

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jernej MOHAR

**UPORABA RAZLIČNIH BARVIL V MODELNIH
MESNIH EMULZIJAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jernej MOHAR

**UPORABA RAZLIČNIH BARVIL V MODELNIH MESNIH
EMULZIJAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

USE OF DIFFERENT COLORANTS IN MODEL MEAT EMULSIONS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Praktični del je bil opravljen na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Tomaža Polaka in za recenzenta izr. prof. dr. Blaža Cigića.

Mentor: doc. dr. Tomaž Polak

Recenzent: izr. prof. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jernej Mohar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 637.523:636.5:547.97:543.2(043)=163.6

KG mesni izdelki / mesne emulzije / aditivi / nitriti / nitrati / pigment topotno obdelanega razsoljenega mesa / CCMP / barva / barvila / karmin / kemijska sestava / tekstura

AV MOHAR, Jernej

SA POLAK, Tomaž (mentor)/ CIGIĆ, Blaž (recenzent)

KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2016

IN UPORABA RAZLIČNIH BARVIL V MODELNIH MESNIH EMULZIJAH

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 57 str., 16 pregl., 17 sl., 71 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Cilj naloge je bil poiskati barvilo za mesne izdelke v primerni koncentraciji, ki ne bi vsebovalo rezidualnega nitrita in bi glede barve imelo vsaj enak učinek kot nitrit. V ta namen smo v modelnih mesnih emulzijah testirali barvilo karmin in barvilo CCMP (pigment topotno obdelanega razsoljenega mesa), ki smo ga sintetizirali v laboratoriju. Pripravili smo 8 mesnih emulzij v dveh ponovitvah: kontrolna emulzija z nitritno soljo, negativna kontrolna emulzija brez dodatka zaobarvanje, 3 emulzije z dodatkom CCMP (30, 60 oz. 120 mg hemina) in 3 emulzije z dodatkom karmina (7,5, 15 oz. 30 mg karmina). Pigment CCMP smo sintetizirali iz govejega hemina. Polnjenju emulzij v ovitke, barjenju in hlajenju so sledile kemijska analiza emulzij (določanje rezidualnega nitrita in osnovne kemijske sestave), instrumentalna analiza barve (kromometer Minolta CR 200b, sistem L* a* b*) in teksture (TA.XTplus in analiza TPA) teh mesnih emulzij ter statistična obdelava podatkov. Vse rezine testnih mesnih emulzij so se značilno razlikovale v izmerjenih parametrih L*, a* in b* ne glede na čas (0-3h) in temperaturo (4 °C in ~20 °C) hranjenja. Emulzije s CCMP, ki so bile izpostavljene sobni temperaturi in temperaturi hladilnika, so s časom postajale manj rdeče in bolj rumene. Emulzije z dodatkom karmina se pri istih pogojih niso značilno spremenjale v vseh merjenih parametrih. Po enomesečnem skladiščenju so bile vse emulzije z dodatkom karmina značilno bolj rdeče, pri emulzijah s CCMP se svetlost (L*) in rdeč odtenek (a*) nista bistveno spremnjala. Glede na podatke je bil vzorec z dodatkom 7,5 mg karmina najbližje kontrolnemu vzorcu. V primerjavi s komercialnimi izdelki bi bile lahko še sprejemljive nekatere emulzije z večjo količino barvila (CCMP1 in CCMP2). Dodatek barvila statistično značilno vpliva na trdoto in kohezivnost - instrumentalno izmerjena teksturna parametra. Emulzije z dodatkom barvil so bile manj trdne.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 637.523:636.5:547.97:543.2(043)=163.6

CX meat products / meat emulsions / additives / nitrite / nitrate / cooked cured meat pigment / CCMP / color / colorants / carmine / chemical composition / texture

AU MOHAR, Jernej

AA POLAK, Tomaž (supervisor)/ CIGIĆ, Blaž (reviewer)

PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2016

TI USE OF DIFFERENT COLORANTS IN MODEL MEAT EMULSIONS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 57 p., 16 tab., 17 fig., 71 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of the thesis was to find colorant for meat products, which would not contain residual nitrite while having at least the same coloring effect as nitrite. For this purpose, we tested carmine and CCMP (cooked cured meat pigment), which we synthesized in the laboratory. We prepared 8 meat emulsions in two iterations: a control emulsion with salt, a negative control emulsion without color additives, 3 with the addition of CCMP (30, 60 or 120 mg of haemin) and 3 with the addition of carmine (7.5, 15 or 30 mg of carmine). We synthesized CCMP from bovine haemin. After emulsions were filled, cooked and cooled, we performed chemical analyses (to determine the residual nitrite and basic chemical composition), instrumental analysis of color (Chroma Meter Minolta CR 200b, L* a* b*) and texture (TA.XTplus, TPA analysis). All data was statistically analyzed. All the slices of meat emulsions were significantly different in their measured parameters L*, a* and b* regardless of the time (0-3h) and temperature (4 °C in ~20 °C) of storage. Emulsions with CCMP, which were exposed to ambient and refrigerated temperatures, became less red and more yellow. In the same conditions, emulsions with the addition of carmine did not change in any of the measured parameters. After one-month storage, all emulsions with the addition of carmine were more red, while emulsions with added CCMP were not significantly changed in brightness (L*) and redness (a*). According to the data, the sample with an addition 7.5 mg of carmine was nearest to the control sample. In comparison with commercial products some emulsions (CCMP1 and CCMP2) with a higher addition of colorant could be acceptable. The addition of colorants significantly affected the hardness and cohesiveness – the instrumentally measured parameter of the texture. Emulsions with the addition of colorants were less hard than the control emulsion.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED LITERATURE.....	3
2.1 BARVA MESA	3
2.1.1 Vsebnost mioglobina.....	3
2.1.2 Oblike mioglobina.....	4
2.2 RAZSOLJEVANJE MESA	6
2.3 NITRATI IN NITRITI.....	7
2.3.1 Značilnosti nitratne soli (NaNO_3 ali KNO_3)	8
2.3.2 Značilnosti nitritne soli.....	9
2.3.3 Oblikovanje barve razsoljenega mesa	10
2.3.4 Varnost in toksičnost nitrata in nitrita	12
2.3.5 Nitrit in oblikovanje arome.....	14
2.3.6 Antioksidativno delovanje nitritov.....	15
2.3.7 Antimikrobeno delovanje nitritov.....	15
2.4 ALTERNATIVE NITRITU.....	16
2.5 BARVILA V MESNI INDUSTRIJI.....	19
2.5.1 Pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP)	19
2.5.2 Barvilo rdeče pese, betanin (betacianini, betaksantini) E 162	21
2.5.3 Angkak (fermentiran riž)	21
2.5.4 Pigmenti rdeče paprike - izvleček paprike, kapsantin, kapsorubin E 160c.....	21

2.5.5	Karoten – mešanice ali β-karoten E 160 a.....	22
2.5.6	Kurkumin E 100	22
2.5.7	Košenil, karminska kislina, karmini E 120	23
2.5.8	Rdeče E 124 (Ponceau 4R, Cochineal Red A)	23
2.5.9	Karamel E 150 a, b, c, d	24
2.5.10	Rdeče E 129	24
2.5.11	Sodobne komercialne mešanice barvil.....	25
2.6	MERJENJE BARVE MESA IN MESNIH IZDELKOV	25
2.6.1	Senzorično vrednotenje barve	26
2.6.2	Instrumentalno vrednotenje barve	27
3	MATERIAL IN METODE DELA	29
3.1	NAČRT POSKUSA.....	29
3.2	SINTEZA CCMP.....	29
3.3	IZDELAVA MESNIH EMULZIJ	30
3.4	METODE DELA	31
3.4.1	Določanje osnovne kemijske sestave modelne mesne emulzije.....	31
3.4.2	Določanje nitrita	32
3.4.3	Instrumentalno merjenje barve.....	32
3.4.4	Instrumentalno merjenje reoloških lastnosti emulzij	33
3.4.5	Statistična analiza	35
4	REZULTATI.....	36
4.1	OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA IN REZIDUALNI NITRIT	36
4.2	INSTRUMENTALNA ANALIZA BARVE MESNIH EMULZIJ	36
4.3	INSTRUMENTALNA ANALIZA TEKSTURE MESNIH EMULZIJ	43
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1	RAZPRAVA	45
5.2	SKLEPI	49
6	POVZETEK	50
7	VIRI	52
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Tri najpomembnejše oblike mioglobina in njihove barve (Hamm, 1975)	5
Preglednica 2: Spremembe barve na površini mesa v odvisnosti od oblike mioglobina (Lawrie, 1979).	6
Preglednica 3: 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).	20
Preglednica 4: Reagenti za pripravo treh koncentracij pigmenta CCMP.	30
Preglednica 5: Recepture za izdelavo osmih skupin mesnih emulzij.	31
Preglednica 6: Rezultati osnovne kemijske analize in rezidualnega nitrita modelnih mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.	36
Preglednica 7: Rezultati merjenja instrumentalnih vrednosti tekture modelnih mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri ($n = 896$).....	36
Preglednica 8: Vpliv dodatka različnih barvil (v različnih koncentracijah) na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost \pm standardni odklon) barve rezin mesnih emulzij takoj po rezanju ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).	37
Preglednica 9: Vpliv dodatka različnih barvil (v različnih koncentracijah) na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost \pm standardni odklon) barve rezin mesnih emulzij, skladiščenih 1 mesec, takoj po rezanju ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).	38
Preglednica 10: Razlike v instrumentalno izmerjenih parametrih (povprečna vrednost \pm standardni odklon) barve sveže odrezanih rezin mesnih emulzij (izdelanih z dodatki različnih barvil) in po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem	

(svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).	39
Preglednica 11: Razlike v instrumentalno izmerjenih parametrih (povprečna vrednost \pm standardni odklon) barve sveže odrezanih rezin mesnih emulzij (izdelanih z dodatki različnih barvil in skladiščenih 1 mesec) ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)	40
Preglednica 12: Vpliv enomesečnega skladiščenja na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost \pm standardni odklon) barve svežega reza mesnih emulzij, izdelanih z dodatki različnih barvil v različnih koncentracijah (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	41
Preglednica 13: Vpliv enomesečnega skladiščenja na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost \pm standardni odklon) barve po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) mesnih emulzij, izdelanih z dodatki različnih barvil v različnih koncentracijah (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).	42
Preglednica 14: Vpliv enomesečnega skladiščenja na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost \pm standardni odklon) barve po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	43
Preglednica 15: Rezultati merjenja instrumentalnih vrednosti tekture modelnih mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri ($n = 64$).....	43
Preglednica 16: Vpliv dodatka različnih barvil (v različnih koncentracijah) na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost \pm standardni odklon) tekture mesnih emulzij (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Odtenki rdeče barve mišičnine pri raznih vrstah mesa: govedina, mlada govedina, teletina, svinjina, perutnina (Bučar, 1997)	4
Slika 2: Oblike mioglobina na primeru mišičnine govedi: mioglobin, oksimioglobin in metmioglobin (Gašperlin in Rajar, 2005)	5
Slika 3: Oblikovanje pigmenta razsoljenega mesa (Wilson, 1981)	10
Slika 4: Kemične spremembe mioglobina v razsoljenem mesu (Gašperlin, 1998)	11
Slika 5: Strukturna formula nitrozomioglobina (Potthast, 1987)	12
Slika 6: Strukturna formula betanina (Socaciu, 2008).....	21
Slika 7: Strukturna formula kapsantina in kapsorubina (Socaciu, 2008).....	22
Slika 8: Strukturna formula β -karotena (Socaciu, 2008)	22
Slika 9: Strukturna formula kurkumina (Socaciu, 2008)	22
Slika 10: Strukturna formula karminske kisline (Socaciu, 2008)	23
Slika 11: Strukturna formula Rdeče E 124 (Socaciu, 2008).....	24
Slika 12: Strukturna formula Rdeče E 129 (Socaciu, 2008).....	25
Slika 13: Prerezi testnih mesnih emulzij.....	31
Slika 14: Test TPA (angl. texture profile analysis) (Texture Analyser XT. Plus, 2010).	34
Slika 15: Primer krivulje, pridobljene s testom TPA, na naključno izbranem vzorcu mesne emulzije.	35
Slika 16: Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev mesnih emulzij, izdelanih z dodatkom različnih barvil v različnih koncentracijah, ter dveh industrijskih izdelkov, prikazana glede na vzorce z nitritom (sveži rez).....	47

Slika 17: Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev mesnih emulzij, izdelanih z dodatkom različnih barvil v različnih koncentracijah, prikazana glede na vzorce z nitritom po treh urah na sobni temperaturi.....47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADI	sprejemljivi dnevni vnos (angl. Acceptable Daily Intake)
BHA	butil hidroksianizol
CCMP	pigment topotno obdelanega razsolenega mesa (angl. Cooked cured Meat Pigment)
CIE	International Commission on Illumination
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)
FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
GRAS	Generally recognized as safe
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka (angl. International Agency for Research on Cancer)
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
Mb	mioglobin
MbO ₂	oksimioglobin
NDMA	N-nitrozodimetilamin
NDEA	N-nitrozodietilamin
NOMb	nitrozomioglobin
NPIR	N-nitrozopirolidin
NPIP	N-nitrozopiperidin
NPRO	N-nitrozoprolin
metMb	metmioglobin
TPA	Texture Profile Analysis
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

1 UVOD

Znano je, da je človek izpostavljen različnim rakotvornim, še posebej pa genotoksičnim spojinam, ki izvirajo iz mnogih in različnih virov ter so definirane kot snovi, ki povzročajo poškodbe DNA. V grobem lahko genotoksične snovi v živilih glede na izvor delimo na naravne, na tiste, ki nastajajo pri topotni obdelavi in tehnoloških postopkih, na dodatke živilom in na kontaminante. Genotoksične snovi naravnega izvora so prisotne predvsem v rastlinah (pirolizidinski alkaloidi in številni flavonoidi, kot je kvercetin). V letu 2005 je Evropska agencija za varno hrano (EFSA) opozorila, da so v številnih živilskih proizvodih našli nedovoljena barvila (Sudan I, II, III, in IV, Para Red, Rhodamine B in Orange II). Ta barvila so genotoksična in čeprav ni dokazano, da so tudi rakotvorna, njihova uporaba v EU ni dovoljena. Raziskali so tudi drugo skupino barvil, ki so v EU prepovedana, vendar se še vedno uporablja v državah nečlanicah EU, od koder živila ali začimbe izvirajo. Za barvila iz te skupine (Acid Red, Sudan Red 7B, Metanil Yellow, Auramin, Congo Red, Butter Yellow, Solvent Red I, Naphtol Yellow, Malachite Green, Leucomalachite Green, Ponceau 3R, Ponceau MX in Oil Orange SS) so na osnovi podatkov, ki so na voljo, ocenili, da jih je potrebno obravnavati kot genotoksične in/ali rakotvorne (Filipič, 2006). Živila so predvsem na področjih z veliko vlage lahko kontaminirana z mikotoksini (aflatoksini, ohratoksin A, sterigmatocistin in nekateri drugi) ali v nekaterih okoljih tudi s težkimi kovinami, npr. kadmijem, svincem, arzenom, živim srebrom ..., ki so rakotvorne za živali in ljudi (IARC jih klasificira v skupino 1A) (Filipič, 2006).

Najbolj razširjen dodatek v živilih (aditiv) je bil in je še vedno nitrit. Zaradi ugotovljenega dejstva, da nitrit v živilih in v človeškem organizmu lahko tvori genotoksične kemijske rakotvorne *N*-nitrozo spojine, je njegova uporaba v zadnjih dvajsetih letih precej sporna. *N*-nitrozo spojine vedno nastanejo pri interakciji med sekundarnimi amini in nitrozirajočimi dejavniki, predvsem dušikovimi oksidi. V živilih sta glavna vira dušikovih oksidov dodajanje nitritov in nitratov ter segrevanje in/ali sušenje živil v prisotnosti dimnih plinov, kjer lahko pride do oksidacije molekularnega dušika v dušikove okside. Poleg tega *N*-nitrozo spojine nastajajo tudi *in vivo* pri hkratnem zaužitju nitritov ali dušikovih oksidov in nitrozabilnega substrata (npr. sekundarnih aminov) (Wogan in Tannenbaum, 1975). Pojem *N*-nitrozo spojine se nanaša na vse spojine, ki imajo *N*-nitrozo skupino. Poznanih je nekaj sto teh spojin in le nekatere so genotoksične in rakotvorne (Filipič, 2006).

Ker se nitrit tradicionalno uporablja predvsem za razsoljevanje mesa in mesnih izdelkov, lahko prav z uživanjem teh izdelkov v telo vnašamo rakotvorne spojine. Problem potencialne rakotvornosti nitrita so znanstveniki hoteli rešiti na različne načine. Vsekakor je popolna izključitev nitrita iz procesa proizvodnje najbolj zanesljiva metoda, saj s tem izločimo prekurzorje za tvorbo *N*-nitrozoaminov. Zadnje čase pa se na trgu pojavlja vedno več izdelkov, ki v ta namen vsebujejo različne aditive, med drugim tudi nekatera alternativna barvila.

Namen naše raziskave je bil poiskati alternativo uporabi nitrita. Pri našem delu nas je zanimalo predvsem, kako uporaba različnih barvil vpliva na kakovost oz. barvo modelnih koagulatov mesnih emulzij. V literaturi je namreč o vplivu alternativnih barvil na senzorično in instrumentalno vrednoteno barvo koagulatov le malo podatkov.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Cilj naloge je poiskati barvilo za mesne izdelke, ki ne bi vsebovalo rezidualnega nitrita in bi glede barve imelo vsaj enak učinek kot nitrit. V ta namen bomo testirali različna barvila, ki se pojavljajo na trgu, ter testno barvilo, ki ga bomo sintetizirali v laboratoriju (CCMP – cooked cured meat pigment).

Delovne hipoteze:

- Zaradi uporabe različnih barvnih aditivov pričakujemo različne barvne odtenke, s katerimi se bomo skušali približati barvi kontrolne skupine, torej mesne emulzije, pri kateri bomo uporabili nitrit.
- Predvidevamo, da bo zadostna količina alternativnega barvnega aditiva (AproRed, karmin, betalain ali CCMP) uspešno simulirala barvo razsoljenega mesa, ter da ne bo bistveno vplivala na teksturne lastnosti mesnih emulzij.
- Rezidualni nitrit pričakujemo samo v kontrolni skupini.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 BARVA MESA

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

Mioglobin, ki se nahaja v sarkoplazmi mišičnih vlaken, je glavni nosilec barve mesa. V živi celici služi kot prinašalec in zaloga kisika. K barvi mesa nekaj malega prispeva še hemoglobin, ki izvira iz nepopolne izkravitev. Barva mesa je okvirno določena s 95 % delom mioglobina in 5 % delom hemoglobina (Potthast, 1987).

Mioglobin in hemoglobin sta kemijsko kromoproteina, ki se med seboj komaj razlikujeta po svoji kemijski sestavi. Uvrščamo ju med hemoproteine. Kemijsko je mioglobin sestavljen iz brezbarvnega globina (beljakovinske komponente) in obarvane prostetične skupine – hema. Molska masa mioglobina je 17 800 g/mol. Hemoglobin ima molsko maso 66 000 g/mol in je sestavljen iz štirih globinov in štirih molekul hema. Barvili se razlikujeta glede na svoje fiziološke funkcije: hemoglobin je odgovoren za transport kisika v krvi, mioglobin pa služi kot akceptor (prevzemnik) in zaloga (depo) kisika za potrebe metabolizma mišičnega vlakna. (Bučar in sod., 1989; Potthast, 1987).

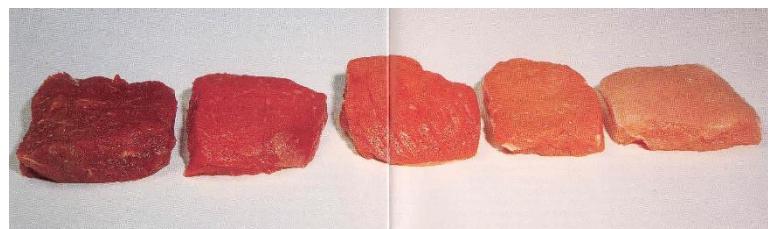
Hem je porfirinski obroč, ki je sestavljen iz štirih med seboj povezanih pirolovin obročev. V središču je dvovalentni Fe ion, povezan z N-atomi pirolovin obročev preko dveh kovalentnih in dveh koordinativnih vezi. Centralni atom železa ima koordinativno število šest, dve koordinativni vezi sta torej še prosti. Ena teh prostih koordinativnih vezi v mioglobingu in hemoglobingu zasede polipeptid globin, ki je vezan na Fe^{2+} preko dušika v imidazolni skupini histidinskega aminokislinskega ostanka. Na zadnje prosto vezivno mesto se lahko vežejo spojine, kot so O_2 , NO , CO itd.; tako je le-to na voljo za reverzibilne in irreverzibilne reakcije. Hem vsebuje dvovalentno Fe (Fe^{2+}), ki se lahko oksidira in preide v Fe^{3+} . To spojino imenujemo hemin (Potthast, 1987).

2.1.1 Vsebnost mioglobina

Vsebnost mišičnega barvila - mioglobina - v svežem mesu je odvisna od:

- živalske vrste (pri govedu 4-20 mg/100 g, pri prašičih 1-3 mg/100 g, pri jagnjetih 1-3 mg/100 g);
- pasme (meso primitivnih pasem je zaradi več mioglobina temnejše);
- starosti živali (meso starejših živali ima več mioglobina: pri teletih 1-3 mg/100 g – (rožnata barva mišičnine); pri mladem govedu 4-10 mg/100 g (svetlo rdeča barva mišičnine), pri starem govedu 10-20 mg/100 g (temnordeča barva mišičnine);
- prehrane (zelena krma prispeva k višji vsebnosti mioglobina);

- anatomske lokacije (mišice stegna so temnejše od mišic hrpta);
- aktivnosti mišice (rdeče mišice, ki so odgovorne za gibanje, so aktivnejše, imajo intenziven oksidativen metabolizem in so temnejše, imajo večjo vsebnost mioglobina; bele mišice imajo zaradi manjše obremenitve manj mioglobina);
- prisotnosti železa v prehrani;
- posredno tudi od spola živali in stopnje zamaščenosti (bolj marmorirana mišičnina ženskih živali je svetlejša) (Potthast, 1987; Bučar in sod., 1989).



