

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПО СНИЖЕНИЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НИТРИТА И НИТРАТА В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ НАТУРАЛЬНОЙ СОЛИ И МОНООКСИДА УГЛЕРОДА

Саката Р.<sup>1</sup>, Такеда С.<sup>1</sup>, Вага М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт ветеринарной медицины, Университет Азабу, Сагамихара, Канагава, Япония

<sup>2</sup> Itoham Foods, Inc., Мэгуро, Токио, Япония

**Ключевые слова:** цветовая стабильность карбоксимиоглобина, ингредиенты для посола, натуральная соль, нитрат, нитрит

## Аннотация

Исследование проводилось с целью изучения изменений цветовых характеристик мясных продуктов за счет добавления натуральной желтой соли (YS) и монооксида углерода (CO). После обработки свинины нитритом натрия в количестве от 0 до 100 ppm, добавляли YS или NaCl в количестве 2% и анализировали оптическим методом изменение цвета. Содержание пигмента гема в мясе также определяли оптическим (спектрофотометрическим) методом. Было обнаружено, что YS приводит к формированию более выраженного красного цвета по сравнению с NaCl, что указывает на то, что содержание остаточного нитрита и нитрата в мясных продуктах, содержащим YS, значительно выше, хотя их количество в YS довольно невысокое. Присутствие нитрита в YS не может объяснить эффект YS при формировании цвета. Поскольку YS содержит не только нитрит, но и нитрат, то исследовали также влияние нитрата на стабильность цвета вареных продуктов из свинины. Нитрат предотвращал снижение концентрации нитрита и потерю цвета вареной соленой ветчины. Было обнаружено, что скорость снижения уровня нитрита уменьшается с увеличением содержания азотной кислоты. Нитрат, по-видимому, не является донором нитрита, и препятствует восстановлению нитрита в вареных мясных продуктах и, следовательно, улучшает стабильность цвета. Нитрат, содержащийся во многих сортах каменной соли, как и в нашем случае, может улучшить формирование цвета. Обработка свинины монооксидом углерода (CO) вызывала образование карбоксимиоглобина (COMb) с последующим формированием красного цвета мяса. Было показано, что COMb стабильно образуется при pH от 5,0 до 8,0, является термоустойчивым, может быть экстрагирован водой, но практически не экстрагируется ацетоном. Также было обнаружено, что оксид азота более тесно связан с миоглобином (Mb), чем CO. Отмечено, что во всех исследуемых мясных продуктах нитрозил-миоглобин является стабильным. Показано также, что монооксид углерода может влиять на степень окисления липидов.

Original scientific paper

## STUDY ON DECREASE OF NITRITE AND NITRATE USAGE IN PROCESSED MEAT WITH ADDITION OF NATURAL SALT AND CARBON MONOXIDE

Sakata R.,<sup>1</sup> Takeda S.,<sup>1</sup> Waga M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara, Kanagawa, Japan

<sup>2</sup> Itoham Foods, Inc., Meguro, Tokyo, Japan

**Keywords:** carboxyl myoglobin color stability, curing agent, natural salt, nitrate, nitrite

## Abstract

This study was carried out to examine the reddening of meat products due to the addition of natural yellow salt (YS) and carbon monoxide (CO). Following YS or NaCl addition at 2% to pork subsequent to nitrite (0~100 ppm) treatment, color development due to this addition was analyzed optically. Heme pigment content in the meat was also determined spectrophotometrically. YS was found to bring about greater reddening than NaCl, indicating residual nitrite and nitrate content to be significantly higher in meat containing YS, through the amount of either was quite small. The nitrite itself in YS could never explain the color formation by the YS. Because the YS included not only nitrite but also nitrate, the effects of nitrate on the color stability of cooked cured pork were examined. Nitrate inhibited the nitrite decrement and discoloration in the cooked cured ham. The degradation rate of nitrite was clearly found to decrease with nitric acid content. Nitrate does not appear to serve as a donor of nitrite, but rather inhibits nitrite reduction in cooked meat products, with consequent prolongation of color stability. Nitrate, observed in many rock salt and also in this case, could enhance the color formation. CO treatment of pork caused the formation of carboxy myoglobin (COMb) with consequent

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Саката Р., Такеда С., Вага М. Исследование по снижению использования нитрита и нитрата в мясных продуктах при добавлении натуральной соли и монооксида углерода. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):35-43. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-35-43

**FOR CITATION:** Sakata R., Takeda S., Waga M. Study on decrease of nitrite and nitrate usage in processed meat with addition of natural salt and carbon monoxide. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):35-43. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-35-43

*reddening of the meat. COMb was shown to be heat-stable and form stably at pH 5.0 to 8.0 and to be extractable with water, but was barely extractable at all with acetone. Nitric oxide was found to have greater affinity toward myoglobin (Mb) than CO. Nitrosyl Mb was noted to be stable in all meat products examined. CO was seen to be capable of controlling the extent of lipid oxidation.*

## 1. Введение

Цвет мяса является основным фактором, определяющим любое решение о покупке мясного продукта, и уже потом оцениваются такие параметры, как запах, вкус или текстура. Вещества, предназначенные для формирования цвета, такие как нитриты и нитраты, признаны весьма эффективными, но по соображениям безопасности пищевых продуктов степень их использования ограничена.

В ответ на запросы потребителей в настоящее время все больше внимания уделяется безопасности пищевых продуктов. В связи с этим, в настоящее время ведется разработка способов для увеличения интенсивности цветовых характеристик мясных продуктов с использованием как можно меньшего количества нитрита и нитрата, но с применением натуральных компонентов [1, 2]. Как в Японии, так и за рубежом проводят исследования с целью заменить традиционные посолочные компоненты натуральными веществами животного происхождения. Результаты должны подтвердить их эффективность с точки зрения улучшения и сохранения привлекательного внешнего вида продуктов, а также безопасность для здоровья человека.

