pri optičnem spektrometru, le da moramo pri EPR z dodatnim zunanjim magnetnim poljem razcepiti energijska stanja paramagnetnih centrov. V bistvu potrebujemo: izvor valovanja, celico z vzorcem, detektor vpadlega in absorbiranega valovanja s polprepustnim zrcalom in ozkopasovnim filtrom ter ojačevalnik signalov. V uporabi sta dve vrsti spektrometrov: taki, ki delujejo zvezno (CW) in taki, ki delujejo pulzno. Mi smo uporabili CW EPR spektrometer (Bruker ESP 300E).

Standardni CW EPR spektrometri delujejo v frekvenčnem območju mikrovalov. Največ se uporabljajo EPR spektrometri, ki delujejo v frekvenčnem področju mikrovalov od 8,5 GHz do 10 GHz (X-pasovni). Uporabljajo se tudi taki, ki delujejo v področju od 2 GHz do 4 GHz (S-pasovni) in okoli 35 GHz (Q pasovni). Frekvenca mikrovalov je med merjenjem konstantna, magnetno polje s časom linearno narašča v intervalu, ki zajema vse resonančne vrednosti magnetnega polja.

Meritev na EPR spektrometru opravljamo tako, da na paramagnetni vzorec v magnetnem polju delujemo z elektromagnetnim valovanjem. Počasi spreminjamo gostoto magnetnega

polja in s tem energijsko razliko med Zeemanovimi energijskimi stanji. Ko je energija fotona elektromagnetnega valovanja enaka energijski razliki med lastnimi energijami elektrona, pride do resonančne absorpcije elektromagnetnih valov, kar zaznamo kot vrh na EPR spektru. Ko je izpolnjen resonančni pogoj prehajajo elektroni iz stanja $m_s = + \frac{1}{2}$ v stanje $m_s = - \frac{1}{2}$, in obratno. Ker je ravnovesna zasedenost stanj pri nižji energiji večja kot pri višji energiji, je absorpcija večja od stimulirane emisije, zato se razlika zasedenosti stanj manjša. Ravnovesna porazdelitev se vzpostavlja preko spinsko-mrežne relaksacije (Poole, 1996).



Slika 33 Splošna shema EPR spektrometra (Wertz in Bolton, 1972).

Figure 33 The scheme of the EPR spectrometre (Wertz and Bolton, 1972).

Klistron (slika 33) služi kot **izvor** mikrovalov, ki se prenašajo do vzorca z **valovodi**, ki morajo biti ustreznih dimenzij, da omogočajo optimalen prenos mikrovalov. Moč valovanja lahko spreminjamo z **atenuatorjem**. Vzorec postavimo v **rezonator**, ki je sklopljen z valovodom.

Rezonator mora biti postavljen v statičnem magnetnem polju, ki ga ponavadi ustvarijo **elektromagneti**. Polja elektromagnetov morajo biti zelo stabilna in po vsem vzorcu homogena kot tudi prirejena za kontrolirano spreminjanje za več velikostnih razredov. Del elektromagnetnega valovanja se odbija na **detektorsko diodo**. Ko se vzpostavi resonančna absorpcija mikrovalov v vzorcu, se del valovanja, ki se odbije na detektorsko diodo absorbira, kar zaznamo kot absorpcijsko črto. Višina te absorpcijske črte je sorazmerna z energijo mikrovalov, ki se je absorbirala v vzorcu, kar je obenem sorazmerno s številom paramagnetnih centrov v vzorcu. Intenziteta izmerjenega spektra je sorazmerna deležu mikrovalovnega valovanja, ki se absorbira v vzorcu.

Zelo pomemben del spektrometra je tudi sistem modulacije, ki enosmeren tok spreminja v izmeničnega in tako omogoča enostavnejše ojačevanje signalov. S slike 33 vidimo, da ob elektromagnet postavimo še dve tuljavi, skozi kateri teče izmenični tok. Zaradi tega se v rezonatorju vzpostavi dodatno nihajoče magnetno polje. Meritev ni več opravljena pri fiksnem magnetnem polju, ampak dobimo signal, ki sinusno niha. Amplituda tega signala je pri dovolj majhni modulacijski frekvenci sorazmerna odvodu absorpcijske krivulje. Tako se lažje izognemo šumom pri meritvi, saj s pomočjo frekvenčnih filtrov izločimo vse ostale frekvence, razen tiste, ki edina nosi informacijo.

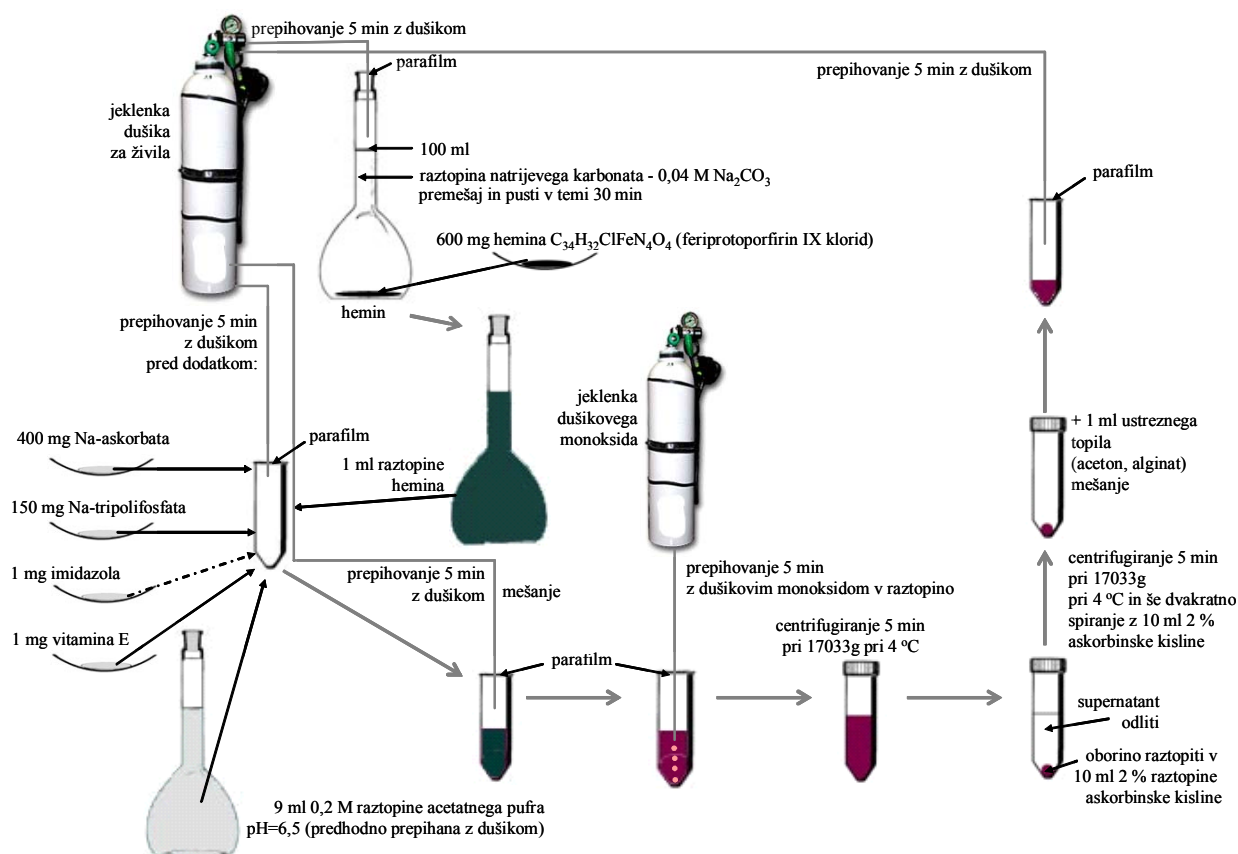
3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 NAČRT POSKUSA

Namen našega raziskovalnega dela je bil sintetizirati in stabilizirati alternativni pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) s pomočjo metode vgrajevanja v določenem nosilcu in ga uporabiti kot barvni dodatek v modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa različne kakovosti (dve različni mišici). Temu naj bi sledila senzorična, kemijska in instrumentalna analiza kakovosti teh mesnih emulzij ter statistična obdelava vseh zbranih podatkov.

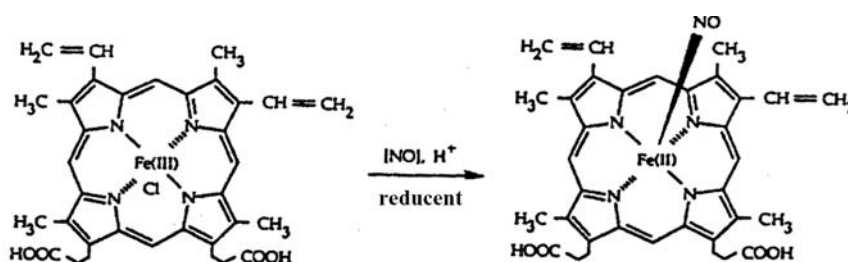
3.2 SINTEZA PIGMENTA TOPLOTNO OBDELANEGA RAZSOLJENEGA MESA

Pigment CCMP smo sintetizirali iz govejega hemina (kemijska formula $C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$) s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO) in reducentov (Na-askorbat in vitamin E), pri čemer je bila osnova modificirana metoda, ki sta jo uporabila Shahidi in Pegg (1991 in 1993a) (slika 35).



Slika 34 Posamezne faze sinteze pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP-ja).

Figure 34 Individual phases of synthesising the cooked cured-meat pigment (CCMP).



Slika 35 Sinteza CCMP-ja iz hemin klorida (Shahidi in Pegg, 1993).

Figure 35 The CCMP synthesis from haemine chloride (Shahidi in Pegg, 1993).

Pred samo sintezo so bile bučke in centrifugirke preprihane z dušikom (dušik se je v ustrezni medij vpihaval skozi stekleno dolgo kapalko). Prav tako je bila z dušikom določen čas preprihana bidestilirana voda, kakor tudi vse raztopine pripravljene za sintezo pigmenta (čas preprihovanja je bil odvisen od prostornine pripravljene raztopine – 2 l največ 3 ure) z namenom, da bi iz njih na podlagi izkušenj v čim večji meri odstranili kisik.

Postopek:

Iz slike 34 vidimo, da 600 mg hemina (feriprotoporfirin IX klorid) raztopimo v 100 ml raztopine 0,04 M natrijevega karbonata (Na₂CO₃), preprihamo z dušikom 5 minut (dušik vpihavamo nad raztopino skozi parafilm) in pustimo v temi 30 minut. Med počivanjem bučko večkrat previdno premešamo. V predhodno z dušikom (5 min) preprihano centrifugirko zatehtamo 1 mg vitamina E, dodamo 400 mg Na-askorbata (L+(-) natrijeva sol askorbinske kisline), 150 mg Na-tripolifosfata, 1 mg imidazola (dodan kot stabilizator), 9 ml 0,2 M raztopine acetatnega pufra s pH = 6,5 in 1 ml pripravljene raztopine hemina. Raztopino nato dobro premešamo (MS2 Minishaker) in nato 5 minut preprihujemo z dušikom nad raztopino ter še 5 minut z NO v samo raztopino. Pri tem je potrebno paziti, da je pretok dušikovega monoksida počasen in v curku – mehurček po mehurček; med preprihovanjem večkrat stekleno kapalko skozi katero vpihujemo dušikov monoksid dvignemo od dna centrifugirke proti njeni sredini. Po preprihovanju centrifugirko zapremo s prilagajočim se zamaškom. Sledi 5 minutno centrifugiranje pri 4 °C v hlajeni centrifugi Sigma 3 K30 pri 17 033g. Po centrifugiranju supernatant odlijemo, k oborini pa dodamo 10 ml 2 % raztopine askorbinske kisline, sledi ponovno centrifugiranje in nato še dvakratno spiranje z 10 ml 2 % raztopine askorbinske kisline. Po zadnjem centrifugiranju sledi k oborini (CCMP) dodatek 1 ml ustreznega topila (acetona, alginata) in ponovno mešanje z MS2 Minishakerjem ter 5 minutno preprihovanje z dušikom.

3.3 IZDELAVA MESNIH EMULZIJ IZ PIŠČANČJEGA MESA

Mesne emulzije smo pripravljali iz piščančjega mesa (prsna – bela mišica, bedra – rdeča mišica; proizvod Perutnine Ptuj d.d.) – petelini starosti 42 dni, povprečne žive teže 2,36 kg in provenience Ross, 100 % sončničnega olja in vode v obliki industrijsko pripravljene ledene drobirja.

V perutninarstvu se pod pojmom provenienca (izvor) skrivajo različna trgovska imena za plemensko perutnino, ki jo je rejec (seleksijska hiša) selekcioniral in držal v zaprti jati vsaj pet generacij (Holcman, 1991). Piščanci Ross so štirilinijski škotski križanci. Ti križanci oziroma njihovi starši, so uvoženi in zato je o njih malo osnovnih podatkov (Šubic, 1997). Za petelinčke te pasme je značilno, da so tako bedra kot tudi prsa manj zamaščena od mesa jarkic. Žlender in sod. (1995) v svoji raziskavi ugotavljajo, da komercialni križanec Ross v primerjavi s tujimi proveniencami (Arbor acres in Avian) ter našimi domačimi (Prelux 1 in Prelux 2) kaže značilne razlike v deležu kože. Prav tako je meso piščancev Ross slabšega vonja in arome, je pa bolj mastno in mehko.

Mišičnini smo odstranili maščobno in vezivno tkivo. Izdelali smo modelne serije mesnih emulzij z določeno vsebnostjo nitrita oziroma z dvema različnima dodatkom inkapsuliranega alternativnega pigmenta razsoljenega mesa (sveži CCMP in staran CCMP – 4 dni na sobni temperaturi), pripravljenega iz hemina s pomočjo nitrozirnega sredstva in reducentov (Na-askorbat in vitamin E). Med pripravo mesne emulzije smo dodali še fosfatni preparat s komercialnim imenom "Mesolex" (proizvod Kolinske, prehranske industrije, d. d. Ljubljana), nitritno sol z 0,5-0,6 % količino nitrita in začimbe (proizvod Kolinske, prehranske industrije, d. d. Ljubljana). Tako smo izdelali 6 skupin mesnih emulzij, in sicer vsako v štirih ponovitvah. Po polnjenju emulzij v ovitke (umetne, nepropustne, premera 19,10 mm), barjenju in hlajenju smo opravili instrumentalno analizo reoloških lastnosti (teksture) z mnogonamenskim aparatom za merjenje teksturnih lastnosti, analizo barve prereza emulzije s kromometrom Minolta CR 200 b in senzorično analizo (zunanji videz, profil barve, videz prereza, profil teksture in arome) mesnih koagulatov. Kemijsko smo določili osnovno kemijsko sestavo emulzij (vsebnost vode, pepela, beljakovin, maščob in mineralov).

Rezultate senzorične, kemijske in instrumentalne analize barve ter instrumentalne analize reoloških lastnosti emulzij smo statistično obdelali s primernimi metodami.

3.3.1 Merjenje temperature svežega mesa

Temperaturo odtajanega zmrznjenega mesa smo izmerili z vbodnim termometrom Ellab ctd 85 (Ellab, Danska).

3.3.2 Merjenje vrednosti pH svežega mesa

Za direktno merjenje vrednosti pH vzorcev mesa, iz katerega smo v nadaljevanju pripravljali koagulate mesnih emulzij smo uporabljali že pripravljeno homogenizirano maso in vbodno kombinirano stekleno gelsko elektrodo tipa 03 (Testo pH elektroda), priključeno na pH meter (Testo 230, Testo, Italija). Natančnost merjenja je bila $\pm 0,01$ enote. Pred merjenjem smo pH meter umerili s pufroma za umerjanje (pH 5,00 in pH 7,00). Elektrodo smo zabodli v homogeniziran vzorec mesa in odčitali vrednost pH. Pred naslednjim merjenjem smo elektrodo dobro sprali z destilirano vodo in obrisali.

3.3.3 Postopek izdelave mesnih emulzij

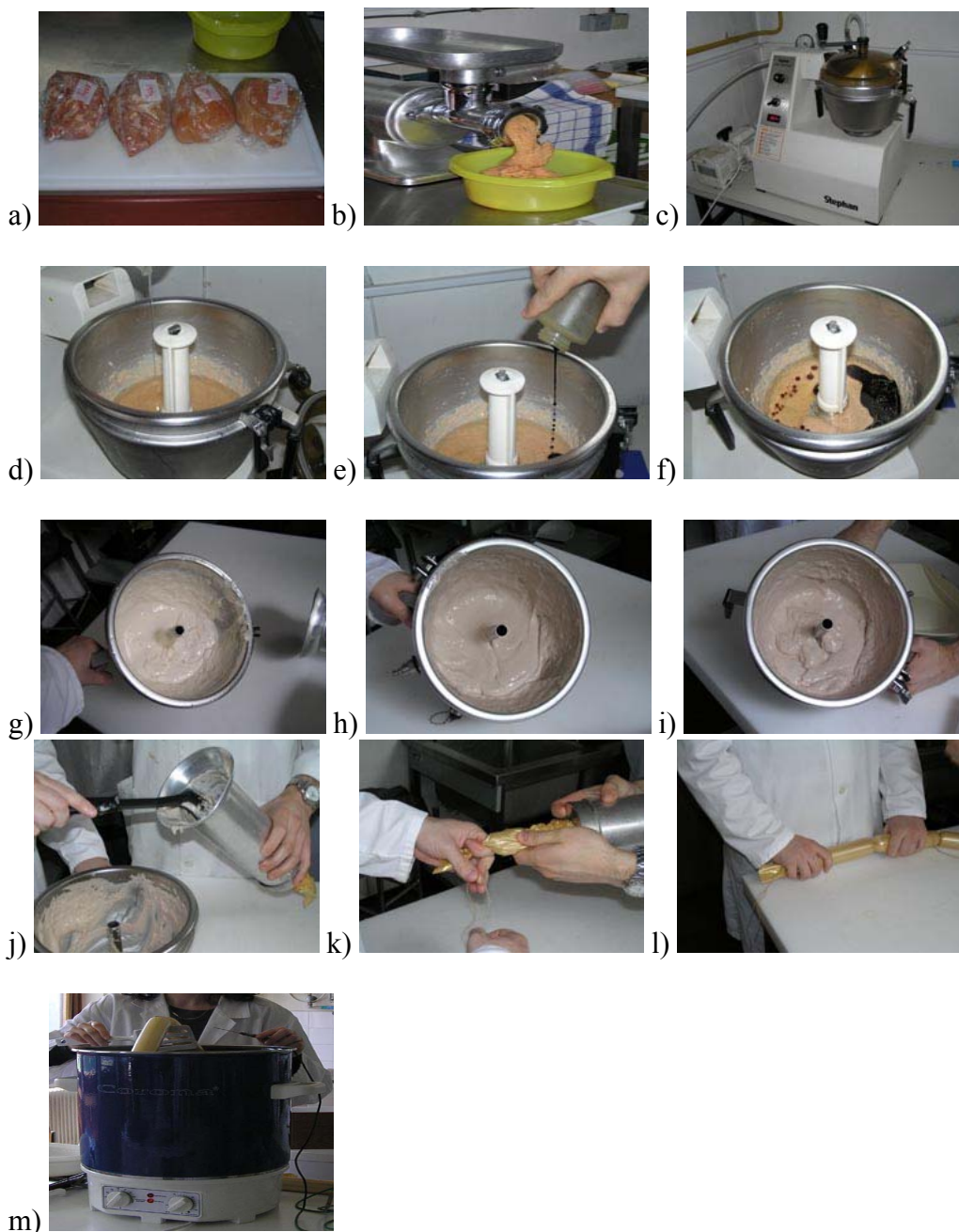
Preglednica 12 Sestava mesnih emulzij.

Table 12 Recipe of meat emulsions.

sestavine	delež (%)	g
piščančje meso (prsna, bedra)	42	420
100 % sončnično olje	28	280
led	30	300
skupaj	100	1 000
kuhinjska/nitritna sol (NaCl)	1,565	15,65
Mesolex	0,9	9

Za poskus smo zmrznjeno meso odtajali, mu izmerili temperaturo (ki je bila od 2 do 6 °C) in vrednost pH (ki je bila v prsah 6,09 in bedrih 6,50) in ga zmleli v volku skozi luknjačo premera 0,5 cm. S hladno vodo umit lonc vakuumskega kutra Stephan UMC 5 electronic (Stephan Nahrungsmittel und Verfahrenstechnik, Nemčija) smo postavili za 10 min v zmrzovalnik, potem smo vanj dodali pripravljeno zmleto meso (ohlajeno na 4 °C), sol, aditiv in ½ ledenega drobirja (preglednica 12). V loncu smo s pomočjo vakuumske črpalke izsesali zrak in tako ustvarili 70 % vakuum ter vsebino razdevali pri 2 100 obratih/minuto do minimalne temperature emulzije 2 °C, nato smo vanjo dodali olje in nitrit oziroma pripravljen inkapsuliran CCMP (svež ali staran, oba sta bila predhodno prav tako v hladilniku). Sledilo je ponovno vakuumiranje na 70 % in razdevanje pri 2 100 obratih/minuto. Ko se je temperatura dvignila na 11 °C, smo v emulzijo dodali preostanek (½) ledu. Ponovno je sledilo vakuumiranje na 70 % in razdevanje pri 3 000 obratih/minuto. Proces smo zaključili, ko se je temperatura dvignila na 12 °C. Nadev za emulzije smo polnili z ročnim batnim polnilnikom v umetne ovitke premera 19,10 mm. Sledila je termična obdelava emulzij v loncu do središčne temperature 72 °C, ki je bila izmerjena z vbodnim termometrom. Kontrolne emulzije z dodanim natrijevim nitritom smo pred obdelavo pustili stati na sobni temperaturi 4 ure. Temu postopku je sledilo postopno hlajenje emulzije s hladno vodo, s temperaturo 18 °C in nato dokončna ohladitev v hladilniku na temperaturo 4 °C. Na sliki 36 so podrobneje predstavljene posamezne tehnološke faze izdelave mesnih emulzij.

3.3.4 Predstavitev tehnoloških faz izdelave emulzij



Slika 36 Tehnološke faze izdelave emulzij.

Figure 36 Technological phases for the preparation of the emulsions.

Legenda: a) Stehtano odtajano piščančje meso (prsa ali bedra); b) Mletje v volku; c) Razdevanje v vakuumskem kutru Stephan UMC 5 electronic; d) Dodatek olja k mesni emulziji; e) Dodatek inkapsuliranega CCMP-ja k mesni emulziji; f) Prehajanje inkapsuliranega CCMP-ja v mesno emulzijo; g) Mesna emulzija z dodatkom nitrita; h) Mesna emulzija z dodatkom svežega inkapsuliranega CCMP-ja; i) Mesna emulzija z dodatkom staranega inkapsuliranega CCMP-ja; j) Polnjenje emulzije v ročni batni polnilec; k) Polnjenje emulzije v umetne ovitke; l) Frkanje; m) Toplotna obdelava mesnih emulzij.

3.4 SENZORIČNA ANALIZA

Senzorično analizo je opravil panel sestavljen iz štirih izkušenih ocenjevalcev s testom "točkovanja lastnosti" iz skupine analitičnih deskriptivnih testov (Sensory evaluation guide for testing food and beverage products, 1981). Senzorično so se v vseh lastnostih ocenjevale 2 mm rezine svežih vzorcev mesnih emulzij, razen v primeru rožnatega odtenka barve posamezne mesne emulzije, ko so bili vzorci ocenjevani tudi še po enournem skladiščenju na sobni temperaturi pri 20 °C in v hladilniku pri 4 °C.

Ocenjevalci so za senzorično ocenjevanje uporabili nestrukturirano točkovno lestvico (1-7 točk), kjer višja ocena pomeni boljše izraženo senzorično lastnost ali pa lestvico (1-4-7 točk), kjer srednja vrednost pomeni optimalno izraženo lastnost.

Ocenjene so bile naslednje senzorične lastnosti:

PROFIL BARVE PREREZA

Rožnat odtenek barve in njeno intenzivnost ocenimo vizualno na prečnem prerezu mesne emulzije (koagulata).

Rožnat odtenek barve (1-7 točk):

- 7 – značilen rožnat (rožnato rdeči) odtenek (niansa) barve – zelo izražen,
- 1 – močno spremenjen odtenek (niansa) barve – slabo izražen, neznačilen, presvetel ali pretemen.

Intenzivnost barve (1-7 točk):

- 7 – primerna intenzivnost barve,
- 1 – slabo izražena, presvetla, bleda oziroma sivkasta, neintenzivna barva.

PROFIL TEKSTURE

Stabilnost emulzije ocenimo vizualno na prečnem prerezu mesne emulzije, teksturo pa med grizenjem mesne emulzije v ustih.

Stabilnost (1-7 točk):

- 7 – stabilna emulzija (vzorec ne odpušča tekočine),
- 1 – nestabilna emulzija (vzorec močno odpušča tekočino).

Tekstura (1-4-7 točk):

- 7 – gumijasta, težje žvečljiva tekstura mesne emulzije,
- 4 – odlična, primerna tekstura emulzije s finim, gladkim, nežnim, prijetnim občutkom v ustih,
- 1 – mesna emulzija je drobljiva, razpadajoča, groba, zrnata ali hrapava z močno obloženostjo ust z drobci.

PROFIL AROME

Med vonjanjem mesne emulzije zaznamo značilnost vonja in prisotnost tujih vonjev, med okušanjem v ustih pa specifično značilno aromo razsoljenega mesa in prisotnost morebitnih priokusov.

Značilnost vonja (1-7 točk):

- 7 – odlično izražen, značilen vonj mesne emulzije,
- 1 – zelo slabo izražen, neznačilen vonj emulzije.

Tuji vonji (1-7 točk):

- 7 – močno prisoten tuj vonj v mesni emulziji,
- 1 – tuj vonj v mesni emulziji ni prisoten.

Značilnost arome (1-7 točk):

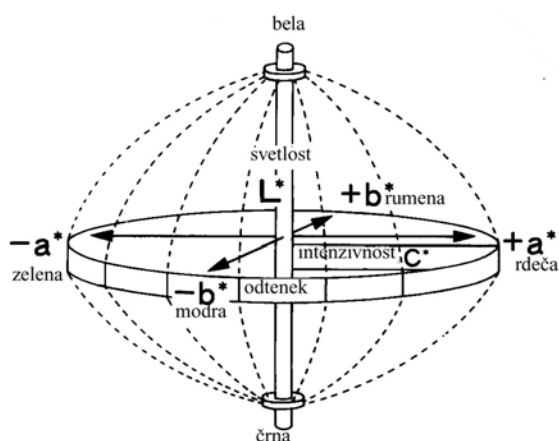
- 7 – odlična, značilna in polna aroma mesne emulzije iz piščančjega mesa,
- 1 – prazna, neizrazita, nezaželjena oziroma neznačilna aroma mesne emulzije.

Priokusi (1-7 točk)

- 7 – močno izraženi priokusi v mesni emulziji
- 1 – v mesni emulziji ni zaznani priokusov.

3.5 INSTRUMENTALNO MERJENJE BARVE MESNIH EMULZIJ

Človeško oko zazna vsako barvo kot kombinacijo rdeče, zelene in modre barve. To so izkoristili v tehnične namene in sestavili aparat za merjenje barve – kromometer. Kromometer deluje na principu človeškega očesa. Barvo vzorca razdeli na tri komponente, ki jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu, in poda rezultate v L, a in b koordinatah.



Slika 37 CIE L^* , a^* , b^* - barvni prostor (Murray, 1992).

Figure 37 CIE L^* , a^* , b^* - colour area (Murray, 1992).

Za instrumentalno analizo barve mesnih emulzij smo uporabili kromometer Minolta CR 200b, ki je priključen na računalnik DATA DP 100. Merili smo barvo koagulatov mesnih emulzij v osnovnem sistemu x, y, z , s koordinatami Y, x, y ali pa v izpeljanih sistemih barv, med katerimi je najpomembnejši L^*, a^*, b^* sistem (slika 37). V našem primeru je bila barva merjena po slednjem sistemu.

Uporabljeni kromometer ima na merilni glavi odprtino premera 8 mm in na tej površini tudi izmeri barvo. Pred vsako meritvijo je potrebno aparat umeriti na bel standard ($Y = 93,8000, x = 0,3134, y = 0,3208$) (Gašperlin, 1998). Barva je bila izmerjena na svežem rezu kakor tudi po enournem skladiščenju vzorcev na sobni temperaturi ($\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$) in temperaturi hladilnika ($4\text{ }^\circ\text{C}$). Koagulat mesne emulzije smo vzdolžno prerezali in na vsaki polovički (levi in desni) na dveh mestih izmerili barvo. Tako je rezultat povprečje štirih meritev. Računalnik je podal L^*, a^* in b^* vrednosti:

- L^* vrednost meri svetlost vzorca – čim višja je vrednost (+L), bolj svetel je vzorec; čim nižja je vrednost (-L), temnejši je vzorec,
- a^* vrednost pomeni prisotnost rdečega odtenka – čim višja je vrednost (+a), bolj rdeč je vzorec (in s tem manj zelen); čim nižja je vrednost (-a), bolj zelen je vzorec in s tem manj rdeč,
- b^* vrednost pa meri rumeni odtenek – čim višja je vrednost (+b), bolj rumen je vzorec (in s tem manj moder); čim nižja je vrednost (-b), bolj moder je vzorec in s tem manj rumen.

3.6 DOLOČANJE OSNOVNE KEMIJSKE SESTAVE MESNIH EMULZIJ

Za določanje kemijske sestave mesnih emulzij smo vzorce homogenizirali s kuhinjskim sekjalnikom do pastozne mase in jo shranili v polietilenske vrečke ter jo do analiz zmrznili v zmrzovalni komori pri $-21\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$.