Slika 1: Odtenki rdeče barve mišičnine pri raznih vrstah mesa: govedina, mlada govedina, teletina, svinjina, perutnina (Bučar, 1997).

Že na prvi pogled tako ločimo temnejše goveje meso (razen mesa telet) od svetlejšega prašičjega (slika 1). Meso kuncev in perutnine je tako v primerjavi z mesom klavne živine - katere meso je svetlo le v mladosti - ne glede na starost zelo svetlo.

2.1.2 Oblike mioglobina

Mioglobin je kemijsko izredno aktivna spojina. Njegova funkcija v živem organizmu je sprejemanje in skladiščenje kisika. Tudi po zakolu potekajo reakcije kisika z mišičnim barvilom in 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**, **oksimioglobin** in **metmioglobin**. **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 izpostavljeni zraku in se na mioglobin veže kisik. **Metmioglobin**, ki je sivo rjav in neutraktivien, je posledica oksidacije mioglobina (preglednica 1, slika 2). Parcialni tlak kisika določa, katera izmed teh dveh oblik mioglobina bo v določenem trenutku prevladovala (Bučar s sod., 1989; Potthast, 1987).

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

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



Slika 2: Oblike mioglobina na primeru mišičnine govedi: mioglobin, oksimioglobin in metmioglobin (Gašperlin in Rajar, 2005).

Pri postopku razsoljevanja se mesu dodaja nitritna ali nitratna sol (mešanica kuhinjske soli in nitrita oziroma redkeje nitrata). Mioglobin reagira z dušikovim monoksidom in pojavi se četrta oblika mioglobina - **nitrozomioglobin (NOMb)**. Meso ostane svetlo rdeče barve tudi po toplotni obdelavi (Karas, 2008).

Med toplotno obdelavo se mioglobin najprej denaturira v rjavi in sivorjavi pigment **miohemokromogen** in nato v sivorjavi denaturiran metmioglobin (**miohemikromogen**). Barva toplotno obdelanega mesa je odvisna od temperature in od obsega denaturacije proteina. Ko razsoljeno meso toplotno obdelamo, beljakovinska komponenta pigmenta tako kot pri svežem nerazsoljenem mesu denaturira in tvori se rožnat **nitrozomiokromogen**. Na oblikovanje barve toplotno obdelanega mesa pa ne vplivajo le hem-pigmenti. Med dolgotrajnejo pripravo mesa pri višji temperaturi hem oksidira, polimerizirajo se tudi maščobe, ogljikovi hidrati in beljakovine (Stevanović, 1998).

Mioglobin odločilno vpliva na oblikovanje barve razsoljenih izdelkov. Veliko lažje je namreč doseči intenzivno barvo razsoljenega mesa v barjenih klobasah (npr. hrenovkah) z večjim deležem mišičnine kot v tistih z večjim deležem maščob, vezivnega tkiva ali vode. V splošnem lahko rečemo, da nezadostna vsebnost pigmenta pomeni slabo barvo razsoljenih izdelkov (Wirth, 1986).

Preglednica 2: Spremembe barve na površini mesa v odvisnosti od oblike mioglobina (Lawrie, 1979).

Pigment	način oblikovanja	Fe	oblika hema	oblika globina	barva
Mioglobin	redukcija metmioglobina, deoksigenacija oksimioglobina	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	nativen	škrlatno rdeč
oksimioglobin	oksigenacija mioglobina	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	nativen	svetlordeč
metmioglobin	oksidacija mioglobina ali oksimioglobina	Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan	nativen	rjavordeč
nitrozomioglobin	vezava mioglobina z NO	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	nativen	svetlordeč (rožnat)
metmioglobin-nitrit	vezava metmioglobina z večjo količino nitrita	Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan	nativen	rdeč
globin hemokromogen	vpliv povisane temperature in denaturantov na mioglobin in oksimioglobin, obsevanje hemikromogena	Fe ⁺⁺	nepoškodovan	denaturiran	rdeč, tudi rjav
globin hemikromogen	vpliv povisane temperature in denaturantov na mioglobin in oksimioglobin, metmioglobin in hemokromogen	Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan	denaturiran	rjav (včasih sivkast)
nitrozomiokromogen	vpliv povisane temperature 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 ali kisline ali drugih reducentov na oksimioglobin	Fe ⁺⁺ Fe ⁺⁺⁺	nepoškodovan zmanjšan	denaturiran	zelen
Verdohem	učinek večjih količin reagentov kot Fe ⁺⁺⁺ pri holeglobinu		porfirinski obroč odprt	denaturiran	zelen
žolčni pigmenti	učinek večjih količin reagentov kot Fe pri holeglobinu		porfirinski odsoten obroč razpade;	odsoten	rumen ali brez barve veriga pirolov

Rezultat oksidacije mioglobina v navzočnosti reducentov sta dva druga pigmenta, oba zelene barve. Če je reducent sulfhidrilna skupina, nastane **sulfmioglobin**. To je hem pigment, v katerem se nahaja žveplo. Sulfmioglobin je predvsem znak bakterijskega kvara mesa. Bakterije proizvajajo oksidazo, ki katalizira nastanek H₂S. Le - ta pa reagira z mišičnim barvilom, kar se kaže v obliki rumeno zelene diskoloracije. Če pa je reducent askorbat (preveliko doziranje) ali kakšna druga sulfhidrilna skupina, nastane **holeglobin hem pigment**, v katerem je oksidiran porfirinski obroč (Lawrie, 1979).

2.2 RAZSOLJEVANJE MESA

Razsoljevanje je eden osnovnih procesov v tehnologiji predelave mesa. Temeljni namen razsoljevanja je oblikovati značilen termostabilni mesni pigment (barvo) ter specifične

senzorične lastnosti razsoljenega mesa (aromo, teksturo). Z razsoljevanjem mesne izdelke konzerviramo, hkrati pa ima razsol antioksidativni učinek, saj upočasni žarkost in lipidno oksidacijo (Rahelić in sod., 1980).

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 pa tudi amonijevega ali kalcijevega nitrata, z nekaterimi drugimi dodatki (ogljikovimi hidrati, polifosfati, askorbinsko kislino ...), ki imajo v celotnem procesu vsak svojo funkcijo (Đorđević in sod., 1980).

Poznamo tri temeljne postopke razsoljevanja mesa, ki se med seboj razlikujejo glede na način prepajanja mesa s snovmi za razsoljevanje. Tako ločimo:

- mokro razsoljevanje (polaganje mesa v razsolico oziroma prelivanje mesa z razsolico),
- suho razsoljevanje (natiranje in posipavanje mesa z razsolom oziroma vmešavanje razsola v razdeto mesu),
- kombinirano razsoljevanje (vbrizgavanje razsolice v meso in dodatno mokro oziroma suho razsoljevanje, lahko pa tudi vbrizgavanje razsolice v meso in dodatno gnetenje mesa) (Gašperlin in Polak, 2010).

Prva dva postopka sta kot samostojni metodi dolgotrajna in se uporablja le še za razsoljevanje manjših kosov mesa. Kombinirana metoda je hitra, traja le nekaj dni in se uporablja za razsoljevanje večjih kosov mesa (Gašperlin in Polak, 2010).

Novejša spoznanja kažejo, da temeljna funkcija razsoljevanja ni več konzerviranje, temveč oblikovanje značilnega in termostabilnega pigmenta (nitrozomioglobina) s privlačno rožnato barvo ter specifične arome in tekture razsoljenega mesa (Karas, 2008). Đorđević in sod. (1980) navajajo, da na značilno aromo razsoljenega mesa bolj vpliva natrijev klorid (NaCl) kot natrijev nitrit (NaNO_2), ki sam te arome ne oblikuje, kot dodatek k natrijevemu kloridu (NaCl) pa jo izboljšuje.

2.3 NITRATI IN NITRITI

V mesni industriji nitrate in nitrite uporabljamo kot aditiv, s katerim zagotavljamo mikrobiološko varnost in poudarjamo barvo izdelkov. Znanstveniki so ugotovili, da je nitrit sredstvo za razsoljevanje, nitrat pa je v postopku razsoljevanja le posrednik (Karas, 2008).

Najučinkovitejše sredstvo za zaščito mesa je natrijev nitrit (NaNO_2), ki je bledo rumena, v vodi topna kristalinična sol NaOH in dušikove (III) kislino. Nitrit je topen v vodi in močno reaktiv; posebno pri nizki vrednosti pH se spremeni v svojo prvotno obliko, dušikovo kislino. Poleg ustvarjanja želene stabilne barve razsoljenega mesa v manjši meri izboljša tudi

aromo mesa. Nitrit je pomembno antioksidativno sredstvo in s svojim delovanjem varuje maščobe pred oksidacijo (Đorđević in sod., 1980).

Uporaba natrijevega nitrita kot edinstvenega konzervansa za zaščito mesa sega daleč v zgodovino, saj so z njegovo pomočjo konzervirali meso že 3000 let pr. n. št. v Mezopotamiji. 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, 1993b), zaradi katerega se je po topotni obdelavi razvila stabilna rdeča barva mesa. Meso, obdelano s tovrstno soljo, je bilo tudi mikrobiološko bolj obstojno in je imelo specifično aromo. Šele konec 19. stoletja so ugotovili, da se nitrat s pomočjo bakterij reducira v nitrit in ta v NO, ter da je prav NO - in ne nitrat - odgovoren za značilno rožnato barvo razsoljenega mesa (Hotchkiss in Cassens, 1987).

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 ustreznih denitrificirajočih bakterij, ki so prišle v razsolico z vodo, kuhinjsko soljo in mesom, reduciral v nitrit. 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 (Bučar in sod., 1989).

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 Značilnosti nitratne soli (NaNO_3 ali KNO_3)

Značilnosti nitratne soli opredeli Karas (2008) na dobre in slabe strani.

Dobre strani:

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

Slabe strani:

- nitratne soli nastopajo kot oksidanti (oksidirajo maščobe),
- nadzor redukcije nitrata v nitrit med tehnološkim postopkom ni enostaven, saj čas razsoljevanja in količino dodanega nitrata težko natanko določimo,
- nitratna sol inhibira rast nekaterih koristnih bakterij, ki delujejo med proteolizo (zorenjem) mesa.

2.3.2 Značilnosti nitritne soli

Značilnosti nitritne soli opredeli Karas (2008) na dobre in slabe strani.

Dobre strani:

- barva razsoljenega mesa se zelo hitro razvije; pri postopku ne potrebujemo nobenega posrednika, ki bi spremenil nitrat v nitrit,
- barva izdelka je enakomernejša, senzorično lepša in atraktivnejša; je pa barva, ki jo da nitrit, nekoliko svetlejša od barve, ki jo da nitrat;
- za oblikovanje barve so potrebne zelo majhne količine nitrita (večja ekonomičnost),
- nitrit oblikuje vonj in okus ter tako prispeva k tipični aromi razsoljenih izdelkov,
- izboljša teksturo razsoljenega mesnega izdelka,
- nitrit učinkuje kot antioksidant (stabilizira mesni pigment),
- nitrit ima antimikrobnii 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 uporabljam nitrit,
- preprečuje oblikovanje t. i. “warmed-over flavour“ (“pogrete“ ali “postane“ arome),
- nitrit je v slanicah in mesu mnogo lažje nadzorovati kot 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.

Količina dodanega nitrita je odvisna predvsem od vrste izdelka in temperature razsoljevanja, ki naj ne bi presegla 6 °C (Wirth, 1991). Na splošno velja, da je za večje kose mesa in tiste z bolj izrazito barvo potrebnega več nitrita, in obratno. Prav tako na količino dodanega nitrita vpliva tudi vsebnost maščobnega tkiva. Izdelkom z več maščobnega tkiva se dodaja manj nitrita.

Podatki o količini rezidualnega nitrita v končnih izdelkih so različni. Raziskovalci (Sofos in Raharjo, 1995; Cassens, 1997) ugotavljajo, da naj bi se med proizvodnjo izgubilo med 10 in 50 % nitrita, med skladiščenjem izdelka pa naj bi se količina še zmanjšala.

Ob uporabi nitrata je nemogoče predvideti, koliko se ga bo pretvorilo v nitrit. To močno poveča verjetnost prevelikega odmerka, kar lahko povzroči poslabšanje kakovosti končnega izdelka. V praksi zato za odmerjanje ustrezne količine nitrita le-tega uporabljam skupaj s kuhinjsko soljo v obliki t. i. nitritne soli za razsoljevanje. Uporaba soli za razsoljevanje

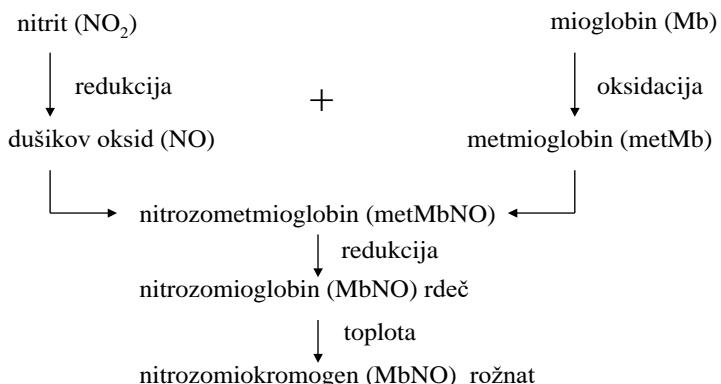
preprečuje, da bi pri proizvodnji mesnih izdelkov dodali preveč nitrita, saj bi bil izdelek preslan. Nitritne soli za razsoljevanje vsebujejo od 0,5 do 0,6 % natrijevega nitrita (Karas, 2008).

Mnogi avtorji so se ukvarjali z vprašanjem, kolikšna je minimalna potrebna količina nitrita, ki še ne vpliva na spremembe senzoričnih lastnosti izdelka. Posebej pozorni so bili na razvoj barve, arome in antibakterijski učinek nitrita. Če izdelku dodamo manjšo količino nitrita, lahko s tem dosežemo, da je v razsoljenem izdelku manjša tudi količina rezidualnega nitrita.

Maksimalna dovoljena količina prostega (rezidualnega) nitrita je odvisna od vrste mesnega izdelka.

2.3.3 Oblikovanje barve razsoljenega mesa

Znano je, da je nitrozomioglobin pigment razsoljenega mesa in da je ta produkt reakcije med nitritom in mišičnim pigmentom mioglobinom (slika 3). Reakcija nastanka nitrozomioglobina je kompleksna, kar je razumljivo glede na veliko reaktivnost najpomembnejših komponent mišičnih vlaken in nitrita (Sofos in Raharjo, 1995).



Slika 3: Oblikovanje pigmenta razsoljenega mesa (Wilson, 1981).

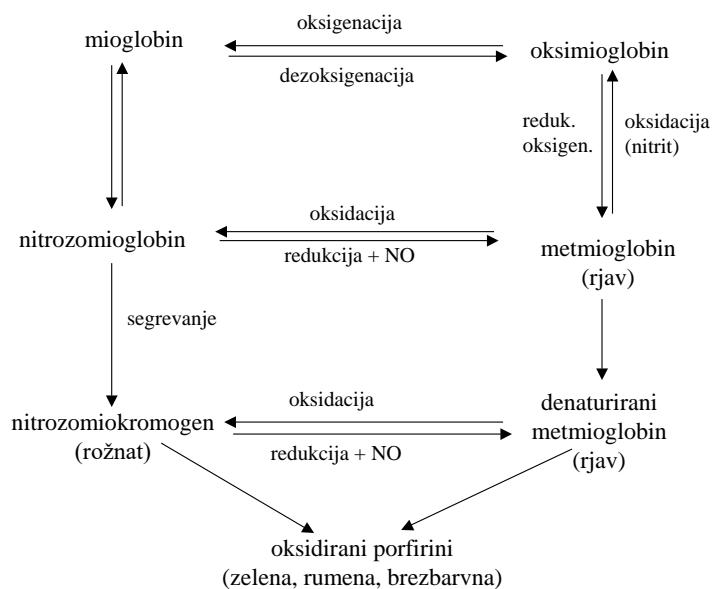
Osnovni mehanizem nastajanja nitrozomioglobina je oksidacija mioglobina v metmioglobin, ki se nato oblikuje v nitrozomioglobin kompleks s povezovanjem direktno z dušikovim monoksidom (NO). NO nastane z redukcijo nitrita. Nitrit je dodan direktno v razsolico ali pa nastane z bakterijsko redukcijo iz nitrata. Natrijev nitrit se pri nizki vrednosti pH (kislo okolje) mesa razgradi do dušikove (III) kislinske (HNO₂). Dušikova (III) kislina se z delovanjem 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 je na zraku nestabilen in možne so hitre diskoloracije (Varnam in Sutherland, 1995). S segrevanjem (v času sušenja ali topotne obdelave) se denaturira globin, ne

spremeni pa se obarvana komponenta pigmenta. Na ta način nastane rožnat nitrozomiokromogen, ki daje topotno obdelanemu razsoljenemu mesu zaželeno stabilno barvo (Stevanović, 1998).

Oblikovanje značilne rdeče barve razsoljenega mesa je odvisno od:

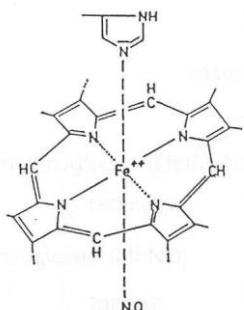
- količine dodanega nitrita, ki je odvisna od vsebnosti mioglobina v mišici,
- temperature razsoljevanja (zviševanje temperature do 80 °C pospeši, še višja temperatura pa upočasni nastajanje barve razsoljenega mesa),
- pH vrednosti mesa in razsolice,
- dodatka reducentov (le-ta pospešujejo redukcijo nitrita v NO in s tem nastanek nitrozomioglobina) in
- stanja uporabljenih surovine (procesi razsoljevanja so počasnejši v predhodno zamrznjenem mesu) (Karas, 2008).

Nastanek zadovoljive barve razsoljenega mesa je v znatni meri odvisen predvsem od uporabljenih tehnologij (Karas, 2008).



Slika 4: Kemične spremembe mioglobina v razsoljenem mesu (Gašperlin, 1998).

Raziskovalci so mnenja, da pri tvorbi nitrozomioglobina (sliki 4 in 5) sodeluje le del dodanega nitrita, znaten del pa ostaja nespremenjen, torej ostane kot rezidualni nitrit, del nitrita 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 5: Strukturna formula nitrozomioglobina (Potthast, 1987).

2.3.4 Varnost in toksičnost nitrata in nitrita

Nevarnost uporabe nitrata je v tem, da lahko iz njega nastanejo nedovoljene količine nitrita. Nitrit je zelo toksična substanca. V mnogih državah poskušajo omejiti ali celo prepovedati uporabo nitrata (Shahidi in Pegg, 1993a).

Prekomerno uživanje lahko povzroči slabost ali bruhanje, draženje oči, padec krvnega tlaka, širjenje arterij ali ven, spremembo motorične aktivnosti, želodčno in krvno methemoglobinemijo in celo komo (Karas, 2008).

Uživanje nitrita ima lahko mutagene učinke, s tvorbo rakotvornih nitrozaminov pa se povečuje tveganje za rakava obolenja. Večina toksičnih učinkov je posledica precej večjega zaužitja nitrita, kot ga je navadno prisotnega v mesnih izdelkih (Karas, 2008).

Methemoglobinemija je bolezen, pri kateri je hemoglobin v oksidirani obliki (methemoglobin) in zaradi tega ne more vezati kisika. Posledično pride do pomanjkanja kisika v tkivih, kar se kaže kot modra obarvanost kože in sluznic, občutek, da nam zmanjkuje zraka, glavobol, slabost, vrtoglavica ali izguba zavesti. Bolezen najbolj ogroža dojenčke do 4. meseca starosti. V tem starostnem obdobju še vedno ni razvit encimski sistem, ki bi bil sposoben reducirati methemoglobin v hemoglobin (Karas, 2008). 1 g NaNO₂ lahko prevede 1885 g hemoglobina v methemoglobin (Vombergar in sod., 1989). Smrtna doza natrijevega nitrita je po ocenah od 2 do 9 g. Prvi znaki pri oralni zastrupitvi se razvijejo po 15 - 45 minutah (Aquanno in sod., 1981).

Poudariti je potrebno možno oziroma verjetno mutagenost nitritov oz. N-nitrozo spojin ($R^1N(-R^2)-N=O$). N-nitrozo spojine je skupno ime za vse spojine z nitrozo skupinami. Velika skupina N-nitrozo spojin, ki se pojavljajo v živilih, so hitro hlapni rakotvorni N-nitrozamini: NDMA (N-nitrozodimetilamin), NDEA (N-nitrozodietilamin), NPIR (N-nitrozopirolidin) in NPIP (N-nitrozopiperidin). Vendar pa so glavne oblike N-nitrozo spojin v živilih nehlapne, npr. NPRO (N-nitrozoprolin). O mutagenosti ali rakotvornosti nehlapnih N-nitrozo spojin ne poročajo, lahko pa te spojine delujejo kot prekurzorji hlapnih rakotvornih nitrozaminov. Tretja skupina N-nitrozo spojin so nitrozamidi. Le-ti vsebujejo

snovi, kot so npr. N-nitrozouree, N-nitrozokarbamati in N-nitrozogvanidini (Jaegerstad in Skog, 2005). Nitrozamini za mutagenost/rakotvornost potrebujejo metabolno aktivacijo, nitrozamidi pa so aktivni že sami po sebi. Do metabolne aktivacije nitrozaminov najpogosteje prihaja v jetrih, lahko pa jih metabolirajo tudi druga človeška tkiva. Ugotovili so, da so individualne razlike v hitrosti metabolizma lahko zelo velike (do 150-kratne). N-nitrozodimetilamin preide z encimsko hidroksilacijo in z naknadno hidrolizo v aldehid in monoalkilnitrozamin. Le-ta se preuredi in sprosti karbokation, ki reagira z DNA. Med hlapnimi nitrozamini v živilih je najbolj rakotvoren NDEA, nekoliko manj NDMA, še manj pa NPIR in NPIP (Jaegerstad in Skog, 2005).

