СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ПО КРИОБИОЛОГИЯ И ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ
София 1407, бул. "Черни връх" № 53, тел: 02/ 8681363, e-mail: director@ikht.bg, www.ikht.bg

ПЕПА ЖИВКОВА НАЦАРИДУ

„ИНОВАТИВНА ТЕХНОЛОГИЯ ЗА ПРЕРАБОТКА НА МЕСО И МЕСНИ ПРОДУКТИ“

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”



Научна област 5. Технически науки,

с професионално направление, 5.12. Хранителни технологии

Научна специалност „Технология на месните и рибни продукти“

гр. София, 2023

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от заседание на Разширен научен съвет към отдел „Отдел „Хранителни технологии“ Институт по криобиология и хранителни технологии, София, проведен на 15.06.2023г. Разработката включва разделите: увод, литературен обзор, материали и методи, резултати и обсъждане, обобщени изводи, литература, общо 117 страници. Цитирани са литературни източници (5 на кирилица и 175 на латиница). В дисертацията са включени 29 таблици и 29 фигури.

Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ПО КРИОБИОЛОГИЯ И ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ
София 1407, бул. "Черни връх" № 53, тел: 02/ 8681363, e-mail: director@ikht.bg, www.ikht.bg

ПЕПА ЖИВКОВА НАЦАРИДУ

„ИНОВАТИВНА ТЕХНОЛОГИЯ ЗА ПРЕРАБОТКА НА МЕСО И МЕСНИ ПРОДУКТИ“

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Научна област 5. Технически науки,
с професионално направление, 5.12. Хранителни технологии
Научна специалност „Технология на месните продукти и рибата“

Научен ръководител:
доц. д-р Даниела Петкова Митева-Гюрова

София, 2023 г.

ВЪВЕДЕНИЕ

Визията на ФАО е "Свят без глад и недохранване, където храната и земеделието по екологично устойчив начин допринасят за подобряване на жизнения стандарт в икономически и социален план на всички, особено на най – бедните" (Term Plan 2018-21). За съвременното общество месото, като храна е един от основните източници за изхранване на населението. По данни на ООН и Световната здравна организация населението на земята страда от недостатъчен прием на пълноценни белтъчини в храната.

Започналата в последните години тенденция за здравословно хранене, сега придоби още по - голям смисъл, като храните трябва да са с удължен срок на годност, поради затрудненията с доставките, но с подобрени качества. Консуматорите се насочват към вегетарианството и приемат месото, като носител на токсични добавки и наситени мазнини, което го прави вредно без да се отчита наличието на незаменими аминокиселини в него. Затова пълната му замяна с протеини от растителен произход, може да провокира здравословни проблеми. Хранителната тенденция на бъдещето е насочена към по-осъзната и отговорна консумация на малко количество месо, но с много високо качество. Месото е необходима част от пълноценното хранене на населението, вниманието на учени и технолози се насочи към изследвания за замяна на: синтетични добавки с натурални източници на антиоксиданти и на традиционните технологии на преработка с нови по- щадящи и запазващи качеството на месото и месните продукти.

Добавките са неизменна част от месо преработката. Тяхната употреба има за цел постигане на характерен вкус и аромат, но също така на предотвратяване или забавяне оксидационните промени и подобряване цялостното качество на месните продукти. Много от технологичните етапи на преработка, съпровождащи производството на месни продукти, могат да доведат до образуване на съединения с токсичен и канцерогенен ефект в месото. Затова най-важните приоритети за месопреработвателната промишленост е разработване и прилагане на иновационни технологии, позволяващи производството на висококачествени и безопасни месни продукти. Използването на натурални добавки с доказан антиоксидантен и антимикробен ефект в съчетание с алтернативни технологии има за цел, получаване на безопасни за здравето на консуматорите месни продукти с удължен срок на годност, които се характеризират се с висока хранителна стойност, биологична ценност и оказват благоприятно въздействие върху човешкото здраве. Чрез консумирането на висококачествена месна храна потребителите могат да се насладят на естествена, безопасна, устойчива, привлекателна и апетитна храна, която в същото време играе профилактична и превантивна роля спрямо различни заболявания.

Нарастващото търсене на минимално преработени храни със запазени вкусови и хранителни характеристики, удължен срок на съхранение и гарантирана микробиална безопасност тласнаха хранително-вкусовата промишленост да търси нови методи и подходи за обработка на храните (Considine et al., 2008). HPP се оказва обещаваща технология с възможност за индустриално приложение в месната промишленост. При нея без промяна на качествените характеристики в комбинация с естествени

антиоксиданти и антимикробни вещества се постига удължаване на срока на годност на така обработените месни продукти и се гарантира тяхната безопасност. Обработката под високо налягане или студена пастьоризация за разлика от конвенционални процеси на обработка не зависи от размера и формата на продукта, което намалява времето за подготовка.

Гамата от преработени хранителни продукти под високо налягане, налични на международния пазар показва бъдещия потенциал на тази технология. Необходими са задълбочени научни изследвания по отношение на ползите от прилагането на HPP технология в хранителната промишленост, за да бъде установен режим на обработка и разбран пълния капацитет на технологията и дали същата може да се прилага масово с търговска цел. Унищожаването на микроорганизми и инактивирането на ензими при ниски или умерени температури без промяна на органолептичните и хранителните свойства показва, че HPP технологията има възможност да бъде използвана в разработване на ново поколение храни с добавена стойност. HPP няма вероятност да замени традиционните методи на обработка, но може да ги допълва или да намира нишови приложения. Комбинацията от HPP с други опции за обработка като топлина, гама-облъчване, ултразвук и др., може да позволи HPP да се интегрира с други процеси като бланширане, дехидратация, осмотична дехидратация, рехидратация, пържене, екстракция, желиране, замразяване и размразяване. Високите капиталови разходи може да ограничат първоначалното му приложение, което се компенсира с по-ниски оперативни разходи. Развитието на технологията и нейната комерсиализация ще доведе до понижаване цената на оборудването и широко разпространение на безвредни и на достъпна цена, хранителни продукти обработвани чрез HPP.

I. ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

1.1. Критичен преглед на съществуващите технологии за консервиране на месо.

- Съществуващите технологии за консервиране на месо, като термична обработка, микровълново нагряване, ниско термична обработка, нетермични технологии, контролиране на водната активност чрез добавяне на осоляващи вещества, химични методи могат да бъдат ефективни, но те не са полезни за запазване хранителните качества на месото. Използването на натурални антиоксиданти е полезно, но само по себе си недостатъчен за консервиране на месо. Въвеждането на обработка под високо хидростатично налягане (High Pressure Processing- HPP), като нов метод на студена пастьоризация дава възможност за запазване на натуралните качества на месото.

1.2. HPP технология- оказва влияние в следните направления:

- Въздействие на HPP срещу патогенни микроорганизми и такива, които причиняват развала на месото. Основно предимство на HPP технологията е ефектността спрямо микроорганизми, като налягане от 500 MPa и по-голямо предизвиква намаляване на CFU с почти 4 log. Следователно пастьоризацията е възможна при налягане от 500 MPa и по- голямо.

- Влияние на средата върху ефективността на HPP за деактивиране на микроорганизми – установено е, че калций, магнезий, цитрат, фосфат, захароза и други действат, като баропротектори.
- Влияние на опаковката върху ефективността на HPP за деактивиране на микроорганизмите - Меките полимерни: торбички, кутии, тави и бутилки са подходящи, като форма, а PET, PE, PP и EVOH филми, използвани поотделно или в комбинации, са най-често срещаните видове опаковъчни материали. Вакуумните опаковки са най-често срещаният тип опаковки, използвани за HPP продукти, тъй като запечатаната опаковка без остатъчен въздух в нея притежава по-висока компресивност.
- Влияние на HPP върху основните хранителни стойности на месото - HPP върху ензимната активност зависи от самия ензим, естеството на средата (субстрат, йонна сила, pH и т.н.), условията на обработка (налягане, температура, време), което се отразява на вкуса и текстурата на месния продукт. Повечето от разгледаните и тествани витамини, като група B, витамини A, E, D не показва значителна промяна след HPP обработка в концентрацията и активността им при стайна температура.
- Влияние на HPP обработката върху структурата на мускулния протеин - Миофибрилините протеини, при прилагане на налягане от 300 MPa и по–високо води до тяхната денатурация, агломерацията и гел формацията. Придаването на крехкост на месото чрез HPP обработка е свързано с модифициране в структурата на саркомера, но не се наблюдава разкъсване на връзките. През последните години HPP се прилага и поради структурните промени, които третирането предизвиква в месните продукти. Тези структурни промени се основават на ефекта от високото налягане върху клетъчната структура и върху биополимерите, присъстващи в храната. Те могат да доведат до различни хранителни приложения, като създаване на нови текстури, подобряване на свързването на водата и процесите на желиране.
- Промяна на качествените характеристики на месото след обработка с HPP - Ефекта на HPP върху миоглобулина зависи от температурата на обработка, установено е, че обезцветяването на обработеното под високо налягане месо се дължи на изсветляващия ефект, породен от денатурацията на миоглобулина при около 400 MPa. Налягането предизвиква значителни промени в нивата на някои летливи съединения, вероятно идващи от микробна активност. Някои алкохоли и алдехиди намаляват, докато други съединения, като 2,3-бутандион и 2-бутанон, са по-изобилни в обработените под високо налягане меса. Ароматичните компоненти с ниско молекулно тегло не се влияят от налягането, поради ковалентните връзки.
- Ефект на HPP върху окисляването на липидите - Увеличаването на стойностите на липидно окисление се наблюдава при по-високи нива на налягане (300, 400 MPa). Наблюдават се някои изменения на отделни мастни киселини, докато високото налягане не оказва влияние върху съотношението полиненаситени/наситени мастни киселини.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

- Иновативен подход в приложението на HPP технологията за обработка на говеждо месо (самостоятелно и в комбинация с биологичноактивни вещества), за подобряване на физикохимичните, биохимичните, микробиологичните и органолептични качества на сурово говеждо месо и продукти от него.

За осъществяване и постигане на така поставената цел, работата е разделена на два етапа

- **ПЪРВИ ЕТАП -** Проучване на комбинираното влияние на HPP обработка и водни екстракти от мащерка и риган върху качествените показатели на сурово говеждо месо от различни по вид мускули m.Longissimus dorsi (m.LD) и m.Semimembranosus (m.SM).

ЗАДАЧИ към първи етап

- Определяне влиянието на обработката с HPP със зададени параметри (600 MPa, 3 мин при 4°C) самостоятелно и комбинирано с водни екстракти от мащерка и риган върху физикохимичните показатели: pH, водозадържаща способност и колориметрично изследване на сурови говежди мускули: Longissimus dorsi (m.LD) и Semimembranosus (m.Sm);
- Определяне влиянието на обработката с HPP със зададени параметри (600 MPa, 3 мин при 4C°) самостоятелно и комбинирано с водни екстракти от мащерка и риган на сурови говежди мускули: Longissimus dorsi (m.LD) и Semimembranosus (m.Sm) на биохимичните показатели: спектрометрично изследване на миоглобин, белтъчното и липидното окисление, мастнокиселинният състав и електрофореза;
- Определяне влиянието на обработката с HPP комбинирано с водни екстракти от мащерка и риган върху микробиологичната стабилност на месото от двете мускулни групи.
- Органолептичен анализ.

- **<u>ВТОРИ ЕТАП -</u>** Проучване на влиянието и ефекта на HPP технологията при два режима на обработка – стандартно и удължено време и комбинираното влияние на HPP обработка със стандартно време и с фиксирани концентрации на антиоксиданти при мляно месо от *m. Semimembranosus (m.SM)*. Изследване влиянието на двата режима на HPP обработка върху инокулирани патогени в мляно месо от *m.SM.*

ЗАДАЧИ към втори етап

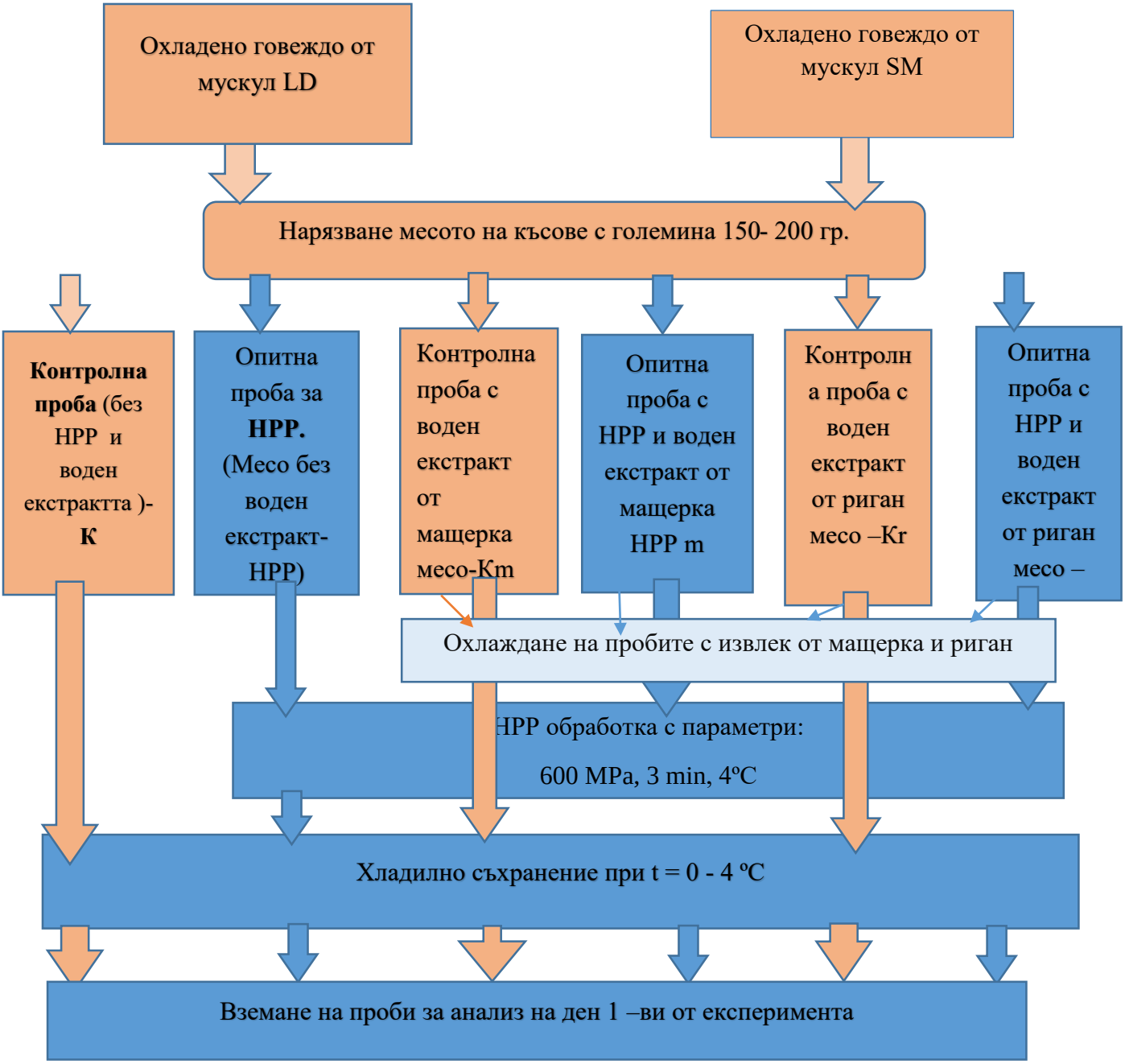
- Проучване на влиянието на самостоятелна HPP обработка с два режима (580 MPa,/ 4 min./ 4°C - стандартно и 580 MPa/ 8 min/ 4°C - удължено време) и комбинирана HPP стандартна обработка и антиоксидантни средства с фиксирани концентрации, по време на 40 дни хладилно съхранение върху физикохимичните показатели: (pH, водозадържаща способност и колориметрично изследване) в мляно месо от m. Semimembranosus

- Влиянието на самостоятелна HPP обработка с два режима (580 MPa,/ 4 min./ 4°C - стандартно и 580 MPa/ 8 min/ 4°C - удължено време) и комбинирана HPP стандартна обработка и антиоксидантни средства с фиксирани концентрации, по време на 40 дни хладилно съхранение влиянието върху биохимични показатели (миоглобин, липидно окисление и мастнокиселинен анализ и електрофореза) върху в мляно месо от m.Semimembranosus
- Определяне на оптималния режим на HPP обработка (стандартно и удължено време) самостоятелно спрямо микробиологичния статус на мляно месо от Semimembranosus по време на 40 дни хладилно съхранение, като показател за удължен срок на годност.
- Проучване комбинирано влияние на HPP стандартна обработка и антиоксидантни средства с фиксирани концентрации върху микробиологичния статус в мляно месо от m.Semimembranosus, като показател за удължен срок на годност.
- Определяне на оптималния режим на HPP обработка (стандартно и удължено време) върху инокулиран микс от патогенни микроорганизми в мляно говеждо месо с цел безопасност на готовият по време на 40 дни хладилно съхранение.
- Изпитване влиянието на HPP обработка (стандартно и удължено време) самостоятелно и подходящо комбинирано с антиоксидантни средства с фиксирани концентрации за запазване и подобряване на органолептичните качества на мляно месо от мускул Semimembranosus:
- Създаване на рецептурен състав на мляно месо m.Semimembranosus, обработен с HPP и подходяща добавка;
- Изготвяне на икономически анализ за целесъобразността на резултатите от разработката.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали.

3.1.1. За Първи етап - моделна система на говеждо месо от мускули *Longissimus Dorsi* (m.LD) и *Semimembranosus* (m.SM), обработено с HPP самостоятелно или предварително мариновано със воден извлек от мащерка или риган.



Фигура 1. *Постановка на опита с моделна система на говеждо месо от мускули Longissimus dorsi (m.LD) и Semimembranosus (m.Sm), обработено с HPP самостоятелно или предварително мариновано със воден извлек от мащерка или риган.*

Легенда*: *cont* -** *контрола (необработено с hpp и воден извлек от мащерка или риган);* ***hpp *– месо обработено само hpp;* ***cont-m*** *- месо обработено с воден екстракт от мащерка* ***hpp-m*** *месо обработено с hpp и воден извлек от мащерка;* ***cont – r*** *-месо обработено с екстракт от риган;* ***hpp-r*** *- месо обработено с hpp и воден извлек от риган*

Суровини.

- Изследванията са проведени с **говеждо месо** I качество, закупено в търговската мрежа, при спазване на изискванията за клане и добив на месо от ЕПЖ от мускулни групи мускули ***Longissimus dorsi*** (*m.LD*) и ***Semimembranosus*** (*m.SM*). Пробите са разделени в шест групи –контрола (необработено с hpp и без добавки); **hpp** – месо обработено само hpp; **cont-m** - месо обработено с воден екстракт от мащерка **hpp-m** месо обработено с hpp и воден извлек от мащерка; **cont – r** -месо обработено с екстракт от риган; **hpp-r** - месо обработено с hpp и воден извлек от риган.
- Експерименти с говеждо месо от различни части на кланичния труп с висока търговска стойност: Котлет – включва дългият мускул на гърба (m. Longissimus dorsi thoracis et lumborum) Вайсбрат, се означава в практиката външната част на бута и включва полусухожилния мускул (m. Semimembranosus**).**
- Метод за овкусяване на месото: Месото от двата мускула се нарязва на парчета с големина 150 гр. - 200 гр. и се заливат с 250 мл. воден извлек, за *m.LD* и 350 мл за *m.SM*. Престояват в течността за 24 часа при температура 4C°. На другия ден месата бяха извадени, отцедени от водния извлек.
- Стръкове мащерка (*Thymus vulgaris* L) и риган (*Origanum vulgare*), закупени в изсушен вид от доставчик в гр. София. За овкусяване са използвани: воден извлек от мащерка и риган в съотношения 1:15.
- Метод за получаване на извлека: За целта 30 гр. сушена мащерка се смесва с 450 мл. дестилирана вода и 30 гр. сушен риган се смесва с 450 мл. дестилирана вода. Изсушените билки се осредняват до размер 3 милиметра и се поставят в кипяща вода и се оставя сместа да ври в продължение на 3 min. Запарката се оставя да изстине за 60 min. Охладената смес се филтрува и се долива до първоначалното количество с дестилирана вода.

Спомагателни материали

- Вакуум пликове на фирма Вакпак Медикал ООД, с размери - (200х420 мм) от полиамид свързващ слой/ полиетилен.