3.6.1 Določanje vsebnosti vode s sušenjem

Vsebnost vode v mesnih emulzijah smo določili po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 950.46 Moisture in Meat (AOAC 950.46, 1997).

3.6.2 Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi

Vsebnost skupnih mineralnih snovi v mesnih emulzijah smo določili po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 920.153 Ash of Meat (AOAC 920.153, 1997).

3.6.3 Določanje vsebnosti maščob po Weibullu in Stoldtu

Vsebnost maščob v mesnih emulzijah smo določili po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 991.36 Fat (Crude) in Meat and Meat Product (AOAC 991.36, 1997).

3.6.4 Določanje vsebnosti beljakovin z metodo po Kjeldahlu

Vsebnost beljakovin v mesnih emulzijah smo določili po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 928.08 Nitrogen in Meat Kjeldahl Method (AOAC 928.08, 1997).

3.7 INSTRUMENTALNO MERJENJE REOLOŠKIH LASTNOSTI EMULZIJ

Meritve reoloških lastnosti koagulatov mesnih emulzij so bile opravljene z mnogonamenskim aparatom za mehanično testiranje Texture Analyser XT. plus, na koščkih koagulatov (ustrezne oblike in velikosti, odvisno od posamezne analize), kateri so bili po pripravi postavljeni za eno uro v hladilnik na temperaturo 5 °C. Aparat sestavljajo testirni nastavek, senzibilni in mehanski element ter računalnik.

1. Merjenje rezne trdnosti z Warner Blatzlerjevim nastavkom – Warner Blatzler giljotine (HDP/BSG, Stable Micro Systems); iz pripravljene mesne emulzije smo z luknjačem (plutovrtom) premera 8 mm naredili 4 cilindre – valje v smeri polnjenja, ki so bili visoki 2 cm. Rezilo je s hitrostjo 3 mm/s prerezalo vzorec v smeri, ki je pravokotna na to smer (na smer polnjenja). Na vsakem koščku smo rezno trdnost izmerili na enem mestu, rezultat pa je povprečje 4 meritev. Rezna trdnost je izražena kot odpor vzorca na rezanje. Na diagramu na računalniku smo odčitali silo, ki je bila potrebna v N (Newtonih). Večja kot je bila sila vreza, večja je bila rezna trdnost.
2. Merjenje strižno-tlačne trdnosti s Kramerjevim nastavkom – Kramerjeva celica s 5 ploščami (rezili); 8 cm kos mesne emulzije smo prerezali vzdolžno v smeri polnjenja na polovico (oblika razpolovljenega valja) in na eni od njiju je rezilo s 5 ploščami s hitrostjo 3 mm/s prerezalo vzorec v smeri, ki je pravokotna na smer polnjenja. Na posamezni polovici je komplet petih plošč izmeril silo dvakrat, tako da je dobljen rezultat njuno povprečje. Strižno-tlačna trdnost je izražena kot odpor vzorca na deformacijo. Na diagramu na računalniku smo odčitali silo, ki je bila potrebna v N (Newtonih).
3. Merjenje tlačne sile (tlačne trdnosti) s cilindričnim nastavkom P 100 (premer bata $\phi = 100$ mm). Iz pripravljene emulzije smo oblikovali dva valja v dolžini 2 cm vzporedno s smerjo polnjenja. Cilindrični nastavek je s hitrostjo 3 mm/s stisnil vzorec v smeri polnjenja nadeva. Na posameznem valju smo s cilindričnim valjem izmerili na enem mestu potrebno silo. Glede na dve meritvi je končni rezultat njuno povprečje. Na diagramu na računalniku smo odčitali silo v N (Newtonih).

3.8 ANALIZA SINTETIZIRANEGA CCMP-ja S POMOČJO ELEKTRONSKE PARAMAGNETNE RESONANCE

3.8.1 Opis EPR spektrometra

Deli tipičnega EPR spektrometra so predstavljeni na sliki 33, na sliki 38 pa je fotografija spektrometra Bruker ESP 300E na katerem smo opravljali meritve.



Slika 38 **Fotografija EPR spektrometra Bruker ESP 300 E.**
Figure 38 **The photograph of the EPR spectrometre Bruker ESP 300 E.**

3.8.2 Material in priprava vzorcev

Meritve smo izvajali v EPR kvarčnih cevkah (z notranjim premerom 3 mm), z X-pasovnim spektrometrom "Bruker ESP 300E" (slika 38). Pri tem smo pazili na temperaturno stabilizacijo vzorcev v resonatorju. CCMP smo v EPR kvarčne cevke prenesli v komori za argonom s pomočjo dolge steklene kapalke, da smo preprečili oksidacijo vzorca.

Poskuse EPR smo napravili na treh serijah posameznega pigmenta. Vsako meritev smo ponovili na paralelnih vzorcih 3-5 krat. Meritve smo opravili pri naslednjih pogojih merjenja:

- temperatura 140 °K,
- mikrovalovna frekvenca 9,62 GHz,
- moč mikrovalov 10 mW,
- modulacijska frekvenca 100 kHz,
- modulacijska amplituda 0,1 mT,
- magnetno polje spreminjano v območju 280-380 mT,
- ojačanje odvisno od števila paramagnetnih centrov v vzorcu.

Z metodo EPR smo merili izkoristek sinteze in spremljali stabilnost vzorca, tako da smo pigment v vzorcih spremljali v različnih časovnih intervalih. Ker je koncentracija pigmenta v vzorcih premosorazmerna z intenziteto spektralnih črt, je njihova stabilnost prikazana kot sprememba intenzitete EPR spektra v odvisnosti od časa. Intenziteto izračunamo kot dvojni integral EPR spektra (ki je prvi odvod absorpcijske krivulje).

3.9 VGRAJEVANJE CCMP-ja V RAZLIČNE SISTEME

3.9.1 Disperzija v polivinilnem alkoholu

Disperzijo polimera v polivinilnem alkoholu (Mowiolu) smo pripravili tako, da smo v 50 ml pripravljene raztopine Mowiola treh različnih molskih mas (PVA 4-98, PVA 10-98, PVA 20-98) in koncentracij (0,1 %, 1 %, 5 %) dodali 1 ml sintetiziranega pigmenta CCMP, raztopljenega v acetonu.

3.9.2 Vgrajevanje v polimerne nanodelce z emulzijsko difuzijsko metodo

V epruveto s premerom 14 mm smo točno natehtali raztopino polimera (5 % Eudragit S 100 – kopolimer metakrilne kisline in metilmetakrilata, 1:2) (Eudragit S 100 – firma Röhm) v benzilnem alkoholu (1,05 g) (benzilni alkohol – firma Fluka) in z avtomatsko pipeto odpipetirali celotno količino sintetiziranega CCMP-ja iz ene centrifugirke (brez, da bi ga predhodno kje topili – količina je bila približno 1,5 ml). Pri tem smo pazili, da je bil prenos CCMP-ja zelo hiter. Med homogeniziranjem z rotor-stator homogenizatorjem (10 mm nastavek) smo počasi dodajali vodno raztopino polivinilnega alkohola (10 % Mowiol 4-98) (2 g). Najprej je nastala emulzija tipa V/O, ki je ob zadostni količini vodne faze prešla v emulzijo tipa O/V. Emulzijo smo pri 15 000 obr/min homogenizirali 4 minute, nato smo dodali bidestilirano vodo (2,5 ml) in homogenizirali še 1 minuto (ta korak je bil vpeljan zaradi manjše izgube emulzije pri prelivanju). Celotna sinteza nanodelcev z rotor-stator homogenizatorjem je potekala v čaši z ledeno kopeljo. Vsebinsko epruvete smo prelili v 200 ml čašo in dolili preostalo vodo (33 ml) ter mešali 5 minut na mešalniku s propelerskim mešalom. Med nastankom nanodelcev smo spremljali njihovo barvo in jim izmerili velikost z aparatom imenovanim Zetasizer.

3.9.3 Vgrajevanje v trdne lipidne nanodelce

Izdelali smo 3 g disperzije. V epruveto smo natehtali (0,05 g) Dynasan 166 lipid in 0,02 g Phospholipon 80 ter dodali 1,5 ml sintetiziranega CCMP-ja iz ene centrifugirke, v čašo pa sterični stabilizator Pluronic F 68, ki smo ga nato raztopili v predpisani količini bidestilirane vode. Lipidno fazo v epruveti smo segrevali na vodni kopeli pri temperaturi tališča lipida (cca. 75 °C), nato pa smo dodali na enako temperaturo segreto vodno fazo. Z 8 minutnim mešanjem (Ultraturax) pri 20 000 obr/min in konstantni temperaturi smo pripravili emulzijo O/V. Med hlajenjem (10 min) pri 5 000 obr/min so lipidne kapljice otrdile in nastali so trdni lipidni nanodelci.

3.10 INKAPSULACIJA SINTETIZIRANEGA CCMP-ja

3.10.1 Inkapsulator Inotech IE-50 R

Inkapsulator IE-50 R je polavtomatizirani instrument, ki se uporablja za inkapsuliranje živalskih, rastlinskih in mikrobnih celic kot tudi drugih biomolekul in spojin. Tehnika tvorbe kapljic temelji na dejstvu, da je mogoče laminarni curek tekočine razbiti v homogene kapljice, če je curek podvržen vibraciji pri optimalnih pogojih (Instruction Manual for the Inotech Encapsulator Research IE – 50 R, 2002).

Instrument omogoča:

- izdelavo mikrodelcev,
- ponovljivost pogojev za izdelavo mikrodelcev med serijami (parametri, kot so frekvenca, amplituda, napetost, hitrost toka curka, hitrost mešala in premer šobe so nastavljivi),
- velik velikostni razpon izdelanih mikrodelcev (od 100 μm do 1 000 μm in več),
- ozko distribucijo porazdelitve velikosti mikrodelcev (ob uporabi čistega alginata je relativna standardna deviacija velikosti mikrodelcev približno 5 %),
- takojšnjo kontrolo procesa (s pomočjo stroboskopske luči lahko kontroliramo kapljice že med samo izdelavo),
- visoko produktivnost (instrument omogoča izdelavo 50-3 000 mikrodelcev na sekundo, odvisno od njihove velikosti in viskoznosti polimerne raztopine).

Glavna sestavna dela inkapsulatorja sta kontrolna enota z električnimi in pnevmatskimi sistemi in reakcijska posoda (slika 39).



Slika 39 Kontrolna enota z reakcijsko posodo.

Figure 39 The control unit with reaction vessel.

Sistemi, ki omogočajo nadzor in nastavitev različnih parametrov za kontrolirano proizvodnjo mikrodelcev, so na kontrolni enoti. To so enota za nastavitev in kontrolo relativne hitrosti tlačilke za brizgo, enota za kontrolo frekvence in amplitude elektromagneta membrane (vibracijska enota), enota za kontrolo električnega naboja, regulator tlaka, enota za kontrolo hitrosti magnetnega mešala in stroboskop, s katerim kontroliramo izdelavo mikrodelcev. Reakcijska posoda je priključena kontrolni enoti. Brizga, skozi katero dovajamo notranjo fazo, ima ločeno kontrolno enoto z lastnim električnim napajanjem in omogoča le nastavljanje relativne hitrosti pretoka notranje faze. Vse dele instrumenta, ki so v direktnem stiku z mikrodelci, lahko steriliziramo z avtoklaviranjem in tako zagotovimo sterilno proizvodnjo.

Raztopino za pripravo mikrodelcev lahko dovajamo na dva načina bodisi s pomočjo brizge ali pa iz posode pod tlakom, v kateri imamo raztopino produkta. Brizgo uporabljamo pri manjših volumnih (< 60 ml) in kadar je potrebna natančna kontrola hitrosti pretoka raztopine. Kadar uporabljamo večje volumne in potrebujemo večje pretoke polimerne raztopine, se uporablja posoda. Ob uporabi brizge, uravnavamo hitrost curka s pomočjo enote za nastavitev relativne hitrosti na kontrolni enoti. Hitrost lahko spreminjamo od

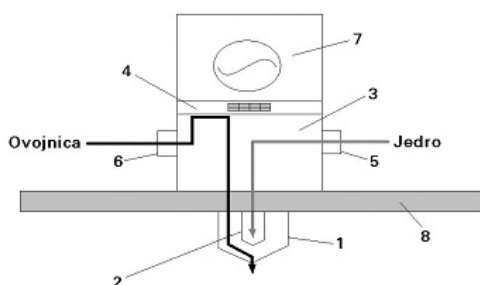
vrednosti 0 pa do 1 000, dejanska hitrost curka je odvisna tudi od premera uporabljene šobe in volumna brizge. Kadar pa dovajamo produkt iz posode je hitrost pretoka kontrolirana s tlakom, vrednosti le-tega se gibljejo od 0,3 do 1 bar. Tudi v tem primeru je hitrost curka odvisna od uporabljene šobe in viskoznosti raztopine.

Frekvenco, s katero niha membrana, lahko nastavljamo v dveh območjih. V nižjem območju lahko nastavimo približne vrednosti od 50 do 440 Hz, v višjem pa od 430 do 7 000 Hz. Nastavitev amplitude je relativna in ima razpon od 1 do 7. Višje amplitude se uporabljajo pri bolj viskoznih raztopinah, vendar vpliv ni tako velik. Električna napetost je potrebna za preprečevanje zlepljanja delcev. Največkrat se uporablja napetost med 400 in 1 800 V.

Inkapsulator Inotech IE-50 R omogoča tako izdelavo mikrodelcev (npr. alginat-poli-L-lizin-alginat mikrodelcev) kot tudi inkapsuliranje tekočih hidrofilnih in hidrofobnih spojin s pomočjo koncentričnega sistema šob (dvokanalna šoba). Koncentrični sistem šob z ustrezno pulzacijsko glavo, predstavlja dodatno opremo sistema z enojno šobo.

Sestavni deli enote s koncentrično šobo so:

- koncentrična šoba, sestavljena iz šobe skozi katero teče zunanja faza (slika 40/1) in šobe skozi katero teče notranja faza (slika 40/2),
- koncentrična pulzacijska glava s pulzacijskim telesom (slika 40/3) in membrano (slika 40/4).



Slika 40 Shematska predstavitev sistema koncentrične šobe.

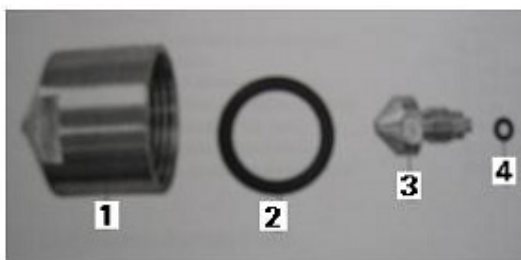
Figure 40 The schematic presentation system concentrated nozzle.

Legenda: 1. Šoba zunanje faze; 2. Šoba notranje faze; 3. Koncentrično pulzacijsko telo; 4. Membrana; 5. Priključek za brizgo z notranjo fazo (jedro); 6. Priključek za brizgo z zunanjo fazo (ovojnica); 7. Tuljava; 8. Krovna plošča.

Enota s koncentrično šobo je montirana na krovno ploščo (slika 40/8). Membrana (slika 40/4) in tuljava (slika 40/7) sta enaki kot pri sistemu z enojno šobo.

Koncentrična šoba visoke kakovosti je ključna za produkcijo homogenih in koncentričnih mikrodelcev. Dve natančno zvrtni šobi zagotavljata ustrezno formacijo laminarnega curka. Premeri odprtin segajo od 100 do 1 000 μm . Razumljivo je, da mora biti premer notranje šobe manjši od premera zunanje. Podobno kot pri sistemu z eno šobo je tudi pri delu z dvokanalno šobo premer mikrodelcev (premer notranje in zunanje faze) močno odvisen od premera uporabljene šobe. V splošnem je premer mikrodelcev dvakrat večji od

premera šobe. V nasprotju s tem pa lahko premer jedra mikrodelca variira v širšem območju, od 1 do 2,5-kratnik premera šobe, skozi katero teče notranja faza (slika 41).



Slika 41 Sistem koncentrične šobe iz nerjavečega jekla.

Figure 41 The system concentrated nozzle made of stainless steel.

Legenda: 1. Šoba zunanje faze; 2. Tesnilo zunanje šobe; 3. Šoba notranje faze; 4. Tesnilo notranje faze.

3.10.2 Princip delovanja

Snov, ki jo inkapsuliramo (celice, mikroorganizmi, biomolekule, pigmenti, spojine: hidrofobna ali hidrofilna tekočina) damo v injekcijsko brizgo (slika 42/1) ali v produkcijsko steklenico (slika 42/2). Enako storimo z materialom za ovojnico (raztopina polimera – alginat), ki ga damo v injekcijsko brizgo (slika 42/3) oziroma produkcijsko steklenico (slika 42/4). Obe raztopini pritiska v smeri koncentrične šobe določenega premera injekcijska tlačilka (slika 42/S) ali s kompresorjem stisnjen zrak (slika 42/P). Raztopini nato stečeta skozi natančno zvrtno koncentrično šobo (slika 42/7), kjer se ustvari laminaren curek, sestavljen iz obeh faz, tako da zunanja obliva notranjo. Razbitje curka omogoča membrana na zadnjem delu šobe, ki niha z določeno frekvenco. Kapljice, ki se tvorijo padajo skozi električno polje med koncentrično šobo (slika 42/7) in elektrodo (slika 42/8), kar ima za posledico tvorbo površinskega naboja. Elektrostatične odbojne sile tako razpršijo kapljice in preprečijo njihovo zlepljanje, preden te padejo v raztopino premreževalca. V raztopini premreževalca kapljice pustimo mešati nekaj časa, da poteče premreženje in učvrstitev strukture, s tem pride do nastanka mikrodelcev. S spreminjanjem procesnih spremenljivk in lastnosti polimera lahko pripravimo mikrodelce različnih velikosti (Instruction manual for the inotech encapsulator research IE-50 R, 2002).

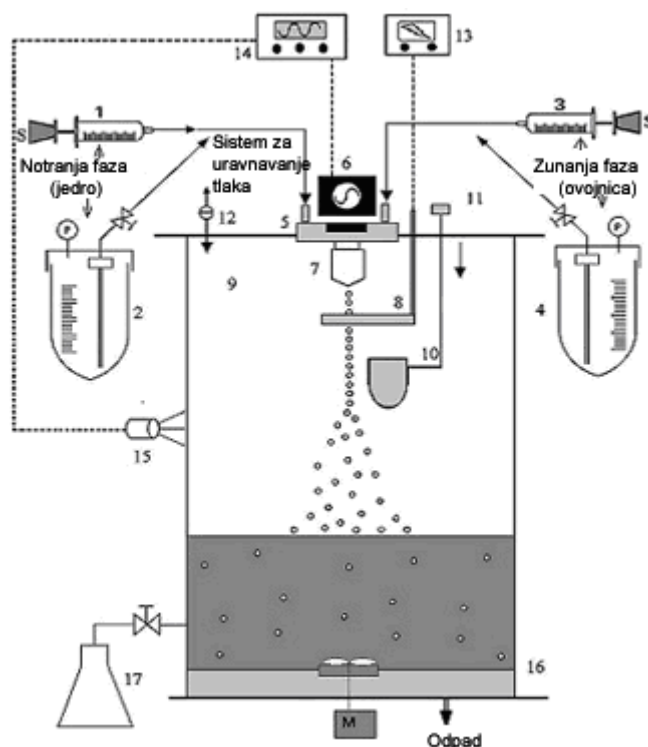
Velikost mikrodelcev je moč nadzorovati s spreminjanjem naslednjih parametrov:

- vibracijske frekvence,
- premera notranje in zunanje šobe,
- hitrosti pretoka obeh tekočin,
- fizikalnih lastnosti polimera in snovi, ki jo inkapsuliramo.

Iskanje parametrov za specifično velikost mikrodelcev zahteva kar nekaj eksperimentalnega dela. Optimalni pogoji za tvorbo mikrodelcev so doseženi, kadar je jasno vidna veriga kapljic, ki padajo mimo stroboskopske luči (slika 42/15). Ko so optimalni pogoji enkrat določeni, jih lahko za proizvodnjo vseh nadaljnjih mikrodelcev z enako sestavo polimera in snovi, ki jo inkapsuliramo, enostavno ponastavimo. Slabo

formirane mikrodcelce, ki nastajajo na začetku in na koncu proizvodnega postopka, prestrežemo z ustrezno zbiralno posodo (slika 42/10).

Ovisno od različnih spremenljivk, nastane od 200 do 2 000 mikrodcelcev na sekundo, te pa zbiramo v reakcijski posodi (slika 42/9), napolnjeni z raztopino premreževalca. Slednjo nenehno mešamo z magnetnim mešalom (slika 42/M), s čimer je preprečena tvorba skupkov. Ob zaključku procesa premreževalno raztopino odtočimo, mikrodcelce pa zadrži za to namenjena filtracijska mreža (slika 42/16). Raztopine za spiranje ali druge reakcijske raztopine dodamo aseptično skozi sterilen membranski filter (slika 42/11). Mikrodcelce lahko v nadaljnjem postopku prenesemo v zbiralno posodo (slika 42/17).



Slika 42 Shematski prikaz inkapsulatorja IE-50 R.

Figure 42 The schematic presentation of the encapsulator IE-50 R.

Legenda: 1. Brizga (jedro); 2. Posoda z raztopino za vgrajevanje (jedro); 3. Brizga (ovojnica); 4. Posoda z raztopino za vgrajevanje (ovojnica); 5. Membrana z magnetom; 6. Vibracijski sistem; 7. Koncentrična šoba; 8. Elektroda; 9. Reakcijska posoda; 10. Posoda za prestrezanje; 11. Filter za tekočine; 12. Zračni filter; 13. Generator električnega naboja; 14. Generator frekvenc; 15. Stroboskopska luč; 16. Filtracijska mreža; 17. Zbiralna posoda za mikrodcelce; M Magnetno mešalo; P Sistem za kontrolo tlaka; S Tlačilka.

Premreženje mikrodcelcev poteka v raztopini premreževalca (v primeru raztopine natrijevega alginata je to največkrat CaCl_2 , uporabljajo pa se tudi drugi večvalentni kationi, kot npr. Ba^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} ...). Da preprečimo zlepljanje mikrodcelcev mešamo raztopino z magnetnim mešalom. Priporočena hitrost mešanja je tista, pri kateri se vidi rahel vrtinec tekočine, sicer pa se je potrebno izogniti večjim hitrostim mešala, saj pride do indukcije močnih strižnih sil, ki vodijo v deformacijo mikrodcelcev. Po določenem času mikrodcelce odstranimo iz raztopine in jih speremo.

Pomembno je, da instrument in vse njegove dele, predvsem šobo, po uporabi dobro očistimo. Šobo speremo s prečiščeno vodo ali etanolom in jo nato še spihamo z zrakom, s čimer preprečimo zamašitev odprtine. Šobo lahko čistimo tudi z 0,01 N NaOH ali 0,01 N H₂SO₄, nikoli pa ne smemo uporabljati HCl, saj bi prišlo v tako kislem mediju do tvorbe precipitata. Šobo tudi nikoli ne dajemo v ultrazvočno kadičko, kar bi lahko razrahljalo safirjev disk (Instruction Manual for the Inotech Encapsulator Research IE – 50 R, 2002).

3.10.3 Potrebni materiali za izdelavo mikrodlecev

- **Polimer:**

Alginska kislina, natrijeva sol, Sigma, Nemčija

(Nizka viskoznost: 2,0 % raztopina pri 25 °C približno 250 mPa×s)

Natrijev alginat sestavlja v večini natrijeva sol alginske kisline, ki je mešanica poliuronskih kislin [(C₆H₈O₆)_n], sestavljena iz D-manuronske kisline in L-guluronske kisline, v glavnem pridobljena iz alg vrste *Phaeophyceae*.

Natrijev alginat je bel ali blede rumeno-rjav prašek, počasi topen v vodi, pri tem tvori viskozno, koloidno raztopino, skoraj netopen je v alkoholu in v vodnih raztopinah alkohola, kjer je vsebnost slednjega večja od 30 % w/w. Netopen je v kloroformu, etru in kislih vodnih raztopinah z vrednostjo pH nižjo od 3 (The Merck Index, 2001, European Pharmacopoeia, 2002).

Razlike med posameznimi vrstami alginskih kislin, ki se kažejo v različnih viskoznostih raztopin alginata ter mehanizem premreževanja z dvovalentnimi in trovalentnimi ioni so opisani v pregledu objav.

- **Notranja faza:**

CCMP – sveže sintetiziran na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete

- **Premreževalci:**

Kalcijev klorid, RIEDEL – de Haën, Nemčija

CaCl₂×2H₂O

Kalcijev klorid vsebuje ne manj kot 97,0 % in ne več kot 103,0 % ekvivalenta CaCl₂×2H₂O. Je bel, kristaliničen prašek, higroskopen, lahko topen v vodi, topen v alkoholu (The Merck Index, 2001, European Pharmacopoeia, 2002).

Aluminijev klorid, MERCK – Schuchardt, Nemčija

AlCl₃, brezvoden

Brevoden aluminijev klorid je rumenkast prašek. Z vodo reagira z eksplozivno silovitostjo, ob čemer se sprosti velika količina toplote. Lahko topen v veliko organskih topilih kot so benzofenon, benzen, nitrobenzen, kloroform itd. (The Merck Index, 2001).

• **Naprave in pripomočki za izdelavo in vrednotenje mikrodelcev:**

Tehtnica	Exacta 300 EB, Tehtnica Slovenija
Propelersko mešalo	Rotamix 405 UM, Tehtnica Železniki, Slovenija
Magnetno mešalo	HI 190 M, Hanna Instruments, Portugalska
Transparentni papir	Carta Ciat – Lucido, Ciat, Italija
Inkapsulator	Encapsulator Inotech IE-50 R, Švica
Brizge	60 ml, Sigma, Švica
Mikroskop	Olympus SZX 12, Japonska
Kamera	Sony 950 P, Japonska

3.10.4 Priprava raztopine polimera

• *Koncentracija raztopine alginata*

Pripravili smo štiri različne koncentracije raztopin alginata, in sicer 1 %, 2 %, 2,5 % in 3%. V prečiščeno vodo smo počasi dodajali alginat ob sočasnem mešanju s propelerskim mešalom, s hitrostjo 1 000 obr/min. Ko smo dodali ves alginat, smo dvignili hitrost mešanja na 2 500 obr/min in mešali nadaljnih 15 minut. Nato smo pustili raztopino 30 minut, da so izplavali vsi mehurčki zraka in šele nato nadaljevali z delom.

3.10.5 Izdelava mikrodelcev

3.10.5.1 Princip razbitja laminarnega toka

Prvo brizgo smo napolnili z raztopino alginata različnih koncentracij, drugo s pigmentom CCMP in na kontrolni enoti nastavili vrednosti parametrov. Najprej smo vklopili pretok raztopine alginata in držali tipko turbo, dokler se ni vzpostavil laminarni curek. Šele nato smo vklopili pretok pigmenta CCMP. Proučevali smo vpliv hitrosti obeh faz, frekvence, električne napetosti in raztopine premreževalca pri konstantni amplitudi (amplituda = 3,5) na tvorbo mikrodelcev s CCMP-jem. Razpršitev curka smo vizualno opazovali s pomočjo stroboskopa. Mikrodelce, ki so se tvorili na začetku in koncu serije, smo lovili v posodico za prestrežanje vzorca.

Parametri nastavitve delovnih pogojev:

- hitrost curka v območju od 195 do 700,
- napetost od 1,20 do 2,0 kV,
- frekvenca z območjem 3 881Hz.

3.10.5.2 Princip metode kapljanja

S šobo širšega premera smo delali po metodi kapljanja. Proučevali smo vpliv hitrosti obeh faz na tvorbo mikrodelcev s pigmentom CCMP, pri čemer nismo izkoriščali funkcije napetosti elektrode. Frekvenca vibriranja membrane je bila vedno nastavljena na vrednost 6 522 Hz, a le zato, ker aparaturna ne omogoča ločenega vklopa stroboskopske luči in frekvence vibriranja membrane. Z izklopljeno stroboskopsko lučjo pa ni mogoče spremljati polnjenja mikrodelcev s CCMP-jem. Amplitude med delom nismo spreminjali, njena vrednost je bila vselej 3,5.

3.10.5.3 Premreževanje mikrodolcev

Premreževanje mikrodolcev je potekalo v 0,3 M raztopini CaCl_2 , v 0,05 M raztopini AlCl_3 . Naredili smo tudi poskus, v katerem smo mikrodolce najprej premrežili v 0,3 M raztopini CaCl_2 , jih nato sprali s prečiščeno vodo ter jih prenesli še v raztopino 0,05 M AlCl_3 . Za posamezno serijo smo uporabili približno 0,3 L raztopine premreževalca. Raztopino z mikrodolci smo nato z magnetnim mešalom mešali najmanj eno uro in največ 24 ur.

Brezvodni AlCl_3 , ki smo ga imeli na voljo, je reagiral z vodo izredno silovito, zato smo ga nezaprtega teden dni hranili v laboratoriju, da je prišlo do vezave zračne vlage. Tako hidriran AlCl_3 se je v vodi raztapljal brez težav.

3.10.5.4 Spiranje mikrodolcev

Mikrodolce smo najprej z odsesavanjem ločili od raztopine premreževalca, jih sprali z najmanj enim litrom prečiščene vode in jih nato prenesli še v čašo s prečiščeno vodo ter mešali z magnetnim mešalom 1 minuto. Mikrodolce smo nato ponovno ločili z odsesavanjem. Če želimo mikrodolce sušiti, je namreč nujno, da z njihove površine temeljito speremo ostanek premreževalnih ionov ter CCMP, ki se ni ujel v mikrodolce in je ostal na površini premreževalne raztopine. Če tega ne storimo, pride med procesom sušenja do zlepljanja mikrodolcev, čemur se želimo v čim večji meri izogniti.