Однако при проведении исследований были отмечены некоторые проблемы с формированием или потерей красного цвета мясных продуктов, для которых необходимо найти эффективные решения. Ранее сообщалось о влиянии гималайской каменной соли на формирование красного цвета мясных продуктов [3].

В несоленых мясных продуктах основной причиной формирования красного цвета можно считать карбоксимиоглобин (COMb). Монооксид углерода (CO) прочно связывается с миоглобином (Mb) с образованием COMb, который обладает устойчивым ярко-красным цветом. В Японии добавление CO в пищевые продукты запрещено законом, хотя в других странах это соединение применяется для упаковки пищевых продуктов в модифицированной газовой среде, и его использование в мясных продуктах тщательно изучается [4, 5]. Если CO сможет снизить содержание нитрита в мясных продуктах, то его использование не должно столкнуться с возражениями со стороны потребителей.

Натуральные соли, особенно те, что содержатся в гималайских каменных породах, могут оказаться наиболее подходящими для формирования красного цвета мясных продуктов, поскольку они содержат небольшое количество нитрита и нитрата, а также различные минералы. Таким образом, при проведении исследований изучалась желтая соль (YS) из гималайских пород на предмет формирования красного цвета мясных продуктов, и результаты сравнивались с данными, полученными для традиционных посолочных смесей.

В процессе формирования цвета нитрат считается предшественником нитрита ввиду его восстановления посредством бактерий. Alley, Cours и Demeyer [6] показали, что нитрат может стабилизировать цвет мясных продуктов, не прошедших тепловую обработку. Однако Ockerman и Kuo [7] считают, что нитрат замедляет снижение уровня нитрита в вареных соленых мясных продуктах. Различия в выводах этих исследователей могут объясняться наличием или отсутствием аскорбата натрия.

Целью настоящего исследования является определение степени восстановления нитрата после тепловой обработки мясных продуктов, а также влияние его содержания на кинетику изменений уровня нитрита в процессе хранения вареной свинины.

Кроме того, были исследованы некоторые свойства CO, такие как его прочное связывание с Mb, приводящее к формированию привлекательного красного цвета мяса. Было проведено сравнение таких параметров, как термостабильность, экстрагируемость и образование COMb при различных значениях pH. Затем производные Mb подвергались спектрофотометрическому исследованию после введения CO в нитрозил-миоглобин (NOMb). Также были исследованы антиоксидантные эффекты CO в мясных продуктах.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Эксперимент с натуральными солями

Для проведения эксперимента использовался окорок свиной туши. Мясо окорока было тщательно очищено от жировой и соединительной ткани и измельчено. В каждый образец мяса добавляли YS или NaCl в количестве 2%, а также 0,1% аскорбата натрия и NaNO<sub>2</sub> в диапазоне концентраций: 0, 10, 30, 50 или 100 ppm. После 4-дневного хранения при температуре 4°C в анаэробных условиях измельченные образцы подвергали термообработке при 75°C в течение 30 минут. Цвет оценивали визуально после охлаждения образца, а затем проводили измерение с помощью спектрального колориметра. (CM-2002, Konica Minolta, Япония).

Коэффициент формирования цвета (CFR) [8] и содержание пигмента гема измеряли с помощью экстракции ацетоном. Содержание остаточного нитрита и нитрата определяли по методу Mirna [9] посредством восстановления в медно-кадмиевой колонке.

### 2.2. Влияние нитрата на вареные продукты из свинины

Все используемые химикаты относились к стандартному лабораторному классу и были приобретены в компании Wako Pure Chemical Industries (Токио, Япо-

ния). Они использовались без дальнейшей очистки. Для получения опытных продуктов использовались мышцы *Longissimus dorsi* (*L. dorsi*, показатель pH=5,7) и *Biceps femoris* (*B. femoris*, показатель pH=5,8), полученные от 5-месячных самцов свиней (трехпородное скрещивание: ландрас, крупная белая и дюрок).

Опытные образцы вареной колбасы и ветчины готовили из фарша *B. femoris* и цельных кусков *L. dorsi* соответственно. Каждый образец в течение 7 дней подвергался посолу с использованием нитрата (обозначали как «+Нитрат») или без него (Контрольный образец). При посоле образцов, (каждый массой 1500 г) использовали 300 мл рассола, содержащего: 27 г NaCl, 0,248 г NaNO<sub>2</sub> и 0,728 г KNO<sub>3</sub> («+Нитрат») или 27 г NaCl и 0,248 г NaNO<sub>2</sub> (Контроль). Затем каждый образец разделяли на 5 порций массой не выше 300 г и упаковывали под вакуумом. Далее образцы подвергали термообработке в водяной бане при температуре 75 °С в течение 30 минут и хранили при 10 °С с флуоресцентным освещением (2000 люкс).

Цвет и концентрацию нитрита и нитрата контролировали еженедельно в течение 4 недель. Содержание остаточного нитрита измеряли по методу Sakata и Nagata [10]. Концентрацию нитрита в экстракте определяли посредством прохождения экстракта через Cu-Cd колонку (скорость потока — 5 мл/мин). Разница в концентрации нитрита до и после прохождения через колонку представляла собой концентрацию нитрата [11]. Цвет поверхности образцов оценивали посредством показателей L\*, a\* и b\* с использованием колориметра (СМ-2002, Konica Minolta, Япония).

