

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tomaž CIMERMAN

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA RASTLINSKIH
EKSTRAKTOV ZA MARINADE Z NAMENOM
ZNIŽANJA VSEBNOSTI HETEROCIKLIČNIH
AMINOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tomaž CIMERMAN

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV ZA
MARINADE Z NAMENOM ZNIŽANJA VSEBNOSTI
HETEROCIKLIČNIH AMINOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

**OPTIMIZATION OF PLANT EXTRACTS FORMATION FOR
MARINADE IN ORDER TO REDUCE LEVEL OF HETEROCYCLIC
AMINES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Tehnology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Praktični del je bil opravljen na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Tomaža Polaka, za somentorico prof. dr. Leo Demšar in za recenzentko izr. prof. dr. Leo Pogačnik.

Mentor: doc. dr. Tomaž Polak

Somentorica: prof. dr. Lea Demšar

Recenzentka: izr. prof. dr. Lea Pogačnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Tomaž Cimerman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 637.5:636.4:547.554:547.56(043)=163.6
- KG meso / svinjsko meso / mesni izdelki / emulzije / toplotna obdelava / rastlinski ekstrakti/ ekstrakt brina / ekstrakt hmelja / fenolne spojine / heterociklični aromatski amini
- AV CIMERMAN, Tomaž dipl. inž. živ. in preh. (UN)
- SA POLAK, Tomaž (mentor)/DEMŠAR, Lea (somentorica)/POGAČNIK, Lea (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2016
- IN OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV ZA MARINADE Z NAMENOM ZNIŽANJA VSEBNOSTI HETEROCIKLIČNIH AMINOV
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
- OP XII, 58 str., 20 pregl., 8 sl., 70 vir.
- IJ Sl
- JI sl/en
- AI V nalogi smo proučevali tvorbo heterocikličnih aromatskih aminov (HCA) v modelnih mesnih emulzijah, ki smo jim dodali biološko aktivne učinkovine ekstraktov brinovih jagod in hmelja, pridobljene z različnimi ekstrakcijskimi topili (70 % etanol, metanol, etilacetat in voda) in vezane na različne nosilce (kuhinjska sol, rafinirano sončnično olje ali koruzni škrob). V koaguliranih modelnih emulzijah z dodanimi rastlinskimi ekstrakti in brez njih smo po pečenju njihovih 1-cm rezin na dvoploščnem žaru pri temperaturi plošč 240 °C do središčne temperature 80 °C določili vsebnost posameznih in skupnih HCA (LC/MS), v istih koagulatih pa smo pred pečenjem določili še vsebnost skupnih fenolov (z metodo Folin-Ciocalteu) in senzorično z metodo kvantitativne deskriptivne analize ocenili sprejemljivost vonja in arome. Osnovno hipotezo, da bo dodatek ekstraktov brinovih jagod in hmelja zmanjšal tvorbo HCA, nismo potrdili. Nasprotno, dodane učinkovine v mesnih emulzijah so po pečenju povečale vsebnost skupnih in posameznih HCA v primerjavi s kontrolnimi vzorci brez dodanih ekstraktov. Če ekstrakte brinovih jagod in hmelja dodamo zaradi povečanja antioksidativne kapacitete mesne emulzije, se priporoča dodatek metanolnih, etanolnih in etilacetatnih ekstraktov brinovih jagod, vezanih na škrob, etanolnih ekstraktov brinovih jagod in hmelja, vezanih na sol, in etilacetatne ekstrakte hmelja, vezane na škrob. Te kombinacije rastlinskih materialov, topil učinkovin in nosilcev ekstraktov relativno najugodnejše zmanjšajo tvorbo HCA in hkrati zagotavljajo sprejemljivo senzorično kakovost mesnih emulzij iz prašičjega mesa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 637.5:636.4:547.554:547.56(043)=163.6
- CX meat / pork meat / meat products / emulsions / heat treatment / plant extracts / juniper extract / extract of hops / phenolic compounds / heterocyclic aromatic amines
- AU CIMERMAN, Tomaž
- AA POLAK, Tomaž (supervisor)/DEMŠAR, Lea (co-advisor)/ POGAČNIK, Lea (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2016
- TY OPTIMIZATION OF PLANT EXTRACTS FORMATION FOR MARINADE IN ORDER TO REDUCE LEVEL OF HETEROCYCLIC AMINES
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
- NO XII, 58 p., 20 tab., 8 fig., 70 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of this study was to examine the formation of heterocyclic aromatic amines (HCA) in model meat emulsions where biologically active substances originated from juniper berries and hop extracts obtained with different extraction solvents (70 % ethanol, methanol, ethyl acetate and water) and linked to various media (kitchen salt, refined sunflower oil, or corn) were added. The content of the individual and total HCA (LC/MS) as well as the content of total phenol compounds (Folin-Ciocalteu method) after roasting on two-plated grill (plates temperature of 240 °C, core temperature of 80 °C) was determined in 1-cm slices of coagulated model emulsions (with and without added plant extracts). The quantitative sensory descriptive analysis was also performed to assess the acceptability of smell and taste of the samples before roasting. The basic hypothesis that the addition of juniper berries and hop extracts reduce the formation of HCA was not confirmed. On the contrary, the added substances in the meat emulsions increased the amount of individual and total HCA compared to control samples (without the addition of the extracts). If juniper berries and hop extracts are added with the intention of increasing the antioxidant capacity of the meat emulsion, addition of methanol, ethanol and ethyl acetate extracts of juniper berries, bound on the starch, ethanolic extracts of juniper berries and hops bound to salt, and ethyl acetate extracts of hops bound to the starch were recommended. These combinations of plant materials, extraction solvents and carriers of plant extracts, relatively favourable reduced HCA formation, and at the same time provided acceptable sensory quality of pork emulsions.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANTIOKSIDANTI V MESU IN MESNIH IZDELKIH.....	3
2.2 SINTETIČNI ANTIOKSIDANTI.....	3
2.3 NARAVNI ANTIOKSIDANTI	3
2.3.1 Brin.....	4
2.3.2 Hmelj.....	5
2.4 PRAŠIČJE MESO	7
2.4.1 Sestava prašičjega mesa	7
2.5 PREKURZORJI HCA V PRAŠIČJEM MESU	9
2.6 HETEROCIKLIČNI AMINI.....	10
2.7 TVORBA HCA MED TOPLOTNO OBDELAVO MESA	12
2.7.1 Tvorb HCA v izdelkih iz prašičjega mesa	12
2.7.2 Nepolarni HCA	13
2.7.3 Polarni HCA.....	13
2.7.4 Dejavniki tvorbe HCA.....	13
2.7.4.1 Temperatura, čas in način toplotne obdelave	13
2.7.4.2 Recepti	13
2.7.4.3 Maščoba.....	14
2.7.4.4 Ostali dejavniki, ki vplivajo na tvorbo HCA	14
2.8 ZMANJŠANJE TVORBE HCA MED TOPLOTNO OBDELAVO	14
2.9 VPLIV MARINIRANJA NA TVORBO HCA	15
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 MATERIAL IN POTEK DELA.....	19

3.2	METODE DELA.....	22
3.2.1	Osnovna kemijska sestava mesnih emulzij.....	22
3.2.2	Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu	23
3.2.2.1	Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin	23
3.2.2.2	Izvedba.....	23
3.2.3	Določanje vsebnosti HCA.....	24
3.2.3.1	Priprava vzorca in izvedba metode.....	24
3.2.3.2	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije.....	24
3.2.4	Izvedba senzorične analize.....	26
3.2.5	Statistična analiza podatkov	27
4	REZULTATI.....	28
4.1	OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MESNIH EMULZIJ	28
4.2	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	28
4.2.1	Vpliv različnih ekstrakcijskih topil na vsebnost skupnih fenolnih spojin v koagulatih mesnih emulzij.....	29
4.2.2	Vpliv nosilca ekstraktov na vsebnost skupnih fenolnih spojin v koagulatih mesnih emulzij	30
4.2.3	Interakcija med vrsto ekstrakta, ekstrakcijskim topilom in nosilcem ekstrakta	31
4.3	VSEBNOST HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV	32
4.3.1	Vpliv različnih ekstrakcijskih topil na vsebnost posameznih in skupnih HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij	35
4.3.2	Vpliv nosilca ekstraktov na vsebnost posameznih in skupnih HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij	36
4.3.3	Interakcija med vrsto ekstrakta, ekstrakcijskim topilom in nosilcem	37
4.4	SENZORIČNA ANALIZA	38
4.4.1	Vpliv različnih ekstrakcijskih topil na tuje vonje in arome v koagulatih mesnih emulzij	40
4.4.2	Vpliv dodatka nosilca ekstrakta na tuje vonje in arome v koagulatih mesnih emulzij	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	42
5.1	RAZPRAVA.....	42
5.1.1	Vsebnost skupnih fenolnih snovi.....	42
5.1.2	Vsebnost HCA.....	43
5.1.2.1	Vpliv ekstraktov, ekstrahiranih z različnimi topili, na tvorbo HCA.....	45

5.1.2.2	Vpliv nosilcev na tvorbo HCA	46
5.1.3	Senzorična analiza	46
5.1.4	Zaključne ugotovitve	47
5.2	SKLEPI.....	49
6	POVZETEK.....	51
7	VIRI	53
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Identificirane fenolne spojine v ekstraktu (Miceli in sod., 2011).....	5
Preglednica 2: Vsebnost hranilnih snovi, nekaterih vitaminov in mineralov v 100 g presnega prašičjega pustega mesa in slanine (Greenfield in sod., 2009).....	8
Preglednica 3: Vsebnost intramuskularne maščobe in maščobnokislinska sestava zrezkov prašičjega mesa (Wood in sod., 2004)	9
Preglednica 4: Kratice in imena HCA (Murkovic, 2004).....	11
Preglednica 5: Uporabljeni aditivi za zmanjšanje/inhibicije tvorbe HCA (Meurillon in Engel, 2016).....	16
Preglednica 6: Uporabljen rastlinski material za ekstrakte, ekstrakcijska topila, nosilci in obstojnost/dodatek ekstrakta	21
Preglednica 7: Podatki za pripravo vzorcev za določanje skupnih fenolov	24
Preglednica 8: Gradienti mobilne faze pri določanju HCA.....	25
Preglednica 9: Masni detektor: Micromass Quattro Micro; Waters.....	25
Preglednica 10: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR-načinu	26
Preglednica 11: Rezultati osnovne kemijske analize mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	28
Preglednica 12: Rezultati vsebnosti skupnih fenolnih spojin, izraženi v mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom, v različnih koagulatih mesnih emulzij.....	29
Preglednica 13: Vpliv ekstraktov, topil in nosilcev na vsebnost (LSM) skupnih fenolnih spojin, izražene v mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom, v koagulatih mesnih emulzij	30
Preglednica 14: Zbirna preglednica, ki prikazuje interakcijo med vrsto ekstrakta, topilom in nosilcem, povezano z ohranjanjem fenolnih spojin v koagulatih mesnih emulzij	31
Preglednica 15: Vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v kontrolnih koagulatih mesnih emulzij.....	32
Preglednica 16: Vpliv dodatka ekstrakta brina in hmelja, ekstrahirana z različnimi topili, ter nosilca ekstrakta na vsebnost (LSM) HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih mesnih emulzijah	33
Preglednica 17: Zbirna preglednica, ki prikazuje povezavo med vrsto ekstrakta, topilom in nosilcem, povezano z zmanjševanjem tvorbe HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij	38
Preglednica 18: Vpliv dodatka ekstrakta brina in hmelja, ekstrahirana z različnimi topili, ter nosilcev ekstrakta na aromo (LSM) toplotno obdelanih mesnih emulzij	39