3.10.5.5 Sušenje mikrodolcev na papirju

Mikrodolce smo ročno razprostrli po transparentnem papirju. Struktura in sestava tega papirja je omogočala učinkovit kapilarni vlek vode s površine mikrodolcev. Sušenje manjših mikrodolcev je bilo neprimerno bolj zapleteno, kot sušenje mikrodolcev z večjim premerom, saj jih je bilo precej težje ločiti že v fazi razporejanja po sušilnem papirju. Dobra ločba mikrodolcev pred sušenjem je bila ključna, sicer so se stikajoče alginatne ovojnice med sušenjem zlepile in jih po sušenju skoraj ni bilo mogoče več ločiti. Mikrodolce smo sušili pri sobni temperaturi, najmanj 24 ur, a se je to izkazalo kot zelo neprimerno.

3.11 STATISTIČNA ANALIZA

V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili ter obdelali s programom Microsoft Excel 2000. Tako urejene podatke smo statistično analizirali z računalniškim programom SAS (SAS/STAT Software, 1999) po metodi najmanjših kvadratov z uporabo GLM postopka (General Linear Models). S statističnim modelom za fizikalno-kemijske in instrumentalne parametre ter senzorične lastnosti smo proučili vpliv vrste mišice (M), dodatka za oblikovanje barve (D), interakcije med vrsto mišice in dodatkom za oblikovanje barve (M^*D), ponovitve (PON) in paralelke oziroma ocenjevalca (PAR):

$$y_{ijklm} = \mu + M_i + D_j + M^*D_{ij} + \text{PON}_k + \text{PAR}_l + e_{ijklm} \quad (\text{model})$$

kjer je y_{ijklm} = $ijklm$ -to opazovanje, μ = povprečna vrednost, M_i = vpliv uporabljene mišice (1 = prsa, 2 = bedra), D_j = vpliv dodatka za oblikovanje barve (1 = nitrit, 2 = sveži inkapsuliran CCMP, 3 = staran inkapsuliran CCMP), M^*D_{ij} = vpliv interakcije i -te mišice in j -tega dodatka za oblikovanje barve, PON_k = vpliv ponovitve (1-2 za kemijske analize

oziroma 1-4 za ostale analize), PAR_1 = vpliv paralelke oziroma ocenjevalca (1-2 za kemijske analize oziroma 1-4 za ostale analize) in e_{ijklm} = rezidualni ostanek.

Za izračun srednjih vrednosti eksperimentalnih skupin smo uporabili Duncanov test in jih primerjali pri 5 % tveganju. Pearsonove korelacijske koeficiente (r) med fizikalno-kemijskimi in instrumentalnimi parametri ter senzoričnimi lastnostmi smo izračunali s pomočjo CORR postopka SAS statističnega paketa za obdelavo podatkov.

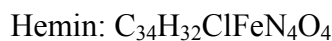
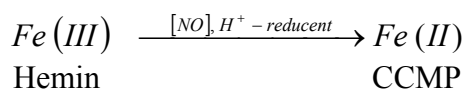
4 REZULTATI

4.1 SINTEZA PIGMENTA TOPLOTNO OBDELANEGA RAZSOLJENEGA MESA (CCMP)

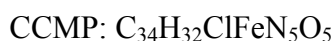
Pigment CCMP smo sintetizirali iz govejega hemina (kemijska formula $C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$) s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO) in reducentov (Na-askorbat in vitamin E), pri čemer je bila osnova modificirana metoda, ki sta jo uporabila Shahidi in Pegg (1991 in 1993a) in je podrobno opisano v poglavju 3.2.

4.2 IZRAČUN IZKORISTKA SINTEZE CCMP-ja

Hemin ima železo v 3+ obliki, zato ga z elektronsko paramagnetno resonanco ne vidimo in ga tudi ne moremo pomeriti. Pri sintezi CCMP-ja se hemin z dušikovim monoksidom reducira v pigment z železom v 2+ obliki, ki je z EPR spektroskopijo viden. Iz dobljenega spektra lahko izračunamo intenziteto, ki je sorazmerna koncentraciji CCMP-ja (mol/l) oziroma številu paramagnetnih centrov v vzorcu.



↓ + NO skupina



Molska masa hemina je 651,577 g/mol, molska masa CCMP-ja pa 681,583 g/mol. Pri tem smo predpostavili, da se na Fe^{2+} v hemu veže le ena molekula NO s koordinativno vezjo.

Za sintezo smo uporabili 600 mg hemina in ker smo v nadaljevanju uporabili samo 1 ml (glej sliko 34) te raztopine, bi teoretično lahko pripravili iz tega največ 6,28 mg CCMP-ja. Po končani sintezi smo ves dobljen CCMP raztopili v 1 ml acetona, kjer je bilo tako $9,214 \cdot 10^{-6}$ mol CCMP-ja, kar ustreza teoretični koncentraciji $9,214 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Nato smo posneli EPR spekter. Iz spektrov smo s pomočjo dvojnega integriranja izračunali število paramagnetnih centrov v posameznem vzorčku in nato še izkoristek sinteze. Za to smo najprej iz števila molov hemina, ki smo ga uporabili za sintezo in Avogadrovega števila izračunali število molekul hemina, kar je ustrezalo praktični vrednosti števila paramagnetnih centrov, ki je bila $5,52 \cdot 10^{-6}$. Izračunana praktična koncentracija CCMP-ja v 1 ml acetona je bila tako $1,66 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Iz izračunanih podatkov je bil tako izkoristek same sinteze 18,0 %.

4.3 IZRAČUN VSEBNOSTI UPORABLJENEGA CCMP-ja PRI IZDELAVI KOAGULATOV MESNIH EMULZIJ

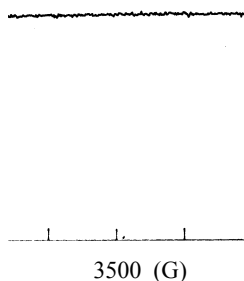
Pigment CCMP za pripravo koagulatov mesnih emulzij smo sintetizirali tako, da smo 600 mg hemina raztopili v 100 ml raztopine, od koder smo odvzeli 10 ml raztopine, v kateri je tako bilo 60 mg hemina. V to raztopino smo dodali 10-krat več ostalih reagentov kot je navedeno v sliki 34 in tako smo iz 60 mg hemina dobili 62,77 mg CCMP-ja. Glede na 18,0 % izkoristek sinteze je bila vsebnost CCMP-ja po sintezi in stabilizaciji z imidazolom 11,31 mg.

4.4 KVANTITATIVNA ANALIZA PIGMENTA CCMP-ja IN NJEGOVA STABILNOST

Izkoristek sinteze in stabilnost pigmenta CCMP-ja smo spremljali z metodo EPR. CCMP ima značilen EPR spekter z značilnim trojnim razcepom zaradi hiperfine interakcije Fe^{2+} z jedrom dušika v Fe^{2+} -NO kompleksu. Tipični spektri so prikazani na sliki 44, značilni trojni razcep pa na sliki 45. Oblika in intenziteta spektra data informacijo o samem kompleksu in njegovi stabilnosti.

4.4.1 EPR spekter hemina raztopljenega v dveh različnih topilih

Signal, ki ga dobimo ob merjenju EPR spektra čistega hemina – izhodnega reaktanta, raztopljenega v dimetilsulfoksidu ali v acetonu je ravna črta, kar pomeni, da čisti hemin nima spektra ne glede na vrsto uporabljenega topila, ker nima nesparjenega elektrona. Nato je bilo potrebno preveriti topnost samega hemina v raztopini Na_2CO_3 , HCl in acetonu. Ugotovljeno je bilo, da se hemin topi v 4 % raztopini Na_2CO_3 , medtem ko se v 0,44 % raztopini HCl in acetonu ne topi.



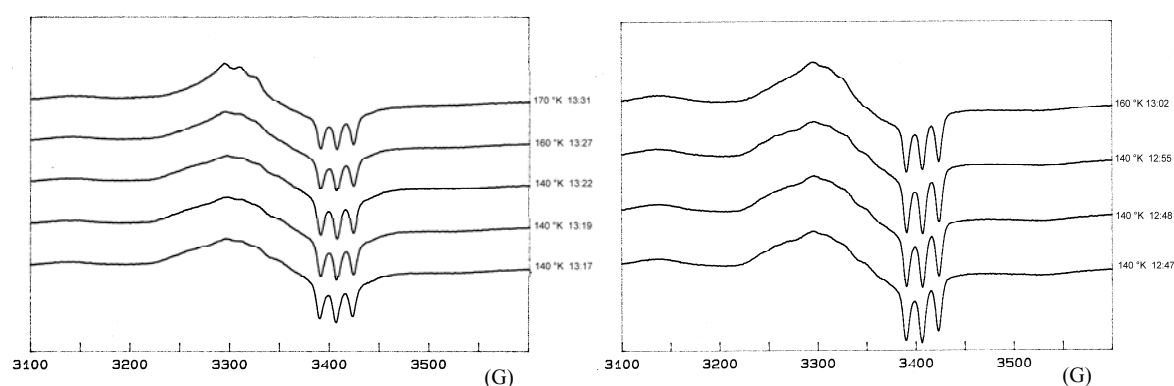
Slika 43 EPR spekter čistega hemina.

Figure 43 The EPR spectre of pure haemin.

4.4.2 Vpliv dodatka Na-tripolifosfata pri sintezi CCMP-ja na obliko EPR spektra pri različnih temperaturnih merjenjih (topilo aceton)

Glede na veliko občutljivost sintetiziranega pigmenta CCMP-ja na kisik med prenosom iz centrifugirke v EPR kvarčno cevko s pomočjo dolge steklene kapalke, smo v nadaljevanju uporabili za prenos pigmenta Dry Box komoro. To je komora, ki namesto zraka vsebuje argon s koncentracijo kisika manjšo od 1 ppm. Po prenosu smo EPR kvarčne cevke z vzorci takoj zatalili in jih potopili v tekoči dušik.

Razlika med vzorci z dodanim Na-tripolifosfatom ali brez njega je bila samo v intenziteti signala, po obliki razlike ni bilo. Iz EPR spektrov se vidi, da je v vzorcih CCMP-ja, ki so bili pripravljani z dodatkom Na-tripolifosfata intenziteta večja, kot pri vzorcih brez tega dodatka (slika 44).



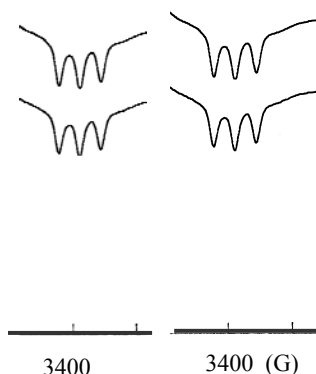
Slika 44 Spreminjanje intenzitete EPR spektrov CCMP-ja z dodatkom Na-tripolifosfata (desno) ali brez njega (levo) s časom merjenja.

Figure 44 The intensity of the EPR spectra of cooked cured meat pigment by the addition of Na-tripolyphosphate (right) or without it (left) with respect to time.

4.4.3 EPR spekter sveže sintetiziranega CCMP-ja, raztopljenega v dveh različnih topilih

Pri raztapljanju sveže sintetiziranega CCMP-ja v dveh različnih topilih (dimetilsulfoksid in aceton) smo ugotovili, da je CCMP v obeh topilih topen. Meritve EPR spektra na različnih mestih v EPR kvarčni cevki dajo identičen spekter, kar pomeni, da je vzorec po prostornini EPR kvarčne cevke homogen (slika 45).

Prenos raztopljenega vzorca CCMP-ja z injekcijsko iglo v EPR kvarčno cevko ni bil primeren, ker je bilo železo, ki je v sami igli, katalizator oksidacije CCMP-ja, pri čemer je prišlo do prehoda Fe^{2+} v Fe^{3+} , kar se je videlo že na oko iz spremembe višnjevo rdeče barve CCMP-ja v rjavo. V izogib temu je bilo potrebno v nadaljevanju pri prenosu CCMP-ja uporabljati dolgo tanko stekleno kapilaro v obliki kapalke. Toda tudi v tem primeru je pigment večinoma oksidiriral že med samim prenosom, kar se je kazalo v izgubi barve CCMP-ja.



Slika 45 Značilen tripletni signal Fe^{2+} -NO kompleksa EPR spektra CCMP-ja.

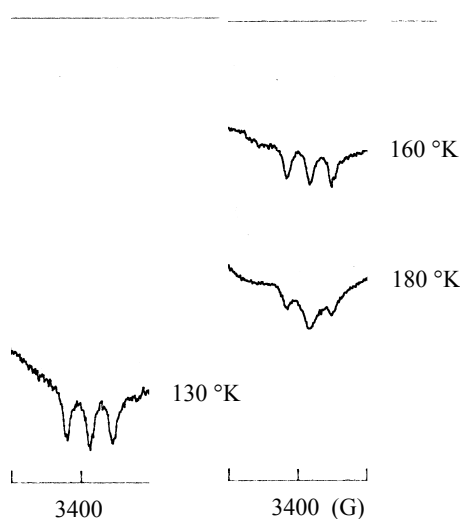
Figure 45 The characteristic triplet signal of the Fe^{2+} -NO complex of the EPR spectrum for CCMP.

4.4.4 Vpliv frekvence modulacije na EPR spektre vzorcev CCMP-ja

Spektri vzorcev CCMP-ja, ki so bili merjeni pri frekvenci modulacije 3,13 kHz so bili enaki tistim, ki so bili merjeni pri frekvenci modulacije 100 kHz, kar kaže na to, da frekvenca modulacije ne vpliva na obliko spektra, zato smo v nadaljevanju vse meritve opravljali pri 100 kHz in ne pri 3,13 kHz, kot so jo uporabljali v svojih raziskavah Pegg in sod. (1996).

4.4.5 Vpliv temperature merjenja na obliko EPR spektra CCMP-ja, raztopljenega v acetonu

Temperatura merjenja vzorcev ima odločilen vpliv na obliko spektra karakterističnega za Fe^{2+} -NO kompleks (slika 46). Iz dobljenih spektrov vidimo, da pigment CCMP pri temperaturi merjenja 180 °K nima tako zelo značilnega spektra, z zniževanjem le-te se pojavi trojni razcep, ki je značilen za Fe^{2+} kompleks z NO.

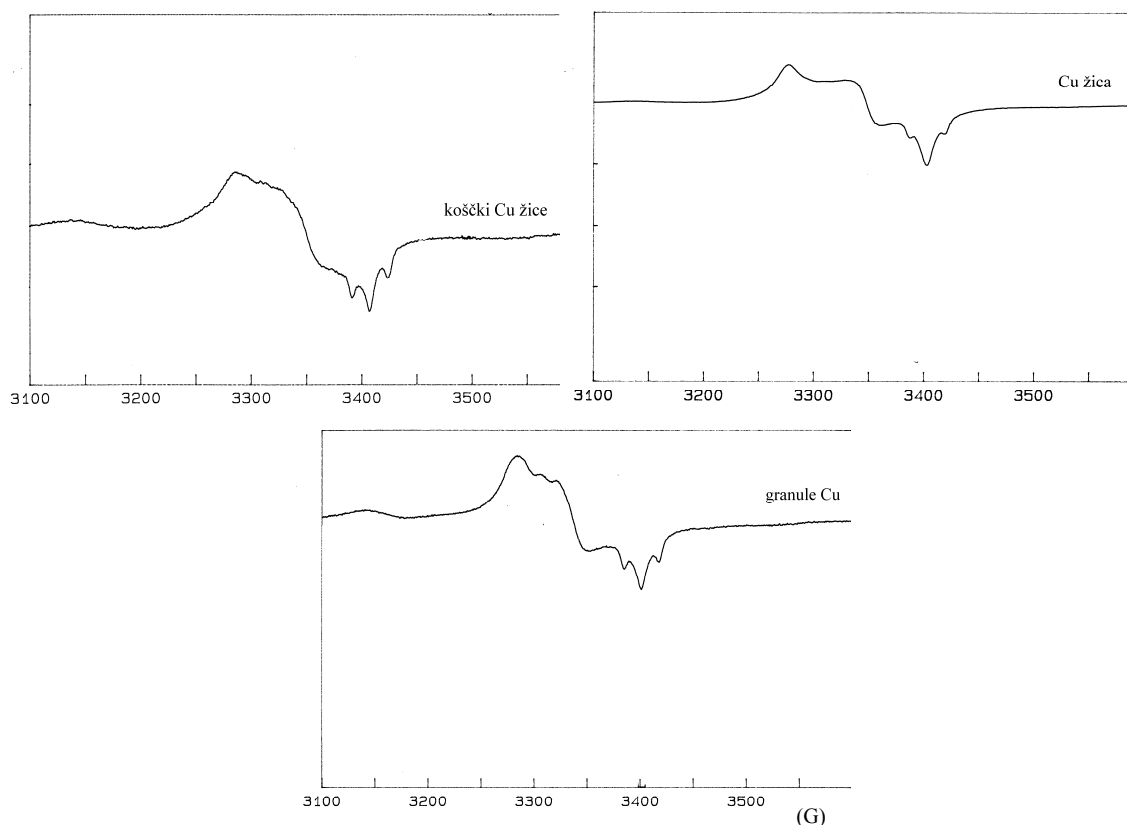


Slika 46 Oblika EPR spektra značilnega tripleta CCMP-ja glede na temperaturo merjenja.

Figure 46 The shape of the EPR spectrum of cooked cured meat pigment with respect to the measurement temperature.

4.4.6 EPR spektri CCMP-ja, ki je bil sintetiziran z dodatkom bakra v različnih oblikah

Da bi preprečili oksidacijo železa v Fe^{3+} -NO smo dodali koščke bakrene žičke, bakreno žičko v celem kosu ali granule bakra (čistost 99,9 %) v centrifugirko na samem začetku sinteze CCMP-ja (tik pred uvajanjem NO v raztopino) (slika 47). Pred centrifugiranjem smo jih iz nje odstranili. Topilo je bil aceton, vzorec CCMP-ja v EPR kvarčni cevki je bil v vakuumu, zataljen in zmrznjen s tekočim dušikom. V supernatant se je izlužilo v vseh primerih zelo malo bakra, kljub majhni količini je ta imel odločilen vpliv na samo obliko spektra, ki je bila tipična za CCMP. Rezultati atomske absorpcije so pokazali, da v nobenem primeru količina bakra v vzorcih tako sintetiziranega CCMP-ja ni presegla dovoljene količino bakra v živilih. Spektri dobljeni s pomočjo granul čistega bakra so bili bolj tipični za EPR spekter CCMP-ja in stabilnejši (slika 47). Dodatek bakra je odločilno povečal stabilnost CCMP kompleksa, saj je deloval kot reducent, kar elementarni Cu nedvomno je. Ker pa smo se hoteli izogniti Cu^{2+} ionom, čeprav smo dokazali Cu^{2+} pod dovoljeno količino v živilih, smo raje poskusili uporabiti vitamin E kot reducent.



Slika 47 Primerjava oblike EPR spektrov CCMP-ja, sintetiziranega z dodatkom bakra v različnih oblikah (koščki Cu žice zgoraj levo, Cu žica zgoraj desno in granule Cu spodaj).

Figure 47 The comparison of the shape of the EPR spectra of cooked cured meat pigment synthesised by adding copper in various forms (bits of copper wire in the top section left, copper wire in the top section right and copper granules in the bottom section).

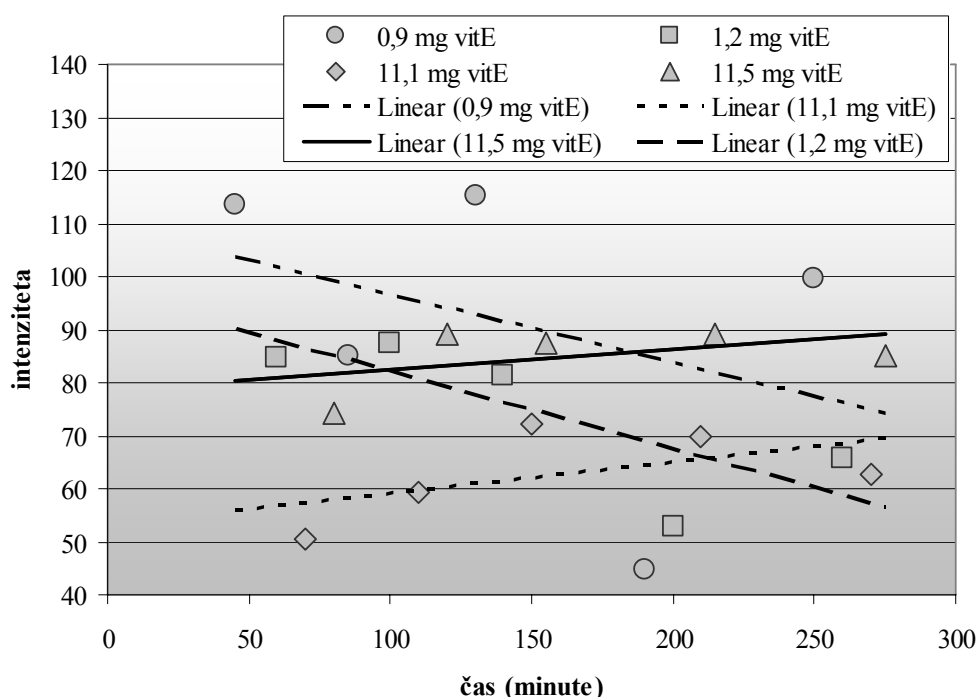
4.4.7 EPR spektri CCMP-ja, ki je bil sintetiziran z dodatkom različnih količin vitamina E

Pigment CCMP je bil sintetiziran z dodatkom različnih količin vitamina E (od 0,9 mg do 11,5 mg) in raztopljen v acetonu. Prenos pigmenta v EPR kvarčne cevke je bil opravljen v Dry Box komori, nakar so bili vzorci zataljeni.

Dobljeni rezultati meritev EPR spektrov (slika 48) tako pripravljenega pigmenta kažejo na to, da vitamin E (α -tokoferol) skupaj z askorbatom (vitamin C) ustvarja pri sintezi CCMP-ja ciklus, v katerem se askorbat oksidira v oksidirano obliko (dehidroaskorbinsko kislino), vitamin E pa to oksidirano obliko spremeni nazaj v reducirano. Vse količine dodanega vitamina E (α -tokoferol) so dale sintetiziranemu pigmentu lepo višnjevo rdečo barvo, ki se na oko ni razlikovala glede na količino dodanega vitamina E, se je pa njena intenziteta še povečala z dodatkom topila acetona k samemu pigmentu. V primerjavi s prejšnjimi poskusi je barva CCMP-ja med prenosom iz centrifugirke v EPR kvarčno cevko vizualno ostala intenzivna in z nespremenjenim odtenkom še po zatalitvi EPR

kvarčnih cevk kakor tudi po njihovem skladiščenju v tekočem dušiku oziroma na sobni temperaturi.

Pri vizualnem spremljanju obstojnosti tako pripravljene pigmenta CCMP-ja smo že na oko ugotovili, da je CCMP sintetiziran z dodatkom 0,9 mg vitamina E obstojen enako dolgo kot tisti CCMP, ki mu je bilo dodano 11,5 mg vitamina E (slika 48). Lepa višnjevo rdeča barva je bila v vzorcih, ki so bili skladiščeni na zraku pri sobni temperaturi eno uro, po eni uri je barva začela zelo počasi izginjati, kar pomeni, da je pričel železov ion počasi oksidirati, a je imel vzorec po dveh urah še zmeraj v sebi rdeči odtenek. Po treh urah je bila barva že rjava. Vzorci, ki so imeli dostop zraka so bili manj obstojni, kot tisti, ki so bili za primerjavo v zataljeni EPR kvarčni cevki.



Slika 48 Časovna odvisnost stabilnosti pigmenta CCMP-ja, pripravljene z različnimi dodatki vitamina E.

Figure 48 Time-dependent stability of cooked cured meat pigment prepared by adding vitamin E.

S pomočjo kvantitativne EPR analize dobljenih spektrov smo s pomočjo dvojnega integriranja v nadaljevanju izračunali intenziteto posameznega spektra, ki je proporcionalna številu paramagnetnih centrov v posameznem vzorcu pigmenta. Ker je bil volumen vzorca v EPR kvarčnih cevkah ves čas meritev enak, je bila izračunana intenziteta proporcionalna koncentraciji. Vzorcem pigmenta, ki so bili v EPR kvarčno cevko preneseni v Dry Box komori, zataljeni v atmosferi argona in skladiščeni v tekočem dušiku (-196 °C), se oblika spektra, kakor tudi njegova intenziteta ni spremenila v času 6 ur (ustrezno obliko spektra smo dobili tudi pri vzorcu, ki je bil pripravljen z 1,2 mg vitamina E celo po 26 urah). Vzorci, ki so bili po prenosu v Dry Box komori samo zaprti s

parafilmom in skladiščeni do merjenja na sobni temperaturi, so imeli spektre z manjšo intenziteto, ki je s časom tudi hitreje padala.

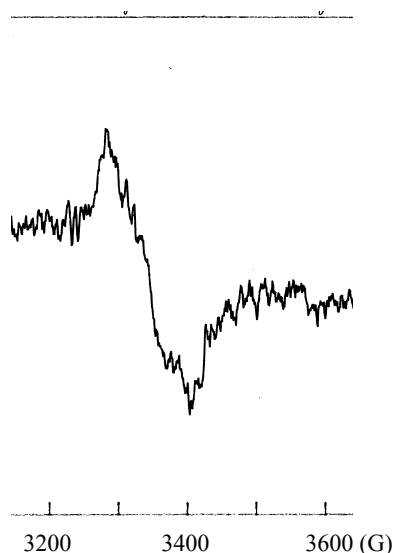
Iz slike 48, ki ponazarja časovno odvisnost stabilnosti pigmenta CCMP-ja pripravljenega z različno koncentracijo vitamina E in je bil pomerjen pri 140 °K vidimo, da pri CCMP-ju, ki je bil pripravljen z dodatkom 0,9 in 1,2 mg vitamina E, intenziteta s časom linearno pada (čas spremljanja 5 ur), medtem ko se pri vzorcih z 11,1 in 11,5 mg vitamina E intenziteta ne spreminja v času meritve. Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da vitamin E stabilizira pigment CCMP, vendar ne dovolj, da bi ga lahko uporabili kot barvilo za pripravo mesnih emulzij. Količina dodanega vitamina E nima odločilnega vpliva na intenziteto spektra pigmenta CCMP, zato smo se odločili, da bomo v nadaljevanju uporabljali najnižjo količino le-tega, ki da ustrezen rezultat, in to je 1 mg.

4.5 VGRAJEVANJE CCMP-ja V RAZLIČNE SISTEME

Glede na rezultate, ki smo jih dobili ob proučevanju zaščite pigmenta CCMP-ja, smo se v nadaljevanju raziskav odločili preiskusiti različne načine vgrajevanja CCMP-ja, ki bi preprečili dostop kisika do pigmenta.

4.5.1 Disperzija v polivinilnem alkoholu

Pri pripravi raztopin različnih koncentracij polivinilnega alkohola (Mowiola) smo ugotovili, da je 5 % koncentracija tista maksimalna koncentracija, da ni preveč viskozna raztopina (oziroma bi lahko le-ta tudi že gelirala), da se vzorca pigmenta CCMP-ja potem sploh ne bi več dalo potegniti s stekleno kapalko in prenesti v EPR kvarčno cevko.

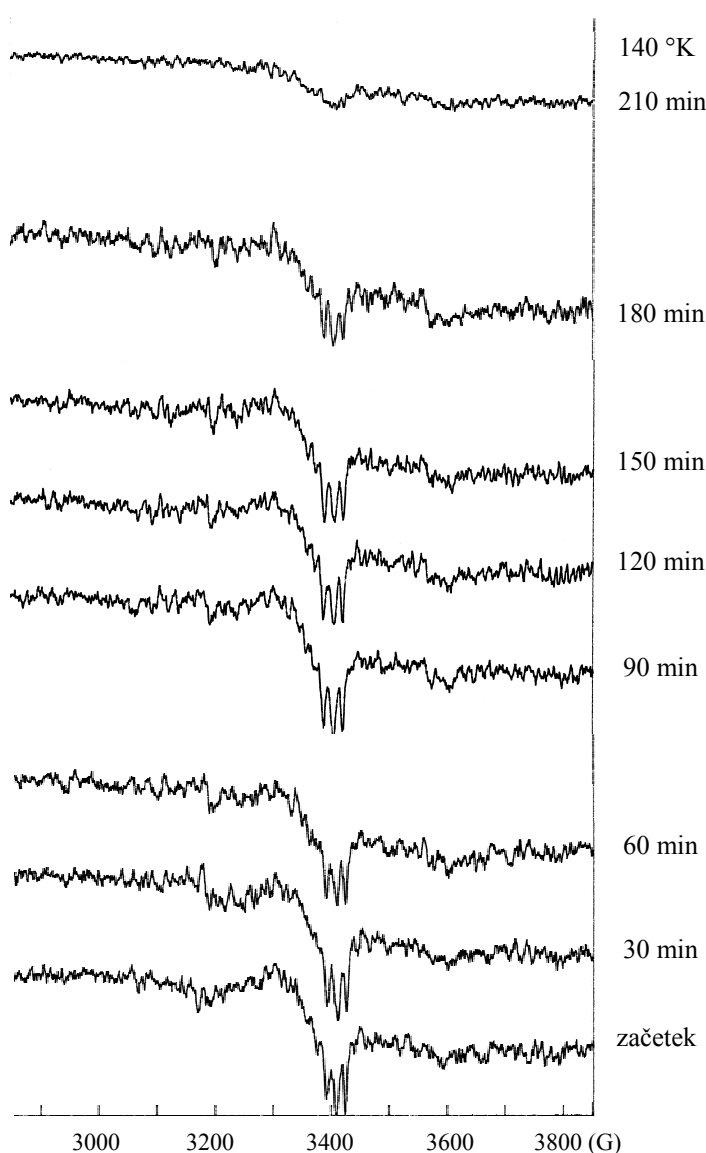


Slika 49 Specifičen EPR spekter CCMP-ja v polivinilnem alkoholu.

