

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Martin GREGORICH

**IDENTIFIKACIJA HETEROCIKLIČNIH AMINOV V RAZLIČNIH  
STOPNJAH PROTEOLIZE TOPLOTNO OBDELANE PRAŠIČJE  
DOLGE HRBTNE MIŠICE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION OF HETEROCYCLIC AMINES IN THERMALLY  
TREATED PORK *LONGISSIMUS DORSI* MUSCLE DURING  
PROTEOLYSIS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Popravki:

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

Študijska komisija oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Leo Gašperlin, za recenzentko pa prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: doc. dr. Lea GAŠPERLIN

Recenzentka: prof. dr. Veronika ABRAM

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Martin GREGORICH

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 637.5'64 : 641.526.3 : 543.61.062 : 547.545(043)=163.6
- KG meso / prašičje meso / *m. longissimus dorsi* / zorenje mesa / pečenje mesa / neproteinski dušik / HPLC-MS / heterociklični aromatski amini
- AV GREGORICH, Martin
- SA GAŠPERLIN, Lea (mentorica) / ABRAM, Veronika (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2008
- IN IDENTIFIKACIJA HETEROCIKLIČNIH AMINOV V RAZLIČNIH STOPNJAH PROTEOLIZE TOPLOTNO OBDELANE PRAŠIČJE DOLGE HRBTNE MIŠICE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 59 str., 15 pregl., 11 sl., 5 pril., 100 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv časa zorenja oz. proteolize in stopnje pečenosti do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ) na tvorbo mutagenih in karcinogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HCA) v dolgi hrbtne mišici (*m. longissimus dorsi*) prašiča. Poskus smo opravili na mišicah petih slovenskih pasemskih križancev (Švedska landrace × Large white × Duroc × Hampshire) normalne kakovosti. Mišice smo razdelili na štiri dele, jih vakuumsko embalirali in zoreli 1 (nezoren), 3, 6 in 10 dni pri temperaturi 2 °C. Meso smo pekli na dvoploščnem žaru pri temperaturi 220 °C do dveh  $T_s$  (70 °C in 95 °C). Osnovno kemijsko sestavo in indikatorje zorenja, kot so izceja, vrednost pH ter vsebnost neproteinskega dušika, smo določili na presnih vzorcih. HCA smo iz homogenata zgornje in spodnje skorje pečenega zrezka ekstrahirali in očistili s trdno fazo (SPE) ter jih določili z HPLC-MS. Zorenje mesa vpliva na vse merjene pokazatelje zorenja. Določili smo pet različnih HCA: PhIP, MeIQx, DiMeIQx, harman in norharman. Vsebnost HCA se je v zorenem mesu povečala za 2- do 3-krat (nezoreno meso vsebuje 1,35 ng/g, po treh 1,38 ng/g, po šestih 1,77 ng/g in po desetih dneh 3,49 ng/g) in je bila odvisna od  $T_s$ ; povprečno se je v vzorcih pečenih do  $T_s = 95$  °C tvorilo od 3- do 4-krat več HCA kot v vzorcih pečenih do  $T_s = 70$  °C (7,30 ng/g vs. 2,18 ng/g). Z zdravstvenega vidika je najprimernejše uživanje do  $T_s = 70$  °C pečenega prašičjega mesa zorenega do 3 dni.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 637.5'64 : 641.526.3 : 543.61.062 : 547.545(043)=163.6

CX meat / pork / *m. Longissimus dorsi* / ageing meat / grilling / non-protein nitrogen / HPLC-MS / heterocyclic aromatic amines

AU GREGORICH, Martin

AA GAŠPERLIN, Lea (supervisor) / ABRAM, Veronika (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2008

TI IDENTIFICATION OF HETEROCYCLIC AMINES IN THERMALLY TREATED PORK *LONGISSIMUS DORSI* MUSCLE DURING PROTEOLYSIS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XIII, 59 p., 15 tab., 11 fig., 5 ann., 100 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The effects of ageing time or proteolysis and internal temperature ( $T_i$ ) on the formation of mutagenic and carcinogenic heterocyclic aromatic amines (HCAs) in grilled pork muscles (*Longissimus dorsi*) were studied. Muscles of normal quality originated from five commercially slaughtered crossbred (Swedish Landrace  $\times$  Large White  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire) barrows. Muscles were cut to four pieces, vacuum packed and aged for 1 (nonaged), 3, 6 and 10 days at 2 °C. Meat was grilled (two plated grill, temperature of 220 °C) to two different  $T_i$  (70 °C and 95 °C). Basic chemical composition and ageing indicators, such as drip loss, pH value and content of non-protein nitrogen, on raw muscles were analysed. HCAs was in a homogenate of upper and lower surface slices of grilled stakes extracted and purified by SPE procedure and determined by HPLC-MS. Generally, all measured ageing indicators were influenced by ageing time. Five HCAs were determined: PhIP, MeIQx, DiMeIQx, Harman and Norharman. Content of HCAs increases with ageing 2- to 3-times (in nonaged and normal pork HCAs content being 1.35 ng/g, after 3 days 1.38 ng/g, after 6 days 1.77 ng/g and after 10 days 3.49 ng/g) and is dependent on  $T_i$ ; on average from 3- to 4-times higher amount of HCAs formed in grilled samples to  $T_i = 95$  °C than in samples grilled to  $T_i = 70$  °C (7.30 ng/g vs. 2.18 ng/g). From health perspective it is the most suitable to grill pork meat to (3-day aged) to the  $T_i = 70$  °C.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>PRILOGE .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 MIKROSTRUKTURA MIŠIČNEGA VLAKNA .....	3
2.2 BIOKEMIJSKE IN STRUKTURNE SPREMEMBE V MIŠIČNINI PO ZAKOLU .....	5
2.2.1 Konverzija mišice v meso .....	5
2.2.2 Zorenje mesa .....	7
2.2.3 Nепroteinski dušik .....	11
2.3 TOPLOTNA OBDELAVA MESA IN POJAV HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV .....	13
2.3.1 Fizikalno-kemijske spremembe mesa med toplotno obdelavo .....	13
2.3.2 Heterociklični aromatski amini .....	16
2.3.3 Prekurzorji in tvorba aminokarbolinov .....	19
2.3.4 Prekurzorji harman in norharman .....	19
2.3.5 Prekurzorji spojin skupine IQ in IQx .....	19
2.3.6 Prekurzorji PhIP .....	20
2.3.7 Proteoliza in nastanek mutagenih snovi .....	21
2.3.8 Vpliv drugih sestavin mesa, ki vplivajo na količino HCA .....	21
2.3.9 Vpliv pogojev toplotne obdelave .....	22
2.3.10 Zmanjševanje vsebnosti HCA s spremembo toplotne obdelave .....	24
2.3.11 Zaščita pred vplivi HCA .....	24
<b>3 MATERIAL IN METODE DE LA .....</b>	<b>25</b>

3.1	MATERIAL ZA RAZISKAVO .....	25
3.2	NAČRT DELA.....	25
3.3	METODE DELA.....	26
3.3.1	Določanje osnovne kemijske sestave mesa .....	26
3.3.2	Merjenje vrednosti pH.....	27
3.3.3	Instrumentalno merjenje barve .....	27
3.3.4	Določanje sposobnosti za vezanje vode.....	28
3.3.5	Določanje vsebnosti neproteinskega dušika .....	28
3.3.6	Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov.....	28
3.3.6.1	Priprava vzorca .....	28
3.3.6.2	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije .....	29
3.3.6.3	Validacija metode .....	30
3.3.7	Statistična analiza.....	32
4	<b>REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1	OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MIŠIC .....	33
4.2	PREVERJANJE KAKOVOSTI MIŠIČNINE.....	33
4.3	VPLIV ZORENJA .....	34
4.4	PARAMETRI PEČENJA NA DVOPLOŠČNEM ŽARU .....	35
4.5	HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI .....	36
4.6	KORELACIJE.....	39
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>40</b>
5.1	RAZPRAVA .....	40
5.2	SKLEPI .....	46
6	<b>POVZETEK.....</b>	<b>47</b>
7	<b>VIRI .....</b>	<b>49</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Najpomembnejše mišične proteaze vključene v proteolizo (Toldrá, 2004). .....	10
Preglednica 2:	Vsebnost prostih aminokislin in nekaterih dipeptidov (mg/100g) v mišici LD prašiča <i>post mortem</i> .....	12
Preglednica 3:	Kratice, imena in strukturne formule poznanih HCA (Felton in sod., 2000). ....	17
Preglednica 4:	Antioksidativen učinek začimb na zmanjšanje vsebnosti HCA v pečenem govejem mesu (Murkovic in sod., 1998).....	21
Preglednica 5:	Vsebnost HCA v različnih vrstah mesa po različni toplotni obdelavi (Skog in sod., 1998; Felton in sod., 2000). .....	23
Preglednica 6:	Priprava umeritvenih krivulj za kvantitativno določanje različnih HCA po metodi standardnega dodatka in internega standarda. ....	31
Preglednica 7:	Rezultati osnovne kemijske analize presnih dolgih hrbtnih mišic prašičev z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	33
Preglednica 8:	Rezultati meritev parametrov kakovosti mišičnine, izmerjenih na presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	33
Preglednica 9:	Rezultati meritev izceje med zorenjem, vrednosti pH v ekstraktu in deleža neproteinskega dušika – NPN zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča. ....	34
Preglednica 10:	Vpliv zorenja na izcejo v različnih časih zorenja, vrednost pH v ekstraktu in delež neproteinskega dušika – NPN v presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 5, model 1, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	34
Preglednica 11:	Vpliv zorenja na čas pečenja in izcejo med pečenjem dolgih hrbtnih mišic prašiča do določene $T_s$ (n = 5, Model 1, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ). ....	35
Preglednica 12:	Vsebnosti nekaterih HCA v nezorenih in zorenih ter toplotno obdelanih dolgih hrbtnih mišic prašiča z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	36
Preglednica 13:	Vpliv časa zorenja in središčne temperature pečenja na vsebnost (ng/g) HCA v toplotno obdelanih dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 5, Model 1 in 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ in t-test v paru). ....	37
Preglednica 14:	Pearsonovi korelacijski koeficienti med izcejo med zorenjem in pečenjem, vsebnostjo NPN v presnih mišicah in vsebnostjo HCA v zunanem sloju pečenih dolgih hrbtnih mišic prašiča v odvisnosti od središčne temperature (n = 8). ....	39
Preglednica 15:	Parametri kakovosti za devet različnih vzorcev LD prašiča (Joo in sod., 1999).....	41



## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz mišičnega vlakna (Strete, 1995).....	3
Slika 2:	Struktura sarkomere (Valin in Ouali, 1992).....	4
Slika 3:	Shematičen prikaz zgodnjih sprememb v mišici post mortem in njihov vpliv na sposobnost vezanja vode (Toldrá, 2003).....	5
Slika 4:	Shematski prikaz reakcij neencimskega porjavenja (Davies in Labuza, 2007).....	15
Slika 5:	Tvorba piridin in pirazin radikalov (Shahidi in sod., 2004; Murkovic, 2004; Vitaglione in Fogliano, 2004). ....	16
Slika 6:	Pot tvorbe imidazokinolinov (IQ) in imidazokinoksalinov (IQx) (Felton in sod., 2000).....	20
Slika 7:	Shematski prikaz odvzema vzorcev iz levih in desnih dolgih hrbtnih mišic prašiča.....	25
Slika 8:	Odvzem vzorcev za fizikalne in kemijske analize.....	26
Slika 9:	HPLC–MS kromatogram mešanice 8-ih različnih HCA standardov v metanolu (vsak 200 ng/g) in TriMeIQx-om kot internim standardom (levo); HPLC–MS kromatogram 6 dni zorenega vzorca, pečenega do središčne temperature 95 °C, z TriMeIQx-om kot internim standardom(desno). ....	30
Slika 10:	Odvisnost med časom pečenja in izcejo pri pečenju različno zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča.....	36
Slika 11:	Vsebnost vseh HCA (ng/g) v nezorenih (1 dan <i>post mortem</i> ) in zorenih dolgih hrbtnih mišicah prašiča, pečenih na dvoploščnem žaru do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ). ....	38

## PRILOGE

Priloga A:	Ponovljivost med paralelkami pri določanju vsebnosti vode, intramuskularne maščobe (IMF), beljakovin, skupnih mineralnih snovi, deleža neproteinskega dušika (NPN) in vrednosti pH, merjene v ekstraktu, v presni dolgi hrbtne mišice prašiča.....	58
Priloga B:	Nekateri MS parametri in masni prehodi HCA v MRM načinu.....	58
Priloga C:	Ponovljivost določanja vsebnosti HCA znotraj paralelke naključnega vzorca. ....	59
Priloga D:	Ponovljivost določanja vsebnosti HCA med paralelkami naključnega vzorca. ....	59
Priloga E:	Validacijski parametri določanja vsebnosti HCA. ....	59

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADP	adenozindifosfat
AIA	aminoimidazo-azaareni
ATP	adenozintrifosfat
A $\alpha$ C	2-amino-9H-pirido[2,3- <i>b</i> ]indol
BMV	bleda, mehka in vodena kakovost mišičnine
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ESI	ionizacija z elektrorazprševanjem
Glu-P-1	2-amino-6-metil-dipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol
Glu-P-2	2-amino-dipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol
harman	9-metil-9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido[3,4- <i>b</i> ]indol oziroma 9-metil- $\beta$ -karbolin
HCA	heterociklični aromatski amini
HPLC-MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masnim spektrometrom
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinolin
IQx	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
LD	dolga hrbtina mišica ( <i>longissimus dorsi</i> )
MCX	mešan kationski in hidrofobni izmenjevalec
MeA $\alpha$ C	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3- <i>b</i> ]indol
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinolin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
Milli-Q	prečiščena Milli-Q voda (RIOs 5 + Milli-Q Gradient System, Millipore S.A., France)
MRM	angl. Multiple Reaction Monitoring
MS	masni spektrometer
norharman	9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido[3,4- <i>b</i> ]indol oziroma $\beta$ -karbolin
NPN	neproteinski dušik
<i>p.m.</i>	<i>post mortem</i> (obdobje po zakolu živali)
pH <sub>24</sub>	vrednost pH merjena 24 ur <i>post mortem</i>
pH <sub>45</sub>	vrednost pH merjena 45 minut <i>post mortem</i>
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin
PROC CORR	korelacije (angl. Correlations)
PROC GLM	splošni linearni model (angl. General Linear Model)
PROC TTEST	t-test v paru (angl. T-test Paired)
PSE	BMV kakovost mišičnine, angl. (Pale, Soft and Exudative)
r	Pearsonov korelacijski koeficient
r <sup>2</sup>	koeficient determinacije
RČN	rdeča, čvrsta, normalna kakovost mišičnine
RMV	rdeča, mehka in vodena kakovost mišičnine

RP-LC	tekočinska kromatografija z obrnjeno fazo
SIR	angl. Selected Ion Recording
SPE	ekstrakcija s trdno fazo, angl. (Solid Phase Extraction)
SpVV	sposobnost za vezanje vode
TCA	trikloroacetna kislina
TN	skupen dušik
TriMeIQx	2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3- <i>b</i> ]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3- <i>b</i> ]indol
T <sub>s</sub>	središčna temperatura
z	naboj iona

## 1 UVOD

Presnega mesa ne pojemo veliko. Večinoma ga na različne načine termično obdelamo in nato zaužijemo. Procesu med termično obdelavo namreč oblikujejo primerne jedilne lastnosti in prebavljivost ter izboljšajo mikrobiološko stabilnost. V določenih primerih pa se med termično obdelavo v sledovih tvorijo tudi nekatere toksične, mutagene ali kancerogene snovi kot so npr. heterociklični aromatski amini, ki povzročajo raka v različnih ciljnih tkivih. Zato pojav nekaterih oblik raka raziskovalci povezujejo z uživanjem večjih količin mesa in mesnih izdelkov ob premajhnem vnosu antioksidantov v vsakodnevno prehrano. Danes poznamo nekaj več kot 20 mutagenih/kancerogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HCA), ki so bili izolirani in identificirani v termično obdelanem mesu, ribah in njihovih izdelkih.

Raziskovalci se ukvarjajo z različnimi področji proučevanja HCA, kot so nastajanje, vsebnost v hrani, vnos in biotransformacija v telesu ter povzročanje sprememb v celicah in tkivih. Tvorba HCA je odvisna od vrste hrane ter načina, časa in temperature njene priprave. Prekurzorji za nastanek HCA v mesu so proste aminokisliline, kreatin in reducirajoči sladkorji. Maillardova reakcija je ključna za tvorbo večine HCA, kar je bilo potrjeno z modelnimi poskusi. Predvidevajo, da tudi drugi (prosti) radikali, ki so zelo reaktivni, prispevajo k nastanku HCA.

Dokazano je, da se med zorenjem govejega mesa pomembno poveča vsebnost prekurzorjev HCA. Zorenje je namreč kompleksen biokemijski proces na mišičnini in mastnini, ki ga usmerjajo naravno prisotni encimi mesa, in ima za posledico razgradnjo oziroma poškodovanje strukturnih beljakovin (proteolizo), kar se kaže kot porušenje mikroskopske zgradbe mesa, izboljšanje teksture in drugih funkcionalnih lastnosti mesa. Meso postaja bolj mehko, topno in žvečljivo, oblikujeta se značilen vonj in okus. Do sedaj proteolitične spremembe prašičjega mesa med zorenjem niso bile deležne posebne pozornosti raziskovalcev. Za nas pa so proteolitične spremembe, kot so povečanje števila krajših miofibrilarnih fragmentov, povečanje vsebnosti neproteinskega dušika in nenazadnje teksturne lastnosti, zanimive predvsem v povezavi s predvidenim povečanim oblikovanjem HCA v dlje zorenem prašičjem mesu.

V večini raziskav so zaradi oblikovanja čim večje količine HCA uporabljali zelo visoke temperature termične obdelave mesa, kar pa je s prehranskega in kulinaričnega vidika nesprejemljivo. Sedaj pa se je tehnika ločevanja in detekcije dovolj razvila, da lahko določamo tudi količine, ki nastajajo v mesu pri normalnih pogojih toplotne obdelave. Zavedali smo se, da se bodo v toplotno obdelanem prašičjem mesu tvorili HCA v zelo majhnih količinah (manjših kot pri govedini), zato sta nam ločevanje in identifikacija različnih vrst HCA v prašičjem mesu predstavljale še poseben izziv. Za ločevanje in

kvantitativno analizo se navadno uporablja tekočinska kromatografija visoke ločljivosti v povezavi z masno spektrometrijo (HPLC-MS) in to tehniko smo uporabili tudi v naši raziskavi.

## 1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

Prisotnost HCA v toplotno obdelanem mesu je odvisna od številnih dejavnikov kot so metoda, čas, temperatura in stopnja toplotne obdelave, prisotnost relativnih količin prekurzorjev, inhibitorjev in stimulatorjev, maščob, antioksidantov in vsebnosti vode. Mi smo skušali ugotoviti vpliv stopnje proteolize oz. časa zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) in vpliv stopnje pečenosti do dveh središčnih temperatur (70 °C in 95 °C) oz. časa pečenja, na nastanek mutagenih in karcinogenih HCA v dolgi hrbtne mišici prašiča. Ker smo predvidevali, da proteoliza v prašičjem mesu različnih kakovosti ne poteka v enakem obsegu, smo v raziskavo vključili samo meso normalne kakovosti. Normalno kakovost vzorcev smo potrdili z ustaljenimi metodami (merjenjem vrednosti pH<sub>24</sub>, sposobnosti za vezanje vode ter instrumentalnim merjenjem barve presnega mesa).

Z rezultati raziskave smo želeli prispevati k večjemu poznavanju problematike HCA, še zlasti k realnim ocenam vnosa HCA v organizem. Pokazati smo želeli, da lahko tako v gospodinjstvu kot tudi v gostinstvu, s preudarno izbiro surovine (svežega mesa) in premišljeno pripravo le te, naredimo okusne in gastronomsko privlačne mesne jedi z manj ali pa skoraj brez zdravju nevarnih HCA.

Naš poskus je temeljil na naslednjih hipotezah:

- da se bo z zorenjem prašičjega mesa v njem povečala koncentracija neproteinskega dušika, na podlagi katerega lahko sklepamo na količino prostih aminokislin in drugih prekurzorjev HCA, ter da bo posledično nastalo med toplotno obdelavo več HCA,
- da bo pri pečenju do višje središčne temperature nastalo več HCA kot posledica podaljšane toplotne obdelave.

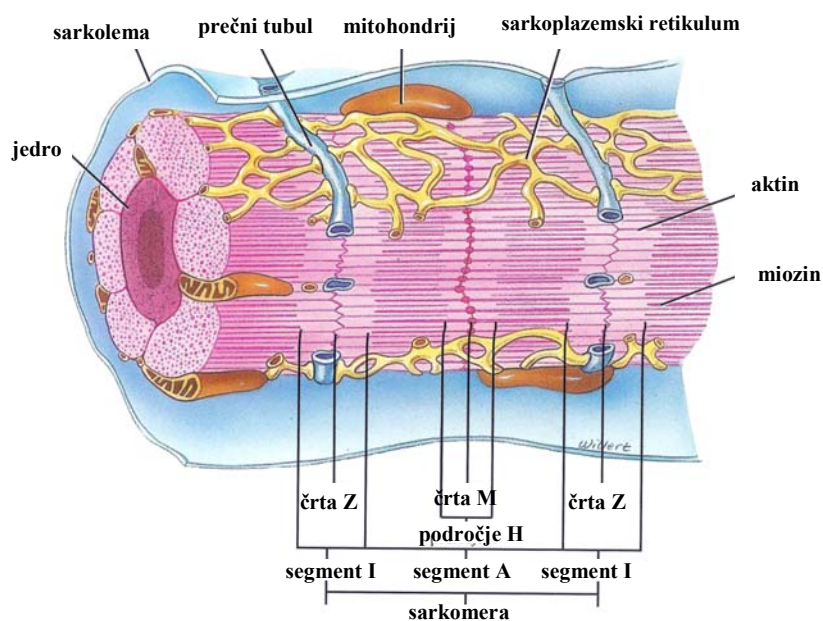
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MIKROSTRUKTURA MIŠIČNEGA VLAKNA

Med proteolizo določeni encimi razgrajujejo beljakovine (predvsem aktin in miozin) na manjše enote – polipeptide, peptide, v manjšem obsegu tudi proste aminokisliline. Zato v uvodnem delu pregleda objav predstavljamo mikrostrukturo mišičnega vlakna, v katerem se odvija poglavitni del omenjenih procesov.