Preglednica 19: Zbirna preglednica, ki prikazuje interakcijo med vrsto ekstrakta, topilom in nosilcem, povezano z oceno* tujih vonjev in arom v koagulatih mesnih emulzij	41
Preglednica 20: Izbira najprimernejšega ekstrakta, na podlagi rezultatov našega poskusa.....	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Ekstrakt brinovih jagod, vezan na sol	20
Slika 2: Ekstrakt hmelja, vezan na škrob.....	20
Slika 3: Vzorci mesnih emulzij senzoričnega ocenjevanja	27
Slika 4: Primerjava vsebnosti skupnih fenolnih snovi hmeljevih in brinovih ekstraktov, vezanih na škrob in sol.....	43
Slika 5: Povprečne vsebnosti posameznih in skupnih HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v pečenih mesnih emulzijah.....	44
Slika 6: Primerjava vpliva ekstraktov brina in hmelja za znižanje posameznih HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah ne glede na vrsto topila in nosilca.	45
Slika 7: Vpliv nosilcev na znižanje vsebnosti posameznih HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah ne glede na vrsto ekstrakta in ekstrakcijskega topila.....	46
Slika 8: Primerjava intenzivnosti izraženih tujih vonjev in arom v mesni emulziji.....	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A α C	2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol
BaP	benzo[a]piren
BHA	butilhidroksianizol
BHT	butilhidroksitoluen
BK	brez kosti
DHA	dokozaheksaenojska kislina (angl. docosahexaenoic acid)
DMIP	2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5-b]piridin
EPA	eikozapentaenojska kislina (angl. eicosapentaenoic acid)
EtAc	etilacetat
EtOH	etanol
F	flour
FC	Folin-Ciocalteu
GAEN	vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena v mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom
Glu-P-1	2-amino-6-metil-dipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-amino-dipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
HCA	heterociklični amini
I	jod
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin
IQx	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
K	kalij
LC-MS	tekočinska kromatografija/masna spektrometrija (angl. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
MeA α C	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol
MeOH	metanol
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
NIR	bližnja infrardeča svetloba (angl. Near-Infrared Spectroscopy)
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki (angl. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
PF	polarna faza
PG	propil galat
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
PUFA	večkrat nenasičene maščobne kisline (angl. Polyunsaturated Fatty Acids)
Se	selen
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (angl. Solid-Phase Extraction)
TBHQ	tert-hidrokinon
TMIP	2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5-b]piridin

Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol
TO	toplotna obdelava
UV	ultravijolično valovanje
Zn	cink
4'-OH-PhIP	2-amino-6-(4-hidroksifenil)imidazo[4,5-b]piridin
4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
4-CH ₂ OH-MeIQx	4-hidroksimetil-2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
7,8-DiMeIQx	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
7,9-DiMeIQx	2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-g]kinoksalin

1 UVOD

Čeprav meso opredeljujemo kot beljakovinsko živilo, ker vsebuje med 20 % in 35 % beljakovin, ki zagotavljajo vse esencialne aminokisljine (lizin, treonin, metionin, fenilalanin, triptofan, levcin, izolevcin in valin), je glede na svojo sestavo tudi pomemben vir drugih hranilnih snovi, kot so esencialne omega-3 maščobne kisline ter biološko visokovredni vitamini (B6, B12 in D) in minerali (železo, cink in selen). V uravnoteženi prehrani človeka so vse te komponente zaželeni, se zlahka absorbirajo v telo in so obenem nujno potrebne (Ferguson, 2010).

Meso je zaradi sestave in vrednosti pH hitro pokvarljivo živilo. Zato za podaljšanje uporabnosti uporabljamo različne tehnike konzerviranja mesa in mesnih izdelkov, predvsem za preprečevanje širjenja okužb s hrano (Farhadian in sod., 2010). Dejstvo je, da presnega mesa ne pojemo veliko, večinoma se toplotno obdela, saj se s tem poveča njegova prebavljivost in oblikujejo se atraktivne senzorične lastnosti. Hkrati pa se med klasičnimi postopki toplotne obdelave mesa tvorijo določene komponente, ki jih raziskovalci povezujejo s tveganjem za nastanek raka.

V številnih epidemioloških raziskavah so ugotovili, da pri visokih temperaturah obdelave mesa in rib nastanejo komponente, kot so heterociklični amini (HCA), poliaromatski ogljikovodiki (PAH) in *N*-nitrozo spojine, ki izkazujejo potencialno karcinogenost za laboratorijske živali in človeka (Farhadian in sod., 2012; Gevaart-Durkin in de Peyster, 2014).

Vendar pa so rezultati študij povezav med pojavnostjo raka in pogostostjo uživanja mesa, toplotno obdelanega pri visokih temperaturah, pogosto nasprotujoči. Razlog je najbrž v celi množici dejavnikov, ki vplivajo na vrsto in količino nastalih HCA med toplotno obdelavo, to pa so vrsta mesa in vrsta mišice ter fizikalni parametri – čas in temperatura toplotne obdelave, središčna temperatura ob koncu pečenja, način toplotne obdelave, predvsem pa vsebnost prekurzorjev HCA, ter dodatek aditivov in različnih začimb oziroma marinad, ki so lahko vir prekurzorjev ali pa delujejo kot inhibitorji tvorbe kancerogenih komponent (Sinha in Rothman, 1999; Grasso in sod., 2014). Vznemirja najnovejša epidemiološka študija (Jinap in sod., 2015), v kateri dokazujejo, da dolgoročno uživanje ocvrtega, do popolne stopnje pečenosti pripravljenega ali na žaru pečenega mesa, poveča tveganje za nastanek raka na črevesju, mehurju, prostati, dojkah in trebušni slinavki.

Mednarodna agencija za raziskave raka IARC smatra nekatere HCA kot potencialne karcinogene (MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, razred 2B) in enega kot verjetnega povzročitelja rakavih obolenj (IQ, razred 2A) (IARC, 2016).

Z namenom zmanjšanja tvorbe HCA v mesu so bili opravljeni že številni poskusi modifikacij in optimizacije postopkov toplotne obdelave ter uporabe raznih dodatkov, ki zavirajo tvorbo HCA. Eden od načinov zmanjšanja tvorbe HCA v toplotno obdelanem mesu je tudi ta, da mesu pred toplotno obdelavo dodamo začimbe v obliki ekstraktov, kot so brinove jagode, rožmarin, skorja črnega bora in hmelj. Janžekovič (2015) namreč ugotavlja, da polifenolne spojine hmelja, med njimi tudi ksantohumol, kažejo veliko antioksidativno aktivnost in so zato primerni za zmanjšanje tvorbe HCA v govejih sekljancih. Po ugotovitvah Knezove (2013) je tvorba HCA v pečenih piščančjih sekljancih brez dodanih ekstraktov 57,67 ng HCA/g. Njihov nastanek zmanjšuje dodatek ekstrakta brinovitih jagod (19,35-33,95 ng/g), sledi dodatek rožmarina (28,83-37,36 ng/g) in najmanj ekstrakt skorje črnega bora (39,62-56,67 ng/g).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil zmanjšati tvorbo HCA v modelnih mesnih emulzijah, kar smo poskušali storiti z dodatkom biološko aktivnih učinkovin ekstraktov brinovitih jagod in hmelja. Ugotoviti smo želeli tudi, kako vrsta nosilca, t.j. kuhinjska sol, rafinirano sončnično olje in koruzni škrob, na katerega smo vezali etanolne, metanolne, etilacetatne in vodne ekstrakte, vpliva na tvorbo HCA in ali so kombinacije nosilec/ekstrakt sprejemljive tudi s senzoričnega vidika.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bodo ekstrakcijska topila (70 % etanol, metanol, etilacetat in voda) različno ekstrahirala biološko aktivne učinkovine brinovitih jagod in hmelja ter s tem različno vplivala na tvorbo HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah iz prašičjega mesa.

Predpostavili smo, da bo dodatek ekstraktov brinovitih jagod in hmelja, vezanih na različne nosilce (kuhinjska sol, rafinirano sončnično olje ali koruzni škrob), prav tako različno vplival na tvorbo HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah iz prašičjega mesa.

Predpostavili smo, da bomo določili kombinacijo ekstrakta in nosilca, ki bo uspešno zmanjšala tvorbo HCA, hkrati pa zagotovila sprejemljivo senzorično kakovost mesnih emulzij iz prašičjega mesa.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIOKSIDANTI V MESU IN MESNIH IZDELKIH

Antioksidanti so snovi, ki že v majhnih koncentracijah zavirajo oksidacijo hitro oksidirajočih biomolekul, kot so lipidi in beljakovine, s čimer se podaljša rok trajanja izdelkov in zaščiti izdelek pred oksidativnim kvarom. Uporaba antioksidantov v živilih je nadzorovana z zakonodajo in mednarodnimi standardi. Kljub velikemu številu spojin, ki imajo antioksidativne lastnosti, se jih uporablja veliko manj. V Evropski uniji je uporaba antioksidantov regulirana z Uredbo (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o aditivih za živila in Uredbo o izvajanju uredbe (ES) o aditivih za živila (2011). Druga organizacija, ki ureja uporabo antioksidantov, je Codex Alimentarius, zbirka mednarodno sprejetih standardov (Karre in sod., 2013).

Sintetični in naravni antioksidanti se uspešno uporabljajo za blokiranje oz. zmanjšanje procesov oksidacije v mesu. Zaradi varnosti in negativnih učinkov sintetičnih antioksidantov pa se povečuje uporaba naravnih (Sánchez-Muniz in sod., 2012; Shah in sod., 2014). Mnogi raziskovalci navajajo, da je oksidacijo maščob v mesnih izdelkih mogoče enako uspešno nadzorovati ali zmanjšati z uporabo tako komercialnih sintetičnih kot tudi naravnih antioksidantov. V industriji mesa se zato v namen zmanjševanja oksidacije lipidov in mikrobne rasti sintetični antioksidanti zamenjujejo z naravnimi. Posledično se je v zadnjih letih povečalo število študij o učinkovitosti naravnih aditivov (Karakaya in sod., 2011).

2.2 SINTETIČNI ANTIOKSIDANTI

Butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), tert-hidrokinon (TBHQ) in propil galat (PG), sintetični antioksidanti, ki so se uporabljali v mesnih izdelkih, so bili umaknjeni zaradi ocenjene morebitne toksičnosti (Karre in sod., 2013).

2.3 NARAVNI ANTIOKSIDANTI

Začimbe in zelišča so dragoceni vir različnih fitokemikalij. Te predstavljajo veliko skupino bioaktivnih snovi, pridobljenih iz rastlin, ki imajo potencialne zaščitne učinke proti boleznim. Med bioaktivne snovi spadajo flavonoidi in druge fenolne spojine, karotenoidi, rastlinski steroli, glukozinolati in druge žveplo vsebujoče spojine. Obstaja več kot 6000 znanih flavonoidov. Fenolne spojine imajo v rastlinah več funkcij, strukturne in obrambne, služijo pa tudi kot vabe za žuželke opravevalke. Rastline jih proizvajajo tudi zaradi zaščite pred UV-svetlobo, torej rastlinam omogočajo preživetje in prilagoditev okolju. Številne

študije so pokazale, da začimbe in zelišča, kot so rožmarin, žajbelj in origano, zaradi velike vsebnosti fenolnih spojin delujejo kot močni antioksidanti (Embuscado, 2015).

Kot naravni antioksidanti za izboljšanje in ohranjanje kakovosti mesa in mesnih izdelkov se uporabljajo rastline oziroma njihovi ekstrakti ali izvlečki. Tako se uporabljajo izvlečki iz sadja (grozdje, granatno jabolko), zelenjave (brokoli, buče), zelišč in začimb (čaji, rožmarin, origano, cimet, žajbelj, timijan). Omenjeni rastlinski izvlečki se pripravijo z različnimi topili po različnih metodah. Vsekakor pa so bogati s fenolnimi spojinami in so dobra alternativa sintetičnim antioksidantom (Shah in sod., 2014).