Figure 49 The specific EPR spectrum of cooked cured meat pigment in polyvinyl alcohole.

Iz dobljenih EPR spektrov smo zaključili, da so le-ti v primeru CCMP-ja in Mowiola popolnoma drugačni od tistih, ko je CCMP raztopljen samo v acetonu, kar kaže na specifično reakcijo teh dveh komponent (slika 49). Pomembno je, da se pripravi čim bolj koncentriran vzorec CCMP-ja v Mowiolu, kar pomeni, da se s tem pridobi tudi na barvi CCMP-ja. Najbolj rožnat je bil odtenek CCMP-ja, ki je bil raztopljen v 1 % Mowiolu PVA 4-98, medtem ko je bil pri vseh ostalih vzorcih odtenek barve nekoliko rumen. Če primerjamo intenziteto tega vzorca, skladiščenega v tekočem dušiku glede na vzorec, skladiščen 1 uro na sobni temperaturi ugotovimo, da vzorcu intenziteta s časom pada, kar pomeni, da polivinilni alkohol sintetiziranega CCMP-ja, raztopljenega v acetonu ne štiti.

4.5.2 Vgrajevanje v poliakrilatne nanodelce z emulzijsko difuzijsko metodo



Slika 50 Spremembe EPR spektrov za pigment CCMP vgrajen v poliakrilatne nanodelce med shranjevanjem na zraku in sobni temperaturi.

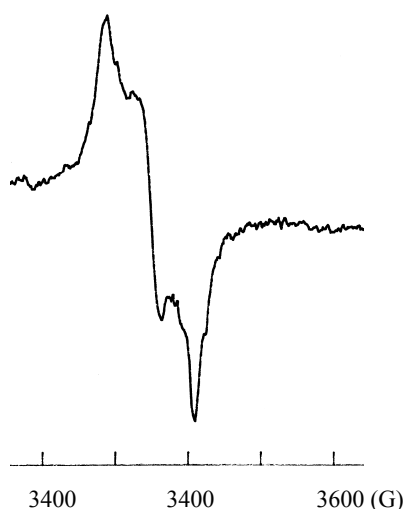
Figure 50 Changes of EPR spectra for CCMP pigment incorporated in polyacrylic nanoparticles during storage at air and room temperature.

Za vgrajevanje pigmenta CCMP-ja v poliakrilatne nanodelce smo se odločili, ker bi naj ščitili pigment CCMP pred oksidacijo in tako naj bi bil ta tudi dlje časa obstojen in stabilen.

Iz nezaščenega CCMP-ja z značilno višnjevo rdečo barvo so s pomočjo emulzijsko difuzijske metode nastali poliakrilatni nanodelci z rahlo rožnato barvo, njihova povprečna velikost je bila $337,5 \text{ nm} \pm 15,7 \text{ nm}$. Časovno smo nato s pomočjo EPR analize spremljali kaj se dogaja s tako zaščitenim pigmentom CCMP na sobni temperaturi ob prisotnosti zraka (slika 50). Iz dobljenih rezultatov smo zaključili, da je obstojnost polimernih nanodelcev 3 ure in da bi bilo v nadaljevanju potrebno v izdelavo takih nanodelcev vključiti večjo količino sintetiziranega pigmenta CCMP-ja, da bi bila njihova barva čim bolj rdeča, kar pomeni, da bi bilo potrebno povečati koncentracijo dodanega CCMP-ja.

4.5.3 Vgrajevanje v trdne lipidne nanodelce

Pri vgrajevanju CCMP-ja v trdne lipidne nanodelce je bila njihova povprečna velikost $351,3 \text{ nm} \pm 41,3 \text{ nm}$, pri čemer je med samim postopkom sinteze prišlo do oksidacije pigmenta CCMP-ja iz višnjevo rdeče barve v čokoladno oziroma kakavovo. Tako ta način tvorbe delcev ni primeren, ker pride zaradi visoke temperature segrevanja do oksidacije, kar potrjujejo tudi pripadajoči spektri EPR (slika 51), kjer ni značilnega trojnega razcepa.



Slika 51 EPR spekter vgrajenega CCMP-ja v trdne lipidne nanodelce brez značilnega trojnega razcepa.

Figure 51 EPR spectrum of CCMP in solid lipid nanoparticles without characteristic spectrum for CCMP.

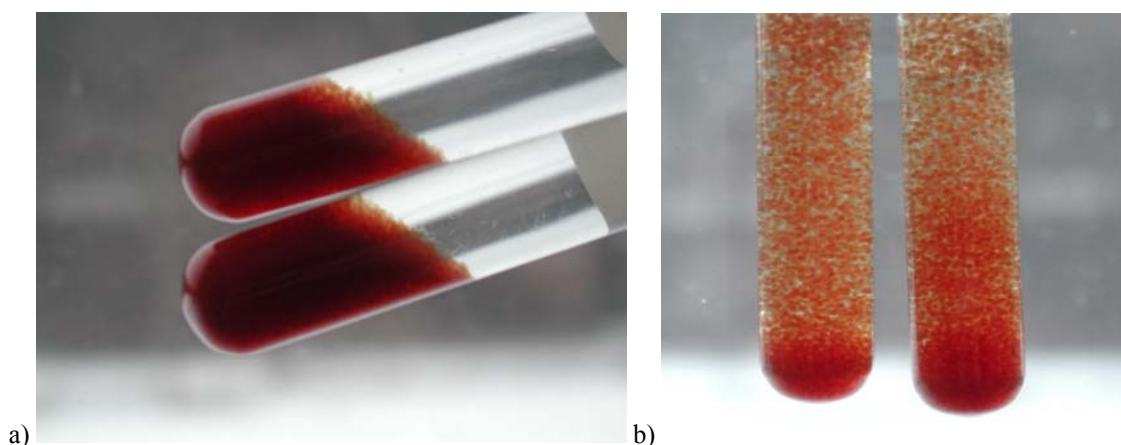
4.6 INKAPSULACIJA CCMP-ja V ALGINATNE MIKRODELCE

4.6.1 Vgrajevanje CCMP-ja

Mikrodelce CCMP smo izdelali z inkapsulatorjem Inotech IE-50 R. Tako polimerno raztopino (raztopino alginata različnih koncentracij od 1,5 do 3 %) kot sam pigment CCMP smo dovajali v aparat s pomočjo brizge. Hitrost curkov obeh faz smo uravnali s pomočjo enote za nastavitev relativne hitrosti na kontrolni enoti. Relativno hitrost pretoka obeh faz smo spreminjali od vrednosti 0 do 1 000, dejanska hitrost pa je bila odvisna tudi od zunanjega premera koncentrične šobe in uporabljene brizge in je bila tako pri ožji enokanalni koncentrični šobi s premerom zunanje šobe 250 μm 291, pri širši enokanalni šobi z zunanjim premerom šobe 500 μm pa 700. V splošnem je premer nastalih mikrodelcev dvakrat večji od zunanjega premera šobe. V nasprotju s tem pa lahko premer jedra mikrodelca variira v širšem območju, od 1 do 2,5 kratnik premera šobe skozi katero teče notranja faza. S pomočjo spreminjanj parametrov v eksperimentu smo ugotovili, da na velikost izdelanih mikrodelcev vplivajo poleg zunanjega premera uporabljene koncentrične šobe in hitrosti curka zunanje faze tudi drugi parametri, kot so frekvenca nihanja membrane in lastnosti polimerne raztopine.

4.6.1.1 Razbitje laminarnega toka pri uporabi šobe 250 μm

Ob uporabi te šobe smo delali po principu, kot ga je zasnoval proizvajalec inkapsulatorja, torej z razpršitvijo laminarnega curka tekočine s pomočjo nihanja membrane z določeno frekvenco. Brizgi napolnjeni z raztopino polimera (alginata različnih koncentracij) in pigmenta CCMP-ja je skozi šobo potiskala tlačilka, ki je omogočala enakomeren tok curka. Z izbiro ustreznih parametrov so se ob izstopu iz šobe tvorili mikrodelci (slika 52). Ti so potovali skozi električno polje in se pri tem nabili, naboj na površini pa je preprečil zlepljanje mikrodelcev med samim letom in med lovljenjem v raztopino premreževalca.



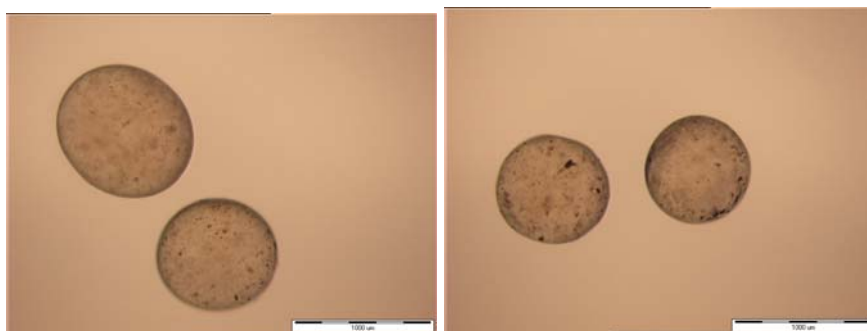
Slika 52 Inkapsuliran CCMP.

Figure 52 The encapsulated CCMP.

Legenda: a) Mikrodelci z vgrajenim barvilom v mirovanju; b) Mikrodelci z vgrajenim barvilom med stresanjem.

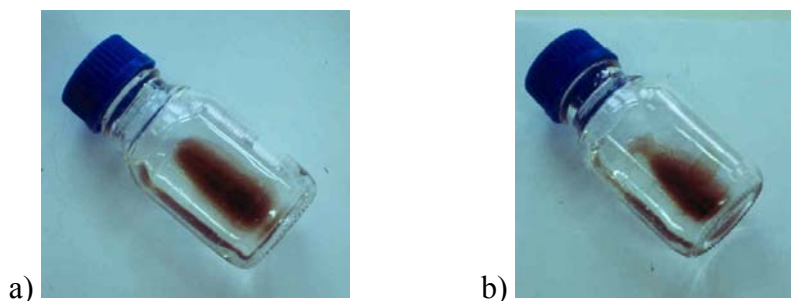
Ker se je 1 % koncentracija raztopine alginata kmalu pokazala kot neustrezna zaradi slabe zaščite pigmenta CCMP-ja, koncentraciji 2,5 % in 3 % pa težavni pri izdelavi mikrodelcev

zaradi prevelike viskoznosti pripravljenih raztopin, se je za najbolj idealno glede na način izdelave mikrodelcev in zaščito samega pigmenta CCMP-ja izkazala 2 % raztopina alginata (slika 53). S pomočjo eksperimenta smo prišli do zaključkov, da velikost nastalih mikrodelcev določajo številni parametri, kot so: premer zunanje šobe, hitrost in lastnosti polimerne raztopine, frekvenca vibriranja membrane in amplituda. Na obliko mikrodelcev pa vpliva tudi izbira premreževalne raztopine. Za najbolj primerno premreževalno raztopino se je izkazala 0,3 M raztopina CaCl_2 (slika 54). Sušenje mikrodelcev na transparentnem papirju pri sobni temperaturi je povzročilo vidno spremembo oblike samih mikrodelcev (slika 55) in oksidacijo vgrajenega CCMP-ja, zato se je tovrstni postopek izkazal kot zelo neprimeren kar se obstojnosti samega pigmenta tiče.



Slika 53 Posamični mikrodelci CCMP-ja v 2 % alginatu takoj po pripravi.

Figure 53 The individual CCMP microparticles in 2 % alginate immediately following the synthesis.



Slika 54 Inkapsuliran CCMP skladiščen v vodi (a), v raztopini 0,3 M CaCl_2 (b).

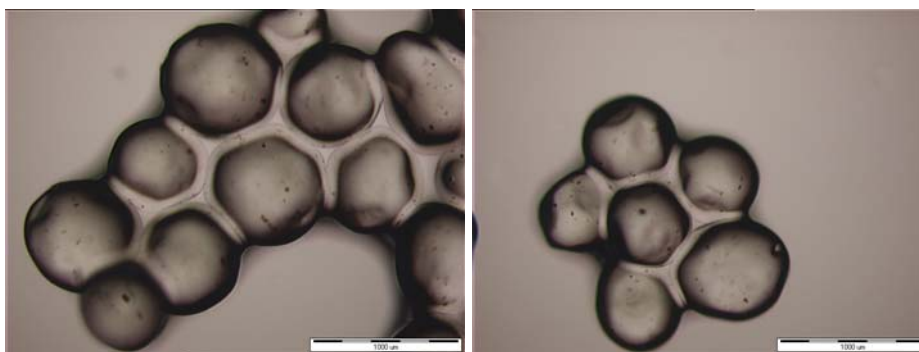
Figure 54 The encapsulated CCMP stored in water (a), in solution of 0.3 M CaCl_2 (b).



Slika 55 Mikrodelci CCMP-ja v 2 % alginatu, sušeni na zraku 24 ur.

Figure 55 The CCMP microparticles in 2 % alginate air-dried for 24 hours.

Najbolj optimalno hitrost curka obeh faz smo tako določili tisto, pri kateri se je tvoril laminaren in stabilen tok s tvorbo mikrodolcev, in to je bila 291. Območje, kjer je bilo mogoče napetost elektrode nastaviti tako, da je prišlo do razpršitve laminarnega curka, smo poimenovali območje dobrega razprševanja (1,20 kV). Le v tem območju sta bili hitrosti pretokov notranje in zunanje faze tako nizki, da je bilo mogoče curek ustrezno razpršiti. Pri višjih hitrostih pretokov obeh faz je bila sila curka za razpršitev prevelika, nastajajoči mikrodolci pa večinoma zlepljeni med seboj (slika 56). Pri frekvenci 3 881 Hz so bile jasno vidne razredčine in zgoščine v laminarnem curku. Pri višjih frekvencah ni prišlo do tvorbe skupkov v raztopini premreževalca.



Slika 56 Zlepljeni mikrodolci CCMP-ja takoj po pripravi.

Figure 56 The aggregated microparticles of CCMP immediately following the synthesis.

4.6.1.2 Princip metode kapljanja pri uporabi šobe 500 µm

Čeprav sama aparatura v osnovi ni namenjena delu pri tako nizkih hitrostih pretoka notranje in zunanje faze, da ne pride do formiranja laminarnega curka, se je pokazalo, da je izdelava mikrodolcev s pigmentom CCMP-jem mogoča tudi kadar prihaja le do kapljanja. Tak način izdelave ni bil izbran namenoma, temveč je posledica tega, da pri širši enokanalni šobi zunanjsega premera 500 µm tudi pri največji hitrosti pretoka zunanje faze ne pride do formiranja laminarnega curka, kar je osnovni pogoj, ki po predpisih proizvajalca zagotavlja ustrezno delo. Navodilo za delo z inkapsulatorjem namreč zahteva, da najprej vklopimo pretok zunanje faze (raztopine alginata) in šele, ko je dosežen laminarni curek (kapljanje raztopine alginata je enakomerno), sledi vklop pretoka notranje faze (pigmenta CCMP). Tedaj je vsota pretokov obeh faz dovolj velika, da se kapljanje pretvori v neprekinjen curek. S kratkimi pritiski tipke turbo smo spremljali polnjenje alginatnih kapljic s pigmentom CCMP-jem. Na tej stopnji je bilo pomembno dobro opazovanje polnjenja kapljic, to pa je bilo mogoče le ob prižgani stroboskopski luči. Ko je bil sistem v ravnotežju, so se od šobe enakomerno trgali mikrodolci s CCMP-jem. Hitrost nastajanja mikrodolcev je bila bistveno počasnejša kot pri razprševanju laminarnega curka in je bila odvisna od relativnih hitrosti obeh faz.

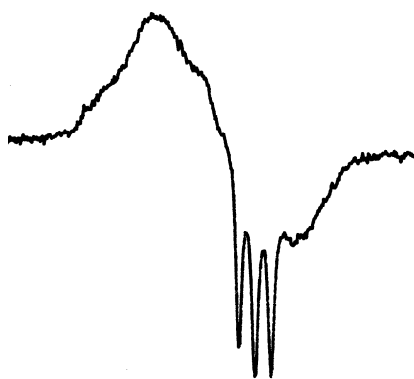
Največja težava, ki se je pojavila pri visokih hitrostih pretokov, je bila ponovljivost poskusov. Ta je bila v omenjenem primeru zelo slaba, saj nam je kljub nastavitvi enakih parametrov, pri katerih smo mikrodolce že uspeli izdelati, kasneje to spodletelo. Največkrat so nastali mikrodolci brez CCMP-ja. Naslednja pomanjkljivost dela s šobo velikega premera je tudi nezmožnost razpršitve laminarnega curka. Tudi, če smo na aparaturi

nastavili največjo napetost (2 kV), je bilo to še zmeraj premalo, da bi se curek razpršil. Posledica tega je bila, da so se kapljice po padcu v premreževalno raztopino zlepljale. Težavo pri tovrstnem načinu inkapsulacije so predstavljale tudi injekcijske brizge, ki so se zaradi majhnega volumna (60 ml) zelo hitro izpraznile. Tako smo imeli zelo malo časa za določitev optimalnih pogojev, pri katerih so nastajali ustrezni mikrodelci. To pomanjkljivost bi se dalo rešiti le z uporabo kompresorja s stisnjenim zrakom, ki črpa obe tekočini iz vsebnika z večjo prostornino.

Poleg različnosti curkov je glavna razlika med obema uporabljenima metodama koncentričnih šob uporaba oziroma neuporaba funkcije napetosti elektrode. Medtem ko je uporaba slednje ključna za razpršitev laminarnega curka in s tem za preprečitev zlepljanja mikrodelcev, je pri delu s kapljanjem ta nepotrebna. Ker je kapljanje počasno, do zlepljanja mikrodelcev ne prihaja ne med letom in ne v premreževalni raztopini.

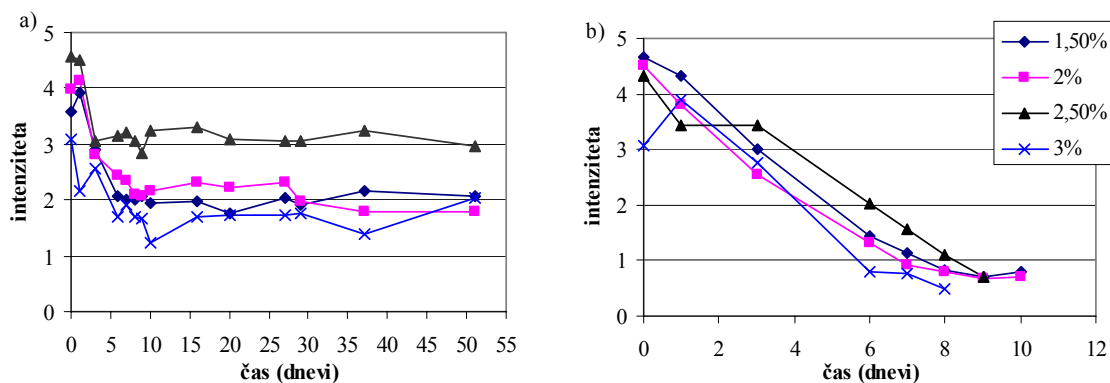
4.6.1.3 Vrednotenje stabilnosti vgrajenega CCMP-ja

Tipičen EPR spekter CCMP-ja v 2 % alginatu premreženim s Ca^{2+} je predstavljen na sliki 57, spreminjanje intenzitete s časom skladiščenja pa na slikah 58-60. Iz slike 60 je razvidno, da inkapsulacija v 2 % alginat stabilizira CCMP v času 6 ur in da koncentracija alginata in temperature ne vplivata bistveno na stabilnost. Po daljšem času skladiščenja je temperatura skladiščenja zelo pomembna. Po 24 urah pride tako pri omenjenih mikrodelcih pri sobni temperaturi in pri 77 °K do padca intenzitete signala za cca. 50 %, kar kaže na to, da se del CCMP-ja oksidira (slika 59). Pri 77 °K ostane po 10 dneh signal stabilen, medtem ko pri skladiščenju na sobni temperaturi ta s časom pada in po 10 dneh pade na zanemarljivo vrednost.



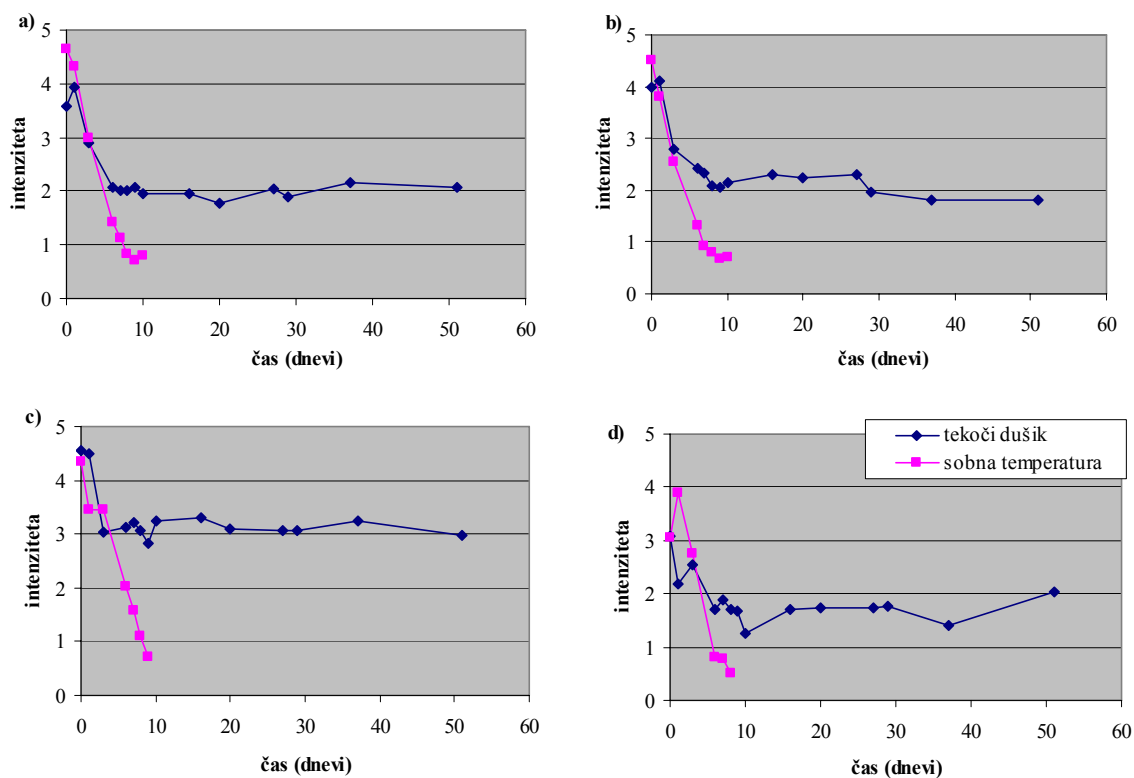
Slika 57 EPR spekter CCMP-ja v 2 % alginatu premreženim s Ca^{2+} .

Figure 57 EPR spectrum of CCMP in 2 % alginate crosslinked by Ca^{2+} .



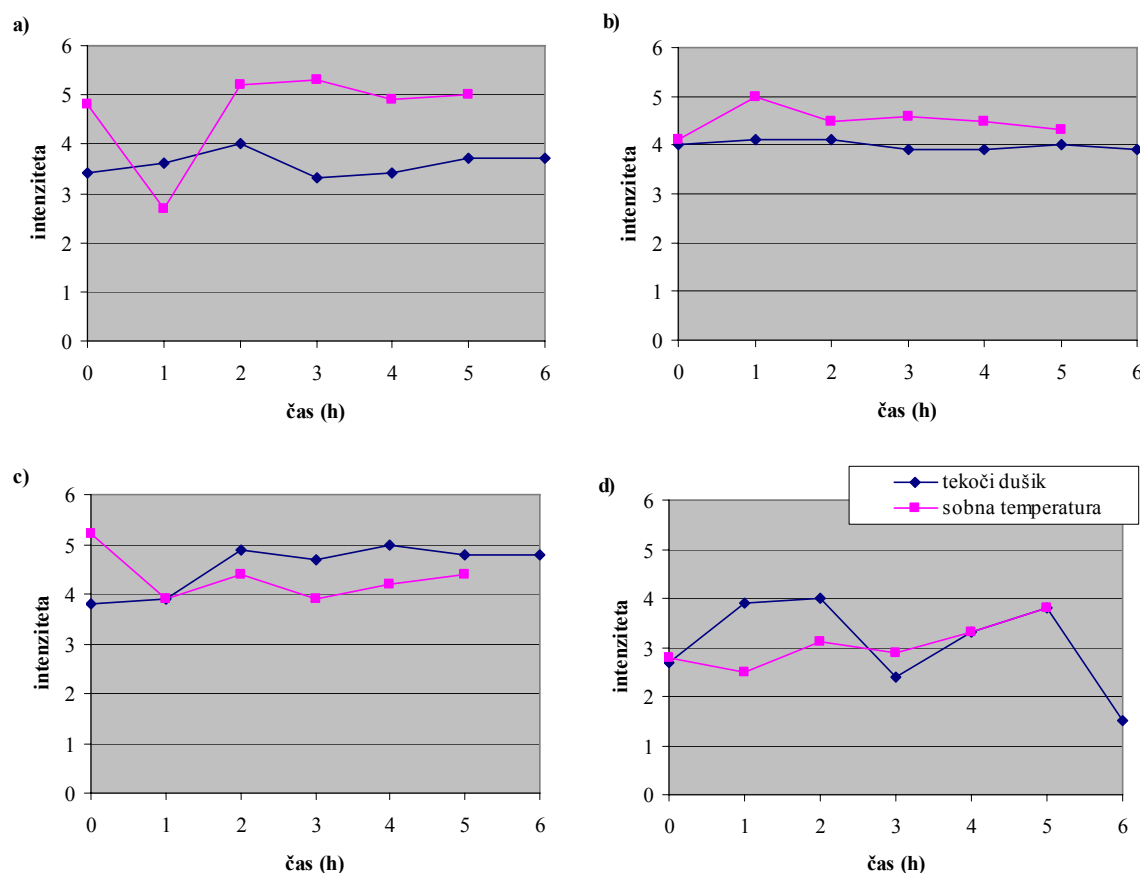
Slika 58 Stabilnost CCMP-ja pri različnih koncentracijah alginata v tekočem dušiku (a) in pri sobni temperaturi (b).

Figure 58 The stability of cooked cured meat pigment of various concentrations alginate in liquid nitrogen (a) in at ambient temperature (b).



Slika 59 Stabilnost CCMP-ja v alginatu različnih koncentracij (a) 1,5 %, b) 2 %, c) 2,5 % in d) 3 % alginat), skladiščnega v tekočem dušiku in pri sobni temperaturi.

Figure 59 The stability of cooked cured meat pigment in alginate of various concentrations (a) 1.5 %, b) 2 %, c) 2.5 % in d) 3 % alginate), stored in liquid nitrogen and at ambient temperature.



Slika 60 Stabilnost CCMP-ja v alginatu različnih koncentracij (a) 1,5 %, b) 2 %, c) 2,5 % in d) 3 % alginat), skladiščenega 6 ur v tekočem dušiku in pri sobni temperaturi.

Figure 60 The stability of cooked cured meat pigment the in alginate of various concentrations (a) 1,5 %, b) 2 %, c) 2,5 % in d) 3 % alginate), stored for six hours in liquid nitrogen and at ambient temperature.

4.7 KEMIJSKI PARAMETRI

Rezultati analiz osnovne kemijske sestave (maščobe, voda, beljakovine in pepel) emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa, so prikazani v preglednici 13, viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na kemijske parametre emulzij v preglednici 14, testiranje razlik v kemijski sestavi emulzij, izdelanih s tremi različnimi dodatki za razvoj barve, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih pa v preglednici 15.

Preglednica 13 Osnovni izračunani statistični parametri za kemijsko sestavo emulzij iz piščančjega mesa.

Table 13 The basic calculated statistical parameters for chemical composition of the emulsions prepared from chicken meat.

parameter	n	\bar{x}	min	max	KV (%)
maščobe (%)	24	30,75	28,10	33,24	1,93
voda (%)	24	57,49	55,05	60,35	1,50
beljakovine (%)	24	9,40	7,86	10,49	0,93
pepel (%)	24	2,21	2,08	2,40	0,07

n – število obravnavanj; \bar{x} – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; KV (%) – koeficient variabilnosti.

Emulzije pripravljene iz piščančjega mesa (upoštevajoč tako tiste pripravljene iz beder kot tudi tiste iz prsi) so v povprečju vsebovale 30,75 % maščob, 57,49 % vode, 9,40 % beljakovin in 2,21 % pepela, kar je razvidno iz preglednice 13. Največje odstopanje je bilo v vsebnosti maščob (KV = 1,93 %) in vode (KV = 1,50 %), najmanj pa so se vzorci med seboj razlikovali v vsebnosti pepela (KV = 0,07 %). Najvišji koeficient variabilnosti pri vsebnosti maščobe in vode v vzorcih emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa je posledica uporabe dveh različnih mišic z različno kemijsko sestavo.

Preglednica 14 Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na kemijske parametre emulzij iz piščančjega mesa.

Table 14 The sources of variability and statistical characteristics of their influence on chemical parameters of the emulsions prepared from chicken meat.

parameter	vir variabilnosti (P vrednost)			
	dodatek	mišica	dodatek * mišica	ponovitev
maščobe (%)	0,2872	<0,0001	0,0010	0,9303
voda (%)	0,0026	0,0015	0,4157	0,8257
beljakovine (%)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5790
pepel (%)	0,1720	0,0201	0,5144	0,9605

P≤0,001 – statistično zelo visoko značilen vpliv; P≤0,01 – statistično visoko značilen vpliv; P≤0,05 – statistično značilen vpliv; P>0,05 – statistično neznačilen vpliv.