Osnovna enota skeletnih mišic je dolga cilindrična, mnogojedrna celica – mišično vlakno. Mišično vlakno je sestavljeno iz (Valin in Ouali, 1992):

- sarkoleme – nežne ovojnice, ki ovija mišično vlakno po celi dolžini;
- sarkoplazme – homogena, razmeroma viskozna tekočina, v kateri se nahajajo miofilamenti, jedra in drugi celični organeli;
- miofibril – kratkih kontraktilnih niti;
- jeder – nosilcev dednega materiala;
- celičnih organelov – mitohondrijev, endoplazemskega retikuluma, lizosomov...



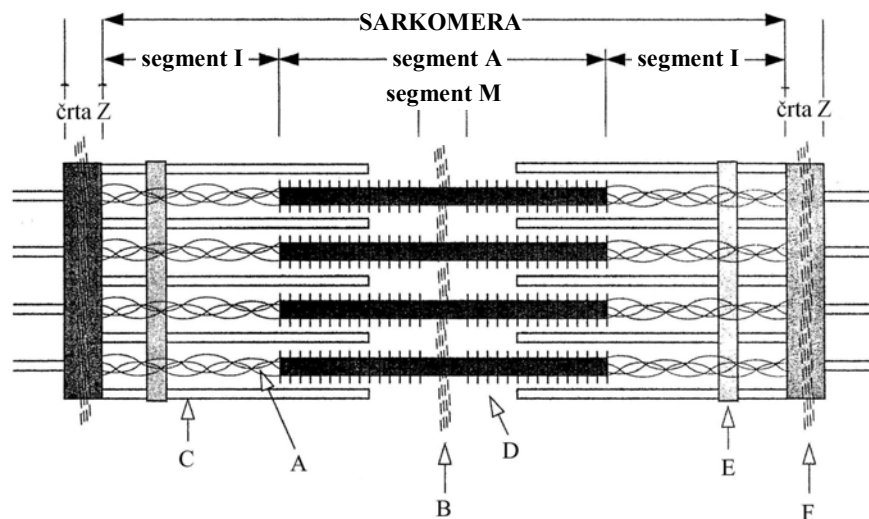
Slika 1: Shematski prikaz mišičnega vlakna (Strete, 1995).

Miofibrile so tanke niti, premera 1-2  $\mu\text{m}$ , ki potekajo čez celo mišično vlakno in ležijo tesno druga ob drugi. So temeljna enota mišičnega vlakna, v katerih so še manjše enote – miofilamenti (debeli (miozin) in tanki (aktin)) ter predstavljajo bazično kontraktilno enoto. Miofibrile so razdeljene na prečne odsečke, ki različno lomijo polarizirano svetlobo. Širši in temnejši je segment A, ožji in svetlejši pa je segment I. Segmenti A in I ležijo drug poleg drugega in dajejo mišičnemu vlaknu prečno progasti videz. Sredi segmenta I teče črta Z in polje med dvema črtama Z je strukturna in funkcionalna enota miofibrile,

imenovana sarkomera (1,5-4,0  $\mu\text{m}$ ) (slika 1 in 2). Od črte Z na vsaki strani se proti sredini prožijo svetle nitke – tanki filamenti, ki so sestavljeni iz prevladujoče beljakovine aktin in jih zato imenujemo aktinski filamenti. V sredini sarkomere so za svetlobo manj prepustne nitke ali filamenti, ki so debelejši, sestavljeni iz proteina miozina in jih zato imenujemo miozinski filamenti (Valin in Ouali, 1992).

Miofibrilarne beljakovine so topne v 0,6 M raztopini elektrolitov in niso topne v vodi. Med miofibrilarne beljakovine prištevamo (Valin in Ouali, 1992):

- glavna kontraktilna proteina: miozin in aktin;
- regulacijske proteine: tropomiozin, troponin-C, troponin-I, troponin-T,  $\alpha$ -aktinin,  $\beta$ -aktinin,  $\gamma$ -aktinin, Eu-aktinin;
- citoskeletne proteine: titin (konektin), nebulin (beljakovina linije N2), protein C, protein M, dezmin (skeleton), filamin, vimentin, sinemin, protein X, protein I, protein F, kreatin kinaza.



- A – longitudinalni filamenti: titin in konektin
- B – prečni filamenti: dezmin
- C – tanki filamenti: aktin, tropomiozin, troponin in aktinin
- D – debeli filamenti: miozin, C-protein, H-protein, X-protein
- E – črta N2: aktinin, filamin, dezmin, vinkulin, talin, zevgmatin, Z-protein
- F – M-protein, miomezin, kreatin-kinaza in skelemin

**Slika 2: Struktura sarkomere (Valin in Ouali, 1992).**

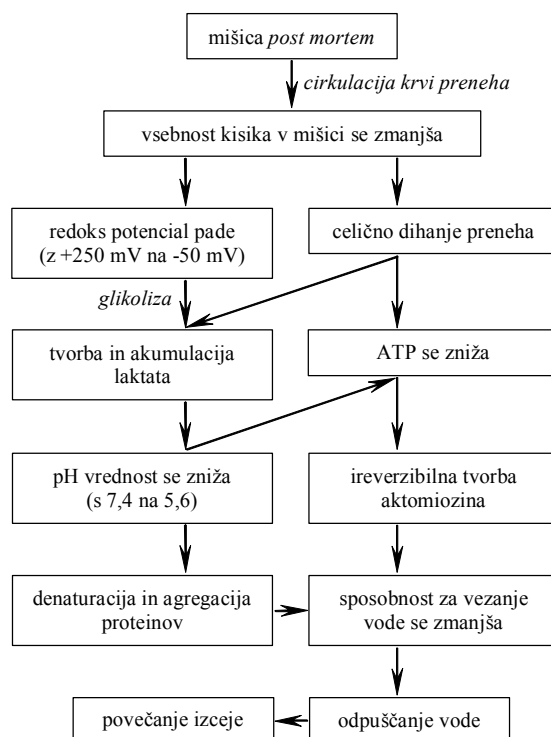


## 2.2 BIOKEMIJSKE IN STRUKTURNE SPREMEMBE V MIŠIČNINI PO ZAKOLU

V tem poglavju so po Encyclopedia of meat sciences (2004) in disertaciji Došlerja (2007) povzete poglavitne biokemijske in strukturne spremembe, ki mišico spremenijo v meso, in proteolitični procesi med nadaljnim hranjenjem mesa, ki so v veliki meri odgovorni za oblikovanje njegovih jedilnih lastnosti.

### 2.2.1 Konverzija mišice v meso

Pretvorba skeletne mišice v meso je kompleksen proces, v katerem so vsi odgovorni mehanizmi za oblikovanje kakovosti mesa zelo verjetno medsebojno odvisni (slika 3). Po izkrvavitvi nastane v mišici neobičajno stanje brez kisika in dotoka hranil. Takšno stanje povzroči programirano celično smrt, t.j. apoptozo (program 'samomor'), ki je vodena preko centralnega živčnega sistema ali preko celice same. V celičnih mitohondrijih se tvorijo kisikovi radikali, ki iniciirajo avtokatalitični proces. Apoptoza se začne neposredno po izkrvavitvi in se nadaljuje tako dolgo, dokler so za apoptozo odgovorni encimi aktivni. Apoptoza v umirajoči celici inducira številne biokemijske in strukturne spremembe, ki se kažejo v mišici *post mortem* (*p.m.*). Pretvorba mišice v meso se odvije v treh zaporednih stopnjah: stopnja pred *rigor*, stopnja *rigor* in stopnja mehčanja mesa (Ouali in sod., 2006).



Slika 3: Shematičen prikaz zgodnjih sprememb v mišici post mortem in njihov vpliv na sposobnost vezanja vode (Toldrá, 2003).

Energijsko bogate rezervne spojine (glikogen, kreatin fosfat in triacilgliceroli) so v aktivni mišici vključene v vzdrževanje homeostaze celične energije ATP. Ohranjanje homeostaze v živi mišici je po izkrvavitvi onemogočeno, ker se prekine dotok kisika, energijsko bogatih spojin (npr. glukoze) in odtok razgradnjih produktov (npr. laktata). Odsotnost kisika onemogoči celici oksidativno porabo energijskih rezerv v mitohondrijih. Zato se celični metabolizem preusmeri v energijsko manj donosno anaerobno tvorbo ATP. Po zakolu se ATP v mišici takoj porablja za: (1) nehoteno počasno kontrakcijo mišic, (2) zagotavljanje membranskega potenciala in (3) vzdrževanje  $\text{Ca}^{2+}$  ionov znotraj sarkoplazemskega retikuluma (Pösö in Puolanne, 2005). Poraba energije ATP iniciira verigo biokemijskih reakcij, ki omogočijo razgradnjo energijskih rezerv. Maščobne rezerve energijsko bogatih triacilglicerolov ostanejo skoraj nespremenjene, saj se razgradnja do maščobnih kislin zaradi pomanjkanja kisika upočasni in ustavi. Kreatin fosfat omogoča relativno hitro resintezo ATP s pomočjo encima kreatin-kinaza do 30 min *post mortem*. Adenilat-kinaza omogoča tvorbo ATP in AMP (adenozinmonofosfat) iz dveh molekul ADP (adenozindifosfat). Mišični celici je *post mortem* omogočeno, da porablja energijske rezerve mišičnega glikogena, ki je sestavljen iz tisočih enot glukoze (Honikel, 2004). Glikogen omogoča homeostazo ATP (8-10  $\mu\text{mol/g}$ ) dokler vsebnost laktata ne doseže polovico končne. Nato se vsebnost ATP zmanjša (Pösö in Puolanne, 2005). Fosforilirane glukozne enote, encimsko odcepljene z glikogena, se kot energijski prekursor vključijo v anaerobno tvorbo laktata. Nastali prosti vodikovi ioni znižajo pH mišice s približno 7,2 na okrog 5,6. Tvorba laktata ter ATP se zaključi po eni uri do trideset ur *post mortem*. To se zgodi zaradi znižanja vrednosti pH in posledično inaktivacije glikolitičnih encimov (Honikel, 2004). Glikoliza se zaključi hitreje v mišičnini perutnine in prašičev kot v mišičnini jagnjetine in govedine.

*Rigor mortis* se pojavi, ko se vsebnost ATP zmanjša na 1  $\mu\text{mol/g}$  (Pösö in Puolanne, 2005). Mišice se zaradi manjše vsebnosti ATP postopno krčijo (normalno 10-15 %), postajajo rigidne in izgubijo elastičnost (Honikel, 2004). Aktin in miozin se v odsotnosti ATP postopno trdno povežeta v ireverzibilen aktomiozinski kompleks. Ugotovljeno je bilo, da se skrajšanje sarkomer zgodi v večjem ali manjšem obsegu v vsaki mišici med glikolizo *post mortem* in da se minimalno skrajšanje razvije pri 15-20 °C. Skrajšanje mišice v rigorju poveča tudi količino izceje. Sposobnost za vezanje vode (SpVV) se zmanjša zaradi izčrpanih zalog ATP in posledično tvorbe aktomiozinskega kompleksa, četudi se *rigor mortis* zgodi pri visoki vrednosti pH. Ko se faza *rigor mortis* zaključi, ostanejo mišice rigidne in neelastične (Lawrie in Ledward, 2006).

SpVV je značilnost mesa, da zadrži lastno ali dodano vodo, ko ga izpostavimo toploti ali tlaku (Brewer, 2004) in je tesno povezana s konverzijo mišice v meso. V mišici je večji del (okrog 95 %) vode proste. Le-ta se zadržuje s kapilarnostjo med celicami in med miofibrilami ter elektrostatično v miofibrilah med tankimi in debelimi filamentami. Ostali del (4-5 %) vode je z vodikovimi vezmi vezan na polarne in nabite skupine proteinov,

predvsem na miozin in aktin. Gibanje proste vode je zaradi različnih sil bolj ali manj omejeno. Šibko bazičen pH (7,2-7,4) ustvari v živi mišici prevladujoč negativen površinski naboj mišičnih beljakovin, kar omogoča večjo sposobnost vezanja proste vode. Sposobnost beljakovin za vezanje vode se *post mortem* zmanjša, ker se vrednost pH znižuje in približuje izoelektrični točki mišičnih beljakovin (pH  $\approx$  5), pri kateri je površinski naboj beljakovin nevtralen (enako število pozitivnih in negativnih nabojev) (Toldrá, 2003). Ker privlak pozitivnih in negativnih nabojev zmanjša prostor med miofilamenti, se imobilizirana (nemobilna) prosta voda iztisne v sarkoplazmo (Honikel, 2004). Sproščanje  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  ionov v sarkoplazmo zmanjša elektrostatični odboj med filamenti, kar povzroči zmanjšanje miofibrilarne strukture in posledično iztiskanje vode. Povečana vsebnost vodikovih ionov povzroči delno denaturacijo miofibrilarnih proteinov in še dodatno odpuščanje vode (Toldrá, 2003). Denaturacija proteinov se pojavi kot rezultat zmanjšane topnosti proteinov, ko se vrednost pH zniža s 6,0 na 5,6 (Brewer, 2004). Denaturacija miozina povzroči krčenje miofibril, kar vpliva na razpršenost (odboj) svetlobe, povečanje izceje in zmanjšanje intenzitete barve (Monin, 2004).

V živi mišici (pH okrog 7) miofilamenti zavzemajo večji del znotraj celičnega prostora in okrog 95 % vode je znotraj celice. Nekaj dni *post mortem* je že 15 % vode zunaj celice. Ta prosta voda je sorazmerno mobilna, zato prehaja po kapilarnem sistemu na površino mesa kot izceja (Honikel, 2004). Povečano odpuščanje vode omogoči povečano izgubo v vodi topnih za kakovost pomembnih spojin, kot so: mioglobin, lizosomalni encimi, nukleotidi, nukleozidi, proste aminokisliline, vitamini in minerali (Toldrá, 2003).

### 2.2.2 Zorenje mesa

Zorenje je terminološki izraz za proces mehčanja mesa zaradi razgradnje miofibrilarne strukture s pomočjo endogenih proteolitičnih mišičnih encimov (Sentandreu in sod., 2002; Devine, 2004; Koohmaraie in Geesink, 2006; Ouali in sod., 2006) in predstavlja tretjo stopnjo pretvorbe mišice v meso (Herrera-Mendez in sod., 2006; Ouali in sod., 2006). Zorenje mesa bistveno vpliva na senzorične lastnosti mesa, predvsem na aromo in teksturo. Mehkoba je najpomembnejša lastnost kakovosti mesa (Koohmaraie in Geesink, 2006; Ouali in sod., 2006), ki je odvisna od količine in topnosti vezivnega tkiva, skrajšanja sarkomer med stopnjo *rigor mortis* in proteolize proteinov po zakolu. Fragmentacija miofibril je ključnega pomena za mehčanje mesa. Verjetno sta razgradnja titina in dezmina glavni ultrastrukturni spremembi, ki določata mehkobo mesa (Koohmaraie in Geesink, 2006).

Čeprav nekateri raziskovalci menijo, da se zorenje mesa začne takoj po zakolu, lahko razumemo zorenje kot mehčanje mesa po zaključeni fazi *rigor mortis*, ko so mišice najbolj rigidne in neelastične (Devine, 2004). Hitrost mehčanja mesa je odvisna od vrste živali. Da

se doseže 80 % maksimalne mehkoobe, je potrebno v hladilniku hraniti meso piščanca 2 dni, prašičje 5 dni, jagnječje 8 dni, goveje in kunčje meso 10 dni.

Obstaja domneva, da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vplivajo na neencimsko razgradnjo miofibrilarne strukture in posledično na mehkoobo mesa (Devine, 2004). Sproščanje fosfolipidov se povezuje s povečano vsebnostjo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v fazi *rigor mortis*, kar domnevno vpliva na razpad proteinov, kot so nebulin, dezmin in titin (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Vsebnost prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov je v sarkoplazmi žive (aktivne) mišice pri relaksaciji  $0,1 \mu\text{M}$ , pri kontrakciji pa  $5,0 \mu\text{M}$ . V mišici *post mortem* se vsebnost  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v sarkoplazmi poveča in vpliva na mehčanje mesa neposredno ali posredno z aktivacijo kalpainov (Ji in Takahashi, 2006).  $\mu$ -kalpain je pri pogojih, kot so v mesu *post mortem* ( $\text{pH} < 5,89$  in  $T < 15 \text{ }^\circ\text{C}$ ) neaktiven (Ouali in Talmant, 1990). Obstaja pa možnost, da je  $\mu$ -kalpain aktiven v začetnem obdobju. Prav tako je v začetni fazi *post mortem* izključen vpliv lizosomalnih katepsinov na mehčanje mesa. Hkrati pa obstajajo zanesljivi dokazi (Ji in Takahashi, 2006):

- da vsebnost  $\text{Ca}^{2+}$  ionov nad  $100 \mu\text{M}$  iniciira razgradnjo dezmina,
- da se  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vežejo na fosfolipide v črti Z, in da sproščanje fosfolipidov vpliva na fragmentacijo miofibril,
- da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vplivajo na cepitev paratropomiozina s konektina ali titina ter
- da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni sprožijo razgradnjo konektina, titina in nebulina.

Obstajata pa dve trditvi, ki nasprotujeta neencimski teoriji kalcijevih ionov pri mehčanju mesa, in sicer (Geesink in sod., 2001):

- ni dokazov, da se dolžina sarkomere v fazi *post rigor* poveča, in
- da vsebnost prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov verjetno vpliva na razgradnjo strukture mesa posredno preko aktivacije kalpainskega sistema in ne neposredno.

V začetku *post mortem* je opaziti razgradnjo veznih proteinov med miofibrilami in sarkolemo. Miofibrile zavzemajo skoraj 80 % volumna mišične celice, zato ima njihova razgradnja velik vpliv na mehčanje mesa (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Razgradnja miofibrilarnih proteinov, predvsem znotraj segmenta I in črte Z, poveča lomljivost in fragmentacijo miofibril (Koochmarai in Geesink, 2006). Hidrolizo celičnih struktur in organel omogoča sinergistično delovanje endogenih proteolitičnih sistemov (peptidaz), ki vključujejo katepsine, kalpaine, proteasome in še druge encime (Sentandreu in sod., 2002; Ouaili in sod., 2006).

Proteoliza so vse biokemijske reakcije odgovorne za encimsko katalizirano razgradnjo sarkoplazemskih in miofibrilarnih proteinov, ter nadaljnjo hidrolizo polipeptidov in peptidov do krajših peptidov ter prostih aminokislin. Skeletne mišice vsebujejo številne encime (preglednica 1), ki katalizirajo hidrolizo, bodisi notranjih peptidnih vezi (kaspaze, kalpainsi, katepsini) ali peptidov z njihovih terminalnih koncev (tri- in dipeptidilpeptidaze

ter amino- in karboksipeptidaze) (Toldrá, 2004). Drugi encimski sistemi, kot so serinske proteaze, proteasomske endopeptidaze in mitohondrijske metalopeptidaze, so prav tako lahko vključeni v proteolizo *post mortem* (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). V razgradnjo strukturnih proteinov se vključijo kot prvi kalpaini in nato od ATP-odvisni ubikvitin ali proteasom (Devine, 2004). Proteasom (EC 3.4.22.17) je multikatalitičen endopeptidazni kompleks.

Kaspaze so nevtralne cisteinske peptidaze s specifičnim delovanjem. Sposobne so cepiti peptidne vezi za asparaginsko kislino. Njihova aktivnost se z znižanjem vrednosti pH zmanjša podobno kot pri kalpainih in proteasomih (Sentandreu in sod., 2002; Ouali in sod., 2006).

Kalpainski sistem je glavni proteolitični sistem, odgovoren za večji del strukturnih sprememb v začetnem obdobju *post mortem* (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004; Koohmaraie in Geesink, 2006; Ouali in sod., 2006). Kalpaini so nevtralne proteaze z največjo aktivnostjo pri pH 7,5 in temperaturi 25 °C. Za svoje delovanje potrebujejo kalcijeve ione. Kalpainski proteolitični sistem vsebuje v skeletni mišici najmanj tri vrste proteaz ( $\mu$ -kalpain, m-kalpain, kalpain-3) in inhibitor kalpastatin. Pomembna lastnost večine kalpainov je, da so sposobni avtolize, kar zmanjša njihovo aktivnost. m-kalpain *post mortem* ni sposoben avtolize. Kalpain-3 in m-kalpain nista vključena v mehčanje mesa *post mortem*, medtem ko je za to verjetno edini odgovoren  $\mu$ -kalpain (Koohmaraie in Geesink, 2006). Na aktivnost encima  $\mu$ -kalpaina vplivajo številni dejavniki, kot so: hitrost znižanja vrednosti pH *post mortem*, končna vrednost pH, vsebnost kalpastatina, znižanje temperature ter inaktivacija  $\mu$ -kalpaina zaradi avtolize ali denaturacije (Toldrá in Flores, 2000). Kalpaini razgrajujejo proteine, ki so v črti Z ali blizu nje. Zato imajo glavno vlogo pri mehčanju mesa (Toldrá, 2003). Dokazano je, da kalpaini razgrajujejo naslednje mišične proteine: C-protein, M-protein, titin, nebulin, troponin T, dezmin, sinemin, distrofin, talin in vinkulin. Razgradnja teh proteinov je povezana z razgradnjo miofibrilarnih struktur in mehčanjem mesa. Kalpaini potrebujejo za aktivacijo ione kalcija. Za polovico maksimalne aktivnosti potrebujejo  $\mu$ -kalpaini 1-30  $\mu$ M in m-kalpaini 100-750  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  ionov (Devine, 2004). Njihova aktivnost se s časom zorenja spreminja zaradi znižanja vrednosti pH in visoke ionske moči. Dokazano je, da se  $\mu$ -kalpaini v govedini in mesu prašičev močno povežejo z miofibrilami. Domneva se, da ta povezava omogoči aktivno delovanje  $\mu$ -kalpainov (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Čeprav je nevtralen pH optimalen za aktivno delovanje, ostanejo kalpaini učinkoviti tudi pri nižji vrednosti pH v fazi *rigor mortis*. Meso se značilno mehča po dveh dneh *post mortem*, ko se količina kalpainov zmanjša (Devine, 2004).