V znanstvenih raziskavah, v katerih določajo antioksidativno aktivnost začimb in zelišč ter drugih rastlinskih materialov, vsebnosti skupnih fenolov zelo variirajo. Razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin iz istih začimb ali zelišč so posledica uporabe različnih topil, ki se uporabljajo za pridobivanje ekstraktov, pa tudi zaradi naravnih variacij v antioksidativni učinkovitosti materiala. Te naravne variacije so običajno posledica sorte začimb ali zelišč, območja rasti, gnojenja, vremena in drugih podobnih dejavnikov. Na podlagi rezultatov raziskave Pandeyja in sod. (2014) ni presenetljivo, da so na tržišču v veliki meri dostopni komercialni naravni antioksidanti, pridobljeni iz rožmarina, origana in žajblja. Odlikujejo se po relativno visoki antioksidativni aktivnosti, odstranjenih aromatičnih snoveh in ekstrahiranih učinkovinah. Cimet, ki ima največjo antioksidativno aktivnost izmed trinajstih zelišč/záčimb, testiranih v omenjeni raziskavi, pa zaradi svojega intenzivnega okusa in arome, ne more biti uporabljen kot antioksidant v mnogih živilih (Embuscado, 2015).

2.3.1 Brin

Brin je zimzelena trajnica, po navadi gre za grmovnico ali nižje drevo. Znanstveno ime je *Juniperus* iz družine *Cupressaceae* (cipresovke). Predstavlja najbolj razširjeno vrsto olesenelih rastlin zmerno hladnega pasu severne poloble. Eterično olje navadnega brina je aromatična in hlapljiva tekočina semenskih storžev, sicer imenovanih »brinovih jagod«. Uporaba je razširjena tako v tradicionalni kot v farmacevtski industriji, veliko pa se je uporablja tudi v prehrani kot začimba, konzervans za meso in mesnine ali aromatske komponente, npr. v ginu. Verjetno najstarejša uporaba, ki sega že v Antiko, pa je uporaba brinovega lesa za dimljenje mesa in rib (Ložienė in Rimantas, 2016).

Izvlečki brina delujejo antioksidativno, antivirusno, antiseptično, protivnetno in analgetično. Prav tako naj bi delovali antikancerogeno, nevroprotektivno in antidiabetično. Ekstrakti se uporabljajo tudi za zdravljenje nevrostatične nevroze in psoriaze. Kemijska sestava eteričnega olja različnih vrst brina je pritegnila zanimanje zdravnikov, veliko manj pozornosti pa so deležne sekundarne spojine omenjene rastline. Nekatere študije poudarjajo prisotnost fenolnih spojin, flavonoidov in biflavonoidov jagod različnih vrst

brina (Chaouche in sod., 2015). Fenolna sestava drugih delov rastline, predvsem korenin, je namreč še zmeraj v veliki meri nepoznana.

Fenoli, fenolne kisline, flavonoidi, tanini in lignani predstavljajo večino naravnih antioksidantov. Ti delujejo na več načinov (Han in Baik, 2008):

- kot lovilci prostih radikalov zaradi prisotnosti fenolnih skupin;
- kot inhibitorji peroksidacije lipidov;
- kot terminatorji reakcij oksidacije z vezanjem prostih radikalov;
- kot kelatorji kovinskih ionov, ki inducirajo oksidacijo.

Na rodu *Juniperus* je bilo opravljeno veliko fitokemijskih študij. Miceli in sod. (2011) so opravili študijo antioksidativnih lastnosti metanolnega ekstrakta brinovih jagod *Juniperus drupacea* z različnimi *in vitro* sistemi. Ugotovili so, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena kot ekvivalenti galne kisline (GAE), $48,06 \pm 0,99$ mg GAE v g ekstrakta. Fenolne kisline so predstavljale več kot 60 % skupnih fenolnih spojin, od tega je tirozol predstavljal največji delež ($1324 \pm 0,64$ $\mu\text{g/g}$ ekstrakta). V preglednici 1 so prikazani rezultati študije, kjer so identificirane fenolne spojine ekstrakta brinovih jagod, izražene kot μg fenolnih spojin v 1 g ekstrakta, v padajočem vrstnem redu glede na vsebnost v ekstraktu (Miceli in sod., 2011).

Preglednica 1: Identificirane in kvantificirane fenolne spojine v ekstraktu (Miceli in sod., 2011)

Spojina	Vsebnost v ekstraktu ($\mu\text{g/g}$) (srednja vrednost \pm standardni odklon)
tirizol	$1324 \pm 0,64$
protokatehnična kislina	$1097 \pm 0,14$
galna kislina	$1016 \pm 1,66$
amentoflavon	$927 \pm 0,35$
klorogena kislina	$703 \pm 1,68$
7-hidroksikumarin	$433 \pm 3,05$
hipolaetin-7-pentozid	$311 \pm 0,54$
rutin	$208 \pm 2,18$
biflavoni	$194 \pm 4,65$
katehin	$181 \pm 1,70$
metil-biflavon	$114 \pm 0,79$
kupresoflavon	$82 \pm 5,20$

2.3.2 Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je zelnata trajnica, katere ženski cvet imenujemo hmeljevi storžki. Ti se uporabljajo v različnih panogah, od tega je kar 98 % svetovne porabe v pivovarstvu (Fandiño in sod., 2015).

Je dvodomna rastlina, kar pomeni, da obstajajo moške in ženske rastline. Iz korenik spomladi zrastejo tanka stebela s plezalnimi laski od 9 do 18 metrov v višino. Rod *Humulus*, ki spada v družino *Cannabaceae*, je sestavljen iz treh vrst: *Humulus lupulus*, *Humulus japonicus* in *Humulus yunnanensis*. Rastlina je udomačena v srednji Evropi in jo gojijo po vseh zmerno toplih območjih v svetu (Severna in Južna Amerika, Južna Afrika, Avstralija). Vrste hmelja so bile klasificirane v pet taksonomskih enot, ki temeljijo na njihovih morfoloških značilnostih in geografskih lokacijah (Zanoli in Zavatti, 2008).

Hmelj je povezan s kakovostnimi lastnostmi piva, tj. okusom, aromo, peno, barvo in končno stabilnostjo izdelka. Prav tako se uporablja zaradi svojih zdravilnih lastnosti, saj vsebuje veliko število komponent s pozitivnimi učinki na zdravje. Hmelj vsebuje več kot 1000 različnih kemijskih snovi (Masek in sod., 2014), deluje pa tudi kot pomirjevalo, diuretik in antibakterijsko sredstvo. Pozitivno vpliva na živčni sistem, blaži napetost, odpravlja anksioznost, izboljšuje počutje in pripomore k pospeševanju prebave.

Glavne strukturne komponente v zrelih hmeljevih storžkih so terpeni, grenčične kisline in halkoni. Hmelj je bogat tudi s flavonolnimi glikozidi (kaemferol, kvercetin, kvercitrin, rutin) in katehini (katehin galat, epikatehin galat). V eteričnem olju hmelja je bilo identificiranih na stotine terpenoidnih komponent (0,3-1,0 % mase storžka): predvsem β -kariofilena, farnesena, humulenoma in mircena (Zanoli in Zavatti, 2008).

Flavonoidi hmelja so polifenoli, ki vsebujejo skelet 2-fenilkromana. Najpomembnejši flavonoid, antioksidant v hmelju je ksantohumol, ki predstavlja 0,1-1 % suhe snovi hmeljevih storžkov (Masek in sod., 2014).

Hmelj gojijo zaradi njegovih sekundarnih metabolitov, predvsem α - in β -kislin, ki predstavljajo med 5 in 20 % celotne mase hmeljevega storžka. Glavne α -kisline so humulon (35-70 % celotnih α -kislin), kohumulon (20-65 %) in adhumulon (10-15 %); pripadajoče β -kisline so lupuloni (30-55 % vseh β -kislin), kolupuloni in adlupuloni (Zanoli in Zavatti, 2008).

α -kisline so neposredni prekursorji glavnih vzročnih dejavnikov grenkobe piva, prispevajo pa tudi k mikrobnosti stabilnosti, delujejo kot naravni konzervansi in povečajo stabilnost pene. Vsebnost teh kislin je v veliki meri odvisna od kultivarja. β -kisline so manj kisle, njihova vloga pa bakteriostatična. Zaradi njihove netopnosti v matriksu piva so v pivovarski industriji običajno nepomembne, poleg tega pa se lahko oksidirajo v kisline, ki dajejo pivu spremenjen/drugačen okus. Vendar pa prispevajo k aromi piva, zato sorte hmelja z veliko vsebnostjo β -kislin pogosto uporabljajo ob koncu postopka varjenja, tudi zato, ker se β -ekstrakt lahko uporablja tudi kot sredstvo za proizvodnjo grenkih komponent, bodisi s preoblikovanjem β -kislin v sintetične izo- α -kisline ali njihovo oksidacijo v hulupone (Fandiño in sod., 2015).

2.4 PRAŠIČJE MESO

Meso in mesni izdelki so bistvenega pomena za uravnoteženo prehrano, še višjo vrednost in bolj zdrav videz pa pridobijo z dodatkom funkcionalnih sestavin, koristnih za zdravje, ali pa z odstranitvijo komponent, ki veljajo za škodljive (Gadekar in sod., 2014).

Prašičje meso je živilo s splošno znanimi pomembnimi prehranskimi lastnostmi, z visoko biološko vrednostjo beljakovin, vitaminov skupine B, mineralov (predvsem hem železa) in drugih bioaktivnih snovi v sledovih. Vendar prašičje meso prispeva tudi k vnosu maščob, nasičenih maščobnih kislin, holesterola in drugih snovi, ki lahko v neustreznih količinah privedejo do negativnih fizioloških učinkov. Obstajajo pomembni dejavniki, ki vplivajo na vsebnost omenjenih komponent v mesu, kot so genetika, starost živali in celo vrsta mišice, kar pomembno vpliva na vsebnost maščob in hemskega železa. Maščobnokislinska sestava trigliceridov je odvisna od količine žita v krmi. Prav tako je vsebnost drugih hranilnih snovi, kot sta vitamin A in E, odvisna od vrste krme. Količine nekaterih bioaktivnih snovi, kot so koencim Q10, taurin, glutamin, kreatin, kreatinin, karnozin in anzerin kažejo veliko odvisnost od vrste mišic (Reig in sod., 2013).

2.4.1 Sestava prašičjega mesa

Prašiči so monogastrične živali in veliko prehranskih komponent se zato hitro spremeni iz krme v mišičnino in maščobna tkiva ter na ta način vpliva na kakovost mesa. To najbolj velja za maščobne kisline, vitamine in minerale (Rosenvold in Andersen, 2002).

Greenfield in sod. (2009) so v obsežni študiji o sestavi in hranilni vrednosti avstralskega prašičjega mesa ugotavljali, ali so nove pasme, način hranjenja in nove metode v prirreji povzročile spremembe v sestavi mesa na trgu v primerjavi s preteklimi raziskavami. V preglednici 2 so predstavljene hranilne vrednosti presnega pustega mesa (ledveni del) in slanine.