HPP обработка

• Обработка под високо хидростатично налягане (съоръжение на Avure, USA) с параметри: налягане 600 MPa, време на обработка 3 min., извършена във фирма „АКВАБАР“ ООД, гр. София, България.

3.1.2. Предварителни опити за установяване, необходимостта от използването на различни адитиви – добавки за моделна система на мляно месо - от мускули *Semimembranosus* (m.SM), обработено с HPP, самостоятелно и в съчетание с антиоксиданти средства.

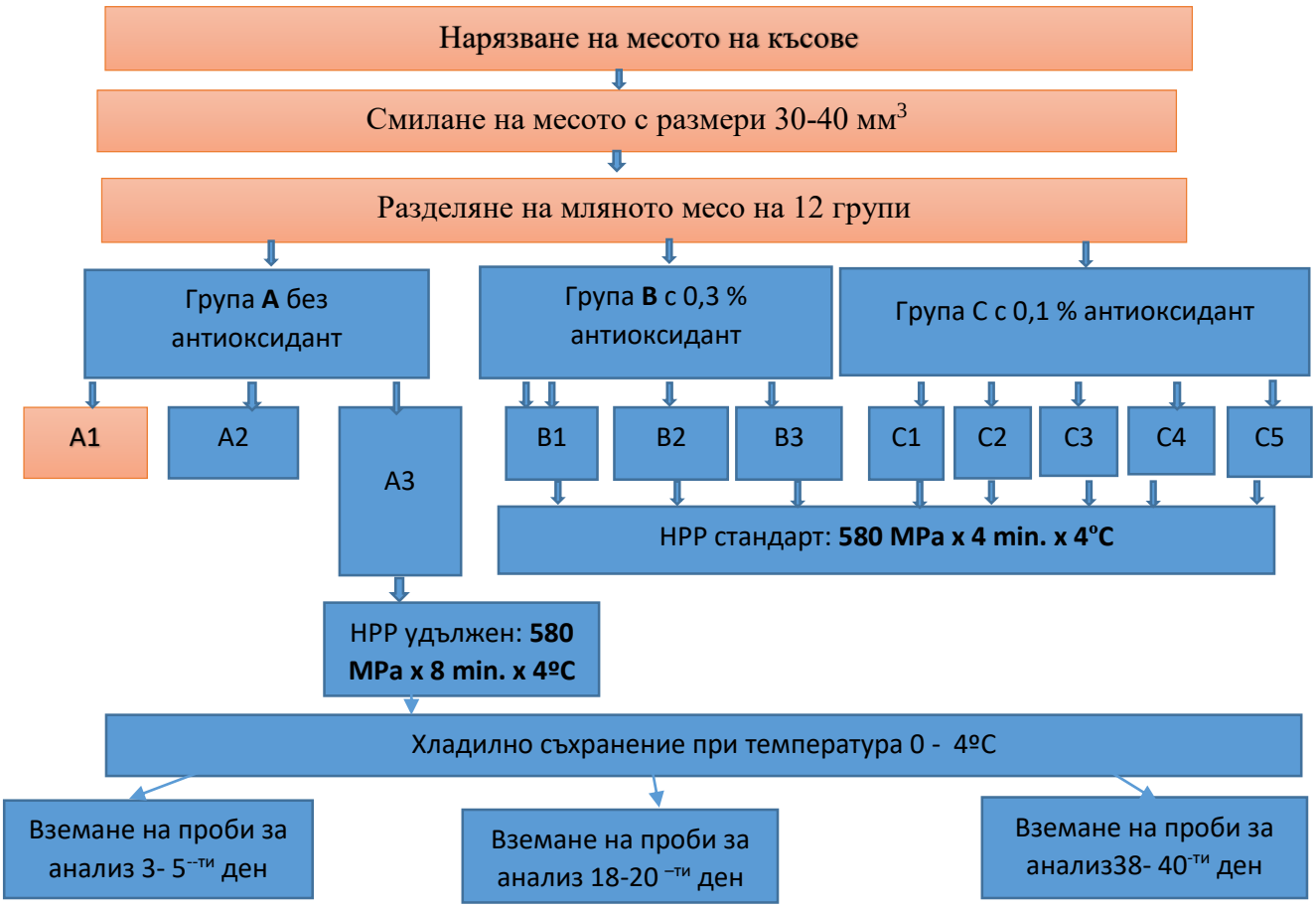
Суровини.

- Мляно месо - от мускул *Semimembranosus* (*m.SM*), закупено от месарницата в гр. Кардица, Гърция за предварителни експериментални цели. Животното е на възраст между 12 – 24 месеца, заколено на 08.01.2020 г. Смляното в месарницата месо беше

разделено на 12 бр. проби по 50 гр., съответно: 1. Контрола: без добавка, 2. 0,05 % етерично масло от риган: 0,025 ml= 25 µl в 50 гр. Месо; 3. 0,1 % етерично масло от риган: 0,050 ml= 50 µl в 50 гр. Месо; 4. 0,15 % етерично масло от риган: 0,075 ml= 75 µl в 50 гр. Месо; 5. 0,2 % етерично масло от риган: 0,100 ml= 50 µl в 50 гр. Месо; 6. 0,1 % сух риган : 0,05 гр. в 50 гр. месо; 7. 0,2 % сух риган : 0,10 гр. в 50 гр. месо; 8. 0,3 % сух риган : 0,15 гр. в 50 гр. Месо; 9. 0,1 % Натриев лактат /80%/ = 0,125 мл.= 0,0625 мл в 50 гр. Месо; 10. 0,1 % Натриев лактат /60 %/ = 0,167 мл. . 60 %= 0,01% в 50 гр. Месо; 11. 0,3 % Медолива Плюс = 0,15 гр. в 50 гр. Месо; 12. 0,5 % Медолива Плюс = 0,25 гр. в 50 гр. месо

- Сух риган (*Origanum vulgare*), закупени в изсушен вид от доставчик в гр. София.
- Етерично масло от риган, закупено от търговската мрежа в Гърция, производство на „ХербСтор“, Гърция.
- Натриевият лактат (80%-ов и 60%-ов разтвор) е закупен от фирма „International Corporation“, Китай . Сграда 9,2277 бул. Зухонжи, Шанхай
- Медолива Плюс- е натурален екстракт от маслини и цитрусови плодове / плодов сок от лимон, капсулиран в малтодекстрин или друг подобен хранителен капсулиращ носител, чрез лиофилизация. За извличането и сушенето му се използва само чиста вода. Производство на фирма „ПолиХелт“, Гърция.

3.1.3. За Втори етап - моделна система на мляно месо от мускули *Semimembranosus* (*m.SM*), обработено с HPP, самостоятелно и в съчетание с антиоксиданти средства

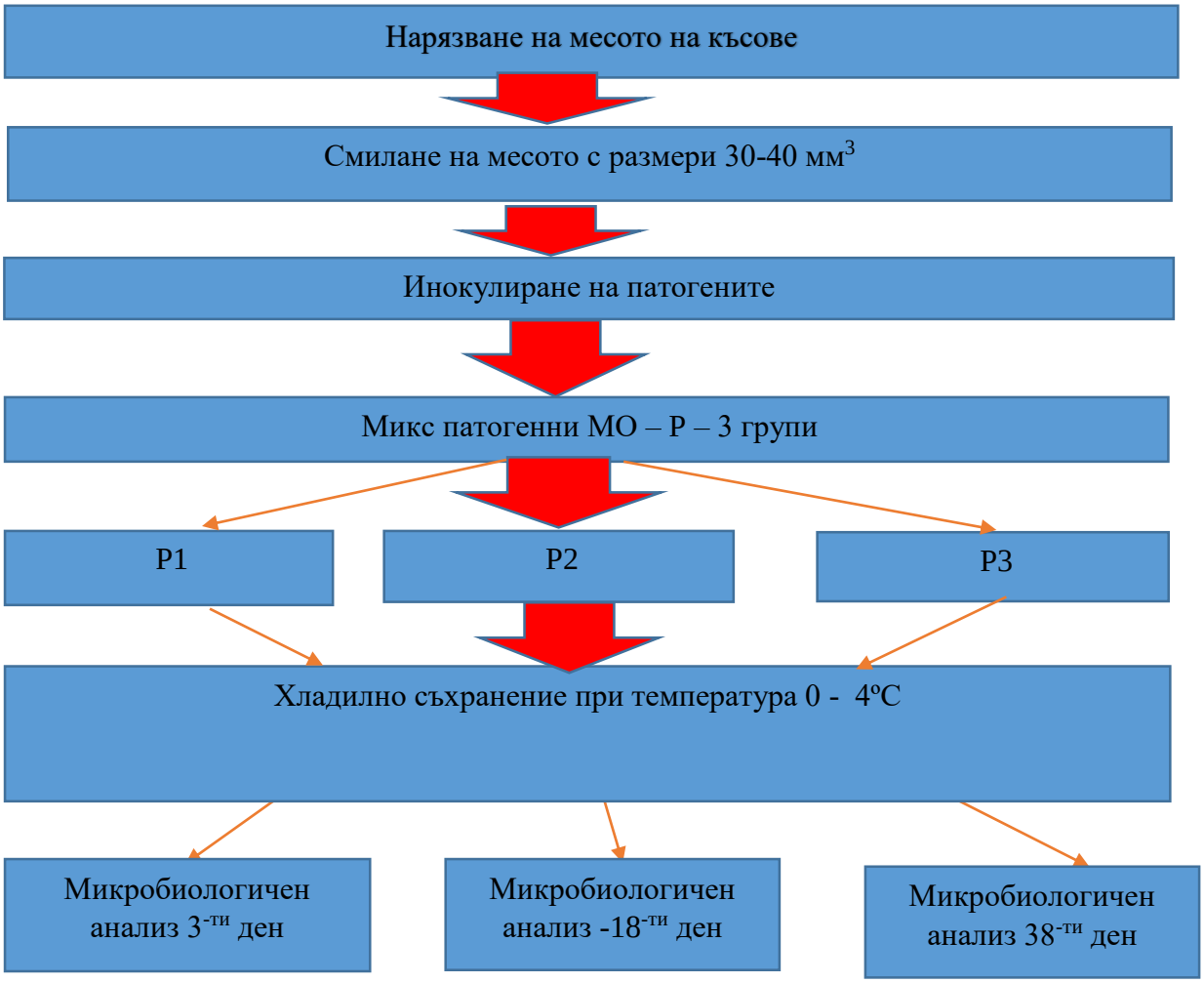


Фигура 2. Опитна постановка на моделна система на мляно месо- от мускули Semimembranosus (m.Sm), обработено с HPP, самостоятелно и в съчетание с антиоксиданти или антимикробни средства.

Легенда:

Група А А1. *от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка;* ***А2.*** *от говеждо месо, вакуум опаковка, с HPP обработка+ 580MPa x 4мин;****А3.*** *от говеждо месо, вакуум опаковка + 580MPa x 8мин;****Група В В1****. от говеждо месо + HPP обработка+ 580MPa x 4мин;* ***В2****. от говеждо месо + HPP + Медолива Плюс (Medoliva Plus) 0,3 %* ***В3****. от говеждо месо + HPP + натриев Натриевият лактат - диацетат 0,3 %;****Група С С1****. от говеждо месо + HPP обработка+ 580MPa x 4мин;****С2*** *от говеждо месо + HPP + Медолива 0,1 %;* ***С3****. от говеждо месо + HPP + Цвекло 0,1 %;* ***С4.*** *от говеждо месо + HPP + Червена репичка 0,1 %;* ***С5.*** *от говеждо месо + HPP + Розмарин 0,1 %.*

Технологична схема на мляно месо - мускул *Semimembranosus* (*m.Sm*), инокулирано с микс от патогени и обработено с HPP



Фигура 3 Опитна постановка на моделна система на мляно месо- от мускул Semimembranosus (m.Sm), инокулирано с микс от патогени и обработено с HPP при два режима.

Легенда: *P1- микс от патогени без HPP; P2 - микс от патогени с HPP (580 MP/4 min./ 4ºC); P3 - микс от патогени с HPP (580 MP/8 min./ 4ºC)*

Суровини

- **Месо от говежди мускул *Semimembranosus*** (*m.Sm*) I качество, кланица "Тремас", гр. Кардица, Гърция, при спазване на изискванията за клане и добив на месо от ЕПЖ . Месото е закупено на 04.02.20 от ферма Тремас, цялото

количество 10 кг е от мускула Semimebranosis . Животното е на възраст между 12 – 24 месеца, заколено на 31.01.2020 г., с тегло 255 кг. Ушна марка на животното – EL4100151007. Код на кланицата S79, поредност на заколеното животно – 1, категория на животното AR3+. Изчисти се по - голяма част от сухожилията и се смляха на машина с размери 30–40 мм^3, от него се сформираха опитните проби от мляно говеждо месо, които бяха разпределени в следните: 11 изследвани проби от група А, В и С и 3 с патогени Р. Пробите са разделени по 100 гр.

Група А: А1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка; А2. от говеждо месо, вакуум опаковка, с HPP обработка+ 580MPa x 4мин; А3. от говеждо месо, вакуум опаковка + 580MPa x 8мин;

Група В: В1. от говеждо месо + HPP обработка+ 580MPa x 4мин; В2. от говеждо месо + HPP + Медолива Плюс (Medoliva Plus) 0,3 %; В3. от говеждо месо + HPP + Натриевият лактат 0,3 %.

Група С: С1. от говеждо месо + HPP обработка+ 580MPa x 4мин; С2 от говеждо месо + HPP + Медолива 0,1 %; С3. от говеждо месо + HPP + Цвекло 0,1 %; С4. от говеждо месо + HPP + Червена репичка 0,1 %; С5. от говеждо месо + HPP + Розмарин 0,1 %.

Антиоксидантни средства в съотношение 0,3 %: **„Медолива Плюс“** 0,3 %, - е натурален екстракт от маслинови полифеноли и цитрусов/ лимонов плодов сок и екстракти, капсулирани в малтодекстрин или друг подобен хранителен носител - **Натриев лактат (60%-ов разтвор)**

Антиоксидантни вещества в концентрация 0,1% : **„Медолива“** Естествен антиоксидант, произведен от плода на маслината (воден екстракт от плода на маслината), с високо съдържание на хидрокситирозол и тирозол, които са известни като най-ефективните естествени антиоксиданти. Продуктът съдържа и значителни количества кафеена и кумарова киселина, катехини и антоцианини. Съдържанието на продукта MEDOLIVA ® в хидрокситирозол / тирозол е 30 пъти повече, отколкото в зехтин екстра върджин. Химичен състав: Екстракт от маслини, малтодекстрин. . Производство на фирма „ПолиХелт“, Гърция; **Червено цвекло на прах**, съдържа компоненти на йода, забелязан е ефект на предотвратяване на атеросклерозата. Цвеклото съдържа голямо количество магнезий, заздравява кръвоносните съдове и предотвратява образуването на кръвни съсиреци, има лечебно действие върху хипертония. Цвеклото съдържа голямо количество целулозни и пектинови компоненти, според изследвания, развива резистентност към стомашна язва. Получава се чрез течно-твърдо извличане. Има лилаво червен цвят. предлагат от фирма FruitMax- Chr. Hansen – Denmark.; **Червена репичка на прах** - получава се от корените на ядивни червени репички Ряпа sativus L.чрез извличане и рафиниране. Това е един вид разтворим във вода, естествено червен цвят. Цвета се състои основно от антоцианин, която принадлежи към глюкоза производни на Pelargonidin. Външен вид: Червен тъмно червен прах. Предлага се от фирма FruitMax- Chr. Hansen – Denmark.; **Розмарин масло.** Розмарин 0,1 %. е натурален екстракт от етерично масло от розмарин. От векове, една от най-честите употреби на воден извлек в медицината е за подобряване на паметта, не само за овкусяване на храната. Тази подправка, и по-специално цветните върхове, съдържа антибактериална и антиоксидантна розмаринова киселина, както и есенциални масла като цинеол, камфен,

борнеол, борнил ацетат, и α-пинен, за които се знае, че имат противовъзпалителни, антигъбични и антисептични свойства.

Спомагателни материали: Вакуум пликове- фирма FlexoPack, Greece (200x420 mm) със свързващ слой полиамид/полиетилен. Този вид опаковане, ограничава отрицателното въздействие на окислението върху мляното говеждото месо. Затварянето на вакуум пликовете се извърши чрез пакетираща машина Henkelman (Холандия). Показателите на вакуум пликовете са: PA-PE основава се на (кислородна пропускливост 75 cc /m2 / 24 h/ 1 atm) водопропускливост 5 gr /m2 / 24 h.

HPP обработка: HPP обработката е извършено в съоръжение на американската фирма AVURE, разположено в Митилос, с. Китрос, област Пиерия, Гърция. **Стандартна** обработка: **Налягане 580 MPa. Температура на водата 4°C, време на задържане 4 min. Удължено** време за обработка: Налягане **580 MPa, температура 4°C, време на задържане 8 min.** Прилага се за проби без добавени вещества (A3) и проби с инокулиран микс от патогени (P3).

3.2. Използвани методи за анализ.

3.2.1. Технологични: Вземането на проби е извършено съгласно изискванията на БДС EN ISO 3100-1:2002.

3.2.2. Физикохимични: 1. Определяне на pH-стойността чрез pH метър: Първи етап - Hanna, USA (MP, pH проба, стъклен електрод), Втори етап -с pH метър Hanna –Food care, HI 99161, Румъния. 2 Определяне на водозадържаща способност (ВЗС): Използван е класически метод за определяне на Grau and Ham (1952). 3. Определяне на цветовите характеристики - Цветовите характеристики на пробите са определени инструментално по системата CYELab (Brewer and Wu, 1993), чрез измерване на рефлективността и екстракцията на пигменти с колориметър. Колориметър модел Lovinbond GAM – Stem 500.

3.2.3. Биохимични: 1. Протеиновото окисление се определя от съдържанието на карбонилните вещества, описано от Oliver at al. (1987) и модифициран от Mercier et al., 1998; 2. Определяне на миоглобина и неговите производни по метода на Krzywicki (1979); 3. Определяне промените в белтъчния спектър на месните продукти, чрез денатурираща протеинова електрофореза в полиакриламиден гел SDS-PAG по метода на Laemmli (Laemmli, 1971), с лека модификация от Ketnawa and Rawdkuen (2011). Използвана е система за протеинова електрофореза – Pharmacia LCB MultiDrive XL снабдена с Omni PAGE WAVE Electrophoresis System (Cleaver Scientifics); 4. Определяне на вторичните производни на липидното окисление чрез 2-тиобарбитурово-киселинните реактивоспособни съединения (липидно окисление) **за Първи етап** се прилага метод на Lynch and Frei (1993) и модифициран от Mercier al. (1998). **За Втори етап -** определянето на вторичните производни на липидното окисление чрез метода на Oxford Biomedical, предложен от лабораторията по микробиология, Университет Тесалия, Гърция Спектрофотометър LANGE, DR 5000, Germany; 5. Определяне на мастнокиселинен състав на мазнините в месото -Екстракцията на общи липиди е извършена по метода на Bligh & Dyer (AOAC, 1959), а метиловите естери на мастните киселини са анализирани на газов хроматограф

3.2.4. Микробиологични: БДС EN ISO 6887-2:2004; EN ISO 4833-1,2; БДС 1035.БДС EN ISO 4833:2004; ISO 4831, ISO 4832; ISO 6579-1:2002; ISO 7954; ISO 6888-1-3, ISO 6888-2:2003; ISO 15213; ISO 15214:1998; ISO 21525-2:2004; ISO16649-2:2001; ISO 11290-2:2017; ISO 10272-2

3.2.5. Органолептична оценка - 5 бална скала разработена от Университет за приложни науки Тесалия, Гърция – Направление Хранителни технологии гр. Кардиц**а.**

3.2.6 Статистически анализ - софтуерния пакет JMP v7. Двуфакторен дисперсионен анализ, (Fit model procedure). Статистическите разлики между групите са приложени множествени сравнения (Tukey-Kramer HSD) при P<0.05. За оценка на достоверността на разликите между групите е използвана средната квадратична грешка (RMSE) на използвания модел.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4. Анализ на резултатите

4.1. ПЪРВИ ЕТАП - Комбинирано влияние на HPP обработка и водни екстракти от мащерка и риган върху качествените показатели на сурово говеждо месо от различни по вид мускули *m.Longissimus dorsi (m.LD)* и *m.Semimembranosus (m.SM).*

4.1.1. Физикохимични показатели, цветови характеристики и липидно окисление

В настоящият анализ се прилага високо налягане (600 MPa) самостоятелно или комбинирано с воден екстракт на мащерка и риган, което води до окислителни процеси на липиди и белтъчини.