Dodatek za obarvanje emulzije (nitrit, CCMP – svež ali staran) je statistično značilno vplival (P≤0,001) na vsebnost beljakovin (saj je CCMP beljakovina) in vode (preglednica 14). Uporabljena vrsta mišice (prsa, bedra) je imela statistično značilen vpliv na vse analizirane kemijske parametre. Interakcija med dodatkom in vrsto mišice je statistično zelo visoko značilno vplivala na vsebnost beljakovin in maščob. Ponovitev na kemijske parametre ni imela statistično značilnega vpliva.

Iz preglednice 15 je razvidno, da emulzije iz prsi vsebujejo statistično značilno manj maščob in več vode pri dodatku nitrta. Dodatek za obarvanje ni vplival na vsebnost beljakovin in pepela.

Emulzije iz beder vsebujejo značilno manj maščob in več beljakovin ob dodatku staranega inkapsuliranega CCMP-ja in vsebujejo značilno več vode ob dodatku nitrita. Na vsebnost pepela dodatek za obarvanje ni vplival.

Emulzije iz beder ne glede na uporabljeni dodatek za obarvanje vsebujejo statistično značilno več maščob in manj vode kot emulzije iz prsi. Vzorci iz beder vsebujejo tudi manj beljakovin – razlike so značilne pri dodatku nitrita in inkapsuliranega CCMP-ja.

Preglednica 15 Testiranje razlik v kemijski sestavi emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki za razvoj barve, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Table 15 Testing for differences in the chemical composition of the emulsions prepared from chicken meat, made using three different additives for the colour development, separately for two muscles and three additives ($\bar{x} \pm sd$, Duncan's test, $\alpha = 0,05$).

parameter	mišice	dodatek		
		nitrit	CCMP	staran CCMP
maščobe (%)	prsa	28,29±0,18 ^{by}	28,95±0,25 ^{aby}	29,55±0,78 ^{ay}
	bedra	32,80±0,12 ^{ax}	32,72±0,48 ^{ax}	32,15±0,16 ^{bx}
voda (%)	prsa	59,64±0,71 ^{ax}	57,15±1,13 ^{bx}	58,03±1,49 ^{abx}
	bedra	57,75±0,64 ^{ay}	56,37±1,16 ^{bx}	55,99±0,32 ^{by}
beljakovine (%)	prsa	10,07±0,19 ^{ax}	10,05±0,14 ^{ax}	10,14±0,25 ^{ax}
	bedra	8,06±0,20 ^{by}	8,22±0,26 ^{by}	9,86±0,10 ^{ax}
pepel (%)	prsa	2,23±0,06 ^{ax}	2,21±0,06 ^{ax}	2,29±0,1 ^{ax}
	bedra	2,20±0,03 ^{ax}	2,14±0,05 ^{ax}	2,18±0,04 ^{ax}

\bar{x} – povprečna vrednost; sd – standardna deviacija; ^{x,y} – povprečni vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujeta ($P>0,05$); ^{a,b,c} – povprečne vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P>0,05$).

4.8 SENZORIČNE LASTNOSTI

Rezultati analiz vrednotenja senzoričnih lastnosti emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa, so prikazani v preglednici 16, viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na senzorične lastnosti emulzij v preglednici 17, testiranje razlik v senzorični kakovosti emulzij, izdelanih s tremi različnimi dodatki za razvoj barve, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih pa v preglednici 18.

Iz preglednice 16 vidimo, da je najlepši odtenek rožnate barve ocenjen na svežem rezu, sledijo vzorci, skladiščeni pri temperaturi hladilnika, najslabše pa je odtenek barve ocenjen pri emulzijah, skladiščenih na sobni temperaturi. Med vsemi ocenjenimi senzoričnimi lastnostmi so bili najbolj variabilni priokusi (48,65 %), najmanj variabilna pa je bila stabilnost emulzije (8,20 %), kar kaže na to, da z dodatkom inkapsuliranega CCMP-ja (svežega ali staranega) dosegamo podobno stabilnost emulzije kot v primeru dodatka nitrita. Tekstura emulzij iz piščančjega mesa je bila blizu optimalne, tujih vonjev skoraj ni bilo zaznati.

Preglednica 16 Osnovni izračunani statistični parametri za senzorične lastnosti emulzij iz piščančjega mesa.

Table 16 The basic calculated statistical parameters for sensory characteristics of the emulsions prepared from chicken meat.

lastnost	n	\bar{x}	min	max	KV (%)
rožnat odtenek barve prereza T_o (1-7)	96	2,33	1	3,5	29,20
rožnat odtenek barve prereza T_H (1-7)	96	2,06	1	3	27,30
rožnat odtenek barve prereza T_S (1-7)	96	1,58	1	3	31,96
intenzivnost barve prereza (1-7)	96	3,59	1	6	44,48
stabilnost emulzije (1-7)	96	6,00	5	7	8,20
tekstura (1-4-7)	96	4,11	3	6	21,85
značilnost vonja (1-7)	96	5,69	3,5	6,5	11,71
tuji vonji (1-7)	96	1,02	1	1,5	9,84
značilnost arome (1-7)	96	4,60	2	6,5	26,57
priokusi (1-7)	96	2,99	1	6	48,65

n – število obravnavanj; \bar{x} – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; KV (%) – koeficient variabilnosti.

Preglednica 17 Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na senzorične lastnosti emulzij iz piščančjega mesa.

Table 17 The sources of variability and statistical characteristics of their influence on sensory characteristics of the emulsions prepared from chicken meat.

lastnost	vir variabilnosti (P vrednost)				
	dodatek	mišica	dodatek*	mišica*	ponovitev ocenjevalcev
rožnat odtenek barve prereza T_o (1-7)	<0,0001	0,0609	<0,0001	0,9589	<0,0001
rožnat odtenek barve prereza T_H (1-7)	<0,0001	0,0792	<0,0001	0,9813	<0,0001
rožnat odtenek barve prereza T_S (1-7)	<0,0001	0,0318	0,0708	0,8631	0,0321
intenzivnost barve prereza (1-7)	<0,0001	<0,0001	0,6888	0,7160	0,0003
stabilnost emulzije (1-7)	<0,0001	<0,0001	0,0007	0,9642	<0,0001
tekstura (1-4-7)	0,4923	<0,0001	0,1754	0,8521	<0,0001
značilnost vonja (1-7)	<0,0001	0,0311	0,4023	0,0880	<0,0001
tuji vonji (1-7)	0,1399	0,2865	0,7507	0,5156	0,0050
značilnost arome (1-7)	<0,0001	0,8464	0,0432	0,0996	0,6916
priokusi (1-7)	<0,0001	0,5817	0,0149	0,1811	0,8511

$P \leq 0,001$ – statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ – statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ – statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ – statistično neznačilen vpliv.

Vrsta dodatka (nitrit, CCMP – svež ali staran) je statistično značilno ($P \leq 0,001$) vplival skoraj na vse ocenjevane senzorične lastnosti, razen na teksturo in tuje vonje, kar je razvidno iz preglednice 17.

Vrsta uporabljene mišice (prsi, bedra) je statistično zelo visoko značilno vplivala na intenzivnost barve prereza, stabilnost emulzije in teksturo, statistično značilno ($P \leq 0,05$) pa na rožnat odtenek barve prereza emulzije, skladiščene na sobni temperaturi in na značilnost vonja emulzije.

Interakcija med uporabljenim dodatkom in vrsto uporabljene mišice je statistično zelo visoko značilna za rožnat odtenek barve svežega prereza emulzije in po skladiščenju v

hladilniku ter na stabilnost emulzije. Statistično značilen je bil njun vpliv na priokuse in na značilnost arome emulzije.

Ponovitev ni vplivala na ocenjevane senzorične lastnosti. Očiten je statistično značilen vpliv ocenjevalcev na skoraj vse ocenjene lastnosti, z izjemo značilnosti arome in priokusov.

Preglednica 18 Testiranje razlik v senzorični kakovosti emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Table 18 Testing for differences in sensory qualities of the emulsions prepared from chicken meat, made by using three different additives, separately for two muscles and three additives ($\bar{x} \pm sd$, Duncan's test, $\alpha = 0,05$).

lastnost	mišice	dodatek		
		nitrit	CCMP	staran CCMP
rožnat odtenek barve prereza T ₀ (1-7)	prsa	1,31±0,44 ^{by}	2,56±0,70 ^{ax}	2,88±0,47 ^{ax}
	bedra	2,28±0,52 ^{bx}	2,31±0,36 ^{bx}	2,63±0,22 ^{ax}
rožnat odtenek barve prereza T _H (1-7)	prsa	1,22±0,26 ^{by}	2,25±0,52 ^{ax}	2,53±0,43 ^{ax}
	bedra	2,03±0,39 ^{bx}	2,00±0,41 ^{bx}	2,34±0,24 ^{ax}
rožnat odtenek barve prereza T _S (1-7)	prsa	1,13±0,22 ^{by}	1,28±0,31 ^{bx}	2,09±0,49 ^{ax}
	bedra	1,47±0,29 ^{bx}	1,47±0,39 ^{bx}	2,03±0,39 ^{ax}
intenzivnost barve prereza (1-7)	prsa	1,31±0,44 ^{cy}	4,50±0,84 ^{ay}	3,63±0,85 ^{by}
	bedra	2,25±0,52 ^{cx}	5,50±0,68 ^{ax}	4,34±0,98 ^{bx}
stabilnost emulzije (1-7)	prsa	6,63±0,22 ^{ax}	6,38±0,56 ^{ax}	5,94±0,17 ^{bx}
	bedra	5,88±0,22 ^{ay}	5,56±0,31 ^{by}	5,63±0,22 ^{by}
tekstura (1-4-7)	prsa	5,03±0,50 ^{ax}	4,78±0,48 ^{ax}	4,88±0,34 ^{ax}
	bedra	3,31±0,31 ^{ay}	3,41±0,55 ^{ay}	3,25±0,32 ^{ay}
značilnost vonja (1-7)	prsa	5,84±0,70 ^{ax}	5,22±0,80 ^{bx}	5,75±0,41 ^{ax}
	bedra	6,13±0,53 ^{ax}	5,41±0,69 ^{bx}	5,78±0,45 ^{abx}
tuji vonji (1-7)	prsa	1,00±0,00 ^{ax}	1,00±0,00 ^{ax}	1,03±0,13 ^{ax}
	bedra	1,00±0,00 ^{ax}	1,03±0,13 ^{ax}	1,06±0,17 ^{ax}
značilnost arome (1-7)	prsa	5,78±1,03 ^{ax}	3,25±0,45 ^{cx}	4,81±0,48 ^{bx}
	bedra	5,81±0,79 ^{ax}	3,66±0,85 ^{cx}	4,28±0,71 ^{by}
priokusi (1-7)	prsa	1,38±0,81 ^{cx}	4,63±0,74 ^{ax}	2,84±0,47 ^{by}
	bedra	1,41±0,80 ^{cx}	4,19±0,87 ^{ax}	3,50±0,66 ^{bx}

\bar{x} – povprečna vrednost; sd – standardna deviacija; ^{x,y} – povprečni vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujeta ($P > 0,05$); ^{a,b,c} – povprečne vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P > 0,05$).

Emulzije iz prsi

Rožnati odtenek barve na svežem prerezu (slika 61) in po hranjenju v hladilniku je bil statistično značilno izrazitejši pri dodatku svežega in staranega inkapsuliranega CCMP-ja, po hranjenju na sobni temperaturi je bil višje ocenjen odtenek vzorca s staranim inkapsuliranim CCMP-jem (preglednica 18). Intenzivnost barve prereza je bila značilno najvišje ocenjena pri emulzijah s svežim CCMP-jem, nekoliko nižje s staranim CCMP-jem in občutno najnižje z dodatkom nitrita. Stabilnost emulzije z dodatkom staranega CCMP-ja je značilno slabša, vendar je še vedno visoko ocenjena. Značilnosti vonja in arome sta

slabše ocenjeni pri emulzijah s svežim CCMP-jem, verjetno zaradi najizrazitejšega priokusa. Na teksturo in tuje vonje različni dodatki za razvoj barve niso vplivali.



Slika 61 Prsa (levo – nitrit, desno – CCMP; sveži rez).

Figure 61 Chicken breast (left – nitrite, right – CCMP; freshly cut).

Emulzije iz beder

Statistično značilno boljši odtenek barve svežega prereza in po enournem skladiščenju pri skladiščenju na sobni temperaturi in temperaturi hladilnika kažejo emulzije z dodatkom staranega inkapsuliranega CCMP-ja (preglednica 18). Tudi intenzivnost barve prereza je mnogo višje ocenjena pri obeh emulzijah s CCMP-jem (slika 62), bolje pri svežem CCMP-ju. Stabilnost emulzije je za odtenek slabša pri vzorcih z dodatkom CCMP-ja, podobno je slabša tudi značilnost vonja in arome, verjetno zaradi izrazitejših priokusov.



Slika 62 Bedra (levo – nitrit, desno – CCMP; sveži rez).

Figure 62 Chicken thigh (left – nitrite, right – CCMP; freshly cut).

Uporabljeni dodatek

Pri dodatku nitrta sta rožnati odtenek barve in intenzivnost barve emulzije izrazitejši pri bedrih, medtem ko pri dodatku mikrodelcev CCMP-ja (svežih ali staranih) ni razlik v odtenku barve emulzij iz prsi in beder (slika 63). Intenzivnost barve prereza je večja pri emulzijah iz beder in pri dodatku CCMP-ja. Stabilnost emulzij iz prsi je boljše ne glede na uporabljen dodatek za razvoj barve. Prav tako so emulzije iz prsi pri vseh uporabljenih barvnih dodatkih nekoliko prečvrste (nad optimalno oceno 4 točke) v primerjavi z emulzijami iz beder. Na značilnost vonja, tuje vonje, značilnost arome in priokuse pri emulzijah z dodatkom nitrta in CCMP-ja vrsta uporabljene mišice ni vplivala; izjema so emulzije z dodatkom staranega CCMP-ja, kjer so vzorci beder pokazali slabšo značilnost arome in intenzivnejše priokuse.



Slika 63 CCMP (levo prsa, desno bedra; sveži rez).

Figure 63 CCMP (left chicken breast, right chicken thigh; freshly cut).

Na slikah od 64 do 68 so predstavljene razlike v senzorični kakovosti emulzij, izdelanih iz piščančjega mesa različne kakovosti (prsa, bedra) in dodatka (nitrit, inkapsuliran CCMP – svež ali staran) glede na sveži rez in skladiščenje pri sobni temperaturi 1 uro v razmaku 15 minut. Iz predstavljenih slik je možno razbrati predvsem razliko v rožnatem odtenku barve prereza in njegovi intenzivnosti, kar se ujema s podatki predstavljenimi v preglednici 18.



Slika 64 Sveži rez – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).

Figure 64 Freshly cut – upper nitrite, lower CCMP (left – chicken breast, right – chicken thigh).



Slika 65 15 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).

Figure 65 15 minute stored at ambient temperature – upper nitrite, lower CCMP (left – chicken breast, right – chicken thigh).



Slika 66 30 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).

Figure 66 30 minute stored at ambient temperature – upper nitrite, lower CCMP (left – chicken breast, right – chicken thigh).



Slika 67 45 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).

Figure 67 45 minute stored at ambient temperature – upper nitrite, lower CCMP (left – chicken breast, right – chicken thigh).



Slika 68 60 minutno skladiščenje pri sobni temperaturi – zgoraj nitrit, spodaj CCMP (levo – prsa, desno – bedra).

Figure 68 60 minute stored at ambient temperature – upper nitrite, lower CCMP (left – chicken breast, right – chicken thigh).

4.9 INSTRUMENTALNI PARAMETRI BARVE

Rezultati instrumentalne analize barve emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa, so prikazani v preglednici 19, viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na instrumentalne parametre barve emulzij v preglednici 20, testiranje razlik v instrumentalno izmerjeni barvi emulzij, izdelanih s tremi različnimi dodatki za razvoj barve, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih pa v preglednici 21.

Iz preglednice 19 je razvidno, da je imela rezina emulzije, skladiščena 1 uro v hladilniku najvišjo izmerjeno vrednost L^* (88,12), medtem ko je imel sveži rez to vrednost najnižjo (76,21). Najvišja vrednost a^* je bila izmerjena na svežem rezu (4,54), najnižja pa na rezini po skladiščenju na sobni temperaturi (3,29). Rezina skladiščena 1 uro na sobni temperaturi je imela najvišjo izmerjeno vrednost b^* (14,15), najnižjo pa rezina svežega reza (13,73). Prav tako lahko razberemo, da je bila najbolj variabilna vrednost a^* rezine na sobni temperaturi, najmanj pa vrednost L^* , izmerjena na rezini, skladiščeni 1 uro v hladilniku.

Koeficient variabilnosti barve je največji v rdeči komponenti (vrednost a^*), ki znaša med 48,87 in 59,27 %. Bistveno manjša je variabilnost barve rumene komponente (vrednost b^*) (6,58 do 22,20 %) in svetlosti (vrednost L^*), ki je le okoli 6 %.

Preglednica 19 Osnovni izračunani statistični parametri instrumentalne analize barve emulzij iz piščančjega mesa.

Table 19 The basic calculated statistical parameters of the instrumental analysis of the colour of the emulsions prepared from chicken meat.

parameter	n	\bar{x}	min	max	KV (%)
sveži rez					
vrednost L*	96	76,21	68,8	85,8	6,54
vrednost a*	96	4,54	0	7,4	48,87
vrednost b*	96	13,73	12	42,5	22,20
v hladilniku					
vrednost L*	96	88,12	76,6	96,7	5,47
vrednost a*	96	4,30	-0,2	7,3	51,08
vrednost b*	96	13,96	12,2	16	6,58
na sobni temperaturi					
vrednost L*	96	79,54	63	87,6	6,09
vrednost a*	96	3,29	-0,8	6,8	59,27
vrednost b*	96	14,15	12	16,1	6,64

n – število obravnavanj; \bar{x} – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; KV (%) – koeficient variabilnosti.

Iz preglednice 20 vidimo, da uporabljeni dodatki za obarvanje kakor tudi vrsta uporabljene mišice statistično značilno vplivajo ($P \leq 0,0001$) na skoraj vse izmerjene vrednosti L*, a* in b* na rezinah emulzij ne glede na čas in temperaturo skladiščenja, razen na vrednost b* svežega reza.

Preglednica 20 Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na instrumentalne parametre barve emulzij iz piščančjega mesa.

Table 20 The sources of variability and statistical characteristics of their influence on the instrumental parameters of colour emulsions prepared from chicken meat.

parameter	vir variabilnosti (P vrednost)				
	dodatek	mišica	dodatek*	mišica*	ponovitev paralelka
sveži rez					
vrednost L*	<0,0001	<0,0001	0,0025	0,6974	0,6917
vrednost a*	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0046	0,6772
vrednost b*	0,1656	0,8622	0,5099	0,4856	0,3331
v hladilniku					
vrednost L*	<0,0001	<0,0001	0,0031	0,0313	0,5371
vrednost a*	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0135	0,3331
vrednost b*	<0,0001	<0,0001	0,2371	0,0024	0,0907
na sobni temperaturi					
vrednost L*	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0070	0,9265
vrednost a*	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0094	0,3010
vrednost b*	<0,0001	<0,0001	0,0017	0,1200	0,9959

$P \leq 0,001$ – statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ – statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ – statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ – statistično neznačilen vpliv.

Statistično značilne so tudi vse interakcije med uporabljenim dodatkom in vrsto mišice za barvne komponente L^* in a^* , za vrednost b^* pa samo po skladiščenju na sobni temperaturi.

Preglednica 21 Testiranje razlik v instrumentalno izmerjeni barvi emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Table 21 Testing for differences in instrumentally measured colour emulsions prepared from chicken meat, made by using three different additives, separately for two muscles and three additives ($\bar{x} \pm sd$, Duncan's test, $\alpha = 0,05$).

parameter	mišice	dodatek		
		nitrit	CCMP	staran CCMP
sveži rez				
vrednost L^*	prsa	83,76±1,33 ^{ax}	74,70±2,38 ^{bx}	74,03±1,57 ^{bx}
	bedra	81,21±1,56 ^{ay}	70,58±1,31 ^{cy}	73,00±1,81 ^{bx}
vrednost a^*	prsa	0,34±0,23 ^{by}	5,51±0,48 ^{ay}	5,28±0,72 ^{ay}
	bedra	3,38±0,80 ^{cx}	6,71±0,44 ^{ax}	6,04±0,54 ^{bx}
vrednost b^*	prsa	12,78±0,33 ^{ay}	14,84±7,39 ^{ax}	13,74±0,68 ^{ay}
	bedra	13,03±0,32 ^{cx}	13,72±0,31 ^{bx}	14,29±0,60 ^{ax}
v hladilniku				
vrednost L^*	prsa	94,81±1,64 ^{ax}	87,24±2,32 ^{bx}	87,45±1,09 ^{bx}
	bedra	93,00±1,10 ^{ay}	82,51±1,16 ^{by}	83,72±2,53 ^{by}
vrednost a^*	prsa	0,01±0,14 ^{by}	4,92±0,40 ^{ay}	5,15±0,45 ^{ay}
	bedra	3,36±0,62 ^{bx}	6,32±0,51 ^{ax}	6,03±0,51 ^{ax}
vrednost b^*	prsa	13,01±0,62 ^{by}	13,73±0,35 ^{ay}	13,41±0,56 ^{ay}
	bedra	13,89±0,54 ^{bx}	14,99±0,52 ^{ax}	14,73±0,92 ^{ax}
na sobni temperaturi				
vrednost L^*	prsa	86,48±0,60 ^{ax}	78,63±2,60 ^{bx}	78,83±1,00 ^{bx}
	bedra	83,89±1,02 ^{ay}	72,95±3,04 ^{cy}	76,50±1,08 ^{by}
vrednost a^*	prsa	-0,38±0,18 ^{by}	3,87±0,50 ^{ay}	4,05±0,37 ^{ay}
	bedra	2,19±0,49 ^{cx}	5,28±0,54 ^{ax}	4,72±0,36 ^{bx}
vrednost b^*	prsa	12,84±0,43 ^{cy}	13,44±0,37 ^{by}	14,38±0,61 ^{ay}
	bedra	14,18±0,54 ^{bx}	15,01±0,49 ^{ax}	15,05±0,55 ^{ax}

\bar{x} – povprečna vrednost; sd – standardna deviacija; ^{x,y} – povprečni vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujeta ($P > 0,05$); ^{a,b,c} povprečne vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P > 0,05$).

Emulzije iz prsi

Emulzije z dodatkom inkapsuliranega CCMP – svežega in staranega, se po barvi med seboj ne razlikujejo, vendar so temnejše (nižja vrednost L^*), bolj rdeče in rumene (višji vrednosti a^* in b^*) v primerjavi z emulzijami z dodatkom nitrita ne glede na čas in temperaturo skladiščenja (preglednica 21). Stabilnost barve emulzij s CCMP-jem je boljša (višja vrednost L^*) po skladiščenju rezin v hladilniku in na sobni temperaturi.

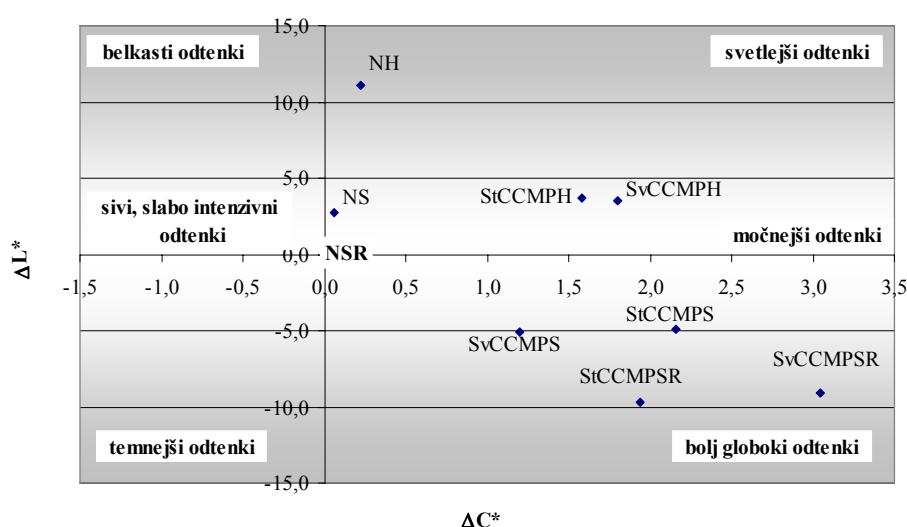
Emulzije iz beder

Emulzije iz beder z dodatkom svežih mikrodelcev CCMP-ja so po barvi najtemnejše (nizka vrednost L^*), najbolj rdeče in rumene (višji vrednosti a^* in b^*), medtem ko so emulzije z

dodatkom nitrita najsvetlejše (visoka vrednost L^*), najmanj rdeče in rumene (nizki vrednosti a^* in b^*). Stabilnost barve emulzij v hladilniku je boljše (nižji vrednosti L^* in a^* ter višja vrednost b^*) kot pri sobni temperaturi, ne glede na uporabljen dodatek za obarvanje.

Uporabljeni dodatek

Emulzije iz prsi in beder se statistično značilno razlikujejo v večini izmerjenih komponent barve, ne glede na uporabljeni dodatek za obarvanje in temperaturo skladiščenja. Emulzije iz beder so temnejše (nižje vrednosti L^*), bolj rdečega in rumenega odtenka barve (a^* in b^* vrednosti) skozi način skladiščenja (temperatura hladilnika, sobna temperatura), izjema je bila L^* vrednost svežega reza emulzij, pripravljenih s staranim inkapsuliranim CCMP-jem, kjer ni bilo statistično značilnih razlik v tem parametru med emulzijami iz prsi in beder.



Slika 69 Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev emulzij, izdelanih iz piščančjih prsi, prikazana glede na vzorce z nitritom (sveži rez).

Figure 69 The correlation between the change of light (ΔL^*) and the colour intensity (ΔC^*) of emulsion samples, prepared from chicken breast presented in comparison with the samples where nitrite was used (freshly cut).

Legenda: NSR – Nitrit sveži rez; NH – Nitrit hladilnik; NS – Nitrit sobna temperatura; SvCCMPSR – Sveži inkapsuliran CCMP sveži rez; SvCCMPH – Sveži inkapsuliran CCMP hladilnik; SvCCMPS – Sveži inkapsuliran CCMP sobna temperatura; StCCMPSR – Starani inkapsuliran CCMP sveži rez; StCCMPH – Starani inkapsuliran CCMP hladilnik; StCCMPS – Starani inkapsuliran CCMP sobna temperatura.

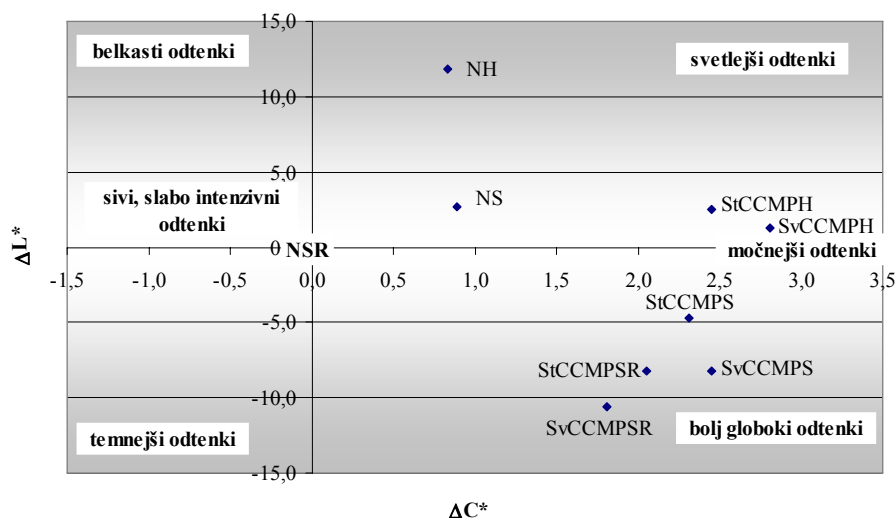
Emulzije iz prsi

Emulzije, pripravljene z dodatkom nitrita, ki so bile skladiščene v hladilniku in na sobni temperaturi, so imele glede na sveži rez svetlejši odtenek barve (slika 69). Vrsta uporabljenega dodatka pigmenta za obarvanje emulzij (svež ali staran inkapsuliran CCMP) ni vplivala na svetlost emulzij (ΔL^*) znotraj skladiščenja pri določeni temperaturi (sobna temperatura, temperatura hladilnika), vplivala pa je na njihovo intenzivnost barve (ΔC^*). Emulzije pripravljene z inkapsuliranim CCMP-jem (svežim ali staranim), skladiščene v hladilniku so imele tako bolj svetlejšo in močnejšo barvo kot je bila le-ta na vzorcih

emulzij svežega reza z nitritom. Vzorci svežega reza emulzij z dodatkom inkapsuliranega CCMP-ja in vzorci emulzij z dodatkom inkapsuliranega CCMP-ja skladiščeni pri sobni temperaturi so bili temnejše, bolj globoke, intenzivne barve z ozirom na tiste vzorce emulzij z mikrodelci CCMP-ja, ki so bili skladiščeni v hladilniku, seveda pa tudi z ozirom na standard (emulzije z nitritom – sveži rez). Bolj intenzivno (močnejšo) barvo so imele pri svežem rezu in skladiščenju v hladilniku emulzije, pripravljene s svežim inkapsuliranim CCMP-jem, na sobni temperaturi pa emulzije, pripravljene s staranim inkapsuliranim CCMP-jem.