Raziskovalci so vsebnost *N*-nitrozaminov v razsoljenih mesnih izdelkih najučinkoviteje zmanjšali z zniževanjem vsebnosti nitrita. Ugotovili so tudi, da je pri doziranju, nižjem od 100 ppm nitrita, antimikrobeni učinek nitrita slab, ter da tvorbo *N*-nitrozaminov najučinkoviteje preprečimo z izključitvijo nitrita in uporabo raznih alternativ (Shahidi in Pegg, 1993b).

Z raziskavami je bilo potrjeno, da pri strokovno izvedenem procesu razsoljevanja in pri uporabi higienko neoporečne surovine ni nevarnosti za tvorbo nitrozaminov. Nevarno je razsoljevanje mesa, ki ni popolnoma sveže in pri katerem sta se že začeli razgradnja proteinov ter tvorba aminov, saj se lahko nitrit v tem primeru veže na amine in tvori nitrozamine. Problematične so tudi izrazito visoke temperature (nad 160 °C) toplotne obdelave, saj v reakciji tvorbe nitrozaminov delujejo katalitično, zaradi česar se odsvetuje ali se celo prepoveduje pečenje razsoljenega mesa (Karas, 2008).

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 dnevnega zaužitja količine zelenjave. Tudi pitna voda je lahko pomemben vir nitratov. Po ocenah od 80 do 90 % nitratov zaužijemo z zelenjavoj. 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. Nitrati, ki so zdravju relativno neškodljivi, se po zaužitju lahko spremenijo v nitrite, ki lahko povzročijo methemoglobinemijo. Nitriti so v želodcu lahko prekurzorji N-nitrozo spojin (NOC) oz. nitrozaminov in nitrozabilnih snovi, ki so po merilih mednarodne agencije za raziskavo raka IARC (International Agency for Research on Cancer) večinoma razvrščeni v skupino rakotvornosti 2 B (možna rakotvorna snov), nekatere pa 2 A (verjetna rakotvorna snov) (Filipič, 2006).

Nitrit in nitrat kot množično uporabljena aditiva pri razsoljevanju mesa sodita v skupino aditivov, katerih uporaba je zakonsko določena oziroma omejena.

JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) je postavila ADI (Acceptable Daily Intake, sprejemljivi dnevni vnos) za nitrati 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).

Glede na priporočila Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je dovoljena dnevna količina zaužitega nitrita največ 0,4 mg/kg telesne teže.

Maksimalna dovoljena količina prostega nitrita je odvisna od vrste mesnega izdelka. Po Pravilniku o aditivih za živila (2010) je v Sloveniji v mesnih izdelkih dovoljena največja vsebnost kalijevega nitrita (E 249), ki se jo lahko doda med proizvodnjo, 150 mg/kg. Največja dovoljena vsebnost natrijevega nitrita (E 250) v primeru steriliziranih mesnih izdelkov je 100 mg/kg. Največja dovoljena vsebnost ostanka (izražena kot NaNO₂) v primeru tradicionalnih mesnih izdelkov, izdelanih po postopku mokrega ali suhega razsoljevanja, znaša 175 mg/kg. Z oznako "za živila" se nitrit lahko prodaja samo v mešanici s soljo ali nadomestkom soli.

Največja dovoljena količina natrijevega (E 251) ali kalijevega (E 252) nitrata, ki se jo lahko doda med proizvodnjo toplotno neobdelanih mesnih izdelkov, je 150 mg/kg. Največja dovoljena količina nitrata, ki se jo lahko doda tradicionalnim mesnim izdelkom, izdelanih po postopku mokrega razsoljevanja, in drugim tradicionalnim soljenim mesnim izdelkom, je 300 mg/kg. Največja dovoljena vsebnost ostanka v primeru tradicionalnih mesnih izdelkov, izdelanih po postopku suhega razsoljevanja, znaša 250 mg/kg. Dovoljene količine nitrata so izražene kot NaNO₃ (Pravilnik o aditivih za živila, 2010).

Vsebnost N-nitrozo spojin v razsoljenih mesnih izdelkih se je v zadnjih letih značilno znižala, predvsem zaradi zmanjševanja količine nitratov in nitritov ter hkratnega dodajanja askorbinske kisline, ki inhibira tvorbo N-nitrozo spojin. Priporočljivo je, da med praženjem razsoljenega mesa in slanine ponev ni pokrita, uživanje maščobe, ki se med praženjem izcedi iz slanine ali mesa, pa odsvetujejo. Vsebnost NPIR se značilno zmanjša, če razsoljeno slanino pred praženjem namočimo v vodi ali pa jo namesto praženja na plošči oz. v ponvi toplotno obdelamo z mikrovalovi. Rešitev v smeri zmanjšanja N-nitrozo spojin je tudi v nadomestkih nitrita kot komponente zaobarvanje mesnin (Rajar in sod., 2006). Za popolno izključitev le-teh se je bilo treba zateči k iskanju alternative nitritu.

2.3.5 Nitrit in oblikovanje aromе

Poleg ustvarjanja želene stabilne barve razsoljenega mesa nitrit v manjši meri izboljša tudi aroma 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 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 žveplove spojine, alkoholi, aldehydi, inozin in hipoksantin. 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 arome izdelkov, razsoljenih z nitratom (Smulders in sod., 1992).

2.3.6 Antioksidativno delovanje nitritov

Nitrit je pomembno antioksidativno sredstvo, ki s svojim delovanjem varuje maščobe pred oksidacijo. Minimalna potrebna količina nitrita kot antioksidanta še ni znana. Proizvodi, obdelani samo s kuhijsko soljo, hitreje izgubijo okus; to 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 nezaželene arome (Đorđević in sod., 1980).

Nitrit kot antioksidant deluje 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 (Karas, 2008).

2.3.7 Antimikrobno delovanje nitritov

Razsoljevanje deluje protimikrobnno izraziteje kot soljenje. 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 inhibitorni učinek na rast raznih 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).

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 pa 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 (Quintavalla in sod., 1999).

Raziskave so pokazale, da je za uspešno inhibicijo bakterij *Salmonella spp.* v obarjenih klobasah pri 8 °C v 20–ih dneh potrebno najmanj 62 ppm nitrita. V čajni klobasi je za isti učinek potrebnega 101 ppm nitrita. Pri 30 °C niti 150 ppm nitrita ni dovolj za inhibiranje bakterije *Clostridium sporogenes* (Quintavalla in sod., 1999). Še več, nitrit v koncentracijah od 80 do 150 ppm upočasni in pri koncentracijah, večjih od 200 ppm, inhibira razmnoževanje bakterij *Clostridium botulinum* in *Salmonella spp.* (Böhmer in Hildebrandt, 1996). Če povzamemo ugotovitve Wirtha (1991), je za inhibicijo patogenih bakterij potreben dodatek nitritov od 80 do 150 ppm. Pri ocenjevanju učinka nitrita na konzerviranje je potrebno upoštevati tudi druge dejavnike, kot so a_w , pH vrednost in temperatura. Na obstojnost proizvodov vplivata predvsem toplotna obdelava in temperatura.

2.4 ALTERNATIVE NITRITU

Raziskovalci že dalj časa skušajo odkriti spojino, ki bi bila popolna alternativa nitritu, hkrati pa ne bi predstavljal tveganja za zdravje. Povod za iskanje alternativ nitritu so bili potencialno škodljivi učinki le-tega (predvsem tvorba nitrozaminov). Ker ima nitrit v proizvodnji mesnih izdelkov več funkcij, je popoln nadomestek težko najti, možnost, da bi vse njegove funkcije nadomestila ena sama spojina, pa je zelo majhna (Young in West, 2001).

Nadomestek za nitrit bi tako moral imeti antimikrobnii 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 tekture razsoljenega mesa (Young in West, 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).

Leta 1975 so v Ameriki izdelali breznitritno mešanico aditivov za razsoljevanje. Ta alternativa razsola je vsebovala antimikrobeno sredstvo metilparaben, t-butilhidroksikinon kot antioksidant in polifosfate kot preprečevalce lipidne avtooksidacije in razvoja neželene 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 pri 3 °C stabilne 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, 1993b).

Da bi našli alternativo nitritu, so Dymicky in sod. (1975) testirali več kot 300 spojin, ki bi lahko tvorile barvo razsoljenega mesa. Najučinkovitejši so bili 3-acil piridini.

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

Kot alternative nitritu so bili - v zvezi z njegovo funkcijoobarvanja mesnih izdelkov - v minulem obdobju poleg dušikovih heterocikličnih in aromatičnih snovi (nikotinska kislina, purinski derivati, tetrazol, heterociklične komponente (purini, pirimidini, pirazini, triazin...)) uporabljeni tudi naravni pigmenti. Glavna zadržka pri uporabi heterocikličnih in aromatičnih snovi sta njihova oksidacijska nestabilnost in dejstvo, da so derivati nikotinske kisline vazodilatatorji.

Barvila, s katerimi je bilo narejenih največ raziskav, so (Karas, 2008):

- betalaini (betacianini, betaksantini),
- angkak (fermentiran riž),
- pigmenti rdeče paprike,
- β -karoten,
- kurkumin,
- košenil (karminska kislina),
- večkomponentne mešanice, sestavljeni iz eritrozina, antioksidanta in antimikrobnih komponent ter
- nitrozirani goveji ali ovčji hemin – CCMP (pigment toplotno obdelanega razsoljenega mesa).

Nadomestki nitrita z antimikrobnim delovanjem so (Karas, 2008):

- kalijev sorbat,
- nizin,
- BHA (butil hidroksianizol),
- natrijev hipofosfit,
- organske kisline,
- lakoza in mlečnokislinske bakterije ter
- fosfati.

Kalijev sorbat je bela kristalinična spojina z GRAS statusom (generally recognized as safe), ki je imela pri dodatku 2600 mg kalijevega sorbata/kg termično obdelanega mesa enakovreden učinek kot dodatek 156 mg nitrita/kg termično obdelanega mesa. Nizin je pri 75 mg/kg učinkovito antibotulinsko sredstvo, a se njegova aktivnost izgubi pri hladnem skladiščenju. BHA (butil hidroksianizol) zavira rast bakterije *Clostridium botulinum* pri 50 mg/kg, a se izgubi med sekljanjem. Natrijev hipofosfit je pri doziranju 3 g/kg (ozioroma

1000 mg natrijevega hipofosfita/kg mesa skupaj z dodatkom 40 mg nitrita/kg mesa) enakovreden dodatku 120 mg nitrita/kg mesa in je tako učinkovito antibotulinsko sredstvo. Je blagega okusa, dobro topen in ima prav tako GRAS status. Organske kisline, posebno mlečna kislina, so prav tako učinkovite. Uporaba mlečne kisline, natrijevega in kalijevega laktata ali mlečnokislinskih bakterij zniža vrednost pH razsoljenega mesa in s tem poveča mikrobiološko obstojnost. Laktoza in mlečnokislinske bakterije zaščitijo pred tvorbo toksina botulina v breznitritni slanini. Fosfati, čeprav prvotno uporabljeni za vezavo vode v hrani, imajo prav tako antimikrobni in antibotulinski učinek (Shahidi in Pegg, 1993b).

Raziskovali so tudi hkratno uporabo antimikrobnega sredstva in zmanjšane količine nitrita (Shahidi in Pegg, 1993b). Ugotovili so, da mora biti antimikrobeno sredstvo vsaj tako učinkovito kot nitrit, biti mora varno, termostabilno, učinkovito mora biti v majhnih količinah in ne sme razvijati neželjene aromе. Pogojno tem zahtevam ustrezajo:

- ester parahidroksibenzojeve kisline, čeprav je njegov učinek proti bakteriji *Clostridium botulinum* vprašljiv,
- metil- in etilestri fumarne kisline in
- butilirani hidroksianizol (Shahidi in Pegg, 1993b).

Eden izmed načinov, s katerimi nadziramo mikrobiološke aktivnosti v mesu, je tudi uporaba nizkih do srednjih doz (do 50 kGray) γ -žarkov pri nizkih temperaturah. Le-te lahko uporabimo namesto nitrita ali za zmanjšanje količine dodanega nitrita (Karas, 2008).

Kot najboljša alternativa nitritu se je izkazala uporaba laktata in radiacijske sterilizacije (Shahidi in Pegg, 1993b). Pri nas je razširjena uporaba laktata, medtem ko uporaba radiacijske sterilizacije zakonsko ni dovoljena.

Nadomestki nitrita z antioksidativnim delovanjem so:

- natrijev askorbat,
- natrijev tripolifosfat,
- pigment CCMP,
- butiliran hidroksianizol in 2-terciarni-butilhidrokinon (30 ppm),
- askorbil acetat in askorbil palmitat,
- sintetični antioksidanti: BHT, BHA, TBHQ, PG, α -tokoferol, trihidroksibutirofenon, katehol, askorbinska kislina in njene soli, eritorbinska kislina,
- naravni antioksidanti (ekstrahirani iz dišavnic in pri uporabnikih bolje sprejeti): rožmarin (z antioksidativnimi snovmi, kot so: karnozol, rozmanol, rozmarikinon, rozmaridifenol), origano (kavna kislina, rožmarinska kislina), timijan (kurkumin), žajbelj, klinčki (evgenol, galna kislina), ingver (gingerol, zingeron), gorčica (sinapinska in parahidroksibenzojska kislina, flavoni, flavonoli),
- sekvestranti (polifosfati in etilendiamino tetraocetna kislina - EDTA) (Karas, 2008).

V kuhanem prašičjem mesu se je, kar zadeva oksidativno stabilnost in aromo, kot najboljša alternativa nitritu izkazala kombinacija sekvestrantov in drugih antioksidantov (3000 ppm Na-tripolifosfata, 550 ppm Na-askorbata in 30 ppm t-butilhidrokinona ali butiliranega hidroksianizola). Učinkovita zaščita pred oksidacijo pa je tudi kombinacija Na-askorbata, Na-tripolifosfa, Na-heksametafosfa ali Na-pirofosfata (Stevanović, 1998).

2.5 BARVILA V MESNI INDUSTRIJI

Barvila živila obarvajo ali poudarijo njihovo barvo. Vsebujejo naravne sestavine živil in sestavine naravnega izvora. Običajno jih ne zaužijemo kot živilo in jih ne uporabljamo kot tipične sestavine živila. Za barvila ne štejejo:

- posušena ali zgoščena živila in arome, dodana zaradi arome ali okusa, ki hkrati obarvajo živilo (npr. paprika, kurkuma in žafranika), in
- barvila, ki se uporabljajo za barvanje neužitnih zunanjih delov živil (npr. skorja sira, ovoji za klobase) (Pravilnik o aditivih za živila, 2010).

S Pravilnikom o aditivih za živila (2010) so v mesnih izdelkih dovoljena naslednja barvila:

- kurkumin (E 100),
- košenil, karminska kislina, karmini (E 120),
- karamel (E 150a),
- alkalijski sulfitni karamel (E 150b),
- amonijev karamel (E 150c),
- amonijev sulfitni karamel (150d),
- karoteni (E 160a),
- izvleček paprike, kapsantin, kapsorubin (E 160c),
- rdeče barvilo rdeče pese, betanin (E 162),
- rdeče E 129 (Allura Red AC),
- rdeče E 124 (Ponceau 4R, Cochineal Red A).

2.5.1 Pigment topotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP)

Pigment topotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) lahko proizvedemo iz hemoglobina krvi (Pegg in Shahidi, 1997). Ta pigment nastane z nitrozacijo hemina ali rdečih krvnih celic s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO) ob prisotnosti reducentov (Na-askorbat in vitamin E) in se lahko stabilizira z inkapsulacijo ali sušenjem (Karas, 2008). CCMP je možno izdelati iz hemina, izoliranega iz mehansko separiranega mesa tjulnjev, ki je bogat vir hemoproteinov. Tako sintetiziran CCMP so dodali različnim vrstam mesa (prašičje, goveje in tjulenje) (preglednica 9). Vrednosti L*, a* in b* se niso razlikovale od kontrolnih, tretiranih z nitritom (Stevanović, 1998).

Če za izdelavo mesnih emulzij uporabimo velik delež govejega ali kakšnega drugega mesa z relativno visoko vsebnostjo mioglobin (preglednica 3), je lahko barva dodanega

alternativnega pigmenta prekrita z naravnimi rjavimi pigmenti topotno obdelanega mesa. Do tega pride, ker je CCMP primarno barvni dodatek in ne konvertira mioglobina v pigment razsoljenega mesa (kot pri uporabi nitrita). CCMP mora prekriti barvo kuhanega nerazsoljenega mesa, da lahko končnemu izdelku zagotovi barvo razsoljenega mesa. Prav zato je CCMP primeren za izdelavo klobas oziroma izdelkov, ki vsebujejo v glavnem meso z malo mioglobina, npr. piščanče, puranje, prašičje in ribje (Stevanović, 1998; Pegg in sod., 2000).

Preglednica 3: Vsebnost skupnega hemoprotein pigmenta v posameznih vrstah in oblikah mesa in potreben dodatek pigmenta topotno obdelanega razsoljenega mesa (CCMP) z namenom doseči rožnato barvo živila (Pegg in Shahidi, 2000).

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

V celih kosih mesa (npr. v šunki) je težko doseči enakomerno porazdelitev dodanega CCMP. To je posledica le delne topnosti CCMP v vodi oziroma razsolici in kompleksne strukture mesa (oz. perimizija). Perimizij je mišična ovojnica, ki ovira transport CCMP v notranjost kosa mesa. Znanstvenikom je uspelo problem rešiti s skrbno kontrolo velikosti delcev vgrajenega pigmenta, s spremenjenim načinom vbrizgavanja razsolice, z gnetenjem kosov mesa pred in po vbrizgavanju razsolice in s kuhanjem v vodni kopeli v hermetično zaprtih vrečah (Stevanović, 1998).

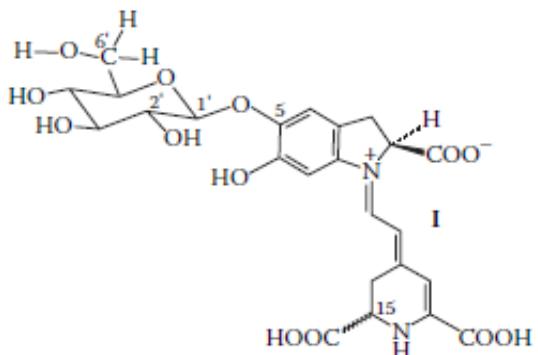
Kumperger (1997) je v diplomski nalogi ugotovil, da se pri koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz svinjine (bela vrsta mišic), razvije primeren odtenek barve pri dodatku CCMP, sintetiziranega iz 60 mg hemina, pri koagulatih iz rdečih vrst mišic pa niti dodatek CCMP, ki je bil pripravljen iz 120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

Raziskovanja številnih avtorjev so šla v smer iskanja takega dodatka, ki bi razvil približno enako barvo kot nitrit, ne bi pa imel stranskega učinka, to je tvorbe rakotvornih nitrozaminov. CCMP je nedvomno takšen dodatek.

Številne raziskave so pokazale, da ima CCMP v modelnih mesnih sistemih slabše antioksidativne lastnosti kot nitrit. 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 Barvilo rdeče pese, betanin (betacianini, betaksantini) E 162

Pigmente rdeče pese, ki jih imenujemo betalaini, lahko razdelimo v dve skupini, rdeče betacianine in rumene betaksantine. Betalaini so v vodi zelo topni. Betanin je rdeči betacianin, ki je odgovoren za 75 do 90 % barve rdeče pese. Gomolji rdeče pese so predelani v sok, ki se ga nato centrifugira, pasterizira in koncertrira. Tako pridobimo koncentrat s približno 70 % sladkorja in 0,5 % betanina. Sok rdeče pese lahko z razprševanjem posušimo in tako dobimo barvilo v obliki prahu. (Hendry in sod., 1996)



Slika 6: Strukturna formula betanina (Socaciu, 2008).

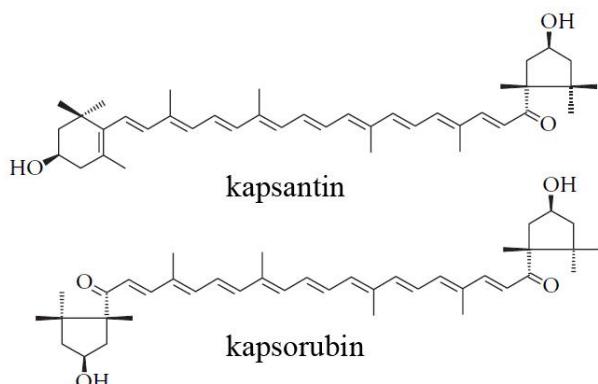
2.5.3 Angkak (fermentiran riž)

Angkak je barvilo, pridobljeno iz fermentiranega rdečega riža, ki ga preraste plesen *Monascus purpurous*. Gojijo ga na substratih, bogatih z ogljikovimi hidrati, kot so npr. riž, pšenica, koruza, krompir in soja. Po tradicionalni kitajski metodi kuhan riž inokulirajo s plesnijo rodu *Monascus* in ga 20 dni gojijo v kontroliranih pogojih. V tradicionalnih orientalskih kuhinjah ga že tisočletja uporabljajo tako za obarvanje vina, pri pripravi sojinih omak, kvašenih jedi kot tudi v medicini. Največje proizvajalke barvila so Japonska, Kitajska in Tajvan. Zaradi toksina citrinina, ki se lahko pojavi v angkaku, je njegova uporaba sporna (Socaciu, 2008).

2.5.4 Pigmenti rdeče paprike - izvleček paprike, kapsantin, kapsorubin E 160c

Kapsantin in kapsorubin sta barvili, ki dajeta papriki značilno rumenooranžno barvo. Za obarvanje živil lahko uporabljamo papriko v prahu ali oljni izvleček iz nje (oleoresin). Izvleček rdeče paprike je pridobljen z ekstrakcijo sušenih in mletih plodov rdeče paprike.

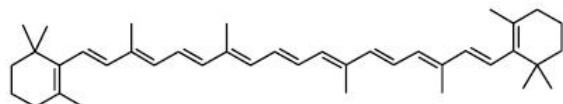
Kapsantin in kapsorubin uvrščamo med karotenoide, ki so topni v maščobah, ne pa tudi v vodi (Hendry in sod., 1996).