На табл.1 и табл.2 са показани резултатите от извършените физикохимични изследвания на сурово говеждо месо при изследваните 2 мускулни групи - *m.Longissimus dorsi (m.LD)* и *m.Semimembranosus (m.SM).*

Таблица 1. Физикохимични показатели и липидно окисление на сурово говеждо месо, обработено с високо хидростатично налягане и антиоксиданти при мускул *Longissimus dorsi- (LD)*

Обраб.	Антиоксид.	pH	ВЗС (%)	L	a	b	липидно окисление, mg МДА / kg месо
Контрола	без добавка	5.590	36.69	40.71	21.54	10.73	0.315
	мащерка	5.627	40.11	47.58	15.21	14.41	0.327
	риган	5.620	41.00	49.96	15.74	15.49	0.345
HPP	без добавка	5.835	41.20	57.89	19.22	12.76	0.296
	мащерка	5.862	43.31	60.20	14.51	15.66	0.215
	риган	5.817	42.79	58.65	15.07	16.62	0.290
Ефект							
Обраб.	контрола	5.612^{b}	39.26^{b}	46.08^{b}	17.50	13.55	0.267
	HPP	5.838^{a}	42.43^{a}	58.91^{a}	16.27	15.01	0.319
Антиокс.	без добавка	5.713^{b}	38.94^{b}	49.30^{b}	20.38^{a}	11.75^{b}	0.306
	мащерка	5.744^{a}	41.71^{ab}	53.89^{a}	14.86^{b}	15.04^{ab}	0.271
	риган	5.718^{ab}	41.90^{a}	54.30^{a}	15.40^{b}	16.05^{a}	0.317
RMSE (n=24)		**0.020**	**1.87**	**2.86**	**2.05**	**2.71**	**0.079**
Достов.	обработка	P<.0001	P=0.0036	P<.0001	P=0.2274	P=0.2743	P=0.1188
	добавка	P=0.0379	P=0.0308	P=0.0186	P=0.0009	P=0.0432	P=0.5867
	обр.*добавка	P=0.1243	P=0.4714	P=0.0717	P=0.7317	P=0.9525	P=0.5978

Легенда: контрола – сурово говеждо месо необработено, HPP – сурово говеждо месо обработено с високо налягане, ВЗС – водозадържаща способност, L – яркост на цвета, a – жълта компонента на цвета, b – червена компонента на цвета. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Таблица 2. Физикохимични показатели и липидно окисление на сурово говеждо месо, обработено с високо хидростатично налягане и антиоксиданти при мускул *m.Semimembranosus (SM)*

Обраб.	Антиоксид.	pH	ВЗС (%)	L	a	b	липидно окисление, mg МДА / kg месо
Контрола	без добавка	5.738	35.16	36.93^{b}	18.93	10.53	0.320
	мащерка	5.739	39.65	46.61^{a}	15.25	14.46	0.324
	риган	5.784	37.73	47.63^{a}	12.82	15.89	0.277
HPP	без добавка	5.873	40.15	52.23^{a}	23.00	13.93	0.246
	мащерка	5.939	40.06	51.72^{a}	17.59	16.06	0.218
	риган	5.870	43.55	51.00^{a}	20.28	15.94	0.251
Ефект							
Обработка	контрола	5.736^{b}	37.52^{b}	43.72	15.66^{b}	13.63	0.307^{a}
	HPP	5.894^{a}	41.25^{a}	51.65	20.29^{a}	15.31	0.238^{b}
Антиокс.	без добавка	5.805	37.66	44.58	20.96^{a}	12.23^{b}	0.283
	мащерка	5.839	39.85	49.17	16.42^{b}	15.26^{a}	0.271
	риган	5.827	40.64	49.31	16.55^{b}	15.92^{a}	0.264
RMSE (n=24)		**0.091**	**3.06**	**3.29**	**2.12**	**2.04**	**0.043**
Достов.	обработка	P=0.0014	P=0.0079	P<.0001	P<.0001	P=0.0581	P=0.0010
	добавка	P=0.7578	P=0.1598	P=0.0151	P=0.0005	P=0.0043	P=0.6754
	обр.*добавка	P=0.4723	P=0.1917	P=0.0039	P=0.0742	P=0.2853	P=0.2017

Легенда: контрола – сурово говеждо месо необработено, HPP – сурово говеждо месо обработено с високо налягане, ВЗС – водозадържаща способност, L – яркост на цвета, a – жълта компонента на цвета, b – червена компонента на цвета. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Установено е, че въздействието на високо хидростатично налягане води до увеличаване на стойностите на **pH** и при двете мускулни групи. Влиянието на антиоксидантите е доказано при мускулна група *m.LD*, където установихме по-високи стойности на този показател при групата обработена с мащерка спрямо контролната група без антиоксидант. Повишаването на pH (киселинността) след обработка с HPP е следствие налягане ≥ 400 MPa. В проучването на Mc Ardle, обработката под високо налягане при 200 MPa не променя pH стойностите на говеждото месо.(McArdle, 2010)

Въздействие върху този показател на вложените антиоксидантни вещества, показват по – високи стойности при комбинирането действие на високо налягане и мащерка и слабо намаление при риган и за двете мускулни групи. Комбинираното влияние зависи, както от антиоксиданта, така и от вида на месото, установено е при съхранение на свински филета при 4°C (9 дни), че pH на филетата съдържащи градински чай, е доста променливо, докато pH на тези с женшен и розмарин се повишава, а тези с сминдух и горчица намалява. (McCarthy et al., 2001).

Влиянието на HPP обработката в направеният анализ води до повишаване **водозадържащата способност** на сурово говежда месо и при двете изследвани мускулни групи от 7 до 10%. Получените резултати се различават от изследването на Wada, където показва, че ВЗС на месо от сардина за нетретирана проба е 37,1%, а след HPP обработка намалява до 33,5% и разглежда този параметър, като свързан с липидното окисление. (Wada, 1996)

Влияние на вложените антиоксиданти установихме само за групата с риган при мускулна група *LD*, където констатираме по-високи стойности спрямо групата без антиоксидант. Взаимодействието между двата фактора не е доказано.

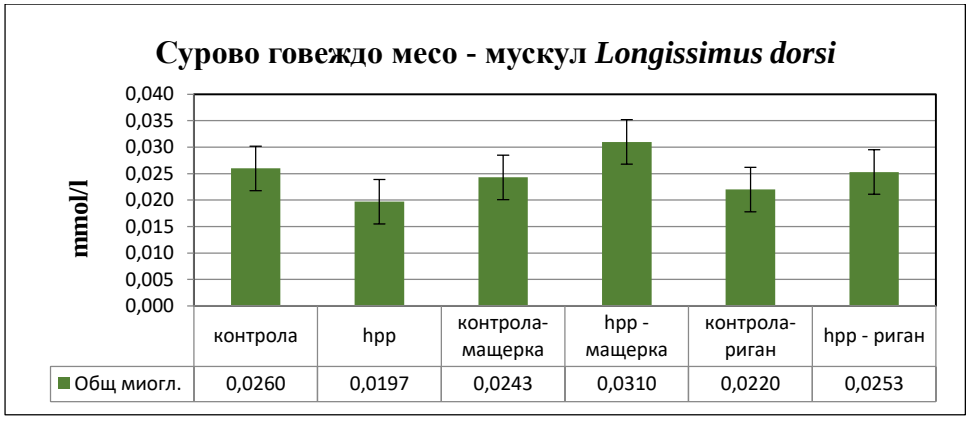
Установено е, че обработката с високо хидростатично налягане води до повишаване стойностите на **яркостта** (L) на сурово говеждо месо при мускулна група *LD* при много висок ранг на доказаност P<.0001. Повишаването на стойностите на L* или „побеляване“, като изсветляващ ефект на налягането се приписва на денатурацията на миоглобина, изместване или освобождаване на хема и окисление на железни йони (Cheftel & Culioli, 1997) Други автори предполагат, че по-светлият вид на месото може също да се дължи на промени във водното съдържание (Mussa, 1999). При мускулна група *SM* е налице доказано взаимодействие между обработката с HPP и вложените антиоксиданти от риган и мащерка в посока повишаване стойностите на показателя в сравнение с контролната група, нетретирана с HPP и без вложени антиоксиданти.

Според получените резултати за **червената компонента** на месото въздействието на HPP действа по различен начин при двата вида мускулни групи. Обработката с HPP води до увеличаване на този показател при мускулна група *SM*, докато при групата *LD* получаваме статистически недоказано намаляване на стойностите. Влагането на мащерка и риган в месото води до по-ниски стойности на този показател и при двете мускулни групи. По-висока стойност на червената компонента на цвета се констатира при SM, спрямо LD. Може да се предположи, че по-добрите резултати при *SM*, се дължат на различният състав на мускула и по-малкото количество миоглобин. Въздействието на приложеното високо хидростатично налягане е слабо изразено и статистически незначително в посока увеличаване на стойностите на **жълтата** компонента на месото. Влиянието на вложените антиоксиданти води до достоверно увеличаване на стойностите на този показател и при двете мускулни групи, по-силно изразено при групата обработена с риган. Резултатите за *LD*, относно червената и жълтата компонента на цвета, кореспондират с получените от McArdle, 2010 за говеждо месо от *m. Pectoralis profundus*. Липидното окисление също причинява промени в цвета на месото, като е един от най- важните качествени параметри. (Jung et al., 2013).

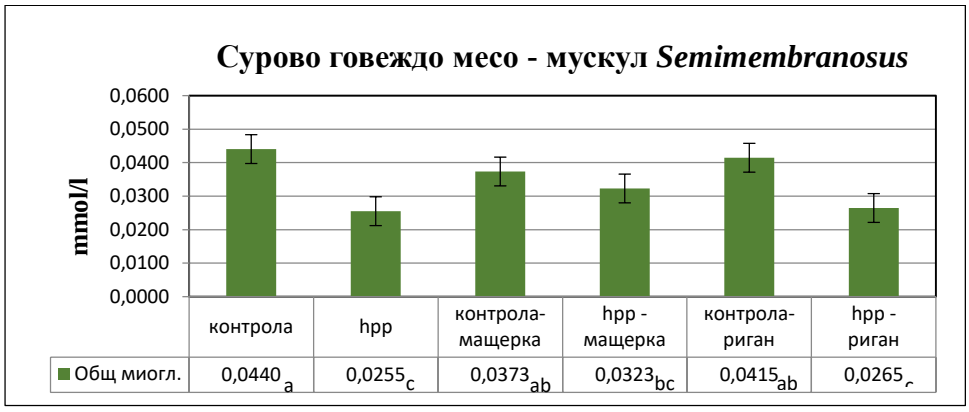
Получените резултати показват, че HPP обработката оказва влияние върху **липидното окисление** на суровото говежда месо само при мускулна група *SM* в посока намаляване стойностите на показателя и за двете мускулни групи, по-съществено при *SM* групата. Обработката с антиоксиданти води до несъществени промени в липидната фракция. Влиянието на третирането с HPP самостоятелно върху показателя за окисление на липиди, показва достоверно намаляване на стойностите на показателя на МДА при SM групата. Може да се предположи, че добрите резултати се дължат също и на високото качество на вакуум опаковката

4.1.2. Миоглобин и неговите форми, промени в белтъка на месото

На фиг.4 и фиг.5 са показани резултатите от направените изследвания върху показателя общ миоглобин при двата изследвани мускула говеждо месо.



Фиг.4 Съдържание на общ миоглобин в сурово говеждо месо при мускул *Longissimus dorsi*

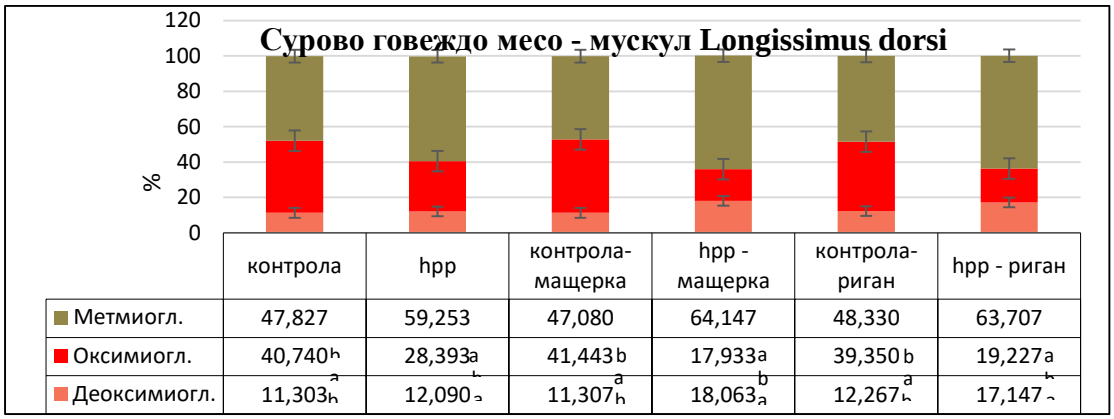


Фиг.5 Съдържание на общ миоглобин в сурово говеждо месо при мускул *Semimembranosus,*

Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

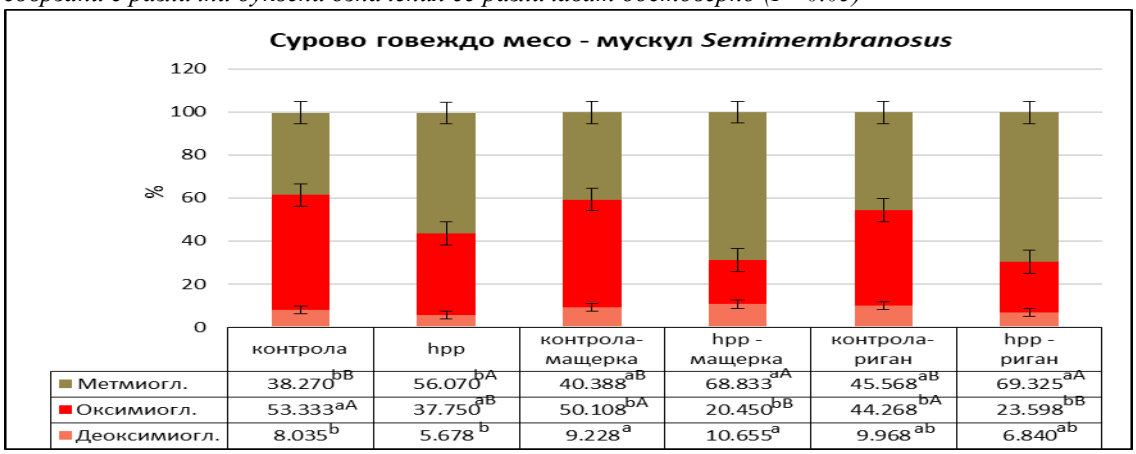
При мускулна група *LD* не са установени съществени различия вследствие прилагането на HPP и обработката с мащерка и риган. При мускулна група *SM* установихме взаимодействие между факторите обработка с HPP и вложените добавки. Най-висока стойност е получена при необработената контрола, която съществено се различава от всички групи третирани с HPP, където констатираме намаляване на стойностите на показателя в рамките на 27 до 42%. Намаляване съдържанието на миоглобин чрез

обработка с високо налягане се счита, че зависи от степента на високо налягане заедно с денатурацията на глобуларният протеин.(Wada1996.)



	контрола	hpp	контрола-мащерка	hpp - мащерка	контрола-риган	hpp - риган
Метмиогл.	47,827	59,253	47,080	64,147	48,330	63,707
Оксимиогл.	40,740$^{b}_{a}$	28,393$^{a}_{b}$	41,443$^{b}_{a}$	17,933$^{a}_{b}$	39,350$^{b}_{a}$	19,227$^{a}_{b}$
Деоксимиогл.	11,303$^{b}_{a}$	12,090$^{a}_{b}$	11,307$^{b}_{a}$	18,063$^{a}_{b}$	12,267$^{b}_{a}$	17,147$^{a}_{b}$

Фиг.6 Форми на миоглобина на сурово говеждо месо при мускулна група *LD*, *Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05)*



	контрола	hpp	контрола-мащерка	hpp - мащерка	контрола-риган	hpp - риган
Метмиогл.	38.270^{bB}	56.070^{bA}	40.388^{aB}	68.833^{aA}	45.568^{aB}	69.325^{aA}
Оксимиогл.	53.333^{aA}	37.750^{aB}	50.108^{bA}	20.450^{bB}	44.268^{bA}	23.598^{bB}
Деоксимиогл.	8.035^{b}	5.678^{b}	9.228^{a}	10.655^{a}	9.968^{ab}	6.840^{ab}

Фиг.7 Форми на *миоглобина* на сурово говеждо месо при мускулна група *LD*,

Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05), като малките буквени означения са свързани с влиянието на вложените добавки, а големите буквени означения са свързани с технологичната обработка (HPP)

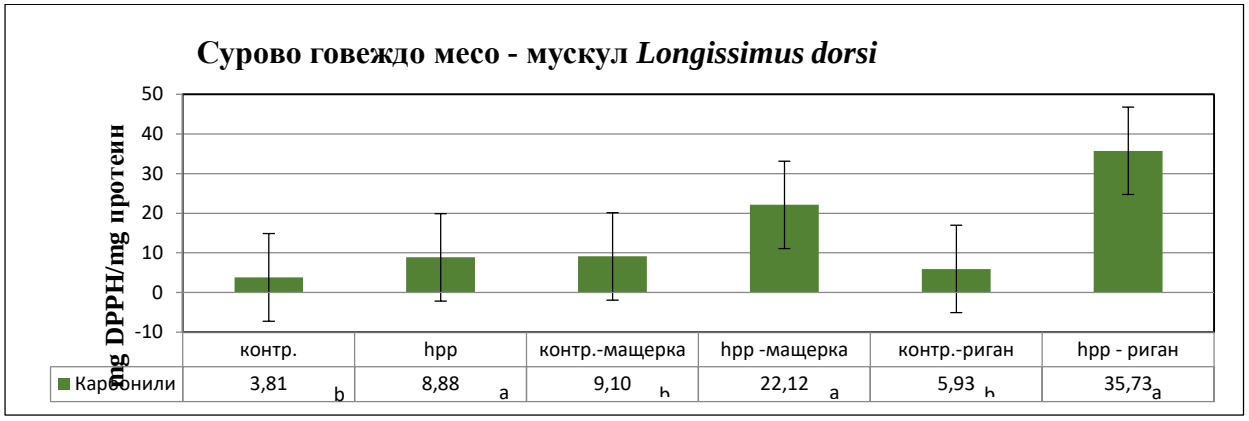
На фиг. 6 и фиг.7 са показани резултатите от измененията във формите на миоглобина при двете изследвани мускулни групи.

При мускул *LD* установихме, че под въздействието на HPP се покачва съдържанието на деоксимиоглобин и метмиоглобин за сметка намаляване съдържанието на оксимиоглобин. Нивата на метмиоглобин са твърде високи и обработката с вложените добавки не повлиява съществено върху стойностите на този показател.

При мускулна група *SM* установихме достоверно покачване на стойностите на деоксимиоглобин при групата с вложена добавка от мащерка спрямо контролната група без добавка. Обработката с високо хидростатично налягане не оказва съществено влияние върху този показател. При оксимиоглобина и метмиоглобина са налице същите тенденции както и при първата мускулна група. Установени са по-високи стойности на метмиоглобин и по-ниски на оксимиоглобин след прилагане на HPP. При тези показатели за разлика от мускулна група *LD* получихме и достоверно влияние на вложените антиоксиданти. Установено е достоверно намаляване на стойностите на

оксимеиглобина и увеличаване на метмиоглобина при групите с риган и мащерка в сравнение с групите без добавки. Различните форми на миоглобин деоксимиоглобин, оксимиоглобина и метмиоглобин имат различна чувствителност към високо налягане и по този начин пропорциите на миоглобините форми, присъстващи в прясното месо преди и след HPP са определящ фактор за степента на окисление на миоглобин. (Bak et al., 2012). Процесът на денатурация, потвърждава стойностите на CIE, че говеждото под налягане се променя от ярко вишнево червено до тъмночервено или кафяво. Това предполага, че обработката с високо налягане може да предизвика същия вид изменение на цвета и респективно миоглобина, както и топлинната преработка. Денатурацията на метмиоглобина е свързана с изместването на хематиновото желязо към феричното състояние

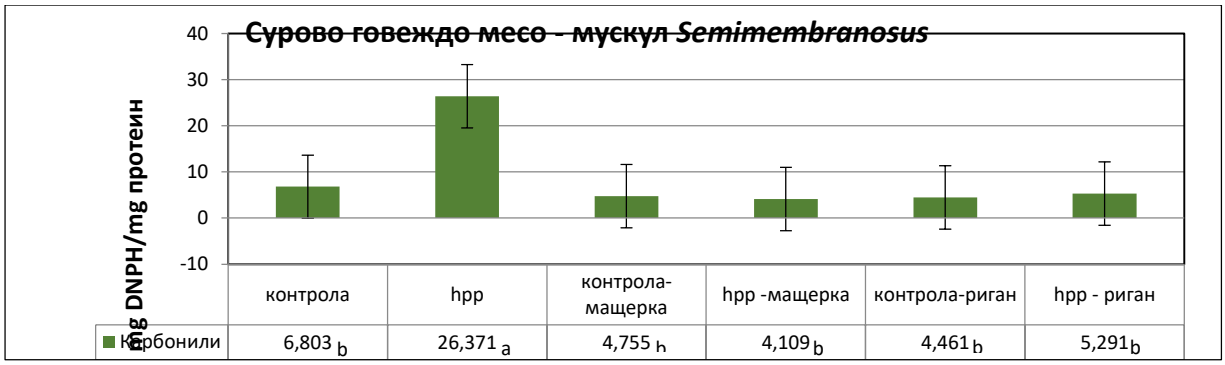
На фиг. 8 и фиг.9 са показани резултатите от изменението на карбонили под въздействието на вложените добавки и технологичната обработка с HPP



Фиг.8 Съдържание на карбонили в сурово говеждо месо при мускулна група *LD*,

Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05)

При мускулна група *LD* установихме, че съдържанието на карбонили достоверно нараства след обработка с HPP, като стойностите варират от 133% при контролната група без добавки до 502% при групата с добавка на риган.