Emulzije iz beder

Emulzije, izdelane iz piščančjih beder s pomočjo treh različnih dodatkov (nitrit, svež in staran inkapsuliran CCMP) in skladiščene pri dveh različnih temperaturah (sobna temperatura in temperatura hladilnika, upoštevajoč tudi sveži rez), so se med seboj razlikovale tako v spremembi svetlosti (ΔL^*) kakor tudi v intenzivnosti barve (ΔC^*). Z ozirom na sveži rez emulzij, pripravljenih z nitritom, so bile emulzije z nitritom, skladiščene v hladilniku, svetlejšje kot tiste skladiščene na sobni temperaturi. Emulzije, pripravljene z mikrodelci CCMP-ja in skladiščene v hladilniku so se po svetlosti približevale standardu (sveži rez nitrit), intenzivnost odtenka barve je bila zelo močna (bolj pri vzorcih, pripravljenih s svežim CCMP). Vzorci emulzij z mikrodelci CCMP-ja (sveži rez in skladiščenje pri sobni temperaturi) so izkazovali temnejše, bolj globoke odtenke barve kot emulzije z nitritom (sveži rez) (slika 70).



Slika 70 Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev emulzij, izdelanih iz piščančjih beder, prikazana glede na vzorce z nitritom (sveži rez).

Figure 70 The correlation between the change of light (ΔL^*) and the colour intensity (ΔC^*) in the emulsion samples prepared from chicken thighs presented in comparison with the samples where nitrite was used (freshly cut).

Legenda: NSR – Nitrit sveži rez; NH – Nitrit hladilnik; NS – Nitrit sobna temperatura; SvCCMPSR – Sveži inkapsuliran CCMP sveži rez; SvCCMPH – Sveži inkapsuliran CCMP hladilnik; SvCCMPS – Sveži inkapsuliran CCMP sobna temperatura; StCCMPSR – Starani inkapsuliran CCMP sveži rez; StCCMPH – Starani inkapsuliran CCMP hladilnik; StCCMPS – Starani inkapsuliran CCMP sobna temperatura.

4.10 INSTRUMENTALNI PARAMETRI TEKSTURE

Rezultati instrumentalne analize teksture emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa, so prikazani v preglednici 22, viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na instrumentalne parametre teksture emulzij v preglednici 23, testiranje razlik v instrumentalno izmerjeni teksturi emulzij, izdelanih s tremi različnimi dodatki za razvoj barve, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih pa v preglednici 24.

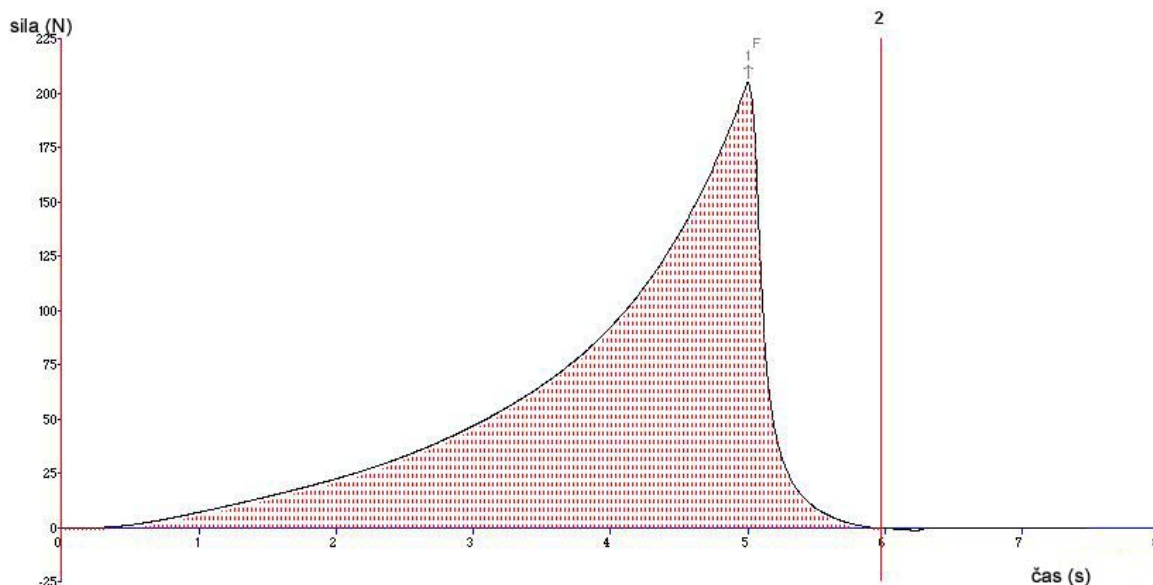
Preglednica 22 Osnovni izračunani statistični parametri instrumentalne analize teksture emulzij iz piščančjega mesa.

Table 22 The basic calculated statistical parameters of instrumental analysis texture of the emulsions prepared from chicken meat.

parameter	n	\bar{x}	min	max	KV (%)
tlačna trdnost (N)	48	144,96	33,31	263,40	41,05
rezna trdnost Warner-Bratzler (N)	96	3,38	2,00	5,33	33,22
strižno-tlačna trdnost Kramer (N)	48	86,66	50,49	143,62	36,63

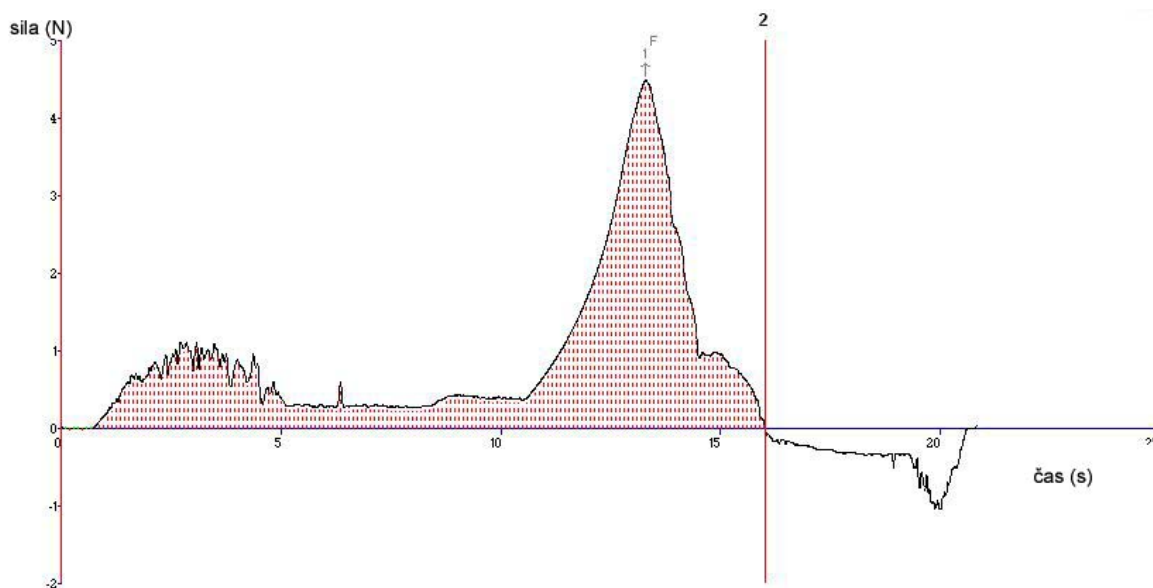
n – število obravnavanj; \bar{x} – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; KV (%) – koeficient variabilnosti.

Iz preglednice 22 razberemo, da je bila tlačna trdnost cilindričnega vzorca visoka (144,96 N), strižno-tlačna trdnost po Kramerju je bila nekoliko nižja (86,66 N), najnižja pa je bila rezna trdnost po Warner-Bratzlerju (3,38 N). Pri tem je bil koeficient variabilnosti najvišji pri tlačni trdnosti (41,05 %), najnižji pa pri rezni trdnosti Warner-Bratzler (33,22 N). Na slikah 71, 72 in 73 je v obliki grafov predstavljena instrumentalno izmerjena tekstura piščančjih emulzij, pripravljenih iz prsi z dodatkom mikrodelcev CCMP-ja v povezavi z rezultati iz preglednice 22.



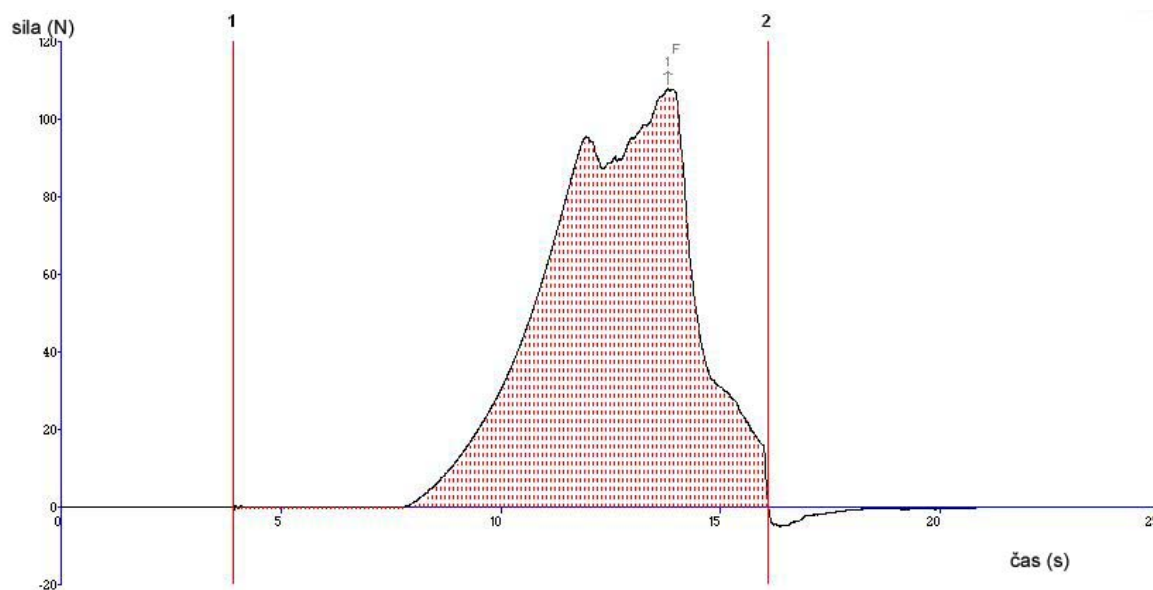
Slika 71 Grafični prikaz instrumentalno izmerjene tlačne trdnosti pri prsih z dodatkom mikrodelcev CCMP-ja.

Figure 71 Graphical presentation of instrumentally measured pressure strength of chicken breast with microparticles of CCMP added.



Slika 72 Grafični prikaz instrumentalno izmerjene rezne trdnosti Warner-Bratzler pri prsih z dodatkom mikrodelcev CCMP-ja.

Figure 72 Graphical presentation of instrumentally measured cutting strength Warner-Bratzler of chicken breast with microparticles of CCMP added.



Slika 73 Grafični prikaz instrumentalno izmerjene strižno-tlačne trdnosti (Kramer) pri prsih z dodatkom CCMP-ja.

Figure 73 Graphical presentation of instrumentally measured shearing and pressure strength (Kramer) of chicken breast with CCMP added.

Preglednica 23 Viri variabilnosti in statistične značilnosti njihovega vpliva na instrumentalne parametre teksture emulzij iz piščančjega mesa.

Table 23 The sources of variability and statistical characteristics of their influence on instrumental parameters of the texture of the emulsions prepared from chicken meat.

parameter	vir variabilnosti (P vrednost)				
	dodatek	mišica	dodatek*	mišica*	ponovitev paralelka
tlačna trdnost (N)	0,0239	0,0002	0,1646	0,0093	0,2266
rezna trdnost Warner-Bratzler (N)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5269	0,7117
strižno-tlačna trdnost Kramer (N)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,2518	0,3915

P≤0,001 – statistično zelo visoko značilen vpliv; P≤0,01 – statistično visoko značilen vpliv; P≤0,05 – statistično značilen vpliv; P>0,05 – statistično neznačilen vpliv.

Na instrumentalne parametre teksture emulzij iz piščančjega mesa sta uporabljeni dodatek za obarvanje in vrsta mišice statistično učinkovala značilno (preglednica 23).

Interakcija dodatka in vrste mišice je statistično značilna (P≤0,001) za rezno trdnost Warner-Bratzler kot tudi za strižno-tlačno trdnost Kramer.

Vpliv ponovitve je bil statistično značilen (P≤0,01) na tlačno trdnost.

Paralelka na instrumentalno izmerjene parametre teksture emulzij ni vplivala statistično značilno, kar kaže na ustrezno in natančno pripravljenost posameznih vzorcev in dobro umerjenost aparature.

Preglednica 24 Testiranje razlik v instrumentalno izmerjeni teksturi emulzij iz piščančjega mesa, izdelanih s tremi različnimi dodatki, ločeno po dveh mišicah in treh dodatkih ($\bar{x} \pm sd$, Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Table 24 Testing for differences in instrumentally measured texture of the emulsions prepared from chicken meat, made by using three different additives, separately for two muscles and three additives ($\bar{x} \pm sd$, Duncan's test, $\alpha = 0,05$).

parameter	mišice	dodatek		
		nitrit	CCMP	staran CCMP
tlačna trdnost (N)	prsa	209,70±41,96 ^{ax}	157,58±48,84 ^{abx}	147,65±68,08 ^{bx}
	bedra	131,28±26,85 ^{ay}	94,50±48,54 ^{ay}	129,06±59,32 ^{ax}
rezna trdnost Warner-Bratzler (N)	prsa	4,84±0,28 ^{ax}	4,28±0,19 ^{bx}	4,27±0,32 ^{bx}
	bedra	2,32±0,16 ^{ay}	2,28±0,14 ^{ay}	2,29±0,08 ^{ay}
strižno-tlačna trdnost Kramer (N)	prsa	132,02±8,74 ^{ax}	109,78±4,18 ^{bx}	108,35±6,95 ^{bx}
	bedra	55,01±3,49 ^{by}	58,49±1,85 ^{ay}	56,31±2,01 ^{aby}

\bar{x} – povprečna vrednost; sd – standardna deviacija; ^{x,y} – povprečni vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujeta (P>0,05); ^{a,b,c} – povprečne vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujejo (P>0,05).

Iz preglednice 24 je razvidno, da so emulzije iz prsi z dodatkom svežega in staranega inkapsuliranega CCMP-ja po vseh treh metodah instrumentalnega merjenja teksture pokazale statistično značilno manj čvrsto in gumijasto teksturo kot tiste z dodatkom nitrta.

Pri emulzijah iz beder so razlike v teksturi značilne samo pri merjenju strižno-tlačne trdnosti po Kramerju, kjer večjo čvrstost kažejo emulzije z dodatkom svežega in staranega inkapsuliranega CCMP-ja. Absolutno so tudi vrednosti strižno-tlačne trdnosti Kramer za emulzije iz beder okoli 50 % nižje (manj čvrste) od emulzij iz prsi. Vzrok mehkejše teksture emulzij iz beder je verjetno zaradi večje zamaščenosti surovine.

Vse tri instrumentalne metode merjenja teksture so pokazale značilno razliko med emulzijami iz beder in prsi, razen pri merjenju tlačne trdnosti z dodatkom staranega CCMP-ja. Emulzije iz beder so manj čvrste in gumijaste (nižje instrumentalne vrednosti), predvsem tiste z dodanim inkapsuliranim CCMP-jem.

4.11 KORELACIJE MED SENZORIČNIMI LASTNOSTMI IN INSTRUMENTALNIMI PARAMETRI

V vseh obdobjih merjenja barve rezin emulzij je izračunana statistično značilna ($P \leq 0,001$) visoka in tesna korelacija ($R \geq 0,80$) med senzorično iz vrednoteno intenzivnostjo barve in instrumentalnimi vrednostmi L^* in a^* (preglednica 25). V tem primeru lahko instrumentalna analiza komponent barve L^* in a^* zamenja senzorično. Senzorično ocenjeni odtenek barve je v bolj šibki korelaciji z instrumentalno izmerjenimi komponentami barve.

Preglednica 25 Tesnost povezave med senzoričnimi lastnostmi barve in instrumentalno izmerjenimi parametri barve (Pearsonovi korelacijski parametri, R).

Table 25 The correlation between the sensory characteristics of colour and instrumentally measured parameters for colour (Pearson's correlation coefficients, R).

lastnost \ vrednost	sveži rez			1 h v hladilniku			1 h na sobni temperaturi		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
odtenek barve	-0,50***	0,59***	0,00	-0,44***	0,61***	0,25**	-0,29***	0,39***	0,39***
intenzivnost barve	-0,81***	0,82***	0,19	-0,82***	0,82***	0,56***	-0,80***	0,82***	0,51***

*** $P \leq 0,001$ – statistično zelo visoko značilno; ** $P \leq 0,01$ – statistično visoko značilno; * $P \leq 0,05$ – statistično značilno; $P > 0,05$ – statistično neznačilno.

S pomočjo izračunane tesnosti povezave (preglednica 26) med senzoričnimi lastnostmi teksture in instrumentalno izmerjenimi parametri teksture mesnih emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa vidimo, da je pozitivna statistično značilna ($P \leq 0,001$) in tesna korelacija med senzorično ocenjeno teksturo in instrumentalnim merjenjem rezne trdnosti z Warner-Bratzlerjevim ($R=0,85$) in Kramerjevim nastavkom ($R=0,91$). To pomeni, da je za vrednotenje teksture emulzij primerna in zadostna metoda z Warner-Bratzlerjevim in Kramerjevim testom.

Preglednica 26 Tesnost povezave med senzoričnimi lastnostmi teksture in instrumentalno izmerjenimi parametri teksture (Pearsonovi korelacijski parametri, R).

Table 26 ametri, R).

Table 27 The correlation between the sensory characteristics of texture and instrumentally measured parameters for texture (Pearson's correlation coefficients, R).

parameter	tlačna trdnost (N)	rezna trdnost Warner-Bratzler (N)	stižno-tlačna trdnost Kramer (N)
stabilnost	0,44 ^{***}	0,67 ^{***}	0,55 ^{***}
tekstura	0,37 [*]	0,85^{***}	0,91^{***}

*** $P \leq 0,001$ – statistično zelo visoko značilno; ** $P \leq 0,01$ – statistično visoko značilno; * $P \leq 0,05$ – statistično značilno; $P > 0,05$ – statistično neznačilno.

5 RAZPRAVA

Človek je v življenju izpostavljen številnim kancerogenim spojinam, ki izvirajo iz mnogih in različnih virov. V mesni industriji se za razsoljevanje mesa in mesnih izdelkov tradicionalno uporablja nitrit, katerega osnovna vloga je oblikovanje specifične rožnato rdeče barve mesnih izdelkov (O'Boyle in sod., 1992; Pegg in Shahidi, 1997). Razsoljeni izdelki imajo značilen vonj in okus, ki se močno razlikujeta od izdelkov, ki so obdelani le s kuhinjsko soljo (Shahidi in sod., 1986; Wirth, 1991; Ramarathnam in Rubin, 1994). Nitrit je bil in je še danes najbolj razširjen dodatek v mesninah. Zaradi nevarnosti, da nitrit v živilih in v človeškem organizmu lahko tvori kancerogene N-nitrozo spojine (Shahidi, 1991; O'Boyle in sod., 1992; Wettasinghe in Shahidi, 1997), je njegova raba vprašljiva. Problem potencialne kancerogenosti nitrita so mnogi znanstveniki hoteli že pred leti rešiti z različnimi pristopi, vendar je zamenjava nitrita zaradi njegove multifunkcionalnosti zelo težavna in zato je zelo majhna možnost njegove zamenjave z eno samo spojino, ki bi nadomestila vse njegove funkcije (Rubin in sod., 1985; O'Boyle in sod., 1991; Shahidi, 1991; Shahidi in Pegg, 1992). Vsekakor je popolna izključitev nitrita iz procesa proizvodnje najbolj zanesljiva metoda, saj bi s tem izločili prekursorje za tvorbo N-nitrozaminov.

Eden izmed omenjenih pristopov zamenjave nitrita je uporaba alternativnega pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa (cooked cured meat pigment – CCMP), ki ga je znanstvenikom že uspelo sintetizirati direktno iz govejih krvnih celic ali iz hemina (Shahidi in sod., 1982; Shahidi in Pegg, 1988, 1991 in 1993a; Pegg in Shahidi, 1997). Pri sami sintezi morajo biti prisotni reducenti, ki ohranjajo železov ion v porfirinskem kompleksu v fero obliki in pospešijo konverzijo nitrita v NO (Shahidi in Pegg, 1993a; Jankiewicz in sod., 1994; Pegg in Shahidi, 1996 in 1997; Pegg in sod., 1996; Arneht, 1998). Pigment CCMP bi bil lahko alternativa nitrita, čeprav se v industrijski proizvodnji izdelan pigment nikjer na svetu še ne uporablja, ker ni dovolj stabilen in na zraku hitro oksidira v feri obliko, ki pa nima značilne rožnato-rdeče barve. Zato so za razvoj praktičnega postopka, primernega za komercialno uporabo tega pigmenta, potrebne še dodatne raziskave (Shahidi in Pegg, 1993a). Prav ta problematika je bila povod za našo raziskavo, katere namen je bil proučiti možnost zamenjave nitrita s CCMP-jem z namenom določiti njegovo stabilnost in podaljšati obstojnost.

Pigment CCMP smo sintetizirali iz govejega hemina s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO) in reducentov (Na-askorbat in vitamin E), pri čemer je bila osnova modificirana metoda, ki sta jo uporabila Shahidi in Pegg (1991 in 1993a). Izkoristek sinteze je bil 18 %. Glede na to, da je pigment CCMP izjemno občutljiv na svetlobo in kisik, je problem njegove stabilnosti še kako aktualen. Številni raziskovalci so poskušali CCMP stabilizirati s pomočjo fluorescentne svetlobe (Pegg in Shahidi, 1989), γ -žarkov (Shahidi in sod., 1991), prenasičene raztopine NO (Shahidi in sod., 1982; Shahidi in Pegg, 1990) in s pomočjo inkapsulacije (Shahidi in Pegg, 1991b in 1993a; O'Boyle in sod., 1991 in 1992) z različnimi ogljikovimi hidrati, od katerih so β -ciklodekstrin, N-LOK (modificiran škrob) in Maltrin M-250 (maltodekstrin) dali najboljše rezultate. Rubin in sod. (1992) ugotavljajo, da morajo biti delci samega pigmenta pred inkapsulacijo čim manjši in kar se da enake velikosti (okoli 2 μ), v primeru, da je pigment namenjen za vbrizgavanje v cele kose mesa.

Eno izmed možnih tehnik inkapsulacije so O'Boyle in sod. (1992) ter Shahidi in Pegg (1993a) označili razprševalno sušenje ("spray drying").

Zato smo predpostavili, da bi bila možna zaščita pigmenta pred oksidacijo ne samo prisotnost reducentov, ampak tudi vgrajevanje CCMP-ja v različne sisteme, glede na to, da nosilni sistemi kot so mikrodelci in nanodelci, predstavljajo eno od najobetavnejših tehnologij razvoja v prehranbeni industriji (Alleman in sod., 1993; Brazel, 1999; Gouin, 2004). Za najučinkovitejšo oksidativno stabilnost izvedeno s pomočjo elektronske paramagnetne resonance na EPR spektrometru Bruker ESP 300 E, se je izkazala stabilizacija pigmenta – inkapsulacija v alginatno ovojnico (2 % raztopina Na-alginata) s pomočjo inkapsulatorja Inotech IE-50 R z razbitjem laminarnega toka pri uporabi šobe 250 μm in premreževalne raztopine 0,3 M CaCl_2 . Ca ioni so pri tem premrežili molekule alginata in oblikovali so se mikrodelci s CCMP-jem, ki so imeli EPR spekter z značilnim trojnim razcepom zaradi hiperfine interakcije Fe^{2+} z jedrom dušika v Fe^{2+} -NO kompleksu, kar je skladno z rezultati raziskav, opravljenih s strani Bonnett in sod. (1980), Pegg in sod. (1996), Pegg in Shahidi (1997), Stevanović (1998) ter Stevanović in Šentjunc (2000a).

Pri tvorbi mikrodelcev CCMP-ja smo ugotovili, da je za tvorbo laminarnega toka suspenzije Na-alginata in spojine (CCMP) z večanjem koncentracije Na-alginata potrebna višja hitrost curka. Razlike med nižjimi in višjimi hitrostmi pri posamezni koncentraciji Na-alginata se ne spreminjajo veliko. Ugotovili smo, da na velikost izdelanih mikrodelcev vpliva predvsem uporabljena frekvenca pa tudi hitrost curka. Večje mikrodelce smo dobili pri nižjih frekvencah in večjih hitrostih curka raztopine. Tudi porazdelitev velikosti mikrodelcev je bila najboljša pri uporabi nižjih frekvenc, širina porazdelitve velikosti pa se je zmanjševala tudi z večanjem koncentracije Na-alginata. Na obliko izdelanih mikrodelcev je tako vplivala koncentracija Na-alginata, in sicer čim višja je bila, tem bolj okroglih oblik so bili mikrodelci in bolj gladkih površin. Z večanjem koncentracije Na-alginata je bilo premreženje polimerne strukture boljše, zato je bila struktura trdnjša in bolj odporna na mehanske vplive okolja. Pri sušenju mikrodelcev na papirju je prišlo do oksidacije le teh, kar je bilo negativno. Tako smo ugotovili da je ena od možnih fizikalnih zaščit CCMP-ja vgrajevanje v alginat kot nosilni sistem, kar je skladno z ugotovitvami nekaterih raziskav (Bauer in sod., 2002; Mørch, 2008).

Mikrodelci CCMP-ja zaščiteni na ta način so tako ostali stabilni več kot 6 ur, kar je bilo dovolj, da smo jih v nadaljevanju lahko uporabili v modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz mehansko ločenega piščančjega mesa – iz mišic z različnim oksidativnim metabolizmom. Pomen piščančjega mesa kot visoko kakovostne hrane je predvsem v biološko visokovrednih beljakovinah in zelo dobri prebavljivosti v primerjavi z mesom klavnih živali. Poleg tega je to meso kakovostnejše tudi zaradi razmeroma majhne količine intramuskularne mastnine. Maščobno tkivo se pri perutnini za razliko od klavnih živali nabira pretežno pod kožo, v trebušni votlini in ni vraščeno med mišičnimi vlakni. Podkožne in medmišične maščobe lahko odstranimo pred uživanjem mesa, kar smo naredili tudi mi, medtem ko mišičnih maščob ni možno odstraniti. Slednje pa prispevajo k marmoriranosti mesa, ki ugodno vpliva na jedilne lastnosti (barva, mehkoča, sočnost, aroma). Zato je perutninsko meso po odstranitvi kože pusto in s prehranskega vidika primerne kakovosti. Potrošnik danes zahteva hrano z manjšo energijsko vrednostjo, manj mastno, vendar okusno, z dovolj nujno potrebnih beljakovin živalskega izvora (Marinšek,

1996). Porabniki perutnino cenijo zaradi visoke prehranske in dietne vrednosti ter zaradi konkurenčne cene (Žlender, 1997), zato poraba perutninskega mesa in izdelkov iz njega v svetu in tudi pri nas vedno bolj narašča.

Pri senzorični analizi znotraj naše raziskave so bile mesne emulzije, pripravljene s svežim ali staranim inkapsuliranim CCMP-jem, ocenjene višje za rožnati odtенок barve prereza kot emulzije, pripravljene z nitritom. Še posebej se je to pokazalo pri emulzijah, pripravljenih iz prsi, ki vsebujejo manj mioglobina, kot komponente za tvorbo tipične barve razsoljenega mesa. Pri emulzijah iz beder, pripravljenih z inkapsuliranim CCMP-jem, je denaturiran mioglobin, ki je sive barve, interferiral z rožnato barvo dodanega CCMP-ja, ki zato ni prišla toliko do izraza, kar se ujema z rezultati raziskav, ki so jih opravili Wirth (1986), Potthast (1987), Shahidi in Pegg (1991 in 1991a) in Ledward (1992). Slednji so namreč ugotovili, da je za doseg optimalne barve v mesu z višjo vsebnostjo nativnega mišičnega pigmenta – mioglobina potrebno dodati odgovarjajočo večjo količino CCMP-ja. Prav zaradi tega je CCMP primeren za izdelavo klobas oziroma izdelkov, ki vsebujejo v glavnem meso z malo mioglobina, kot je piščančje, puranje, prašičje in ribje (Rubin in sod., 1992; Stevanović in sod., 1997 in 2000; Stevanović, 1998; Pejkovski, 2000; Pegg in sod., 2000). Ocena rožnatega odtenka barve prereza je padala s časom in je bila najvišja pri svežem prerezu in najnižja pri prerezu hranjenem eno uro pri sobni temperaturi. Opisana tendenca je bila neodvisna od vrste mišice in vrste dodatka za obarvanje emulzije. Niti nitrit, niti inkapsuliran CCMP nista tvorila stabilne barve, ki ne bi na stiku z zrakom oksidirala; barva se je nekoliko bolje ohranila pri nižjih temperaturah – pri hrambi v hladilniku. Ocena rožnatega odtenka barve prereza emulzije, pripravljene s CCMP-jem, je bila pri svežem rezu sicer višja kot pri emulziji, pripravljene z nitritom, ampak je rožnata barva, dobljena s CCMP-jem hitreje oksidirala.