**Preglednica 1: Najpomembnejše mišične proteaze vključene v proteolizo (Toldrá, 2004).**

Ime encima	EC števílo	lokacija	glavni substrati	glavni produkti	optimalen pH
katapsin B	3.4.22.1	lizosomi	miozin, aktin, kolagen	polipeptidi	5,5-6,0
katapsin H	3.4.22.16	lizosomi	miozin	peptidi, aminokislíne	6,8
katapsin D	3.4.23.5	lizosomi	miofibrilarni proteini	polipeptidi	4,0
katapsin L	3.4.22.15	lizosomi	miofibrilarni proteini, kolagen	polipeptidi	5,5-6,0
$\mu$ -kalpain	3.4.22.17	Z-črta	proteini Z-črte, titin, nebulin, troponini, tropomiozin	polipeptidi, peptidi	7,5
m-kalpain	3.4.22.17	Z-črta	proteini Z-črte, titin, nebulin, troponini, tropomiozin	polipeptidi, peptidi	7,5
dipeptidilpeptidaze I	3.4.14.1	lizosomi	Ala-Arg-polipeptidi, Gly-Arg-polipeptidi	dipeptidi	5,5
dipeptidilpeptidaze II	3.4.14.2	lizosomi	Gly-Pro-polipeptidi	dipeptidi	5,5
dipeptidilpeptidaze III	3.4.14.4	citosol	Gly-Pro-polipeptidi	dipeptidi	8,0
dipeptidilpeptidaze IV	3.4.14.5	membrane	Arg-Arg-polipeptidi, Ala-Arg-polipeptidi	dipeptidi	7,5-8,0
tripeptidilpeptidaze I	3.4.14.9	lizosomi	Gly-Pro-X-polipeptidi	tripeptidi	4,0
tripeptidilpeptidaze II	3.4.14.10	citosol	Ala-Ala-Phe-polipeptidi	tripeptidi	6,5- 7,5
alanil-aminopeptidaze	3.4.11.14	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	vse aminokislíne	6,5
aminopeptidaze B	3.4.11.6	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	Arg, Lys	6,5
metionil-aminopeptidaze	3.4.11.18	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	Met, Ala, Lys, Leu	7,5
levcil-aminopeptidaze	3.4.11.1	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	Leu, Met	9,0
piroglutamil- aminopeptidaze	3.4.19.3	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	piroglutamínska kislína	8,5
karboksipeptidaze A	3.4.16.1	lizosomi	polipeptidi, peptidi (na karboksi koncu)	hidrofobne aminokislíne	5,2-5,5
karboksipeptidaze B	3.4.18.1	lizosomi	polipeptidi, peptidi (na karboksi koncu)	vse aminokislíne	5,0

Katepsini so najbolj učinkoviti v kislem pH (*katapsin B* med 5,5 in 6,5; *katapsin H* med 6,5 in 6,8; *katapsin D* med 3,0 in 5,0; *katapsin L* med 5,5 in 6,5; *katapsin S* med 6,0 in 6,5; *katapsin K* med 6,0 in 6,5; *katapsin F* med 5,2 in 6,8). Odgovorni so za razgradnjo številnih proteinov v mišici, vključno z miozinom in aktinom (Sentandreu in sod., 2002).

Glavna miofibrilarna proteina miozin in aktin se pri normalnih pogojih skladiščenja ne razgradita v prvem tednu po zakolu živali, ampak šele po daljšem času zorenja. Njuno razgradnjo lahko pospešimo z relativno visoko temperaturo. V začetnem obdobju *post mortem*, ko se oblikuje mehkoča mesa, je delovanje katepsinov pri normalnih pogojih skladiščenja do določene mere omejeno (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Katepsini verjetno ostajajo aktivni daljše obdobje zorenja mesa (Devine, 2004).

C-protein, M-protein, troponin T, titin, nebulin in dezmin so miofibrilarni in citoskeletni proteini, ki se razgradijo že v začetni fazi *post mortem*, medtem ko je razgradnja miozina in aktina v tej fazi neznatna (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004; Devine, 2004).

### 2.2.3 Nепroteinski dušik

Mišični proteini vsebujejo skupaj okrog 16 % celokupnega dušika (Keeton in Eddy, 2004). Okrog 95 % skupnega mišičnega dušika izvira iz proteinov, medtem ko je preostalih 5 % iz drugih dušikovih spojin, ki pa niso del proteinov. Nепroteinski dušik vsebujejo: proste aminokislino, kratki (di)peptidi (karnozin, anserin...), kreatin, kreatin fosfat, kreatinin, nekateri vitamini, nukleozidi, nukleotidi, urea ipd. (Olsson, 2004; Bruas-Reignier in Brun-Bellut, 1996). Količina nепroteinskega dušika se *post mortem* poveča, zaradi proteolitične aktivnosti encimov (Benito in sod., 2003).

#### ***Proste aminokislino in dipeptidi***

Proste aminokislino (angl. *Free Amino Acids*, okr. FAA) in dipeptidi so manjše molekule, ki vsebujejo najmanj eno karboksilno in amino skupino ter različne stranske verige (Leth, 2004). Količina prostih aminokislin in dipeptidov je odvisna od metabolizma mišice, fizične aktivnosti in prehrane živali, ter od zorenja mesa *post mortem* oz. proteolize z endogenimi ali eksogenimi encimi mikroorganizmov (preglednica 2). Segrevanje in toplotna obdelava mesa prav tako lahko inducirata hidrolizo proteinov (Felton in sod., 2000; Cornet in Bousset, 1999; Armero in sod., 1999). Znano je, da se količina skoraj vseh prostih aminokislin *post mortem* poveča zaradi delovanja mišičnih proteaz v procesu proteolize, in tudi, da večja vsebnost prostih aminokislin izboljša (oplemeniti) okus mesa. Različna aktivnost različnih tipov endo- in eksopeptidaz vpliva na različno sestavo prostih aminokislin (Watanabe in sod., 2004). Hidroliza polipeptidov in peptidov z amino-, karboksi-, di-, tripeptidazami do aminokislin je zadnja stopnja proteolitične verige biokemijskih reakcij. Alanil-aminopeptidaze so glavne nespecifične eksopeptidaze, saj prevladujejo v tem procesu in katalizirajo reakcije z različnimi substrati. Bazične aminokislino (kot arginin in lizin) nastajajo predvsem zaradi aktivnosti aminopeptidaz B (Toldrá, 2004). Na splošno velja, da pri daljšem procesu proteolize nastane večja količina prostih aminokislin. Glutaminska kislino, alanin, levcin, lizin, valin in asparaginska kislino so aminokislino, ki se običajno pojavljajo v največjih količinah (Toldrá, 2004).

**Preglednica 2: Vsebnost prostih aminokislin in nekaterih dipeptidov (mg/100g) v mišici LD prašiča *post mortem*.**

Ime FAA	Cornet in Bousset Aristoy in Toldrá Flores in sod. Armero in sod.			
	(1999)	(1998)	(2000)	(1999)
	30 min <i>p.m.</i>	45 min <i>p.m.</i>	2 uri <i>p.m.</i>	4 ure <i>p.m.</i>
<i>nepolarne FAA</i>				
<i>alifatske FAA</i>				
<b>glicin</b>	11,65	6,01	6,33	6,83
<b>alanin</b>	-	11,29	11,36	13,98
<b>prolin</b>	4,09	2,83	2,35	2,26
<b>valin</b>	5,53	2,78	2,63	3,40
<b>levcin</b>	2,51	2,43	2,78	4,07
<b>izolevcin</b>	3,54	1,52	1,57	2,43
<b>metionin</b>	1,59	0,90	0,76	2,14
<i>aromske FAA</i>				
<b>fenilalanin</b>	0,87	1,51	1,74	2,98
<b>tirozin</b>	1,81	2,11	1,60	2,52
<b>triptofan</b>	-	-	0,90	1,12
<i>polarne FAA</i>				
<i>nevtralne FAA</i>				
<b>serin</b>	3,87	2,02	1,79	3,18
<b>treonin</b>	2,34	2,86	1,75	8,40
<b>asparagin</b>	2,06	0,91	1,04	1,39
<b>glutamin</b>	65,38	38,88	28,19	11,34
<i>bazične FAA</i>				
<b>lizin</b>	2,66	-	2,98	4,04
<b>histidin</b>	-	2,9	1,66	3,02
<b>arginin</b>	5,58	5,19	4,85	3,26
<i>kisle FAA</i>				
<b>asparaginska kislina</b>	7,02	0,39	0,3	0,71
<b>glutaminska kislina</b>	12,17	2,03	2,09	16,94
FAA skupaj	132,67	86,56	76,67	94,01
<i>druge amino-spojine</i>				
<b>4-hidroksiprolin</b>	1,45	-	-	-
<b>ornitin</b>	-	0,83	0,53	0,78
<b>tavrin</b>	27,69	18,83	24,25	24,81
<b>anserin</b>	5,82	14,56	20,83	21,59
<b>karnoizin</b>	266,54	313,02	479,75	429,16



## 2.3 TOPLOTNA OBDELAVA MESA IN POJAV HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV

### 2.3.1 Fizikalno-kemijske spremembe mesa med toplotno obdelavo

Meso toplotno obdelujemo zato, da: (1) zagotovimo mikrobiološko varnost in (2) oblikujemo želeno senzorično kakovost (Jägerstad in Skog, 2005). Fizikalno-kemijski procesi med toplotno obdelavo mesa vplivajo na spremembe osnovnih komponent mesa, na teksturo, SpVV, barvo, aromo in druge lastnosti toplotno obdelanega mesa. Segrevanje inducira kemijske in encimske reakcije mesa, ki vplivajo: (1) na konformacijo mišičnih proteinov, (2) na encimsko aktivnost, (3) na toplotno in hidrolitsko cepitev peptidnih vezi, (4) na toplotno razgradnjo in derivatizacijo prostih aminokislin, (5) na tvorbo novih vezi, (6) na oksidacijo in tvorbo senzorično pomembnih spojin. Na vse te procese vplivajo: temperatura in čas toplotne obdelave, vrednost pH mesa, oksidacija spojin, antioksidanti, radikali in druge reaktivne spojine (npr. reducirajoči sladkorji) (Palka, 2004). Med toplotno obdelavo se spremeni konformacija mišičnih proteinov, kar se imenuje denaturacija. Interakcije proteinov in nastanki skupkov zmanjšajo topnost proteinov. S toploto inducirana agregacija mišičnih proteinov poteče med 36 °C in 60 °C, lahko pa šele pri temperaturi 90 °C. Denaturirani proteini vplivajo na strukturne spremembe mesa, kot so: porušitev celične membrane, vzdolžno in prečno krčenje mišičnih vlaken, agregacija in tvorba gela sarkoplazemskih proteinov, krčenje in raztapljanje vezivnega tkiva (Törnberg, 2005).

Meso vsebuje 69-75 % vode. Med toplotno obdelavo se, odvisno od metode segrevanja in od končne središčne temperature (70 °C ali 90 °C), vsebnost vode zaradi evaporacije in izceje v mesu zmanjša na 65 % ali 60 %. Ko se središčna temperatura mesa povečuje, se zaradi denaturacije mišičnih proteinov (predvsem miozina) SpVV zmanjša in s tem izceja poveča. Meso z višjo vrednostjo pH izgubi med toplotno obdelavo manj vode in je končno bolj mehko (Palka, 2004), medtem ko je meso z nižjo vrednostjo pH izgubi več (Rosenvold in sod., 2004).

Matriks mesa je zelo kompleksen in vsebuje številne nehlapne spojine, ki se med toplotno obdelavo vključijo v kompleksno mrežo kemijskih reakcij, v katerih se tvori heterogen sistem vsebujoč številne hlapne in nehlapne spojine (ki sooblikujejo vonj in okus), ojačevalce in sinergiste arome. Tvorijo se različne skupine spojin, in sicer: ogljikovodiki, aldehidi, alkoholi, ketoni, karboksilne kisline, etri, estri, laktoni, *S*-, *N*- in *O*- vsebujoče heterociklične spojine. Spojine, ki se tvorijo iz lipidnih prekurzorjev so: alkanali, alkanoni, alkanoidske kisline, alkanoli,  $\gamma$ -laktoni,  $\delta$ -laktoni in alkilfurani. Spojine, ki se tvorijo iz vodotopnih prekurzorjev pa so: furanoni, pirazini, piridini, pirololi, oksazoli, tiazoli, tiofeni, tritiolani, tritiani, 2-metil-3-furantiol, alkil tioli, alkil sulfidi in alkil disulfidi. Med toplotno obdelavo se mono- in oligosaharidi delno razgradijo do hlapnih furanonov in furfuralov.

Proste aminokisliline so bolj termostabilne in je zato malo verjetno, da se razgradijo. Piroliza prostih aminokislin lahko poteka pri pečenju na žaru in ražnju, saj lokalna dehidracija na površini mesa omogoči, da se temperatura zviša preko 100 °C, kar posledično sproži karboksilacije in deaminacije. Razgradnja teh spojin poteka v večjem obsegu pri višjih temperaturah, kot se uporabljajo pri običajni pripravi mesa. Proste amino skupine aminokislin in peptidov lahko z reducirajočimi sladkorji reagirajo v kompleksu neencimskih reakcij porjavenja. Produkti Maillardove reakcije se tvorijo v večjem obsegu na površini pečenega mesa, kjer je manjša vsebnost vode, čeprav se lahko v manjšem obsegu tvorijo tudi v vodnih raztopinah (Pegg in Shahidi, 2004).

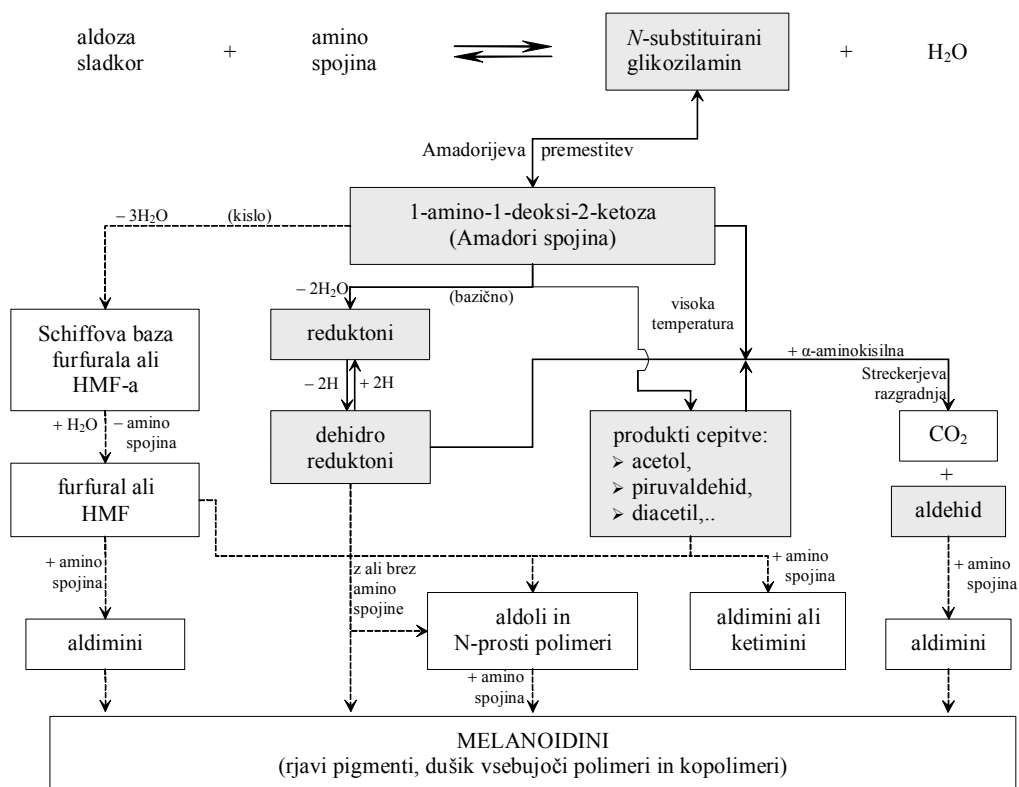
Maillardova reakcija je skupek kemijskih reakcij, ki se začnejo med karbonilnimi spojinami (reducirajoči sladkorji) in primarnimi ali sekundarnimi amino spojinami (slika 4). Toplotna obdelava (toplota) inducira Maillardovo reakcijo med vodotopnimi spojinami, ki vsebujejo proste amino skupine (npr. aminokisliline, amini, peptidi) in karbonilne skupine (npr. ketoni, aldehidi, reducirajoči sladkorji itd.). Ta reakcija zelo vpliva na oblikovanje arome toplotno obdelanega mesa. Množica reakcij vključuje številne interakcije spojin in njihove razgradnje, kar omogoči nastanek številnih produktov, ki so nosilci arome (Cambero in sod., 2000; Shahidi in sod., 2004).

Maillardova reakcija poteka že pri temperaturah nad 80 °C. Produkti teh reakcij so barvne spojine, ki oblikujejo rjavo barvo (melanoidini) pečene površine in hlapne spojine, ki sooblikujejo aromo pečenega mesa. V prvem koraku Maillardove reakcije se tvorijo  $\alpha$ -dikarbonili, kot so: 1-deoksiozoni, 3-deoksiozoni in 1-deoksireduktoni, preko *N*-substituiranega glikozilamina in Amadorijevih spojin. Pri razgradnji teh spojin nastanejo furfurali, furanoni in dikarbonili. Te spojine sooblikujejo aromo mesa, in so hkrati glavni intermediati, saj lahko naprej reagirajo z amini, aminokislinami, vodikovim sulfidom, tioli, amoniakom, acetaldehidom in drugimi aldehidi, in tako tvorijo *N*-, *S*- in *O*-heterociklične produkte, kot so: furani in njihovi derivati, furanoni, ketoni, alkoholi, ciklični etri, pirol, piridini, pirazini, imidazoli, oksazoli, oksazolini, ciklični etilen sulfidi, alkil sulfidi, disulfidi, tioli, tiofeni, tiazoli, tiazolini in druge heterociklične spojine (Pegg in Shahidi, 2004).

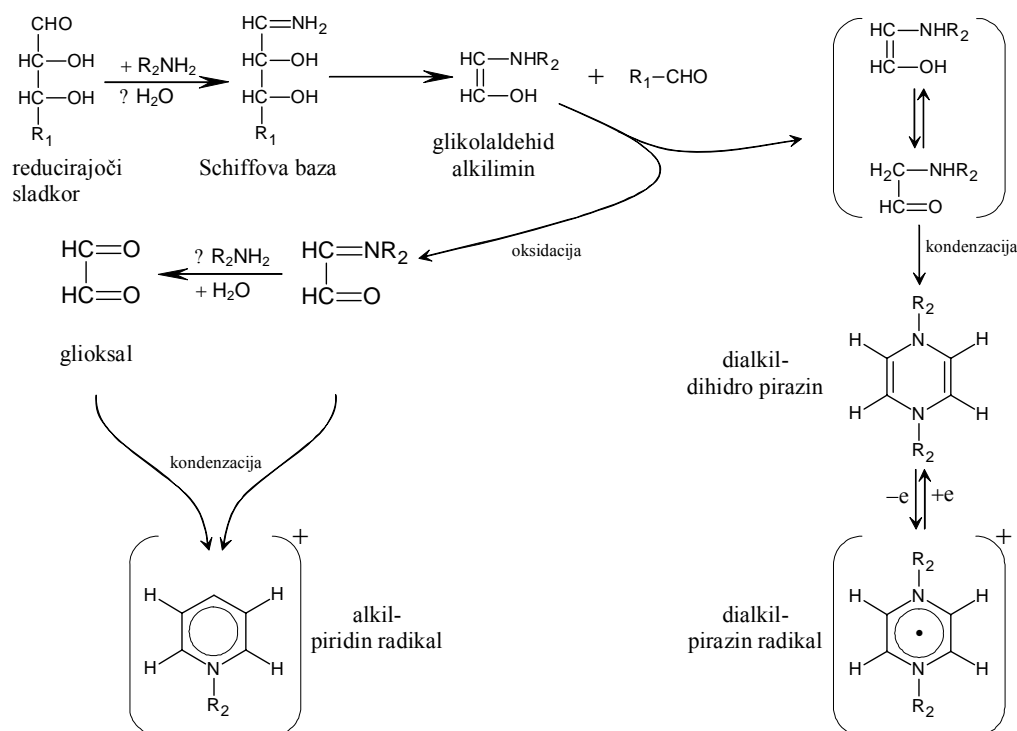
Na produkte Maillardove reakcije vpliva temperatura in čas toplotne obdelave, vodna aktivnost, vsebnost vode, vrednost pH in vsebnost prekurzorjev. Vsebnost barvnih pigmentov melanoidinov in aromatičnih spojin manjše molekulske mase se značilno poveča pri višji temperaturi toplotne obdelave. Maillardova reakcija poteka optimalno pri vodni aktivnosti 0,65-0,75. Zato se produkti Maillardove reakcije tvorijo v zunanjih delih (v skorji) toplotno obdelanega mesa, kjer je zaradi toplotne dehidracije manjša vsebnost vode (Shahidi in sod., 2004).

Streckerjeva razgradnja aminokislin (slika 4) je pomembna reakcija med aminokislinami in  $\alpha$ -dikarbonilnimi spojinami (deoksiozoni, reduktoni, diacetil, piruvaldehid in hidroksiaceton). Produkt razgradnje aminokislina sta Streckerjev aldehid in ogljikov dioksid, medtem ko se dikarbonil pretvori v  $\alpha$ -aminoketon oziroma aminoalkohol. Če se vključi v Streckerjevo reakcijo aminokislina cistein, se tvorijo za aromo pomembni intermediati: acetaldehid, amonijak in vodikov sulfid. Aminoketoni so pomembni intermediati pri tvorbi številnih za aromo pomembnih heterocikličnih spojin, kot so: pirazini, oksazoli in tiazoli. 3-deoksiglukozon (preurejena Amadorijeva spojina) je glavni prekursor za nastanek piruvaldehida, kateri se v Streckerjevi razgradnji pretvori v dimetilpirazin. V toplotno obdelani govedini je dokazanih 48 pirazinov, v prašičjem mesu 36 in v jagnjetini 16. Pirazini so najpomembnejša skupina, saj predstavljajo 77 % vseh spojin odgovornih za aromo na žaru pečenega mesa prašičev (Shahidi in sod., 2004).