Preglednica 2: Vsebnost hranilnih snovi, nekaterih vitaminov in mineralov v 100 g presnega prašičjega pustega mesa in slanina (Greenfield in sod., 2009)

Analit	Presno pustno meso	Presna slanina
voda (g)	74,1 ± 0,7	23,8 ± 4,9
maščoba (g)	1,75 ± 0,21	69,2 ± 4,6
proteini (g)	23,2 ± 0,8	7,9 ± 1,6
pepel (g)	1,22 ± 0,04	0,36 ± 0,07
celokupni dušik (g)	3,71 ± 0,12	1,25 ± 0,25
energijska vrednost (kJ)	459 ± 12	2693 ± 153
α-karoten (μg)	< 5 (a)	(b)
β-karoten (μg)	< 5	(b)
retinol (μg)	< 2,5	18 ± 4
vitamin E (mg)	0,06 ± 0,03	0,34 ± 0,13
tiamin (mg)	0,76 ± 0,18	0,17 ± 0,06
riboflavin (mg)	0,143 ± 0,032	0,107 ± 0,043
niacin (mg)	6,83 ± 1,75	1,60 ± 0,85
vitamin B ₆ (mg)	0,34 ± 0,06	0,06
pantotenska kislina (mg)	0,79 ± 0,17	0,34 ± 0,19
vitamin B ₁₂ (μg)	0,20 ± 0,05	1,06 ± 0,18
folati (μg)	42 ± 34	14 ± 12
Se (μg)	27,4 ± 5,7	6,0 ± 1,4
Zn (mg)	1,28 ± 0,07	0,37 ± 0,10
Na (mg)	52,4 ± 2,0	24,4 ± 1,5
K (mg)	426 ± 31	104 ± 21
Mg (mg)	25,8 ± 1,0	6,0 ± 1,3
Mn (μg)	7,6 ± 1,3	4,3 ± 0,7
Fe (mg)	0,46 ± 0,07	0,29 ± 0,07
Cu (μg)	48,2 ± 5,6	31,8 ± 5,6
Ca (mg)	10,6 ± 1,3	15,0 ± 6,3
I (μg)	0,74 ± 0,05	0,71 ± 0,06
F (mg)	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,03

Legenda: a – vrednosti pod mejo detekcije; b – ni podatkov

V preglednici 3 so prikazane vsebnosti intramuskularne maščobe in maščobnokislinska sestava zrezkov ledvenega dela prašičjega mesa, kupljenega v štirih različnih supermarketih.

Preglednica 3: Vsebnost intramuskularne maščobe in maščobnokislinska sestava zrezkov prašičjega mesa (Wood in sod., 2004)

Vzorec	Parameter	Vrednost
cel zrezek	maščoba (g/100 g)	21,1
mišica	maščobne kisline (ut. % od skupnih maščobnih kislin)	
	C16:0 palmitinska kislina	23,2
	C18:0 stearinska kislina	12,2
	C18:1 n-9 oleinska kislina	32,8
	C18:2 n-6 linolenska kislina	14,2
	C18:3 n-3 α -linolenska kislina	0,95
	C20:4 n-6 arahidonska kislina	2,21
	C20:5 n-3 EPA	0,31
	C22:6 n-3 DHA	0,39
	skupne maščobne kisline (ut. % od mase mišice)	2,2
	P/S	0,58
	n-6/n-3	7,22
slanina	maščobne kisline (ut. % od skupnih maščobnih kislin)	
	C16:0 palmitinska kislina	23,9
	C18:0 stearinska kislina	12,8
	C18:1 n-9 oleinska kislina	35,8
	C18:2 n-6 linolenska kislina	14,3
	C18:3 n-3 α -linolenska kislina	1,43
	C20-C22 n-3 PUFA (ut. % od mase maščobnega tkiva)	0,36

2.5 PREKURZORJI HCA V PRAŠIČJEM MESU

HCA nastajajo z Maillardovo reakcijo, ki kot prekurzorje vključuje proste aminokisline, kreatinin in reducirajoče sladkorje (glukozo in fruktozo, in sicer neposredno ali preko hidrolize saharoze) (Hasnol in sod., 2014).

Jägerstad in sod. (1991) so ugotovili, da dodatek sladkorja in kreatina oz. kreatinina v mleto govedino poveča mutagenost sekljanine po toplotni obdelavi in da so prekurzorji HCA v mesu sladkorji, aminokisline, kreatin oz. kreatinin (Kikugawa, 2004).

Najpomembnejši prekurzor je sladkor. Ko raven sladkorja preseže raven kreatina, le-ta inhibira tvorbo HCA. Skog in Jägerstad (1990) sta preučevala različne monosaharide in disaharide in ugotovila potrdila, da se je tvorba HCA povečala v primeru, ko je bila koncentracija sladkorja manjša od koncentracije kreatina, ter se je učinkovito zmanjšala, ko je koncentracija sladkorja preseгла koncentracijo kreatina. Rezultati so lahko povezani s

produkti Maillardove reakcije, kot je 5-hidroksimetil-furfural, ko je sladkor v presežku, hkrati pa inhibira tvorbo HCA, tako da reagira s kreatininom. Hasnol in sod. (2014) so preučevali različne vrste sladkorjev in ugotovili, da je bil med, bogat z glukozo in fruktozo, najučinkovitejši inhibitor tvorbe HCA (Meurillon in Engel, 2016).

Kreatin ali kreatinin je potreben prekursor za tvorbo več HCA, kot so v preteklosti poročali Felton in Knize (1991), Jägerstad in sod. (1991) ali Skog (1993) v več modelnih eksperimentih in eksperimentih s cvrtjem. Za kreatinin je bilo ugotovljeno, da ima le majhen vpliv na povečanje tvorbe HCA, če ga dodamo soku prašičjega mesa in izpostavimo rektifikaciji za 12 ur (Skog in sod., 1998).

Aminokislina lahko deluje kot prekursorji spojin IQ (aminoimidazo-azaareni), tako da služijo kot vir dušika pri oblikovanju pirazinov, tudi izkoristek in vrsta nastalih spojin je odvisna od vrste aminokislin (Skog in sod., 1998).

2.6 HETEROCIKLIČNI AMINI (HCA)

HCA so spojine, ki nastajajo med toplotno obdelavo mesa in rib, prisotne so tudi v kondenzatu tobačnega dima in v izpušnem plinu vozil. Koncentracija HCA v toplotno obdelanem mesu je odvisna od vrste mesa, temperature, trajanja in načina toplotne obdelave (Turesky, 2007; Nauwelaers in sod., 2011).

HCA so odkrili Sugimura in sod. leta 1977. Kasneje so raziskovalci ugotovili, da heterociklični amini v povezavi z uživanjem mesa pri ljudeh in živalih povzročajo raka, kot so tumorji debelega črevesja, prostate, pljuč, kože, dojk, jeter in prebavil. Rohrmann in sod. (2009) so ugotovili, da se je tveganje za nastanek raka na debelem črevesju povečalo, če je uživanje HCA presežilo 41,4 ng na dan.

Študije o vsebnosti HCA v toplotno obdelanih mesnih izdelkih so ustvarile nasprotujoče podatke. Rezultate študij je težko primerjati zaradi uporabe različnih živil, postopkov toplotne obdelave (način, stopnja pečenosti, uporaba olja ali masti, pogostost obračanja) in priprave oz. predpriprave (Puangsombat in sod., 2012).

Do sedaj so izolirali in karakterizirali iz različnih toplotno obdelanih vzorcev že več kot 20 različnih vrst HCA. Glede na njihovo kemijsko strukturo jih lahko razdelimo v dve glavni skupini:

- tip IQ (aminoimidazo-azaareni/polarni),
- tip ne-IQ (karbonili/nepolarni) (Busquets in sod., 2004).

HCA tipa IQ nastajajo med Maillardovo reakcijo ob segrevanju mešanice kreati(ni)na, aminokislin in sladkorjev. HCA tipa ne-IQ večinoma nastanejo med pirolizo proteinov in aminokislin pri višjih temperaturah kot HCA tipa IQ. Raznolikost in količina HCA je poleg že naštetih dejavnikov odvisna od prekurzorjev HCA in spojin, ki pospešijo oz. inhibirajo tvorbo nevarnih komponent, pri čemer je kritičen parameter temperatura (Busquets in sod., 2004).

Kemijsko HCA sestavljajo heterociklični obroči in spojine, ki vsebujejo dušik, imenovane amini (Rahman in sod., 2014). V preglednici 4 so predstavljeni heterociklični amini, imena sicer niso v skladu z najnovejšo nomenklaturu po IUPAC-u, vendar dajejo pojasnila mednarodno uporabljenih kratic (Murkovic, 2004).

Preglednica 4: Kratice in imena HCA (Murkovic, 2004)

Kratice HCA	Ime HCA
kinolini (polarni)	
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin
kinoksalini (polarni)	
IQx	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
7,8-DiMeIQx	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
4-CH ₂ OH-MeIQx	4-hidroksimetil-2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
7,9-DiMeIQx	2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-g]kinoksalin
piridini (nepolarni)	
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
4'-OH-PhIP	2-amino-6-(4-hidroksifenil)imidazo[4,5-b]piridin
DMIP	2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5-b]piridin
TMIP	2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5-b]piridin
IFP	2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]piridin
piridoimidazoli in idoli (nepolarni)	
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol
AαC	2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol
MeAαC	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol
Glu-P-1	2-amino-6-metil-dipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-amino-dipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol

2.7 TVORBA HCA MED TOPLOTNO OBDELAVO MESA

Od odkritja ognja človek toplotno obdeluje živila, da jedem izboljša okus in zmanjša bakteriološko tveganje. Na žalost pa se med kuhanjem oz. toplotno obdelavo med drugim tvorijo tudi toksične snovi, ki predstavljajo morebitno tveganje za zdravje ljudi. Veliko nevrotoksinov vsebujejo kategorije živil, bogate z ogljikovimi hidrati (akrilamid in hidroksimetil-furfurala), mesni in ribji izdelki (heterociklični aromatski amini, *N*-nitrozamini in poliaromatski ogljikovodiki) in olja (monokloropropan-dioli in derivati). Mesni in ribji izdelki kažejo na to, da proizvajajo najpomembnejšo »paletu« s toplotno obdelavo pogojenih toksičnih snovi, zato je to skupina živil, v kateri je nujno oceniti realno tveganje, povezano z njihovim uživanjem (Meurillon in Engel, 2016).

HCA (tip IQ) nastajajo pri temperaturi med 100 in 200 °C. Več avtorjev trdi, da se oblikujejo tudi pri višjih temperaturah, tja do 250 °C ali celo do 300 °C. Pirolezini (tip ne-IQ HCA) nastajajo nad 200 °C (Szterk, 2015).

2.7.1 Tvorba HCA v izdelkih iz prašičjega mesa

Pečena slanina vsebuje najvišjo raven PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin), medtem ko drugi izdelki iz prašičjega mesa vsebujejo nezaznavno ali zelo majhno količino HCA. Slanina se razlikuje od mesa, saj med pripravo slanine v pečici nastane relativno veliko PhIP v primerjavi z ostalimi izdelki, pripravljenimi z drugačnimi metodami toplotne obdelave. Nasprotno pa v govejem ali piščančjem mesu, pečenem v pečici, nastane manj PhIP in MelQx (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin), kot v ocvrtem ali pripravljemem na žaru. Podatki anket med potrošniki v ZDA kažejo, da je slanina najpogosteje uporabljen kos mesa. Poleg tega študije kažejo tudi, da so HCA v slanini biološko razpoložljivi, zato je uživanje slanine povezana z večjim izločanjem MelQx z urinom (Sinha in sod., 1998).

Popolnoma pečene piščančje prsi vsebujejo dvakratno količino PhIP, to je 70 ng/g mesa, v primerjavi z ocvrtimi polpeti in ocvrtim piščancem. Vsebnost PhIP v zrezkih, rezinah šunke, klobasah ali hrenovkah je bila pod mejo detekcije (Sinha in sod., 1998).