Эксперимент проводили *in vitro* с использованием реакционных растворов, полученных смешиванием 2 мл (2-х молярного уксуснокислого буфера (pH = 4,5), 1 мл (0,1-молярного NaNO<sub>2</sub>) и 1 мл дистиллированной воды. Соотношение между снижением уровня нитрита и формированием нитрата определяли на основе значений оптической плотности с использованием спектрофотометра (UV-2700, Shimadzu, Япония). Концентрацию нитрата рассчитывали на основе его максимума при длине волны 303 нм. Спектры поглощения нитрита изменялись по мере увеличения или уменьшения показателя pH, так как изменялось содержание нитрита и HNO<sub>2</sub>. В связи с этим для определения концентраций нитрита использовали изобестическую точку при длине волны 324 нм для нитрита и HNO<sub>2</sub>. Каждый раствор перед использованием выдерживали при температуре 20 °С, а затем после смешивания всех растворов измеряли оптическую плотность при длинах волн 324 нм и 303 нм каждые 20 секунд. Измерения проводили более чем 350 раз.

### 2.3. Эксперимент с СО

СОМб получали с помощью опытного раствора (0,1% Мб, 0,2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=5,5 с введением СО), а затем образцы подвергали термообработке при 70 °С

в течение 20 минут. После этого регистрировали спектры поглощения СОМб при изменении значений pH от 5,0–9,0.

Образцы мяса, полученные из окорока свиной туши, были предварительно обработаны монооксидом углерода (к которому добавили 100 ppm NaNO<sub>2</sub>) и подвергнуты посолу. Затем их выдерживали при температуре 2 °С в течение 4 дней. Значение показателя a\* измеряли спектрофотометрически (СМ-2002, Konica Minolta, Япония). СОМб и НОМб экстрагировали водой или 75 % ацетоном, а спектры поглощения полученных таким образом растворов использовали для определения степени образования СОМб. Окисление липидов в каждом образце мяса также оценивали посредством анализа с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТВА) [12].

Для определения степени образования СОМб измеряли спектры поглощения раствора НОМб (0,1% Мб, 1% аскорбата натрия, 0,1% NaNO<sub>2</sub>, pH=5,5), предварительно обработанного СО.

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Влияние желтой каменной соли и низкого уровня нитрита и нитрата на цвет мяса

В фарше с добавлением NaCl и без нитрита CFR и показатель a\* (краснота) были ниже, чем в образцах фарша с YS. В образцах фарша с YS (с нитритом и без него) краснота мяса и CFR превышали 70 %, несмотря на низкий уровень нитрита в диапазоне от 0 до 100 ppm (Рис. 1).

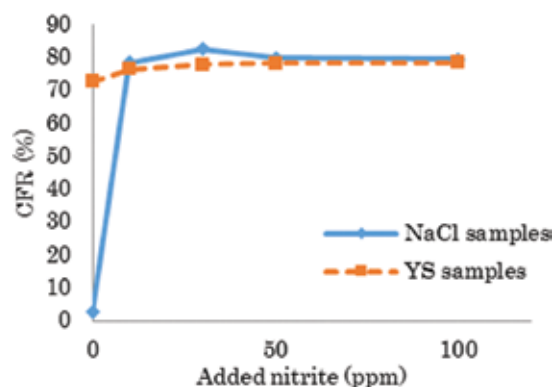


Рис. 1. Коэффициент формирования цвета (CFR)

По сравнению с образцами, содержащими NaCl, уровень остаточного нитрита обычно был выше в фарше с добавлением YS (Рис. 2). Сама YS содержит больше нитрита, чем нитрата. Таким образом, было показано, что YS эффективно улучшает формирование красного цвета мяса. Возможно, этому способствует небольшое количество нитрита, нитрата и минералов в YS.

Было отмечено, что в свином фарше с добавлением YS значение CFR изменяется с увеличением содержания пигмента гема. Когда содержание гема в образцах фарша довольно невысокое, то значение CFR выше, чем

в фарше с большим количеством гема (Рис. 3). Возможно, это происходит из-за ограниченного участия нитрозирования гема в формировании красного цвета мяса.

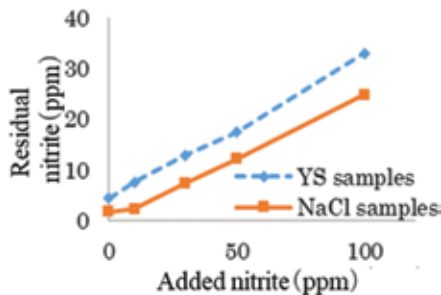


Рис. 2. Остаточные уровни нитрита

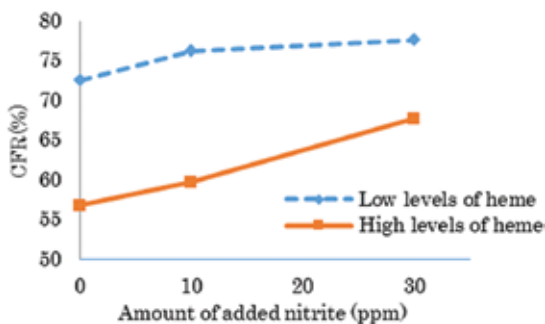


Рис. 3. Коэффициент формирования цвета как функция содержания пигмента гема

### 3.2. Влияние нитрата на стабильность цвета вареных продуктов из свинины

В течение периода хранения инструментальное значение показателя  $a^*$  (краснота) в ветчине, с использованием при посоле нитрита (Контроль), уменьшалось быстрее, чем в ветчине, с использованием при посоле нитрита и нитрата («+Нитрат») (Рис. 4).

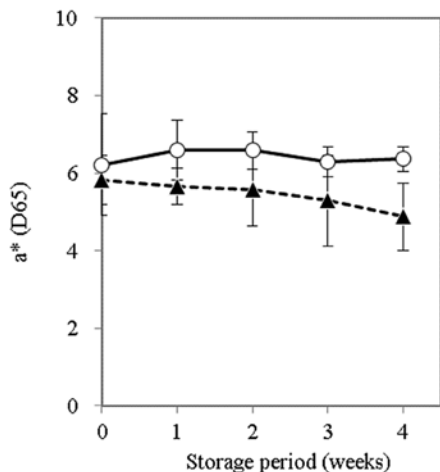


Рис. 4. Влияние нитрата на стабильность цвета в опытных образцах ветчины  
Контроль: посол с использованием 1,5% NaCl и 2 мМ NaNO<sub>2</sub>; обозначено символом (▲).  
+Нитрат: посол с использованием 1,5% NaCl, 2 мМ NaNO<sub>2</sub> и 4 мМ KNO<sub>3</sub>; обозначено символом (○).