V modelnem sistemu je dokazano, da se produkti porjavenja (melanoidini) tvorijo tudi po drugi poti, in sicer se v začetni fazi pred Amadorijevo preureditvijo tvori glikolaldehid imin (slika 5). Dimer glikolaldehid imina kondenzira, oksidira in tako tvori 1,4-dialkilpirazin kationski radikal, ki je pomemben intermedat za tvorbo melanoidinov (Shahidi in sod., 2004). Dokazano je, da se v Maillardovi reakciji med reducirajočimi sladkorji in prostimi aminokislinami tvorijo radikali (npr. pirazin kation radikali) (Kikugawa in sod., 1999).



Slika 4: Shematski prikaz reakcij neencimskega porjavenja (Davies in Labuza, 2007).



**Slika 5:** Tvorba piridin in pirazin radikalov (Shahidi in sod., 2004; Murkovic, 2004; Vitaglione in Fogliano, 2004).

### 2.3.2 Heterociklični aromatski amini

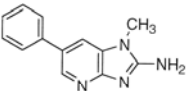
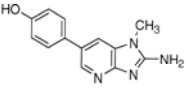
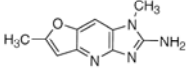
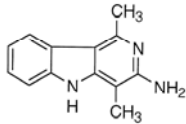
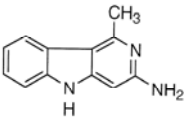
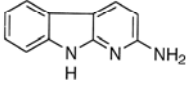
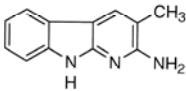
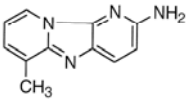
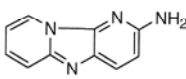
HCA delimo v dve skupini, ne-IQ in IQ tipa HCA. Ne-IQ tip HCA so derivati  $\gamma$ -karbolina, amino- $\alpha$ -karbolina in dipiridoimidazola. Ne-IQ tip HCA nastajajo s pirolizo aminokislin in proteinov pri visokih temperaturah. Tip IQ HCA so derivati imidazokinolina, imidazokinoksalina in fenilimidazopiridina. Za ta tip HCA niso potrebne tako visoke temperature, čeprav se pri povišani temperaturi tvorijo hitreje in v večjih količinah. IQ tip so izolirali iz normalno pripravljene beljakovinsko bogate hrane, kot je meso različnih vrst. Prekursorji vseh HCA so proste aminokisljine, monosaharidi in kreat(in)in. IQ tip HCA je zelo mutagen, kar so ugotovili s testiranjem z bakterijo *Salmonello typhimorium* sev TA98. Opazili so od 1800 do 660000 mutacijskih sprememb/ $\mu\text{g}$  HCA (Sugimura in Adamson, 2000). Raziskave na različnih organizmih so potrdile, da so te spojine mutagene in kancerogene ter povzročajo razvoj raka na različnih predelih: jetrih, mlečnih žlezah, koži, tankem črevesju, debelem črevesju, prostati, mehurju, ledvicah in dvanajstniku. Npr. fenilimidazopiridin (PhIP) povzroča nastanek raka pri podganah na prostati, mlečnih žlezah, na debelem črevesu, ne povzroči pa nastanka raka v jetrih (Sugimura in Adamson, 2000).

Do sedaj so izolirali 20 zelo mutagenih in/ali kancerogenih HCA iz različne beljakovinsko bogate toplotno obdelane hrane. Večina do sedaj odkritih HCA je prikazana v preglednici 3.

**Preglednica 3: Kratice, imena in strukturne formule poznanih HCA (Felton in sod., 2000).**

kratica HCA	ime HCA	formula
<b>IQ</b>	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin	
<b>MeIQ</b>	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin	
<b>IQx</b>	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
<b>MeIQx</b>	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
<b>DiMeIQx</b>	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
<b>7,8- DiMeIQx</b>	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
<b>4-CH2OH-MeIQx</b>	4-hidroksimetil-2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
<b>7,9-DiMeIQx</b>	2-amino-3,7,9-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
<b>DMIP</b>	2-amino-1,5-dimetilimidazo[4,5-b]piridin	
<b>TMIP</b>	2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5-b]piridin	

**Nadaljevanje preglednice 3: Kratice, imena in strukturne formule poznanih HCA.**

kratica	ime	formula
<b>PhIP</b>	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin	
<b>4'-hydroxy-PhIP</b>	2-amino-6-(4-hidroksifenil)-1-metilimidazo[4,5-b]piridin	
<b>IFP</b>	2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]piridin	
<b>Trp-P-1</b>	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol	
<b>Trp-P-2</b>	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol	
<b>AαC</b>	2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol	
<b>MeAαC</b>	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol	
<b>Glu-P-1</b>	2-amino-6- metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol	
<b>Glu-P-2</b>	2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol	

### 2.3.3 Prekurzorji in tvorba aminokarbolinov

Aminokarbolini se tvorijo pri visokih temperaturah – okrog 300 °C s pirolizo aminokislin in proteinov. Vmesni produkti reagirajo s prostimi radikali drugih snovi in tvorijo heterociklično strukturo. Natančna pot nastanka aminokarbolinov še ni poznana (Wakabayashi in sod., 1993).

$\alpha$ - in  $\gamma$ -karbolini (A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2) lahko nastanejo s pirolizo triptofana proteinov živalskega ali rastlinskega izvora, npr. albumina, kazeina ali sojinih globulinov. Indolov obroč, ki je sestavni del molekul  $\alpha$ - in  $\gamma$ -karbolinov, predvidoma izhaja iz triptofana, ni pa izključeno, da lahko nastane tudi iz drugih aminokislin. Npr. Trp-P-1 in Trp-P-2 so izolirali po segrevanju (v vodi pri 180 °C, 10 min) tako iz modelnega sistema, ki je vseboval kreatinin, glukozo in triptofan, kot tudi modelnega sistema, kjer je bil namesto triptofana izolevcin (Johansson in sod., 1995). To dokazuje, da triptofan ni edini prekurzor in da piroliza ni edina pot za oblikovanje indolovega obroča v karbolinih.

### 2.3.4 Prekurzorji harman in norharman

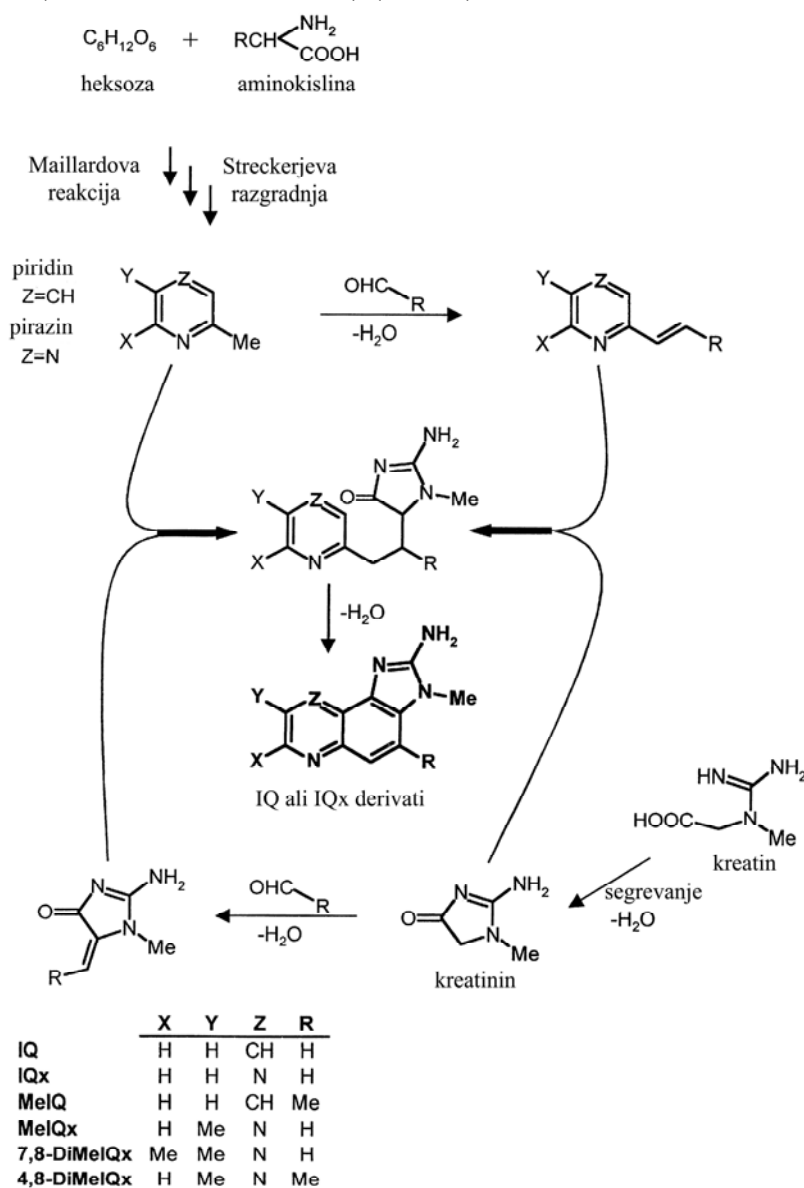
V primerjavi z drugimi aminokarbolini  $\beta$ -karbolina, harman (9-metil- $\beta$ -karbolin) in norharman (9-(4'-amino-fenil)-9 H-pirido[3,4-b]indol), nastajata v 10- do 100-krat večjem obsegu. Tvorita se pri normalnih pogojih toplotne obdelave (100-225 °C; 10 do 120 min) v prisotnosti kreat(in)ina, glukoze in določenih aminokislin ali mešanice le-teh (Johansson in sod., 1995; Arvidsson in sod. 1997). Norharman nastane po cepitvi C-C vezi Amadorijevih spojin. Opisana pot vodi preko Maillardove reakcije, saj so Amadorijeve spojine intermediati Maillardove reakcije.

### 2.3.5 Prekurzorji spojin skupine IQ in IQx

Maillardova reakcija je glavna pot nastajanja HCA, ki vsebujejo imidazolno skupino (IQ in IQx spojine). Iz Maillardove reakcije izvirajo tudi metilirani derivati MeIQ, MeIQx, DiMeIQx in TriMeIQx. Prekurzorji za nastanek teh spojin so proste aminokisljine, kreatin in heksoze, ki so prisotne v surovem mesu. Amino-imidni del molekule kreatinina nastane s ciklizacijo in odvzemom vode iz kreatina (slika 6). Ostali deli molekul HCA pa nastanejo s Streckerjevo razgradnjo in Maillardovo reakcijo. Vse spojine IQ in IQx skupine HCA vsebujejo imidno skupino, ki izhaja iz kreatina ali kreatinina. Kreatin se pri toplotni obdelavi pretvori v kreatinin in ta nato sodeluje v reakcijah nastajanja HCA. Ugotavljajo tudi, da je predvsem imido skupina z 2-amino skupino odgovorna za mutagenost spojin skupine IQ in IQx HCA (Skog in sod., 1998).

IQx derivati se lahko tvorijo tudi iz tavrina in dipeptida karnozina (alanil-histidin), glukoze in kreatinina (Arvidsson in sod., 1997). Pri tvorbi pirazinov ali piridinov preko Maillardove reakcije in Streckerjeve razgradnje aminokisljine prispevajo dušik in amino

skupine. Aminokislina lahko prispevajo ogljikove atome in v nekaterih primerih tudi metilne skupine (Johansson in sod., 1995) (slika 6).



Slika 6: Pot tvorbe imidazokinolinov (IQ) in imidazokinoksalinov (IQx) (Felton in sod., 2000).

### 2.3.6 Prekurzorji PhIP

Prekurzorji za PhIP (4'-hidroksi-PhIP) so kreatin, glukoza in fenilalanin (Felton in sod., 1994). Skog in sod. (1998) navajajo, da se PhIP lahko tvori tudi iz aminokislin, kot so levcin, izolevcin in tirozin, v prisotnosti reducirajočih ogljikovih hidratov in kreat(in)ina. Koncentracija glukoze pomembno vpliva na nastanek PhIP. Pri mokrih in suhih postopkih toplotne obdelave prevelika koncentracija glukoze deluje zaviralno na tvorbo PhIP (Felton in sod., 1994).



### 2.3.7 Proteoliza in nastanek mutagenih snovi

Taylor in sod. (1984) so proučevali vpliv proteolize govejega mesa in razvoj mutagenih snovi. V mesu tretiranem z različnimi proteolitičnimi encimi (papain, kimotripsin, tripsin, karboksipeptidazi A in B) so ugotovili povečanje prostih aminokislin in kratkih peptidov ( $M_r < 5000$ ). Povečanje prisotnosti teh spojin pa je povzročilo dvig mutagenih snovi v toplotno obdelanih vzorcih. Torej stopnja proteolize vpliva na dvig mutagenih snovi v toplotno obdelanem mesu. Do podobnih ugotovitev sta prišla tudi Polak (2003) ter Došler (2007), ki sta do sedaj edina proučevala povezavo med naravnim zorenjem mesa (govedina, prašičje meso) in razvojem HCA.

### 2.3.8 Vpliv drugih sestavin mesa, ki vplivajo na količino HCA

V mesu so tudi maščobe, ki prav tako vplivajo na količino HCA v mesu po toplotni obdelavi. Med toplotno obdelavo maščobe delno hidrolizirajo in maščobne kisline tvorijo (proste) radikale, ki vplivajo na potek Maillardove reakcije. Maščobne kisline oz. (prosti) radikali, ki se tvorijo med toplotno obdelavo, delujejo kot nekakšni katalizatorji nastajanja HCA. Po dodatku oljčnega olja se vsebnost MeIQx 2-krat poveča (Hwang in Ngadi, 2002). Reakcije nastajanja HCA pospeši tudi prisotnost železovih ionov. Dodatek železovih ionov v mešanico s kreatininom, glicinom in glukozo sproži povečanje vsebnosti MeIQx za 2-krat (Johansson in sod., 1995). Podobne rezultate je dobil Murkovic s sod. (1998), ko je namesto železovih ionov uporabil mioglobina. To katalitično delovanje povezujejo s povečanim nastajanjem (prostih) radikalov iz maščob in posrednim vplivom na tvorbo HCA preko Maillardove reakcije.

**Preglednica 4: Antioksidativen učinek začimb na zmanjšanje vsebnosti HCA v pečenem govejem mesu (Murkovic in sod., 1998).**

Začimba	vsebnost HCA v začinjenem mesu v primerjavi z nezačinjenim (%)				
	MeIQx	IQ	MeIQ	PhIP	4,8-DiMeIQx
<b>brez</b>	100	100	100	100	100
<b>rožmarin</b>	62	31	36	25	61
<b>timijan</b>	39	26	39	25	0
<b>žajbelj</b>	60	0	23	0	36
<b>česen</b>	29	68	60	46	22
<b>brin</b>	15	14	51	34	0

Dodatek antioksidantov zmanjšuje količino posameznih HCA. V pripravi mesnih jedi uporabljamo različne začimbe in zelišča, ki so tudi vir antioksidantov. Različni antioksidanti različno vplivajo na vsebnost posameznih HCA. Dodatek suhih začimb na površino govejega mesa pred toplotno obdelavo povzroči močno zmanjšanje količine

posameznih HCA. To lahko razložimo z antioksidativnim delovanjem aktivnih komponent začimb. Te zavirajo tvorbo (prostih) radikalov pri nastanku heterocikličnih komponent v Maillardovi reakciji (npr. nastanek pirazinskega kationskega radikala in piridinskega kationskega radikala, ki sodelujeta v nadaljnjih reakcijah tvorbe HCA). Vpliv posameznih zelišč je prikazan v preglednici 4 (Murkovic in sod., 1998).

### **2.3.9 Vpliv pogojev toplotne obdelave**

HCA se tvorijo med toplotno obdelavo živil, bogatih z beljakovinami. Količina in vrsta HCA, ki bo prisotna v živilu po toplotni obdelavi, je odvisna od mnogih dejavnikov. Prvi dejavnik je vrsta živila oz. mesa. Različne vrste mesa imajo različne količine prekursorjev, ki so potrebni za nastanek HCA. Tako se perutnina razlikuje od govedine in svinjine, pri enakih pogojih obdelave vsebuje perutnina navadno več HCA (Skog in sod., 1998).

Drugi zelo pomemben dejavnik je temperatura toplotne obdelave. HCA se tvorijo pri višjih temperaturah (nad 100 °C). Kuhanje v vodi ne povzroča povečanja mutagenosti mesa na račun HCA. Večje količine HCA nastajajo pri pirolizi aminokislin, ta pa poteka pri temperaturah višjih od 175 °C (Knize in sod., 1994).

Tretji dejavnik je čas. Podaljševanje časa toplotne obdelave nikakor ni priporočljivo z zdravstvenega niti gurmanskega vidika. Daljši čas izpostavljanja prekursorjev HCA privede do povečanja vsebnosti le-teh v končnem živilu. Podaljšan čas pečenja zelo poveča vsebnost predvsem MeIQx, ki naraste z 2 ng/g po 15 minutah na kar 35 ng/g po 35 minutah. Podobno se dogaja z ostalimi HCA, vendar njihovo povečanje ni tako obsežno (Murkovic in sod., 1998). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi raziskovalci (Skog in sod., 1998; Knize in sod., 1994).

Četrty dejavnik je način priprave mesa (preglednica 5) Sem lahko vključimo kulinarično predpripravo mesa (začimbe, marinade, paniranja...) in način toplotne obdelave. Meso lahko obdelamo s suhimi toplotnimi postopki, kot so pečenje, pečenje na žaru, praženje in cvrenje, mokrimi postopki, kot so kuhanje in dušenje, ter mikrovalovi. Med praženjem in pečenjem na žaru se tvori veliko večja koncentracija HCA, kot pri pečenju v pečici (Knize in sod., 1994). Med praženjem in pečenjem na ploščnem žaru je meso in s tem prekursorji HCA v neposrednem stiku z grelno ploščo. Pri takšnih pogojih se oblikuje rjava skorja. Med oblikovanjem te skorje se vsebnost vode v njej zmanjša, posredno se poveča koncentracija kreatina, glukoze in prostih aminokislin ter temperatura se zelo zviša. Povečana temperatura na površini povzroči nastanek HCA. Posledica tega je, da se večina HCA nahaja na površini toplotno obdelanega beljakovinsko bogatega živila (Jagerstad in sod., 1998). Pri cvrenju se toplota prenaša preko maščobe, v kateri se meso cvre. Temperatura je po živilu hitreje izenačena, vendar se vse dogaja pri višji temperaturi (175 °C). Pri pečenju v pečici pride do manjše vsebnosti HCA na maso izdelka, ker je

površina na volumen relativno manjša kot pri pečenju na žaru (Skog, 1993; Skog in sod., 1997). Največje koncentracije pa so določili v mesu pripravljene na žaru z lesnim ogljem (Fay in sod., 1997; Sinha in sod., 1998).

**Preglednica 5: Vsebnost HCA v različnih vrstah mesa po različni toplotni obdelavi (Skog in sod., 1998; Felton in sod., 2000).**

vrsta mesa	metoda toplotne obdelave	T površine (°C)	t priprave (min)	vsebnost (ng/g mesa)			
				PhIP	MeIQx	DiMeIQx	IQ
govedina							
<b>zrezek</b>	pečen na žaru	-	-	16	2,1	nd	0,19
<b>zrezek</b>	dvoplošni žar	150-225	7	0,1-1,8	0,02-1,6	0,02-0,6	nd-0,04
<b>zrezek</b>	dvoplošni žar	180-191	6-20	nd-23	1,3-8,2	nd-1	nd
<b>zrezek</b>	dvoplošni žar	180	25	5,48	13,2	2,26	10,2
<b>pečenka</b>	pečenje	160	96-182	nd	nd	nd	nd
svinjina							
<b>slanina</b>	pečenje	170	12-16	nd-53	0,9-27	nd-2,4	nd
<b>slanina</b>	pečenje	225	12	1,6-2,7	0,9-1,2	0,2-0,3	nd
<b>zrezek</b>	pečen na žaru	-	-	1,5	2,3	0,2	nd
<b>zrezek</b>	pečenje	150-225	7	nd-13	nd-4,6	nd-3,3	nd
perutnina							
<b>file</b>	pečenje	197-211	14-36	12-70	1-3	1-4	nd
<b>file</b>	pečen na žaru	180-260	10-43	27-480	nd-9	nd-2	nd
<b>piščanec</b>	pečen	175-225	15	0,5-10	0,4-0,5	0,2-0,5	nd
<b>piščanec</b>	pečen na žaru	-	2-6	13-226	5-110	-	0,01-5

nd-ni določeno; T-temperatura ; t-čas.

Mikrovalovno segrevanje pa omogoča enakomerno segrevanje celotnega živila pri nizkih temperaturah in tako ne pride do tvorbe HCA (Felton in Knize, 1994).

Največ HCA se tvori v soku pečenk, kjer pride do koncentriranja prekurzorjev HCA. Nato pa pri povišani temperaturi iz njih nastajajo HCA (Sinha in sod., 1998). V toplotno obdelanih živilih živalskega izvora se najpogosteje in v zaznavnih koncentracijah pojavljata predvsem dva HCA: PhIP in MeIQx, sledita še DiMeIQx in IQ. V tako pripravljene hrani je običajno od 0,1 pa do 10 ng HCA/g mesa. V nekaterih vzorcih količina HCA presega tudi nekaj 100 ng HCA/g mesa. Nekateri vzorci vsebujejo večji delež MeIQx, drugi pa PhIP. Tako lahko zaključimo, da je nastajanje in razgradnja HCA zelo kompleksen sistem, na katerega vpliva dokajšnje število dejavnikov (Skog, 2002; Skog in sod., 2003).

### 2.3.10 Zmanjševanje vsebnosti HCA s spremembo toplotne obdelave

Pogoje toplotne obdelave je zelo težko definirati, še posebej, če imamo opraviti s sistemi, ki so že v osnovi težko vodeni – npr. pečenje na žaru z ogljem. Pomembna je izguba mase živila med toplotno obdelavo. Če želimo doseči nižjo vsebnost HCA, moramo zagotoviti čim manjšo izgubo mase (pod 20 %). Pri večji izgubi vode se tvorijo predvsem večje količine PhIP (Skog in sod., 1995; Abdulkarim in Scott, 1998; Borgen in sod., 2001). Zniževanje temperature in časa toplotne obdelave bistveno prispeva k manjši vsebnosti HCA v pripravljenem mesu, vendar z mikrobiološkega vidika ne smemo pretiravati. Preprečevanje velikega nihanja temperature tudi znižuje vsebnost HCA. Termo elementi z boljšimi termostati so primernejši za peko kot pa tisti z velikim nihanjem temperature (Johansson in sod., 1995). Pomembna je tudi hitrost prenosa toplote v živilo. Pri manjši toplotni prevodnosti živila se večina HCA tvori na površini. Vsebnost HCA na celotno maso živila je tako manjša kot pri tistih z večjo toplotno prevodnostjo. Torej, cvrenje hrane zaradi (prostih) radikalov povzroča dvig HCA. Do razlik pride lahko tudi zaradi vrste olja, v katerem je živilo obdelano.