Razlike v tvorbi HCA so posledica več dejavnikov. Tvorba HCA je lahko odvisna od vrste mesnega izdelka; v pleskavicah z ravno, relativno veliko površino v celoti v stiku z vročo površino prenosnika toplote, je tvorba HCA večja v primerjavi s klobasami, ki vsebujejo prekursorje HCA v mesnem soku v notranjosti klobase, razen če je površina poškodovana. Barjene klobase hot dog so imele nezaznavne količine HCA tudi po pečenju v ponvi do stopnje »well done«, površina klobas je bila še sprejemljivo popečena (zažgana) (Sinha in sod., 1998). Nekatere študije pa so poročale o visoki mutagenosti, katere izvor so pripisali HCA iz hrenovk, pečenih na žaru (Stavric in sod., 1995).

2.7.2 Napolarni HCA

Kot že samo ime pove, se pirolizirani HCA v glavnem oblikujejo pri visoki temperaturi (navadno več kot 250 °C), odvisno od njihove strukture. Nastanejo iz aminokislin, kot so triptofan, fenilalanin, glutaminska kislina ali ornitin, lahko pa tudi s pirolizo kazeina in sojinega globulina. Pri visoki temperaturi se tvorijo reaktivni radikali, poteče pa tudi deaminacija in dekarboksilacija produktov. Različne spojine reagirajo in tvorijo se omenjene HCA (Meurillon in Engel, 2016).

2.7.3 Polarni HCA

Aminoimidazo-azareni nastajajo v Maillardovi reakciji pri temperaturah med 150 °C in 200 °C. Nastanejo iz različnih prekurzorjev, prav tako tudi njihov skelet, ki nastane v Maillardovi reakciji med aminokislino in heksozo preko produktov Streckerjeve razgradnje. Različni intermediati, nastali med to fazo, glede na osnovno strukturo oblikujejo specifične HCA (Meurillon in Engel, 2016).

2.7.4 Dejavniki tvorbe HCA

Najpomembnejše spremenljivke, ki vplivajo na oblikovanje HCA, so temperatura, čas in način kuhanja oz. toplotne obdelave ter vrsta hrane, torej vsebnost prekurzorjev in inhibitorjev (Skog in sod., 1998).

2.7.4.1 Temperatura, čas in način toplotne obdelave

Postopka cvrtje in pečenje mesa potekata pri temperaturi pod 200 °C. Večina prvih eksperimentov na temo HCA v mesu je bila opravljena pri temperaturah nad 200 °C. Šele pred kratkim so postali na voljo podatki o vsebnosti HCA v toplotno obdelanem mesu pri nižjih temperaturah. Cvrtje pri nižjih temperaturah je primernejše, saj se podaljša čas toplotne obdelave, s tem pa se prenese večja količina bodisi prekurzorjev ali HCA iz skorje izdelka v usedlino (prismojen ostanek) v ponvi. HCA se lahko tvorijo tudi pri temperaturah pod 100 °C. Johansson in Jägerstad (1993) sta poročala o prisotnosti HCA v lososu, prekajenem pri nizkih temperaturah (80-85 °C). Kljub presenetljivim rezultatom lahko nizka vodna aktivnost na površini izdelka ali relativno dolg postopek toplotne obdelave spodbudi tvorbo HCA (Skog in sod., 1998).

2.7.4.2 Recepti

Že manjše spremembe v pripravi različnih mesnih jedi lahko privedejo do zmanjšanja tvorbe HCA. Voda je pomembna za transport vodotopnih prekurzorjev iz notranjosti živila na njegovo površino med toplotno obdelavo. Transport prekurzorjev je mogoče omejiti z dodatkom spojin, ki vežejo vodo, kot so sol, škrob, soja itd. Zmanjšanje mutagenega

delovanja so Wang in sod. (1982) opazili ob dodatku sojinega proteina v govejo pleskavico pred cvrtjem. Opazili so tudi inhibitorni učinek sladkorja (mešanica glukoze in laktoze) v mletem mesu, pa tudi predhodno mariniranje se je v nedavnih raziskavah pokazalo kot uspešen način za zmanjšanja tvorbe HCA med pečenjem (Skog in sod., 1998).

2.7.4.3 Maščoba

Poročali so, da maščoba dejansko vpliva na količino nastalih mutagenih snovi med toplotno obdelavo. Maščoba namreč učinkovito prenaša toploto v mesu in redči prekursorje v mesu. Lahko pa maščoba na tvorbo HCA deluje tudi obratno, pospešuje tvorbo HCA s tvorbo prostih radikalov pri oksidaciji lipidov ali zaradi sodelovanja v Maillardovi reakciji (Skog in sod., 1998).

Vpliv dodatka različnih maščobnih kislin (C18:0, C18:1, C18:2, C18:3), olja (koruznega in olivnega) in glicerola na oblikovanje MeIQx v vodnem modelu s kreatininom, glicinom in glukozo, sta preučevala Johansson in Jägerstad (1993) ter ugotovila, da nobena od dodanih spojin ne vpliva na vrsto nastalih HCA v modelnem sistemu, ampak le na količino MeIQx (Skog in sod., 1998).

2.7.4.4 Ostali dejavniki, ki vplivajo na tvorbo HCA

Živila vsebujejo različne sestavine, ki lahko vplivajo na povečanje ali zmanjšanje tvorbe in mutageno delovanje HCA. To so sestavine, kot so indoli, kovine, antioksidanti in različni aditivi za živila, kar dodatno otežuje razumevanje oblikovanja HCA. Po drugi strani pa lahko iste spojine pomagajo zmanjšati in nadzorovati tvorbo HCA (Skog in sod., 1998).

2.8 ZMANJŠANJE TVORBE HCA MED TOPLOTNO OBDELAVO

Obstajajo trije glavni dejavniki, ki vplivajo na zmanjšanja tvorbe HCA pri toplotni obdelavi mesa, in sicer količina prekursorjev v mesu oz. izdelku, razmere med postopkom toplotne obdelave in dodatek specifičnih snovi z inhibitornimi lastnostmi. V preglednici 4 so prikazani primeri uporabljenih aditivov, inhibitorjev, mehanizem zaviranja HCA in odstotek zmanjšanja tvorbe posameznega HCA (Meurillon in Engel, 2016).

Doslej je bilo opravljenih največ študij o zmanjšanju tvorbe mutagenih snovi v reakcijah Maillardovega tipa. Prvi način zmanjšanja tvorbe omenjenih snovi je blokada neradikalskega nastajanja mutagena. Dodajanje aminokislinskih derivatov zmanjšuje njihov nastanek. Jones in Weisburger (1988) sta prikazala, da triptofan, derivati indola in prolin v modelnem sistemu ali govedini zmanjšujejo nastajanje mutagenih formacij s prikrivanjem reaktivnih aldehydov. Sladkor je prav tako pomemben faktor zmanjševanja mutagenosti.

Skog in Jägerstad (1990, 1991) sta dokazala, da povečana količina sladkorjev v modelnih sistemih ali v govedini zmanjšuje nastajanje mutagenih snovi s prikrievanjem oz. maskiranjem kreatina oz. kreatinina, lahko pa tudi zaradi Maillardove reakcije. Dodajanje čebule lahko učinkovito zmanjša mutagen učinek toplotne obdelave hamburgerja, ker povzroči neravnovesje vsebnosti sladkorja v mletem mesu. Dodatek sladkorja v mletu meso v presežku je lahko praktičen način zmanjšanja mutagenosti (Kikugawa, 2004).

Mehanizem lovljenja prostih radikalov s tiolnimi spojinami in nenasičenimi maščobnimi kislinami zoper radikalom pirazin kationa je lahko naslednji način inhibicije mutagenosti. Tiolne spojine lahko darujejo atom vodika nestabilnemu radikalumu pirazin kationa in tako pretvorijo radikalsko v neradikalsko obliko. Nenasičene maščobne kisline vsebujejo dvojne vezi ali aktivne metilenske skupine, iz katerih se atomi vodika lahko zlahka sprostijo. Radikal pirazin kationa lahko prevzame atom vodika nenasičenih maščobnih kislin, da se pretvori v neradikalsko obliko. Nenasičene maščobne kisline se lahko same po sebi pretvorijo v vrste s prostimi radikali, ki pa so usmerjene oz. podvržene verižni peroksidaciji ali pa se s terminacijo pretvorijo v neradikalske zvrsti (Kikugawa in sod., 1999).

2.9 VPLIV MARINIRANJA NA TVORBO HCA

V ZDA, Švedski, Novi Zelandiji, Japonski in Singapurju je ocena povprečnega zaužitega mesa in rib med 80 in 160 g na dan. Meso z žara, ki se pred pečenjem pogosto marinira, je priljubljena jed po vsem svetu. Mariniranje se izvaja iz več razlogov, bodisi zavoljo izboljšanja okusa ali pa doseganja zelene mehkoobe in nežnosti. Poleg tega lahko marinade predstavljajo oviro, ki preprečuje neposreden stik med mesom in ognjem, zato je pričakovati manjšo koncentracijo HCA v mariniranem mesu (Hasnol in sod., 2014).

Preglednica 5: Uporabljeni aditivi za zmanjšanje/inhibicijo tvorbe HCA (Meurillon in Engel, 2016)

Aditiv	Vrsta inhibitorja	Mehanizem inhibicije	Tarčni HCA	% inhibicije
vino	Flavonoidi, kot flavonoli, antocianini in tanini	lovljenje prostih radikalov	PhIP	88 % za PhIP
			MeIQx	33 % za MeIQx
			AαC	61 % za AαC 70 % za tvorbo vseh HCA
zeleni čaj	Katehini, kot epikatehin in epigalokatehin galat	lovljenje fenilacetaldehida lovljenje prostih radikalov	PhIP	90 % za fenilacetaldehid
			AαC	75 % za PhIP 85 % za AαC 70 % za tvorbo vseh HCA
ekstrakt oliv	polifenoli, kot 4-hidroksitirozol	lovljenje prostih radikalov	MeIQx	76,1 % za MeIQx
			PhIP	82,1 % za PhIP Antimikrobna aktivnost
rožmarin	Terpenoid, kot karnosol	lovljenje prostih radikalov	MeIQx	Do 91,7 % za MeIQx
	karnosolna kislina		PhIP	Do 85,3 % za PhIP
	rosmanol			
grozdne peške	flavonoidi	lovljenje prostih radikalov	MeIQx	57 % za MeIQx
			PhIP	90 % za PhIP
			IQ	
			4,8-DiMeIQx	
črni poper	palmitinska kislina	lovljenje prostih radikalov	MeIQx	100 % za PhIP in 4,8-DiMeIQx
	lavrinska kislina		PhIP	12 do 100 % za tvorbo vseh HCA
	miristinska kislina		IQ	
	piperin		4,8-DiMeIQx	
ekstrakt hibiskusa	flavonoidi in antocianini	lovljenje prostih radikalov	MeIQx	50 % za MeIQx
			PhIP	40 % za PhIP
semena granatnega jabolka	tokoferoli in fenolne kisline, kot hidroksibenzojske kisline ali dihidroksibenzojske kisline	lovljenje prostih radikalov	PhIP	68 % za PhIP
			IQ	45 % za IQ
			MeIQx	57 % za MeIQx
			norharman	24 % za norharman
			harman	18 % za harman
origanovo olje	terpenoidi	lovljenje prostih radikalov	PhIP	78 % za PhIP
	karvakrol	tvorba netopnih kompleksov z amini (cf klorofilin)	MeIQ	58 % za MeIQ
			MeIQx	72 % za MeIQx Antimikrobna aktivnost

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 5: Uporabljeni aditivi za zmanjšanje/inhibicijo tvorbe HCA (Meurillon in Engel, 2016)

Aditiv	Vrsta inhibitorja	Mehanizem inhibicije	Tarčni HCA	% inhibicije
čebula	alicin	zaviranje Maillardove reakcije z reakcijo glukoze	MeIQx	94,3 % za PhIP
	dialil disulfid		4,8-DiMeIQx	78 % za MeIQx
	tiosulfati		PhIP	
česen	dialil disulfid	zaviranje Maillardove reakcije z reakcijo glukoze	4,8-DiMeIQx	78 % za MeIQx
	dialil disulfid		PhIP	66,2 % za MeIQx
	tiosulfati			
vitamini	vitamin E	lovljenje prostih radikalov	norharman, harman, PhIP, A α C	51,2 % za norharman
			MeA α C	30,7 % za harman
				78,3 % za PhIP
				49 % za tvorbo vseh HCA
	piridoksin (vitamin B 6)	lovljenje fenilacetaldehida	PhIP, MeIQx	60 % za fenilacetaldehid
			40 % za tvorbo vseh HCA	

Mariniranje je pogosto uporabljena metoda, ki vključuje injiciranje, gnetenje ali potopitev, za razpršitev oz. razporeditev marinade v in po mišičnem tkivu. Glede na dodane sestavine obstaja več vrst marinad. Medtem ko alkalne vsebujejo fosfate, so kisle pripravljene iz organskih kislin in njihovih soli. Tretjo vrsto marinad pa predstavljajo emulzije (Vlahova-Vangelova in Dragoev, 2014).