Slika 7: Strukturna formula kapsantina in kapsorubina (Socaciu, 2008).

2.5.5 Karoteni – mešanice ali β -karoten E 160 a

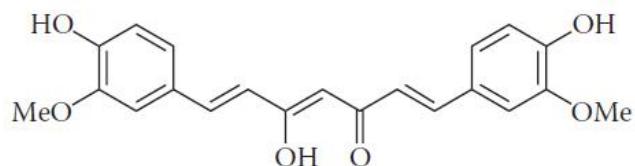
Karoteni so zelo razširjeni naravni pigmenti. Rastlinam in živalim v naravi dajejo značilno rumeno, oranžno ali rdeče barvo. Ker niso toksični, jih pogosto uporabljamo kot barvilo za obarvanje različnih živil. Topni so v maščobah. V prehrani človeka so ključnega pomena kot β -karoteni – prekurzorji vitamina A. (Hendry in sod., 1996)



Slika 8: Strukturna formula β -karotena (Socaciu, 2008).

2.5.6 Kurkumin E 100

Kurkumin je barvilo, ki ga najdemo v gomolju kurkume (*Curcuma longa*). Rastlina sodi v družino ingverjevk. Gojijo jo v Indiji, Pakistanu, Indoneziji in na Kitajskem. Zmlet gomolj uporabljamo kot začimbo, ki hrano obarva rumeno. Je netopna v vodi; topi se v maščobah. V Indiji je zelo pogosto uporabljana začimba. Pripisujejo ji blagodejne učinke na človekovo zdravje (Socaciu, 2008).

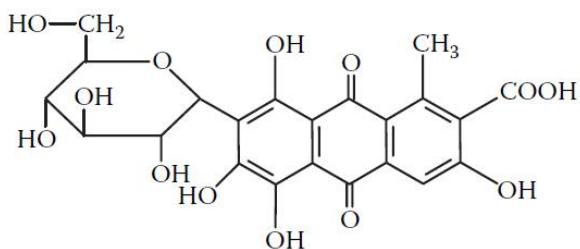


Slika 9: Strukturna formula kurkumina (Socaciu, 2008).

2.5.7 Košenil, karminska kislina, karmini E 120

Košenil je poznan kot pigment že tisočletja, saj so ga uporabljali v starem Egiptu in predkolonialni Ameriki. Uporabljali so ga za barvanje tekstila, v kozmetiki, prehrani in medicini. Košenil pridobivajo iz parazitskih žuželk košenilk (*Dactylopius coccus*). Pridobivajo ga iz žuželk ženskega spola, ki živijo na kaktusih vrst *Opuntia* in *Nopalea*. Ženske žuželke so ovalne oblike, brez kril in tehtajo približno 45 mg. Pri sušenju se njihova teža zmanjša za 70 %. Najvišjo vsebnost pigmenta (22 % suhe teže) dosežejo tik preden izležejo jajčeca. Za 1 kg košenila predelajo od 80 000 do 100 000 osebkov. Najpomembnejši pigment košenilk je karminska kislina. Karminska kislina je topna v vodi ter stabilna na svetlobi in topoti (Socaciu, 2008).

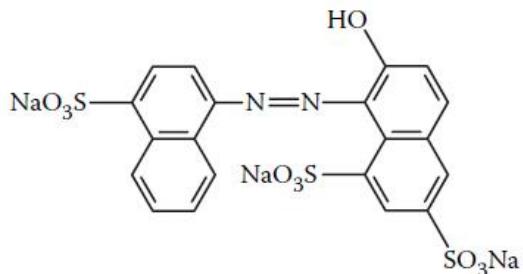
Košenil, karminska kislina in karmini so v EU odobreni kot živilska barvila (aditiv z oznako E 120). Dovoljena količina v hrani je od 50 do 500 mg/kg. Karminska kislina in karmin zaradi dobre stabilnosti in sposobnosti obarvanja veljata za dobri barvili. V EU je dovoljena uporaba derivatov košenila za obarvanje alkoholnih in brezalkoholnih pijač, kandiranega sadja in zelenjave, v slaščičarstvu in pekarstvu, v sladoledih, sirih in ostalih izdelkih. Uporaba je dovoljena tudi v določenih mesnih izdelkih, kot so klobase, salame, perutniinski izdelki in marinade. Košenil, dodan predelanemu svinjskemu mesu, obarva meso podobno, kot bi ga obarval eritrozin, le da je barva bolj stabilna (Socaciu, 2008).



Slika 10: Strukturna formula karminske kislie (Socaciu, 2008).

2.5.8 Rdeče E 124 (Ponceau 4R, Cochineal Red A)

Rdeče E 124 je sintetično azo barvilo v obliki granul ali praška. Je dobro topno v vodi in slabše v etanolu. Je jagodno rdeče barve in se lahko uporablja v različnih živilih ter je ponavadi sintetizirano iz aromatičnih ogljikovodikov. Odporno je na svetlobo, visoko temperaturo in kisline (z izjemo askorbinske kisline). Ob sprejemljivem dnevнем vnosu (0,7 mg/kg (EU) oz. 4mg/kg (WHO/FAO)) rakotvornost, genotoksičnost, nevrotoksičnost ter reproduktivna in razvojna toksičnost niso dokazane (Socaciu, 2008).



Slika 11: Strukturna formula Rdeče E 124 (Socaciu, 2008).

2.5.9 Karamel E 150 a, b, c, d

Karamel je najbolj uporabljano barvilo v živilski industriji; njegova proizvodnja predstavlja 11 % svetovnega trga z živilskimi barvili. Pridobivamo ga s segrevanjem sladkorjev v različnih pogojih. Karamel je temno rjave ali celo črne barve in ga že stoletja uporabljamo v domačih kuhinjah (kot barvilo in kot specifično aroma določenih jedi). V komercialne namene so ga v Evropi začeli proizvajati že leta 1850 (Socaciu, 2008).

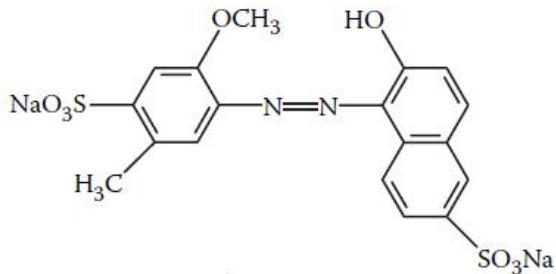
Najstarejši način pridobivanja karamela je segrevanje saharoze v odprti posodi (postopek karamelizacije). Za uporabo v živilski industriji je potrebno izboljšati določene lastnosti karamela (sposobnost obarvanja, stabilnost barvila, kompatibilnost z živilom). Industrijska proizvodnja karamela poteka ob nadzorovanem segrevanju vira sladkorjev ob prisotnosti določenih reaktantov. Reaktanti so lahko kisline, baze, soli, amonijeve soli in sulfiti - odvisno od tega, kakšne vrste karamel želimo pridobiti. Poznamo štiri razrede karamela:

- E 150a karamel
- E 150b alkalijski sulfitni karamel
- E 150c amonijev karamel
- E 150d amonijev sulfitni karamel

(Socaciu, 2008)

2.5.10 Rdeče E 129

Rdeče E 129 (Allura red AC) je sintetično azo barvilo temno rdeče barve v obliki praška ali granul, ki so topne v vodi in netopne v etanolu. Navadno je v obliki natrijeve soli; dovoljeni sta tudi kalcijeva in kalijeva sol. V ZDA so barvilo začeli uporabljati v zgodnjih osemdesetih letih kot nadomestek za amarant (E 123) (Socaciu, 2008).

**Slika 12: Strukturna formula Rdeče E 129 (Socaciu, 2008).**

2.5.11 Sodobne komercialne mešanice barvil

2.5.11.1 Vegired

Vegired je naravna mešanica barvil rdeče pese, paprike, korenja in paradižnika, ki jo lahko uporabimo kot alternativo karminu in azo barvilm. Uporabljam jo pri pripravi surovih in kuhanih klobas, salam, omak in sladic, pri čemer navajanje barvila kot aditiva v deklaracijah ni potrebno. Je v obliki praška. Ima blag okus po rdeči pesi. Namenjeno je tako toplotno obdelanim kot toplotno neobdelanim izdelkom. Priporočeno doziranje je 1 do 5g/kg izdelka (Colin, 2015).

2.5.11.2 Natural R100 in Natural R100 Plus

Natural R100 in Natural R100 Plus sta naravni barvili, pridobljeni iz rastlinskih ekstraktov. Njune značilnosti so: velika svetlobna obstojnost, obstojnost pri nizkem in visokem pH, obstojnost pri visoki temperaturi (celo pri sterilizaciji), velika učinkovitost pri nizkih koncentracijah, obstojnost na zraku. Zaradi visoke stabilnosti in dobre topnosti sta uporabni v večini mesnih izdelkov (Campus, 2015).

2.6 MERJENJE BARVE MESA IN MESNIH IZDELKOV

Barvo mesa je mogoče oceniti senzorično (subjektivno) in meriti objektivno z nekaterimi instrumentalnimi metodami. Največji problem pri merjenju barve je, da za razliko od fizikalnih prvin, kot sta dolžina ali masa, za merjenje barve ne obstaja fizikalna skala, kar merjenje zelo otežuje. Dva človeka namreč ne bosta enako opisala iste barve. Obstaja ogromno dejavnikov, ki vplivajo na percepcijo barve, kot so: starost, občutljivost očesa, razpoloženje, določena zdravila, izvor svetlobe, velikost in tekstura vzorca, elementi ozadja ... (Gašperlin, 1998). Pred merjenjem je potrebno natančno definirati pogoje merjenja, kar so že pred leti storili Cassens in sod. (1995). Iz večih različnih veljavnih načinov in postopkov merjenja barvnih lastnosti so poskusili oblikovati referenčno metodo, katere

rezultati bi bili lahko primerljivi med seboj in bi omogočili jasno in natančno komuniciranje med različnimi raziskovalnimi skupinami.

Priporočila te metode so:

- izvor vzorca naj bo opisan čim natančneje (pasma, starost, genotip, spol, pH in pogoji transporta, zakola, hlajenja in zorenja);
- vzorec ne sme biti odvzet prej kot 24 ur *post mortem* (p.m.);
- mišica mora biti natančno izbrana in poimenovana, opisan mora biti tudi položaj vzorca znotraj mišice; za preferenčno mišico predlagajo *longissimus dorsi*, sprejemljive so tudi druge mišice;
- vzorec mora biti odvzet prečno na mišična vlakna in debeline najmanj 1,5 cm;
- pri manj pigmentiranih mišicah je zaradi razmerja med debelino in prosojnostjo vzorca potrebno vzorcu izmeriti barvo na beli in črni podlagi;
- vzorci naj bodo skladiščeni pri najmanj 3 °C, zelo natančno pa je potrebno specificirati tudi pogoje skladiščenja, pakiranja in zorenja (temperatura, prisotnost svetlobe, embalažni material ...);
- pomemben dejavnik je tudi oksigenacija (cvetenje) površine vzorca. Če se ocenjuje cvetenje vzorca, potem priporočajo, da le-to poteka najmanj 1 uro pri največ 3 °C, površino pa je potrebno zaščititi pred izsuševanjem z ustrezno folijo ali pa je potrebno vzdrževati določeno vlažnost prostora;
- priporočajo, da se merjenje barve ponovi v najmanj treh ponovitvah na različnih delih eksponirane površine;
- priporočajo CIE L*, a*, b* sistem ter predhodno umeritev inštrumenta (Cassens in sod., 1995).

2.6.1 Senzorično vrednotenje barve

Z vidnim preiskovanjem (adspekcijo oz. pregledovanjem in opazovanjem hrane) zaznamo in ovrednotimo več lastnosti mesa, ki jih Bučar (1997) deli v štiri skupine:

- značilno obliko mesnih jedi, debelino in njihove napake,
- barvo površine mesnih jedi (rumena do rjava) in sredice (razni odtenki rdeče do sivorjave barve pri raznih stopnjah pečenosti) ter napake barve,
- barvo in tekočnost mesnega soka oziroma mešanice soka in masti ter
- delež posameznih sestavin mesne jedi (mišičnine, mastnine, vezivnine).

Študije so pokazale, da je človek sposoben ločiti milijon barvnih odtenkov, v spektru čistih barv, uklonjenih iz prizme, pa kvečjemu 130. Razliko nians od 130 do milijon tvorijo barvne mešanice. Ker so barve v življenju še kako pomembne, so jih vedno želeli klasificirati in opisati tako, da bo za vsakega človeka ista barva točno določena. Pri tem so naleteli na mnogo težav. Ena izmed njih je tudi ta, da isti barvni vtis, ki ga preko očesa dobijo možgani,

lahko ustvarimo na več načinov (npr. rumeno, ki je osnovna barva spektra, lahko dobimo tudi kot zmes rdeče in zelene) (Gašperlin, 1998).

Najenostavnejša in najpopolnejša senzorična metoda vrednotenja za presno in topotno obdelano meso temelji na primerjavi barve vzorca s predhodno oblikovanimi barvnimi standardi (Gašperlin in sod., 2000). Metoda temelji na določanju deležev treh osnovnih barv – črne (PB), rdeče (PR) in rumene (PY). Na vzorcih je pri tej metodi opazna sprememba deleža treh osnovnih barv, če se delež posamezne barve spremeni za 10 %. S tem načinom vrednotenja barve preskuševalci določijo tridelno karakteristično barvo vzorca, npr. PB₄₀PR₅₀PY₇₀.

2.6.2 Instrumentalno vrednotenje barve

Barva mesa je odvisna od absorpcije, razpršitve in odboja svetlobe na površini mesa, kot tudi od barve uporabljenih svetlobnih pigmentov (mioglobin). Razpršitev svetlobe je pogojena z dejavniki, kot so hrapavost površine mesa, marmoriranost in vsebnost vezivnega tkiva. Refleksija je proporcionalna s stopnjo leske – sijaja na površini (Murray, 1992).

Nekaj načinov instrumentalnega merjenja barve (Pribiš in sod., 1982):

- **merjenje s kromometrom:** 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 po principu delovanja človeškega očesa. Barvo vzorca razdeli na tri komponente, ki jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu, in poda rezultate v L*, a* in b* koordinatah (glej metodiko). Vrednost L* opisuje svetlost barve, pri čemer višje vrednosti pomenijo svetlejšo barvo vzorca in obratno. Vrednost a* določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju (rdeča barva je odvisna od prisotnosti barvila mioglobina) in zelene barve v negativnem območju (samo v primeru diskoloracij na površini mesa). Vrednost b* pa predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju (rumena barva je povezana s stopnjo oksigenacije mesnega barvila) in modre v negativnem. Tri najpomembnejše lastnosti barve so barvni odtenek (angl. hue), nasičenost ali gostota (angl. chroma) in barvna vrednost (angl. value) (Boakye in sod., 1996). Barvni odtenek (h*) opisuje vizualni občutek glede na to, kateri barvi ali razmerju dveh zaznanih barv rdeče, rumene, zelene in modre se površina izkaže podobna. Nasičenost barve opisuje intenzivnost osnovnih barv (c*), pri tem pa se mora upoštevati tudi vsebnost bele svetlobe. Barvna vrednost (L*) je pokazatelj svetlosti. Vrednost barvne razlike (E*) pa meri spremembo v treh komponentah barve: svetlost L*, rdeče-zeleno a* in rumeno-modro b*.

- **določanje barve s pomočjo spektrofotometra:** Kibelka-Munk metoda je ena od metod za ugotavljanje sprememb mioglobina v mesu in temelji na določanju razmerja med koeficientom absorpcije in koeficientom razsipanja svetlobe.
- **določanje barve mesa s fotokolorimetrom:** s fotokolorimetrom določimo osnovne značilnosti barve (spekralna in nespektralna barva ter stopnja zasičenosti) po standardnem CIE, Hunterjevem ali Munsellovem sistemu.
- **merjenje barve mesa s fotografsko metodo:** vzorec mesa se pod določenimi pogoji fotografira in absorpcijski spekter filmskega traku se analizira.
- **določanje barve mesa s primerjalno ploščo:** za vsako vrsto mesa so izdelani posebni diskki z barvnimi stekli, ki so oštrevlčena in vsako število ustrezata določeni intenzivnosti barve.
- **merjenje barve s fotometrom:** eden takih instrumentov je fotometer Fahellpho, ki deluje na principu izenačevanja barve vzorca glede na standard. Pomanjkljivost tega aparata je, da pri dolgotrajnem merjenju pride do utrujenosti oči. Boljši aparat je Gofo, kjer skozi rdeč filter prehaja snop svetlobe na vzorec, intenzivnost odbite svetlobe pa meri fotocelica.

V svetu se uporablja veliko različnih naprav in načinov za merjenje barve: Minolta kromometri (CR 200b, 300, ...), Colormet Reflectance Meter, Surface Meat Colour Meter, Retrolux III, Colormet, prototip aparata Danish Probe,...(Pribiš in sod., 1982).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 NAČRT POSKUSA

Cilj naše naloge je poiskati barvilo za mesne izdelke v primerni koncentraciji, ki ne bi vsebovalo rezidualnega nitrita in bi imelo enak barvni učinek kot nitrit. V ta namen smo v modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa, testirali barvili betalain in karmin, ki sta v uporabi v živilski industriji, in testno barvilo, ki smo ga sintetizirali v laboratoriju (CCMP – cooked cured meat pigment). Že v predposkusu smo ugotovili, da barvilo betalain ni obstojno v mesnih emulzijah, zato smo poskus izvedli samo s karminom (E120) in s CCMP, obakrat v treh koncentracijah. Aplikaciji barvil v emulzije je sledila kemijska analiza emulzij (določanje rezidualnega nitrita in osnovne kemijske sestave), instrumentalna analiza barve (kromometer Minolta, sistem $L^*a^*b^*$) in teksture (aparat TA-XT in analiza TPA – Texture Profile Analysis) teh mesnih emulzij ter statistična obdelava vseh zbranih podatkov.

3.2 SINTEZA CCMP

Pigment CCMP smo sintetizirali iz govejega hemina (kemijska formula $C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$; H9039 Sigma) s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO), reducenta (Na-askorbat) in imidazola ($C_3H_4N_2$; I2399 Sigma-Aldrich), pri čemer je bila osnova modificirana metoda, ki sta jo prva uporabila Shahidi in Pegg (1991, 1993a).

Postopek:

120 mg hemina raztopimo v 20 ml raztopine 0,04 M natrijevega karbonata (Na_2CO_3), 5 minut prepihujemo z dušikom, nato pa pustimo v temi 30 minut. V centrifugirko zatehtamo 500 mg Na-askorbata, 120 mg imidazola, 30 ml 0,2 M raztopine acetatnega pufra (amonijev acetat) s $pH = 5$ in prej pripravljeno raztopino hemina. Dobljeno raztopino dobro premešamo in nato prepihujemo 5 minut z dušikom nad raztopino ter 5 minut z NO v samo raztopino. Po prepihovanju centrifugirko zapremo z zamaškom. Nato raztopino 5 minut centrifugiramo pri 17 033 x g in 4 °C v hlajeni centrifugi Sigma 3 K30. Po centrifugiranju supernatant odlijemo, k usedlini pa dodamo 10 ml 2 % raztopine askorbinske kisline. Sledi ponovno centrifugiranje ter še dvakratno spiranje z 10 ml 2 % raztopine askorbinske kisline. Po zadnjem centrifugiranju odlijemo supernatant. K usedlini dodamo 1 ml topila (0,5 % raztopina natrijevega alginata) in dobro premešamo. Tako pridobljeni pigment CCMP uporabimo v modelnih mesnih emulzijah.

Preglednica 4: Reagenti za pripravo treh koncentracij pigmenta CCMP.

	CCMP1	CCMP2	CCMP3
Hemin	30 mg	60 mg	120 mg
Ca ₂ CO ₃ (0,04M) - 0,424g/100ml	20 ml	20 ml	20 ml
Na-askorbat	500 mg	500 mg	500 mg
Imidazol	30 mg	60 mg	120 mg
Amonijev acetat (0,2M) - 3,084g/200ml => pH=5 (ocet. k.)	30 ml	30 ml	30 ml

3.3 IZDELAVA MESNIH EMULZIJ

Mesne emulzije smo pripravljali iz piščančjih prsi, 100 % sončničnega olja in vode v obliki industrijsko pripravljenega ledenega drobirja. V mesne emulzije smo dodali še fosfatni preparat s komercialnim imenom Aroma UK (Prava aroma, d. o. o.) in askorbinsko kislino. V vse skupine – razen v kontrolno – smo dodali kuhinjsko sol. V kontrolno skupino smo dodali nitritno sol. V negativno kontrolno skupino nismo dodali barvnega aditiva. V ostalih 6 skupin mesnih emulzij pa smo dodali barvni aditiv (CCMP ali karmin).

Tako smo izdelali 8 skupin mesnih emulzij, in sicer vsako v dveh ponovitvah:

- emulzija brez nitrita in barvnega aditiva (negativna kontrola);
- emulzija z dodanim nitritom brez barvnega aditiva (kontrola);
- 3 emulzije z dodatkom CCMP (30, 60 oz. 120 mg hemina);
- 3 emulzije z dodatkom karmina (7,5, 15 oz. 30 mg karmina).

Po polnjenju emulzij v ovitke (umetne, nepropustne, premera 40 mm), barjenju in hlajenju smo opravili instrumentalno analizo reoloških lastnosti (teksture) z mnogonamenskim aparatom za merjenje teksturnih lastnosti (aparat TA-XT), analizo barve prereza emulzije s kromometrom Minolta CR 200 b, ter določili osnovno kemijsko sestavo emulzij (vsebnost vode, beljakovin, maščob in mineralov) in vsebnost rezidualnih niritov.