При экспериментах с ветчиной концентрация остаточного нитрита поддерживалась в течение 3–4 недель с помощью добавления нитрата (Рис. 5). Результаты

этого исследования показывают, что распад нитрита прогрессирует в виде обратимой реакции, как показано выше. Поэтому нитрат предотвращает снижение концентрации остаточного нитрита в вареной соленой свинине. Усиливающее действие нитрата на формирование цвета мяса было ограничено, даже если нитрат добавляли в достаточном количестве. Таким образом, нитрат в YS может улучшать формирование цвета, но на этот процесс влияют и другие вещества, содержащиеся в YS.

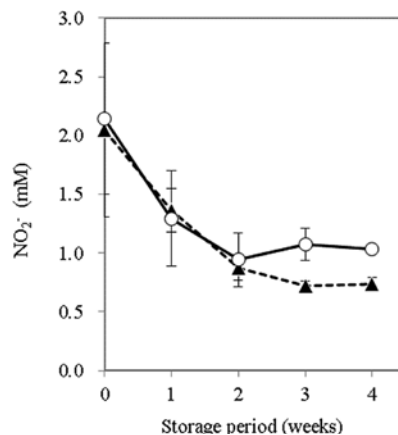


Рис. 5. Влияние нитрата на скорость снижения уровня остаточного нитрита в опытном окороке  
Контроль: посол с использованием 1,5% NaCl и 2 мМ NaNO<sub>2</sub>; обозначено символом (▲).  
+Нитрат: посол с использованием 1,5% NaCl, 2 мМ NaNO<sub>2</sub> и 4 мМ KNO<sub>3</sub>; обозначено символом (○).

### 3.3. Влияние газообразного СО на свойства мяса и формирование NOMb

Значение показателя  $a^*$  (краснота) в обработанной с помощью СО сырой свинине, говядине, курице и соленой свинине увеличивается, что указывает на факт формирования COMb, когда Mb и СО вместе присутствуют в продукте. Экстракты образцов мяса продемонстрировали спектры поглощения, специфические для COMb.

В опытном растворе COMb был термоустойчив и оставался стабильным в течение всего времени охлаждения (Рис. 6), при этом уровень рН поддерживался в диапазоне от 5,0 до 8,0. Значение рН в мясе обычно составляет около 5,5, поэтому красный цвет мяса должен сохраняться в присутствии СО.

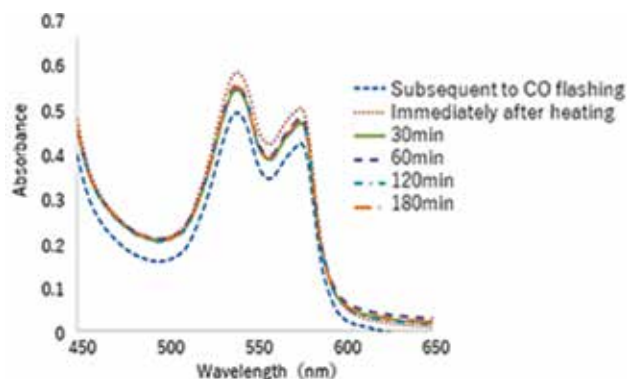


Рис. 6. Спектры поглощения раствора COMb после нагревания и охлаждения в течение 180 минут

СОМб можно экстрагировать водой, но практически невозможно ацетоном (Рис. 7), в отличие от НОМб (данные не представлены). Таким образом, коэффициент формирования СОМб относительно общего уровня Мб в настоящем исследовании не может быть определен.

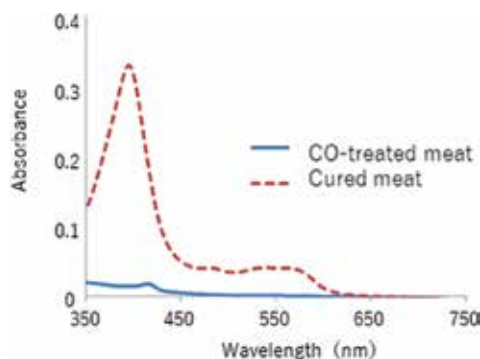


Рис. 7. Спектры поглощения обработанного с помощью СО и соленого мяса после экстракции

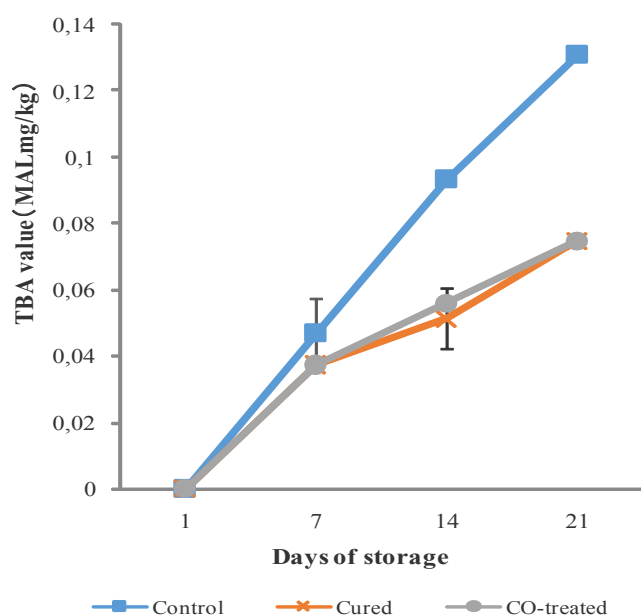


Рис. 8. Изменение значений ТВА в свинине во время хранения

По сравнению с контролем, значения ТВА для сырого мяса значительно увеличивались во время хранения с 7-го по 21-й день, но для свинины, обработанной с по-

мощью СО, они снижались почти до тех же величин, что наблюдались в группе NO (Рис. 8). Таким образом, было показано, что СО так же, как нитрит, эффективен в контроле окисления липидов в сырой свинине. СО ингибировал роста микроорганизмов, что также отмечено для нитрита (данные не представлены).