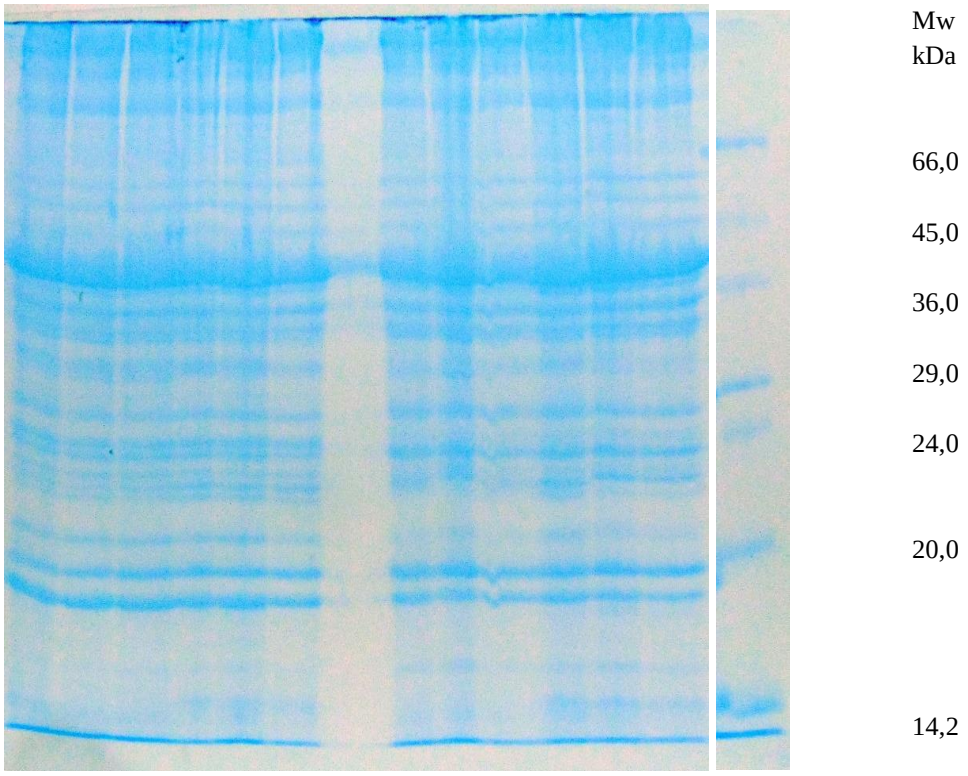
Фиг.9 Съдържание на карбонили в сурово говеждо месо при мускулна група *SM*,

Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05)

При мускулна група *SM* установихме взаимодействие между факторите обработка и , като се отличава групата обработена с високо хидростатично налягане без добавки, при която стойностите са 4 до 6 пъти по-високи спрямо останалите изследвани

групи. Мускулните протеини са податливи на окислителни реакции, причинени от различни инициатори на окисление, като окисляващи липиди, метални йони и други прооксиданти, генерирани по време на обработката на месо, което кореспондира с получените резултати за карбонили в двете мускулни групи. (Estévez et al.,2011).

На фиг.10 **Електрофореза** в полиакриламиден гел SDS-PAGE на мускулни групи Longissimus dorsi и Semimembranosus на говеждо месо дава информация за промени в белтъчния спектър на месните продукти, преди и след HPP третиране и добавяне на биологичноактивни компоненти с цел стабилизиране в процеса на съхранение. Екстрактите не променят броя и интензитета на протеиновите фракции. Не се отчитат разлики и при пробите подложени на обработка с високо налягане (HPP).**Технологичната обработка под високо налягане не променя първичната структура и молекулната маса на основните протеини в месото и от двете мускулни групи. Тези резултати са в съответствие с данните, получени от Csehi et al. (2015)**, според които протеините в говеждото месо (саркоплазмени и миофибриларни) не се променят по време на третиране с високо налягане 600 MPa, не се денатурира и е по – устойчиво на високото налягане за разлика от свинско месо.



Фигура 10. SDS PAGE електрофореза на протеини от говеждо месо при различни варианти на обработка. Легенда: 1-Контрола Musculus semimembranosus (MSm); 2- Musculus semimembranosus (MSm) маринован с риган; 3- Musculus semimembranosus (MSm) маринован с мащерка; 4- контрола Musculus semimembranosus (MSm) третирана с HPP; 5- Musculus semimembranosus (MSm) третирана с HPP и маринован с риган; 6- Musculus semimembranosus (MSm) третирана с HPP и маринован с мащерка; 7- Контрола Musculus longissimus dorsi (MLD); 8- Musculus longissimus dorsi (MLD) маринован с риган; 9- Musculus longissimus dorsi (MLD) маринован с мащерка; 10- контрола Musculus longissimus dorsi (MLD) третирана с HPP; 11- Musculus longissimus dorsi (MLD) третирана с HPP и маринован с риган; 12- Musculus longissimus dorsi (MLD) третирана с HPP и маринован с мащерка; M- протеинов маркер.

4.1.3. Изменения в мастнокиселинния състав на моделна система на мускулни групи *Longissimus dorsi* и *Semimembranosus*

Таблица 3. Групи мастни киселини (g/100g мазнини) на сурово говеждо месо при мускули *Longissimus dorsi* и *Semimembranosus*.

Обработка	Антиоксидант	Σ SFA		Σ MUFA		Σ PUFA		Σ CLA		Σ Branched FA		Σ ω3		Σ ω6		Σ ω6/Σ ω3	
		mLD	m SM	m LD	m.SM	m. LD	m SM	m. LD	m. SM	m.LD	m.SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM
Контрола	без добавки	44.26	48.83	35.62	40.99^{ab}	17.72	8.17	0.459	0.315	1.949	1.698	7.081	2.675	10.635	5.497	1.535	2.248
	мащерка	43.02	53.44	34.44	36.96^{b}	21.00	7.26	0.250	0.355	1.270	1.899	7.142	2.315	13.854	4.942	1.900	2.239
	риган	39.97	47.08	33.82	41.62^{ab}	24.31	9.53	0.246	0.283	1.571	1.493	8.747	3.231	15.564	6.296	1.772	1.868
HPP	без добавки	49.01	43.08	39.02	52.54^{a}	10.20	12.85	0.244	0.261	1.530	1.221	3.242	4.332	6.958	8.522	2.214	1.983
	мащерка	47.20	45.32	42.81	44.47^{a}	8.02	8.30	0.220	0.349	1.740	1.552	2.390	2.800	5.632	5.502	2.384	2.190
	риган	45.00	42.10	42.79	42.35^{a}	10.24	13.92	0.224	0.262	1.752	1.368	3.801	4.872	6.435	9.051	1.856	1.868
Обработка	контрола	42.41^{b}	49.78^{a}	34.63^{b}	39.85	21.01^{a}	8.32^{b}	0.318	0.317	1.597	1.697^{a}	7.657^{a}	2.740^{b}	13.351^{a}	5.578^{b}	1.736^{b}	2.150
	HPP	47.07^{a}	43.50^{b}	41.54^{a}	43.12	9.49^{b}	11.69^{a}	0.230	0.290	1.674	1.380^{b}	3.144^{b}	4.001^{a}	6.342^{b}	7.692^{a}	2.152^{a}	2.014
Антиоксидант	без добавки	46.63	45.95^{ab}	37.32	41.76	13.96	10.51	0.351	0.288	1.740	1.460	5.161	3.504	8.797	7.010	1.875	2.115
	мащерка	45.11	49.38^{a}	38.63	40.71	14.51	7.78	0.235	0.352	1.505	1.726	4.766	2.558	9.743	5.222	2.142	2.215
	риган	42.48	44.59^{b}	38.30	41.98	17.27	11.72	0.235	0.272	1.661	1.430	6.274	4.051	11.000	7.673	1.814	1.916
RMSE (n=24)		**3.27**	**3.81**	**4.85**	**2.28**	**5.52**	**3.61**	**0.113**	**0.083**	**0.302**	**0.312**	**1.960**	**1.374**	**3.865**	**0.076**	**0.371**	**0.380**
Достоверност (P)	обработка	0.011	0.001	0.011	0.002	0.001	0.031	0.123	0.432	0.596	0.021	0.001	0.034	0.002	0.031	0.039	0.383
	добавки	0.126	0.048	0.890	0.482	0.554	0.095	0.164	0.141	0.417	0.125	0.412	0.103	0.624	0.093	0.301	0.285
	обр.*добавки	0.974	0.681	0.568	0.012	0.561	0.522	0.285	0.834	0.068	0.534	0.874	0.607	0.449	0.478	0.395	0.833

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Table 4. Основни мастни киселини (g/100g мазнини) на сурово говеждо месо при мускули *Longissimus dorsi* и *Semimembranosus*

Обработка	Антиоксидант	лауринова C-12:0		палмитинова C-16:0		стаеринова C-18:0		палмитоленова C-16:1n7		хептадеценова C-17:1n7		линолова C-18:2c9,12/19:0		ейкозаценова C-20:3n3		олеинова C-18:1cis-FA	
		m. LD	m.SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM	m. LD	m. SM
Контрола	без добавки	4.73	4.52	19.96	24.59	15.23	16.13	2.04	2.34	4.88	1.61	10.42	5.14	5.51	1.67	25.53	33.23^{ab}
	мащерка	0.64	7.83	20.65	25.07	19.30	15.94	1.34	2.00	2.51	1.69	13.46	4.53	5.27	1.27	27.33	28.96^{b}
	риган	2.76	3.84	19.14	24.48	14.90	15.54	1.64	2.36	6.45	2.20	15.06	6.02	6.84	1.98	22.25	33.34^{ab}
HPP	без добавки	0.23	0.54	22.54	24.75	23.41	14.60	1.50	2.59	0.48	2.00	6.59	8.25	2.40	2.89	34.20	34.52^{a}
	мащерка	0.44	0.60	22.57	25.87	19.04	15.15	2.13	2.80	0.89	1.40	5.38	5.26	1.85	1.68	36.84	36.56^{a}
	риган	1.02	1.59	23.03	23.17	17.66	14.18	2.23	2.65	1.42	2.57	6.07	8.75	2.84	3.22	35.97	33.35^{ab}
Обработка	контрола	2.71^{a}	5.40^{a}	19.92^{b}	24.71	16.47^{b}	15.87	1.67	2.23^{b}	4.61^{a}	1.83	12.98^{a}	5.23^{b}	5.87^{a}	1.64^{b}	25.04^{b}	31.84
	HPP	0.57^{b}	0.91^{b}	23.38^{a}	24.60	20.04^{a}	14.65	1.95	2.68^{a}	0.93^{b}	1.99	6.01^{b}	7.42^{a}	2.37^{b}	2.60^{a}	35.67^{a}	34.81
Антиоксидант	без добавки	2.48	2.53	21.25	24.67	19.32	15.37	1.77	2.46	2.68	1.80	8.50	6.69	3.95	2.28	29.87	33.87
	мащерка	0.54	4.22	20.65	25.47	19.17	15.55	1.74	2.40	1.70	1.54	9.42	4.90	3.56	1.48	32.09	32.76
	риган	1.89	2.71	19.14	23.82	16.28	14.86	1.93	2.51	3.94	2.38	10.57	7.39	4.84	2.60	29.11	33.35
RMSE (n=24)		**1.44**	**2.66**	**1.77**	**2.11**	**3.23**	**1.72**	**0.52**	**0.51**	**1.47**	**0.93**	**3.77**	**2.24**	**1.38**	**1.00**	**5.30**	**2.41**
Достоверност (P)	обработка	0.009	0.001	0.001	0.895	0.037	0.093	0.266	0.041	0.001	0.677	0.002	0.025	0.001	0.027	0.001	0.006
	добавки	0.097	0.374	0.300	0.300	0.226	0.706	0.786	0.914	0.069	0.194	0.647	0.085	0.296	0.081	0.612	0.643
	обр.*добавки	0.067	0.174	0.759	0.588	0.113	0.897	0.093	0.474	0.144	0.693	0.471	0.509	0.857	0.621	0.685	0.009

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

На табл.3 са показани групите наситени, полиненаситени, мононенаситени, спрегнати, конюгирани линолови киселини, сумата ω3, ω6 и тяхното съотношение на сурово говеждо месо при мускулни групи *Longissimus dorsi* и *Semimembranosus*. На табл. 5 са показани някои от основните мастни киселини, чиито дял съставлява около 80% от общия им сбор.

При мускулна група *LD* установихме че прилагането на HPP обработка води до достоверно увеличаване на наситените и мононенаситените мастни киселини с 5 и 7%, за сметка на намаляване на полиненаситените мастни киселини с около 12%. Като логично следствие от това регистрираме намаляване на Σ ω3 и Σ ω6 мастни киселини, както и нарастване съотношението между тях. При тази мускулна група не е установено достоверно влияние на вложените антиоксиданти. Регистрираме минимално покачване на съдържанието на поли- и мононенаситени мастни киселини за сметка на понижаването на наситени мастни киселини.

При мускулна група *SM* обаче получихме противоположно въздействие на обработката с HPP по отношение на някои групи мастни киселини. Достоверно се повишава с около 3% съдържанието на полиненаситените мастни киселини за сметка на намаляване съдържанието на наситените мастни киселини в същия порядък. Регистрираме също увеличаване на Σω3 и Σω6 мастни киселини, докато тяхното съотношение се запазва. При тази мускулна група установихме и достоверно влияние на взаимодействието между двата фактора – обработка с HPP и влияние на вложените етерични масла от мащерка и риган върху съдържанието на мононенаситени мастни киселини, където получихме с 4,6 до 15,6% по-ниски стойности на нетретираната с HPP група с добавка на мащерка спрямо групите третирани с HPP.

При разглеждане резултатите на влиянието на факторите обработка и антиоксиданти върху някои от основните мастни киселини при мускулна група *LD* установихме достоверно намаляване съдържанието на лауриновата, хептадеценовата, линолова и ейкозаценоната киселина, както и увеличаване на палмитиновата, стеариновата и цис изомерите на олеионовата киселина под въздействие на обработка с високо хидростатично налягане. Не е установено влияние на вложените антиоксиданти.

При мускулна група *SM* установихме нарастване на стеариновата, палмитоленовата, линоловата и ейкозаценовата киселина, както и намаляване на съдържанието на лауринова киселина след обработка с HPP. При тази мускулна група е налице и доказано взаимодействие между двата фактора при групата мастни киселина с най- голям дял в говеждото месо – цис изомерите на олеиновата киселина, където при групите без добавка и с добавка мащерка регистрираме достоверно по-високи стойности спрямо необработената с HPP група с мащерка.

Установено е нарастването на наситените мастни киселини, което е индикатор за липидно окисление при технологичната обработка на мускули *Longissimus dorsi,* докато при мускули *Semimembranosus* тя води до подобряване на мастнокиселинния състав по отношение на наситени и транс мастни киселини. Причините за това вероятно са в различното съдържание на интермускулатурни липиди в двата вида мускули.

4.1.4. Изменения в микробния статус на моделна система на мускулни групи Longissimus dorsi и Semimembranosus на говеждо месо

Резултатите от микробиологичните изследвания на двата мускула при третиране с HPP и обработка с воден извлек от мащерка и риган, показват че за общ брой аеробни

(ОБМ) мезофилни и психротрофни микроорганизми, както й съдържанието на плесени и дрожди в изследваните проби говеждо месо са в допустимите норми, спрямо изискванията на БДС и ISO. За **ОБМ** (m.Sm/CFU/g - за контрола -1.5. 10^6**,** след HPP - 2.10^2, HPP с мащерка и риган - $<1x10^2$**),** за (m.Ld/CFU/g – контрола, след HPP - $1.6.10^2$, HPP с мащерка - $<1x\ 10^1$, и риган - $<1x\ 10^1$). **Плесени и дрожди** (m.Sm/CFU/g -$4x10^2$ за контрола, след HPP - 1.10^2, HPP с мащерка и риган $<1x\ 10^2$), за (m.Ld/CFU/g – контрола $2x10^2$, след HPP - $1.6x10^?$, HPP с мащерка $<1.1x\ 10^2$, проби с HPP с риган - $1.1.\ 10^2$). Резултатите показват и затвърждават научно доказаните свойства на мащерката, че е силен антисептик. Отсъствието на Колиформи, Салмонела, Листерия, Коаголазоположителни стафилококи, Анаеробни сулфитредуциращи клостридии доказва чистотата и годността за употреба на изследваното говеждо месо. В тази връзка прилагането на HPP обработка при 600 MPa беше доказано, че е много ефективен метод за намаляване на бактериалното натоварване и води до удължаване на безопасния срок на годност на охладени месни продукти. Способността на психротрофните микроорганизми да се възстановяват в месо при ниски температури, се явява като критичен фактор при оценка на резултатите от HPP обработка.

4.1.5. Органолептичен анализ

Направеният в Институт по криобиология и хранителни технологии (ИКХТ) – София, бул. Черни връх № 53 органолептичен анализ, участваха 5 лица от института с опит. Всички са жени на възраст над 50 г. Извършеният анализ включваше: Месните проби от (**m. *Longissimus dorsi***) (m.***Semimembranosus***)** Резултатите показват, че изпечените месни проби от (**m. *Longissimus dorsi***) (m.***Semimembranosus*)*,*** показва, че обработеното с HPP чисто месо беше леко сухо, повече за *SM*. Мащерката предава приятен аромат, но необичаен вкус. Риганът е неприемлив, като извлек поради горчивият вкус.

4.2 Предварителни опити за установяване, необходимостта от използването на различни адитиви – добавки с цел подобряване цвета и органолептичните характеристики на мляно месо - от мускули *Semimembranosus* (m.SM), като втора част на анализа. Органолептичен анализ.

* Направеният сензорен анализ, не включва студена пастьоризация и не води до допълнителни изменения в органолептичните усещания.

Табл. 5 Сензорен анализ на мляно говеждо месо от мускул *Semimembranosus (m.SM)* с различни добавки

Изследвана проба	Експозиция	Сензорна оценка
0,05 % етерично масло от риган: 0,025 ml= 25 µl в 50 гр. Месо;	3 дни	Слаб аромат на етерично масло от риган и вкус в месото.
0,1 % етерично масло от риган: 0,050 ml= 50 µl в 50 гр. Месо;	3 дни	вкусът на проба с 0,1 % етерично масло от риган е приятен, а аромата на подправка е приемлив.
0,15 % етерично масло от риган: 0,075 ml= 75 µl в 50 гр. Месо;	3 дни	Все още натрапчив аромат на масло от риган, но и леко горчив вкус на месото.
0,2 % етерично масло от риган: 0,100 ml= 50 µl в 50 гр. Месо;	3 дни	Силен аромат на етерично масло от риган и неприятен горчив вкус на месото.