Predhodna obdelava mesa z mikrovalovi povzroči povečano izgubo prekurzorjev HCA in s tem posredno vpliva na manjšo vsebnost HCA v toplotno obdelanem mesu (Keating in sod., 1999).

Mariniranje mesa različnih vrst ima zelo različne učinke na tvorbo HCA med pečenjem. Verjetno je zelo odvisno od sestave marinade. Marinade, ki vsebujejo večje količine ogljikovih hidratov, delujejo najprej zaviralno, če pa se čas termične obdelave podaljša, pa pride do dviga predvsem MeIQx (Salmon in sod., 1997). Marinade, ki vsebujejo več antioksidantov, lahko zmanjšajo vsebnost HCA (Murkovic in sod., 1998). Tudi predhodno soljenje mesa pomaga pri zmanjšanju prekurzorjev in pozitivno vpliva na zmanjšanje HCA.

### 2.3.11 Zaščita pred vplivi HCA

Dashwood (2002) navaja zaščitne mehanizme pred negativnimi vplivi HCA.

#### **Zaščitni mehanizmi, ki učinkujejo pred zauživanjem hrane, ki vsebuje HCA:**

- manjše zauživanje hrane, ki vsebuje HCA,
- odstranjevanje zapečenih (zažganih) delov mesa in rib,
- uporaba načinov in pogojev toplotne obdelave mesa, ki zmanjšajo tvorbo HCA,
- zmanjšanje tvorbe HCA z antioksidanti (npr. katehini, flavonoidi, kavna kislina...), z nekaterimi žveplo vsebujočimi spojinami (npr. dialil sulfid, dipropil disulfid, dialil disulfid), z nekaterimi produkti Maillardove reakcije in oljčnim oljem (dihidroksifeniletanol derivati).

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

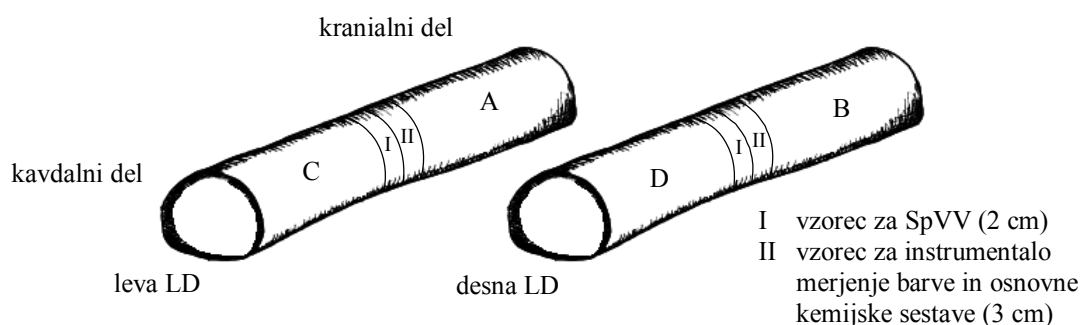
#### 3.1 MATERIAL ZA RAZISKAVO

V raziskavo je bilo vključenih 5 garanih prašičev starih ( $180 \pm 3$ ) dni. Slovenski pasemski križanci (Švedska landrace  $\times$  Large white  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire), vzrejeni pod enakimi pogoji na farmi Ihan, so bili tržnega razreda E. Zaklani in obdelani trupi so imeli povprečno toplo maso 88 kg in povprečno 58,1 % mesa. Glede na videz (barva in vlažnost površine), otip in vrednost  $pH_{24}$  (merjena 24 h *post mortem*) smo izrezali 5 levih in 5 desnih dolgih hrbtnih mišic (*m. longissimus dorsi*, LD) normalne kakovosti med 8. prsnim in 6. ledvenim vretencem, dolžine ca. 45 cm.

#### 3.2 NAČRT DELA

Na kranialnih in kavdalnih delih (slika 7) mišic smo 24 ur *post mortem* z direktno metodo izmerili vrednosti  $pH_{24}$ . Srednje dele levih in desnih mišic smo uporabili za določanje sposobnosti vezanja vode (zrezki debeline 2 cm, oznaka I) in instrumentalno analizo barve (oznaka II). Instrumentalne parametre barve smo izmerili na površini zrezkov debeline 3 cm šele po 10-minutnem izpostavljanju zrezkov zraku (pri sobni temperaturi) ter jih po merjenju uporabili še za določanje osnovne kemijske sestave (voda, beljakovine, maščobe in skupne mineralne snovi). Omenjene zrezke smo homogenizirali s kuhinjskim sekljalnikom, jih vakuumsko embalirali in do analize zamrznili pri ( $-30 \pm 1$ ) °C.

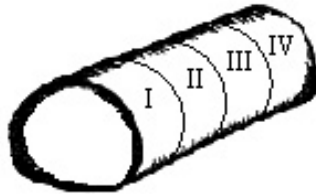
Preostale kranialne in kavdalne dele levih in desnih mišic smo razdelili na štiri enake kose (slika 7, oznake A, B, C in D) ter jih vakuumsko embalirali v polietilenske vrečke. Z naključnim izborom smo kosom določili čas zorenja 1, 3, 6 ali 10 dni in s tem eliminirali vpliv lokacije vzorca v mišici. Zorenje je potekalo v hladilniku pri temperaturi ( $2 \pm 1$ ) °C.



**Slika 7: Shematski prikaz odvzema vzorcev iz levih in desnih dolgih hrbtnih mišic prašiča.**

Po določenem času zorenja smo vsak kos (A, B, C in D) razdelili na štiri zrezke debeline 3 cm (slika 8) in pripravili vzorce za posamezne analize. Vzorce (slika 8, oznaki I in II) za analizo vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov smo toplotno obdelali, medtem ko smo vzorce za določanje vrednosti pH v ekstraktu ( $pH_{\text{ekstrakt}}$ ) in deleža neproteinskega

dušika (NPN) (slika 8) presne homogenizirali skupaj z izcejenim mesnim sokom, jih vakuumsko embalirali v polietilenske vrečke ter jih do analize zamrznili pri temperaturi  $(-30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Tako pripravljene vzorce smo v zamrzovalniku hranili do posameznih analiz.



I	HCA $70^\circ\text{C}$ (3 cm)
II	HCA $95^\circ\text{C}$ (3 cm)
III	$\text{pH}_{\text{ekstrakt}}$ NPN (3 cm)
IV	ostanek (3 cm)

**Slika 8: Odvzem vzorcev za fizikalne in kemijske analize.**

### 3.2.1 Toplotna obdelava vzorcev

Zrezke za toplotno obdelavo smo stehali, kondicionirali v hladilniku pri temperaturi  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$  in jih brez dodatka maščobe toplotno obdelali na dvoploščnem žaru (Silex, Nemčija) s teflonsko prevleko in s temperaturo plošč  $220 ^\circ\text{C}$ . Temperaturo plošč žara in središčno temperaturo zrezkov smo merili s termometrom Ellab ctd 85 (Ellab, Danska). Zrezke pečene do središčne temperature  $T_s = 70 ^\circ\text{C}$  ali  $T_s = 95 ^\circ\text{C}$  smo ponovno tehtali in jim na spodnji in zgornji strani odrezali skorji debeline 2 mm s preciznim kuhinjskim rezalnikom. Obe skorji zrezka smo združili, stehali, embalirali v polietilenske vrečke in do analize vsebnosti HCA zamrznili pri  $(-30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Zamrznjene vzorce smo na dan analize homogenizirali s kuhinjskim sekljalnikom pri maksimalni hitrosti do homogene strukture. Izcejo pečenja smo določili kot odstotek izceje glede na začetno maso vzorca.

## 3.3 METODE DELA

### 3.3.1 Določanje osnovne kemijske sestave mesa

Vsebnost vode v mesu smo določili s sušenjem po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 950.46 Moisture in Meat (1997), vsebnost beljakovin (skupni dušik  $\times 6,25$ ) po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 928.08 Nitrogen in Meat Kjeldahl Method (1997), vsebnost intramuskularne maščobe po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 991.36 Fat (Crude) in Meat and Meat Product (1997) in vsebnost skupnih mineralnih snovi po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 920.153 Ash of Meat (1997).

Ponovljivost metod smo določili tako, da smo v poskusu merjene fizikalne, fizikalno-kemijske in kemijske parametre na naključno izbranem vzorcu analizirali v šestih

ponovitvah (priloge A in C). Ponovljivost smo ovrednotili z določitvijo koeficienta variabilnosti (KV), ki smo ga izračunali po naslednji enačbi:

$$KV(\%) = \frac{SO}{\bar{x}} \times 100$$

so ... standardni odklon

$\bar{x}$  ... povprečna vrednost šestih meritev

Koeficienti variabilnosti določanja vsebnosti vode, beljakovin, intramuskularne maščobe in skupnih mineralnih snovi (priloga A) niso presegali 4 %, kar kaže na zelo dobro ponovljivost teh metod. Na osnovi teh ugotovitev smo se tudi odločili, da je za nadaljnje analize dovolj delo v dveh paralelkah.

### 3.3.2 Merjenje vrednosti pH

**Direktno merjenje vrednosti pH<sub>24</sub>** smo izvedli z vbodno kombinirano stekleno gelsko elektrodo tipa 03 (Testo pH elektroda) priključeno na pH meter (Testo 230, Testo, Italija) opremljen s temperaturnim tipalom (Testo, 0613 2211). Natančnost merjenja je bila ± 0,01 enote. pH meter je bil umerjen na pH 4,00 in pH 7,00.

**Merjenje vrednosti pH v ekstraktu:** 5,000 g vzorca smo 60 s homogenizirali pri sobni temperaturi v 50 mL destilirane vode s homogenizatorjem Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G (IKA, Nemčija) pri 10000 obr/min. Homogeno suspenzijo smo filtrirali skozi filter papir (Sartorius 388, FT-3-101-150) in vrednost pH izmerili v filtratu s Sartorius pH elektrodo tipa PY-P10, priključeno na Sartorius Basic pH meter PB-20. Natančnost umerjenega pH metra na pH 4,00, pH 7,00 in pH 10,00 je bila ± 0,005 enote.

Ponovljivost metode je bila zelo dobra, saj je bil koeficient variabilnosti merjenja vrednosti pH<sub>ekstrakt</sub> v šestih paralelkah zelo majhen (0,23 %) (priloga A).

### 3.3.3 Instrumentalno merjenje barve

Barvo mišic smo določili s kromometrom Minolta CR 200b (Minolta, Japonska). Pred merjenjem smo kromometer (vir svetlobe (angl. illuminant) C, osvetljevanje pod kotom 45°) umerili na bel standard ( $L^* = 92,8$ ;  $a^* = 0,3136$ ;  $b^* = 0,3196$ ) ter meritve izvedli v šestih paralelkah. Aparat poda barvo v treh koordinatah, kot so v  $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$ . Vrednost  $L^*$  opisuje svetlost barve, pri čemer višje vrednosti pomenijo svetlejšo barvo vzorca in obratno. Vrednost  $a^*$  določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju (rdeča barva je odvisna od prisotnosti barvila mioglobina) in zelene barve v negativnem območju (samo v primeru diskoloracij na površini mesa). Vrednost  $b^*$  pa predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju (rumena barva je povezana s stopnjo oksigenacije mesnega barvila) in modre v negativnem območju (samo v primeru diskoloracij na površini mesa).

### 3.3.4 Določanje sposobnosti za vezanje vode

Sposobnost za vezanje vode – SpVV mišic smo določili po metodi, ki jo opisujeta Honikel (1998) in Micklander in sod. (2005). Zrezke debeline 2 cm (slika 7, oznaka I) smo oblikovali v vzorce dimenzij  $6 \times 3 \times 2 \text{ cm}^3$ , jih stehtali (ca. 40 g) in ovili v mrežico. S pomočjo nitke smo vzorce obesili v vrečke jih napihnilni z dušikom in zavarili. Nadtlak v vrečki je preprečeval kontakt vzorca z vrečko. Tako pripravljene vzorce so prosto viseli 48 ur pri temperaturi  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorce smo po hranjenju ponovno tehtali in jim določili količino izceje. SpVV smo izrazili kot odstotek izceje glede na začetno maso vzorca.

### 3.3.5 Določanje vsebnosti neproteinskega dušika

Vsebnost neproteinskega dušika v mišicah smo določili po modificirani metodi, ki jo opisujejo Paulsen in sod. (2006) in Soriano in sod. (2006). Zatehtali smo 5,000 g homogeniziranega vzorca, dodali 40 mL ohlajene 3 % triklorocente kisline (Merck, 1.00807) in 120 s homogenizirali v ledeni vodni kopeli s homogenizatorjem (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija) pri 20000 obr/min. Suspenzijo smo filtrirali skozi filter papir (Sartorius 388, FT-3-101-150) direktno v Büchi razklopne kivete in nato spirali filtrirno pogačo z 10 mL 3 % raztopine triklorocetne kisline. Vsebnost NPN smo določili v skupnem bistrem filtratu z Büchi Kjeldahl linijo (Büchi Kjeldahl Line: K-424, B-324, B-414) za določanje dušika po uradni Kjeldahl metodi (AOAC 928.08, 1997). Delež neproteinskega dušika smo izrazili kot odstotek neproteinskega dušika glede na skupni dušik. Vsak vzorec smo analizirali v dveh ponovitvah.

Ponovljivost metode je bila zelo dobra, saj je bil koeficient variabilnosti določanja vsebnosti neproteinskega dušika v šestih paralelkah naključnega vzorca 1,2 % (priloga A).

### 3.3.6 Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov

Heterociklične aromatske amine smo ekstrahirali z ekstrakcijo s trdno fazo, jih določili z RP-HPLC v kombinaciji z masnim spektrometrom in dobljene kromatograme obdelali z računalniškim programom MassLynx™ V4,0 (Micromass, 2004).

#### 3.3.6.1 Priprava vzorca

Za določanje vsebnosti HCA smo uporabili modificirano metodo, ki jo opisujejo Messner in Murkovic (2004) ter Sentellas in sod. (2004). V čašo smo odtehtali 3,000 g homogeniziranega vzorca, dodali 100  $\mu\text{L}$  raztopine internega standarda (0,5  $\mu\text{g/g}$ ) TriMeIQx (TRC, A630000) v metanolu in 12 mL 1 M raztopine NaOH (Merck, 1.06498). Suspenzijo smo homogenizirali pri sobni temperaturi 12 h na magnetnem mešalniku (IKA, RCT basic) pri 500 obr./min. V alkalni homogenat smo vmešali 13 g diatomejske zemlje - EXtrelut NT (Merck, 1.15092) in z zmesjo napolnili stekleno kolono (Lenz, 5.4508.04). HCA smo ekstrahirali s 75 mL ekstrakcijskega topila etil acetata (Merck, 1.00868) in



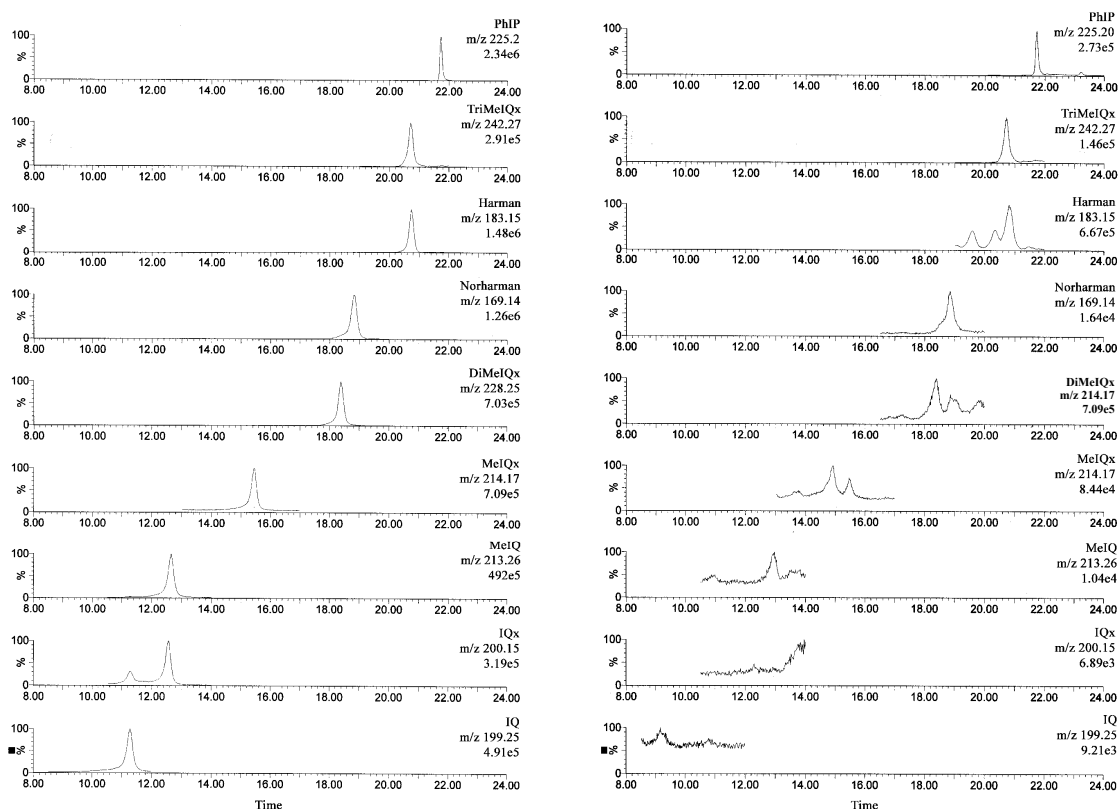
diklorometana (Merck, 1.06044) v razmerju 1 : 1. Sledilo je SPE čiščenje eluata na kolonicah (angl. Cartridge) Oasis MCX (angl. Mixed Mode Cation Exchanger) 60 mg (Waters, ZDA, 186000253). Ves eluat smo injicirali na MCX sorbent, kondicioniran z 2 mL metanola (Merck, 1.06007) in uravnotežen z 2 mL zmesi topil etil acetata in diklorometana (1:1), ter ga očistili z 2 mL 0,1 M raztopine HCl (Merck, 1.00317) in z 2 mL metanola (Merck, 1.06007). Na sorbent ujete polarne in nepolarne HCA smo eluirali z 2 mL zmesi topil metanol (Merck, 1.06007) : amoniak (Merck, 1.05432) v razmerju 9 : 1 (v/v) in vzorce do suhega evaporirali v zmernem toku dušika ter končni ekstrakt tik pred ločevanjem na HPLC-MS sistemu raztopili v 250 mg metanola (Merck, 1.06007).

### 3.3.6.2 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

Kromatografske pogoje in pogoje detekcije smo modificirali po Barceló-Barrachina in sod. (2006, 2004a, 2004b) in Bianchi in sod. (2005). HPLC analiza je bila opravljena na sistemu Agilent 1100. Ločevanje je potekalo na koloni z obrnjeno fazo (Semi Micro TSKgel ODS-80Ts column, 5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  2 mm i.d.) podjetja Tosoh Bioscience LLC (Japonska, 18151) pri temperaturi 25  $^{\circ}$ C. Volumen injiciranja je bil 10  $\mu$ L. Kromatografija je potekala z gradientom mobilne faze in pretokom 0,3 mL/min, pri čemer je bila mobilna faza A 20 mM amonijev formiat (Fluka, 09739) z vrednostjo pH 3,2 in mobilna faza B acetonitril (Merck, 1.00030). Gradient je bil naslednji: 95 % A, 0-0,5 min; 95-80 % A, 0,5-15 min; 80-40 % A, 15-18 min; 40 % A, 18-24 min; 40-95 % A, 24-27 min; 95 % A, 27-40 min. Vrste HCA so bile določene na podlagi retencijskih časov in m/z HCA standardov (TRC: Harman, H105000; Norharman, N700000; IQ, A616500; MeIQ, A605200; IQx, A616900; MeIQx, A606600; 4,8-DiMeIQx, A631000; 4,7,8-TriMeIQx, A630000; PhIP, A617000).

Uporabljen masni detektor (Micromass Quattro micro<sup>®</sup> API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI) je deloval pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 40 V, temperatura izvora 135  $^{\circ}$ C in napetost kapilare 3,6 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+). Razpršilni plin dušik je imel temperaturo 390  $^{\circ}$ C in pretok 600 L/h. Plin vhodne leče dušik je imel pretok 70 L/h. Detekcija na masnem spektrometru je potekala v SIR načinu (m/z 183,2 za Harman, 169,2 za Norharman, 199,2 za IQ, 213,2 za MeIQ, 200,2 za IQx, 214,2 za MeIQx, 228,2 za 4,8-DiMeIQx, 242,2 za 4,7,8-TriMeIQx in 225,2 za PhIP). Potrditev posameznih HCA smo naredili še v načinu MRM (angl. Multiple Reaction Monitoring). Podrobnejši opis je podan v prilogi B.

Rezultati so bili obdelani s funkcijo Quantify v računalniškem programu MassLynx<sup>™</sup> V4,0 (Micromass, 2004). Na sliki 9 je primer kromatograma.



**Slika 9:** HPLC–MS kromatogram mešanice 8-ih različnih HCA standardov v metanolu (vsak 200 ng/g) in TriMeIQx-om kot internim standardom (levo); HPLC–MS kromatogram 6 dni zorenega vzorca, pečenega do središčne temperature 95 °C, z TriMeIQx-om kot internim standardom (desno).

### 3.3.6.3 Validacija metode

#### 3.3.6.3.1 Meja detekcije in kvantifikacije

Z računalniškim programom (MassLynx™ V4,0) smo po metodi 'Peak-to-Peak' določili razmerje ('signal to noise' – S/N) med signalom opazovanega HCA in šumom. Mejo detekcije in kvantifikacije smo določili kot vsebnost opazovanega HCA v vzorcu, pri kateri je razmerje S/N = 3 oz. S/N = 10. Rezultati so predstavljeni v prilogi E.