#### 4. Заключение

Было обнаружено, что гималайская каменная соль эффективна в улучшении формирования красного цвета мяса при очень небольшом содержании нитрита в рецептуре или даже при его отсутствии. Значение CFR в вареных мясных продуктах изменялось в зависимости от содержания пигмента гема из-за низкой степени его нитрозирования в мясе. Нитрат может усиливать эффект гималайской каменной соли в отношении формирования цвета мяса. Тем не менее, в каменной соли должны содержаться и другие факторы формирования красного цвета, поскольку нитрат оказывает лишь небольшое влияние на формирование цвета.

Было отмечено, что СОМб быстро образуется в мясе при совместном присутствии там Мб и СО, что приводит к формированию ярко-красного цвета. Из этого следует, что использование СО может способствовать значительному снижению количество нитрита, добавляемого в мясные продукты, при этом сохраняя формирование приемлемого красного цвета. Кроме того, СО может функционировать в мясе так же, как и нитрит. Сам по себе СО может быть ответственен за неожиданное формирование красного цвета мяса, которое отмечалось на предприятиях общественного питания, но подтверждение этого факта требует дополнительных исследований.

#### Благодарности

Авторы благодарят д-ра М. Мотоюама (Национальная организация сельского хозяйства и пищевых продуктов (NARO), Япония), г-на Y Miki и г-жу M. Kaneko (являются выпускниками Университета Азабу, Япония) за помощь в проведении обработки с помощью СО.

#### 1. Introduction

The purchase of meat products is initially based on color prior to any assessment of parameters such as odor, taste or texture. Meat color is the primary determinant of any decision to purchase a meat product. Color developing agents such as nitrite and nitrate have been found quite useful but food safety considerations limit the extent of their usage.

In recent years, attention has come to be increasingly directed to food safety in response to consumer demands in this regard. Accordingly, techniques for effectively enhancing the red color of meat products through the least possible use of nitrite and nitrate, but with usage of naturally occurring ingredients, have thus become modern day

focal points of emphasis [1, 2]. As substitutes for curing agents, natural animal substances are being avidly examined for potential application, both in Japan and foreign countries. The findings should prove valuable for enhancing and maintaining good food appearance as well as being in the best interests of human health.

However, unexpected reddening and discoloration problems have recently been pointed out and effective solutions must be found. The reddening effect of Himalayan rock salt on meat products was previously reported [3].

In uncured meat products, carboxy myoglobin (COMb) can be considered a major reason for unexpected meat reddening. Carbon monoxide (CO) binds strongly to myoglo-

bin (Mb) to form COMb, which shows a stable bright red color. The addition of CO to food is prohibited by law in Japan, though in foreign countries, this compound is applied as a gas in food packing, and its use in meat products is being carefully examined [4, 5]. Should CO be capable of lowering nitrite content in meat, its use should not meet with any consumer objections.

Natural salts, particularly those in Himalayan rock salts, should prove favorable candidates for reddening of meat products, since they contain nitrite along with nitrate in only small amounts, plus minerals. Yellow salt (YS) from Himalayan products was, therefore, examined in this study for its capacity to bring about a red coloration in meat products and the results were compared with those for ordinary cooking salts.

Nitrate is considered a precursor of nitrite in color formation through its reduction by a bacterium. Alley, Cours, and Demeyer [6] have shown that nitrate can stabilize color in uncooked meat products. Ockerman and Kuo [7], however, consider nitrate to lessen the decline of nitrite in cooked cured meats. Differences in the conclusions from these studies may be explained due to the presence or absence of sodium ascorbate. The present study was conducted to determine whether nitrate is reduced subsequent to heat application and whether nitrate has any effect on nitrite kinetics in cooked cured pork sausage during storage.

Additionally, the characteristics of CO, such as its strong binding to Mb, leading to an attractive red meat color, were also investigated in this study. A comparison was made of parameters such as heat stability, extractability and formation of COMb at different pHs. Mb derivatives were then investigated spectrophotometrically subsequent to CO flushing into nitrosylmyoglobin (NOMb). The antioxidative effects of CO on meat were also examined.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Natural salts experiment

Meat taken from pork leg was depleted as much as possible of its fat and connective tissue and then minced. YS or NaCl was added at 2% to each meat sample, along with 0.1% sodium ascorbate and NaNO<sub>2</sub> in the concentration range: 0, 10, 30, 50 or 100 ppm. After 4 days storage at 4°C under anaerobic conditions, the mince samples were cooked at 75°C for 30 min. After sample cooling, color was assessed visually and then with a spectral colorimeter.

The color forming ratio (CFR) [8], and heme pigment content were measured by acetone extraction. Residual nitrite and nitrate content were determined according to the method of Mirna and Schütz [9] and by copper-cadmium column reduction, respectively.

### 2.2. Effect of nitrate on cooked cured pork

All chemicals used were of standard laboratory grade, obtained from Wako Pure Chemical Industries (Tokyo,

Japan) and used without further purification. The *Longissimus dorsi* (*L. dorsi*; pH 5.7) and *Biceps femoris* (*B. femoris*; pH 5.8) obtained from 5-month old female pigs (three-way cross pig: Landrace, Large White and Duroc) were used to prepare model products.