0,1 % сух риган : 0,05 гр. в 50 гр. месо;	3 дни	Сухите подправки, не променяха вкусът и аромата, както е резултата от действието на етеричното масло. При сдъвкването им остава неприятно усещане от сухите части на стеблата на ригана.
0,2 % сух риган : 0,10 гр. в 50 гр. месо;	3 дни	Сухите подправки, не променяха вкусът и аромата, както е резултата от действието на етеричното масло. При сдъвкването им остава неприятно усещане от сухите части на стеблата на ригана.
0,3 % сух риган : 0,15 гр. в 50 гр. месо.	3 дни	Сухите подправки, не променяха вкусът и аромата, както е резултата от действието на етеричното масло. При сдъвкването им остава неприятно усещане от сухите части на стеблата на ригана.
0,1 % Натриев лактат /80%/ = 0,125 мл.= 0,0625 мл в 50 гр. месо	3 дни	Натриевият лактат предава влажност на месото.
0,1 % Натриев лактат /60 %/ = 0,167 мл. . 60 %= 0,01% в 50 гр. месо	3 дни	Натриевият лактат предава сочност и влажност на месото, като по-ниският процент дава по-приятно сензорно усещане.
0,3 % Медолива Плюс = 0,15 гр. в 50 гр. месо	3 дни	„Медолива Плюс“ предава приятен маслен вкус и аромат на зехтин, спомага за по-наситен тъмно червен цвят на мляното месо.
0,5 % Медолива Плюс = 0,25 гр. в 50 гр. месо	3 дни	По – високата концентрация не води до приемливи органолептични характеристики, като вкус, аромат и цвят.

4.3 Втори етап - мляно месо от мускули *Semimembranosus* (*m.SM*), обработено с HPP, самостоятелно и в съчетание с антиоксиданти или антимикробни средства.

4.3.1.Физикохимични показатели и цветови характеристики, липидно окисление.

Експерименталният дизайн е разделен на 3 групи. В група А е изследвано влиянието върху изследваните показатели при различни режими на обработка с HPP. При групи В и С е изследвано влиянието на различни антиоксиданти в съчетание с HPP.

Група А: А1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка; А2. от говеждо месо, вакуум опаковка, с HPP обработка+ 580MPa x 4мин; А3. от говеждо месо, вакуум опаковка + 580MPa x 8мин;
Група В: В1. от говеждо месо + HPP обработка+ 580MPa x 4мин; В2. от говеждо месо + HPP + Медолива Плюс (Medoliva Plus) 0,3 %; В3. от говеждо месо + HPP + Натриевият лактат 0,3 %;
Група С: С1. от говеждо месо + HPP обработка+ 580MPa x 4мин; С2 от говеждо месо + HPP + Медолива 0,1 %; С3. от говеждо месо + HPP + Цвекло 0,1 %; С4. от говеждо месо + HPP + Червена репичка 0,1 %; С5. от говеждо месо + HPP + Розмарин 0,1 %.

На табл. 6 са показани резултатите за физикохимични показатели, цветови характеристики и липидно окисление на различни режими на обработка с HPP

Табл.6 Физикохимични показатели и липидно окисление на сурово говеждо месо, обработено с високо хидростатично налягане

Обработка	Съхранение	pH	ВЗС (%)	L	a	b	липидно окисление, mg МДА / kg месо
A1	5 дни	$5,68^{d}$	$34,71^{ab}$	$46,17^{e}$	$25,50^{a}$	$10,60^{bc}$	0,069
	20 дни	$5,47^{e}$	$18,44^{c}$	$47,07^{e}$	$26,03^{a}$	$9,80^{c}$	0,160
	40 дни	$5,38^{e}$	$23,43^{bc}$	$51,40^{d}$	$18,97^{b}$	$7,23^{d}$	0,225
A2	5 дни	$5,83^{abc}$	$39,04^{a}$	$61,83^{ab}$	$12,20^{c}$	$11,93^{bc}$	0,115
	20 дни	$5,86^{abc}$	$40,11^{a}$	$58,43^{bc}$	$18,67^{b}$	$15,03^{a}$	0,172
	40 дни	$5,79^{bcd}$	$34,59^{ab}$	$62,50^{a}$	$11,90^{c}$	$10,33^{bc}$	0,261
A3	5 дни	$5,87^{ab}$	$38,05^{a}$	$58,27^{c}$	$11,40^{c}$	$12,40^{b}$	0,146
	20 дни	$5,73^{cd}$	$23,73^{bc}$	$54,23^{d}$	$17,13^{b}$	$15,03^{a}$	0,179
	40 дни	$5,94^{a}$	$35,12^{ab}$	$64,70^{a}$	$9,80^{c}$	$10,60^{bc}$	0,261
Ефект							
Обработка	A1	5,51	25,53	48,21	23,50	9,21	$0,151^{b}$
	A2	5,83	37,91	60,92	14,26	12,43	$0,182^{a}$
	A3	5,85	32,30	59,06	12.78	12,68	$0,195^{a}$
Съхранение	5 дни	5,79	37,26	55,42	16,37	11,64	$0,110^{c}$
	20 дни	5,70	27,43	53,24	20,61	13,29	$0,170^{b}$
	40 дни	5,79	31,05	59,53	13,56	9,39	$0,249^{a}$
RMSE (n=27)		**0.05**	**4.53**	**1.23**	**1.00**	**0.75**	**0.021**
Достоверност	обработка	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P=0.0011
	съхранение	P=0.0003	P=0.0008	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
	обр.*съхр.	P<0.0001	P=0.0112	P=0.0002	P=0.0001	P=0.0027	P=0.2265

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Според получените резултати на табл. 6 установяваме доказан ефект от взаимодействието на факторите: обработка и съхранение при всички изследвани показатели с изключение на липидното окисление, където и двата фактора влияят самостоятелно. Най-високи стойности по отношение на **pH** са групата обработена с по-висока продължителност на въздействието с HPP при срок на съхранение 40 дни, а най-ниска при необработената с HPP контрола за същия период на съхранение. Тенденцията е към нарастване на стойностите на показателя след обработка с HPP, като при по-продължителната обработка получаваме по-високи стойности. **Водозадържащата** способност се увеличава след въздействие с HPP, докато с увеличаване времето на съхранение стойностите на показателя намаляват. Аналогична тенденция се наблюдава и при яркостта на месото. **Червената компонента** достоверно намалява след приложената обработка, а **жълтата** се увеличава. Резултатите по време на съхранение, остават стабилни, както резултатите от анализа на McArdle, 2010, който съобщава, че стойностите на L* при налягане (35, 45, 55 ◦C, 400, 600 MPa) пробите от говеждо месо остават стабилни по време на съхранение (за 30 дни при +4 ◦C) и показват, че L*стойностите на контролните проби са по-ниски ($p < 0.001$) от тези на пробите под налягане по време на съхранението. По-светлият вид се дължи на денатурация на миглобин и/или изместване или освобождаване на хем група от Carlez et al.1995, При **липидното окисление** установихме, че след обработка с HPP стойностите на показателя се увеличават, както е установено от Sert, 2022 , че стойностите на МДА на всички проби са по-високи от очакваните за началото на съхранението . Това може да се отдаде на факта, че месото е преминало два пъти през машина за смилане, преди да бъде обработено с HPP. При другите показатели най-забележимо е влиянието на срока на

съхранение върху **водозадържащата** способност в посока намаляване и върху яркостта на месото в посока нарастване с увеличаване продължителността на съхранение.

Като цяло отчитаме положително действие на обработката с HPP, без съществени разлики при двата вида продължителност на обработка. По тази причина избрахме варианта с продължителност от 4 min. обработка за по-нататъшни изследвания като икономически по-целесъобразен.

На табл. 7 са показани резултатите на физикохимични показатели, цветови характеристики и липидно окисление при групи мляно говеждо месо обработено с HPP и вложени антиоксиданти + Медолива Плюс (Medoliva Plus) 0,3 % и натриевият лактат 0,3 %.

Табл.7 Физикохимични показатели и липидно окисление на мляно говеждо месо, обработено с високо хидростатично налягане и антиоксиданти

Обработка	Съхранение	pH	ВЗС (%)	L	a	b	липидно окисление, mg МДА / kg месо
B1	5 дни	5.83	39.04	61.83^{cd}	12.20^{b}	11.93	0.115
	20 дни	5.86	40.11	58.43^{e}	18.67^{a}	15.03	0.172
	40 дни	5.79	34.59	62.50^{bc}	11.90^{b}	10.33	0.261
B2	5 дни	5.99	42.93	59.87^{de}	12.43^{b}	11,.67	0.100
	20 дни	5.93	41.42	58.30^{e}	18.73^{a}	15.23	0.151
	40 дни	5.86	36.15	60.53^{cde}	12.17^{b}	10.87	0.222
B3	5 дни	5.85	40.21	64.57^{ab}	9.80^{b}	11.67	0.198
	20 дни	5.67	30.30	66.17^{a}	11.40^{b}	15.30	0.206
	40 дни	5.67	37.00	64.97^{ab}	11.63^{b}	10.33	0.308
Ефект							
Обработка	B1	5.83^{ab}	37.91	60.92	14.26	12.43	0.182^{ab}
	B2	5.93^{a}	40.17	59.57	14.44	12.59	0.158^{b}
	B3	5.73^{b}	35.84	65.23	10.94	12.43	0.237^{a}
Съхранение	5 дни	5.89^{a}	40.73	62.09	11.48	11.76^{b}	0.138^{b}
	20 дни	5.82^{ab}	37.28	60.97	16.27	15.19^{a}	0.176^{b}
	40 дни	5.77^{b}	35.91	62.67	11.90	10.51^{c}	0.263^{a}
RMSE (n=27)		**0.09**	**6.12**	**0.90**	**0.97**	**0.63**	**0.053**
Достоверност	обработка	P=0.0005	P=0.3463	P<0.0001	P<0.0001	P=0.8350	P=0.0154
	съхранение	P=0.0316	P=0.2545	P=0.0029	P<0.0001	P<0.0001	P=0.0003
	обр.*съхр.	P=0.3308	P=0.3714	P=0.0006	P<0.0001	P=0.7868	P=0.9194

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Показателят на **киселинност** достоверно се увеличава при групата с антиоксидант „Медолива“. За същия показател установихме достоверно намаляване на стойностите след 40 дни съхранение. При **водозадържащата** способност не открихме достоверни разлики между различните изследвани групи. Marcos et al. (2010) откриха отрицателна корелация между разтворимостта на саркоплазмения протеин и изразена влага в говеждото от m. *Longissimus dorsi* мускул, което предполага, че предизвиканата от налягането денатурация на саркоплазмени протеини би могла да влияе отрицателно до известна степен на свързването на вода в меса под налягане.

Установихме доказано взаимодействие между факторите обработка и съхранение при цветовите характеристики яркост и червена компонента на месото. Добавката на натриев лактат води до повишаване **яркостта** на месото. При **червената компонента** се отличават групите B1 и B2 при съхранение 20 дни, където установихме достоверно по-високи стойности за този показател спрямо всички останали групи. Влиянието на

вложените антиоксиданти върху **липидното окисление** е незначително. При нито един от двата не установихме достоверни разлики спрямо необработената група. При този показател очаквано регистрираме достоверно нарастване след съхранение.

На табл. 8 са показани резултатите за физикохимични показатели, цветови характеристики и липидно окисление при групи мляно говеждо месо обработено с HPP и вложени различни антиоксиданти в концентрация 0,1%.

Табл.8 Физикохимични показатели и липидно окисление на мляно говеждо месо, обработено с високо хидростатично налягане и антиоксиданти

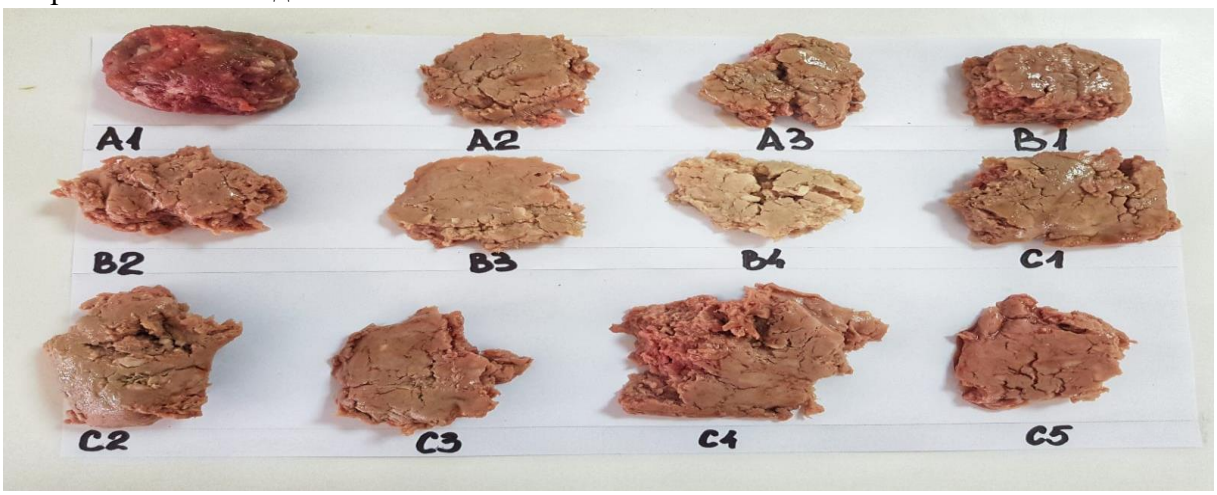
Обработка	Съхранение	pH	ВЗС (%)	L	a	b	липидно окисление, mg МДА / kg месо
C1	5 дни	5.86^{bc}	36.02	61.07^{bcde}	11.90	11.93	0.114^{d}
	20 дни	5.71^{d}	34.37	59.47^{efg}	12.40	13.97	0.181^{cd}
	40 дни	5.86^{bc}	34.59	62.50^{abcd}	11.90	10.33	0.261^{ab}
C2	5 дни	5.82^{bcd}	43.77	59.20^{efg}	12.93	11.93	0.161^{cd}
	20 дни	5.80^{cd}	29.22	60.67^{cdef}	12.67	14.50	0.165^{cd}
	40 дни	5.85^{bc}	39.24	61.03^{bcdef}	12.67	10.80	0.219^{bc}
C3	5 дни	5.84^{bc}	41.90	59.87^{defg}	15.30	11.40	0.125^{d}
	20 дни	5.80^{cd}	37.45	57.13^{g}	15.83	13.23	0.274^{ab}
	40 дни	5.87^{abc}	38.53	61.43^{bcde}	14.77	10.60	0.303^{a}
C4	5 дни	5.87^{abc}	41.89	62.63^{abc}	13.20	10.60	0.172^{cd}
	20 дни	5.93^{ab}	29.93	58.30^{fg}	16.10	13.17	0.216^{bc}
	40 дни	5.98^{a}	36.26	63.07^{abc}	12.40	9.80	0.284^{ab}
C5	5 дни	5.87^{abc}	36.26	63.50^{ab}	13.19	10.97	0.119^{d}
	20 дни	5.76^{cd}	30.62	61.47^{bcde}	13.70	13.70	0.170^{cd}
	40 дни	5.92^{ab}	33.79	64.30^{a}	13.17	10.80	0.213^{bc}
Ефект							
Обработка	C1	5.81	34.99^{ab}	61.01	12.07^{c}	12.08^{a}	0.185
	C2	5.82	37.41^{ab}	60.30	12.76^{bc}	12.41^{a}	0.181
	C3	5.84	39.30^{a}	59.48	15.30^{a}	$12,.08^{a}$	0.234
	C4	5.92	36.03^{ab}	61.33	13.90^{b}	11.19^{b}	0.224
	C5	5.85	33.55^{b}	63.09	13.35^{b}	11.82^{ab}	0,.167
Съхранение	5 дни	5.85	39.97^{a}	61.25	13.30^{b}	11.37^{b}	0.138
	20 дни	5.80	32.32^{b}	59.41	14.14^{a}	13.91^{a}	0.201
	40 дни	5.90	36.48^{a}	62.47	12.98^{b}	10.47^{c}	0.256
RMSE (n=45)		**0.04**	**3.27**	**0.91**	**0.91**	**0.51**	**0.024**
Достоверност	обработка	P<0.0001	P=0.0091	P<0.0001	P<0.0001	P=0.0003	P<0.0001
	съхранение	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P=0.0047	P<0.0001	P<0.0001
	обр.*съхр.	P=0.0044	P=0.0521	P=0.0009	P=0.0533	P=0.5007	P=0.0009

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05)

Установихме доказано взаимодействие между обработката с различни антиоксиданти и срока на съхранение при показателите **pH, яркост** на месото и **липидно окисление.** Въпреки това по отношение на първите 2 показателя разликите между различните варианти са твърде малки, като абсолютна стойност и не ни позволяват да правим по-категорични заключения. При **киселинността** най-ниска стойност получаваме при необработената с антиоксидант група С1след 20 дни съхранение, а най-висока при групата обработена с антиоксидант репичка след 40 дни съхранение. Повишаването на pH след HPP, според (Mandava et al., 1994) се дължи на намаляване на наличните киселинни групи в месото като резултат от конформационни промени, свързани с денатурация на протеини.

При **яркостта** на месото най-ниска стойност регистрираме при група С3 с антиоксидант червено цвекло след 20 дни съхранение, а най-висока при розмарина – група С5 след 40 дни съхранение. По отношение на показателя **липидно окисление** разликите между отделните варианти са достатъчно високи, за да можем да направим някои по-категорични заключения. Тенденцията на нарастване с увеличаване срока на съхранение е очевидна. Влиянието на вложените антиоксиданти от червено цвекло има негативен ефект, изразен в увеличаване на стойностите на показателя спрямо нетретираната група след 20 дни съхранение.

При останалите показатели установихме самостоятелно действие на факторите обработка и съхранение. Влиянието на различните антиоксиданти върху **водозадържащата** способност е най-осезаемо при групата с добавено цвекло, където регистрираме най-висока стойност, при този антиоксидант получаваме и най-високата стойност на червената компонента. Докато при **жълтата компонента** се отличава варианта с антиоксидант червена репичка, където установяваме по-ниски стойности спрямо останалите изследвани групи. Влиянието на съхранението се изразява в намаляване на водозадържащата способност и увеличаване на червената и жълтата компонента на месото при групите съхранявани 20 дни в сравнение с групите съхранявани 5 и 40 дни.



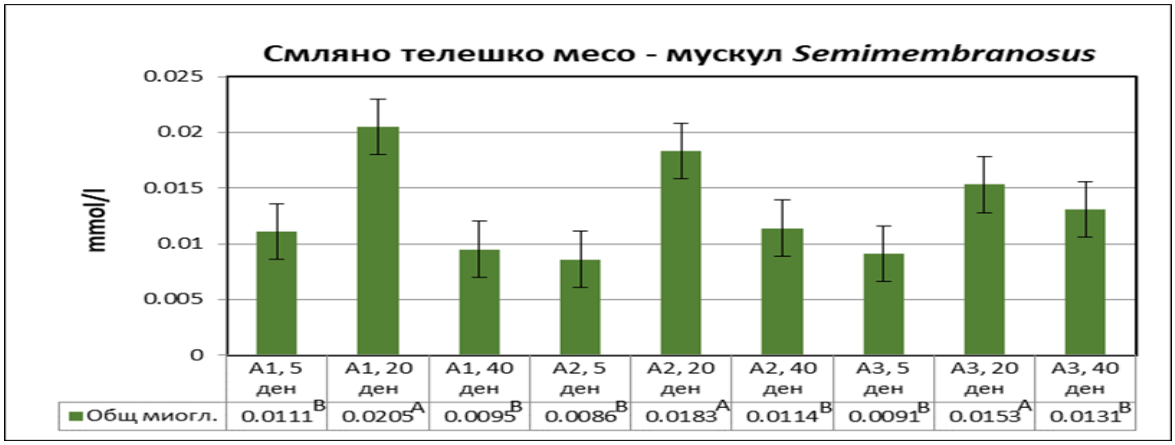
Фигура 11. Снимка на пробите на 5 -ти ден от изследването - измененията в инструментално заснетите цветови характеристики.