Sestavine v marinadah služijo za povečanje donosa (z dodatkom vode), izboljšanje barve in okusa, zmanjšanje občutljivosti in s tem podaljšanja roka uporabnosti.

Marinade lahko vključujejo tudi sveže ali suhe sestavine začimb, zelišč in druge ekstrakte. Študije poročajo o antibakterijskih, protivnetnih, antialergijskih, hepatoprotektivnih, antitrombotičnih, protivirusnih, antikancerogenih, kardioprotektivnih in vazodilatarnih učinkih marinad. Začimbe in zelišča, kot dodatki marinad, znatno povečujejo varnost mesa in zmanjšujejo oksidacijo maščob (Vlahova-Vangelova in Dragoev, 2014).

Salmon in sod. (1997) so poročali o 92-99 % zmanjšanju vsebnosti PhIP v celotnih piščančji prsih, ki so bila marinirana z mešanico rjavega sladkorja, olivnega olja, kisa, česna, gorčice, limoninega soka in soli, pri čemer niso primerjali vplivov različnih vrst sladkorja (Hasnol in sod., 2014).

V pečenem mesu je lahko koncentracija mutagenih snovi do 10-krat večja kot v kuhanem mesu. V 90. letih so Edenharder in sod. (1995) ugotovili, da klorofil v stročjem fižolu, brokoliju in špinači zmanjša mutagen vpliv IQ in MeIQx. Vmesni produkti HCA so bili odstranjeni ali stabilizirani z dodajanjem BHA, sezamola ali epigalokatehin galata (Kikugawa in sod., 1999). Zmanjšanje tvorbe HCA je bilo pojasnjeno s stabilizacijskim vplivom dodanih antioksidantov na vmesne produkte Maillardove reakcije in kreatinina (Vlahova-Vangelova in Dragoev, 2014).

Koncentracija HCA v mariniranih mesnih izdelkih je bila zmanjšana med cvrtjem. Kratko mariniranje vpliva predvsem na površino mesnih izdelkov, saj sestavine marinad le delno prodrejo v notranjost mesnih izdelkov (Gibis in Weiss, 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL IN POTEK DELA

Eksperimentalni del naloge je obsegal optimizacijo pridobivanja rastlinskih ekstraktov z namenom zmanjšanja tvorbe heterocikličnih aminov (HCA) v modelnih mesnih emulzijah. V pečenih koagulatih mesnih emulzij z dodanimi različnimi rastlinskimi ekstrakti (vezanimi na različne nosilce) smo določili vsebnost posameznih in skupnih HCA, v istih koagulatih pa smo pred pečenjem določili še vsebnost skupnih fenolov (FC) in senzorično ocenili njihovo sprejemljivost.

V prvem delu poskusa smo pripravili ekstrakte hmelja in brinovih jagod. Pri izdelavi ekstraktov smo uporabili štiri različna topila, in sicer 70 % etanol, metanol, etilacetat in destilirano vodo (segreto na 60 °C). Nato smo etanolne, metanolne, etilacetatne in vodne ekstrakte hmelja in brinovih jagod vezali na tri različne nosilce: koruzni škrob, kuhinjsko sol in rafinirano sončnično olje. Posamezne (24) ekstrakte, vezane na nosilce, smo v drugem delu poskusa dodajali mesnim emulzijam. Recepture emulzij smo prilagajali glede na nosilec uporabljenega ekstrakta. Delež komponente emulzije (olje, sol ali škrob) smo zmanjšali za delež komponente, uporabljene kot nosilec v ekstraktu.

Priprava ekstraktov brina in hmelja

Za pripravo ekstraktov smo uporabili brinove jagode (letnik 2013) in liste hmelja (hmeljarstvo Čas, Golding 2013). Ekstrahirali smo jih v 70 % etanolu, etilacetatu, metanolu in destilirani vodi (segreti na 60 °C). Vse pripravljene ekstrakte smo vezali na naslednje nosilce:

- koruzni škrob (GUSTIN),
- kuhinjska sol (morska sol; fino mleta – DROGA Portorož),
- rafinirano jedilno sončnično olje (CEKIN).

Ekstrakt brinovih jagod

Brinove jagode smo zmleli v mlinčku (IKA[®], A11 Basic Analytical Mill). Zmlete brinove jagode smo zatehtali (10 g) v štiri erlenmajerice in dodali po 200 mL topila (etanol, etilacetat, metanol oz. destilirana voda). Sledilo je 60 minutno raztapljanje na ultrazvočni kopeli (Branson 3510). Po končanem raztapljanju smo vzorce filtrirali skozi filter papir (Sartorius Stedim Biotech, 388) v 100 mL bučke in posamezen ekstrakt vezali na nosilce (koruzni škrob, kuhinjsko sol oz. rafinirano sončnično olje). Vezava je potekala tako, da smo v čaše odmerili po 10 mL posameznega ekstrakta, dodali 10 g nosilca in 50 mL destilirane vode (razen v primerih, ko je nosilec ekstrakta olje ali kot topilo etilacetat, takrat vode nismo dodali). Vzorce smo 15 minut mešali na ultrazvočni kopeli (Branson 3510), jih prelili v petrijevke (razen vzorcev, katerih topilo je bilo olje – te smo pustili v čašah), jih sušili na zraku, da sta voda in topilo izhlapela.

Ekstrakt hmelja

Liste hmelja smo zmleli v mlinčku (IKA[®], A11 Basic Analytical Mill). Zmlete liste hmelja smo natehtali (10 g) v štiri erlenmajerice in dodali po 200 mL topila (etanol, etilacetat, metanol oz. destilirano vodo). Sledilo je raztapljanje na ultrazvočni kopeli (Branson 3510) 60 minut. Po končanem raztapljanju smo vzorce filtrirali skozi filter papir (Sartorius Stedim Biotech, 388) v 100 mL bučko in posamezen ekstrakt vezali na nosilce (koruzni škrob, kuhinjsko sol oz. rafinirano sončnično olje). Vezava je potekala tako, da smo v čaše odmerili po 10 mL posameznega ekstrakta, dodali 10 g nosilca in 50 mL destilirane vode (razen v primerih, ko je nosilec ekstrakta olje ali kot topilo etilacetat, takrat vode nismo dodali). Vzorce smo mešali 15 minut na ultrazvočni kopeli (Branson 3510), jih prelili v petrijevke (razen vzorcev, katerih topilo je bilo olje – te smo pustili v čašah), jih posušili na zraku, da sta voda in topilo izhlapela, kakor lahko vidimo na primeru iz slik 1 in 2.



Slika 1: Ekstrakt brinovih jagod, vezan na škrob



Slika 2: Ekstrakt hmelja, vezan na sol

Priprava in obdelava mesnih emulzij

Kontrolne mesne emulzije smo pripravili iz naslednjih komponent:

- 700 g mesa (prašičje stegno BK, Mercator, d. d. - SM Brdo),
- 100 g olja (rafinirano jedilno sončnično olje),
- 200 g ledu,
- 14 g kuhinjske soli (morska sol – jodirana, fino mleta – DROGA Portorož),
- 15 g jedilnega koruznega škroba (GUSTIN).

V ostale eksperimentalne skupine smo dodali še različne ekstrakte, vezane bodisi na sol bodisi na škrob ali na olje. V eksperimentalnih skupinah mesnih emulzij, v katere smo dodali ekstrakte, vezane na nosilec sol (8 g), smo recepturo spremenili – dodali smo le 6 g soli, tako da je skupna količina soli ostala enaka kot v kontrolni skupini. Podobno smo

naredili tudi v primeru ostalih dveh nosilcev ekstraktov – koruznega škroba in sončničnega olja.

Iz naštetih surovin in aditivov smo nameravali izdelati 24 skupin mesnih emulzij z dodanimi ekstrakti brinovih jagod in hmelja in dve kontrolni emulziji brez dodanih ekstraktov. Na štirih ekstraktih, pri katerih sta bili topili etanol ali voda, nosilec ekstrakta pa olje, se je pojavila plesen, zato jih nismo uporabili za izdelavo emulzij. Skupno smo torej izdelali 20 eksperimentalnih in dve kontrolni skupini mesnih emulzij.

Izdelava mesne emulzije je potekala po naslednjem postopku. Najprej smo zatehtali komponente za vsako od dvaindvajsetih skupin vzorcev. Meso smo predhodno zmleli v volku. Vzorce, katerih nosilca sta sol in koruzni škrob, smo zdrobili v terilnici.

Kontrolno emulzijo smo izdelali iz mesa, kuhinjske soli in tretjine ledu v kutru Stephan (ohlajenim na $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pri 1500 obratih/min do središčne temperature $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (približno ena minuta). Nato smo zmesi dodali sončnično olje, koruzni škrob in preostali dve tretjini ledu. Sledila je ponovna homogenizacija pri 2400 obratih/min, dokler emulzija ni dosegla temperature $11,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (približno dve minuti). Nadev smo napolnili v plastične ovitke premera 40 mm in oblikovali 10 cm dolge vzorce klobas. Druge eksperimentalne skupine smo izdelali enako, le da smo dodajali ekstrakte, pridobljene z različnimi topili in vezane na različne nosilce (preglednica 6). Ekstrakte, vezane na sol, smo dodajali v prvi fazi izdelave mesnega testa, ekstrakte, vezane na koruzni škrob in sončnično olje, pa v drugi fazi, v fazi izdelave mesne emulzije.

Preglednica 6: Uporabljen rastlinski material za ekstrakte, ekstrakcijska topila, nosilci in obstojnost/dodatek ekstrakta

Rastlinski material	Topilo	Nosilec	Dodatek emulziji
hmelj	etanol (70 %)	škrob	da
		NaCl	da
		olje	ne ^p
	metanol	škrob	da
		NaCl	da
		olje	da
	etilacetat	škrob	da
		NaCl	da
		olje	da
	voda (60 °C)	škrob	da
		NaCl	da
		olje	ne ^p

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 6: Uporabljen rastlinski material za ekstrakte, ekstrakcijska topila, nosilci in obstojnost/dodatek ekstrakta

Rastlinski material	Topilo	Nosilec	Dodatek emulziji
brinove jagode	etanol (70 %)	škrob	da
		NaCl	da
		olje	ne ^p
	metanol	škrob	da
		NaCl	da
		olje	da
	etilacetat	škrob	da
		NaCl	da
		olje	da
	voda (60 °C)	škrob	da
		NaCl	da
		olje	ne ^p

Legenda: ^p– nastanek plesni

Vse vzorce smo sočasno obdelali z vodno paro v kuhalni komori Fessmann do končne središčne temperature (T_s) 70 °C (ΔT 8 °C), ohladili in skladiščili pri temperaturi 4 °C do senzorične analize in analize osnovne kemijske sestave ter skupnih fenolnih spojin. Poskus smo opravili v dveh proizvodnih ponovitvah.