Model sausage and model ham were prepared from minced *B. femoris* and a whole cut of *L. dorsi*. Each sample cured for 7 days with nitrate was designated as either «+Nitrate» or without nitrate, as the control. Each 1,500 g sample was cured for 7 days with 300 mL brine containing: +Nitrate: NaCl 27 g, NaNO<sub>2</sub> 0.248 g and KNO<sub>3</sub> 0.728 g; the control containing NaCl 27 g and NaNO<sub>2</sub> 0.248 g. Sample quantity in all cases exceeded 300 g and was vacuum packed into 5 bags. These samples were cooked in a water bath at 75°C for 30 min and stored at 10°C with fluorescent illumination (2,000 lx).

Color and concentration of nitrite and nitrate were monitored each week for 4 weeks. Residual nitrite was measured by the method of Sakata and Nagata [10]. Nitrite concentration in the extract was determined subsequent to the flow of the extract through a Cu-Cd column (flow rate: 5 mL/min), the difference in concentration of nitrite before and after flow through this column was considered to be the concentration of nitrate [11]. Surface color was assessed as L\*, a\* and b\* using a colorimeter (CM-2002, Konica Minolta, Japan).

This experiment was conducted *in vitro* using the reaction solutions prepared by mixing 2 mL of 2 M acetic acid buffer (pH 4.5), 1 mL of 0.1 M NaNO<sub>2</sub> and 1 mL of distilled water. The ratio of nitrite decrement to nitrate production was determined based on the absorption values using a spectrophotometer (UV-2700, Shimadzu, Japan). Nitrate concentration was computed based on its peak at 303 nm. Nitrite absorption spectra varied with pH owing to changes in nitrite and HNO<sub>2</sub> content, hence, the isosbestic point of 324 nm for nitrite and HNO<sub>2</sub> was used for determining nitrite concentrations. Each solution was maintained at 20°C before use, and then absorption was measured at 324 nm/303 nm every 20 seconds more than 350 times at 20°C following mixing of all solutions.

### 2.3. CO experiment

COMb was prepared in a model solution (0.1% Mb-0.2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 5.5 with CO gas flushing) and cooked at 70°C for 20 min. The absorption spectra of COMb at pHs adjusted to 5.0–9.0 were monitored.

CO-treated meat and cured meat samples were prepared with pig thigh flushed with CO, to which 100 ppm NaNO<sub>2</sub> had been added, and the meats then kept at 2°C for 4 days. a\* value was measured spectrophotometrically (CM-2002, Konica Minolta, Japan). COMb and NOMb were extracted with water or 75% acetone and the absorption spectra of the solutions thus obtained were used to determine the extent of COMb formation. Lipid oxidation in each meat sample was also evaluated by 2-thiobarbituric acid (TBA) analysis [12].

Absorption spectra of NOMb solution (0.1% Mb-1% Na ascorbate-0.1% NaNO<sub>2</sub>, pH 5.5) previously flushed with CO was measured to determine the extent of COMb formation.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Effects of yellow rock salt and low levels of nitrite and nitrate on meat color

In mince with added NaCl and without nitrite, the CFR and a\* (redness) were less than those measured in YS mince samples. In YS mince samples with and without nitrite, meat redness and CFR were found to exceed 70%, regardless of the low nitrite range, from 0 to 100 ppm (Fig. 1).

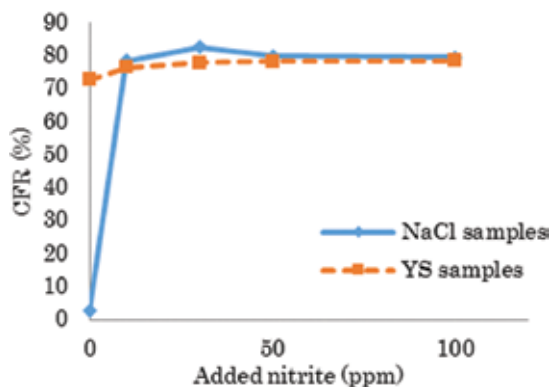


Figure 1. Color forming ratio (CFR)

Compared to NaCl mince samples, residual nitrite content was usually higher in mince with added YS (Fig. 2). The YS itself contained more nitrite than nitrate. YS was, thus, shown to effectively enhance meat reddening. Small amounts of nitrite, nitrate and minerals in the YS could possibly have contributed to this finding.

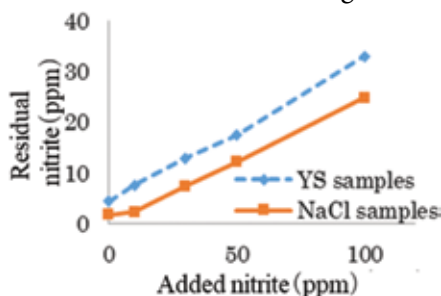


Figure 2. Residual nitrite levels

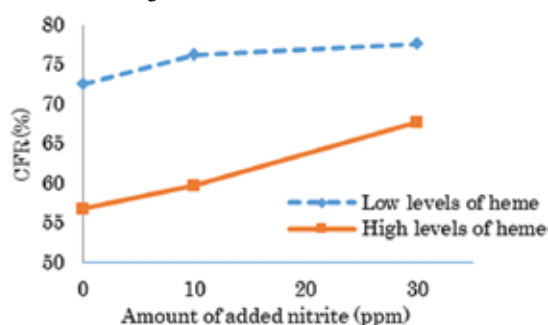


Figure 3. Color forming ratio as a function of heme pigment content

The CFR was noted to change with increase in heme pigment content in pork mince with added YS. When the

content of heme was quite small, the CFR in the mince samples was larger than in mince with more heme (Fig. 3). This could possibly have been due to the limited capacity of heme nitrosation to bring about meat reddening.

#### 3.2. Effect of nitrate on color stability of cooked pork

The instrumental color value, a\* (redness) declined rapidly in cooked pork ham cured with nitrite (Control) than the pork ham cured with nitrite and nitrate (+Nitrate) during storage period (Fig. 4).