Легенда: А1. Мляно говеждо без HPP обработка; А2. Мляно говеждо с HPP обработка+ 580MPa x 4мин; А3. Мляно говеждо + 580MPa x 8мин; В1. Мляно говеждо + HPP; В2 Мляно говеждо + HPP + Медолива Плюс 0,3 % ;В3. Мляно говеждо + HPP + натриев лактат 0,3 %; С1 Мляно говеждо + HPP; С2 Мляно говеждо + HPP + Медолива 0,1 %;С3. Мляно говеждо + HPP + Цвекло 0,1 %;С4. Мляно говеждо + HPP + Червена репичка 0,1 %; С5. Мляно говеждо + HPP + Розмарин 0,1 %

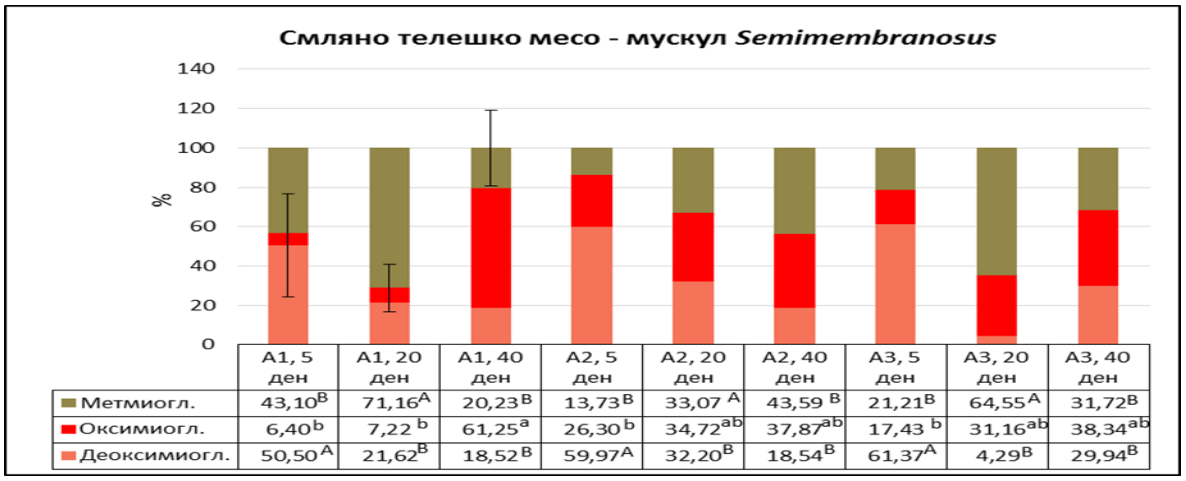
4.3.2. Миоглобин и неговите форми, определяне на промени в белтъка на месото

На фиг.12 и фиг.13 са показани резултатите от направените изследвания върху показателя общ миоглобин на смляно говеждо месо при различна продължителност на обработка с HPP.

Според получените резултати на фиг. 12 не установихме промяна в съдържанието на общ миоглобин след третиране с HPP. Достоверни разлики се наблюдават само след съхранение 20 дни спрямо групите съхранявани 5 и 40 дни.



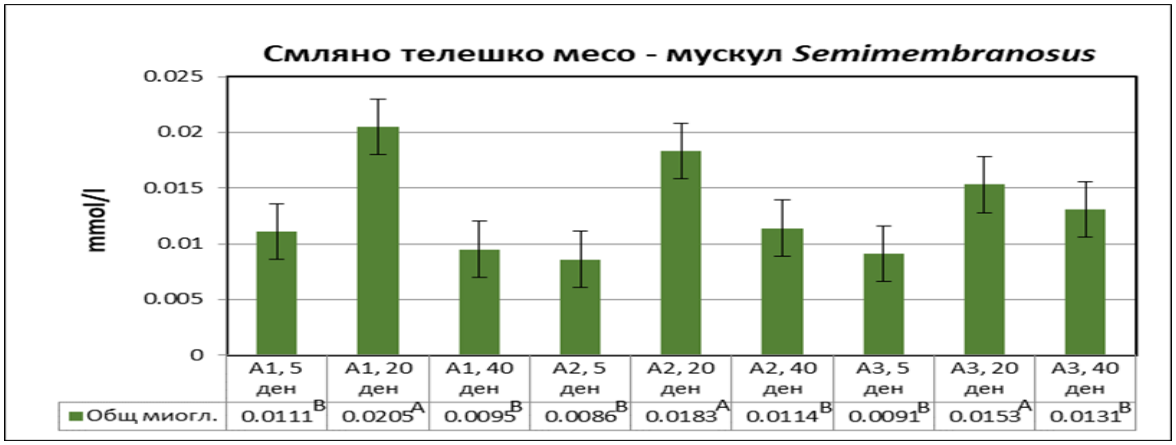
Фиг.12 Съдържание на общ миоглобин в мляно говеждо месо - мускул *Semimembranosus, Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).*



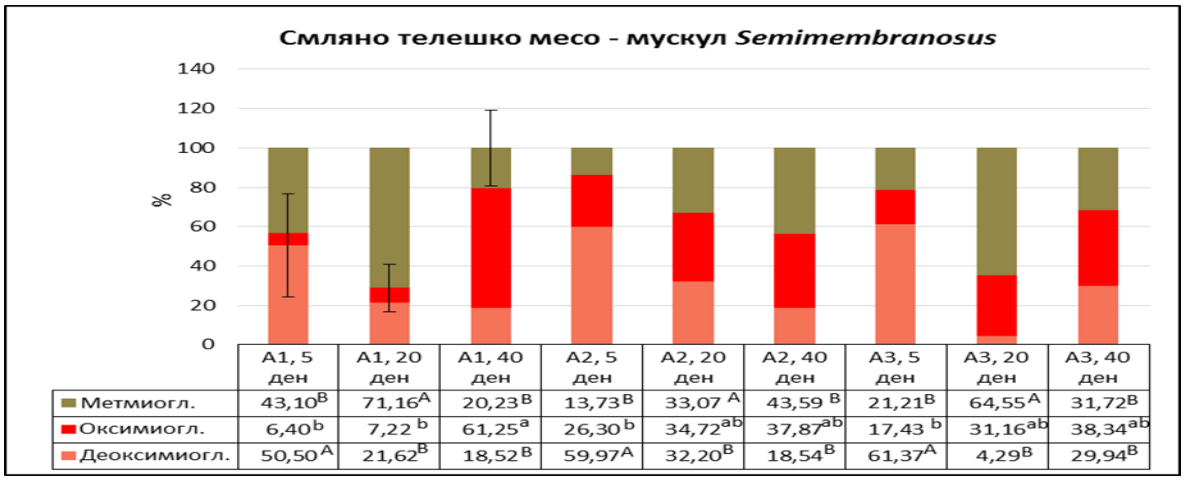
Фиг.13 Форми на *миоглобина* на мляно говеждо месо

Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05), като малките буквени при оксимиоглобина показват наличие на взаимодействие между двата фактора, а големите буквени означения са свързани със срока на съхранение

На фиг. 13 е показан ефекта от налягане 580 MPa върху мляно говеждо месо SM, с изключение на контролата A1 (необработена с HPP) се наблюдава деградация при почти всички анализирани проби. В потвърждение на Cheah и Ledwar 1996, които съобщават, че HPP, причинява значителни промени в цвета, като влияе на миоглобина в протеинова структура при налягане 400 MPa предизвиква необратима денатурация на миоглобин, а месото придобива сиво-кафяв цвят. Според получените резултати за формите на миоглобина установяваме намаляване на съдържанието на деоксимиоглобин за целия период на съхранение и увеличаване на съдържанието на метмиоглобин след 20 дни съхранение. При оксимиоглобина получихме несъразмерно високи стойности на концентрацията при нетретираната група за срок от 40 дни съхранение спрямо групите съхранявани 5 и 20 дни.



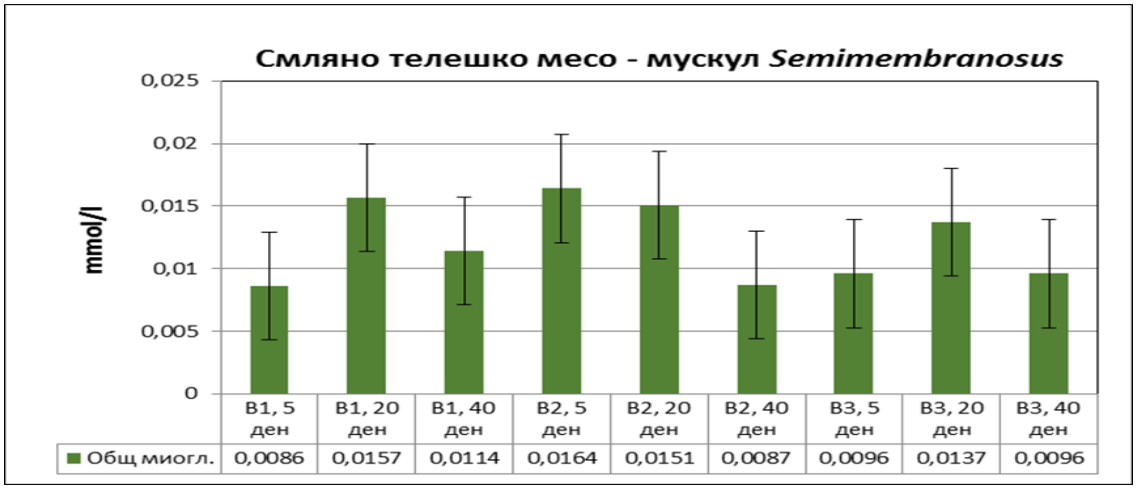
Фиг.12 Съдържание на общ миоглобин в мляно говеждо месо - мускул *Semimembranosus, Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).*



Фиг.13 Форми на *миоглобина* на мляно говеждо месо

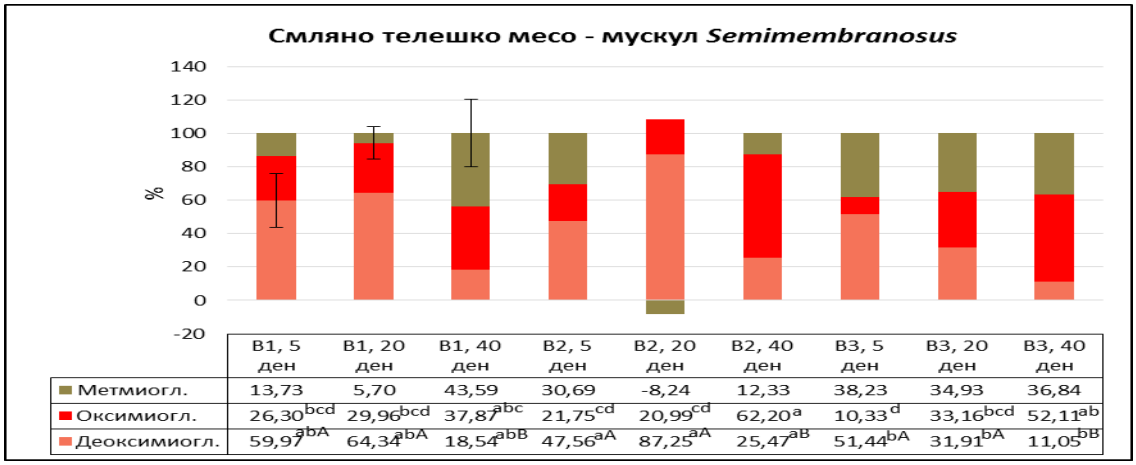
Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05), като малките буквени при оксимиоглобина показват наличие на взаимодействие между двата фактора, а големите буквени означения са свързани със срока на съхранение

На фиг. 13 е показан ефекта от налягане 580 MPa върху мляно говеждо месо SM, с изключение на контролата A1 (необработена с HPP) се наблюдава деградация при почти всички анализирани проби. В потвърждение на Cheah и Ledwar 1996, които съобщават, че HPP, причинява значителни промени в цвета, като влияе на миоглобина в протеинова структура при налягане 400 MPa предизвиква необратима денатурация на миоглобин, а месото придобива сиво-кафяв цвят. Според получените резултати за формите на миоглобина установяваме намаляване на съдържанието на деоксимиоглобин за целия период на съхранение и увеличаване на съдържанието на метмиоглобин след 20 дни съхранение. При оксимиоглобина получихме несъразмерно високи стойности на концентрацията при нетретираната група за срок от 40 дни съхранение спрямо групите съхранявани 5 и 20 дни.



Фиг.14 Съдържание на общ миоглобин в мляно говеждо месо обработено с антиоксиданти от група В

При изследване съдържанието на общ миоглобин на фиг. 14 смляно говеждо месо обработено с „Медолива“ 0,3% и натриев лактат не бяха установени достоверни разлики между отделните групи. Прави впечатление голямата стойност на стандартната грешка на модела, което вероятно се дължи от една страна на малкия брой проби, а от друга в различните начални състояния на месото, които е възможно да са свързани с различен период след клане или различен начин на съхранение преди закупуване на пробите.

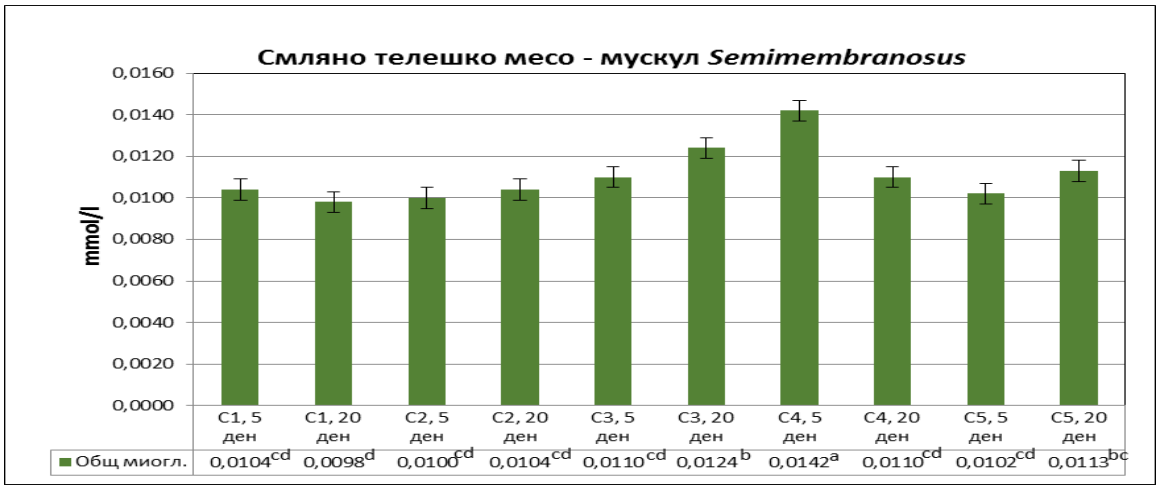


фиг15. Форми на *миоглобина* на мляно говеждо месо при групи В.

Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05), като малките буквени при оксимиоглобина показват наличие на взаимодействие между двата фактора, малките буквени означения деоксимиоглобина показват наличие на достоверни разлики между групите обработени с различен антиоксидант, а големите буквени означения са свързани със срока на съхранение

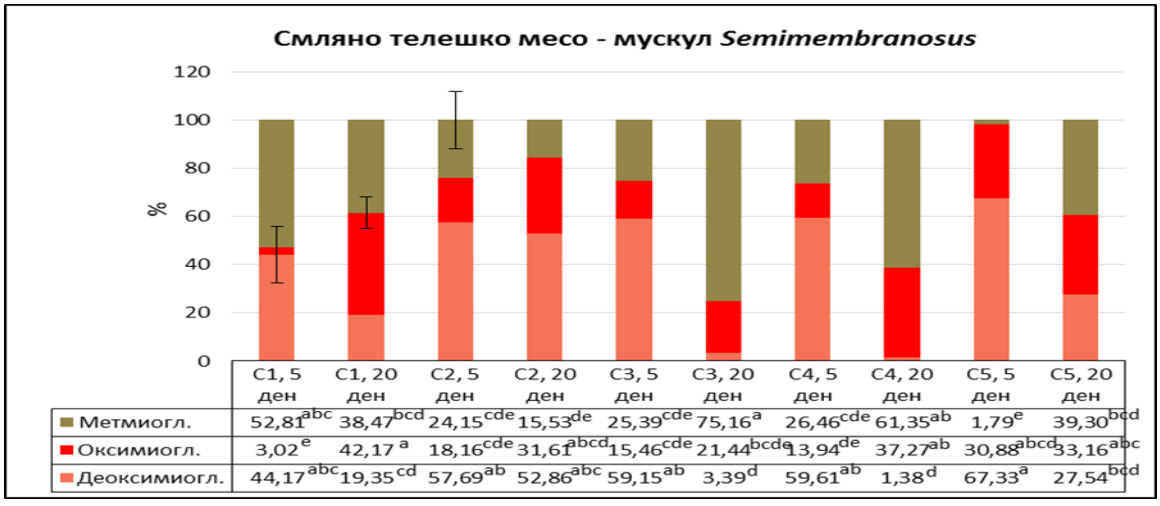
По отношение на продуктите на миоглобина на фиг. 15 установихме достоверни въздействие на вложените антиоксиданти и срок на съхранение при показателя деоксимиоглобин и взаимодействие между двата фактора при показателя оксимиоглобин, докато при метмиоглобина не установихме достоверни различия. Въпреки това поради изложените по-горе съображения за общия миоглобин, считаме, че не можем да правим някакви категорични заключения при тълкуването резултатите за тези показатели. Комбинираното действие на HPP и 0,3 % „Медолива Плюс“(B2),

показва най- ниски стойности на метмиоглобин, предполагаме че е благодарение на високото ниво на полифеноли.



Фиг.16 Съдържание на общ миоглобин в мляно говеждо месо, обработено с антиоксиданти от група С, *Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).*

При изследване влиянието на вложените антиоксиданти от група С и времето на съхранение за мляно говеждо месо получихме достоверно взаимодействие между двата фактора. Най-високи стойности за този показател получихме при групите с антиоксидант червено цвекло при съхранение 20 дни и червена репичка съхранявани 5 дни, където установихме по-високи стойности спрямо всички останали групи. Стойностите на миоглобин варират в широки граници от 0,0098 до 0,0142. По–високите стойности се дължат на комбинираното действие на антиоксидантите. Най-положителен ефект, както от колориметричното изследване, така и от спектрометричното е на 0,1 % прах от Цвекло (С3), 0,1 % Червени репички (С4)

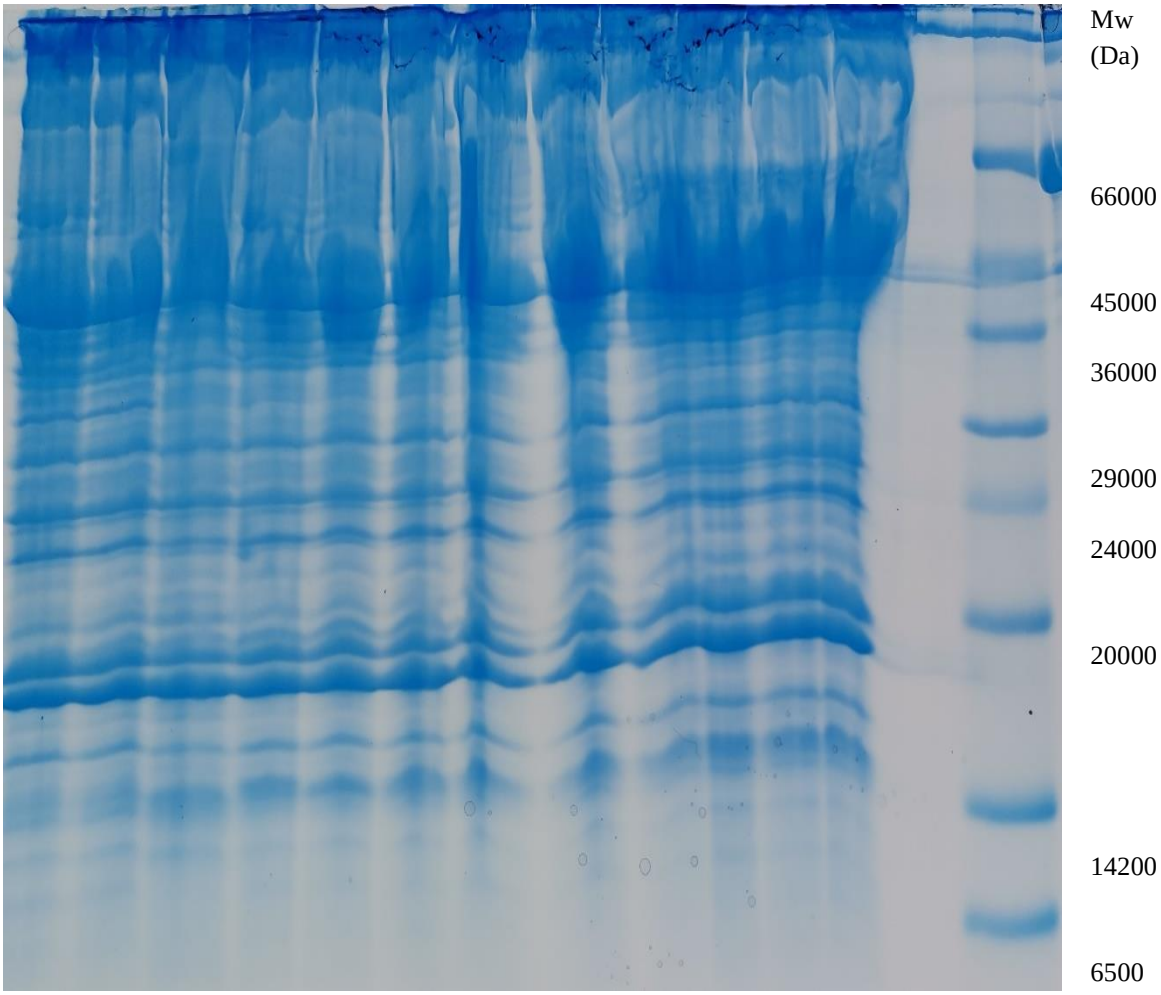


Фиг. 17. Форми на *миоглобина* на мляно говеждо месо при групи В. *Заб. Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05), като различните буквени означения са свързани с достоверни разлики при доказано взаимодействие между двата фактора при всички показатели*

Влиянието на времето на съхранение и вложените антиоксиданти от група С върху формите на миоглобина са показани на фиг. 17. Установено е доказано

взаимодействие на двата фактора и при 3-те изследвани показателя. Взаимодействие между 2 фактора се коментира трудно по принцип, особено при наличие ва такива големи стойности на стандартната грешка, каквито получаваме в използвания от нас модел. Все пак можем да отбележим достоверното намаляване стойностите на деоксимиоглобина и увеличаване на оксимиоглобина при по-дълъг период на съхранение, както и ниските нива на метмиоглобина при групата с добавка на „Медолива“ – С2 в сравнение с групата без антиоксидант – С1. Тези резултати с оглед параметрите на обработка с високо налягане е в съответствие с McArdle, който установява, че съотношението на оксимиоглобина намалява в диапазон от 400–500 MPa, за сметка на повишените стойности на метмиоглобин, но от таблицата става ясно, че комбинацията с антиоксиданти подобрява значително количеството на оксимиоглобин в изследваните проби. Въпреки това, както и други изследвания констатират по отношение на цвета, денатурацията на миоглобин под налягане е подобна на денатурацията в следствие топлина, киселина и урея и това отчасти се дължи на прекъсването на хидрофобните взаимодействия (McArdle et al.2010)

На фиг. 18 е показан протеиновите профили на пробите, определени чрез SDS-PAGE при редуциращи условия според Laemmli (1970). При необработеното с HPP мляно месо (1 и 2) се наблюдават множество ивици, съответстващи на протеиновия профил на говеждо месо. Открояват се интензивните фракции, отговарящи по молекулна маса на съкратителните белтъци – актин и миозин. Подобна е картината и при месото, обработено с HPP и различни различни и антиоксиданти (от 3 до 12). Различните антиоксиданти и HPP обработка **не показват промяна в интензитета на протеиновите фракции.** Разтворимостта на миозин лека верига се увеличава с увеличаване на налягането, както се демонстрира в изследване на Hanjun Ma.