#### 3.3.6.3.2 Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom in internim standardom

Umeritveno krivuljo za določanje posameznega HCA smo pripravili tako, da smo poiskali linearno povezavo med analitičnim signalom in vsebnostjo tega HCA. Pripravili smo mešan standard HCA različnih koncentracij (0,01 µg/g, 0,1 µg/g, 0,5 µg/g, 1,0 µg/g metanola) in metodo kalibrirali v štirih točkah (v dveh ponovitvah) za območje med 0,5 ng/g in 60 ng/g vzorca pečene skorje. Vzorcju (1,5 g pečene skorje) smo dodali

naraščajočo količino mešanega standarda HCA in konstantno količino (100 mg) raztopine internega standarda (0,5 µg/g metanola) TriMeIQx ter enako postopali kot z vzorci.

**Preglednica 6: Priprava umeritvenih krivulj za kvantitativno določanje različnih HCA po metodi standardnega dodatka in internega standarda.**

Točke	masa vzorca (skorje) (g)	masa posameznega HCA v mešanem standardu (ng)	masa internega standarda (ng)
slepa	1,5	0,0	50,0
1	1,5	1,5	50,0
2	1,5	15,0	50,0
3	1,5	80,0	50,0
4	1,5	180,0	50,0

Umeritvene krivulje za določanje vsebnosti HCA kažejo, da je povezava med analitičnim signalom in vsebnostjo analita linearna ( $r^2 > 0,99$ , priloga E).

Enačba premice:

$$\frac{S_{HCA_i}}{S_{IS}} = k_i \times \frac{m_{HCA_i}}{m_{IS}}$$

Izračun vsebnosti HCA:

$$HCA_i(\text{ng} / \text{g}) = \frac{S_{HCA_i} \times m_{IS} \times m_{sk}}{S_{IS} \times k_i \times m_{vz} \times m_{zr}}$$

$HCA_i$  – vsebnost posameznega HCA (ng/g toplotno obdelane mišice LD);  $S_{HCA_i}$  – površina pod vrhom opazovanega HCA;  $S_{IS}$  – površina pod vrhom internega standarda;  $k_i$  – naklon premice za opazovan HCA;  $m_{HCA_i}$  – masa standardnega dodatka opazovanega HCA (ng);  $m_{IS}$  – masa dodanega internega standarda (ng);  $m_{vz}$  – masa vzorca (g);  $m_{sk}$  – masa pečene skorje (g);  $m_{zr}$  – masa pečenega zrezka mišice LD (g).

### 3.3.6.3.3 Ponovljivost metode

Koeficienti variabilnosti znotraj paralelke pri določanju HCA so se gibali med 2,17 % in 3,16 %, koeficienti variabilnosti med paralelkami pa so bili v večini primerov pod 6 %. Nizke vrednosti kažejo na zelo dobro ponovljivost testirane metode (prilogi C in D).

### 3.3.7 Statistična analiza

Vrednosti, ki smo jih dobili za posamezne opazovane parametre, smo vnesli v računalnik s programom Microsoft Excel 2000. S programskim paketom SAS/STAT (SAS Software, 1999) smo izračunali osnovne statistične parametre, kot so povprečje, standardni odklon, najmanjša in največja vrednost ter statistično obdelali podatke za posamezno opazovano lastnost. Za obdelavo podatkov z normalno porazdelitvijo po spodaj navedenih statističnih modelih smo uporabili postopek PROC GLM (General linear models). Za vrednotenje vpliva končnih središčnih temperatur na vsebnosti HCA v zgornjem sloju na dvoploščnem žaru pečenih vzorcev pa smo uporabili postopek PROC TTEST (t-test v paru).

Statistični model 1 smo uporabili za obdelavo podatkov: izceje med zorenjem, vrednosti pH merjenih v mesnem ekstraktu, deleža neproteinskega dušika in vsebnosti HCA (PhIP, harman, norharman, DiMeIQx, MeIQx in vsote vseh HCA pri dveh središčnih temperaturah pečenja 70 °C in 95 °C). V statističnem modelu 1 smo upoštevali vpliv živali ( $\check{Z}$ ) in vpliv časa zorenja mesa ( $Z$ ).

$$y_{ijk} = \mu + \check{Z}_i + Z_j + e_{ijk} \quad (\text{statistični model 1})$$

$y_{ijk}$  –  $ijk$ -to opazovanje;  $\mu$  – povprečna vrednost;  $\check{Z}_i$  – vpliv živali (1-5);  $Z_j$  – vpliv časa zorenja (1, 3, 6 in 10 dni *post mortem*);  $e_{ijk}$  – ostanek.

Za ugotavljanje vpliva končne središčne temperature ( $T_i$ ) na vsebnost HCA smo uporabili spodnji statistični model 2.

$$y_{ijk} = \mu + T_i + \check{Z}_j + e_{ijk} \quad (\text{statistični model 2})$$

$y_{ijk}$  –  $ijk$ -to opazovanje;  $\mu$  – povprečna vrednost;  $T_i$  – vpliv središčne temperature pečenja na dvoploščnem žaru (70 °C and 95 °C);  $\check{Z}_j$  – vpliv živali (1-5);  $e_{ijk}$  – ostanek.

Povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri zorenja, vsebnosti prekursorjev HCA in vsebnostjo HCA so bili izračunani s postopkom PROC CORR (SAS Software, 1999).

## 4 REZULTATI

### 4.1 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MIŠIC

Mišice so vsebovale v povprečju 74,8 % vode, 1,42 % intramuskularne maščobe-IMF, 23,0 % beljakovin in 1,12 % skupnih mineralnih snovi. Iz rezultatov (preglednica 7) je razvidno, da smo izbrali homogen vzorec, saj so bili koeficienti variabilnosti nižji od 4 %. Izjema je le variabilnost vsebnosti intramuskularne maščobe (KV=35 %).

**Preglednica 7: Rezultati osnovne kemijske analize presnih dolgih hrbtnih mišic prašičev z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.**

Parameter (g/100 g)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
voda	5	74,84	74,50	75,53	0,31	0,41
IMF	5	1,42	0,90	2,23	0,50	35,03
beljakovine	5	23,01	22,34	24,14	0,61	2,63
skupne mineralne snovi	5	1,12	1,05	1,19	0,04	3,96

IMF – intramuskularna maščoba, n – število mišic,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

### 4.2 PREVERJANJE KAKOVOSTI MIŠIČNINE

Normalno kakovost mišic smo potrdili z merjenjem pH (24h *post mortem*), SpVV ter instrumentalnem merjenjem parametrov barve mesa. Kakovostni parametri so bili zelo variabilni (KV > 20 %). Izjema sta le vrednosti pH<sub>24</sub> (KV = 1,15 %) in L\* (KV = 3,9 %). Variabilnost rezultatov je verjetno posledica razlik med individualnimi živalmi. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 8.

**Preglednica 8: Rezultati meritev parametrov kakovosti mišičnine, izmerjenih na presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.**

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
vrednost pH <sub>24</sub>	40	5,51	5,37	5,67	0,06	1,15
SpVV	10	7,88	4,89	11,70	2,50	31,68
vrednost L*	60	52,8	47,7	57,0	2,1	3,9
vrednost a*	60	6,3	3,8	8,9	1,3	20,0
vrednost b*	60	1,2	-0,1	2,4	0,6	51,0

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti, pH<sub>24</sub> – vrednost pH merjena 24 ur *post mortem*, SpVV – sposobnost za vezanje vode.

Čeprav izmerjene vrednosti  $pH_{24}$  in  $L^*$  nekoliko mejita na BMV kakovost mišičnine, nam je nižji odstotek izceje ( $SpVV = 7,9\%$ ) potrdil pravilno vzorčenje mišic normalne kakovosti.

### 4.3 VPLIV ZORENJA

V literaturi smo zasledili številne metode določanja obsega zorenja mesa. Te so: določanje dolžine sarkomer v miofibrilah (Strydom in sod., 2005), določanje rezne trdnosti (angl. Share Force Value), miofibrilarni fragmentacijski indeks (Olson in sod., 1976), določanje komponente 30 kDa (Koochmarai, 1994), določanje aktivnosti glikogen-fosforilaze b, kreatin-kinaze in gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (Okomura in sod., 2003). Okomura in sod. (2003) poleg običajnega indikatorja Warner-Bratzlerjeve strižne sile predlagajo za vrednotenje zorenja prašičjega mesa še naslednje uporabne pokazatelje: miofibrilarni fragmentacijski indeks, 32 kDa komponenta, peptida P1 in P2 ter aktivnost gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze. V naši študiji smo za vrednotenje procesov zorenja izbrali delež neproteinskega dušika. Poleg tega še navajamo podatke za izcejo med zorenjem in vrednost pH (preglednici 9 in 10).

**Preglednica 9: Rezultati meritev izceje med zorenjem, vrednosti pH v ekstraktu in deleža neproteinskega dušika – NPN zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča.**

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
izceja <sub>Z</sub> (%)	15	2,35	0,84	6,93	1,54	65,37
vrednost $pH_{ekstrakt}$	20	5,60	5,47	5,73	0,07	1,30
NPN (% od skupnega N)	38	12,07	11,10	13,29	0,62	5,13

izceja<sub>Z</sub> – izceja med zorenjem, n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

**Preglednica 10: Vpliv zorenja na izcejo v različnih časih zorenja, vrednost pH v ekstraktu in delež neproteinskega dušika – NPN v presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 5, model 1, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).**

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	zorenje (dan)				vpliv zorenja
	1	3	6	10	
izceja <sub>Z</sub> (%)	$0,0 \pm 0,0^b$	$1,8 \pm 0,8^a$	$2,0 \pm 1,1^a$	$3,2 \pm 2,3^a$	*
vrednost $pH_{ekstrakt}$	$5,61 \pm 0,06^a$	$5,60 \pm 0,09^a$	$5,62 \pm 0,06^a$	$5,57 \pm 0,09^a$	nz
NPN (% od TN)	$11,7 \pm 0,5^b$	$12,0 \pm 0,6^{ab}$	$12,2 \pm 0,6^a$	$12,4 \pm 0,7^a$	***

n – število obravnavanj v skupini,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, izceja<sub>Z</sub> – izceja med zorenjem, \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv, \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv, \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv, nz –  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv, <sup>a,b,c</sup> skupine z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

V preglednici 9 so zbrani vsi rezultati meritev izceje med zorenjem, vrednosti pH ekstrakta in deleža neproteinskega dušika zorenih mišic prašiča. Izceja med zorenjem je v tem poskusu močno variabilen parameter.

Po pričakovanju se rezultati meritev spreminjajo vzporedno z zorenjem mesa. Izjema je le spreminjanje vrednosti pH ekstrakta. Ta bi se moral z zorenjem povečati za nekaj desetink, kar pa se ni zgodilo. Delež neproteinskega dušika se v primerjavi s prvim dnevom *post mortem* (nezorene mišice) statistično značilno poveča po šestem dnevu zorenja mišic.

#### 4.4 PARAMETRI PEČENJA NA DVOPLOŠČNEM ŽARU

Zrezke debeline 3 cm smo pekli na dvoploščnem žaru s temperaturo plošč 220°C do dveh središčnih temperatur ( $T_s = 70^\circ\text{C}$  oz.  $95^\circ\text{C}$ ). Ker smo predvidevali, da bo podaljšana toplotna obdelava vplivala na večjo tvorbo HCA, smo spremljali čas pečenja in izcejo med pečenjem. Rezultati so prikazani v preglednici 11.

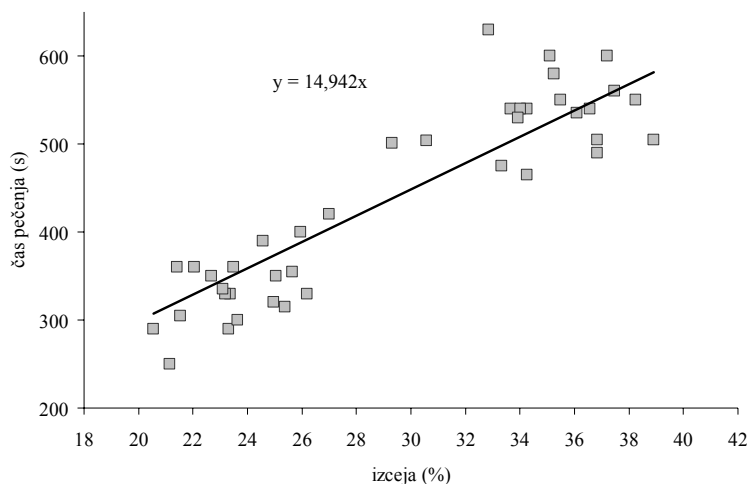
**Preglednica 11: Vpliv zorenja na čas pečenja in izcejo med pečenjem dolgih hrbtnih mišic prašiča do določene  $T_s$  (n = 5, Model 1, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).**

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	$T_s$ (°C)	zorenje (dan)				značilnost vpliva
		1	3	6	10	
čas pečenja (s)	70	321 ± 46 <sup>a</sup>	326 ± 41 <sup>a</sup>	346 ± 46 <sup>a</sup>	355 ± 30 <sup>a</sup>	nz
	95	537 ± 59 <sup>ab</sup>	512 ± 39 <sup>b</sup>	567 ± 31 <sup>a</sup>	532 ± 31 <sup>ab</sup>	nz
izceja med pečenjem (%)	70	22,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	23,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	24,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	24,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	nz
	95	33,4 ± 3,7 <sup>a</sup>	33,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	36,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	36,3 ± 1,9 <sup>a</sup>	nz

$\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon,  $T_s$  – središčna temperatura, \*\*\*  $p \leq 0,01$  statistično zelo visoko značilen vpliv, nz  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv, <sup>a,b</sup> skupini z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujeta.

Iz rezultatov meritev lahko razberemo, da so razlike v času pečenja med vzorci zgolj naključne in niso posledica razlik med živalmi in ne časa zorenja. Vzorce pečene do  $T_s = 95^\circ\text{C}$  smo pekli dalj časa kot vzorce v katerih je bila središčna temperatura ( $70^\circ\text{C}$ ).

S slike 10 je razvidna splošna tendenca povezanosti med časom in izcejo pečenja. Med pečenjem je količina izcejanega mesnega soka odvisna od časa pečenja. Sklepamo lahko, da večja izceja kot posledica podaljšane toplotne obdelave vpliva na večjo vsebnost HCA. Večja izceja pri pečenju pomeni tudi večjo količino prekursorjev HCA v kontaktu z grelno površino, kar posledično poveča količino HCA. Močno povezavo med izcejo pri pečenju in tvorbo vseh oblikovanih HCA potrjujeta tudi Pearsonova korelacijska koeficienta v preglednici 14 in sicer je pri  $T_s = 70^\circ\text{C}$  vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta 0,87 ter 0,97 pri  $T_s = 95^\circ\text{C}$ .



**Slika 10:** Odvisnost med časom pečenja in izcejo pri pečenju različno zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča.

#### 4.5 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI

V našem poskusu smo določili pet različnih HCA: PhIP, MeIQx, DiMeIQx, harman in norharman. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 12.

**Preglednica 12:** Vsebnosti nekaterih HCA v nezorenih in zorenih ter toplotno obdelanih dolgih hrbtnih mišic prašiča z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.

HCA (ng/g)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
PhIP	80	1,75	0,14	6,34	1,57	89,7
harman	80	0,12	0,05	0,25	0,05	43,1
norharman	80	0,33	0,07	0,89	0,22	64,4
DiMeIQx	80	0,54	0,04	1,79	0,45	84,4
MeIQx	80	2,00	0,26	6,74	1,58	79,1
vsota HCA	80	4,74	0,57	15,05	3,77	79,5

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

Vsebnosti posameznih HCA zelo variirajo ( $43,1 < KV < 89,7$ ), kar je posledica različnih časovnih intervalov zorenja, razlik med živalmi, predvsem pa različnih časov toplotne obdelave. Izmerili smo količine HCA v območju med 0,04 (DiMeIQx) in 6,74 (MeIQx) ng/g toplotno obdelanega mesa. Mišice so vsebovale v povprečju največ MeIQx (2,00 ng/g) in PhIP (1,75 ng/g), v manjših količinah pa še DiMeIQx (0,54 ng/g), norharman (0,33 ng/g) in harman (0,12 ng/g).



Vpliv časa zorenja mišic in časa toplotne obdelave lahko ocenimo iz rezultatov meritev zbranih v preglednici 13. Na splošno vsebnosti vseh HCA naraščajo z zorenjem in končno središčno temperaturo pečenja.

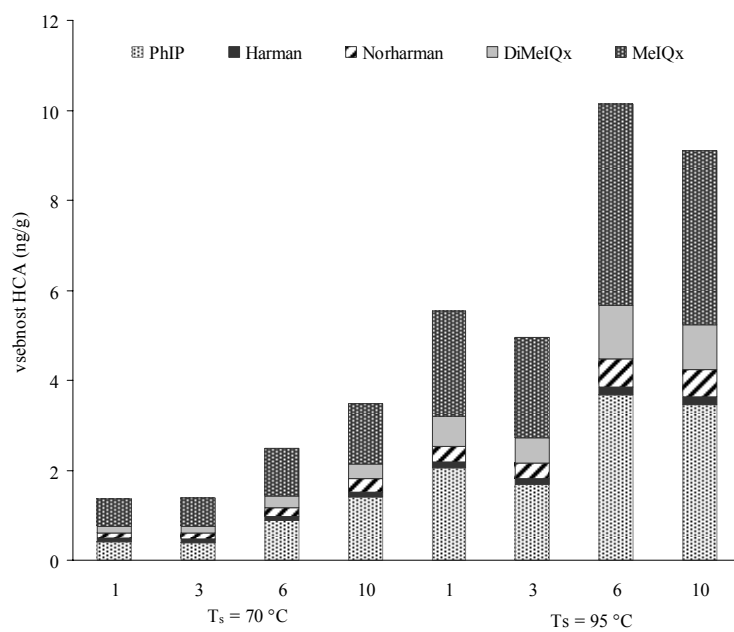
**Preglednica 13: Vpliv časa zorenja in središčne temperature pečenja na vsebnost (ng/g) HCA v toplotno obdelanih dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 5, Modela 1 in 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$  in t-test v paru).**

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	T <sub>s</sub> (°C)	zorenje (dan)				značilnost vpliva
		1	3	6	10	
PhIP	70	0,41 ± 0,44 <sup>cy</sup>	0,40 ± 0,19 <sup>cy</sup>	0,88 ± 0,67 <sup>by</sup>	1,41 ± 0,62 <sup>ay</sup>	***
	95	2,05 ± 1,48 <sup>bx</sup>	1,69 ± 1,45 <sup>bx</sup>	3,67 ± 1,11 <sup>ax</sup>	3,46 ± 1,57 <sup>ax</sup>	***
značilnost vpliva T <sub>s</sub>		***	***	***	***	
harman	70	0,08 ± 0,03 <sup>by</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>by</sup>	0,09 ± 0,03 <sup>aby</sup>	0,11 ± 0,03 <sup>ax</sup>	***
	95	0,14 ± 0,05 <sup>bx</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>bx</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>ax</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>ax</sup>	***
značilnost vpliva T <sub>s</sub>		***	***	***	***	
norharman	70	0,12 ± 0,06 <sup>cy</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>cy</sup>	0,20 ± 0,10 <sup>by</sup>	0,30 ± 0,10 <sup>ay</sup>	***
	95	0,35 ± 0,17 <sup>bx</sup>	0,34 ± 0,13 <sup>bx</sup>	0,62 ± 0,18 <sup>ax</sup>	0,60 ± 0,11 <sup>ax</sup>	***
značilnost vpliva T <sub>s</sub>		***	***	***	***	
DiMeIQx	70	0,14 ± 0,12 <sup>cy</sup>	0,16 ± 0,06 <sup>bcy</sup>	0,25 ± 0,17 <sup>aby</sup>	0,33 ± 0,11 <sup>ay</sup>	***
	95	0,66 ± 0,46 <sup>bx</sup>	0,56 ± 0,27 <sup>bx</sup>	1,19 ± 0,45 <sup>ax</sup>	1,00 ± 0,24 <sup>ax</sup>	***
značilnost vpliva T <sub>s</sub>		***	***	***	***	
MeIQx	70	0,61 ± 0,48 <sup>by</sup>	0,62 ± 0,26 <sup>by</sup>	1,07 ± 0,82 <sup>ay</sup>	1,34 ± 0,39 <sup>ay</sup>	***
	95	1,80 ± 0,83 <sup>bx</sup>	2,23 ± 0,79 <sup>bx</sup>	4,48 ± 1,26 <sup>ax</sup>	3,87 ± 1,20 <sup>ax</sup>	***
značilnost vpliva T <sub>s</sub>		***	***	***	***	
vsota HCA	70	1,35 ± 1,13 <sup>by</sup>	1,38 ± 0,49 <sup>by</sup>	2,48 ± 1,77 <sup>ay</sup>	3,49 ± 1,19 <sup>ay</sup>	***
	95	5,00 ± 3,39 <sup>bx</sup>	4,95 ± 2,58 <sup>bx</sup>	10,1 ± 2,9 <sup>ax</sup>	9,11 ± 3,02 <sup>ax</sup>	***
značilnost vpliva T <sub>s</sub>		***	***	***	***	

$\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, T<sub>s</sub> – središčna temperatura, \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv, \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv, \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv, nz  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv, <sup>x,y</sup> skupini z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujeta, <sup>a,b,c,d</sup> skupine z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujejo

V nezorenih vzorcih pečenih do T<sub>s</sub> = 70 °C, smo določili 0,41 ng/g PhIP. Po treh dneh zorenja se vrednosti niso spremenile. Statistično značilno večji preskok pa smo zasledili po šestih dneh zorenja, ko se je vsebnost PhIP pri vzorcih povečala za 2-krat, po 10-ih dneh pa za okoli 3-krat (1,41 ng/g). Enako lahko povzamemo tudi za vzorce, pečene do T<sub>s</sub> = 95 °C, pri katerih so bile vrednosti PhIP pri nezorenih vzorcih (2,05 ng/g) 1,7-krat nižje kot pri zorenih (3,46 ng/g). Vsebnost PhIP v vzorcih, pečenih do T<sub>s</sub> = 70 °C, je statistično zelo visoko značilno manjša (preglednica 13) kot v vzorcih, pečenih do T<sub>s</sub> = 95 °C.

Harman je tisti HCA, ki ga je bilo po vsebnosti v vzorcih najmanj, okoli 0,08 ng/g. Po zorenju se je vsebnost harmana značilno povečala pri obeh središčnih temperaturah. Po 10-ih dneh zorenja ga je bilo pri nižji  $T_s$  v povprečju 0,11 ng/g, pri višji pa 0,18 ng/g.