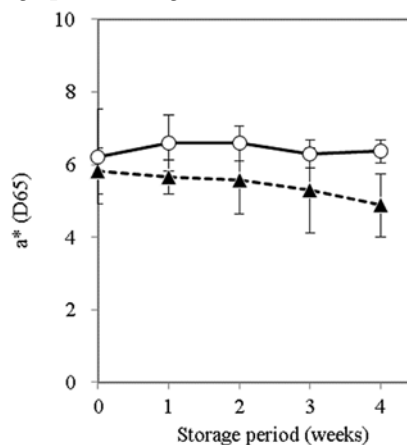


Figure 4. Effects of nitrate on color stability in model ham. Control: cured with 1.5 % NaCl and 2 mM NaNO<sub>2</sub>; indicated by the filled triangle symbol (▲). +Nitrate: cured with 1.5 % NaCl, 2 mM NaNO<sub>2</sub> and 4 mM KNO<sub>3</sub>; indicated by the open circle symbol (○).

The concentration of residual nitrite was maintained at 3–4 weeks by the addition of nitrate in the model ham system (Fig. 5). The results in this study suggest that nitrite decomposition progresses as a reversible reaction as shown above. Therefore, nitrate inhibits the decrease of residual nitrite in cooked cured pork. The accelerative effect of nitrate on the meat color formation was limited even if the nitrate was added in sufficient quantities. Thus, the nitrate in YS could enhance the color formation but there would be the other factors in YS.

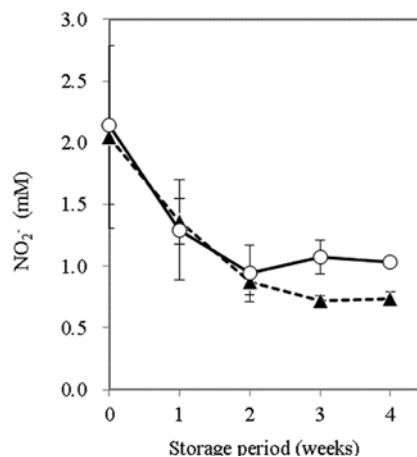


Figure 5. Effects of nitrate on the rate decrease in residual nitrite. Control: cured with 1.5 % NaCl and 2 mM NaNO<sub>2</sub>; indicated by the filled triangle symbol (▲). +Nitrate: cured with 1.5 % NaCl, 2 mM NaNO<sub>2</sub> and 4 mM KNO<sub>3</sub>; indicated by the open circle symbol (○).

### 3.3. Effects of CO gas on meat and NOMb

$a^*$  values (redness) increased in CO-treated raw pork, beef, chicken and cured pork, indicating COMb to have formed when Mb and CO were present together. The meat sample extracts showed the specific absorption spectra of COMb.

In a model solution, COMb was heat stable and stable throughout the given cooling times (Fig. 6), with pH maintained within a range of 5.0 to ~8.0. Meat pH is normally approximately 5.5, so this indicates the red color of meat should be maintained in the presence of CO.

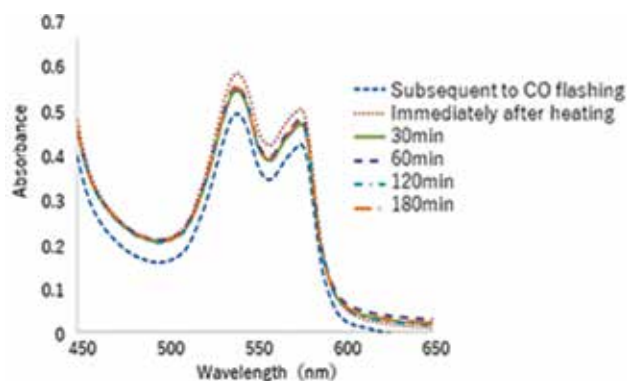


Figure 6. Absorption spectra of COMb solution after heating and cooling for up to 180 mins

The extraction of COMb was possible with water, though virtually impossible with acetone (Fig. 7), in contrast to NOMb (data not shown). Thus, the extent of COMb formation compared to total Mb could not be determined in the present study.

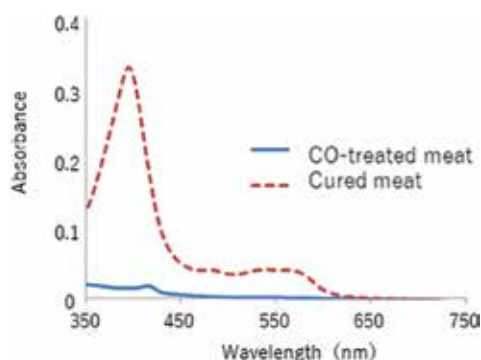


Figure 7. Absorption spectra of CO-treated and cured meat after extraction with

Even when CO was added to NOMb solution, the absorption spectrum of NOMb showed no change (data not shown), thus indicating the higher affinity of NO than CO toward Mb. The addition of  $\text{NaNO}_2$  (100 ppm) to COMb resulted in a change in the absorption spectrum of the NOMb formed (data not shown).

TBA values of raw meat increased significantly during storage, but TBA values for CO-treated pork decreased to nearly the same as those observed in the NO-group,

compared to the control, from day 7 to day 21 of storage (Fig. 8). Therefore, CO was shown to be as capable as nitrite of controlling lipid oxidation in raw pork. CO proved inhibitory to microorganism growth, as was also noted for nitrite (data not shown).