Фигура 18. SDS-PAGE на проби от мляно говеждо месо SM

1. A1- контрола, без HPP, 3 ден; 2. A1 – контрола, без HPP, 40 ден; 3. A3 –HPP 580 MPa/ 8 min.; 4. A2 /B1 - HPP 580 MPa/ 4 min.; 5. B2 – (HPP 580 MPa/ 4 min) + „Медолива Плюс“ 0,3% ; 6. B3 – (HPP 580 MPa/ 4 min) + натриев лактат 0,3%; 8. C1 - HPP 580 MPa/ 4 min.; 9. C2 - HPP 580 MPa/ 4 min + „Медолива“ 0,1%; 10. C3 - HPP 580 MPa/ 4 min + червено цвекло 0,1%; 11. C4 - HPP 580 MPa/ 4 min + червена репичка 0,1%; 12. C5 - HPP 580 MPa/ 4 min + розмарин 0,1%*

От направеният литературен преглед за SDS-PAGE елктрофореза на HPP обработено говеждо месо се отчитат разлики и при пробите подложени на обработка с високо налягане (HPP), когато се изследват паралелно супернатантата и утайката. Настоящите резултати показват липса на значими промени в белтъчния профил при говеждо месо третирано с HPP, подобно на изследването направено с утайка. Може да се заключи, че са необходими допълнителни изследвания, за да се изясни ефектът от високото налягане върху протеиновия профил на месото.

4.3.3. Влияние на обработката с HPP състав на моделна група и вложените добавки върху мастнокиселинния състав на мляно говеждо месо

На табл. 9 до 14 са показани резултатите за мастнокиселинния профил на мляно говеждо месо с различна продължителност на въздействие с HPP (група A) и комбинация от обработка с HPP и вложени различни антиоксиданти при групи B и C.

Табл.9 Групи мастни киселини (g/100g мазнини) на мляно говеждо месо при групи A

Обработка	Σ SFA	Σ MUFA	Σ PUFA	Σ CLA	Σ Branched FA	Σ ω3	Σ ω6	Σ ω6/Σ ω3
A1	45.24	42,91	9.77	0.337	1.757	2.69	7.07	4.10
A2	43.60	42.52	12.58	0.259	1.201	4.27	8.31	1.97
A3	44.29	42,91	11.21	0.275	1.281	3.76	7.44	1.98
RMSE (n=9)	**3.09**	**1,17**	**3.59**	**0,051**	**0.310**	**1.54**	**2.18**	**2.07**
Достоверност	P=0.8125	P=0.8939	P=0.6515	P=0.2234	P=0.1369	P=0.4872	P=0.7817	P=0.4057

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Табл.10 Основни мастни киселини (g/100g мазнини) на мляно говеждо месо при групи A

Обработка	лауринова C-12:0	палмитинова C-16:0	стеаринова C-18:0	палмитоленова C-16:1n7	хептадеценова C-17:1n7	линоловa C-18:2c9,12/19:0	ейкозаценова C-20:3n3	олеиновa C-18:1cis-FA
A1	0.908	25.16	15.33	2.56	1.06	6.72	1.73	35.44
A2	0.636	24.83	14.73	2.57	2.06	8.03	2.84	34.43
A3	0.608	25.73	14.57	2.77	1.86	7.19	2.45	34.84
RMSE (n=9)	**0.221**	**2.06**	**1.55**	**0.58**	**0.49**	**2.13**	**1.19**	**0.70**
Достоверност	P=0.2631	P=0.8689	P=0.8240	P=0.8926	P=0.0962	P=0.7565	P=0.5459	P=0.2808

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Получените резултати за мастнокиселинния профил при група A показват, че обработката с HPP не повлиява съществено върху неговия състав. Не са установени достоверни разлики между групите. Налице е тенденция на минимално покачване на полиненаситените мастни киселини и намаляване на съотношението ω6/ω3, но в рамките на стандартната грешка на модела. От основните мастни киселини регистрираме незначително намаляване на лауриновата и стеариновата киселина и покачване на хептадеценовата и ейкозаценовата киселини също в рамките на стандартната грешка.

Табл.11 Групи мастни киселини (g/100g мазнини) на мляно говеждо месо при групи B

Обработка	Σ SFA	Σ MUFA	Σ PUFA	Σ CLA	Σ Branched FA	Σ ω3	Σ ω6	Σ ω6/Σ ω3
B1	42.02	42.35	14.51	0.248	1.165	4.79^{b}	9.60	2.01^{a}
B2	38.75	42.64	16.64	0.330	1.632	7.14^{a}	9.50	1.34^{b}
B3	43.18	42.54	12.76	0.260	1.228	4.31^{b}	8.45	1.96^{ab}
RMSE (n=9)	**2.43**	**1.54**	**1.83**	**0.070**	**0.331**	**0.85**	**1.33**	**0.25**
Достоверност	P=0.1479	P=0.9724	P=0.1048	P=0.3631	P=0.2504	P=0.0148	P=0.5395	P=0.0291

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Табл.12 Основни мастни киселини (g/100g мазнини) на мляно говеждо месо при групи B

Обработка	лауринова C-12:0	палмитинова C-16:0	стеаринова C-18:0	палмитоленова C-16:1n7	хептадеценова C-17:1n7	линоловa C-18:2c9,12/19:0	ейкозаценова C-20:3n3	олеиновa C-18:1cis-FA
B1	0.463	23.77	14.64	2.408	2.143	9.30	3.33	34.20
B2	0.635	20.74	12.82	2.476	1.822	8.87	4.33	32.47
B3	0.569	24.78	14.64	2.583	2.019	8.18	2.88	34.50
RMSE (n=9)	**0.211**	**1.77**	**1.27**	**0.191**	**0.259**	**1.36**	**0.63**	**1.22**
Достоверност	P=0.6239	P=0.0715	P=0.2057	P=0.5631	P=0.3708	P=0.6208	P=0.0716	P=0.1723

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Според получените резултати за мастнокиселинния състав на групите обработени с различни антиоксиданти от група В установяваме достоверно повишаване на ω3 и намаляване на съотношението ω6/ω3 при групата с антиоксидант „Медолива плюс“ (В2) спрямо групата без добавка на антиоксидант (В1). Наблюдава се и тенденция на нарастване на полиненаситените, спрегнатите линолови и разклонени мастни киселини за сметка на намаляване на наситените мастни киселини при групата с „Медолива плюс“ спрямо групата без антиоксидант, но в рамките на статистическата грешка на модела. При основните мастни киселини отчитаме минимално намаляване на палмитиновата, стеариновата и олеиновите киселини и минимално покачване на ейкозаценовата киселина при група В2 спрямо група В1.

Табл.13 Групи мастни киселини (g/100g мазнини) на мляно говеждо месо при групи С

Обработка	Σ SFA	Σ MUFA	Σ PUFA	Σ CLA	Σ Branched FA	Σ ω3	Σ ω6	Σ ω6/Σ ω3
C1	43.99	42.59	11.88	0.270	1.223^{ab}	3.98	7.90	1.99
C2	42.70	42.22	13.77	0.226	1.092^{ab}	4.71	9.05	1.93
C3	41.48	41.65	15.72	0.197	0.948^{b}	5.52	10.20	1.85
C4	43.56	42.49	12.67	0.225	1.054^{ab}	4.35	8.31	1.91
C5	46.04	40.59	11.31	0.298	1.759^{a}	3.02	8.29	2.75
RMSE (n=15)	**2.31**	**1.69**	**2.04**	**0.041**	**0.263**	**1.10**	**1.08**	**1.92**
Достоверност	P=0.2509	P=0.6029	P=0.1423	P=0.0771	P=0.0259	P=0.1533	P=0.1496	P=0.3947

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

Табл.14 Основни мастни киселини (g/100g мазнини) на мляно говеждо месо при групи В

Обработка	лауринова C-12:0	палмитинова C-16:0	стеаринова C-18:0	палмитоленова C-16:1n7	хептадеценова C-17:1n7	линолова C-18:2c9,12/19:0	ейкозаценова C-20:3n3	олеинова C-18:1cis-FA
C1	0.685	25.24^{a}	14.77	2.59	2.031	7.64	2.61	34.50
C2	0.436	22.07^{b}	13.61	2.24	1.909	8.75	3.09	31.90
C3	0.366	20.54^{b}	13.44	2.07	2.130	9.84	3.72	31.07
C4	0.574	21.84^{b}	13.44	2.17	2.005	8.01	2.79	30.91
C5	0.542	25.03^{a}	16.85	2.15	2.027	7.92	1.96	32.79
RMSE (n=15)	**0.172**	**1.08**	**1.86**	**0.28**	**0.586**	**1.06**	**0.83**	**1.69**
Достоверност	P=0.2610	P=0.0011	P=0.1931	P=0.2411	P=0.9984	P=0.1564	P=0.2020	P=0.1329

Стойностите, свързани с различни буквени означения се различават достоверно (P<0.05).

При изследване на мастнокиселинния състав на мляно говеждо месо обработено с антиоксиданти от група С, получихме достоверни разлики между групите само при разклонените мастни киселини (по-високи стойности при група С5 с антиоксидант розмарин спрямо група С3 с антиоксидант червено цвекло) и при палмитиновата киселина, където установихме достоверно по-ниски стойности при групите с „Медолива“, червено цвекло и червена репичка спрямо нетретираната с антиоксидант контрола. Наблюдават се тенденции на намаляване на наситените мастни киселини, увеличаване на полиненаситените, ω3 и ω6 киселините при всички групи без тази от розмарин спрямо необработената с антиоксидант група, но в рамките на стандартната грешка. Вероятно използваната концентрация от 0,1% на вложените антиоксиданти се е оказала недостатъчна за да повлияе върху промените в мастнокиселинния състав на месото.

4.3.4. Влияние на обработката с HPP и вложените антиоксидантни вещества върху микробния статус на мляно говеждо месо

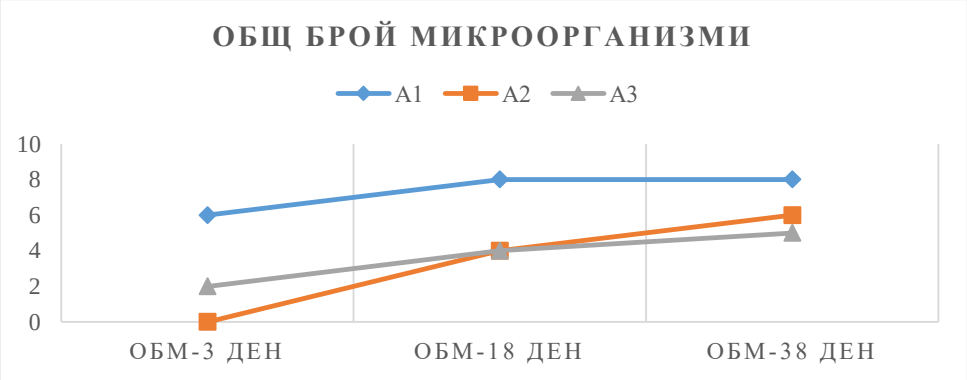
Влияние на обработката с HPP и вложените антиоксидантни с антимикробно действие върху микробния статус на моделна система на мляно говеждо месо

Ефектът от прилагането на налягане със сила 580 MPa и време (4 min.– 8min.) при температура +4C° все анализира спрямо изброената микробиота на мляно говеждо месо**:**

1. Общ брой микроорганизми – *Total Plate Count;* **2. Млечно-киселите бактерии -** (*Lactobacillus*) *(LAB);* **3. Ентеробактерии-** *Enterobacteriaceae*

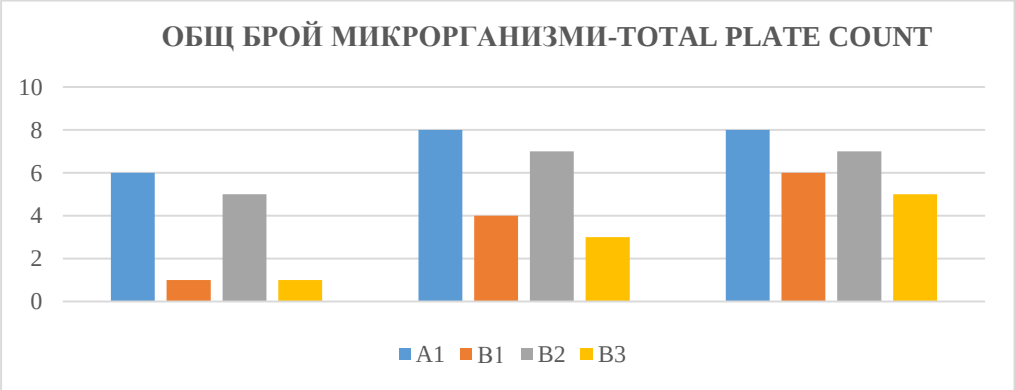
Оценка на концентрацията на микроорганизмите, свързани със срокът на годност на месния продукт (Общ брой микроорганизми, млечнокисели бактерии, ентеробактерии) се разглежда спрямо факторите:

1. различно време на задържане (4 min.– 8min.);
2. комбинирано влияние на хидростатично налягане (580 MPa, 240 s) и добавени средства - Медолива Плюс 0,3%, Натриевият лактат 0,3%.



Фигура 19. Влияние на фактор време върху общият брой микроорганизми при HPP обработка
Легенда: A1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка A2. от говеждо месо, вакуум опаковка, с HPP обработка+ 580MPa x 4min. A3. от говеждо месо, вакуум опаковка + 580MPa x 8min.

При микробиологичните анализи върху **общ брой микроорганизми**, се наблюдават следните резултати: Контролите имат високия първоначален брой микроорганизми ($1.5.10^6$ cfu/g), който се увеличава с 2 log CU/g на 18 тия ден от хладилното съхранение ($1.3.\ 10^8$) и се поддържа приблизително на същото ниво до 38 мия ден от изследването ($5.\ 10^8$).

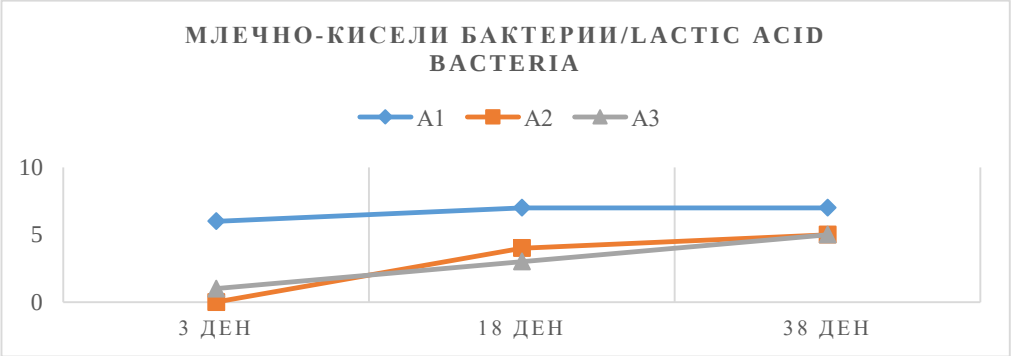


Фигура 20. Комбинирано влияние на антиоксиданти с антимикробно действие и HPP обработка

А1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка; В1. от говеждо месо + HPP + 600MPa x 4мин; В2. от говеждо месо + HPP + Медолива Плюс (Medoliva Plus) 0,3 %; В3. от говеждо месо + HPP + натриев лактат 0,3 %

Фигура 20 показва, комбинираното влияние на фактор налягане – антиоксиданти с антимикробно действие. Влиянието на Натриев лактат 0,3%, дава по– добър комбиниран резултат, както в началото на наблюдението (В3 – 3ти ден, <1x 10^2) , така и по време на хладилното съхранение (В3 – 18ти ден, 1.1. 10^3 ; В3 – 38ти ден, 4.2. 10^5), поради силното консервиращо действие на лактата и в потвърждение на Doores, 2005. Медолива Плюс в концентрация 0,3%, играе баропротекторна роля и елиминира влиянието на хидростатичното налягане, вероятно поради количествата от олеопропилин: 0.5 μg kg^{-1} и 1.7 μg kg^{-1} , лутеин-7-О-глюкозат 1.3 μg kg^{-1} и 4.3 μg kg^{-1} , открити от (Moudache, at al. 2016). Микробиологичните изследвания , показват редукция с 1-log CU/g на 3-ти ден (2. 10^5); 18 тия ден от хладилното съхранение (3.2. 10^7) и с до 38 мия ден от изследването (7.10^7).

При микробиологичните анализи върху млечно – киселите бактерии, се наблюдават следните резултати. Контролите имат висок първоначален брой микроорганизми (1.1. 10^6 cfu/g), който се увеличава с 1–log CU/g на 18 тия ден от хладилното съхранение и с 1.7 log CU/g до 38 мия ден от изследването.