Glede senzorične ocene intenzivnosti barve so bile emulzije, pripravljene z inkapsuliranim CCMP-jem ocenjene višje kot emulzije, pripravljene z nitritom; s staranim CCMP-jem nekoliko nižje kot s svežim CCMP-jem. Tudi tip mišice je značilno prispeval k senzorični oceni intenzivnosti barve, saj so bile emulzije, pripravljene iz mišičnine beder ocenjene višje kot emulzije, pripravljene iz prsi. Pri vrednosti L^* smo opazili visoko negativno korelacijo, pri vrednosti a^* pa visoko pozitivno korelacijo s senzorično ocenjeno intenzivnostjo barve prereza. Intenzivnost barve prereza se je skladala z instrumentalno izmerjenimi vrednostmi za temnejšo in bolj rdečo barvo.

Večja vsebnost maščob v mišicah beder je vplivala tudi na senzorično oceno teksture. Emulzije, pripravljene iz beder so bile ocenjene kot nekoliko drobljive/mazave, napram emulzijam, pripravljenim iz prsi, ki so bile ocenjene kot bolj gumijave. Dodatki za razvoj barve na teksturo niso bistveno vplivali.

Pri ocenah za vonj in tuj vonj med emulzijami pripravljenimi z nitritom in emulzijami pripravljenimi z inkapsuliranim CCMP-jem ni bilo večjih razlik. Emulzije, pripravljene z nitritom so bile višje ocenjene za značilnost arome kot emulzije, pripravljene s CCMP-jem. Emulzije, pripravljene s CCMP-jem so nekoliko pogrenile (verjetno zaradi dodanega fosfata v procesu sinteze CCMP-ja in pri izdelavi mesne emulzije), zato so bili priokus pri njih ocenjeni kot moteči, medtem ko pri emulzijah, pripravljenih z nitritom niso bili zaznavni.

Pri instrumentalni analizi barve prereza emulzije se je pokazala največja razlika med različnimi tipi emulzij pri vrednosti a^* (rdeča barva). Vrednosti a^* so bile pri emulzijah, izdelanih iz beder, višje kot pri emulzijah, izdelanih iz prsi. Koeficient variabilnosti meritev vrednosti a^* pri emulzijah, pripravljenih z nitritom je bil bistveno višji kot pri emulzijah, pripravljenih s CCMP-jem, kar bi lahko pomenilo, da barva, ki nastane z nitrozacijo ni tako stabilna in enakomerna kot tista, ki jo tvori CCMP. Svetlost (L^*) in rdeč odtenek (a^*) emulzije, pripravljene s CCMP-jem se s skladiščenjem nista bistveno spreminjala, kar je zelo pozitivno. K razliki v barvi je prispevala vrednost b^* . Vrednost L^* je bila pri emulzijah, pripravljenih z nitritom višja (svetlejša barva), medtem ko je bila vrednost a^* (intenzivnost rdeče barve) višja pri emulzijah z dodatkom CCMP-ja (ne glede na starost pigmenta). Vrsta mišice je bistveno vplivala na instrumentalno izmerjene vrednosti barve prereza; emulzije, pripravljene iz beder so kazale višje vrednosti a^* in nižje vrednosti L^* . Emulzije, pripravljene s CCMP-jem, so bile bolj izražene temne barve kot vzorci, pripravljene z nitritom. Opaziti je bilo tudi, da so meritve na svežem rezu pokazale bolj izražene barve kot pa meritve po eni uri hranjenja. Hranjenje pri temperaturi hladilnika je malenkost bolj ohranilo intenzivnost barve kot hranjenje na sobni temperaturi.

Skladno s senzorično analizo so tudi instrumentalni testi teksture pokazali večje vrednosti, to je večjo trdnost emulzij, izdelanih iz prsi. Emulzije iz beder so vsebovale večji odstotek maščobe in temu sorazmerno manjši odstotek beljakovin, zato so bile manj čvrste – kazale so manjši upor na delujoče sile deformacije. Vrednosti, merjene na emulzijah z dodanim svežim in staranim inkapsuliranim CCMP-jem, so bile nižje kot vrednosti, merjene na emulzijah, pripravljenih z nitritom, kar kaže na to, da so emulzije s svežim in staranim inkapsuliranim CCMP-jem manj čvrste kot emulzije z nitritom. Ta trend je bil bolj izrazit pri emulzijah iz prsi kot iz beder in je kazal na minimalen vpliv dodatka za razvoj barve na teksturo emulzije. Instrumentalni parametri teksture, izmerjeni s testom Warner-Bratzler in testom Kramer so kazali visoko pozitivno korelacijo s senzorično oceno teksture, tako da lahko instrumentalni test zamenja senzorično oceno.

Za mesno industrijo bi izdelava in uporaba mikrodolcev CCMP-ja v mesnih izdelkih nedvomno pomenila velik korak v inovativnosti, saj bi temu lahko sledila tudi proizvodnja bolj kakovostnih in s prehransko-zdravstvenega stališča bolj zdravih izdelkov.

6 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko povzamemo naslednje sklepne ugotovitve:

- Pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) nam je uspelo sintetizirati iz govejega hemina s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO) in reducentov (Na-askorbat in vitamin E), pri čemer je bil izkoristek sinteze 18,0 %.
- Primerno oksidativno stabilnost pigmenta CCMP-ja smo dosegli z metodo inkapsuliranja z 2 % raztopino Na-alginata. Uspešen proces vgrajevanja smo dosegli s pomočjo inkapsulatorja Inotech IE-50 R z razbitjem laminarnega toka skozi šobo 250 μm v premreževalno raztopino 0,3 M CaCl_2 . Pri tem so Ca ioni premrežili molekule alginata in nastali so mikrodelci.
- Emulzije iz belega (prsi) in temnega piščančjega mesa (bedra) smo uspešno obarvali s CCMP-jem, saj sta bila odtenek rožnate barve in intenzivnost barve senzorično in instrumentalno iz vrednotenja boljše, v primerjavi z emulzijami z dodatkom nitrita.
- Stabilnost barve toplotno obdelanih koagulatov mesnih emulzij z dodatkom inkapsuliranega CCMP-ja je bila slabša, predvsem po dodatku svežega CCMP-ja, v primerjavi z razsoljenimi vzorci.
- Intenzivnost barve emulzij, pripravljenih s staranim CCMP-jem je bila senzorično slabše ocenjena od emulzij, pripravljenih s svežim CCMP-jem.
- Instrumentalno izmerjene komponente barve so kazale višjo vrednost L^* (svetlejšo barvo) emulzij z dodatkom nitrita, medtem ko je bila intenzivnost rdeče barve (vrednost a^*) večja pri emulzijah z dodatkom CCMP-ja (ne glede na starost).
- Na vonj in okus emulzij različni dodatki za razvoj barve niso vplivali, je pa dodatek CCMP-ja povzročil grenak priokus.
- Tekstura (instrumentalna in senzorična) emulzij z dodatkom CCMP-ja je bila manj čvrsta v primerjavi s tistimi z nitritom, prav tako so bile manj čvrste emulzije, pripravljene iz beder kot iz prsi.
- Tako pripravljen CCMP bi bilo smotno uporabiti pri proizvodnji bolj kakovostnih in s prehransko-zdravstvenega stališča bolj varnih mesnin, pri čemer bi bilo potrebno grenak priokus, ki verjetno izhaja iz dodanega fosfata v procesu sinteze CCMP-ja in pri izdelavi mesne emulzije, na nek način prekriti.

7 POVZETEK

V predelavi mesa je proces razsoljevanja mesa z nitritno soljo dolga tradicija. Proces nitrozacije mišičnega pigmenta mioglobina je namenjen oblikovanju termostabilnega pigmenta nitrozomioglobina oziroma denaturiranega nitrozomiohromogena, ki mesnemu izdelku daje značilno rožnato rdečo barvo in aromo. Rezidualni nitrit v izdelku hkrati učinkuje antimikrobno, predvsem inhibira termofilne anaerobne bakterije kot nevarne povzročitelje alimentarnih infekcij ter učinkuje kot antioksidant. Nitrit je hkrati toksičen in lahko v razsoljenem mesu ali v prebavnem traktu človeka reagira s sekundarnimi in tudi nekaterimi terciarnimi amini, pri tem se tvorijo kancerogeni N-nitrozamini. Problem potencialne kancerogenosti nitrita so mnogi znanstveniki hoteli že pred leti rešiti z različnimi pristopi, vendar je zamenjava nitrita zaradi njegove multifunkcionalnosti zelo zahtevna in zato je zelo majhna verjetnost njegove zamenjave z eno samo spojino, ki bi nadomestila vse njegove funkcije. Možne rešitve glede zmanjševanja nastanka nitrozaminov ali celo njihove eliminacije se kažejo v zmanjševanju količine dodatka nitrita v izdelkih in v iskanju zamenjave (alternative) nitrita, ki bi slednjega nadomestila v vseh pogledih.

Namen raziskave je bil proučiti možnost zamenjave nitrita z alternativnim pigmentom toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP – cooked cured meat pigment) z namenom določiti njegovo stabilnost in podaljšati obstojnost. Pigment je znanstvenikom že uspelo sintetizirati direktno iz govejih krvnih celic ali iz hemina, pri čemer je bilo potrebno, da so bili pri sami sintezi prisotni reducenti, ki so ohranjali železov ion v porfirinskem kompleksu v fero obliki in pospešili konverzijo nitrita v NO. Problem CCMP-ja je njegova stabilnost, saj na zraku hitro oksidira v feri obliko, ki nima značilne rožnato-rdeče barve. Zato smo predpostavili, da bi bila možna zaščita pigmenta pred oksidacijo ne samo prisotnost reducentov, ampak tudi vgrajevanje CCMP-ja v različne sisteme. V ta namen naj bi s primerno metodo vgrajevanja poskusili stabilizirati pigment do uporabe v modelnih koagulatih mesnih emulzij iz mehansko ločenega piščančjega mesa. V hipotezi naloge smo predpostavili, da bo učinek obarvanja mesne emulzije s CCMP-jem odvisen tudi od vsebnosti mioglobina, ki je različna v t. i. belem in temnem piščančjem mesu.

Ključna pri sami nalogi je bila tako priprava pigmenta CCMP-ja (z 18,0 % izkoristkom sinteze). Za najučinkovitejšo oksidativno stabilnost iz vrednoteno s pomočjo elektronske paramagnetne resonance na EPR spektrometru Bruker ESP 300 E, se je izkazala stabilizacija pigmenta – inkapsulacija v alginatno ovojnico (2 % raztopina Na-alginata) s pomočjo inkapsulatorja Inotech IE-50 R z razbitjem laminarnega toka pri uporabi šobe 250 µm in premreževalne raztopine 0,3 M CaCl₂. Pri tem so Ca ioni premrežili molekule alginata in nastali so mikrodelci. CCMP zaščiten na ta način je tako ostal stabilen več kot 6 ur, potem pa se je kljub inkapsulaciji pričel proces oksidacije. Pri skladiščenju pri 77 °K se je oksidiralo cca. 50 % pigmenta, potem pa je ostal produkt stabilen. Glede na ugotovljeno nam je uspelo zaščititi pigment CCMP do te mere, da smo ga v nadaljevanju lahko uporabili v modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz mehansko ločenega piščančjega mesa – iz mišic z različnim oksidativnim metabolizmom. Tovrstne bolj kakovostne in s prehransko-zdravstvenega stališča bolj varne mesnine bodo v prihodnosti predstavljale vedno večji tržni delež, kar je posledica zahtev vse večjega deleža prehransko in zdravstveno vedno bolj osveščenih porabnikov. V prihodnje lahko v tem pogledu

pričakujemo vedno bolj zahtevne porabnike, ki bodo z vidika zdrave prehrane za bolj varne izdelke pripravljene tudi več plačati. Potemtakem ne gre za vprašanje ali je nitrit zaželjena in potrebna sestavina mesnin, temveč gre bolj za vprašanje za koliko ga lahko v njih zmanjšamo in s kakšnimi postopki, da bi bila hkrati senzorična kakovost in sprejemljivost izdelka čim bolj primerljiva tisti standardni z dodatkom nitrita. Pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa ima tako funkcijo barvila, je brez ostankov nitrita in brez nevarnosti tvorbe nitrozaminov.

Na modelnih mesnih emulzijah iz belega (prsi) in temnega (bedra) piščančjega mesa, obarvanih z nitritno soljo ter svežim in staranim inkapsuliranim CCMP-jem, je bila analizirana osnovna kemijska sestava, senzorična kakovost (barva in njena stabilnost, tekstura, vonj in aroma), instrumentalno so bili izmerjeni parametri barve (vrednosti L^* , a^* , b^*) in teksture (tlačna, rezna in strižno-tlačna trdnost), opravljena je bila tudi statistična obdelava rezultatov s programom SAS. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo emulzije iz belega (prsi) in temnega piščančjega mesa (bedra) uspešno obarvali z mikrodenci CCMP-ja, saj sta bila odtenek rožnate barve in intenzivnost barve senzorično in instrumentalno izvednotena kot boljša v primerjavi z emulzijami z dodatkom nitrita. Stabilnost barve toplotno obdelanih koagulatov mesnih emulzij z dodatkom CCMP-ja je bila slabša, predvsem po dodatku svežega pigmenta, v primerjavi z razsoljenimi vzorci. Intenzivnost barve emulzij, pripravljenih s staranim CCMP-jem je bila senzorično slabše ocenjena od emulzij, pripravljenih s svežim CCMP-jem. Instrumentalno izmerjene komponente barve so kazale višjo vrednost L^* (svetlejšo barvo) emulzij z dodatkom nitrita, medtem ko je bila intenzivnost rdeče barve (vrednost a^*) večja pri emulzijah z dodatkom CCMP-ja (ne glede na starost pigmenta). Na vonj in okus emulzij različni dodatki za razvoj barve niso vplivali, je pa dodatek CCMP-ja povzročil grenak priokus. Tekstura (instrumentalna in senzorična) emulzij z dodatkom CCMP-ja je bila manj čvrsta v primerjavi s tistimi z nitritom, prav tako so bile manj čvrste emulzije, pripravljene iz beder kot iz prsi.

Na stabilnost CCMP-ja so imeli različni nosilci in različne metode vgrajevanja različen učinek. Barvni učinek inkapsuliranega pigmenta v modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz strojno (mehansko) ločenega piščančjega mesa je bil odvisen od vrste mesa oziroma vsebnosti mioglobina. To je potrdilo postavljeno delovno hipotezo.

Tako pripravljen CCMP bi bilo smotrno uporabiti pri proizvodnji bolj kakovostnih in s prehransko-zdravstvenega stališča bolj varnih mesnin, pri čemer bi bilo potrebno grenak priokus, ki verjetno izhaja iz dodanega fosfata v procesu sinteze CCMP-ja in pri izdelavi mesne emulzije, na nek način prekriti.

8 SUMMARY

In the meat processing industry, the process of meat curing using nitrite salt has a long tradition. The process of the nitrosation of the myoglobin muscle pigment serves to create the thermally stable pigment nitrosomyoglobin, i.e. the denatured nitrosomyochromogen, which gives a meat product the characteristic pink red colour and flavour. Residual nitrite in the product acts simultaneously in two ways: it has an antimicrobial effect, predominantly it inhibits the thermophile anaerobic bacteria as dangerous agents of alimentary infections, and acts as an antioxidant. Nitrite is also toxic and it may cause a reaction in cured meat or in human gastrointestinal tract with secondary and also certain tertiary amines and on that occasion carcinogenic N-nitrosamines are formed. Many scientists were keen to resolve the issue of the potential carcinogenic effects of nitrite years ago by applying many different approaches, but the replacement of nitrite is a highly complex task due to its multifunctional properties and consequently there is an extremely low possibility that it could be replaced by one single compound that could replace all its functions. As regards the cutting back of the formation of nitrosamines or even their elimination, the possible solutions appear to be identified in decreasing the quantity of nitrite added to meat products and in searching for a replacement (alternative) for nitrite having the characteristics that would make it suitable to be used instead of nitrite in all aspects.

The purpose of the research was to examine the possibility of replacing nitrite with the alternative thermally processed cured meat pigment (cooked cured meat pigment – CCMP), to determine its stability and to prolong its persistence. Scientists have already been successful at synthesizing the pigment directly from bovine blood cells or from haemin, but the synthesis process required to have the reducing agents present for the purpose of preserving the ferrous ion in the porphyrin complex in the ferrous oxidation state and boosted the conversion of nitrite into nitric oxide (NO). The problem identified in relation to CCMP is its stability, since it oxidises fast in air into the ferric ion, which lacks the characteristic pink-red colour. Therefore, we assumed that the protection of the pigment against oxidation would be possible not only in the presence of reducing agents, but also the incorporation of CCMP into different systems. To that end, by deploying an appropriate integration method we could try to stabilize the pigment until its use in the model meat emulsion coagulate from mechanically separated chicken meat. The hypothesis of the research builds on the assumption that the effect of colouring meat emulsions using CCMP depends also on the content of myoglobin whose presence varies in the so-called white and dark chicken meat.

The key role in the research was the preparation of the cooked cured-meat pigment (having the 18.0 % synthesis utilization rate). The most efficient oxidative stability where values were measured by means of electronic paramagnetic resonance on the EPR spectrometre Bruker ESP 300 E, proved to be the pigment stabilisation – encapsulation in the alginate beads encapsulator (a 2 % Na-alginate solution) by using the Inotech IE-50 R encapsulation device, which functions by breaking the laminar liquid jet into droplets using the 250 µm nozzle and 0.3 M CaCl₂ cross-linking scheme solution. CCMP was protected in such a way that it remained stable for more than 6 hours, and after that the oxidation process commenced in spite of encapsulation. When stored at 77 °K, approximately 50 %

of the pigment underwent oxidation, after that the product remained stable. In view of the findings, we were able to protect the pigment cooked cured-meat pigment to the extent that we could continue to use it in model meat emulsion coagulate prepared from mechanically separated chicken meat – from the muscle tissue having different oxidative metabolism. Such meat products of higher quality and considered safer from the nutritional and health standpoint will account in the forthcoming years for an ever increasing share of the market as a result of demands made by the ever-increasing portion of consumers who are becoming more aware of food and health concerns. In the future, we can expect to see consumers becoming more discerning and demanding safer products in the sense of healthy food and being prepared also to pay more for such products. In conclusion, the issue is not whether nitrite is a desirable and necessary ingredient of meat products, but it is more about the issue of how far we can go in effort to reduce their content and what procedures can be used to that end in order to make the sensory quality and the product acceptability more comparable with the standard meat products containing nitrite additive. Consequently, the function cooked cured meat pigment is to act as a colouring agent, it is free of any nitrite residues and poses no risk of the creation of nitrosamines.

The basic chemical composition, sensory quality (the colour and its stability, the texture, the smell and the flavour), the colour parameters were instrumentally measured (the L^* , a^* , b^* values) and the texture (pressure, cutting and shearing displacement and pressure strength), and the model meat emulsions from white (breast) and dark (thigh) chicken meat, coloured with nitrite salt and the freshly prepared and aged encapsulated CCMP was analysed and the statistical processing of the obtained results was carried out by using the SAS programme. On the basis of the obtained results, we can draw a conclusion that we were successful at colouring the emulsions made from the white (breast) and dark chicken meat (thigh) using the encapsulated CCMP, since the hue of the pink colour and the intensity of the colour scored higher values measured sensorially and instrumentally in comparison with the emulsions prepared with nitrite. The stability of the colour of thermally processed meat emulsion coagulates with the addition of CCMP was inferior, primarily after adding the freshly prepared pigment in comparison with the cured samples. The intensity of colour emulsions prepared by aged (stored) CCMP was sensorially lower scored than the emulsions prepared with fresh CCMP. Instrumentally measured colour components of emulsions with nitrite displayed a higher value L^* (brighter colour, whereas the intensity of red colour (value a^*) was higher in the emulsions with added CCMP (irrespective of the pigment aging). The odour and taste of the emulsions remain unchanged after various additives for the development of the colour were added, whereas the addition of CCMP resulted in bitter off-flavour. The texture (instrumental and sensory) of the emulsions with the addition of CCMP was not so consistent in comparison with those containing nitrite and the same applies to the emulsions prepared from thighs that proved to be less consistent than those prepared from breast.

Various intermediates and different methods of incorporating have produced different effect on the CCMP stability. The colour effect of the encapsulated pigment in the model meat emulsion coagulates prepared from mechanically separated (deboned) chicken meat depended on the kind of meat used, i.e. on the myoglobin content. This has confirmed the articulated working hypothesis.

It is reasonable to assume that CCMP prepared as described above would be best used for the production of the meat products of higher quality and safer from the nutritional and health aspect, while taking steps to cover the bitter off-flavour, which probably derives from the added phosphate in the process of synthesizing CCMP and as emulsifier and WHC enhancer in the production of meat emulsions.

9 VIRI

- Allemann E., Gurny R., Doelker E. 1993. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 39, 5: 173-191
- Aquanno J. J., Chan K-M., Dietzler D. N. 1981. Accidental poisoning of two laboratory technologists with sodium nitrite. *Clinical Chemistry*, 27, 6: 1145-1146
- AOAC 920.153. Ash of meat. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 4-4
- AOAC 928.08. Nitrogen in meat Kjeldahl method. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 5-6
- AOAC 950.46. Moisture in meat. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 1-2
- AOAC Official Method 991.36. Fat (crude) in meat and meat product. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 3-4
- Archer M. C. 1982. Hazard of nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds in human nutrition. V: Nutritional toxicology. Vol. 1. Hathcock J. N. (ed.). New York, Academic Press: 327-381
- Arneth W. 1998. The chemical basis of reddening. *Fleischwirtschaft*, 78, 8: 868-870, 873-874
- Bauer K. H., Frömmling K.-H., Führer C. 2002. *Lehrbuch der Pharmazeutische Technologie: mit einer Einführung in die Biopharmazie*. 7. Aufl. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 486 str.
- Belovič A. 1995. Kakovost hrenovk z zmanjšanimi količinami nitrita. Diplomski naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 str.
- Benton B. F., Gardner D. L. 1983. Microcapsules: innovative, versatile product delivery. *Battelle Technical Inputs to Planning*, 33: 1-36
- Bhardway T. R., Kanwar M., Lal R., Gupta P. 2000. Natural gums and modified natural gums as sustained – release carriers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26, 10: 1025-1038
- Boakye K., Mittal G. S. 1996. Changes in colour of beef *M. longissimus dorsi* muscle during ageing. *Meat Science*, 42, 3: 347-354
- Bogataj M., Kristl A., Mrhar A., Kozjek F. 1988. Postopki priprave in kontrole mikrokapsul. *Farmaceutski vestnik*, 39: 239-252
- Bonnett R., Chandra S., Charalambides A. A., Sales K. D., Scourides P. A. 1980. Nitrosation and nitrosylation of haemoproteins and related compounds. Part 4. Pentacoordinate nitrosylprotohaem as the pigment of cooked cured meat. Direct evidence from e.s.r. spectroscopy. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1: 1706-1710

- Bos G. W., Verrijck R., Franssen O., Bezemer J. M., Hennink W. E., Crommelin D. J. A. 2001. Hydrogels for the controlled release of pharmaceutical proteins. *Biopharm Europe*, 13: 64-74
- Böhmer L. Hildebrandt G. 1996. *Mikrobiologie der Kochpöckelwaren*. V: *Fleisch und Fleischerzeugnisse*. Weber H. (ed.). Hamburg, Behr's Verlag: 249-283
- Brazel C. S. 1999. Microencapsulation: offering solution for the food industry. *Cereal Foods World*, 44, 6: 388-393
- Brauer H. 1993. Fat – reduced frankfurter – type sausage. A technology for preventing too firm and rubbery bite. *Fleischwirtschaft*, 60, 1: 64-65
- Bruneton J. 1999. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. 2nd ed. Paris, Lavosier Publishing: 48-52
- Bučar F., Đorđević V., Žlender B. 1989. Tehnologija mesa (izbrana poglavja). Interno gradivo za študente živilske tehnologije in živinoreje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTO za živilsko tehnologijo: 228 str.
- Bučar F. 1997. Meso – poznavanje in priprava. Ljubljana, Kmečki glas: 266 str.
- Burgess D. J., Hickey A. J. 1994. Microsphere technology and applications. V: *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Vol. 10. Swarbrick J., Boylan J. C. (eds.). New York, Marcel Dekker: 1-29
- Burgess D. J., Hickey A. J. 2007. Microsphere technology and applications. V: *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Swarbrick J. (ed.). 3th ed. Volume 4. New York, Marcel Dekker: 2328-2339
- Campbell M. K. 1995. *Biochemistry*. 2nd ed. Philadelphia, Saunders College Publishing: 391-417
- Cassens R. G. 1997. Residual nitrite in cured meat. *Food Technology*, 51, 2: 53-55
- Cassens R. G., Demeyer D., Eikelenboom G., Honikel K. O., Johansson G., Nielsen T. 1995. Recommendation of reference method for assessment of meat color. V: 41st Annual International Congress of Meat Science and Technology, San Antonio, Texas, USA, August 20-25, 1995. Chicago, American Meat Science Association, National Live Stock and Meat Board: 410-411
- Clark D. C. 1993. Emulsifiers. V: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds.). London, Academic Press: 1577-1590
- Clydesdale F. M. 1991. Color perception and food quality. *Journal of Food Quality*, 14, 1: 61-74
- Cofrades S., Carballo J., Jimenez-Colmenero F. 1997. Heating rate effects on high-fat and low-fat frankfurtes with a high content of added water. *Meat Science*, 47, 1-2: 105-114
- Dakić M., Jovanović G., Babić L. 1980. Nitriti u proizvodima od mesa. *Hrana i ishrana*, 21, 5-6: 113-115

- Dorđević V. 1982. Mehanički separisano meso-proizvodnja, osobine i primena. V: Nove surovine v živilstvu. 7. Bitenčevi živilski dnevi. Ljubljana, 13.-14. maj 1982. Bučar F. (ur.). Ljubljana. Biotehniška fakulteta, VTOZD za živilsko tehnologijo: 89-100
- Dorđević V., Mihajlović B., Tomašević M., Nikolić Ž. 1980. Uticaj nitrita, nitrata, natrijumhlorida, fosfata i askorbinske kiseline na oksidativne promene lipida mesa. Tehnologija mesa, 21, 10: 278-282
- Dymicky M., Fox J. B., Wasserman A. E. 1975. Color formation in cooked model and meat systems with organic and inorganic compounds. Journal of Food Science, 40, 2: 306-309
- European Pharmacopoeia. 2002. 4th ed. Strassbourg, Council of Europe: 785-786, 1900
- Faustman C., Cassens R. G. 1989. Strategies for improving fresh meat color. V: Proceedings of the 35th International Congress of Meat Science & Technology, Copenhagen 1998. Copenhagen, ICOMST: 446-453
- Gašperlin L. 1992. Barva presnega in pečenega mesa goved. Magistrska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 101 str.
- Gašperlin L. 1998. Barva presnih in termično obdelanih govejih mišic *m. Longissimus dorsi* in *m. Psoas major* normalne in TČS kakovosti. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 104 str.
- Gouin S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food Science & Technology, 15: 330-347
- Goutefongea R. 1992. Salting and curing. V: Technology of meat and meat products. Girard J. P. (ed.). Chichester, Ellis Horwood: 115-137
- Gray J. I., Pearson A. M. 1984. Cured meat flavor. Advances in Food Research, 55: 539-546
- Gray J. I., Crackel R. L. V. 1992. Oxidative flavour changes in meats: Their origin and prevention. V: The chemistry of muscle-based foods. Johnston D. E., Knight M. K., Ledward D. A. (eds.). Belfast, The Royal Society of Chemistry: 145-167
- Gupta P., Bansal A. K. 2002. Patent opportunities in matrix – based oral controlled release drug delivery systems. Part 1. Pharmaceutical Technology, 14, 9: 49-58
- Hamm R. 1975. Muskelfarbstoff und Fleischfarbe. Die Fleischwirtschaft, 55, 10: 1415-1418
- Hill M. J. 1991. Nitrates and nitrites from food and water in relation to human disease. V: Nitrates and nitrites in food and water. Hill M. J. (ed.). New York, Ellis Horwood: 163-193
- Holcman A. 1991. Kokošje pasme. V: Reja perutnine: piščancev in kokoši. Ločniškar F., Benčina D., Holcman A., Kmecl A. (ur.). Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 25-39
- Hoogenkamp H. W. 1989. Low-calorie sausages, spreads and mousses. Fleischerei, 40, 11: 1-4
- Honikel K. O. 1992. The biochemical basis of meat conditioning. V: New technologies for meat and meat products: Fermentation and starter cultures, muscle enzymology and

- meat ageing, quality control systems. Smulders F. J. M., Toldra F., Flores J., Prieto M. (eds.). Utrecht, ECCEAMST, Nijmegen: Audet tijdschriften: 135-161
- Hotchkiss J. H. 1987. A review of current literature on N-nitroso compounds in foods. *Advances in Food Research*, 31: 53-115
- Hotchkiss J. H., Cassens R. G. 1987. Nitrate, nitrite, and nitroso compounds in foods. *Food Technology*, 41, 4: 127-134
- Hui Y. H., Wai-Kit N., Rogers R. W., Young O. A. (eds.). 2001. *Meat science and applications*. New York, Marcel Dekker: 704 str.
- IPCS INCHEM. 2008. Nitrate and nitrite. Hamilton (Canada), IPCS INCHEM – International Programme on Chemical Safety and the Canadian Centre for Occupational Health and Safety. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je07.htm>: 13 str. (WHO Food Additives Series; 50)
- Igene J. O., Yamauchi K., Pearson A. M., Gray J. I. 1985. Mechanism by which nitrite inhibits the development of warmed over flavor in cured meat. *Food Chemistry*, 18, 1: 1-18
- Instruction manual for the inotech encapsulator research IE-50 R. 2002. Dottikon, Switzerland, Inotech Encapsulation AG: loč.pag.
- Jackson L. S., Lee K. 1991. Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 24, 4: 289-297
- Janetschke P. 1992. Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln. V: *Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*. Fehlhaber K., Janetschke P. (eds.). Stuttgart, Jena, Fischer Verlag: 138-167
- Jankiewicz L., Kwasny M., Wasylik K., Graczyk A. 1994. Structure studies on the nitrosyl derivative of heme. *Journal of Food Science*, 59, 1: 57-59
- Jianlong W., Horan N., Stentiford E., Yi Q. 1999. The radial distribution and bioactivity of *Pseudomonas sp.* immobilized in calcium alginate gel beads. *Process Biochemistry*, 35: 465-469
- Kanawjia S. K., Pathania V., Singh S. 1992. Microencapsulation of enzymes, micro-organisms and flavours and their applications in foods. *Indian Dairyman*, 44, 6: 280-287
- Karas R. 1999. Vpliv sestave na kakovost in obstojnost majoneze. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 158 str.
- Killday K. B., Tempesta M. S., Bailey M. E., Metral C. J. 1988. Structural characterization of nitrosylhaemochromogen of cooked cured meat implications in the meat curing reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 5: 909-914
- Koch S., Schwinger C., Kressler J., Heinzen C., Rainov N. G. 2003. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: comparison of production devices methods and microcapsule characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 20, 3: 303-331
- Kovač V., Krbavčič A. 1999. Alginatna vlakna in alginatne obloge kot sanitetni in obvezilni materiali. *Farmaceutski vestnik*, 50: 41-52