Ohlajene emulzije (4 °C) smo razrezali na šest kolobarjev debeline 1 cm in spekli na dvoploščnem žaru Silex (Nemčija) pri temperaturi plošč 240 °C do T_s 80 °C (1 min 40 s). Med pečenjem smo merili naraščanje temperature. Pečene vzorce smo po ohladitvi zmleli v mlinčku (IKA[®], A11 Basic Analytical Mill), vakuumsko zapakirali in jih do nadaljnjih analiz vsebnosti HCA oz. ekstrakcije na trdni fazi (SPE – ang. Solid Phase Extraction) zamrznili.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Osnovna kemijska sestava mesnih emulzij

Za določitev osnovne kemijske sestave (vsebnosti vode, beljakovin, maščob in soli) izdelanih emulzij smo uporabili hitro metodo določanja, ki temelji na uporabi bližnje infrardeče svetlobe (NIR). Tri naključne vzorce mesnih emulzij smo zmleli in prenesli v čiste okrogle pladnje (FOSS, 60000304), jih razmazali in zgladili površino vzorca. Osnovno kemijsko sestavo smo nato določili z aparatom Food ScanTM Meat Analyser (FOSS, Danska), ki je posebej namenjen za analizo mesa in mesnih izdelkov. Ponovljivost meritev smo zagotovili z analiziranjem naključno izbranega vzorca v šestih paralelkah, pri čemer je znašal koeficient variabilnosti rezultatov vsebnosti vode, beljakovin, maščob, soli in kolagena manj kot 0,2 %.

3.2.2 Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu

Metoda Folin-Ciocalteu je priznana, pogosto uporabljena metoda za kvantifikacijo skupnih fenolnih spojin različnih izvlečkov oz. ekstraktov. Je kolorimetrična metoda, ki omogoča analizo organskih spojin, ki imajo hidroksilirane aromatske obročje. Metoda ima dobro občutljivost, zato omogoča merjenje vsebnosti fenolnih spojin, ki reagirajo z reagentom Folin-Ciocalteu. Ta vsebuje volframat in molibdat, kar ima za posledico modro obarvanje in omogočeno spektrofotometrično določanje pri 750 nm (Vázquez in sod., 2015).

3.2.2.1 Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. Pripravili smo štiri paralelke, v katere smo dodali po 100 μL od posameznih ekstraktov oz. jih nismo dodali v primeru kontrole. V vsako epruveto smo posamezno dolili različne količine MeOH (95, 90, 85, 80 μL), galne kisline (5, 10, 15, 20 μL) s koncentracijo 3,5 mg/10 mL MeOH. Na koncu smo dolili še vodo mQ (1300 μL), reagent Folin-Ciocalteu (300 μL) in 20 % raztopino Na_2CO_3 v vodi mQ (300 μL).

3.2.2.2 Izvedba

Najprej smo pripravili osnovne vzorce, tako da smo po 0,300 g posameznih ekstraktov, vezanih na nosilce, razen tistih, vezanih na olje, zatehtali v 10 mL bučko in jo dopolnili z destilirano vodo do oznake. Iz vseh predhodno pripravljenih osnovnih vzorcev smo pripravili vzorce v dveh paralelkah, A in B.

Reagent Folin-Ciocalteu (FC) smo za analizo razredčili v razmerju 1 : 2 (1 mL FC + 2 mL vode mQ), pripravili smo tudi 20 % raztopino Na_2CO_3 v vodi mQ (vode dodatno prečiščene po Milli-Q sistemu).

Paralelke A so vsebovale 1,350 mL mQ, 0,050 mL vzorca, 0,300 mL FC in 0,300 mL raztopine Na_2CO_3 , paralelke B pa so se razlikovale v količini vzorca (0,100 mL) in vode mQ (1300 mL).

Pripravili smo tudi slepi vzorec za vsako paralelko, ki je vseboval enake komponente kot vzorec, le da smo učinkovino nadomestili z vodo.

V 2 mL epico smo odpipetirali ustrezen volumen polarne faze (PF) in vode mQ (kot je prikazano v preglednici 7). Dodali smo 0,300 mL reagenta FC in premešali na vorteksu. Po mešanju smo počakali 5 minut ter dodali 0,300 mL raztopine Na_2CO_3 . Po 60 minutah smo vzorce prelili v 2,5 mL kivete ter pri temperaturi 25 °C izmerili absorbanco pri 765 nm.

Preglednica 7: Podatki za pripravo vzorcev za določanje skupnih fenolov

Vrsta komponente	Slepi vzorec	Paralelka A	Paralelka B
voda mQ	1,400 mL	1,350 mL	1,300 mL
ekstrakt	0 mL	0,050 mL	0,100 mL
FC (1 : 2)	0,300 mL	0,300 mL	0,300 mL
Na ₂ CO ₃ (20 %)	0,300 mL	0,300 mL	0,300 mL
skupaj	2 mL	2 mL	2 mL

3.2.3 Določanje vsebnosti HCA

Vsebnost HCA smo določili s HPLC-MS (visokotlačna tekočinska kromatografija v kombinaciji z masnim spektrometrom) ob predhodni ekstrakciji s trdno fazo. Kromatograme smo obdelali z računalniškim programom Mass Lynx™ V 4,1 (Micromass, 2004).

3.2.3.1 Priprava vzorca in izvedba metode

Za določanje vsebnosti HCA smo uporabili metodo, ki jo opisujejo Barceló-Barrachina in sod. (2004a, 2004b). V 100 mL čaše smo odtehtali 3,00 g ($\pm 0,01$ g) homogeniziranega vzorca in dodali 12 mL 1 M NaOH (Merck, 1.06498) ter 100 μ L internega standarda TriMeIQx (1 mg/L) (TRC, A630000) v metanolu. Čaše smo, pokrite parafilmom, čez noč pustili na magnetnem mešalniku. V homogenat smo dodali 12 g diatomejske zemlje EXTrelut®NT (Merck, 1.15092) in ga s stekleno palčko dobro premešali. Stekleno kolono smo napolnili s 70 mL etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252), naložili vzorec in počasi ekstrahirali. Eluat smo zbrali v čašo. Sledilo je čiščenje vzorca z metodo ekstrakcije s trdno fazo (SPE), za katero smo uporabili kolono Oasis MCX 60 mg (Walters, 186000253). Eluat smo v celoti injicirali na kolono, ki smo jo predhodno kondicionirali z 2 mL metanola (Merck, 1,09060) in uravnovežili z 2 mL etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252). Sledilo je spiranje z 2 mL 0,1 M HCl in nato še z 2 mL MeOH (Merck, 1.06007). Kolono smo posušili v toku zraka. Nato smo eluriali polarne in nepolarne HCA z 2 mL mešanice metanol (Merck, 1.06007) : 25 % raztopina amonijaka (Merck, 1.05432) v razmerju 19:1 (v/v). Vzorec smo do suhega evaporirali v vakuumski črpalki (Genevac, HT-4X Evaporator) in ga nadalje raztopili v 250 mg metanola (Merck, 1.09060). Določitev HCA je poteklo na LC-MS.

3.2.3.2 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

Preiskovane komponente – HCA smo ločili s HPLC sistemom Agilent Tehnology 1100, ki je sestavljen iz binarne črpalke (G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (G1379A), termostata kolone (G1316A) in avtomatskega vzorčevalnika (G1330B).

Pogoji:

- način kromatografije: RP (reverzana faza)
- kromatografska kolona: Kinetex Biphenyl 2,6 $\mu\text{m} \times 2,1 \times 100$ mm; Phenomenex
- mobilna faza A: 30 mL amonijev formiat (HCOONH_4 ; Fluka, 09737; pH 3,2)
- mobilna faza B: acetonitril (Merck, 1.00030)
- volumen injiciranja: 1 μL
- temperatura vzorcev: 8 $^\circ\text{C}$
- temperatura kolone: 30 $^\circ\text{C}$

Preglednica 8: Gradienti mobilne faze pri določanju HCA

Čas (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)	Pretok (mL/min)
0,00	97	3	0,300
2,00	97	3	0,300
20,00	40	60	0,300
21,00	0	100	0,300
25,00	0	100	0,300
26,00	97	3	0,300
35,00	97	3	0,300

Posamezni HCA so bili določeni na podlagi retencijskih časov in m/z HCA standardov (TRC: harman, H105000; norharman, N700000; IQ, H785000; MelQ, A605200; IQx, A616900; MelQx, A606600; 4,8-DiMelQx, A631000; 7,8-DiMelQx, A869500; 4,7,8-TriMelQx, A630000; PhIP, A617000; A α C, A629002; Glu-P-2, N493810; Trp-P-1, N493780; Trp-P-2, N493985).

Preglednica 9: Masni detektor: Micromass Quattro Micro; Waters

Način	ESI +
Kapilara (kV)	3,50
Napetost vhodne plošče (V)	40
Leča (V)	2
Ekstraktor (V)	0,5
Temperatura vhodne plošče ($^\circ\text{C}$)	120
Temperatura razpršilnega N_2 ($^\circ\text{C}$)	350
Pretok N_2 cone (L/h)	50
Pretok razpršilnega N_2 (L/h)	450
Način	SIR (angl. Selected Ion Recording)

Legenda: ESI +: elektrorazpršilna ionizacija (ang. Electrosprey Ionisation)

Detekcija na masnem spektrometru je potekala na SIR-načinu, pri pogojih, ki so prikazani v preglednici 10.

Preglednica 10: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR-načinu

HCA	m/z (ESI +)	Cona (V)
IQ	199,20	40
IQx	200,20	40
MelQx	214,20	40
Glu-P-2	185,20	40
harman	183,28	40
norharman	169,26	40
PhIP	255,20	40
TriMelQx	242,26	40

Legenda: ESI+: elektrorazpršilna ionizacija (ang. Electrosprey Ionisation); m/z: razmerje masa/naboj

Rezultate smo obdelali s funkcijo Quantify v programu Mass LynxTM V 4.1 (Micromass, 2004).

3.2.4 Izvedba senzorične analize

Z namenom opredelitve senzoričnih lastnosti koagulatov mesnih emulzij smo sestavili senzorični panel štirih preskuševalcev, ki dobro poznajo področje ocenjevanja mesnih izdelkov. Panel so ves čas sestavljali isti preskuševalci. Določili smo pomembne senzorične lastnosti in deskriptorje koagulatov mesnih emulzij (slika 3) in ustrezno metodo kvantitativne deskriptivne analize (Golob in sod., 2005). Ocenjevalna komisija je vzorce ocenjevala v za to namenjenem prostoru. Prostor je bil primerno osvetljen, z optimalno temperaturo (20 ± 2 °C), relativno vlago (60-75 %) in zadostno zračnostjo. Za senzorično oceno smo odrezali 1 cm debelo rezino in jo ponudili preskuševalcem v oceno na belih krožnikih. Krožnike smo opremili s številko in na ta način zagotovili anonimnost vzorcev. Za nevtralizacijo okusa je imela komisija na razpolago sredico belega kruha in vodo.