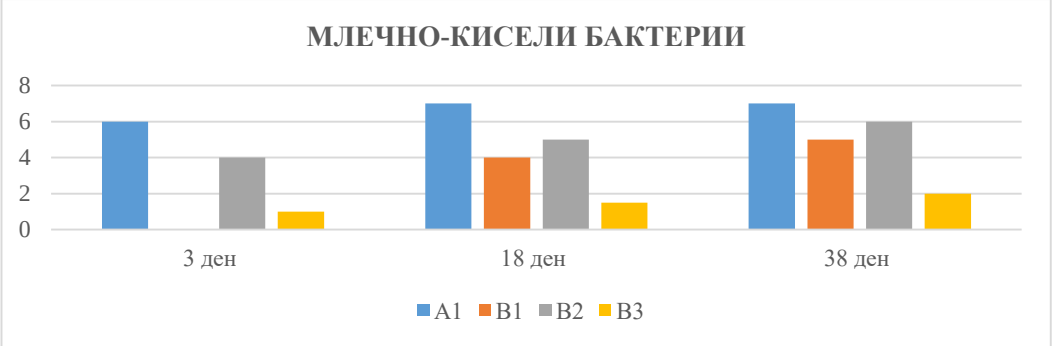


Фигура 21. Влияние на фактор продължителност на HPP обработка върху млечно-киселите бактерии

Легенда: А1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка; А2. от говеждо месо, вакуум опаковка, с HPP обработка+ 580MPa x 4 min.; А3. от говеждо месо, вакуум опаковка + 580MPa x 8 min

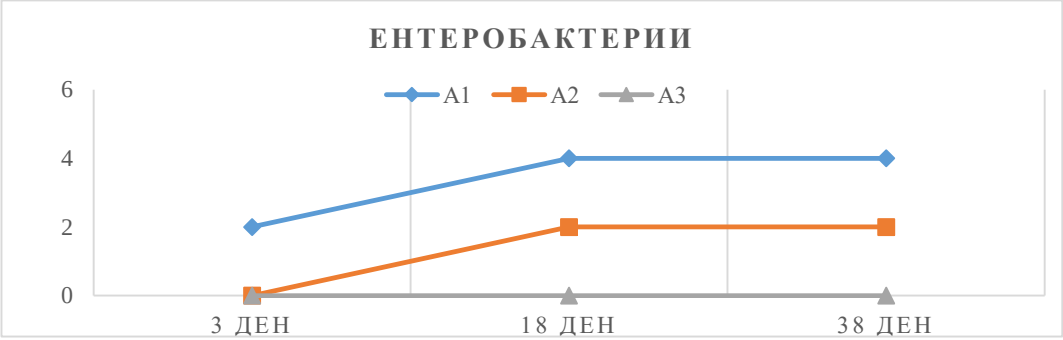
.

На фиг. 21 е показано влиянието на HPP обработката с параметри: налягане 580 Mpa и време на задържане (4- 8 nm) показва редукция с 6 log CU/g на броя микроорганизми на 3 - тият ден от обработката (<1 × 10^1) спрямо не третираната контрола. В процеса на хладилно съхранение на 18 - ден, редукцията на млечно- кисели бактерии намалява до 3 log CU/g (3 × 10^4), а на 38 ден до 2 log CU/g (3.8 × 10^5). Удълженото време за обработка не променя значително броят на млечно-киселите бактерии, спрямо обработените за време 4 min.



Фигура 22. Комбинирано влияние на антиоксиданти с антимикробно действие и HPP обработка
Легенда: *A1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка; B1. от говеждо месо + HPP + 580MPa x 4 nm; B2. от говеждо месо + HPP + Мед олива Плюс 0,3 %; B3. от говеждо месо + HPP + натриев лактата 0,3 %*

На фиг. 22 е представено комбинираното действие на HPP и антиоксиданти с антимкробно действие. Натриевият лактат в концентрация 0,3%, поддържа редукция (B3 –3ти ден 2 × 10^1) от 5 log CU/g от 18 (B3 –18ти ден 4 × 10^1) до 38 ден от съхранението (B3 –38ти ден 3.× 10^2). Комбинираният ефект, показва преимущество, спрямо обработката под високо налягане, разгледано спрямо млечнокиселите бактерии. Разлика от 3 log CU/g на 38 ден от съхранението е значителна. Медолива Плюс в концентрация 0,3%, играе баропротекторна роля, както спрямо общият брой бактерии и елиминира влиянието на хидростатичното налягане. Замърсяването с ентеробактерии в контролите не е толкова високо, спрямо останалите две изследвания.



Фигура 23. Влияние на фактор време върху ентеробактерии при HPP обработка
Легедна:A1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка; A2. от говеждо месо, вакуум опаковка, с HPP обработка+ 580MPa x 4мин; A3. от говеждо месо, вакуум опаковка + 580MPa x 8мин

От фиг. 23 е видно, че прилагането на хидростатично налягане със сила 580 Mpa и време на задържане (4 nm./240s.) са ефективни параметри за намаляване броят ентеробактерии за целият период на наблюдение от 3- ят (<1x 10^1), 18-(8.6. 10^2) до 38 - ият ден (<1x 10^2), спрямо контролите: 3-ти ден (5.9. 10^2), 18-ти ден (1.2. 10^4) и 38–ти (3.8. 10^4). HPP приложено за време (8 min./480 s.), преустановява развитието на ентеробактерии за целия период на изследване при съхранение в хладилни условия.



Фигура 24. Комбинирано влияние на антиоксиданти с антимикробно действие и HPP обработка върху ентеробактерии при HPP обработка

Легенда:A1. от говеждо месо, вакуум опаковка, без HPP обработка;B1. от говеждо месо + HPP + 580MPa x 4мин; B2. от говеждо месо + HPP + Медолива Плюс 0,3 %; B3. от говеждо месо + HPP + Натриевият лактат 0,3 %

На фиг. 24 показват, че комбинираното действие и на двата антиоксиданта с антимикробни средства - Медолива Плюс 0,3% , Натриев лактат 0,3%, не позволяват развитието на ентеробактерии от 3-тия до 38 мия ден (<1x 10^1). Ефективността, както на обработката под налягане, така и на комбинираното действие е ефективен процес на подобряване на микробиалната безопасност и качество по време на съхранение.

Мляното говеждо месо има висока влажност и смесена микрофлора, включително патогенна от кланицата до пакетирането.

Тази оценка от направените експерименти потвърждава литературните данни, че при налягане от 450 до 600 MPa намалява общия брой бактерии с 6-8 log (CFU/g) за период от 7-14 дни, в зависимост от наличните микроорганизми в месото. Това означава, че пастьоризация е възможна при налягане над 500 MPa.(Kruk, 2011).Видът на хранителният продукт и микробиологичните видове в него, заедно със способността на психротрофните микроорганизми да се възстановяват при ниски температури, са критичните фактори при оценка на ефективността на HHP обработка.

Влияние на обработката с HPP и вложените антиоксиданти с антимикробно действие върху броя на инокулираните патогени на мляно говеждо месо

Инокулираните патогени в микс (P), включват: *Escherichia coli; Salmonella; Listeria monocytogenes; Staphylococcus/ sp; Campylobacter jejuni*. Поведението на патогените, се разглежда спрямо фактор различно време на задържане (240–480s) на HPP обработка.

Влиянието на фактора високо хидростатично налягане върху *Salmonella* е безспорно и при стандартна обработка. При първоначални стойност на контролата в log (CFU/g) (*P1 без HPP обработка)* на 3 ти ден от изследването – **9,7.10^3**, води до липса и след двата режима на обработка. (P2- HPP обработка 580 MPa x 4min.*)* **<1x 10^1** *(*P3 - HPP обработка 580MPa x 8min.*)* **<1x 10^1**. На 38 - ят ден от изследването стойностите на контролата са **9. 10^4**, а за P2 и P3 (**<1x 10^1**) са получени същите резултати, което е в съответствие с изследванията на (Smelt, 1998).

Влиянието на HPP върху патогена *Escherichia Coli* е извършен анализ на 3-ти ден от обработката с HPP, за контролата P1без HPP е получен резултат **4.7. 10^4** която води

до редуциране при Р2 - **2x 10^1** (CFU/g) при и липса при Р3. Редукция с 4 log, показва добра ефективност, този патоген принадлежи към семейството на Enterobackter.

Инокулираната *Listeria Monocytogenes* в мляното говеждо месо показва редукция на 3 ти ден с 3 log (CFU/g) Р2 (**5x10^1**), спрямо контролните проби при Р1(**1.6x10^3**) и до липса при Р3. По време на съхранението спрямо контролата 18 –ят Р1(**7. 10^4**) 38–ят Р1(**3. 10^4**) е налице редукция на 38–ят Р2 (**8x 10^2**) с 2 log (CFU/g), а при Р3 продължава да не се развива *Listeria*. По – трудното елиминиране на този патоген се дължи на принадлежността му към Грам (+), които по- трудно се поддават на обработка дори при високо налягане от 580 MPa, съгласно (Smelt, 1998).

Върху *Staphilococcus Spp.* се наблюдава значително влияние на HPP, от контрола Р1 3-ти ден (**7.2. 10^3**), като техния брой намалява 3 кратно, Р2 (**4x 10^1**) и Р3 (**<1x 10^1**). Този тип микроорганизми са Грам (+) поради структурата на клетъчната стена (Smelt, 1998) и са със сферична форма (Diels and Michiels 2006), което определя тяхната по-трудна обработка с HPP.

При *Campylobacter Jejuni*, като Грам (-) се наблюдава намаление от 1 log (CFU/g) спрямо контролите (Р1 - **1.1. 10^3**), а при (Р2 - **4. 10^2**), и липса при Р3.

Направените опити с патогени дават обещаващ резултат за прилагането на HPP технологията в използвания режим на работа за справяне със зоонозните проблеми, както за контролните органи, така и за производителите на месни продукти.

4.3.5. Влияние на обработката с HPP и вложените антимикробни и антиоксидантни вещества върху органолептичните характеристики на мляно говеждо месо.



Фигура 25. Снимка на пробите по време на органолептична оценка

Органолептичен анализ

Органолептичната оценка на мляно месо от *musculus Semembranosus* се проведе в лабораторията по микробиология на Тесалийският университет в Гърция. Участниците не са професионални дегустатори, но са бъдещи или настоящи технолози по храните. Към анализа се включиха - преподавателят по микробиология и присъстващите в лабораторията студенти. От тях преобладаващата част са жени на възраст от 21 до 33 г., а мъжете на възраст 20 и 40 годишни. Всеки участник разполагаше с оценителен лист, въз основа на който се даде оценка на: Общ вид, Цвят, Структура, Аромат, Вкус. Оценъчната

скала е от 1 до 5. (5 - Отлично, 4 - Много добър, 3 – Добър, 2 – Приемливо, 1 – Не приемливо). Органолептичният анализ на мляно говеждо месо с различни добавки и обработено с HPP технология най-добра обща оценка показват пробите с добавена червена репичка и съответства на изследванията и на други автори (Schindle, 2010).

V. ИЗВОДИ

1. На база на получените резултати от изследването на говеждо месо от различни части на кланичния труп с висока търговска стойност – *m. Longissimus dorsi thoracis et lumborum* и *m. Semimembranosus* приложеното високото хидростатично налягане в комбинация с третиране с биологично активни вещества на избраните мускулни групи, могат да се направят следните по-важни изводи:

- *Увеличаването на pH* стойностите при опитите с мариновано телешко месо с мащерка и риган от мускулни групи от **Longissimus dorsi** (LD) и ***Semimembranosus*** **(SM**, след HPP обработка доказват, че маринатата оказва минимално влияние и не представлява интерес за по- широки изследвания с цел намаляване на стойностите на този показател. При опитите с добавяне на антимикробни вещества към месен продукт се наблюдава значително увеличение на показателя при групата третирана с „Медолива“ , което е естествен екстракт от маслина, като прах, но тази способност на продукта не води до развала на месния продукт. Тенденцията на увеличение се наблюдава и при групата с добавени вещества с антиоксидантно действие, от които 0,1 % добавен прах от репичка е най- съществено.
- *Установи се, че Водозадържаща способност* се увеличава съществено след обработка с HPP технология. Добавянето на маринатата от мащерка и риган също оказват влияние и при двете мускулни групи. При сравнение между двете мускулни групи **Longissimus dorsi** (LD)
  и ***Semimembranosus*** **(SM)** се констатира повишаване на показателя, по – силно изразен за мускулна група LD. При изследване влиянието върху водозадържащата способност се доказа влиянието на антиоксидантите в периода на съхранение. Най- висока стойност е измерена при съчетанието на HPP и антиоксидант Ното действие на прах от цвекло, а най- ниска при вложеното етерично масло от розмарин.
- Направените опити за подобряване на отрицателния ефект на HPP обработка върху месо върху цвета върху двата мускула LD и SM, показа по- висока зачервеност при мускул SM.
- Проучено е влиянието на високо хидростатично налягане върху окислението на липидите на телешко месо, изразени, като стойности на рефлективност *TBARS* (МДА). Установено е нарастването на наситените мастни киселини, което е индикатор за липидно окисление при технологичната обработка на мускули Longissimus dorsi, за разлика от мускул Semimembranosus.
- Анализирани са получените резултати за протеиновото окисляване, което води до различни модификации на аминокиселини, водещи до образуване на карбонил. Данните за *карбонили* в месото след обработка с високо хидростатично налягане. показват нарастване стойностите на този показател вследствие

третирането с HPP при месото от LD групата при всичките му варианти, а при месото от SM групата влиянието на HPP обработката е ниско на фактор HPP и фактор добавка риган.

- Микробиологичните изследвания върху общата микрофлора показват ефективност на HPP технологията. Показателите: общ брой аеробни мезофилни, психротрофни микроорганизми, плесени и дрожди във изследваните проби в мускулни групи LD и SM са в допустимите норми, спрямо изискванията на БДС и ISO. Антибактериалните свойства на мащерката в съчетание с HPP технологията водят до удължаване срокът на годност на суровото месо и от двата мускула.

2. На база на получените резултати от изследването на мляно месо – кайма от мускул Semimembranosus (m.Sm), приложеното високото хидростатично налягане HPP обработката, самостоятелно и в съчетание с антиоксиданти или антимикробни средства , могат да се направят следните по-важни изводи:

- Най- положителен резултат върху млян мускул SM е добавянето на прах от цвекло. Получените резултатите показаха, че от вложените антиоксиданти единствено при червената репичка е установено достоверно намаляване на жълтата компонента на месния продукт, като най-висока стойност получихме при групата съхранявана за период от 40 дни.
- При жълтата компонента на месото съществено се отличава варианта с озонирана вода за 15 мин, съхранявана 40 дни, при който получихме стойност съществено по-ниска от всички останали групи. Времето на съхранение на 20-тия ден показват по-високи стойности в сравнение с групите съхранявани 5 и 40 дни.
- Непосредствено след HPP с параметри (налягане 580 MPa и време 4мин), *най – високи* нива на МДА показаха пробите с 15 минутна обработка в озонирана вода, а по време на охладеното съхранение резултатите са стабилни и бавно покачващи до 40-тият ден от наблюдението. Получиха се най-високи стойности при групата на вложените антиоксиданти - прах от репичка - 0,1% и *най- ниски* при Медолива Плюс 0,3 %, (съдържа маслинен + цитрусов полифенол + лимонена киселина), както и с добавен, като антиоксидант Розмарин 0,1 %.
- *Изследването с мляно месо от мускула* SM показа значително влияние на обработката под високо хидростатично налягане (HPP) върху общ брой микроорганизми, млечно- киселите бактерии и ефективно преустановява *Enterobacteriaceae* от 5 до 40 - тият ден. Комбинираното действие с антимикробни средства не оказва допълнително влияние.
- Направените SDS-PAGE електрофореза на HPP, заключава, че промяната в структурата на белтъците не потвърждава резултата в други научни публикации, което означава, че са необходими допълнителни изследвания, за да се изясни ефектът от високото налягане върху протеиновия профил на месото.

VII. ПРИНОСИ

1. Научни приноси

• Експериментално е установено, че обработените с HPP проби водят до повишаване на показателя за киселинност, който не е признак за процес на развала.

• Извършените статистически анализи показват доказано действие на фактора обработка с HPP върху водозадържащата способност при вариантите на месо с вложени мащерка и риган за m.LD месо, както и при варианта с риган при m.SM. Повишеният водозадържащ капацитет (ВЗК) на говеждо месо в следствие приложеното високо хидростатично налягане, при използването му, като суровина за преработен месен продукт води до повишаване на рандемана и стабилизиране на месните емулсии, намалява се загубата на тегло при готвене. Подобрява се структурата и сензорното възприятие (крехкост, сочност, вкус).

• Установено е, че добавената „Медолива Плюс“ в концентрация 0,3%, играе баропротекторна роля и елиминира влиянието на хидростатичното налягане, върху общият брой микроорганизми, но спрямо развитието на ентеробактерии (Enterobacteriaceae) тя и другите три използвани антимикробни средства влияят еднакво положително и не позволяват да се развиват микроорганизми до 38-ия ден.

2. Научно-приложни приноси

- От направените анализи се заключава, че обработката с параметри: 580 MPa, температура 4°C, време на задържане 4 минути е оптималният режим на работа за достигане на високо ефективно елиминиране на патогенната (Escherichia Coli, Salmonella, Listeria Monocytogenes, Staphylococcus/ Sp, Campylobacter Jejuni) и намаляване на общата микрофлора, за удължаване на безопасния срок на годност на охладено мляно говеждо месо и подобрение на колориметричните показатели при използване на подходящи натурални антиоксиданти. Прилагането на същото налягане, но с удължено време на задържане 8 min., не е икономически оправдано, тъй като не се откриха значителни разлики между ефекта от обработка със задържане 4 min.
- Установено е, че комбинираната обработка с HPP и натриевия лактат-диацетат подтиска развитието, както на общия брой микроорганизми, така и на млечнокиселите бактерии, като запазва силните си антимикробни способности за целия период на съхранение от 38 дни.
- В следствие микробиологичните резултати може да се предложи замяна на синтетичните консерванти със самостоятелно или комбинирано приложение на високо хидростатично налягане, което е екологично и икономически изгодно. Дава възможност да се преработват, както биологични храни, така и навлезлите широко на пазара храни под името „clean label“ .
- Разработен е иновативен продукт - мляно говеждо месо, обработено с HPP технология и добавен прах от червена репичка, който е със значително подобрен вкус, цвят и текстура. Широката гама от получени резултати с използването на различни антимикробни и антиоксидативни вещества дава възможност да се разработят нови вкусови предпочитания в месното производство.

- Въздействието на добавката Медолива Плюс има баропротекторен ефект, но барорезистеността по отношение на млечнокиселите бактерии може да се отчете, като положителна или отрицателна в зависимост от характеристиките на конкретните щамове. Употребата на ферментирали храни (с антимикробни метаболитни организми) е нова тенденция в хранителната индустрия. Използването на Медолива Плюс действа защитно на тези щамове микроорганизми, при прилагане на HPP обработка върху вече ферментирал месен продукт.

VI. СПИСЪК ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Pepa Nacaridou**, Daniela Miteva, Silvyia Ivanova, 2021. Alternative technology for beef meat shelf life. *Bulgarian Journal of acriculture*, 27(4), 792-797; ISSN 1310-0351 – print, ISSN 2534-983X – online; (*Web of Science*, Scopus).
2. **Pepa Natsaridu**, 2021. Influence of high pressure processing at 580 MPa and other antimicrobials on minced beef. *Agricultural Academy;Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, LVIII, 4/26-57; ISSN 0514-7441 (Print), ISSN 2534-9856 (On-line); (*Web of Science, CABI)*
3. **Pepa Natsaridu,** 2019. Application of HPP technology in meat-processing production. *Food Processing Industry Magazine,* 9/31-35, ISSN 1311-0179; (*Web of Science, CABI)*

X. УЧАСТИЯ В ОБУЧЕНИЯ:

- ✓ Участие в обучение на тема: Принципи и приложение на технологията HPP в хранително- вкусовата промишленост. HACCP контрол и етикетиране. Обучението се проведе в толинг център „ Pascal Processing B.V", Helmond, Netherlands, 19-22.02.2018г Приложен протокол от обучение Jasper van Altena Food Technolist EMEA
- ✓ Участие в обучение от Errol V. Raghubeer, Avure Technologies, Erlanger, KY, USA, training in AquaBar LTD, Sofia www.avure-hpp-foods.com,
- ✓ Обучение по програма Еразъм +, модул „Споразумение за обучение Мобилност на студентите и докторанти за стажове" в Университет Тесали, Кардиса, Гърциия - 25.11.2019г.-25.04.2020г., което включва практика и обучение при съвременни методи и техники на изследванията върху месо и месни продукти, обработени с HPP технология, входен изпит по английски език и онлайн обучение по време на програмата. По време на обучението докторантката е усвоила методи на статистическа обработка на получените данни с цел определяне линейността на използваните методи за анализ. Усвоила е аналитични методи и техники за определяне на промените в месото и месните продукти след HPP обработка.

XI. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ:

- ✓ **ССА- ПРОЕКТ ХТАИ – № 139** „Разработване на високопротеинови храни на месна основа с повишен антиоксидантен ефект”.
  Ръководител: доц. д-р Даниела Митева
- ✓ **ССА - ПРОЕКТ ХТАИ - № ТН 6: „**Съвременни методи за удължаване срока на съхранение и мониторинг на свежестта на хранителните продукти“
  Ръководител: доц. д-р Даниела Митева, доц. д-р Светла Дянкова