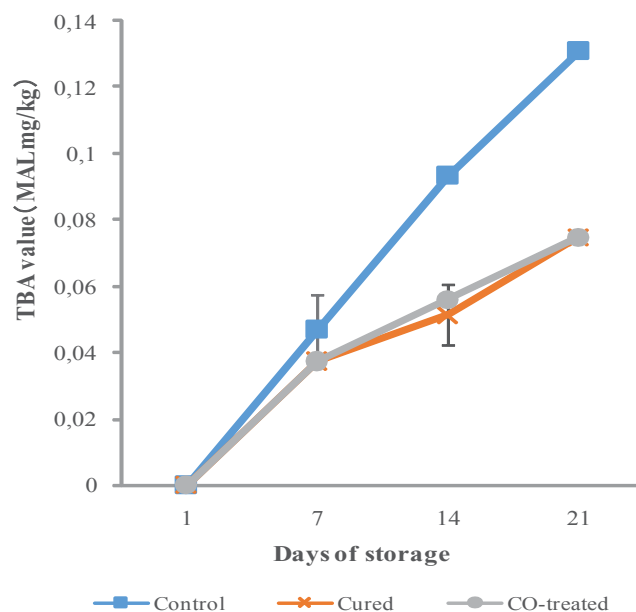


Figure 8. Change in pork TBA value during storage

## 4. Conclusion

Himalayan rock salt was found to be effective for enhancing the red color of meat at very small nitrite content or even in the absence of nitrite. The CFR in cooked meat changed with heme pigment content in meat, owing to the low degree of nitrosation in the meat. The nitrate could play a part in the accelerative effect of Himalayan rock salt on the meat color formation. However, there would be the other reddening factors in the rock salt because the nitrate made a little impact on the color formation.

COMb was noted to form rapidly in meat when Mb and CO were combined, giving rise to a bright red color in the meat. It follows then, that CO could serve to significantly lessen the amount of nitrite added to meat products, while still supporting formation of an acceptable red color. CO could also function in a very similar fashion as nitrite in meat. CO itself could possibly be a factor for the unexpected reddening of meat as noted at food service facilities, but confirmation of this point will require additional research.

## Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. M Motoyama (National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Japan), Mr. Y Miki and Miss M Kaneko (the latter two are graduates of the Azabu University, Japan) for their assistance in conducting the CO treatment.



## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Mancini, R.A., Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100–121.
2. Sakata, R. (2010). Prospects for new technology of meat processing in Japan. *Meat Science*, 86 (1), 243–248.
3. Kaneko, M., Okuda, Y., Waga, M., Oshida, T., Sakata, R. (2014). Enhanced reddening of meat by the addition of himalayan rock salt. *Proceedings of the 60th International Congress of Meat Science and Technology, Punta del Uste, Uruguay*, CD068.
4. Suman, S.P., Hunt, M.C., Nair, M.N., Rentfrow, G. (2014). Improving beef color stability: Practical strategies and underlying mechanisms. *Meat Science*, 98 (3), 490–504.
5. Van Rooyen, L.A., Allen, P., O'Connor, D.I. (2017). The application of carbon monoxide in meat packaging needs to be re-evaluated within the EU: An overview. *Meat Science*, 132, 179–188.
6. Alley, G., Cours, D., Demeyer, D. (1992). Effect of nitrate, nitrite and ascorbate on colour and colour stability of dry, fermented sausage prepared using 'back slopping'. *Meat Science*, 32 (3), 279–287.
7. Ockerman, H.W., Kuo, J.C. (1982). Dried Pork as Influenced by Nitrate, Packaging Method and Storage. *Journal of Food Science*, 47 (5), 1631–1634.
8. Sakata, R., Ohso, M., Nagata, Y. (1981). Effect of Porcine Muscle Conditions on the Color of Cooked Cured Meat Products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 (9), 2077–2081.
9. Mirna, A. (1972). Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung des Pökelfstoffes sowie von Nitrit und Nitrat bin Fleischzeignissen. *Fleischwirtschaft*. 52, 337–1338.
10. Sakata, R., Nagata, Y. (1992). Heme pigment content in meat as affected by the addition of curing agents. *Meat Science*, 32 (3), 343–350.
11. Pérez-Rodríguez, M. L., Bosch-Bosch, N., Garcíá-Mata, M. (1996). Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. *Meat Science*, 44 (1–2), 65–73.
12. Yamauchi, K., Murata, H., Ohashi, T., Katayama, H., Pearson, A.L., Okada, T., Yamakura, T. (1991). Effect of dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation on the molar ratio of polyunsaturated fatty acids/ $\alpha$ -tocopherol in broiler skeletal muscles and subcellular membranes and its relationship to oxidative stability. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 38, 545–552.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Саката Риочи** — профессор, Лаборатория науки о пище, Институт ветеринарной медицины, Университет Асабу Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan  
Тел.: +81–42–754–71–11  
E-mail: sakata@azabu-u.ac.jp

**Такеда Широ** — Адыюнкт- профессор, Лаборатория науки о пище, Институт ветеринарной медицины, Университет Асабу Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan  
Тел.: +81–42–754–71–11  
E-mail: s-takeda@azabu-u.ac.jp  
\*автор для контактов

**Вара Масахиро** — Ph.D, помощник руководителя отдела технического управления, производственный дивизион, корпорация Itoham Foods, Meguro, Tokyo 153–8587, Japan  
Тел.: +81–3–572–60–98  
E-mail: masahiro.waga@outlook.com

## Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2017

## AUTHOR INFORMATION

## Affiliation

**Sakata Ryoichi** — Professor, Laboratory of Food Science, School of Veterinary Medicine, Azabu University Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan  
Tel.: +81–42–754–7–11  
E-mail: sakata@azabu-u.ac.jp

**Takeda Shiro** — Associate Professor, Laboratory of Food Science School of Veterinary Medicine, Azabu University Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan  
Tel.: +81–42–754–71–11  
E-mail: s-takeda@azabu-u.ac.jp  
\*corresponding author

**Waga Masahiro** — Ph.D., Assistant Chief Technical Management Sector, Production Division, Itoham Foods Inc., Tokyo Office, Meguro, Tokyo 153–8587, Japan  
Tel.: +81–3–572–60–98  
E-mail: masahiro.waga@outlook.com

## Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 11.10.2017