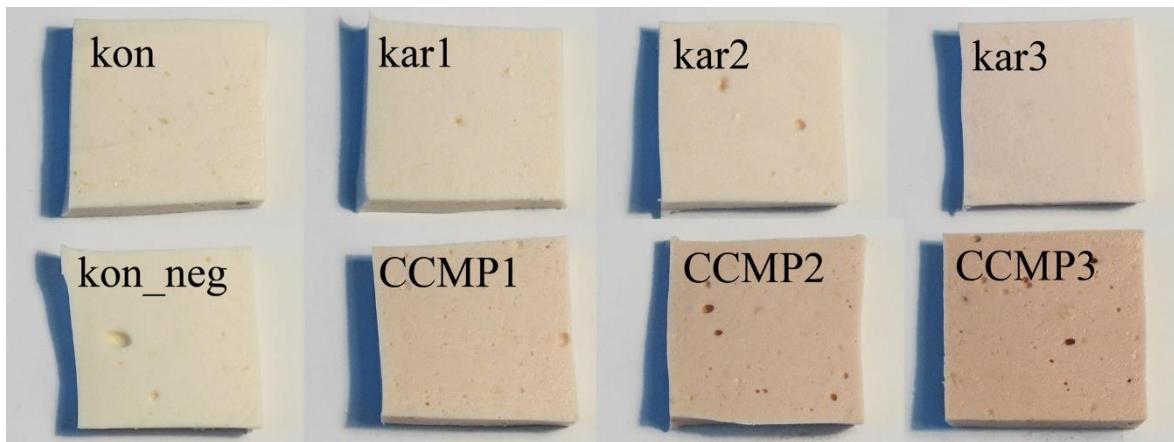
Za poskus smo zmrznjeno meso odtajali, mu izmerili temperaturo in ga zmleli v volku skozi luknjačo premera 3 mm. V vakuumski kuter Stephan UMC 5 electronic (Stephan Nahrungsmittel und Verfahrenstechnik, Nemčija) smo dodali pripravljeno zmleto meso (ohlajeno na 4 °C), sol, aditiv in ½ ledenega drobirja (preglednica 5). Kuter je deloval pri 70 % vakuumu ter vsebino razdeval pri 2400 obratih/minuto, dokler temperatura emulzije ni dosegla 2 °C. Nato smo vanjo dodali olje in glede na poskusno skupino nitrit ali CCMP (izdelan iz 30 mg, 60 mg ali 120 mg hemina) ali karmin (7,5 mg/kg, 15 mg/kg ali 30 mg/kg).

Preglednica 5: Recepture za izdelavo osmih skupin mesnih emulzij.

sestavine	razmerje (%)	kon	kon_neg	CCMP1	CCMP2	CCMP3	kar1	kar2	kar3
		masa (g)							
piščanče meso - prsa	52	780	780	780	780	780	780	780	780
100 % sončično olje	18	270	270	270	270	270	270	270	270
led	30	450	450	450	450	450	450	450	450
skupaj	100	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
fosfati (Aroma UK)	0,75	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5
kuhinjska sol	1,05	-	15,75	15,75	15,75	15,75	15,75	15,75	15,75
nitritna sol	1,05	15,75	-	-	-	-	-	-	-
askorbinska kislina	0,2	3	3	3	3	3	3	3	3
CCMP	-	-	-	30 mg*	60 mg*	120 mg*	-	-	-
karmin	-	-	-	-	-	-	7,5 ml**	15 ml**	30 ml**

kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; * mg hemina, ** ml raztopine karmina (100 mg karmina v 100 ml vode)

Sledilo je ponovno vakuumiranje na 70 % in razdevanje pri 2400 obratih/minuto. Ko se je temperatura emulzije dvignila na 11 °C, smo v emulzijo dodali preostanek ($\frac{1}{2}$) ledu. Ponovno je sledilo vakuumiranje na 70 % in razdevanje pri 3000 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 40 mm. Sledila je termična obdelava emulzij do središčne temperature 72 °C. 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.



Slika 13: Prerezi testnih mesnih emulzij.

3.4 METODE DELA

3.4.1 Določanje osnovne kemijske sestave modelne mesne emulzije

Vsebnost vode smo v emulzijah določili s sušenjem po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 950.46...(1997), vsebnost beljakovin (skupni dušik \times 6,25) po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 928.08 ... (1997), vsebnost maščobe

po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 991.36...(1997) in vsebnost skupnih mineralnih snovi po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 920.153...(1997).

3.4.2 Določanje nitrita

Vsebnost nitritov smo določili po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 973.31...(1997). Spektrofotometrična metoda je zasnovana na pojavu rdeče barve, ki nastane z reakcijo dušikove III kisline (HNO_2) z alfa-naftil-aminom in sulfanilno kislino v prisotnosti ocetne kisline.

Pripravili smo Griessov reagent I in II. Za Griessov reagent I smo raztopili 0,6 g sulfanilne kisline v malo vode, dodali 20 ml koncentrirane ocetne kisline in dopolnili z vodo do 100 ml. Za Griessov reagent II pa smo dodali 0,03 g alfa-naftil-amina v 70 ml destilirane vode, zavreli in filtrirali. V filtrat smo dodali 20 ml koncentrirane ocetne kisline in dopolnili z vodo do 100 ml ter ga do uporabe hranili v temi.

V 200 ml erlenmajerico z obrusom smo zatehtali 8 g ($\pm 0,01$ g) zmletega in homogeniziranega vzorca, dodali 5 ml nasičene borakske raztopine ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$) in okoli 150 ml vroče destilirane vode. Vse skupaj smo dobro premešali in segrevali 15 minut v vreli vodni kopeli (100 °C). Takoj za tem smo med mešanjem dodali 1 ml Carrez II raztopine (300 g cinkovega sulfata $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ v 1000 ml vode) po kapljicah, dobro ohladili, dopolnili do oznake z vodo in filtrirali. 20 ml bistrega filtrata smo odmerili v 100 ml merilno bučo ter najprej dodali 25 ml razredčenega amonijaka (1 del 25% raztopine NH_3 s 4 deli vode), nato pa še 10 ml 0,1 M HCl in dopolnili z vodo do 100 ml. V plastično kiveto smo odmerili 1,5 ml te raztopine, dodali 0,75 ml Griessovega reagenta I, in 0,75 ml Griessovega reagenta II. Po 15 minutah smo izmerili absorbanco s spektrofotometrom pri valovni dolžini 530 nm. Koncentracijo nitrita smo odčitali iz umeritvene krivulje, za korekcijo rezultata pa upoštevali dejansko zatehto vzorca.

Korekcija rezultata: $C_1 = C \times (8/m)$

C_1 = vsebnost nitrita v izdelku (mg nitrita / 1 kg izdelka)

C = vsebnost nitrita, odčitana iz umeritvene krivulje

8 = zatehta iz navodil (g)

m = dejanska zatehta (g)

3.4.3 Instrumentalno merjenje barve

Za instrumentalno analizo barve mesnih emulzij smo uporabili kromometer Minolta CR 200b. 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. 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 tako na svežem rezu kakor tudi po eno-, dvo- in triurnem skladiščenju vzorcev na sobni temperaturi (~20 °C) in temperaturi hladilnika (4 °C). Koagulat mesne emulzije smo vzdolžno prerezali in na vsaki polovici (levi in desni) na dveh mestih izmerili barvo. Kromometer je podal L^* , a^* in b^* vrednosti:

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

Izmerjene L^* -, a^* - in b^* - vrednosti smo uporabili za izračun sprememb v vrednosti barvne razlike, svetlosti, barvnem odtenku in nasičenju barve (Gašperlin in sod., 2000). Izračuni temeljijo na naslednjih enačbah:

razlika v svetlosti (SR)

$$\Delta L^* = L^*_1 - L^*_0$$

razlika v nasičenosti barve (CR)

$$\Delta c^* = (a^*_{12} + b^*_{12})^{1/2} - (a^*_{02} + b^*_{02})^{1/2},$$

pri čemer so L^*_0 , a^*_0 , b^*_0 primerjalni vzorci (z nitritom), L^*_1 , a^*_1 , b^*_1 pa testni vzorci. Svetlost meri razsipanje svetlobe in koncentracijo pigmenta, medtem ko nasičenost barve meri intenzivnost dominirajočega barvnega odtenka ali pomanjkanje sivine.

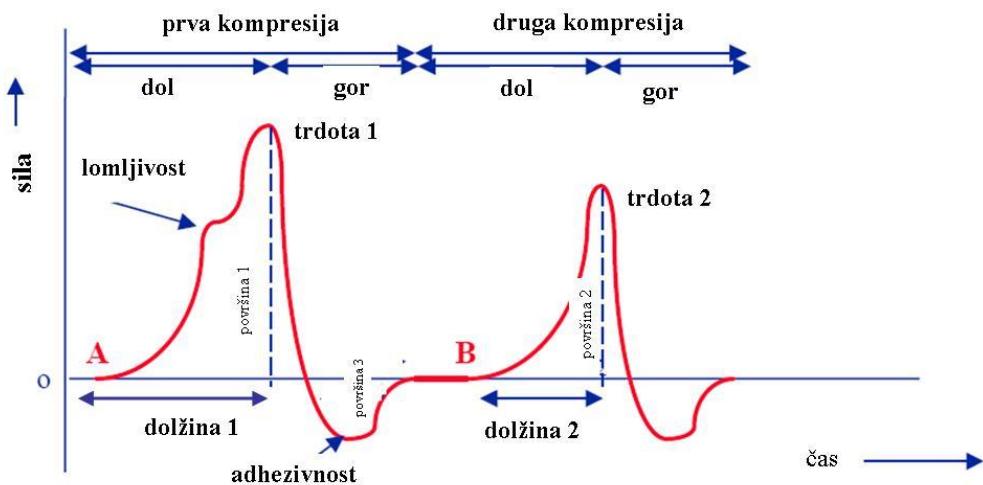
3.4.4 Instrumentalno merjenje reoloških lastnosti emulzij

Meritve reoloških lastnosti koagulatov mesnih emulzij so bile opravljene z aparatom Texture Analyser XT.plus na vzorcih koagulatov (ustreznih oblik in velikosti, odvisno od posamezne analize), ki so bili po pripravi eno uro hlajeni v hladilniku pri temperaturi 5 °C. Aparat sestavlja testni nastavek, senzibilni in mehanski element ter računalnik. V okviru reoloških analiz smo izvedli test TPA (angl. *texture profile analysis*), s katerim smo mehansko merili trdoto, adhezivnost, kohezivnost in prožnost vzorcev (Bourne, 1978; Ruiz de Huidobro in sod., 2005; Texture Analyser XT. Plus, 2010).

3.4.4.1 Test TPA (angl. texture profile analysis)

Iz vsake skupine emulzij smo pripravili štiri cilindre, visoke 40 mm in s premerom 40 mm. Uporabili smo dvojni kompresijski ciklični test, s pomočjo katerega smo z aluminijastim cilindričnim nastavkom P100 (100 mm premera) izvedli kompresijo vzorca do 50 % prvočne višine vzorca. Med prvo in drugo kompresijo vzorca je poteklo 5 sekund. Krivuljo

deformacije med časom in silo smo pridobili z aplikacijo 50 kg celice in hitrostjo glave 5 mm/s.



Slika 14: Test TPA (angl. texture profile analysis) (Texture Analyser XT. Plus, 2010).

Posamezne teksturne parametre odčitamo iz krivulj ali pa jih izračunamo po naslednjih enačbah (Texture Analyser XT. Plus, 2010):

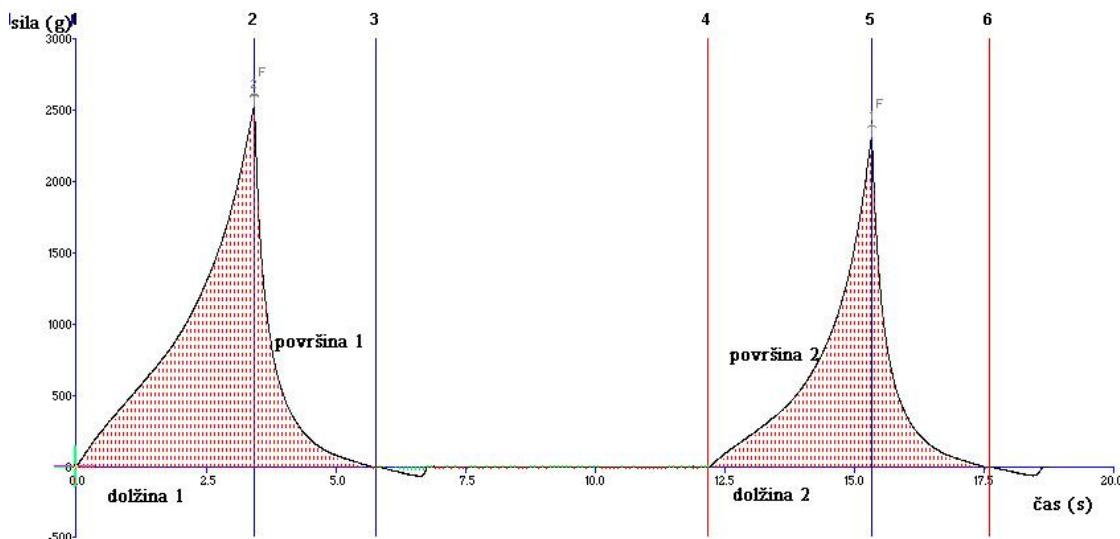
- **trdota** (angl. hardness): to vrednost (v newtonih – N) izpiše računalniški program, pomeni pa največjo silo pri prvi deformaciji vzorca (na sliki 14 oznaka trdota 1);
- **adhezivnost/oprijemnost** (angl. adhesiveness): tudi to vrednost (Ns) izpiše program in predstavlja silo, potrebno za odlepljenje vzorca od površine aparata;
- **kohezivnost** (angl. cohesiveness): izračunamo jo s pomočjo enačbe

$$\text{kohezivnost} = \frac{\text{površina 2}}{\text{površina 1}}$$

in vrednoti upor vzorca pri drugi deformaciji ter ga primerja s prvo;

- **prožnost** (angl. springiness): izračunamo jo s pomočjo enačbe
- $$\text{prožnost} = \frac{\text{dolžina 2}}{\text{dolžina 1}}$$
- in primerja dolžino kompresije pri drugi deformaciji s prvotno dolžino kompresije ter se izraža kot delež;
- **gumijavost** (angl. gumminess): je lastnost poltrdnih snovi; izračunamo jo kot
- $$\text{gumijavost} = \text{trdota} \times \text{kohezivnost}.$$
- Gumijavost se izključuje z žvečljivostjo, ki je lastnost trdnih snovi, vzorec pa ne more biti poltrd in trd hkrati;
- **žvečljivost** (angl. chewiness): je lastnost trdnih snovi (kot sta presno in toplotno obdelano meso), ki opisuje energijo, potrebno za prežvečenje trdnega vzorca do oblike, primerne za požiranje. Izračuna se kot:
- $$\text{žvečljivost} = \text{gumijavost} \times \text{prožnost}.$$

Čeprav metodo TPA raziskovalci mesa redko uporabljajo, pri raziskovalcih ostalih živil pa je zelo priljubljena, metodo uspešno uporabljajo pri vrednotenju tekture rib, za analizo tekture mesa pa raziskovalci predlagajo merjenje trdnosti, prožnosti in kohezivnosti, iz vseh treh parametrov pa se lahko izračuna žvečljivost (Ruiz de Huidobro in sod., 2005).



Slika 15: Primer krivulje, pridobljene s testom TPA, na naključno izbranem vzorcu mesne emulzije.

3.4.5 Statistična analiza

V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS, 1999). Rezultati poskusa so bili analizirani po metodi najmanjših kvadratov s postopkom GLM in LSM testom, ki ju omogoča statistični paket SAS (1999).

4 REZULTATI

4.1 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA IN REZIDUALNI NITRIT

Osnovno kemijsko analizo in vsebnost rezidualnega nitrita smo opravili na kontrolnem vzorcu modelnih mesnih emulzij, in sicer v šestih ponovitvah. Kontrolni vzorec modelne mesne emulzije je v povprečju vseboval 64,93 % vode, 12,63 % beljakovin, 21,48 % maščob, 1,83 % skupnih mineralnih snovi in 21,45 mg/kg rezidualnega nitrita. Iz preglednice 6 lahko razberemo rezultate osnovne kemijske analize in vsebnost rezidualnega nitrita modelnih mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.

Preglednica 6: Rezultati osnovne kemijske analize in rezidualnega nitrita modelnih mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.

Parameter	n	\bar{x}	min	max	so	KV (%)
Voda (%)	6	64,93	64,87	65,00	0,04	0,06
Beljakovine (%)	6	12,63	12,56	12,66	0,04	0,28
Maščobe (%)	6	21,48	20,94	21,90	0,32	1,50
Skupne mineralne snovi (%)	6	1,83	1,76	1,88	0,04	2,22
Rezidualni nitrit (mg/kg)	6	21,45	20,40	22,74	0,77	3,61

Legenda: n – meritev, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

4.2 INSTRUMENTALNA ANALIZA BARVE MESNIH EMULZIJ

Preglednica 7: Rezultati merjenja instrumentalnih vrednosti tekture modelnih mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 896).

Parameter	povprečje	min	max	so	KV (%)
L*	80,7	66,8	87,7	4,9	6,1
a*	4,9	0,5	10,7	2,6	52,7
b*	8,8	6,5	10,7	1,0	11,1

Legenda: n – število vrednotenj v poskusu, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti

Rezultati instrumentalne analize barve mesnih emulzij so prikazani v preglednici 7, testiranje razlik v instrumentalno izmerjeni barvi emulzij, izdelanih z različnimi dodatki za razvoj barve, pa v preglednicah 8 in 9.

Iz preglednice 7 je razvidno, da je imela povprečna rezina emulzije celotnega poskusa vrednost L* 88,7, vrednost a* 4,9 in vrednost b* 8,8. Koeficient variabilnosti je največji pri rdeči komponenti (vrednost a*) in znaša 52,7 %. Bistveno manjša je variabilnost barve rumene komponente (vrednost b*) in sicer 11,1 % in svetlosti (vrednost L*), ki je le 6,1 %.

Iz preglednic 8 in 9 vidimo, da uporabljeni dodatki za obarvanje statistično značilno vplivajo ($p \leq 0,0001$) na izmerjene vrednosti L^* , a* in b* na rezinah emulzij, ne glede na čas in temperaturo skladiščenja.

Preglednica 8: Vpliv dodatka različnih barvil (v različnih koncentracijah) na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost ± standardni odklon) barve rezin mesnih emulzij takoj po rezanju ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Barvilo											
t/T	vr.	kon	kon_neg	CCMP1	CCMP2	CCMP3	kar1	kar2	kar3	z.	
SR	L*	85,7±1,4 ^a	86,3±1,2 ^a	79,9±2,0 ^c	76,8±1,3 ^d	71,8±1,8 ^e	85,2±1,6 ^{ab}	84,0±1,2 ^b	82,3±1,3 ^c	***	
	a*	2,3±0,6 ^e	1,1±0,6 ^f	5,6±0,6 ^c	7,3±0,4 ^b	9,5±0,7 ^a	2,8±0,6 ^e	4,6±0,3 ^d	7,5±0,7 ^b	***	
	b*	8,8±0,4 ^b	9,3±0,5 ^a	8,2±0,1 ^c	8,2±0,2 ^c	8,2±0,1 ^c	8,6±0,4 ^b	7,8±0,4 ^d	7,0±0,3 ^e	***	
H1	L*	85,3±1,4 ^{ab}	86,1±1,1 ^a	80,1±1,6 ^d	76,5±1,4 ^e	72,0±2,5 ^f	85,4±1,4 ^{ab}	84,1±1,4 ^b	82,3±1,2 ^c	***	
	a*	2,2±0,7 ^d	1,0±0,3 ^e	5,2±0,7 ^c	6,8±0,7 ^b	8,9±1,2 ^a	2,8±0,5 ^d	4,5±0,4 ^c	7,5±0,7 ^b	***	
	b*	9,0±0,5 ^b	9,4±0,5 ^a	8,7±0,2 ^b	8,7±0,4 ^b	8,8±0,1 ^b	8,7±0,4 ^b	7,8±0,2 ^c	6,9±0,4 ^d	***	
H2	L*	84,9±0,7 ^a	85,4±0,8 ^a	79,4±1,3 ^d	76,7±1,4 ^e	71,3±1,7 ^f	84,7±0,8 ^a	83,5±0,6 ^b	81,6±0,8 ^c	***	
	a*	2,3±0,6 ^f	1,2±0,4 ^g	5,2±0,6 ^d	6,7±0,7 ^c	8,7±1,1 ^a	3,0±0,4 ^e	4,7±0,2 ^d	7,7±0,6 ^b	***	
	b*	9,0±0,5 ^b	9,6±0,4 ^a	8,9±0,2 ^b	9,0±0,5 ^b	9,0±0,4 ^b	8,8±0,5 ^b	7,9±0,3 ^c	6,9±0,3 ^d	***	
H3	L*	85,2±1,3 ^a	85,6±0,9 ^a	79,3±1,2 ^d	75,8±1,2 ^e	71,1±1,9 ^f	84,5±1,0 ^a	83,2±0,9 ^b	81,3±1,1 ^c	***	
	a*	2,1±0,8 ^e	1,2±0,3 ^f	4,8±0,7 ^c	6,4±1,0 ^b	8,4±1,4 ^a	3,0±0,4 ^d	4,7±0,3 ^c	7,8±0,7 ^a	***	
	b*	9,1±0,6 ^{bc}	9,5±0,3 ^a	9,2±0,4 ^{abc}	9,3±0,7 ^{ab}	9,3±0,5 ^{ab}	8,7±0,4 ^c	8,0±0,2 ^d	6,9±0,3 ^e	***	
S1	L*	85,5±1,4 ^a	85,4±1,3 ^a	80,4±1,4 ^d	76,8±1,7 ^e	72,1±2,3 ^f	84,8±1,1 ^{ab}	83,5±1,4 ^{bc}	82,1±1,2 ^c	***	
	a*	1,7±0,8 ^e	0,9±0,4 ^f	4,3±0,7 ^c	5,9±0,8 ^b	7,8±1,2 ^a	2,8±0,4 ^d	4,4±0,3 ^c	7,4±0,7 ^a	***	
	b*	9,5±0,5 ^{ab}	9,9±0,4 ^a	9,5±0,2 ^b	9,6±0,4 ^{ab}	9,6±0,2 ^{ab}	8,9±0,2 ^c	8,1±0,4 ^d	6,9±0,2 ^e	***	
S2	L*	85,0±0,9 ^a	85,6±1,0 ^a	80,1±0,9 ^d	76,4±1,4 ^e	71,6±1,7 ^f	84,5±0,6 ^a	83,4±1,0 ^b	81,6±0,9 ^c	***	
	a*	1,5±0,7 ^e	0,9±0,3 ^e	3,9±0,7 ^c	5,3±0,8 ^b	7,1±1,3 ^a	2,8±0,3 ^d	4,6±0,2 ^c	7,6±0,6 ^a	***	
	b*	9,7±0,4 ^a	9,7±0,2 ^a	9,8±0,3 ^a	9,9±0,4 ^a	9,9±0,2 ^a	8,8±0,3 ^b	8,0±0,2 ^c	7,1±0,3 ^d	***	
S3	L*	85,6±1,1 ^a	85,4±1,2 ^a	79,9±1,1 ^d	76,4±1,2 ^e	71,5±1,3 ^f	84,7±0,5 ^a	83,5±0,8 ^b	81,5±1,1 ^c	***	
	a*	1,4±0,7 ^f	1,0±0,4 ^f	3,7±0,7 ^d	5,0±0,9 ^c	6,7±1,3 ^b	2,8±0,3 ^e	4,6±0,2 ^c	7,6±0,6 ^a	***	
	b*	9,8±0,5 ^b	9,8±0,3 ^b	9,9±0,1 ^{ab}	10,1±0,4 ^a	10,1±0,3 ^{ab}	9,0±0,4 ^c	8,1±0,2 ^d	7,1±0,1 ^e	***	

Legenda: kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; SR - sveži rez, H1 - v hladilniku po 1 uri, H2 - v hladilniku po 2 urah, H3 - v hladilniku po 3 urah, S1 – na sobni temperaturi po 1 uri, S2 – na sobni temperaturi po 2 urah, S3 – na sobni temperaturi po 3 urah; z.: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ^{a,b,c,d,e,f,g,h} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Povzamemo lahko, da je svetlost (vrednost L^*) barve emulzij, izdelanih z nitritom ali brez nitrita, takoj po rezanju (preglednica 8) podobna ($p > 0,05$), značilno temnejše (nižja vrednost L^*) so emulzije, izdelane z dodatkom karmina (kar1, kar2 in kar3) in najtemnejše emulzije z dodatkom CCMP (CCMP1, CCMP2 in CCMP3). Tudi razlike med skupinami z dodatkom istega barvila v različnih količinah (kar1, kar2 in kar3 ter CCMP1, CCMP2 in CCMP3) so značilne in odtenki se – skladno z rastočo količino barvila – spreminjačo od svetlejšega k temnejšemu. Enaka razmerja so se ohranila tudi, ko smo svetlost merili po enomesečnem skladiščenju (preglednica 9).