- Krajnc A. 2004. Vpliv procesnih spremenljivk pri izdelavi mikrokapsul z lipofilnim jedrom na enkapsulatorju IE-50 R. Diplomski naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 77 str.
- Kretschmar U. 1992. Funktionelle Eigenschaften von Muskelproteinen. Zum Zusammenhang funktioneller und molekularer Eigenschaften von Muskelproteinen. *Fleischwirtschaft*, 72, 6: 905-911
- Kumperger U. 1997. Vpliv vrste mišice in dodatka pigmenta CCMP na kakovost koagulatov mesnih emulzij. Diplomski naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Lawrie R. A. 1979. *Meat Science*. 3rd ed. Oxford, London, Pergamon Press: 300-314
- Ledward D. A. 1992. Colour of raw and cooked meat. V: *The chemistry of muscle-based foods*. Ledward D. A., Johnston D. E., Knight M. H. (eds.). Cambridge, Royal Society of Chemistry: 128-144
- Lewis R. J. 1989. *Food additives handbook*. New York, Van Nostrand Reinhold: 238 str.
- Livingston D. J., Brown W. D. 1981. The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 35, 5: 244-252
- Luca D., Raileanu L. R., Luca V., Duda R. 1985. Chromosomal aberrations and micronuclei induced in rat and mouse bone marrow cells by sodium nitrate. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 155, 3: 121-125
- Marinšek J. 1996. Kvaliteta perutninskega mesa in izdelkov. V: *Seminar Perutninsko meso in izdelki v prehrani*, Ljubljana, 17. april 1996. Pokorn D. (ur.) Ptuj, Perutnina; Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za higieno: 33-37
- Marsh D. 1981. Electron spin resonance: spin labels. Reprint from *membrane spectroscopy*. Berlin, Heidelberg, Springer – Verlag: 51-142
- McGinity J. W., Repka M. A. 2002. Alginate Acid. V: *Handbook of pharmaceutical excipients*. Rowe R. C., Sheskey P. J., Weller P. J. (eds.). 4th ed. London, Pharmaceutical Press, AphA American Pharmaceutical Association: 16-18
- Monin G., Ouali A. 1991. Muscle differentiation and meat quality. V: *Developments in meat science – 5*. Lawrie R. A. (ed). London, Elsevier Applied Science: 89-157
- Moore V. J. 1988. Effect of packaging and display variables on retail display of frozen lamb chops. *Meat Science*, 22, 4: 313-320
- Mottram D. S., Edwards R. A. 1983. The role of triglycerids and phospholipids in the aroma of cooked beef. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 34: 517-522
- Mørch Y. A. 2008. Novel alginate microcapsules for cell therapy: A study of the structure – function relationships in native and structurally engineered alginates. Thesis. Trondheim, Faculty of Natural Sciences and Technology, Department of biotechnology: 73 str.
- Murray A. C. 1992. Measurement of pork colour. *Lacombe, Lacombe Research Highlights*: 33-35

- O'Boyle A. R., Aladin–Kassam N., Rubin L. J., Diosady L. L. 1991. The stabilization of dinitrosyl ferrohemochrome and its application in the production of nitrite – free pork cuts. V: Proceedings of the 37th International Congress of Meat Science and Technology ICoMST 1991, Kulmbach, 1-6 September 1991. Kulmbach, Federal Centre for Meat Research: 766-769
- O'Boyle A. R., Aladin–Kassam N., Rubin L. J., Diosady L. L. 1992. Encapsulated cured–meat pigment and its application in nitrite – free ham. *Journal of Food Science*, 57, 4: 807-812
- Orive G., Hernandez R. M., Gascon A. R., Igartua M., Pedraz J. L. 2003. Development and optimization of alginate – PMCG – alginate microcapsules for cell immobilisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 259: 57-68
- Pearson A. M., Dutson T. R. (eds.). 1987. *Advances in meat research. Volume 3: Restructured meat and poultry products*, New York, Van Nostrand: 318-320
- Pegg R. B., Shahidi F. 1989. Effect of light and storage time on the colour stability of processed meats. Abstract 125. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 22: 418-418
- Pegg R. B., Shahidi F. 1996. A novel titration methodology for elucidation of the structure of preformed cooked cured – meat pigment by visible spectroscopy. *Food Chemistry*, 56, 2: 105-110
- Pegg R. B., Shahidi F. 1997. Unraveling the chemical identity of meat pigments. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37, 6: 561-589
- Pegg R. B., Shahidi F. 2000. Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Trumbull, Food & Nutrition Press: 268 str.
- Pegg R. B., Shahidi F., Gogan N. J., DeSilva S. I. 1996. Elucidation of the chemical structure of preformed cooked cured-meat pigment by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2: 416-421
- Pegg R. B., Fisch K. M., Shahidi F. 2000. The replacement of conventional meat curing with nitrite-free curing system. *Fleischwirtschaft*, 80, 5: 86-89
- Pejkovski Z. M. 2000. Possibilities for nitrite substitution in frankfurter type sausages. Doctoral dissertation. Skopje, St. Cyril and Methodius University, Faculty of Agriculture: 154 str.
- Plestenjak A. 1983. Študija mehanskih lastnosti in komponent senzorične teksture raznih tipov koagulatov mesnih emulzij ter njihova medsebojna povezanost. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za živilsko tehnologijo: 11-17
- Poole C. P. Jr. 1996. *Electron spin resonance, a comprehensive treatise on experimental techniques*. 2nd ed. Mineola, New York, Dover Publications: 780 str.
- Popravek Pravilnika o kakovosti mesnih izdelkov. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 62: 8022-8022
- Potthast K. 1987. Fleischfarbe, Farbstabilität und Umrötung. *Fleischwirtschaft*, 67, 1: 50-55

- Pravilnik o aditivih za živila. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5263-5335
- Pravilnik o kakovosti mesnih izdelkov. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 34: 3956-3963
- Pravilnik o kakovosti perutninskih mesnih izdelkov. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 85: 8767-8777
- Pravilnik o spremembi Pravilnika o kakovosti mesnih izdelkov. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 50: 4965-4965
- Pravilnik o spremembi Pravilnika o kakovosti mesnih izdelkov. 2006. Uradni list Republike Slovenije, 77: 8311-8311
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o aditivih za živila. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 8: 545-557
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o aditivih za živila. 2006. Uradni list Republike Slovenije, 16, 17: 1540-1542
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o aditivih za živila. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 16: 1235-1247
- Quintavalla S., Massera B., Franceschini Pedrielli R. 1999. Survival of sulphite-reducing clostridia and their ability to spoil "mortadella" mixes as a function of the amount or residual nitrite. *Industria Conserve*, 74, 1: 11-22
- Rahelić S. 1978. Osnove tehnologije mesa: mišić-sastav i postmortalne promjene. Zagreb, Školska knjiga: 35-38, 128-134
- Rahelić S. 1987. Kvalitet mesa plemenite svinje. Novi Sad, Tehnološki fakultet Novi Sad, Institut za tehnologiju mesa, mleka, ulja i masti i voća i povrća: 218 str.
- Rahelić S., Joksimović J., Bučar F. 1980. Tehnologija prerade mesa. Novi Sad, Tehnološki fakultet: 91-143
- Ramarathnam N., Rubin L. J. 1994. The flavour of cured meat. V: Flavor of meat and meat products. Shahidi F. (ed). London, Blackie Academic & Professional: 174-198
- Rašeta J., Kepčija Đ., Babić L., Popović L., Simović D. 1975. Ispitavanje mogućnosti smanjenja količine nitrta u barenih kobasica. *Tehnologija mesa*, 16, 7-8: 194-197
- Reis C. P., Neufeld R. J., Vilela S., Ribeiro A. J., Veiga F. 2006. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*, 23, 3: 245-257
- Renerre M. 1984. Variabilite entre muscles et entre animaux de la stabilite de la couleur des viandes bovines. *Sciences des Aliments*, 4, 4: 567-584
- Renerre M., Talmant A. 1981. Relation entre type metabolique et respiration musculaire. V: Proceedings of the 27th European Meeting of Meat Research Workers, Wien, 1981. Wien, European Meat Research Workers: 70-75
- Renerre M., Labas R. 1987. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Science*, 19, 2: 151-165

- Renerre M., Labadie J. 1992. Fresh red meat packaging and meat quality. V: Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology. August 23-28, 1992. Clermont-Ferrand, ICOMST: 361-387
- Rickansrud D. A., Henrickson R. L. 1967. Total pigments and myoglobin concentration in four bovine muscles. *Journal of Food Science*, 32, 1: 57-61
- Rubin L. J., Diosady L. L., Shahidi F., Wood D. F. 1985. Meat curing compositions and method of use. United States Patent US 4559234: 14 str.
- Rubin L. J., Diosady L. L., O'Boyle A. R., Kassam N., Shahidi F. 1992. Nitrite – free meat curative and process of curing meat. International patent application WO 92/03223A1: 31 str.
- SAS/STAT Software. 1999. Version 8.01. Cary, SAS Institute Inc: software.
- Savić I. 1979. Redukcija sadržaja rezidualnih nitrita i inhibiranje formiranja nitrozamina izborom tehnoloških postopaka salamurjenja. V: Nitriti in nitrati v predelavi mesa, Portorož, oktober, 1979. Ljubljana, SOZD hp – združena podjetja živilske industrije: 7-22
- Schwinger C., Koch S., Jahnz U., Wittlich P., Rainov N. G., Kressler J. 2002. High throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter technology. *Journal of Microencapsulation*, 19, 3: 273-280
- Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. 1981. *Food Technology*, 35, 11: 50-59
- Shahidi F. 1991. Developing alternative meat – curing systems. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 9: 219-222
- Shahidi F., Pegg R. B. 1988. Synthesis of cooked cured-meat pigment, dinitrosyl ferrohemochrome, and its colour characteristics. V: Proceedings of the 34th International Congress of Meat Science and Technology, Part B, Brisbane, Australia, 29 August-2 September 1988. Brisbane, Livestock and Meat Authority of Queensland: 357-359
- Shahidi F., Pegg R. B. 1990. Colour characteristics of cooked cured – meat pigment and its application to meat. *Food Chemistry*, 38,1: 61-68
- Shahidi F., Pegg R. B. 1991. Novel synthesis of cooked cured – meat pigment. *Journal of Food Science*, 56, 5: 1205-1208
- Shahidi F., Pegg R. B. 1991a. Effect of the preformed cooked cured - meat pigment (CCMP) on color parameters of muscle foods. *Journal of Muscle Foods*, 2, 4: 297-304
- Shahidi F., Pegg R. B. 1991b. Encapsulation of the pre-formed cooked cured–meat pigment. *Journal of Food Science*, 56, 6: 1500-1504, 1518
- Shahidi F., Pegg R. B. 1992. Nitrite – free meat curing systems: update and review. *Food Chemistry*, 43, 3: 185-191
- Shahidi F., Pegg R. B. 1993. Nitrite – free meat: Safety and sensory considerations in developing nitrite alternatives for meat curing. *Meat Focus International*, 2, 9: 407-414
- Shahidi F., Pegg R. B. 1993a. Process for preparing a powdered cooked cured–meat pigment. United States Patent US 5 230 915: 46 str.

- Shahidi F., Pegg R. B. 1995. Further evidence for mononitrosylhaem complex of the cooked cured-meat pigment. V: 41st Annual international congress of meat science and technology. Proceedings. Volume 2. San Antonio, Texas. Sleeth R.B. (ed.) Chicago, American Meat Science Association, National Live Stock and Meat Board: 406-407
- Shahidi F., Diosady L. L., Rubin L. J. 1982. Alternative meat curing systems. I. Cooked cured meat pigment. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 15, 3: 11-23
- Shahidi F., Rubin L. J., Diosady L. L., Chew V., Wood D. F. 1984. Preparation of dinitrosyl ferrohemochrome from hemin and sodium nitrite. Canadian Institute of Food Science & Technology Journal. 17, 1: 33-37
- Shahidi F., Rubin L. J., D'Sauza L. A. 1986. Meat flavour volatiles: a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 24, 2: 141-243
- Shahidi F., Rubin L. J., Wood D. F. 1987. Control of lipid oxidation in cooked ground pork with antioxidants and dinitrosyl ferrohemochrome. Journal of Food Science, 52, 3: 564-567
- Shahidi F., Pegg R. B., Shamsuzzaman K. 1991. Color and oxidative stability of nitrite-free cured meat after gamma irradiation. Journal of Food Science, 56, 5: 1450-1452
- Sinell H. J. 1992. Einführung in die Lebensmittelhygiene. 3. Aufl. Berlin, Hamburg, Verlag Paul Parey: 230 str.
- Skvarča M. 1992. Instrumentalni in senzorični parametri razsoljenega govejega mesa. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 124 str.
- Skvarča M. 2008. Senzorične lastnosti mesa. V: Senzorično ocenjevanje mesa in mesnin. Seminar, Ljubljana, od 30. januarja do 1. februarja 2008. Golob T., Skvarča M., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za tehnologijo mesa in gotovih jedi ter Katedra za vrednotenje živil: loč. pag.
- Smith J. 1993. Antimicrobial preservative-reduced foods. V: Technology of reduced-additive foods. Smith J. (ed.). London, Blackie Academic & Professional: 123-138
- Smulders F. J. M., Toldra F., Flores J., Prieto M. 1992. Discussion with the authors – Part I. V: New technologies for meat and meat products: Fermentation and starter cultures, muscle enzymology and meat ageing, quality control systems. Smulders F. J. M., Toldra F., Flores J., Prieto M. (eds.). Utrecht, ECCEAMST, Nijmegen: Audet tijdschriften: 126-134
- Sofos J. N., Raharjo S. 1995. Curing agents. V: Food additive toxicology. Maga J. A., Tu A.T. (eds.) New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker: 235-267
- Sriamornsak P. 1998. Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 46: 233-236
- Sriamornsak P., Nunthanid J. 1998. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery. I. Preparations and in vitro release studies. International Journal of Pharmaceutics, 160: 207-212

- Stevanović M. 1993. Senzorične, kemične in instrumentalne lastnosti dietnih hrenovk. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 30-90
- Stevanović M. 1998. Alternativni pigment razsoljenega mesa v modelnih koagulatih mesnih emulzij. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 105 str.
- Stevanović M., Žlender B., Abram V., Kumperger U. 1997. The influence of pork muscle's type and addition of pigment CCMP on the colour of meat emulsion coagulates. V: Vitality of meat. 43rd International Congress of Meat Science and Technology ICoMST 1997, 3rd Asia and Pacific Congress of Meat Science and Technology, 29th New Zealand Meat Industry Research Conference, Auckland, 27 July to 1 August, 1997. Congress proceedings, D1-53. Bass J. (ed.), Hamilton, Mirinz: 462-463
- Stevanović M., Čadež P., Žlender B., Filipič M. 2000. Genotoxicity testing of cooked cured-meat pigment (CCMP) and meat emulsion coagulates prepared with CCMP. Journal of Food Protection, 63, 7: 945-952
- Stevanović M., Šentjerc M. 2000a. EPR studies of alternative cooked cured meat pigment (CCMP). Acta Chimica Slovenica, 47, 1: 47-53
- Stryer L. 1995. Biochemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 1064 str.
- Šentjerc M. 1981. EPR encimov dihalne verige. Farmaceutski vestnik. 3: 271-280
- Šubic T. 1997. Kakovost mesa piščancev različnih provenienc. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 50 str.
- The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 2001. 13th ed. Whitehouse Station: Merck & Company: 46, 61, 279
- Tri oblike mioglobina mišičnine govedi. Slikovno gradivo. 1997. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za tehnologijo mesa in gotovih jedi: 1 str.
- Valin C., Ouali A. 1992. Proteolytic muscle enzymes and *post mortem* meat tenderisation. V: New technologies for meat and meat products: fermentation and starter cultures, muscle enzymology and meat ageing, quality control systems. Smulders F., Toldra F., Flores J., Prieto M. (eds.). Utrecht, Audet Tijdschriften: 163-179
- Varnam A. H., Sutherland J. P. 1995. Meat and meat products: Technology, chemistry and microbiology. London, Chapman & Hall: 167-223
- Vombergar B., Jurkovič B., Jež A. 1989. Mesni izdelki brez ali z zmanjšano količino nitritov. V: Meso kao namirnica u savremenoj ishrani. 29. savetovanje jugoslovenske industrije mesa, Vrbovec, 7. in 8. septembar, 1989. Trumić Ž., Tišljarec D., Petrović N., Polić M. (ur.). Beograd, Jugoslovenski institut za tehnologijo mesa: 252-253
- Vrhovnik K. 1997. Vpliv strukture domen in velikosti liposomov na transport hidrofilne spinsko označene molekule v kožo. Magistrska naloga. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 7-36
- Wang W., Liu X., Xie Y., Zhang H., Yu W., Xiong Y., Xie W., Ma X. 2006. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. Journal of Materials Chemistry, 16: 3252-3267

- Watson D. H. 1993. Safety of chemicals in food. London, Ellis Horwood: 63-75
- Weber R. T. 1991. Bruker ESP300 EPR Spectrometer: User's manual. Massachusetts, Bruker instruments: 2.1-2.21
- Weil J. A., Bolton J. R., Wertz J. E. 1994. Electron paramagnetic resonance spectroscopy: elementary theory and practical applications. New York, John Wiley & Sons: 568 str.
- Wertz J. E., Bolton J. R. 1972. Electron spin resonance – elementary theory and practical application. New York, McGraw – Hill: 1-12, 21-48, 258-312
- Wettasinghe M., Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of preformed cooked cured-meat pigment in a β -carotene/linoleate model system. Food Chemistry, 58, 3: 203-207
- Wilson N. R. P. 1981. Sausages and other comminuted meat products. V: Meat and meat products: factors affecting quality control. Wilson N. R. P., Dyett E. J., Hughes R. B., Jones C. R. V. (eds.). London, Applied Science Publishers: 164-181
- Wirth F. 1985. Farbbildung und farbhaltung bei Brühwurst. Fleischwirtschaft, 65, 4: 423-435
- Wirth F. 1986. Curing: colour formation and colour retention in frankfurter-type sausages. Fleischwirtschaft, 66, 3: 354-358
- Wirth F. 1991. Restricting and dispensing with curing agents in meat products. Fleischwirtschaft, 71, 9: 1051-1054
- Wood J. D., Nute G. R., Fursey G. A. J., Cuthbertson A. 1995. The effect of cooking conditions on the eating quality of pork. Meat Science, 40, 2: 127-135
- Žlender B. 1997. Senzorična kakovost perutninskih izdelkov. V: Strokovni seminar in prezentacija. Ptuj, 21. marec 1997. Ptuj: Perutnina Ptuj: 10 str.
- Žlender B., Holcman A., Rajar A. 1995. The effect of provenance of chickens on dressing percentage and meat composition. Zbornik Biotehniške fakultete v Ljubljani, Kmetijstvo (Zootehnika), Supl. 22: 233-239

ZAHVALA

Svoje najgloblje spoštovanje in zahvalo moram izraziti gospodu mentorju prof. dr. Božidarju Žlendru, ki me je vodil skozi pot podiplomskega izobraževanja, v času raziskave mi dajal nasvete, me bodril, vzpodbujal tudi med samo boleznijo in mi strokovno veliko pomagal ter s potrpežljivostjo pripomogel k dokončanju doktorske disertacije. Ob tem se je velikokrat uresničila sreča kot skladnost najinih misli in besed.

Iskrena hvala velja tudi gospe somentorici prof. dr. Veroniki Abram za vso njeno tako ali drugače izrečeno in izraženo pomoč, razumevanje, kritične usmeritve, koristne strokovne nasvete, mnenja, čas, ki si ga je kljub zasedenosti in obremenitvam zmeraj utrgala ter bila tako pripravljena iskati primerne rešitve glede na nastalo situacijo med samim eksperimentalnim delom kakor tudi po njem vse do zagovora. Dali ste mi vedeti, da so prijazne besede kratke in enostavne, njihov odmev pa neskončen.

Prisrčna hvala tudi gospe prof. dr. Julijani Kristl, pri kateri je še kako izstopal čut do sočloveka, ko je bil ta pomoči potreben. Hvala za vse neprecenljive nasvete, besede spodbude, poslušnost, pomoč in razumevanje, ki sem ga bila deležna pri samem eksperimentalnem delu kakor tudi po tem, ko je doktorsko disertacijo bilo potrebno napisati in popravljati. Ob Vas sem spoznala, da nobeno dobro delo, naj bo še tako drobceno, nikoli ne gre v nič.

Zahvala velja tudi gospodu prof. dr. Milanu Schari, ki je nesebično priskočil na pomoč z idejami, nazornimi in koristnimi strokovnimi nasveti ter priporočili, ko smo v laboratoriju za biofiziko Odseka za fiziko trdne snovi (F5) Instituta Jožef Stefan včasih tudi pozno v noč iskali možnosti glede učinkovite zaščite pigmenta toplotno obdelanega razsoljenega mesa. Z Vaše strani se je dobrotar razdajala in ob tem se je v meni oživil ustvarjalni duh.

Bistveni delež pri ustvarjanju doktorske disertacije je imela gospa dr. Marjeta Šentjunc z Odseka za fiziko trdne snovi (F5) Instituta Jožef Stefan, ki me je popeljala v svet elektronske paramagnetne resonance tako s pomočjo teorije kakor potem tudi prakse. Nikoli mi ni zavrnila nobene prošnje za pomoč, venomer je bila pripravljena razumeti in slišati tisto, kar sem izrekla, najsi v pisni ali ustni obliki. Tudi čas zanjo ni bil nikoli vprašljiv, pomembno je bilo, da se z rezultati natančnega in marljivega dela pride do zastavljenega cilja. V primeru, da na tej poti nastanejo ovire, so venomer tudi rešitve, s katerimi se jih premaga, zato jih je bila pripravljena poiskati sama ali pa s pomočjo prijaznih sodelavcev: gospe Marjane Nemec, doc. dr. Janeza Štrancarja, dr. Zorana Arsova, dr. Tilena Kokliča, dr. Zrinke Abramovič in dr. Polone Umek, katerim se ob tej priložnosti tudi iz srca zahvaljujem. Prav tako hvala tudi gospe dr. Radmili Milačič z Odseka za kemijo okolja za njen doprinos pri obogatitvi eksperimentalnega dela. Nisem pa pozabila tudi dr. Aleša Omerzuja z Odseka za kompleksne snovi (F7) Instituta Jožef Stefan, ki mi je v primeru nejasnosti, problemov in težav takoj priskočil na pomoč z idejami ali možnostmi za rešitev. Vsak izmed Vas se drži načela, da je resnično bogastvo človeka dobro, ki ga stori na svetu.

Prav lepa hvala velja gospe doc. dr. Lei Gašperlin za neizmerno pomoč, nasvete pri statistični obdelavi podatkov in oblikovanju dokončne različice doktorske disertacije ter

vsem zaposlenim na Katedri za tehnologijo mesa in gotovih jedi, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete: gospe viš. pred. mag. Marleni Skvarča, gospe viš. pred. mag. Alenki Rajar, gospodu dr. Tomažu Polaku in gospe Mojci Malenšek, ki so mi stali ob strani, me vzpodbujali pri odločitvah in mi bili pripravljeni pomagati sleherni trenutek vsak po svojih najboljših močeh. Hvaležna sem, da mi je bilo dano z Vami preživeti in doživeti leta mlade raziskovalke. Ob tem ne smem pozabiti tudi gospe Marte Satler in dr. Dejana Došlerja, katerima gre pravtako beseda hvala.

Gospa Marlena in gospa Lea – če bi naštevala vse za kar sem Vama hvaležna in se Vama ob tej priložnosti zahvaljujem, bi bilo tega preveč. Zato dovolita, da izrečem besedi LEPA HVALA, sami pa najbolj vesta kaj je glede na čas, ko sem bila pri Vaju in tudi pozneje pod njima razumljeno.

Hvala tudi gospe Tatjani Hrovatič, gospe Mojci Keržan, gospodu asist. dr. Mihi Homarju, mag. farm. in gospe Alenki Zvonar, mag. farm. za vso pomoč v okviru dela, ki je bilo opravljeno na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, Fakultete za farmacijo.

Prisrčna hvala gospe prof. dr. Tereziji Golob in njenim sodelavkam: gospe Mojci Jamnik, univ. dipl. ing. živ. tehnol., gospe Jasni Bertonec, univ. dipl. ing. živ. tehnolog., gospe Marinki Jan, univ. dipl. ing. živ. tehnol. in gospe Eleni Kenda Majerič za zaupanje, pomoč in prijazne besede v laboratoriju Katedre za vrednotenje živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete. Nasveti, ki sem jih bila deležna so mi prišli še kako prav. Prinašale ste mi svetlobo v eksperimentalni vsakdan.

Hvala velja tudi vsem zaposlenim na Katedri za kemijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, ki ste me v laboratoriju spustili medse in si z razumevanjem ter s sočutjem delo organizirali tako, da je bilo realizirano tako na eni kot na drugi strani.

Prav tako bi se rada zahvalila gospodu prof. dr. Petru Rasporju, ki mi je omogočil, da sem lahko v njegovem laboratoriju v okviru Katedre za biotehnologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete uporabljala pri eksperimentalnem delu centrifugo s hlajenjem. Hvala tudi gospe dr. Neži Čadež za pomoč pri tem delu.

Hvaležna sem tudi gospodu prof. dr. Miklavžu Grabnarju s Katedre za molekularno genetiko, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete in njegovemu sodelavcu v laboratoriju gospodu dr. Zdravku Podlesku, ki sta mi priskočila na pomoč, ko je bilo med eksperimentalnim delom potrebno uporabiti sintezo pigmenta CCMP-ja v večjem merilu.

Za sodelovanje pri nastajanju tega dela se zahvaljujem gospodu Roku Breclju, univ. dipl. ing. živ. tehnol. in Alanu Krajncu, mag. farm., s katerima smo skupaj prehodili določen del raziskovalne poti.

Perutnini Ptuj d. d., Potrčeva cesta 10, 2250 Ptuj, gospodu Milku Lebariču, univ. dipl. ing. živ. tehnol. in gospodu Vladu Pevniku gre zahvala za material, ki je bil namenjen eksperimentalnemu delu raziskave. Ministrstvu za šolstvo, znanost in šport ter Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije pa za financiranje celotnega študija podiplomskega izobraževanja.

Za pomoč in sodelovanje se zahvaljujem gospe dr. Marjeti Stevanović.

Zahvala velja tudi osebju knjižnice – gospe Ivici Hočevnar, univ. dipl. ing. živ. tehnol., gospe Barbari Slemenik, univ. dipl. bibliot. in gospe Lini Burkan, univ. ing. živ. tehnol. na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete za veliko pomoč pri oblikovanju doktorske disertacije in pri iskanju ter nabavi gradiva zanjo.

Barbara – hvala ti za obljubo dnevne svetlobe v najtemnejšem trenutku noči. To, kar si imela, si večkrat obdržala tako, da si podarila.

Zahvala velja tudi gospe Saši Štraus, prof., ki je pregledala doktorsko disertacijo in tako pripomogla, da je le-ta napisana v lepem slovenskem knjižnem jeziku. Hvala tudi gospe Vesni Mršič, prof., za njen doprinos prevajanja v angleški jezik.

Prav posebej pa gre zahvala dekanu Biotehniške fakultete gospodu prof. dr. Janezu Hribarju za vso razumevanje in pomoč, ki ste ju širokosrčno podarjali, kadarkoli sem ju potrebovala.

Drage prijateljice in dragi prijatelji – z Vami je bil vsak trenutek nov začetek. Dajali ste mi upanje in z Vami sem hodila skupaj proti zastavljenemu cilju. Z mano ste se veselili rezultatov mojega dela, ob meni ste bili, ko je bil jutri obremenjen s skrbmi. Ob Vas sem spoznala ustvarjalni namen, ki je spodbujal nove rešitve. Prijateljstvo je s tem povečalo srečo, saj se je podvojilo naše veselje. Iz Vaših dejanj je žarela misel “Hočem, da si srečna!”

Na tem omejenem prostoru se ne morem zahvaliti vsem, svojo hvaležnost pa želim izraziti vsem tistim neimenovanim, ki so kakorkoli pripomogli pri izdelavi te doktorske disertacije. Marsikdo izmed teh mi je naklonil neštete ure svojega dragocenega časa.

Prav posebna zahvala pa gre mojim dragim staršem in domačim, ki so mi omogočili podiplomski študij ter mi po svojih močeh pomagali, me bodrili, vzpodbujali in so mi bile zaradi njih omogočene tudi mnoge druge stvari.

**“Ko si tlakujemo pot, po kateri hodimo,
se spomnimo na stezo, kjer smo bili srečni.”**