**Slika 11:** Vsebnost vseh HCA (ng/g) v nezorenih (1 dan *post mortem*) in zorenih dolgih hrbtne mišicah prašiča, pečenih na dvoploščnem žaru do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ).

Nekoliko višje vrednosti smo določili pri norharmanu, in sicer pri nižji  $T_s$  v povprečju 0,12 ng/g, in pri višji  $T_s$  0,35 ng/g (preglednica 13). Po 10-ih dneh zorenja se vsebnost norharmana značilno poveča približno za dvakrat. V nezorenih vzorcih pečenih do  $T_s = 70\text{ °C}$  smo določili 0,14 ng/g DiMeIQx. Po treh dneh zorenja se vrednosti niso spremenile. Večji statistično značilni preskok smo zasledili po šestih dneh zorenja, ko se je vsebnost DiMeIQx povečala za približno 1,5-krat, po 10-ih dneh pa za 2,5-krat (0,33 ng/g). Enako velja tudi za vzorce pečene do  $T_s = 95\text{ °C}$ , pri katerih so bile vrednosti pri nezorenih vzorcih (0,66 ng/g) za 1,5-krat nižje kot pri vzorcih zorenih 10 dni (1,00 ng/g). Vsebnost DiMeIQx v vzorcih, pečenih do  $T_s = 70\text{ °C}$ , je statistično zelo visoko značilno manjša kot v vzorcih, pečenih do  $T_s = 95\text{ °C}$ .

Na splošno vsebnost MeIQx narašča z zorenjem in s končno središčno temperaturo pečenja. V nezorenih vzorcih pečenih do  $T_s = 70\text{ °C}$  smo določili 0,61 ng/g MeIQx. Po treh dneh zorenja se vrednosti niso spremenile. Značilno večjo vsebnost smo zasledili po šestih dneh zorenja, ko se je vsebnost MeIQx povečala za približno 1,5-krat, po 10-ih dneh pa za 2-krat (1,34 ng/g). Vrednosti nezorenih vzorcev pečenih do  $T_s = 95\text{ °C}$  (1,80 ng/g) so 3-krat višje od vrednosti nezorenih vzorcev pečenih do  $T_s = 70\text{ °C}$ .

Iz preglednice 13 je razvidno, da ima končna središčna temperatura v vseh obdobjih zorenja statistično značilen vpliv na količino vseh HCA, saj se pri višji središčni temperaturi (95 °C) tvori večja količina HCA.

Najmanjšo skupno vsebnost HCA (1,35 ng/g) smo določili v nezorenih mišicah pripravljenih do  $T_s = 70$  °C, največjo (9,11 ng/g) pa v 10 dni zorenih mišicah pečenih do  $T_s = 95$  °C. V pečenih vzorcih do  $T_s = 95$  °C se oblikuje 3- do 4-krat več HCA kot pri vzorcih pečenih do  $T_s = 70$  °C. Razlike so pri višji središčni temperaturi za vse HCA statistično značilne, razen za PhIP in norharmana. Pri nižji temperaturi pa so razlike statistično značilne samo za MeIQx.

#### 4.6 KORELACIJE

Vrednosti Pearsonovih korelacijskih koeficientov v preglednici 14 kažejo, da ima vsebnost NPN večji vpliv na tvorbo HCA pri nižji (70°C) kot pri višji (95°C) središčni temperaturi.

Iz preglednice 14 so razvidne tudi srednje močne povezave (niso značilne) med vsebnostjo HCA ter izcejo med zorenjem in pečenjem pri obeh središčnih temperaturah. Izrazita je predvsem povezava med izcejo pečenja in tvorbo HCA pri višji središčni temperaturi.

**Preglednica 14: Pearsonovi korelacijski koeficienti med izcejo med zorenjem in pečenjem, vsebnostjo NPN v presnih mišicah in vsebnostjo HCA v zunanem sloju pečenih dolgih hrbtnih mišic prašiča v odvisnosti od središčne temperature (n = 8).**

Parameter	$T_s$	PhIP	harman	norharman	DiMeIQx	MeIQx	vsota HCA
70 °C							
izceja zorenja		0,82	0,72	0,87	0,88	0,83	0,98*
izceja pečenja		0,85	0,75	0,88	0,91	0,88	0,87
NPN		0,91*	0,84	0,93*	0,96*	0,95*	0,93*
95 °C							
izceja zorenja		0,62	0,71	0,71	0,53	0,62	0,62
izceja pečenja		0,96*	0,97*	0,99**	0,93*	0,97*	0,97*
NPN		0,57	0,68	0,61	0,42	0,46	0,51

n – število primerjav,  $T_s$  – središčna temperatura, NPN – delež neproteinskega dušika, \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilno, \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilno, \*  $p \leq 0,05$  statistično značilno.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Z raziskavami heterocikličnih aromatskih aminov-HCA se ukvarjajo že 30 let. V zadnjih nekaj letih pa se je intenzivnost raziskovanja teh zdravju nevarnih spojin povečala. V preteklosti so se ukvarjali predvsem s kvalitativnim določevanjem in iskanjem različnih HCA v živilih. Njihov namen je bil predvsem s kemijskega stališča okarakterizirati in ovrednotiti to skupino mutagenih in/ali kancerogenih snovi. V zadnjem času se je tehnika čiščenja, ločevanja in detekcije teh zelo majhnih količin HCA dovolj izpopolnila, da lahko določimo HCA tudi v beljakovinsko bogati hrani, pripravljene pri temperaturah, sprejemljivih za uživanje. V literaturi najdemo predvsem raziskave, ki zajemajo različne metode toplotne obdelave in različno predpripravo mesa pred toplotno obdelavo, kot je npr. dodajanje raznih antioksidantov in marinad, ki vplivajo na tvorbo HCA. Več raziskav je bilo narejenih tudi na vzorcih, ki so bili neprimerno pripravljene do previsokih središčnih temperatur z namenom določiti čim več različnih HCA in v večjih količinah. Ogromno raziskav je bilo narejenih z modelnimi poskusi, kjer so poskušali ugotoviti vpliv posameznih prekurzorjev na tvorbo HCA.

Prisotnost HCA v toplotno obdelanem mesu je odvisna od številnih dejavnikov kot so metoda, čas, temperatura in stopnja toplotne obdelave, prisotnost relativnih količin prekurzorjev, inhibitorjev in stimulatorjev, maščob, antioksidantov in vsebnosti vode. Mi smo v raziskavi skušali ugotoviti vpliv stopnje proteolize oz. časa zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) in vpliv stopnje pečenosti do dveh središčnih temperatur (70 °C in 95 °C) oz. časa pečenja na nastanek mutagenih in karcinogenih HCA v dolgi hrbtne mišici prašiča. Ker smo predvidevali, da proteoliza v prašičjem mesu različnih kakovosti ne poteka v enakem obsegu, smo v raziskavo vključili samo meso normalne kakovosti.

Naša raziskava je bila zasnovana na predvidevanju:

- da se bo z zorenjem prašičjega mesa v njem povečala koncentracija neproteinskega dušika ter da bo posledično nastalo med toplotno obdelavo več HCA in
- da bo pri pečenju do višje središčne temperature nastalo več HCA kot posledica podaljšane toplotne obdelave.

V nalogi smo določili tudi osnovne kemijske parametre, kot so vsebnost vode, beljakovin, intramuskularne maščobe in mineralnih snovi. Normalno kakovost mišičnine pa smo potrdili z merjenjem pH (24h *post mortem*), SpVV ter instrumentalnem merjenjem parametrov barve mesa.

### Preverjanje kakovosti mesa

Kakovost mesa se najpogosteje določa s pomočjo meritev vrednosti pH, barve, in SpVV. Njihova povezanost je kompleksna in nelinearna (Warriss in sod., 2006). Meso je normalne kakovosti, če je vrednost pH dve uri *post mortem* višja od 5,8 ter izceja manjša od 6 %, in če je vrednost  $L^*$  med 44 in 50 (Joo in sod., 1999; Flores in sod., 2000; Toldrá, 2003). Joo in sod. (1999) navajajo (preglednica 15), da obarjanje sarkoplazemskih proteinov, zaradi nižjega pH, zelo vpliva na barvo mesa. Na SpVV pa vpliva denaturacija miofibrilarnih proteinov in nizka končna vrednost pH.

**Preglednica 15: Parametri kakovosti za devet različnih vzorcev LD prašiča (Joo in sod., 1999).**

Kakovost mesa	$L^*$ vrednost (svetlost)	odstotek izceje (%)	končna vrednost pH
ekstremno BMV	57,1	11,6	5,23
BMV	54,0	10,9	5,38
delno BMV	51,8	8,6	5,54
ekstremno RMV	48,4	12,3	5,43
RMV	46,1	8,3	5,49
RČN	46,5	4,0	5,62
RČN	44,0	2,1	5,82
TČS	41,7	0,9	6,14
ekstremno TČS	35,1	0,4	6,5

BMV – bleda, mehka, vodena; RMV – rdeča, mehka, vodena; RČN – rdeča, čvrsta, normalna; TČS – temna, čvrsta, suha.

Mi smo kakovost mišičnine ob odvzemu vzorcev v mesno-predelovalnem podjetju določili z merjenjem vrednosti  $pH_{45}$  (merjena 45 min *post mortem*) ter s senzorično oceno barve in teksture. Pravilno izbiro dolgih hrbtnih mišic smo potrdili tako, da smo določili vrednost  $pH_{24}$  (merjeno 24 h *post mortem*), instrumentalno izmerili barvne vrednosti  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  ter določili SpVV (preglednica 8).

Mišice normalne kakovosti so imele v povprečju vrednost  $pH_{24}$  5,51, SpVV 7,9 %, in vrednost  $L^*$  52,8. Vrednosti glavnih parametrov, ki se uporabljajo za določanje kakovosti mesa, so bile primerljive z navedbami drugih avtorjev. Joo in sod. (1999) navajajo, da imajo mišice normalne kakovosti povprečno vrednost  $pH_{24}$  med 5,6 in 5,8, SpVV med 2,1 % in 4 % ter vrednost  $L^*$  med 44 in 46,5. Warriss in sod. (2006) so prav tako izbrali mišice normalne kakovosti, ki so imele v povprečju vrednost  $pH_{24}$  5,45, SpVV 10,3 %, vrednost  $L^*$  54,3 in mišice BMV kakovosti, ki so imele vrednost  $pH_{24}$  5,37, SpVV 13,0 % ter vrednost  $L^*$  61,0. Podatki, ki jih avtorji navajajo, se lahko med seboj nekoliko razlikujejo, najbrž zaradi genskih dejavnikov, merjenih mišic in metodike.

### **Vpliv zorenja na vsebnost HCA**

Stopnjo zorenja smo opredelili tako, da smo po določenem obdobju zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) določili delež NPN v svežem mesu. Metodo smo izbrali na podlagi predhodnih raziskav zorenja prašičjega mesa (Došler in sod., 2007). Delež NPN, izračunan glede na skupni dušik, se je s časom zorenja povečal (preglednica 10). V presnih mišicah smo značilno povečanje s povprečno 11,7 % na 12,2 % opazili šele po šestih dneh zorenja. Povečanje neproteinskega dušika je bilo pričakovano, saj je splošno znano, da se med procesom proteolize sproščajo številne aminokisliline in kratki (di)peptidi, ki so med drugimi številnimi spojinami vir neproteinskega dušika.

Čas zorenja ima zelo visok vpliv na vsebnost vseh HCA (preglednica 13). V povprečju se je v 10 dni zorenih vzorcih tvorilo 2- do 3-krat več HCA kot v nezorenih vzorcih; in sicer je v 10 dni zorenih vzorcih vsebnost PhIP v povprečju 3- oz. 2-krat več, vsebnost MeIQx v povprečju 2-krat več, vsebnost DiMeIQx 2-krat več, vsebnost norharmana 3- oz. 2-krat več in vsebnost harmana 2-krat več.

Če združimo rezultate določanja HCA in NPN, lahko zaključimo, da je večja količina HCA v zorenih mišicah v primerjavi z nezorenimi, posledica večje vsebnosti nebeljakovinskega dušika oz. prostih aminokislin, kreatinina... (preglednica 14).

### **Vpliv toplotne obdelave na vsebnost HCA**

Po določenem obdobju zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) smo zrezke dolge hrbtne mišice toplotno obdelali do dveh središčnih temperatur (70 °C in 95 °C) in nato v zapečeni skorji določili PhIP, harman, norharman, DiMeIQx in MeIQx. Olsson in sod. (2005) so prav tako kot mi v toplotno obdelanih mišicah določili PhIP, harman, norharman in MeIQx, medtem ko so IQx določili samo v vzorcih prašičev, ki so vsebovali mutiran gen RN<sup>-</sup>. V naših vzorcih je bila vsebnost HCA v območju med 0,04 ng/g (DiMeIQx) in 6,74 ng/g (MeIQx). V povprečju se je tvorilo največ MeIQx (2,00 ng/g) in PhIP (1,75 ng/g), manj pa DiMeIQx (0,54 ng/g), norharmana (0,33 ng/g) in harmana (0,12 ng/g). Warzecha in sod. (2004) prav tako navajajo, da se med toplotno obdelavo mesa tvorijo PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx v relativno največji količini. Busquets in sod. (2004) še dodatno potrjujejo, da so MeIQx, PhIP, 4,8-DiMeIQx, norharman, harman, DMIP, Trp-P-1, AαC in MeAαC najbolj pogosto določeni HCA v toplotno obdelanem mesu.

V prašičjih mišicah, ki smo jih pekli pri temperaturi 220 °C do T<sub>s</sub> = 70 °C in T<sub>s</sub> = 95 °C, nismo dokazali nepolarnih HCA, razen β-karbolinov (harman in norharman); kar smo pričakovali, saj se po navedbah drugih avtorjev (Sugimura in Adamson, 2000; Toribio in sod., 2000; Murkovic, 2004) nepolarni HCA tvorijo v reakcijah radikalov s pirolizo aminokislin in proteinov pri temperaturah nad 300 °C, nasprotno pa se harman in norharman tvorita že pri nižjih temperaturah.

Številni avtorji (Felton in sod., 2000; Skog in sod., 2003; Vitaglione in Fogliano, 2004; Oz in sod., 2006) navajajo, da so za tvorbo HCA poleg kemijske sestave mesa (prisotnost prekursorjev itd.) najbolj pomembni način in pogoji toplotne obdelave mesa, in sicer sta temperatura in čas toplotne obdelave tista parametra, ki vodita tvorbo HCA med postopkom toplotne obdelave. Murkovic in sod. (1998) navajajo, da je tvorba HCA pri temperaturi pod 140 °C sorazmerno majhna in da se mutagena aktivnost mesa zelo poveča, če meso pečemo pri temperaturi 200 °C do 250 °C oz. nad 300 °C. Avtorji (Augustsson in sod., 1997; Olsson in sod., 2005) navajajo, da se vsebnosti MeIQx in PhIP povečata za okrog 20-krat, če temperaturo pečenja povečamo s 160 °C na 225 °C, in sicer se vsebnost HCA poveča s povprečno 0,18 ng/g na 4,13 ng/g.

Zaradi že temeljito preučenega vpliva temperature toplotne obdelave na tvorbo HCA, smo v našem poskusu z vidika toplotne obdelave preučili samo vpliv časa pečenja oz. vpliv dveh središčnih temperatur, ki se v gastronomiji običajno uporabljata, na tvorbo (vsebnost) HCA. Glede na rezultate in navedbe številnih avtorjev smo pričakovali, da bodo vzorci, ki smo jih pekli dlje časa vsebovali tudi več HCA.

Središčna temperatura pečenja ima v vseh obdobjih zorenja statistično značilen vpliv na vsebnost vseh v raziskavi določenih HCA. Vsebnost HCA je v vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C statistično značilno večja (preglednica 13) kot v vzorcih pečenih do središčne temperature 70 °C; in sicer se v vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C v povprečju tvori za 3- do 4-krat več HCA. Večja vsebnost HCA v vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C je posledica daljšega časa pečenja in večje izceje mesnega soka. Daljši čas pečenja omogoča večjo izcejo iz mesa na površino mesa in s tem tudi večji obseg prenosa v vodi topnih prekursorjev HCA na površino mesa. Skog in sod. (2003) prav tako navajajo, da je pri večji izgubi mase med toplotno obdelavo, večja tudi mutagena aktivnost vzorca.

Pri daljšem kontaktu mesa z grelno površino (220 °C) se v zunanjem delu mesa vsebnost vode zmanjša in posledično površina mesa (skorja) segreje na višjo temperaturo (do 220 °C). Znano je, da se pri višji temperaturi in daljšem času pečenja tvori tudi več HCA. Pegg in Shahidi (2004) navajata, da se več produktov Maillardove reakcije lahko tvori na površini pečenega mesa, kjer je manjša vsebnost vode, čeprav se lahko v manjšem obsegu tvorijo tudi v vodnih raztopinah. Skog in sod. (2003) prav tako menijo, da se med pečenjem na površini mesa izparevanje vode s časom pečenja zmanjša, ter da se zaradi manjše vsebnosti vode poveča nastanek skorje in tvorba mutagenih spojin.

Zorenje in središčna temperatura toplotne obdelave mesa prašičev soodvisno vplivata na vsebnost HCA (preglednica 13). Pri višji središčni temperaturi (95 °C) in daljšem času zorenja (10 dni) se tvori največ HCA (9,11 ng/g), medtem ko se pri nižji središčni temperaturi (70 °C) in v nezorenih vzorcih tvori najmanj HCA (1,35 ng/g).

V vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C se glede na vzorce pečene do središčne temperature 70 °C v povprečju tvori 1. dan 4-krat več HCA, 3. dan 4-krat več, 6. dan 4-krat več in 10. dan 3-krat več HCA (preglednica 13). Iz rezultatov lahko vidimo, da je pri višji središčni temperaturi (95 °C) po 10-ih dneh zorenja v povprečju 3-krat večja vsebnost DiMeIQx, 3-krat večja vsebnost MeIQx, 3-krat večja vsebnost PhIP, 2-krat večja vsebnost norharmana in 2-krat večja vsebnost harmana. Podatki nam kažejo, da ima daljši čas pečenja večji vpliv na tvorbo DiMeIQx, MeIQx in PhIP kot na tvorbo norharmana in harmana. Da ima čas toplotne obdelave manjši vpliv na tvorbo harmana in norharmana kot pa na tvorbo drugih mutagenih HCA, ugotavljajo tudi Olsson in sod. (2005).

### **Vpliv časa pečenja in izceje med pečenjem na tvorbo HCA**

Vzorce pečene do središčne temperature 95 °C smo pekli (povprečno 537 s) dalj časa od vzorcev pečenih do nižje središčne temperature 70 °C (povprečno 337 s) (preglednica 11). Daljši čas pečenja posledično pomeni, da meso odda več mesnega soka. Zato je pri vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C tudi za 11 % večja izceja; in sicer je izceja pri teh vzorcih v povprečju 35-odstotna ter pri vzorcih pečenih krajši čas (središčna temperatura 70 °C) v povprečju 24-odstotna. Vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $r = 0,90$ ) nam kaže, da je med časom pečenja in izcejo pečenja močna povezanost. Palka (2004) pojasnjuje ta pojav tako, da se vsebnost vode med toplotno obdelavo zniža zaradi evaporacije in izceje. Ko se središčna temperatura mesa povečuje, se zaradi denaturacije mišičnih proteinov (predvsem miozina) SpVV zmanjšuje in s tem izceja povečuje.

Vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $r = 0,87$ ) med izcejo pečenja in vsebnostjo HCA kaže pri nižji stopnji pečenosti srednje močno, pri višji stopnji pečenosti pa močno in pozitivno povezanost ( $r = 0,97$ ). Iz navedenega lahko sklepamo, da večja količina izceje poveča količino prekurzorjev HCA na površini mesa, in tako omogoči večji obseg tvorbe izvrednotenih HCA (preglednica 14).

V raziskavi smo ugotovili, da imajo mišice med zorenjem v povprečju 2,4 % izceje, med toplotno obdelavo pa 24 % oz. 35 % (preglednici 9 in 11). Vrednosti korelacijskih koeficientov med izcejo zorenja in pečenja ter vsebnostjo HCA kažejo srednje močno oz. močno povezanost ( $0,87 \leq r \leq 0,97$ ), zato izceja med zorenjem ni zanemarljiva.

Skog in sod. (2003) navajajo, da izguba mase med toplotno obdelavo mesa vpliva na mutageno aktivnost, in sicer večja kot je izguba mase, večja je mutagena aktivnost.



### **Zaključne ugotovitve**

Rezultati naše raziskave so potrdili domneve o vplivu zorenja mesa in stopnje pečenosti na tvorbo HCA med pečenjem mesa prašičev. Ugotovili smo, da je vsebnost HCA odvisna od časa zorenja in od središčne temperature toplotne obdelave (pečenja). Na splošno lahko rečemo, da se v mišicah, ki so zorene daljši čas in pečene do višje središčne temperature tvori več HCA.

Ugotovili smo, da se največja vsebnost skupnih HCA (9,11 ng/g) tvori v mišicah 10 dni in pečenih do središčne temperature 95 °C. Najmanjša vsebnost skupnih HCA (1,35 ng/g) pa se tvori v nezorenih mišicah pečenih do središčne temperature 70 °C.

Iz naših ugotovitev lahko zaključimo, da je z zdravstvenega vidika oz. vidika vsebnosti mutagenih in karcinogenih HCA, najprimernejša toplotna obdelava prašičjega mesa zorenega do tri dni, in sicer do nižje središčne temperature 70 °C, pri kateri se skupaj tvori do 1,38 ng/g HCA.