Vrednost a^{*} - in s tem intenzivnost rdeče barve - je takoj po rezanju najnižja pri emulziji, izdelani brez nitrita, sledijo emulzija z nitritom, kar1, kar2, CCMP1, kar3, CCMP2 ter najbolj rdeča CCMP3 (preglednica 8). Po enomesečnem skladiščenju je vrstni red enak (preglednica 9).

Preglednica 9: Vpliv dodatka različnih barvil (v različnih koncentracijah) na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost ± standardni odklon) barve rezin mesnih emulzij, skladiščenih 1 mesec, takoj po rezanju ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Barvilo										
t/T	vr.	kon	kon_neg	CCMP1	CCMP2	CCMP3	kar1	kar2	kar3	z.
SR	L*	84,5±1,3 ^{ab}	85,2±0,7 ^a	79,1±1,2 ^d	75,3±1,6 ^e	70,4±2,1 ^f	84,4±0,8 ^{ab}	83,2±1,0 ^b	81,7±1,3 ^c	***
	a*	2,7±0,6 ^f	2,3±0,4 ^f	5,8±0,5 ^d	7,7±0,6 ^c	9,9±0,7 ^a	4,2±0,4 ^e	5,7±0,2 ^d	8,6±0,7 ^b	***
	b*	9,0±0,5 ^a	9,1±0,3 ^a	8,5±0,1 ^b	8,4±0,2 ^b	8,4±0,1 ^b	8,6±0,5 ^b	7,8±0,3 ^c	6,8±0,3 ^d	***
H1	L*	84,4±1,8 ^{ab}	84,9±1,4 ^a	79,0±1,9 ^d	74,8±1,4 ^e	70,5±2,2 ^f	84,1±1,1 ^{ab}	83,0±1,1 ^b	81,3±1,6 ^c	***
	a*	2,4±0,6 ^f	1,8±0,3 ^g	5,4±0,7 ^d	7,4±0,5 ^c	9,5±0,9 ^a	3,5±0,5 ^e	5,2±0,2 ^d	8,2±0,8 ^b	***
	b*	9,3±0,1 ^b	9,6±0,1 ^a	8,8±0,1 ^c	8,8±0,3 ^c	8,8±0,1 ^c	8,7±0,4 ^c	7,9±0,2 ^d	7,0±0,2 ^e	***
H2	L*	84,2±1,8 ^a	84,5±1,1 ^a	79,0±1,3 ^d	75,4±1,5 ^e	70,4±1,8 ^f	84,0±0,7 ^a	82,6±1,0 ^b	81,0±1,3 ^c	***
	a*	2,4±0,5 ^f	1,8±0,2 ^g	5,4±0,5 ^d	7,2±0,6 ^c	9,3±0,8 ^a	3,5±0,4 ^e	5,3±0,2 ^d	8,2±0,7 ^b	***
	b*	9,4±0,2 ^b	9,6±0,1 ^a	9,1±0,2 ^c	9,0±0,2 ^{cd}	8,9±0,1 ^{de}	8,8±0,3 ^e	7,9±0,1 ^f	6,9±0,2 ^g	***
H3	L*	84,1±2,1 ^a	84,8±1,0 ^a	79,0±1,4 ^c	75,0±1,3 ^d	70,3±2,3 ^e	83,8±0,9 ^a	83,2±1,1 ^a	81,3±1,2 ^b	***
	a*	2,4±0,5 ^f	1,8±0,3 ^f	5,3±0,6 ^d	7,0±0,7 ^c	9,1±1,1 ^a	3,5±0,4 ^e	5,2±0,2 ^d	8,1±0,7 ^b	***
	b*	9,5±0,3 ^b	9,7±0,1 ^a	9,2±0,1 ^c	9,3±0,3 ^c	9,2±0,1 ^c	8,9±0,3 ^d	8,0±0,2 ^e	7,0±0,2 ^f	***
S1	L*	84,8±1,1 ^a	84,8±1,2 ^a	79,0±1,5 ^c	75,5±1,7 ^d	70,6±2,9 ^e	83,7±1,1 ^a	83,2±0,9 ^a	81,3±1,2 ^b	***
	a*	1,8±0,5 ^e	1,4±0,2 ^e	4,9±0,2 ^c	6,5±0,1 ^b	8,0±0,9 ^a	3,3±0,4 ^d	5,1±0,4 ^c	8,0±0,7 ^a	***
	b*	9,8±0,3 ^a	9,9±0,2 ^a	9,5±0,3 ^b	9,5±0,3 ^b	9,6±0,1 ^{ab}	9,1±0,3 ^c	8,1±0,2 ^d	7,1±0,2 ^e	***
S2	L*	84,8±1,7 ^a	84,7±1,7 ^a	79,1±1,3 ^d	74,7±1,3 ^e	70,7±1,9 ^f	83,7±0,9 ^{ab}	82,5±1,4 ^{bc}	81,4±1,3 ^c	***
	a*	1,6±0,4 ^g	1,4±0,3 ^g	4,2±0,4 ^e	5,7±0,3 ^c	7,2±0,8 ^b	3,2±0,3 ^f	5,1±0,2 ^d	8,0±0,6 ^a	***
	b*	9,8±0,2 ^c	9,9±0,1 ^{bc}	10,0±0,2 ^b	10,1±0,1 ^a	10,1±0,1 ^a	8,8±0,2 ^d	8,1±0,1 ^e	7,0±0,1 ^f	***
S3	L*	84,6±1,2 ^a	84,8±1,3 ^a	79,2±1,8 ^d	75,5±1,5 ^e	70,7±2,0 ^f	83,7±1,6 ^{ab}	82,8±1,2 ^b	81,0±1,1 ^c	***
	a*	1,5±0,4 ^f	1,3±0,2 ^f	3,7±0,5 ^d	5,1±0,5 ^c	6,8±0,8 ^b	3,1±0,3 ^e	5,0±0,2 ^c	8,0±0,7 ^a	***
	b*	10,0±0,3 ^{ab}	9,9±0,1 ^{ab}	9,7±1,1 ^b	10,3±0,1 ^a	10,3±0,1 ^a	9,1±0,3 ^c	8,3±0,2 ^d	7,3±0,3 ^e	***

Legenda: kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; SR - sveži rez, H1 - v hladilniku po 1 uri, H2 - v hladilniku po 2 urah, H3 - v hladilniku po 3 urah, S1 – na sobni temperaturi po 1 uri, S2 – na sobni temperaturi po 2 urah, S3 – na sobni temperaturi po 3 urah; z.: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ^{a,b} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Vrednost b^{*} in s tem rumenost je takoj po rezanju najvišja pri emulziji, izdelani brez nitrita, sledi emulzija z nitritom, kar1, CCMP1, CCMP2, CCMP3, kar2 in kar3 (preglednica 8). Po enomesečnem skladiščenju je vrstni red enak (preglednica 9).

Preglednica 10: Razlike v instrumentalno izmerjenih parametrih (povprečna vrednost ± standardni odklon) barve sveže odrezanih rezin mesnih emulzij (izdelanih z dodatki različnih barvil) in po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

		Postopek							
Barvilo	vr.	SR	H1	H2	H3	S1	S2	S3	z.
kon	L*	85,7±1,4	85,3±1,4	84,9±0,7	85,2±1,3	85,5±1,4	85,0±0,9	85,6±1,1	nz
	a*	2,3±0,6 ^a	2,2±0,7 ^{ab}	2,3±0,6 ^{ab}	2,1±0,8 ^{abc}	1,7±0,8 ^{abc}	1,5±0,7 ^{bc}	1,4±0,7 ^c	*
	b*	8,8±0,4 ^c	9,0±0,5 ^{bc}	9,0±0,5 ^{bc}	9,1±0,6 ^{bc}	9,5±0,5 ^{ab}	9,7±0,4 ^a	9,8±0,5 ^a	***
kon_neg	L*	86,3±1,2	86,1±1,1	85,4±0,8	85,6±0,9	85,4±1,3	85,6±1,0	85,4±1,2	nz
	a*	1,1±0,6	1,0±0,3	1,2±0,4	1,2±0,3	0,9±0,4	0,9±0,3	1,0±0,4	nz
	b*	9,3±0,5 ^c	9,4±0,5 ^{bc}	9,6±0,4 ^{abc}	9,5±0,3 ^{abc}	9,9±0,4 ^a	9,7±0,2 ^{abc}	9,8±0,3 ^{ab}	nz
CCMP1	L*	79,9±2,0	80,1±1,6	79,4±1,3	79,3±1,2	80,4±1,4	80,1±0,9	79,9±1,1	nz
	a*	5,6±0,6 ^a	5,2±0,7 ^{ab}	5,2±0,6 ^{ab}	4,8±0,7 ^{bc}	4,3±0,7 ^{cd}	3,9±0,7 ^d	3,7±0,7 ^d	***
	b*	8,2±0,1 ^e	8,7±0,2 ^d	8,9±0,2 ^d	9,2±0,4 ^c	9,5±0,2 ^b	9,8±0,3 ^a	9,9±0,1 ^a	***
CCMP2	L*	76,8±1,3	76,5±1,4	76,7±1,4	75,8±1,2	76,8±1,7	76,4±1,4	76,4±1,2	nz
	a*	7,3±0,4 ^a	6,8±0,7 ^{ab}	6,7±0,7 ^{ab}	6,4±1,0 ^{bc}	5,9±0,8 ^{cd}	5,3±0,8 ^d	5,0±0,9 ^d	***
	b*	8,2±0,2 ^f	8,7±0,4 ^e	9,0±0,5 ^{de}	9,3±0,7 ^{cd}	9,6±0,4 ^{bc}	9,9±0,4 ^{ab}	10,1±0,4 ^a	***
CCMP3	L*	71,8±1,8	72,0±2,5	71,3±1,7	71,1±1,9	72,1±2,3	71,6±1,7	71,5±1,3	nz
	a*	9,5±0,7 ^a	8,9±1,2 ^{ab}	8,7±1,1 ^{ab}	8,4±1,4 ^{ab}	7,8±1,2 ^{bc}	7,1±1,3 ^c	6,7±1,3 ^c	***
	b*	8,2±0,1 ^e	8,8±0,1 ^d	9,0±0,4 ^c	9,3±0,5 ^{bc}	9,6±0,2 ^b	9,9±0,2 ^a	10,1±0,3 ^a	***
kar1	L*	85,2±1,6	85,4±1,4	84,7±0,8	84,5±1,0	84,8±1,1	84,5±0,6	84,7±0,5	nz
	a*	2,8±0,6	2,8±0,5	3,0±0,4	3,0±0,4	2,8±0,4	2,8±0,3	2,8±0,3	nz
	b*	8,6±0,4	8,7±0,4	8,8±0,5	8,7±0,4	8,9±0,2	8,8±0,3	9,0±0,4	nz
kar2	L*	84,0±1,2	84,1±1,4	83,5±0,6	83,2±0,9	83,5±1,4	83,4±1,0	83,5±0,8	nz
	a*	4,6±0,3	4,5±0,4	4,7±0,2	4,7±0,3	4,4±0,3	4,6±0,2	4,6±0,2	nz
	b*	7,8±0,4	7,8±0,2	7,9±0,3	8,0±0,2	8,1±0,4	8,0±0,2	8,1±0,2	nz
kar3	L*	82,3±1,3	82,3±1,2	81,6±0,8	81,3±1,1	82,1±1,2	81,6±0,9	81,5±1,1	nz
	a*	7,5±0,7	7,5±0,7	7,7±0,6	7,8±0,7	7,4±0,7	7,6±0,6	7,6±0,6	nz
	b*	7,0±0,3	6,9±0,4	6,9±0,3	6,9±0,3	6,9±0,2	7,1±0,3	7,1±0,1	nz

Legenda: kontrola – kontrola z nitritom, kontrola_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; SR - sveži rez, H1 - v hladilniku po 1 uri, H2 - v hladilniku po 2 urah, H3 - v hladilniku po 3 urah, S1 – na sobni temperaturi po 1 uri, S2 – na sobni temperaturi po 2 urah, S3 – na sobni temperaturi po 3 urah; z.: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Iz preglednic 10 in 11 je razvidno, da se svetlost iste emulzije (vrednost L*) pri svežem rezu ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem in pogojem hladilnika statistično ne razlikuje. Prav tako se vrednosti L* statistično ne razlikujejo po enomesečnem skladiščenju. Pri kontrolni emulziji in vseh treh emulzijah z dodanim CCMP se vrednost a* znižuje, vrednost b* pa zvišuje. Pri kontrolni emulziji brez nitrita in emulzijah z dodanim karminom

se vrednosti a* in b* statistično ne razlikujejo. Po enomesečnem skladiščenju se vrednosti a* in b* značilno razlikujejo pri skoraj vseh emulzijah (vrednost a* pada in b* raste).

Preglednica 11: Razlike v instrumentalno izmerjenih parametrih (povprečna vrednost ± standardni odklon) barve sveže odrezanih rezin mesnih emulzij (izdelanih z dodatki različnih barvil in skladiščenih 1 mesec) ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) in pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Postopek									
Barvilo	Vr.	SR	H1	H2	H3	S1	S2	S3	z.
kon	L*	84,5±1,3	84,4±1,8	84,2±1,8	84,1±2,1	84,8±1,1	84,8±1,7	84,6±1,2	nz
	a*	2,7±0,6 ^a	2,4±0,6 ^a	2,4±0,5 ^a	2,4±0,5 ^{ab}	1,8±0,5 ^{bc}	1,6±0,4 ^c	1,5±0,4 ^c	***
	b*	9,0±0,5 ^c	9,3±0,1 ^b	9,4±0,2 ^b	9,5±0,3 ^b	9,8±0,3 ^a	9,8±0,2 ^a	10,0±0,3 ^a	***
kon_neg	L*	85,2±0,7	84,9±1,4	84,5±1,1	84,8±1,0	84,8±1,2	84,7±1,7	84,8±1,3	nz
	a*	2,3±0,4 ^a	1,8±0,3 ^b	1,8±0,2 ^b	1,8±0,3 ^b	1,4±0,2 ^c	1,4±0,3 ^c	1,3±0,2 ^c	***
	b*	9,1±0,3 ^c	9,6±0,1 ^b	9,6±0,1 ^b	9,7±0,1 ^{ab}	9,9±0,2 ^a	9,9±0,1 ^a	9,9±0,1 ^a	***
CCMP1	L*	79,1±1,2	79,0±1,9	79,0±1,3	79,0±1,4	79,0±1,5	79,1±1,3	79,2±1,8	nz
	a*	5,8±0,5 ^a	5,4±0,7 ^{ab}	5,4±0,5 ^{ab}	5,3±0,6 ^{bc}	4,9±0,2 ^c	4,2±0,4 ^d	3,7±0,5 ^d	***
	b*	8,5±0,1 ^e	8,8±0,1 ^{de}	9,1±0,2 ^{cd}	9,2±0,1 ^{cd}	9,5±0,3 ^{bc}	10,0±0,2 ^a	9,7±1,1 ^{ab}	***
CCMP2	L*	75,3±1,6	74,8±1,4	75,4±1,5	75,0±1,3	75,5±1,7	74,7±1,3	75,5±1,5	nz
	a*	7,7±0,6 ^a	7,4±0,5 ^{ab}	7,2±0,6 ^{ab}	7,0±0,7 ^{bc}	6,5±0,1 ^c	5,7±0,3 ^d	5,1±0,5 ^e	***
	b*	8,4±0,2 ^e	8,8±0,3 ^d	9,0±0,2 ^c	9,3±0,3 ^b	9,5±0,3 ^b	10,1±0,1 ^a	10,3±0,1 ^a	***
CCMP3	L*	70,4±2,1	70,5±2,2	70,4±1,8	70,3±2,3	70,6±2,9	70,7±1,9	70,7±2,0	nz
	a*	9,9±0,7 ^a	9,5±0,9 ^a	9,3±0,8 ^a	9,1±1,1 ^a	8,0±0,9 ^b	7,2±0,8 ^{bc}	6,8±0,8 ^c	***
	b*	8,4±0,1 ^g	8,8±0,1 ^f	8,9±0,1 ^e	9,2±0,1 ^d	9,6±0,1 ^c	10,1±0,1 ^b	10,3±0,1 ^a	***
kar1	L*	84,4±0,8	84,1±1,1	84,0±0,7	83,8±0,9	83,7±1,1	83,7±0,9	83,7±1,6	nz
	a*	4,2±0,4 ^a	3,5±0,5 ^b	3,5±0,4 ^b	3,5±0,4 ^b	3,3±0,4 ^b	3,2±0,3 ^b	3,1±0,3 ^b	***
	b*	8,6±0,5 ^b	8,7±0,4 ^{ab}	8,8±0,3 ^{ab}	8,9±0,3 ^{ab}	9,1±0,3 ^a	8,8±0,2 ^{ab}	9,1±0,3 ^a	*
kar2	L*	83,2±1,0	83,0±1,1	82,6±1,0	83,2±1,1	83,2±0,9	82,5±1,4	82,8±1,2	nz
	a*	5,7±0,2 ^a	5,2±0,2 ^b	5,3±0,2 ^b	5,2±0,2 ^b	5,1±0,4 ^b	5,1±0,2 ^b	5,0±0,2 ^b	***
	b*	7,8±0,3 ^d	7,9±0,2 ^{cd}	7,9±0,1 ^{bc}	8,0±0,2 ^{bc}	8,1±0,2 ^{abc}	8,1±0,1 ^{ab}	8,3±0,2 ^a	**
kar3	L*	81,7±1,3	81,3±1,6	81,0±1,3	81,3±1,2	81,3±1,2	81,4±1,3	81,0±1,1	nz
	a*	8,6±0,7	8,2±0,8	8,2±0,7	8,1±0,7	8,0±0,7	8,0±0,6	8,0±0,7	nz
	b*	6,8±0,3 ^c	7,0±0,2 ^{bc}	6,9±0,2 ^{bc}	7,0±0,2 ^{bc}	7,1±0,2 ^b	7,0±0,1 ^b	7,3±0,3 ^a	**

Legenda: kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; SR - sveži rez, H1 - v hladilniku po 1 uri, H2 - v hladilniku po 2 urah, H3 - v hladilniku po 3 urah, S1 – na sobni temperaturi po 1 uri, S2 – na sobni temperaturi po 2 urah, S3 – na sobni temperaturi po 3 urah; z.: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Primerjali smo tudi vrednosti, izmerjene takoj, in vrednosti, izmerjene po enomesečnem skladiščenju. Rezultati so predstavljeni v preglednici 12 (vpliv enomesečnega skladiščenja pri svežem rezu), preglednici 13 (vpliv enomesečnega skladiščenja po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem) in preglednici 14 (vpliv enomesečnega skladiščenja po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju pogojem hladilnika).