Ugotovili smo, da ima 10-dnevno zorenje mesa manjši vpliv na vsebnost HCA po pečenju kot pa stopnja pečenosti. Porabnikom, ki želijo povečati okusnost in mehkobo pečenega prašičjega mesa svetujemo, da za pečenje uporabijo temperaturo žara, ki ni višja od 220 °C (med 150 °C in 200 °C), da meso ne pečejo do središčne temperature 95 °C, ampak, da pustijo mišice prašiča zoreti tri do največ pet dni pri temperaturi 2 °C in nato meso pečejo do središčne temperature 70 °C, t.j. temperature, pri kateri nastane manj HCA, in ki še zagotavlja mikrobiološko varnost.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo:

- Osnovna kemijska sestava nezrele dolge hrbtne mišice prašiča (1. dan *post mortem*) je naslednja: 74,8 % vode, 1,42 % intramuskularne maščobe, 23,0 % beljakovin in 1,12 % skupnih mineralnih snovi.
- Normalna kakovost mišice je bila potrjena z vrednostjo pH<sub>24</sub> (5,51), SpVV (7,9 %) in instrumentalno izmerjeno barvno vrednostjo L\* (52,8).
- Delež neproteinskega dušika se v primerjavi s prvim dnem *post mortem* statistično značilno poveča po šestem dnevu.
- V skorji pečenih dolgih hrbtnih mišic prašiča smo določili naslednje HCA: MeIQx, PhIP, DiMeIQx, norharman in harman.
- Povprečno se je v 10 dni zorenih vzorcih tvorilo 2- do 3-krat več HCA kot v nezorenih vzorcih.
- Končna središčna temperatura pečenja vpliva na vsebnost HCA: v pečenih vzorcih do T<sub>s</sub> = 95 °C se oblikuje 3- do 4-krat več HCA kot pri pečenih do T<sub>s</sub> = 70 °C.
- Z zdravstvenega vidika je najprimernejša toplotna obdelava prašičjega mesa do tretjega dne po zakolu, obdelanega do središčne temperature 70 °C, pri kateri se skupaj tvori najmanj HCA. Največ HCA se oblikuje pri pečenju prašičjih mišic zorenih 10 dni in termično obdelanih do T<sub>s</sub> = 95 °C.

## 6 POVZETEK

Raziskovalci so ugotovili, da se prokarcinogene spojine heterociklični aromatski amini (HCA) tvorijo med suhimi postopki (pečenje, praženje in cvrenje) toplotne obdelave mesa, rib in njihovih izdelkov iz aminokislin, reducirajočih ogljikovih hidratov in kreatinina oz. kreatina. HCA so spojine z visokim mutagenim in karcinogenim potencialom, saj lahko poškodujejo DNA in povzročijo nastanek raka na različnih organih tako pri živalih kot pri ljudeh, zato je raziskovanje in poznavanje tovrstne problematike HCA nujno.

V raziskavi smo želeli ugotoviti vpliv časa zorenja prašičjega mesa in stopnje pečenosti do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ), ki se običajno uporabljata v kulinariki, na tvorbo mutagenih in karcinogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HCA) v dolgi hrbtne mišici (*m. longissimus dorsi*) prašiča. Raziskovalno delo je temeljilo na dveh glavnih hipotezah, in sicer: (1) da se bo med zorenjem v mišicah povečal delež neproteinskega dušika in da bo posledično med pečenjem nastalo več HCA, ter (2) da se bo pri mišicah pečenih do  $T_s = 95$  °C tvorilo več HCA kot pri mišicah pečenih do  $T_s = 70$  °C.

Poskus smo opravili na mišicah petih slovenskih pasemskih križancev (Švedska landrace  $\times$  Large white  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire) normalne kakovosti. To smo določili z analizo vrednosti pH, sposobnosti za vezanje vode in barve ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Mišice smo razdelili na štiri dele, jih vakuumsko embalirali in zoreli 1 (nezoren), 3, 6 in 10 dni pri temperaturi ( $2 \pm 1$ ) °C. Meso smo pekli v dvoploščnem žaru pri temperaturi 220 °C do dveh  $T_s$  (nižje 70 °C in višje 95 °C). Osnovno kemijsko sestavo in indikatorje zorenja, kot so izceja, vrednost pH in vsebnost neproteinskega dušika smo določili na presnih vzorcih. HCA smo iz homogenata zgornje in spodnje skorje (debeline 2 mm) pečenega zrezka ekstrahirali in očistili s trdno fazo (SPE) ter jih določili z HPLC-MS. Osnovno kemijsko sestavo (vsebnost vode, beljakovin, skupnih mineralnih snovi in intramuskularnih maščob) smo določili z metodami, ki jih predpisuje AOAC. Vsebnost neproteinskega dušika smo določili po Kjeldahlovi metodi, ki jo opisujejo Paulsen in sod. (2006) ter Soriano in sod. (2006), HCA pa smo ekstrahirali in očistili s trdno fazo (SPE), jih ločili in njihovo vsebnost določili z HPLC-MS. Rezultate analiz smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS.

Osnovna kemijska sestava nezorene (1. dan *post mortem*) dolge hrbtne mišice je bila naslednja: 74,8 % vode, 1,42 % intramuskularne maščobe, 23,0 % beljakovin in 1,12 % skupnih mineralnih snovi. Zorenje mesa značilno vpliva na vse merjene pokazatelje zorenja. Delež neproteinskega dušika se v primerjavi s prvim dnevom *post mortem* statistično značilno poveča po šestem dnevu.

V skorji pečenih zrezkov smo določili naslednje HCA: MeIQx, PhIP, DiMeIQx, harman in norharman. Rezultati raziskave so potrdili obe pred poskusom postavljeni hipotezi.

Vsebnost HCA se z zorenjem poveča za 2- do 3-krat (nezoreno meso vsebuje 1,35 ng/g, po treh 1,38 ng/g, po šestih 1,77 ng/g in po desetih dneh 3,49 ng/g), hkrati pa je soodvisna od središčne temperature. Povprečno se v vzorcih pečenih do  $T_s = 95$  °C tvori do 3- do 4-krat več HCA kot v vzorcih pečenih do  $T_s = 70$  °C (7,30 ng/g vs. 2,18 ng/g).

Z zdravstvenega vidika je najprimernejše uživanje mesa prašičev do tretjega dne po zakolu pečenega do središčne temperature 70 °C, pri kateri se tvori do 1,38 ng/g HCA.

## 7 VIRI

- Abdulkarim B.G., Smith J.S. 1998. Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 11: 4680-4687.
- AOAC Official Method 920.153 Ash of meat. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 4-4.
- AOAC Official Method 928.08 Nitrogen in meat Kjeldahl method. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 5-6.
- AOAC Official Method 950.46 Moisture in meat. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 1-2.
- AOAC Official Method 991.36 Fat (Crude) in meat and meat product. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 3-4.
- Aristoy M.C., Toldrá F. 1998. Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, 50: 327-332.
- Armero E., Baselga M., Aristoy M.C., Toldrá F. 1999. Effects of sire type and sex on pork muscle exopeptidase activity, natural dipeptides and free amino acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1280-1284.
- Arvidsson P., Boekel M.A.J.S., Skog K., Jagerstad M. 1997. Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *Journal of Food Science*, 62, 5: 911-916.
- Augustsson K., Skog K., Jägerstad M., Steineck G. 1997. Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis*, 18, 10: 1931-1935.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T. 2004a. Determination of heterocyclic amines by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054, 1-2: 409-418.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T., Lliberia J.L., Bagó B., Cortes M.A. 2006. Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography A*, 1125: 195-203.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004b. Evaluation of reversed-phase columns for the analysis of heterocyclic aromatic amines by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 45-59.

- Benito M.J., Rodríguez M., Acosta R., Córdoba J.J. 2003. Effect of the fungal extracellular protease EPg222 on texture of whole pieces of pork loin. *Meat Science*, 65: 877-884.
- Bianchi F., Careri M., Corradini C., Elviri L., Mangia A., Zagnoni I. 2005. Investigation of the separation of heterocyclic aromatic amines by reversed phase ion-pair liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry: The role of ion pair reagents on LC-MS/MS sensitivity. *Journal of Chromatography B*, 825, 2, 25: 193-200.
- Borgen E., Solyakov A., Skog K. 2001. Effects of precursor composition and water on the formation of heterocyclic amines in meat model systems. *Food Chemistry*, 74, 1: 11-19.
- Brewer M.S. 2004. Water-holding capacity. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 242-249.
- Bruas-Reignier F., Brun-Bellut J. 1996. Changes affecting the *longissimus dorsi*, *triceps brachii caput longum* and *rectus femoris* muscles of young friesian bulls during meat ageing. *Meat Science*, 43: 335-344.
- Busquets R., Bordas M., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 79-86.
- Cambero M.I., Pereira-Lima C.I., Ordonez J.A., Garcia de Fernando G.D. 2000. Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1519-1528.
- Cornet M., Bousset J. 1999. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Science*, 51, 3: 215-219.
- Dashwood R.H. 2002. Review Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutation Research*, 511: 89-112.
- Davies C.G.A., Labuza T.P. 2007. The Maillard reaction application to confectionery products. Minnesota, University of Minnesota, Department of Food Science and Nutrition. <http://citeseer.ist.psu.edu/469420.html> (21. sep 2007): 33 str.
- Devine C.E. 2004. Conversion of muscle to meat: Ageing. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 330-338.
- Došler D., Polak T., Žlender B., Gašperlin L. 2007. Relation of myofibril fragmentation to textural and chemical parameters of aged pork *Longissimus dorsi* = Povezava med mifibilarno fragmentacijo, teksturnimi in kemijskimi parametri zorene prašičje mišice *Longissimus dorsi*. *Acta agriculturae Slovenica*, 90(1): 5-16

- Došler D. 2007. Vpliv kakovosti, proteolize in stopnje pečenosti na nastanek heterocikličnih aromatskih aminov v dolgi hrbtne mišici prašiča. Doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 109 str.
- Fay A.M., Kane S.A., Kazim M., Millar W.S., Odel J.G. 1997. Magnetic resonance imaging of optic perineuritis. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 17, 4: 247-249.
- Felton J.S., Jägerstad M., Knize M.G., Skog K., Wakabayashi K. 2000. Contents in food, beverages and tobacco. V: *Food borne carcinogens. Heterocyclic amines*. Nagao M., Sugimura T. (eds.). New York, John Wiley & Sons, LTD: 31-72.
- Flores M., Moya V.J., Aristoy M.C., Toldrá F. 2000. Nitrogen compounds as potential biochemical markers of pork meat quality. *Food Chemistry*, 69, 4: 371-377.
- Geesink G.H., Taylor R.G., Bekhit A.E.D., Bickerstaffe R. 2001. Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderization. *Meat Science*, 59, 4: 417-422.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Boudjellal A., Ouali A. 2006. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 8: 394-405.
- Honikel K.O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 4: 447-457.
- Honikel K.O. 2004. Conversion of muscle to meat. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 314-322.
- Hopkins D.L., Huff-Lonergan E. 2004. Tenderizing mechanisms: Chemical and enzymatic. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 3. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (ur.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 1363-1369.
- Hwang D.K., Ngadi M. 2002. Kinetics of heterocyclic amines formation in meat emulsion at Different fat content. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35, 7: 600-606.
- Jägerstad M., Skog K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*, 574: 156-172.
- Jägerstad M., Skog K., Arvidsson P., Solyakov A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Food Research and Technology*, 207, 6: 419-427.
- Ji J.R., Takahashi K. 2006. Changes in concentration of sarcoplasmic free calcium during *post-mortem* ageing of meat. *Meat Science*, 73: 395-403.
- Johansson M.A.E., Fay L.B., Gross G.A., Olsson K., Jägerstad M. 1995. Influence of amino acids on the formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in a model system. *Carcinogenesis*, 16: 2553-2560.

- Joo S.T., Kauffman R.G., Kim B.C., Park G.B. 1999. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine *longissimus* muscle. *Meat Science*, 52, 3: 291-297.
- Keating G.A., Bogen K.T. 2004. Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. *Journal of Chromatography B*, 802: 127-133.
- Keeton J.T., Eddy S. 2004. Chemical and physical characteristics of meat. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 210-264.
- Kikugawa K., Kato T., Hiramoto K., Takada C., Tanaka M., Maeda Y., Ishihara T. 1999. Participation of the pyrazine cation radical in the formation of mutagens in the reaction of glucose / glycine / creatinine. *Mutation Research*, 444: 133-144.
- Knize M.G., Dolbeare F.A., Carroll K.L., Moore D.H., Felton J.S. 1994. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 7: 595-603.
- Koohmaraie M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*, 36: 93-104.
- Koohmaraie M., Geesink G.H. 2006. Contribution of *postmortem* muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 74: 34-43.
- Lawrie R.A., Ledward D.A. 2006. *Lawrie's meat science*. 7<sup>th</sup> ed. Cambridge, Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition: 442 str.
- Leth T. 2004. Chemical analysis for specific components. Major meat components. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 185-195.
- MassLynx<sup>TM</sup> Version 4.0. Milford, Massachusetts. SP4. 2004. Micromass<sup>®</sup> Ltd. UK Limited (Reg. U.S. Pat. & Tm. Off.). Global mass – informatics: software.
- Messner C., Murkovic M. 2004. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 19-26.
- Micklander E., Bertram H.C., Marnø H., Bak L.S., Andersen H.J., Engelsen S.B., Nørgaard L. 2005. Early *post-mortem* discrimination of water-holding capacity in pig *longissimus* muscle using new ultrasound method. *Food Science and Technology*, 38, 5: 437-445.
- Monin G. 2004. Colour and texture deviations. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 323-330.
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 3-10.



- Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Food Research Technology*, 207, 6: 477-480.
- Okumura T., Yamada R., Nishimura T. 2003. Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during *post mortem* conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Science*, 64: 467-473.
- Olson D.G., Parrish J.R., Stromer M.H. 1976. Myofibrillar fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during *post mortem* storage. *Journal of Food Science*, 41: 1036-1041.
- Olsson V. 2004. The effect of the RN<sup>-</sup> allele and production system on meat quality and the formation of heterocyclic amines in pork. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Food Science: 70 str.
- Olsson V., Skog K., Lundström K., Jägerstad M. 2005. Colour photographs for estimation of heterocyclic amine intake from fried pork chops of different RN genotypes indicate large variations. *Food Quality and Preference*, 16, 2: 91-101.
- Ouali A., Talmant A. 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28, 4: 331-348.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu M.A. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74: 44-58.
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2006. Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chemistry*, 104: 67-72.
- Palka K. 2004. Heat effects on meat. Physics and chemistry. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 2. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 567-570.
- Paulsen P., Hagen U., Bauer F. 2006. Changes in biogenic amine contents, non-protein nitrogen and crude protein during curing and thermal processing of *M. longissimus, pars lumborum* of pork. *European Food Research and Technology*, 223, 5: 603-608.
- Pegg R.B., Shahidi F. 2004. Heat effects on meat. Flavour development. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 2. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 570-578.
- Polak T. 2003. Heterociklični aromatski amini v zoreni termično obdelani goveji dolgi hrbtne mišici. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93 str.

- Pösö A.R., Puolanne E. 2005. Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, 70, 3: 423-434.
- Rosenvold K., Baltzer M., Aaslyng M.D., Støier S. 2004. Water loss from pork during cooking – does pH during cooking have an impact? V: 50th International Congress of Meat Science and Technology, august 8<sup>th</sup> – 13<sup>th</sup>, 2004, Helsinki, Finland: Proceedings. Helsinki, University of Helsinki, Department of Food Technology: CD-ROM: 7 str.
- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 5: 433-441.
- SAS Softwear. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.
- Sentandreu M.A., Coulis G., Ouali A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science Technology*, 13: 400-421.
- Sentellas S., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1032, 1-2: 193-201.
- Shahidi F., Samaranyaka A.G.P., Pegg R.B. 2004. Heat effects on meat. Maillard reaction and browning. Vol. 2. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 578-592.
- Sinha R., Knize M.G., Salmon C.P., Brown E.D., Rhodes D., Felton J.S., Levander O.A., Rothman N. 1998. Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 4: 289-297.
- Skog K. 1993. Cooking procedures and food mutagens - a literature-review. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 9: 655-675.
- Skog K. 2002. Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1197-1203.
- Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., Jagerstad M. 1997. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 6: 555-565.
- Skog K., Eneroth A., Svanberg M. 2003. Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 3: 313-323.
- Skog K.I., Johansson M.A., Jagerstad M.I., 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 879-896.

- Soriano A., Cruz B., Gómez L., Mariscal C., Ruiz A.G. 2006. Proteolysis, physicochemical characteristics and free fatty acid composition of dry sausages made with deer (*Cervus elaphus*) or wild boar (*Sus scrofa*) meat: A preliminary study. *Food Chemistry*, 96, 2: 173-184.
- Strete D. (ed.) 1995. Color atlas of histology. New York, Harper Collins College: 81-81.
- Strydom P.E., Frylinck L., Smith M.F. 2005. Should electrical stimulation be applied when cold shortening is not a risk? *Meat Science*, 70: 733-742.
- Sugimura T., Adamson R.H. 2000. Introduction. V: Food borne carcinogens. Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.). New York, John Wiley & Sons, LTD: 1-4.
- Taylor R.T., Shore V., Fultz E. 1984. Mutagen formation in a model beef boiling system. 2. Effects of proteolysis and comparison of soluble fractions from several protein-sources. *Journal of Environmental Science and Health*, 19, 7: 819-845.
- Toldrá F. 2003. Muscle foods: Water, structure and functionality. *Food Science and Technology International*, 9: 173-177.
- Toldrá F. 2004. Curing: Dry. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 360-365.
- Toldrá F., Flores M. 2000. The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality. *Food Chemistry*, 69, 4: 387-395.
- Toribio F., Galceran M.T., Puignou L. 2000. Review: Separation of heteroaromatic amines in food products. *Journal of Chromatography B*, 747: 171-202.
- Tornberg E. 2005. Effects of heat on meat proteins – implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 3: 493-508.
- Valin C., Ouali A. 1992. Proteolytic muscle enzymes and *post mortem* meat tenderisation. V: New technologies for meat and meat products: fermentation and starter cultures, muscle enzymology and meat ageing, quality control systems. Smulders F., Toldra F., Flores J., Prieto M. (eds.) Utrecht, Audet Tijdschriften: 163-179.
- Vitaglione P., Fogliano V. 2004. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 189-199.
- Wakabayashi K., Ushiyama H., Takahashi M., Nukaya H., Kim S.B., Hirose M., Ochiai M., Sugimura T., Nagao M. 1993. Exposure to Heterocyclic Amines. *Environmental Health Perspectives*, 99: 129-133.
- Warriss P.D., Brown S.N., Paściak P. 2006. The colour of the adductor muscle as a predictor of pork quality in the loin. *Meat Science*, 73: 565-569.

- Warzecha L., Janoszka B., Błaszczuk U., Strózyk M., Bodzek D., Dobosz C. 2004. Determination of heterocyclic aromatic amines content in samples of household-prepared meat dishes. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 95-106.
- Watanabe A., Ueda Y., Higuchi M. 2004. Effects of slaughter age on the levels of free amino acids and dipeptides in fattening cattle. *Animal Science Journal*, 75: 361-367.

## ZAHVALA

## PRILOGE

### Priloga A: Ponovljivost med paralelkami pri določanju vsebnosti vode, intramuskularne maščobe (IMF), beljakovin, skupnih mineralnih snovi, deleža neproteinskega dušika (NPN) in vrednosti pH, merjene v ekstraktu, v presni dolgi hrbtne mišica prašiča.

parameter (g/100 g)	paralelka						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV (%)
voda	74,63	75,28	75,07	74,98	74,93	75,30	75,03	0,33
IMF	1,43	1,43	1,36	1,39	1,39	1,36	1,39	2,13
beljakovine	22,38	22,37	22,34	22,34	22,50	22,63	22,42	0,52
skupne mineralne snovi	1,15	1,11	1,09	1,18	1,13	1,19	1,14	3,59
vrednost pH <sub>ekstrakt</sub>	5,58	5,60	5,61	5,58	5,59	5,58	5,59	0,23
NPN (% od skupnega N)	12,11	12,25	11,84	12,19	12,19	12,16	12,12	1,21

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti.

### Priloga B: Nekateri MS parametri in masni prehodi HCA v MRM načinu.

Okrajšava HCA	masa izvornega kationa [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	masa fragmenta_A MRM* (m/z)	energija v CID MRM* (eV)	masa fragmenta_B MRM** (m/z)	energija fragmentacije v CID MRM** (eV)	čas snemanja masnega spektra posameznega kationa (min)
IQ	199,25	184,04	30	157,09	35	8,5 – 12,0
IQx	200,15	185,08	30	131,00	35	10,5 – 14,0
MeIQ	213,26	198,13	25	197,81	35	
MeIQx	214,17	130,90	40	199,17	25	13,0 – 17,0
DiMeIQx	228,25	212,00	35	213,00	25	16,5 – 20,0
norharman	169,14	114,80	35	142,00	25	
harman	183,15	114,75	35	88,00	60	19,0 – 22,0
TriMeIQx	242,27	227,17	25	226,13	35	
PhIP	225,20	210,08	33	183,00	35	20,0 – 24,0

M – molska masa v g/mol, MRM\* – način detekcije za kvantifikacijo, MRM\*\* – način detekcije za identifikacijo.

**Priloga C: Ponovljivost določanja vsebnosti HCA znotraj paralelke naključnega vzorca.**

HCA (ng/g)	injiciranje						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV ( % )
PhIP	0,22	0,22	0,21	0,23	0,22	0,21	0,22	2,42
MeIQx	0,34	0,34	0,33	0,33	0,35	0,34	0,34	2,17
DiMeIQx	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	3,16
harman	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	2,80
norharman	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	2,62

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti

**Priloga D: Ponovljivost določanja vsebnosti HCA med paralelkami naključnega vzorca.**

HCA (ng/g)	paralelka						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV ( % )
PhIP	1,47	1,69	1,65	1,55	1,55	1,52	1,57	5,42
MeIQx	4,07	4,29	4,20	4,38	3,99	3,95	4,15	4,08
DiMeIQx	1,48	1,66	1,67	1,69	1,71	1,59	1,64	5,11
harman	0,12	0,12	0,13	0,13	0,12	0,12	0,13	3,52
norharman	0,76	0,85	0,76	0,77	0,80	0,76	0,78	4,64

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti

**Priloga E: Validacijski parametri določanja vsebnosti HCA.**

HCA	IOD (pg)	LOQ (pg/g)	UM SD IS	$r^2$
IQ	9,01	–	$y = 0,9279x$	0,9994
IQx	6,57	–	$y = 0,5224x$	0,9991
MeIQ	6,78	–	$y = 0,8128x$	0,9995
MeIQx	8,92	56,9	$y = 1,4325x$	0,9997
DiMeIQx	0,86	5,3	$y = 1,3722x$	0,9997
TriMeIQx	–	–	–	–
PhIP	0,22	25,5	$y = 1,6255x$	0,9998
norharman	0,76	10,7	$y = 3,3773x$	0,9999
harman	0,68	42,2	$y = 4,3625x$	0,9999

IOD – instrumentalno območje detekcije, LOQ – meja kvantifikacije, UM SD IS – umeritvena krivulja s standardnim dodatkom in internim standardom,  $r^2$  – koeficient determinacije za UM SD IS.