Preglednica 12: Vpliv enomesečnega skladiščenja na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost ± standardni odklon) barve svežega reza mesnih emulzij, izdelanih z dodatki različnih barvil v različnih koncentracijah (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Skupina	vrednost	skladiščenje		z.
		takoj	1 mesec	
kon _neg	L*	86,3±1,2 ^a	85,2±0,7 ^b	*
	a*	1,1±0,6 ^b	2,3±0,4 ^a	***
	b*	9,3±0,5	9,1±0,3	nz
kon	L*	85,7±1,4	84,5±1,3	nz
	a*	2,3±0,6	2,7±0,6	nz
	b*	8,8±0,4	9,0±0,5	nz
kar3	L*	82,3±1,3	81,7±1,3	nz
	a*	7,5±0,7 ^b	8,6±0,7 ^a	**
	b*	7,0±0,3	6,8±0,3	nz
kar2	L*	84,0±1,2	83,2±1,0	nz
	a*	4,6±0,3 ^b	5,7±0,2 ^a	***
	b*	7,8±0,4	7,8±0,3	nz
kar1	L*	85,2±1,6	84,4±0,8	nz
	a*	2,8±0,6 ^b	4,2±0,4 ^a	***
	b*	8,6±0,4	8,6±0,5	nz
CCMP3	L*	71,8±1,8	70,4±2,1	nz
	a*	9,5±0,7	9,9±0,7	nz
	b*	8,2±0,1 ^b	8,4±0,1 ^a	**
CCMP2	L*	76,8±1,3	75,3±1,6	nz
	a*	7,3±0,4	7,7±0,6	nz
	b*	8,2±0,2	8,4±0,2	nz
CCMP1	L*	79,9±2,0	79,1±1,2	nz
	a*	5,6±0,6	5,8±0,5	nz
	b*	8,2±0,1 ^b	8,5±0,1 ^a	***

Legenda: kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; z.: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Pri svežem rezu (preglednica 12) smo opazili, da so bile vse emulzije z dodatkom karmina značilno bolj rdeče (dvig vrednosti a*). Značilno bolj rdeča je bila tudi emulzija brez dodatka nitrita, pri kateri smo tudi opazili znižanje vrednosti L* (svetlost). Dve emulziji z dodatkom CCMP pa sta bili bolj rumeni (dvig vrednosti b*).

Pri meritvah, ki smo jih opravili po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (preglednica 13), smo pri emulzijah kon_neg, kar1 in kar2 opazili višjo vrednost a* po enomesečnem skladiščenju, ostale meritve pa se statistično večinoma niso razlikovale.

Preglednica 13: Vpliv enomesečnega skladiščenja na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost ± standardni odklon) barve po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem (svetloba in 18 °C) mesnih emulzij, izdelanih z dodatki različnih barvil v različnih koncentracijah (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Skupina	vr.	S1		znač.		S2		znač.		S3		znač.	
		takoj	1mesec	takoj	1mesec	takoj	1mesec	takoj	1mesec	takoj	1mesec	takoj	1mesec
kon_neg	L*	85,4±1,3	84,8±1,2	nz	85,6±1,0	84,7±1,7	nz	85,4±1,2	84,8±1,3	nz			
	a*	0,9±0,4 ^b	1,4±0,2 ^a	**	0,9±0,3 ^b	1,4±0,3 ^a	**	1,0±0,4	1,3±0,2	nz			
	b*	9,9±0,4	9,9±0,2	nz	9,7±0,2	9,9±0,1	nz	9,8±0,3	9,9±0,1	nz			
kon	L*	85,5±1,4	84,8±1,1	nz	85,0±0,9	84,8±1,7	nz	85,6±1,1	84,6±1,2	nz			
	a*	1,7±0,8	1,8±0,5	nz	1,5±0,7	1,6±0,4	nz	1,4±0,7	1,5±0,4	nz			
	b*	9,5±0,5	9,8±0,3	nz	9,7±0,4	9,8±0,2	nz	9,8±0,5	10,0±0,3	nz			
kar3	L*	82,1±1,2	81,3±1,2	nz	81,6±0,9	81,4±1,3	nz	81,5±1,1	81,0±1,1	nz			
	a*	7,4±0,7	8,0±0,7	nz	7,6±0,6	8,0±0,6	nz	7,6±0,6	8,0±0,7	nz			
	b*	6,9±0,2	7,1±0,2	nz	7,1±0,3	7,0±0,1	nz	7,1±0,1	7,3±0,3	nz			
kar2	L*	83,5±1,4	83,2±0,9	nz	83,4±1,0	82,5±1,4	nz	83,5±0,8	82,8±1,2	nz			
	a*	4,4±0,3 ^b	5,1±0,4 ^a	**	4,6±0,2 ^b	5,1±0,2 ^a	***	4,6±0,2 ^b	5,0±0,2 ^a	**			
	b*	8,1±0,4	8,1±0,2	nz	8,0±0,2	8,1±0,1	nz	8,1±0,2	8,3±0,2	nz			
kar1	L*	84,8±1,1	83,7±1,1	nz	84,5±0,6	83,7±0,9	nz	84,7±0,5	83,7±1,6	nz			
	a*	2,8±0,4 ^b	3,3±0,4 ^a	*	2,8±0,3 ^b	3,2±0,3 ^a	**	2,8±0,3 ^b	3,1±0,3 ^a	*			
	b*	8,9±0,2	9,1±0,3	nz	8,8±0,3	8,8±0,2	nz	9,0±0,4	9,1±0,3	nz			
ccmp3	L*	72,1±2,3	70,6±2,9	nz	71,6±1,7	70,7±1,9	nz	71,5±1,3	70,7±2,0	nz			
	a*	7,8±1,2	8,0±0,9	nz	7,1±1,3	7,2±0,8	nz	6,7±1,3	6,8±0,8	nz			
	b*	9,6±0,2	9,6±0,1	nz	9,9±0,2 ^b	10,1±0,1 ^a	**	10,1±0,3	10,3±0,1	nz			
ccmp2	L*	76,8±1,7	75,5±1,7	nz	76,4±1,4 ^a	74,7±1,3 ^b	*	76,4±1,2	75,5±1,5	nz			
	a*	5,9±0,8	6,5±0,1	nz	5,3±0,8	5,7±0,3	nz	5,0±0,9	5,1±0,5	nz			
	b*	9,6±0,4	9,5±0,3	nz	9,9±0,4	10,1±0,1	nz	10,1±0,4	10,3±0,1	nz			
ccmp1	L*	80,4±1,4	79,0±1,5	nz	80,1±0,9	79,1±1,3	nz	79,9±1,1	79,2±1,8	nz			
	a*	4,3±0,7	4,9±0,2	nz	3,9±0,7	4,2±0,4	nz	3,7±0,7	3,7±0,5	nz			
	b*	9,5±0,2	9,5±0,3	nz	9,8±0,3	10,0±0,2	nz	9,9±0,1	9,7±1,1	nz			

Legenda: kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; S1 – na sobni temperaturi po 1 uri, S2 – na sobni temperaturi po 2 urah, S3 – na sobni temperaturi po 3 urah; z.: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Pri meritvah, ki smo jih opravili po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju pogojem hladilnika (preglednica 14), smo pri emulzijah kon_neg, kar1 in kar2 prav tako opazili višjo vrednost ^a po enomesečnem skladiščenju, ostale meritve pa se statistično večinoma niso razlikovale.

Preglednica 14: Vpliv enomesečnega skladiščenja na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost ± standardni odklon) barve po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju pogojem hladilnika (tema in 4 °C) (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Skupina	vr.	H1		z.	H2		z.	H3		z.
		takoj	1 mesec		takoj	1 mesec		takoj	1 mesec	
kon_neg	L*	86,1±1,1	84,9±1,4	nz	85,4±0,8	84,5±1,1	nz	85,6±0,9	84,8±1,0	nz
kon_neg	a*	1,0±0,3 ^b	1,8±0,3 ^a	***	1,2±0,4 ^b	1,8±0,2 ^a	**	1,2±0,3 ^b	1,8±0,3 ^a	**
kon_neg	b*	9,4±0,5	9,6±0,1	nz	9,6±0,4	9,6±0,1	nz	9,5±0,3	9,7±0,1	nz
kon	L*	85,3±1,4	84,4±1,8	nz	84,9±0,7	84,2±1,8	nz	85,2±1,3	84,1±2,1	nz
kon	a*	2,2±0,7	2,4±0,6	nz	2,3±0,6	2,4±0,5	nz	2,1±0,8	2,4±0,5	nz
kon	b*	9,0±0,5	9,3±0,1	nz	9,0±0,5	9,4±0,2	nz	9,1±0,6	9,5±0,3	nz
kar3	L*	82,3±1,2	81,3±1,6	nz	81,6±0,8	81,0±1,3	nz	81,3±1,1	81,3±1,2	nz
kar3	a*	7,5±0,7	8,2±0,8	nz	7,7±0,6	8,2±0,7	nz	7,8±0,7	8,1±0,7	nz
kar3	b*	6,9±0,4	7,0±0,2	nz	6,9±0,3	6,9±0,2	nz	6,9±0,3	7,0±0,2	nz
kar2	L*	84,1±1,4	83,0±1,1	nz	83,5±0,6 ^a	82,6±1,0 ^b	*	83,2±0,9	83,2±1,1	nz
kar2	a*	4,5±0,4 ^b	5,2±0,2 ^a	*	4,7±0,2 ^b	5,3±0,2 ^a	***	4,7±0,3 ^b	5,2±0,2 ^a	**
kar2	b*	7,8±0,2	7,9±0,2	nz	7,9±0,3	7,9±0,1	nz	8,0±0,2	8,0±0,2	nz
kar1	L*	85,4±1,4	84,1±1,1	nz	84,7±0,8	84,0±0,7	nz	84,5±1,0	83,8±0,9	nz
kar1	a*	2,8±0,5 ^b	3,5±0,5 ^a	*	3,0±0,4 ^b	3,5±0,4 ^a	**	3,0±0,4 ^b	3,5±0,4 ^a	*
kar1	b*	8,7±0,4	8,7±0,4	nz	8,8±0,5	8,8±0,3	nz	8,7±0,4	8,9±0,3	nz
ccmp3	L*	72,0±2,5	70,5±2,2	nz	71,3±1,7	70,4±1,8	nz	71,1±1,9	70,3±2,3	nz
ccmp3	a*	8,9±1,2	9,5±0,9	nz	8,7±1,1	9,3±0,8	nz	8,4±1,4	9,1±1,1	nz
ccmp3	b*	8,8±0,1	8,8±0,1	nz	9,0±0,4	8,9±0,1	nz	9,3±0,5	9,2±0,1	nz
ccmp2	L*	76,5±1,4 ^a	74,8±1,4 ^b	*	76,7±1,4	75,4±1,5	nz	75,8±1,2	75,0±1,3	nz
ccmp2	a*	6,8±0,7	7,4±0,5	nz	6,7±0,7	7,2±0,6	nz	6,4±1,0	7,0±0,7	nz
ccmp2	b*	8,7±0,4	8,8±0,3	nz	9,0±0,5	9,0±0,2	nz	9,3±0,7	9,3±0,3	nz
ccmp1	L*	80,1±1,6	79,0±1,9	nz	79,4±1,3	79,0±1,3	nz	79,3±1,2	79,0±1,4	nz
ccmp1	a*	5,2±0,7	5,4±0,7	nz	5,2±0,6	5,4±0,5	nz	4,8±0,7	5,3±0,6	nz
ccmp1	b*	8,7±0,2	8,8±0,1	nz	8,9±0,2	9,1±0,2	nz	9,2±0,4	9,2±0,1	nz

Legenda: kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; H1 - v hladilniku po 1 uri, H2 - v hladilniku po 2 urah, H3 - v hladilniku po 3 urah; z.: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

4.3 INSTRUMENTALNA ANALIZA TEKSTURE MESNIH EMULZIJ

Preglednica 15: Rezultati merjenja instrumentalnih vrednosti tekture modelnih mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 64).

Parameter	povprečje	min	max	so	KV(%)
trdota (N)	126	107	145	12	9
adhezivnost (Ns)	2,16	0,19	3,80	1,47	68
kohezivnost	0,70	0,67	0,73	0,01	1,5
prožnost	0,91	0,82	0,97	0,02	2,3
žvečljivost (N)	81	64	95	8	10

Legenda: n – število vrednotenj v poskusu, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

Rezultati instrumentalne analize teksture mesnih emulzij so prikazani v preglednici 15, vpliv dodatka različnih barvil (v različnih koncentracijah) na instrumentalno izmerjene parametre pa v preglednici 16.

Koefficient variabilnosti je bil največji (68 %) pri adhezivnosti, kar gre verjetno pripisati naravi vzorcev, saj težko zagotovimo primerno homogenost. Že manjša površinska vlagalihko bistveno vpliva na oprijemljivost vzorcev in s tem na silo, ki je potrebna za odlepitev vzorca od nastavka na aparaturi, s katero smo merili teksturne lastnosti emulzij. Pri trdoti vzorcev je koeficient variabilnost 9 %, tu je bilo opaziti tudi statistično zelo značilen vpliv dodatka za razvoj barve. Najtrši je bil kontrolni vzorec, sledili so kar1, kar2, CCMP1, CCMP3, vzorec brez nitrita, kar3 in CCMP2. Na ostale teksturne parametre dodatek barvila ni imel vpliva.

Preglednica 16: Vpliv dodatka različnih barvil (v različnih koncentracijah) na instrumentalno izmerjene parametre (povprečna vrednost ± standardni odklon) tekture mesnih emulzij (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).

Parameter					
Barvilo	trdota (N)	adhezivnost (Ns)	kohezivnost	prožnost	žvečljivost (N)
CCMP1	127±12 ^{ab}	2,32±1,6	0,70±0,02 ^a	0,90±0,03	81±11
CCMP2	121±10 ^c	2,88±1,1	0,71±0,01 ^a	0,90±0,03	78±7
CCMP3	125±13 ^{abc}	1,60±1,5	0,71±0,01 ^a	0,91±0,02	81±9
kar1	128±9 ^a	2,67±1,4	0,70±0,01 ^{ab}	0,91±0,01	82±5
kar2	127±12 ^a	2,05±1,6	0,70±0,00 ^{ab}	0,92±0,01	83±8
kar3	122±12 ^{bc}	1,59±1,6	0,70±0,01 ^{ab}	0,92±0,01	79±6
kon	129±12 ^a	2,09±1,5	0,70±0,01 ^{ab}	0,91±0,02	82±9
kon_neg	125±17 ^{abc}	2,07±1,5	0,69±0,01 ^b	0,92±0,02	80±12
z.	**	nz	*	nz	nz

Legenda: kon – kontrola z nitritom, kon_neg – kontrola brez nitrita, kar1 – dodatek karmina 7,5 mg, kar2 – dodatek karmina 15 mg, kar3 – dodatek karmina 30 mg, CCMP1 – dodatek 30 mg hemina, CCMP2 – dodatek 60 mg hemina, CCMP3 – dodatek 120 mg hemina; z.: ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c} povprečja z različno črko v indeksu se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Nitrit je aditiv, ki se ga v predelavi mesnih izdelkov uporablja že zelo dolgo. Njegove funkcije v postopku razsoljevanja so oblikovanje termostabilne barve, oblikovanje značilne arome, antimikrobnog in antioksidativno delovanje. Pri uporabi nitrita je problematično, da je toksičen in prekurzor tvorbe rakotvornih nitrozaminov.

Cilj naloge je bil poiskati barvilo za mesne izdelke, ki bi glede barve imelo enak učinek kot nitrit. V ta namen smo testirali barvilo karmin ter testno barvilo CCMP, ki smo ga sintetizirali v laboratoriju.

V modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa, smo testirali barvili karmin in CCMP v treh koncentracijah, poleg teh pa smo izdelali kontrolni emulziji z in brez nitrita. Izdelavi emulzij so sledile osnovna kemijska analiza, instrumentalna analiza merjenja barve in tekture ter statistična obdelava vseh zbranih podatkov.

Osnovno kemijsko analizo smo opravili na kontrolnem vzorcu. Po pravilniku o kakovosti mesnih izdelkov (2012) je naša emulzija presegala dovoljeno vsebnost maščobe (20%) za 1,48 %, količina beljakovin (12,63 %) pa je bila skladna s pravilnikom, ki določa najmanj 9 % vsebnost beljakovin.

Za instrumentalno analizo barve mesnih emulzij smo uporabili kromometer Minolta CR 200b. Merili smo barvo koagulatov mesnih emulzij v sistemu L^* , a^* , b . Opravili smo 896 meritev; povprečne vrednosti meritev so bile: vrednost L^* 88,7, vrednost a^* 4,9 in vrednost b^* 8,8. Koeficient variabilnosti je bil največji pri rdeči komponenti. To smo pričakovali, saj smo uporabili dodatke za obarvanje v različnih koncentracijah. Bistveno manjša je bila variabilnost rumene komponente in svetlosti, tako lahko sklepamo da imajo dodatki za obarvanje manjši vpliv na ta dva parametra.

Svetlost emulzij svežega reza je bila najvišja pri kontrolnih vzorcih, padla je pri vzorcih z dodatkom karmina, najtemnejši pa so bili vzorci z dodatkom CCMP. Znotraj skupin z istim barvilm je skladno s pričakovanji svetlost padala z višanjem koncentracije barvila. Vrednost a^* je bila najnižja pri emulziji brez nitrita, nekoliko višja pri kontrolni emulziji, še višja pri emulzijah s karminom in najvišja pri vzorcih s CCMP. Vrednost b^* in s tem rumenost je bila najvišja pri emulziji, izdelani brez nitrita, nekoliko nižja pri emulziji z nitritom, še nižja pri emulziji s CCMP ter najnižja pri vzorcih s karminom. Tudi po enomesecnem skladiščenju so se ta razmerja ohranila.

Pri svežem rezu ter po 1-, 2- in 3-urnem izpostavljanju sobnim pogojem in pogojem hladilnika se vrednosti L^* statistično niso razlikovale ne pri meritvah, opravljenih takoj, ne

po enomesečnem skladiščenju. Za vrednosti a^* in b^* pri kontrolnih vzorcih in vzorcih s CCMP je veljalo, da je bila vrednost a^* značilno nižja pri meritvah opravljenih pri sobni temperaturi, vrednost b^* pa višja, emulzije so torej postajale manj rdeče in bolj rumene. Tudi Primožič (2012) v svojem diplomskem delu ugotavlja, da hrampa v hladilniku upočasni oksidacijo barve mesnih emulzij. Izjema so bile le emulzije s karminom, pri katerih se vrednosti a^* in b^* niso statistično razlikovale takoj, po enomesečnem skladiščenju pa so tudi te postajale manj rdeče in bolj rumene. Sklepamo lahko da so emulzije s karminom bolj odporne na oksidacijo barve pri sobni temperaturi.

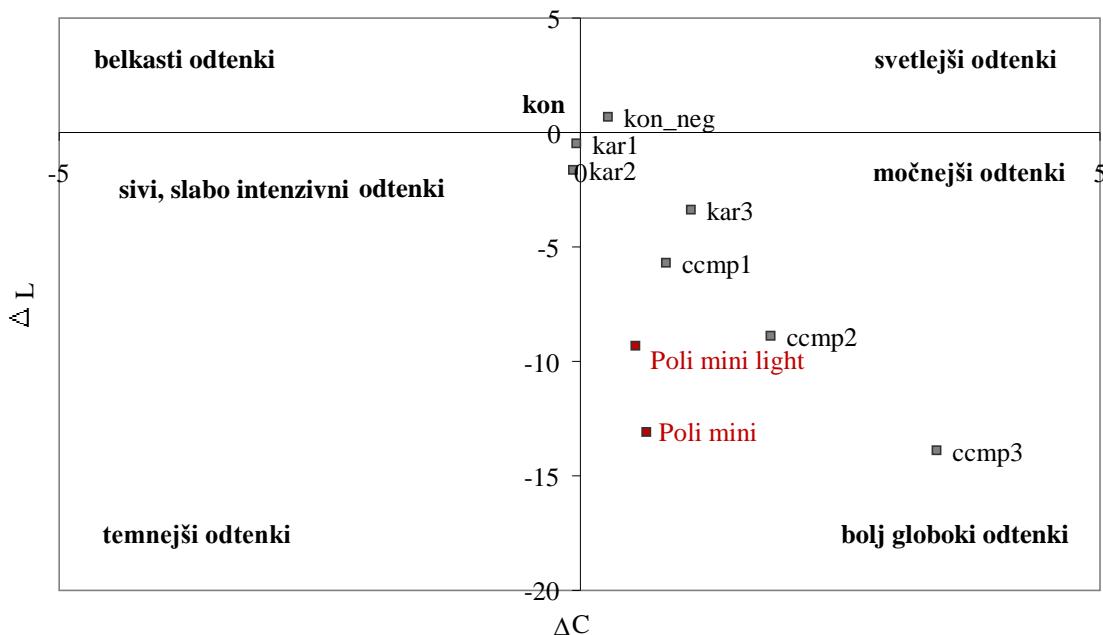
Primerjali smo tudi vrednosti, izmerjene takoj, in vrednosti, izmerjene po enomesečnem skladiščenju. Opazili smo, da so bile vse emulzije z dodatkom karmina značilno bolj rdeče po enomesečnem skladiščenju. Iz tega lahko sklepamo, da verjetno karmin potrebuje daljši čas da se popolnoma raztopi inobarva celotno emulzijo.

Stevanović (1998) je prišla do podobnih rezultatov pri emulzijah LD60 in LD120, ki so bile pripravljene iz svinjskega mesa (dolge hrbtnne mišice) z dodatkom 60 in 120 mg hemina. Te lahko primerjamo s CCMP2 in CCMP3 po svetlosti (L^*), a^* in b^* vrednostih. Kontrolni vzorci pa so bili manj rdeči (nižja vrednost a^*), ker smo uporabili meso z manj mioglobina. Če primerjamo rezultate kontrolnih vzorcev in tistih z dodanim CCMP s tistimi, ki jih navaja Brecelj (2005), lahko ugotovimo, da so bile dobljene emulzije bolj rdeče in manj rumene, kar lahko pripišemo drugačni recepturi za izdelavo emulzij. Brecelj je uporabil manj mesa in več maščobe v emulzijah, čeprav je prav tako uporabil piščančje prsi. Lojavec (2014) je v mesnih emulzijah uporabil mehansko odkoščičene hrbte piščancev in dobil precej temnejšo, bolj rdečo in rumeno kontrolno emulzijo.

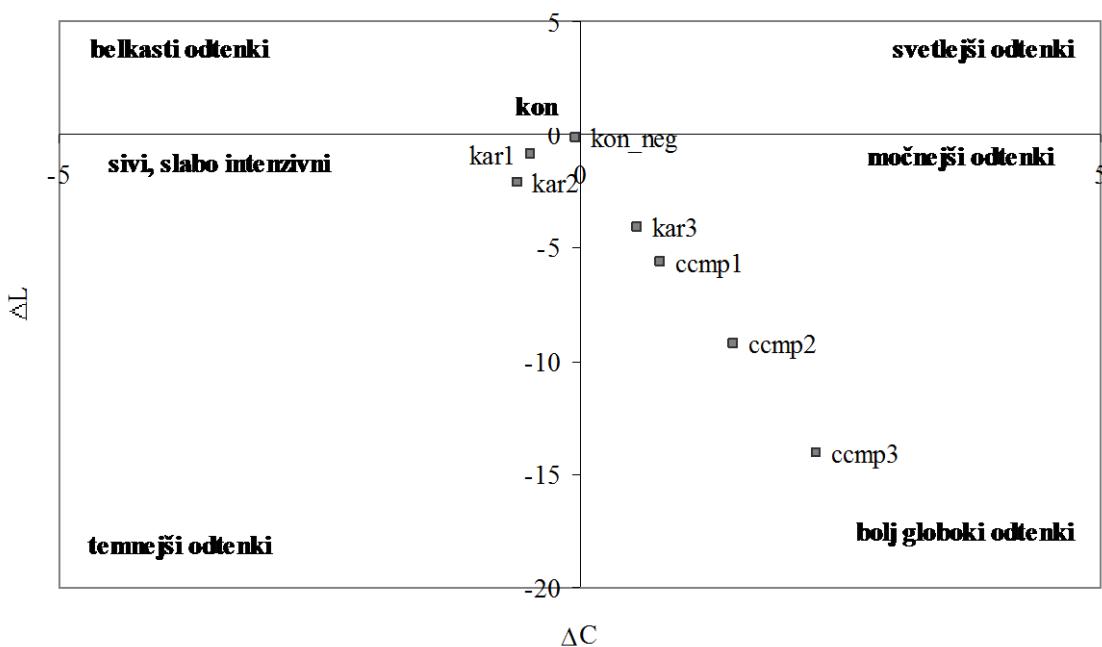
Nekatere emulzije s CCMP so bile bolj rumene po enomesečnem skladiščenju, rdeča komponenta pa je bila stabilna. Tudi Karas (2008) ugotavlja, da se svetlost (L^*) in rdeč odtenek (a^*) emulzije, pripravljene s CCMP, s skladiščenjem nista bistveno spremnjala. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da je tudi CCMP relativno dober barvni dodatek.

Sprememba svetlosti (ΔL^*) in intenzivnost barve (ΔC^*) svežega reza (glede na vzorec z nitritom) je prikazana na sliki 16. Iz slike lahko razberemo, da je bil vzorec z dodatkom 7,5 mg karmina (kar1) najbliže kontrolnemu vzorcu. Sledijo vzorci od najmanj globokega kar2, preko kar3, CCMP1, CCMP2 do CCMP3, ki je bil najbolj temen in intenziven. Po treh urah pri sobni temperaturi se ta razmerja ohranijo, kar je razvidno iz slike 17.

Slika 16 prikazuje tudi primerjavo z dvema komercialnima izdelkoma (Poli mini in Poli mini light). Ugotovimo lahko, da sta ta dva izdelka precej bliže CCMP1 in CCMP2 kot kontrolnemu. Glede na priljubljenost teh izdelkov med potrošniki lahko ugotovimo, da bi bili emulziji CCMP1 in CCMP2 prav tako primerni. Verjetno bi bilo bolje, če bi za emulzije uporabili piščančja stegna in bi bilo izhodišče (kontrolni vzorec) bližje tem komercialnim.



Slika 16: Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev mesnih emulzij, izdelanih z dodatkom različnih barvil v različnih koncentracijah, ter dveh industrijskih izdelkov, prikazana glede na vzorce z nitritom (sveži rez).



Slika 17: Povezava med spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnosti barve (ΔC^*) vzorcev mesnih emulzij, izdelanih z dodatkom različnih barvil v različnih koncentracijah, prikazana glede na vzorce z nitritom po treh urah na sobni temperaturi.

Pri analizi tekture vzorcev smo opazili statistično zelo značilen vpliv dodatka za razvoj barve na trdoto. Najtrši je bil kontrolni vzorec, sledili so kar1, kar2, CCMP1, CCMP3, vzorec brez nitrita, kar3 in CCMP2. Tudi Brecelj (2005) je v diplomskem delu ugotavljal, da so bile emulzije z dodanim CCMP manj čvrste od kontrolne emulzije z nitritom. Do enakih ugotovitev je prišla tudi Karas (2008) v svoji doktorski disertaciji. Če primerjamo kontrolni vzorec, kot ga omenja Lojevec (2014), lahko ugotovimo, da smo prišli do zelo podobnih rezultatov pri vseh teksturnih lastnostih z izjemo adhezivnosti.

Novejše študije kažejo na možnost uporabe različnih barvil, kakršna so npr. paradižnik v prahu (oz. različne surovine, ki so stranski produkt predelave paradižnika), kartamin (rdeče barvilo žafranske), ekstrakt jabutikabe (*Myrciaria cauliflora*) in oleoresin, pridobljen iz paprike.

Eyiler in Oztan (2011) ugotavljata, da so bile hrenovke, ki jim je bil dodan paradižnik v prahu, pri ocenjevalcih bolje sprejete. Hkrati ugotavljata, da je dodatek paradižnika v prahu znižal stopnjo oksidacije hrenovk. Tudi Savadkoohi in sod. (2014) v svoji raziskavi ugotavlajo, da dodatek ostankov, ki nastanejo pri predelavi paradižnika, pozitivno vpliva na sprejetost izdelka pri potrošnikih. Kim in sod. (2015) so raziskovali uporabo nitrita in pšeničnih vlaken, obarvanih z rdečim pigmentom žafranske (*Carthamus tinctorius L.*). Ugotovili so, da rdeči pigment žafranske tvori primerno barvo, znižuje oksidacijo lipidov, zaradi dodanih pšeničnih vlaken pa povečuje izkoristek pri proizvodnji klobas. S to tehniko barvanja lahko zmanjšamo količino rezidualnega nitrita in povečamo količino prehranskih vlaknin v izdelku. Baldin in sod. (2016) so ugotavliali, če dodatek ekstrakta jabutikabe k svežim klobasam deluje antimikrobnno in antioksidativno. Rezultati so pokazali, da je senzorično sprejemljiv 2 % dodatek omenjenega barvila, ki deluje antimikrobnno in kot antioksidant. Yusop in sod. (2012) so raziskovali uporabo barvila oleoresin, pridobljenega iz paprike. Ugotovili so, kako barvilo vpliva na fizikalne in senzorične lastnosti kuhanega mariniranega piščanca. Rezultati so pokazali, da dodatek oleoresina pozitivno vpliva na intenzivnost barve mariniranega mesa (tako na površini kot v notranjosti).

Uporaba naravnih barvil v mesnih izdelkih z namenom zamenjave nitrita se zdi smiselna in sprejemljiva, sporna pa je, v primeru da z barvili sušamo prikriti kakšno napako ali vsebino mesnih izdelkov.

Karmin in CCMP sta lahko primerna dodatka za razvoj barve, vendar pa nitrit zaradi njegove multifunkcionalne vloge v proizvodnji mesnih izdelkov težko popolnoma nadomestita. Na trgu se pojavljajo različne naravne mešanice barvil za obarvanje mesnih izdelkov. Takšni mešanici sta npr. Vegired in Natural R100, ki lahko uspešno nadomestita sintetična barvila. V zadnjih letih potekajo številne raziskave v smeri iskanja naravnih barvil, še posebej takih, ki bi prevzela še kakšno drugo funkcijo nitrita, kakršni sta npr. njegovo antimikrobnno in antioksidativno delovanje.

5.2 SKLEPI

- Testne mesne emulzije iz piščančjih prsi z dodatkom karmina in CCMP v različnih koncentracijah se statistično značilno razlikujejo v instrumentalno izmerjenih barvnih parametrih L^* , a^* in b^* glede na čas in temperaturo skladiščenja;
- Rezine mesnih emulzij s CCMP, ki so bile do 3 ure izpostavljene sobni temperaturi in temperaturi hladilnika, so s časom postajale manj rdeče in bolj rumene. Rezine z dodatkom karmina se pri istih pogojih takoj niso spreminjaile, po enomesečnem skladiščenju pa so prav tako postajale manj rdeče in bolj rumene (nižja vrednost a^* in višja b^*);
- Po enomesečnem skladiščenju so bile vse emulzije z dodatkom karmina značilno bolj rdeče. Pri emulzijah s CCMP se po enomesečnem skladiščenju svetlost (L^*) in rdeč odtenek (a^*) nista bistveno spreminjała;
- Glede na spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnost barve (ΔC^*) svežega reza lahko trdimo, da je bil vzorec z dodatkom 7,5 mg karmina najbliže kontrolnemu vzorcu. V primerjavi s komercialnimi izdelki sta vzorca s CCMP1 in CCMP2 prav tako primerna.
- Dodatek za razvoj barve statistično značilno vpliva na trdoto in kohezivnost - instrumentalno izmerjena teksturna parametra. Emulzije z dodatkom barvil so manj trdne.

6 POVZETEK

Raziskovalci že dalj časa skušajo odkriti spojino, ki bi bila popolna alternativa nitritu, hkrati pa ne bi predstavljala tveganja za zdravje. Povod za iskanje alternativ nitritu so bili potencialno škodljivi učinki le-tega (predvsem tvorba nitrozaminov). Ker ima nitrit v proizvodnji mesnih izdelkov več funkcij, je popoln nadomestek težko najti, možnost, da bi vse njegove funkcije nadomestila ena sama spojina, pa je zelo majhna. Nadomestek za nitrit bi tako moral imeti antimikrobní učinek (na bakterijo *Clostridium botulinum*), vlogo pri nastanku značilne termostabilne barve razsoljenega mesa (rožnatordeča), antioksidativni učinek, ki prepreči nastanek slabe arome, ter vlogo pri oblikovanju arome in tekture razsoljenega mesa (Young in West, 2001).

Cilj naloge je bil poiskati barvilo za mesne izdelke, ki ne bi vsebovalo rezidualnega nitrita in bi glede barve imelo enak učinek kot nitrit. V ta namen smo v modelnih koagulatih mesnih emulzij, pripravljenih iz piščančjega mesa, testirali barvili betalain in karmin, ki sta v uporabi v živilski industriji, in testno barvilo, ki smo ga sintetizirali v laboratoriju (CCMP – cooked cured meat pigment). Že v predposkusu smo izločili barvilo betalain, ker ni bilo obstojno pri temperaturi 80 °C. Mesne emulzije smo pripravljali iz piščančjih prsi, 100 % sončničnega olja in vode v obliki industrijsko pripravljenega ledenega drobirja. V mesne emulzije smo dodali še fosfatni preparat in askorbinsko kislino. V vse skupine – razen v kontrolno – smo dodali kuhinjsko sol. V kontrolno skupino smo dodali nitritno sol. V negativno kontrolno skupino nismo dodali barvnega aditiva. Pripravili smo še 3 emulzije z dodatkom CCMP (30, 60 oz. 120 mg hemina) in 3 emulzije z dodatkom karmina (7,5, 15 oz. 30 mg karmina). Tako smo izdelali 8 skupin mesnih emulzij, in sicer vsako v dveh ponovitvah. Pigment CCMP smo sintetizirali iz govejega hemina (kemijska formula $C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$) s pomočjo nitrozirnega sredstva (NO), reducenta (Na-askorbat) in imidazola ($C_3H_4N_2$).

Po polnjenju emulzij v ovitke (umetne, nepropustne, premera 40 mm), barjenju in hlajenju je sledila kemijska analiza emulzij (določanje rezidualnega nitrita in osnovne kemijske sestave), instrumentalna analiza barve (kromometer Minolta, sistem $L^*a^*b^*$) in tekture (aparat TA-XT.plus in analiza TPA – Texture Profile Analysis) mesnih emulzij ter statistična obdelava vseh zbranih podatkov.

Testne mesne emulzije z dodatkom karmina in CCMP v različnih koncentracijah se statistično značilno razlikujejo v instrumentalno izmerjenih barvnih parametrih L^* , a^* in b^* , ne glede na čas in temperaturo skladiščenja. Rezine mesnih emulzij s CCMP, ki so bile izpostavljene sobni temperaturi in temperaturi hladilnika, so s časom postajale manj rdeče in bolj rumene. Rezine z dodatkom karmina se pri istih pogojih takoj niso spremnjale, po enomesečnem skladiščenju pa so prav tako postajale manj rdeče in bolj rumene (nižja vrednost a^* in višja b^*). Po enomesečnem skladiščenju so bile vse emulzije z dodatkom

karmina značilno bolj rdeče. Pri emulzijah s CCMP se po enomesečnem skladiščenju svetlost (L^*) in rdeč odtenek (a^*) nista bistveno spreminja. Glede na spremembo svetlosti (ΔL^*) in intenzivnost barve (ΔC^*) svežega reza lahko trdimo, da je bil vzorec z dodatkom 7,5 mg karmina najbliže kontrolnemu vzorcu. V primerjavi s komercialnimi izdelki sta vzorca s CCMP1 in CCMP2 prav tako primerna.

Dodatek za razvoj barve statistično značilno vpliva na trdoto in kohezivnost - instrumentalno izmerjena teksturna parametra. Emulzije z dodatkom barvil so manj trdne.

Karmin in CCMP sta lahko primerena dodatka za razvoj barve, vendar pa nitrit zaradi njegove multifunkcionalne vloge v proizvodnji mesnih izdelkov težko popolnoma nadomestita. V zadnjih letih potekajo številne raziskave v smeri iskanja naravnih barvil, še posebej takih, ki bi prevzela še kakšno drugo funkcijo nitrita, kakršni sta npr. njegovo antimikrobnino in antioksidativno delovanje.

7 VIRI

- AOAC Official Method 920.153. Ash of meat. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Washington, AOAC International: chapter 39: 4-4
- AOAC Official Method 928.08. Nitrogen in meat Kjeldahl method. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Washington, AOAC International: chapter 39: 5-6
- AOAC Official Method 950.46. Moisture in meat. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Washington, AOAC International: chapter 39: 1-2
- AOAC Official Method 973.31. Nitrites in cured meat. Colorimetric Method. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Washington, AOAC International: chapter 39: 6
- AOAC Official Method 991.36. Fat (Crude) in meat and meat product. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Washington, AOAC International: chapter 39: 3-4
- 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
- Baldin J.C., Michelin E.C., Polizer Y.J., Rodrigues I., Seraphin de Godoy S.H., Fregonesi R.P., Pires M.A., Carvalho L.T., Fávaro-Trindade C.S., Gonçalves de Lima C., Fernandes A.M., Trindade M.A. 2016. Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. *Meat Science*, 118: 15–21
- Boakye K., Mittal G. S. 1996. Changes in colour of beef *m. longissimus dorsi* muscle during ageing. *Meat Science*, 42, 3: 347-354
- Böhmer L. Hildebrandt G. 1996. Mikrobiologie der Kochpöckelwaren. V: Fleisch und Fleischerzeugnisse. Weber H. (ed.). Hamburg, Behr's Verlag: 249-283
- Brecelj R. 2005. Kakovost koagulatov mesnih emulzij iz piščančjega mesa z dodanim CCMP. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 85 str.
- Bourne M. C. 1978. Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62-66
- Bučar F. 1997. Meso – poznavanje in priprava. Ljubljana, Kmečki glas: 266 str.
- 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.

Campus. 2015. Natural R100 and Natural R100 plus. Collecchio, Campus Srl: 1 str.

<http://campus-italy.com/naturalcolouring.htm> (maj, 2015)

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. Recomendation 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

Colin. 2015. Vegired. Mittelhausen, Colin Ingrédients: 1 str.

<http://www.colin-ingredients.com/en/vegired-stab> (maj, 2015)

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

Đorđević 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

Eyiler E., Oztan A. 2011. Production of frankfurters with tomato powder as a natural additive. LWT - Food Science and Technology, 44: 307-311

Filipič, M. 2006. Genotoksične komponente hrane. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana 9. in 10. november 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61-72

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.

Gašperlin L., Polak T. 2010. Tehnologije mesa in mesnin I : drugi učbenik za študente univerzitetnega študija Živilstvo in prehrana pri vajah predmeta Tehnologije mesa in mesnin I. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71 str. http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Tehnologije_mesa_in_mesnin_I.pdf. (maj, 2016)

Gašperlin L., Rajar A. 2005. Tehnologija mesnin: Zbirka vaj za predmet Tehnologija mesnin. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 86-86

Gašperlin L., Žlender B., Abram V. 2000. Colour of normal and high pH beef heated to different temperatures as related to oxygenation. Meat Science, 54, 391-398

Hamm R. 1975. Muskelfarbstoff und Fleischfarbe. Die Fleischwirtschaft, 55, 10: 1415-1418

- Hendry G.A.F., Houghton J.D. 1996. Natural food colorants. 2nd ed. Glasgow, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall: 348 str.
- 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
- IPCS INCHEM. 2008. Nitrate and nitrite. WHO Food Additives Series; 50. Hamilton, International Programme on Chemical Safety and the Canadian Centre for Occupational Health and Safety: 13 str.
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je07.htm> (julij, 2016)
- Jaegerstad M., Skog K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574, 1: 156-172
- Karas R. 2008. Stabilnost alternativnega pigmenta razsoljenega mesa in njegova primernost za koagulate mesnih emulzij. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 140 str.
- Kim H., Hwang K., Song D., Kim Y., Ham Y., Lim Y., Jeong T., Choi Y., Kim C. 2015. Wheat fiber colored with a safflower (*Carthamus tinctorius L.*) red pigment as a natural colorant and antioxidant in cooked sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 64: 350-355
- Kumperger U. 1997. Vpliv vrste mišice in dodatka pigmenta CCMP na kakovost koagulatov mesnih emulzij. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Lawrie R. A. 1979. Meat science. 3rd ed. Oxford, London, Pergamon Press: 300-314
- Lojevec I. 2014. Vpliv različnih hidrokoloidov na teksturne lastnosti mesne emulzije. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 50 str.
- Murray A. C. 1992. Measurement of pork colour. Lacombe, Lacombe Research Highlights: 33-35
- 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.
- Potthast K. 1987. Fleischfarbe, Farbstabilität und Umrötung. *Fleischwirtschaft*, 67, 1: 50-55
- Pravilnik o aditivih za živila. 2010. Uradni list Republike Slovenije, 20, 100: 15516-15612
- Pravilnik o kakovosti mesnih izdelkov. 2012. Uradni list Republike Slovenije, 22, 59: 6097-6105

- Pribiš V., Rede R. 1982. O boji mesa – nosioci boje mesa. *Tehnologija mesa*, 23, 2: 34-39
- Primožič M. 2012. Sprejemljivost mesne emulzije z manj soli in natrija. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 57 str.
- 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 of residual nitrite. *Industria Conserve*, 74, 1: 11-22
- Rahelić S., Joksimović J., Bučar F. 1980. *Tehnologija prerađe mesa (Tehnologija mesa II)*. Novi Sad, Tehnološki fakultet: 413 str.
- Rajar A., Gašperlin L., Žlender B. 2006. Karcinogene komponente v predelanih in topotno obdelanih živilih. V: *Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih*. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana 9. in 10. november 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 89-101
- 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
- Ruiz de Huidobro F., Miguel E., Blázquez B., Onega E. 2005. A comparison between two methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Science*, 69, 3: 527-536
- SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software
- Savadkoohi S., Hoogenkamp H., Shamsi K., Farahnaky A. 2014. Color, sensory and textural attributes of beef frankfurter, beef ham and meat-free sausage containing tomato pomace. *Meat Science*, 97: 410–418
- Shahidi F. 1991. Developing alternative meat – curing systems. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 9: 219-222
- 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. 1993a. Process for preparing a powdered cooked cured-meat pigment. United States Patent US 5 230 915: 46 str.
- Shahidi F., Pegg R. B. 1993b. Nitrite – free meat: safety and sensory considerations in developing nitrite alternatives for meat curing. *Meat Focus International*, 2, 9: 407-414
- 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

- Skvarča M. 1992. Instrumentalni in senzorični parametri razsoljenega govejega mesa. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 124 str.
- Smulders F. J. M., Toldra F., Flores J., Prieto M. 1992. Discussion with the autors – 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
- Socaciu C., 2008. Food colorants: chemical and functional properties Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group: 633 str.
- Sofos J. N., Raharjo S. 1995. Curing agents. V: Food additive toxicology. Maga J. A., Tu A.T. (eds.) New York, Marcel Dekker: 235-267
- Stevanović M. 1998. Alternativni pigment razsoljenega mesa v modelnih koagulatih mesnih emulzij. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 105 str.
- Texture Analyser XT. Plus, 2010. Hamilton, Texture Technologies Corp: 24 str.
<http://texturetechnologies.com/texture-profile-analysis/texture-profile-analysis.php>
(april, 2015)
- 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
- 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. 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
- Wogan G.N., Tannenbaum S.R. 1975. Environmental *N*-nitroso compounds: implications for public health. Toxicology and Applied Pharmacology, 31: 375 383.
- Young O.A., West J. 2001. Meat color. V: Meat science and applications. Hui Y. H., Wai-Kit N., Rogers R. W., Young O. A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 39-66

Yusop S. M., O'Sullivan M. G., Preuß M., Weber H., Kerry J. F., Kerry J. P. 2012.
Assessment of nanoparticle paprika oleoresin on marinating performance and sensory
acceptance of poultry meat. *LWT - Food Science and Technology*, 46: 349-355

ZAHVALA

Mentorju doc. dr. Tomažu Polaku se zahvaljujem za strokovno vodenje in usmerjanje pri izvedbi diplome - tako pri izvedbi poskusa kot pri nastajanju pisnega izdelka. Zahvaljujem se tudi vsem s katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, ki so kakorkoli pripomogli k izvedbi te diplome.

Zahvala recenzentu prof. dr. Blažu Cigiću za strokovni pregled diplome.

Zahvala tudi Barbari Slemenik za hiter in skrben tehnični pregled ter popoldanske ure, ki jih je namenila tej diplomi.

Zahvaljujem se Vlasti za vso pomoč in čas, ki ju je namenila moji diplomi, predvsem pa za dolgoletno spodbujanje, ki je pripeljalo do tega izdelka.

Na koncu pa še posebna zahvala mami in očetu, ki sta vsa ta leta čakala na ta dan in se nista vdala.