Preskuševalci so uporabili metodo kvantitativne deskriptivne analize s strukturirano lestvico s sidriščnima vrednostima 0 in 4 (Golob in sod., 2005). Na tej lestvici vrednost 0 pomeni, da lastnost ni izražena, vrednost 4 pa močno izraženo lastnost. Ocenjevali smo štiri lastnosti, tuje vonje in tuje arome ter aromo po brinovih jagodah (brinu) in aromo po hmelju.



Slika 3: Vzorci mesnih emulzij senzoričnega ocenjevanja

3.2.5 Statistična analiza podatkov

Pridobljene podatke smo uredili in pripravili s programom Microsoft Excel XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s programom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Analizo podatkov smo izvedli s pomočjo programske opreme Statistical Analysis System (SAS) software, version 8.1 (SAS Institute, Cary, NC, ZDA).

Za obdelavo podatkov o tvorbi HCA, vsebnosti skupnih fenolnih spojin in komponentah arome smo uporabili statistični model, v katerega smo vključili fiksne vplive dodatka ekstrakta brina in hmelja, ekstrahiranih z različnimi topili (ET, $i = 8$, brin + etanol, brin + etilacetat, brin + metanol, brin + voda, hmelj + etanol, hmelj + etilacetat, hmelj + metanol, hmelj + voda), vrste nosilca (N, $j = 3$, olje, sol, škrob) in proizvodne ponovitve (R, $k = 3$): $y_{ijkl} = \mu + ET_i + N_j + R_k + e_{ijkl}$. Ocenjene srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane s testom LSM in primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

4.1 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MESNIH EMULZIJ

Osnovno kemijsko sestavo mesnih emulzij smo na treh naključnih vzorcih določili z instrumentalno metodo NIR, katere rezultati so podani v preglednici 11. Mesne emulzije so v 100 g v povprečju vsebovale 69,24 g vode, 15,46 g beljakovin, 11,90 g maščob, 0,65 g soli in 0,46 g kolagena. Največjo variabilnost smo ugotovili pri vsebnosti kolagena (22 %) in maščobe (11 %).

Preglednica 11: Rezultati osnovne kemijske analize mesnih emulzij z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

Parameter	Število vzorcev	Vrednost			Standardni odklon	Koefficient variabilnosti (%)
		povprečna	najmanjša	največja		
beljakovine (g/100 g)	3	15,46	15,35	15,52	0,08	1
maščobe (g/100 g)	3	11,90	10,13	13,20	1,30	11
voda (g/100 g)	3	69,24	67,97	71,01	1,29	2
sol (g/100 g)	3	0,65	0,60	0,69	0,04	6
kolagen (g/100 g)	3	0,46	0,33	0,56	0,10	22

4.2 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Preglednica 12 prikazuje paralelne rezultate določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v vodnih, metanolnih, etanolnih in etilacetatnih ekstraktih hmelja in brinovih jagod, vezanih na škrob in sol, izraženih kot mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom (GAEN)/g).

Preglednica 12: Rezultati vsebnosti skupnih fenolnih spojin, izraženi v mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom, v različnih koagulatih mesnih emulzij

	Topilo	Nosilec	Rastlinski material	
			brin	hmelj
SFS (mg galne kisline/ g nosilca z ekstraktom)	etanol	sol	0,27	0,44
	etanol	sol	0,33	0,41
	etanol	škrob	0,47	0,82
	etanol	škrob	0,47	0,79
	etilacetat	sol	0,48	0,14
	etilacetat	sol	0,06	0,11
	etilacetat	škrob	0,13	0,25
	etilacetat	škrob	0,09	0,26
	metanol	sol	0,16	0,45
	metanol	sol	0,14	0,44
	metanol	škrob	0,67	0,83
	metanol	škrob	0,32	0,79
	voda	sol	0,16	0,32
	voda	sol	0,13	0,29
	voda	škrob	0,30	0,40
	voda	škrob	0,25	0,37

Največ skupnih fenolnih spojin vsebujeta metanolni in etanolni ekstrakt hmelja, vezana na škrob (0,83 oz. 0,82 mg skupnih fenolnih spojin, izražene v mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom), sledita jima prav tako metanolni in etanolni ekstrakt brina, vezana na škrob (0,68 oz. 0,47 mg skupnih fenolnih spojin, izražene v mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom). Med analiziranimi vzorci vsebujeta najmanj omenjenih spojin etilacetatni ekstrakt hmelja, vezan na sol, ter etilacetatni ekstrakt brina, prav tako vezan na sol. Rezultati kažejo, da ekstrakti hmelja vsebujejo večjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin kot ekstrakti brina, če primerjamo vzorce z enakim topilom in nosilcem. Znotraj skupine ekstraktov posamezne rastline (hmelj ali brin) predstavljata v povprečju metanol in etanol boljše ekstrakcijsko topilo kot voda in etil-acetat.

4.2.1 Vpliv različnih ekstrakcijskih topil na vsebnost skupnih fenolnih spojin v koagulatih mesnih emulzij

Iz preglednice 13 je razvidno, da smo v koagulatih mesnih emulzij z dodanimi metanolnimi in etanolnimi ekstrakti hmelja, vezanimi na škrob, določili podobno (in statistično največjo) vsebnost skupnih fenolnih spojin (0,81 in 0,81 mg GAEN/g), značilno manjšo pri dodanih metanolnih in etanolnih ekstraktih brina (0,51 in 0,43 mg/g) ter najmanjšo pri etilacetatnih ekstraktih brina (0,11 mg GAEN/g). Največjo skupno vsebnost fenolnih spojin (0,45 in 0,43 mg GAEN/g) smo ugotovili v emulzijah z dodanimi

metanolnimi in etanolnimi ekstrakti hmelja, vezanimi na sol, manjšo (pod 0,30 mg/g) pri vodnih in acetatnih ekstraktih hmelja in vseh ekstraktih brina, najmanjšo pa v emulzijah z etilacetatnim ekstraktom brina (0,05 mg GAEN/g). V primeru, da je bil ekstrakt vezan na olje, smo v emulziji določili največjo skupno vsebnost fenolnih spojin (0,13 mg GAEN/g) pri metanolnem ekstraktu hmelja bistveno več kot pri vseh ostalih, etilacetatnih ekstraktih hmelja in brina ter metanolnih ekstraktih brina (0,02-0,04 mg GAEN/g).

Preglednica 13: Vpliv ekstraktov, topil in nosilcev na vsebnost (LSM) skupnih fenolnih spojin, izraženih v mg galne kisline na g nosilca z ekstraktom, v koagulatih mesnih emulzij

Parameter	Ekstrakt	Topilo	Nosilec			SE	p vrednost
			Olje	Škrob	Sol		
SFG (mg GAEN/g)	brin	etanol		0,43 ^{aCB}	0,27 ^{bC}	< 0,01	$p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,001$
		etilacetat	0,02 ^{cD}	0,11 ^{aE}	0,05 ^{bE}		
		metanol	0,04 ^{bB}	0,51 ^{aB}	0,15 ^{bD}		
		Voda		0,28 ^{aD}	0,15 ^{bD}		
	hmelj	etanol		0,81 ^{aA}	0,43 ^{bA}		
		etilacetat	0,04 ^{cC}	0,25 ^{aD}	0,13 ^{bD}		
		metanol	0,13 ^{cA}	0,81 ^{aA}	0,45 ^{bA}		
		Voda		0,38 ^{aC}	0,30 ^{bB}		

Legenda: SFG – vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena v mg galne kisline na g ekstrakta na nosilcu (GAEN); LSM – ocenjene srednje vrednosti; SE – standardna napaka ocene; p_{ET} , statistična verjetnost vpliva ekstrakta, ekstrahirane z različnimi topili; p_N , statistična verjetnost vpliva vrste nosilca ekstrakta; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C,D,E,F,G}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi ekstrakti, ekstrahiranimi z različnimi topili)

4.2.2 Vpliv nosilca ekstraktov na vsebnost skupnih fenolnih spojin v koagulatih mesnih emulzij

Koagulati mesnih emulzij z dodanimi etanolnimi ekstrakti hmelja in brina, vezanimi na sol, vsebujejo manj skupnih fenolnih spojin kot omenjena ekstrakta, vezana na škrob (sol: 0,27 in 0,43 mg GAEN/g vs. škrob: 0,43 in 0,81 mg GAEN/g). Koagulati mesnih emulzij z dodanimi etilacetatnimi in metanolnimi ekstrakti brina in hmelja, vezanimi na olje, vsebujejo značilno manj fenolnih komponent kot omenjeni ekstrakti, vezani na škrob in sol. Koagulati mesnih emulzij z dodanimi vodnimi ekstrakti hmelja in brina, vezanimi na škrob, pa vsebujejo večjo vrednost skupnih fenolnih spojin kot v omenjenih ekstraktih, vezanih na sol (preglednica 13).

4.2.3 Interakcije med vrsto ekstrakta, ekstrakcijskim topilom in nosilcem ekstrakta

Preglednica 14: Interakcije med vrsto ekstrakta, topilom in nosilcem, povezano z ohranjanjem fenolnih spojin v koagulatih mesnih emulzij

Material	Topilo	Vsebnost skupnih fenolnih spojin
ekstrakt brinovih jagod	etanol:	škrob > sol
	etilacetat:	škrob > sol > olje
	metanol:	škrob > sol = olje
	voda:	škrob > sol
hmelj	etanol:	škrob > sol
	etilacetat:	škrob > sol > olje
	metanol:	škrob > sol > olje
	voda:	škrob > sol
Material	Nosilec	
ekstrakt brinovih jagod	olje:	etilacetat < metanol
	škrob:	etilacetat < voda < etanol = metanol
	sol:	etilacetat < voda = metanol < etanol
hmelj	olje:	etilacetat < metanol
	škrob:	etilacetat < voda < etanol = metanol
	sol:	etilacetat < voda < etanol = metanol
Nosilec	Topilo	
olje	etilacetat	brin < hmelj
	metanol	brin < hmelj
škrob	etanol	brin < hmelj
	etilacetat	brin < hmelj
	metanol	brin < hmelj
	voda	brin < hmelj
sol	etanol	brin < hmelj
	etilacetat	brin < hmelj
	metanol	brin < hmelj
	voda	brin < hmelj

Na vsebnost skupnih fenolnih spojin v mesnih emulzijah značilno vplivata sočasno ekstrakt, ekstrahiran z različnimi topili, in nosilec ekstrakta (preglednica 13). Drugače rečeno, fenolne spojine hmelja se najbolje ekstrahirajo v metanolni in etanolni ekstrakt, predvsem če so nato vezani na olje, škrob in sol ter uporabljeni za izdelavo mesnih emulzij. To pa ne velja za mesne emulzije z dodanimi metanolnimi ekstrakti brina, pri katerih smo določili največ skupnih fenolnih spojin le v primeru vezave na olje in škrob, ne pa v primeru vezave na sol. Največ skupnih fenolnih spojin se ohrani v mesnih emulzijah v primeru, da so ekstrakti hmelja vezani na škrob. Torej je z vidika ohranjanja fenolnih spojin najprimernejše uporabiti ekstrakte hmelja, jih ekstrahirati z metanolom ali etanolom in vezati na škrob (preglednica 14).

4.3 VSEBNOST HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV

Preglednica 15 prikazuje paralelne rezultate določanja HCA v kontrolnih mesnih emulzijah, v katere nismo dodali ekstraktov brinovih jagod in hmelja, so pa že po recepturi vsebovali določeno količino kuhinjske soli, sončničnega olja in koruznega škroba. V kontrolnih koagulatih mesnih emulzij smo po pečenju na dvoploščnem žaru s temperaturo plošč 240 °C in središčno temperaturo 80 °C določili deset predstavnikov HCA v skupni količini $58,40 \pm 0,86 \mu\text{g/kg}$. V največjem obsegu je zastopan MeIQx ($46,08 \pm 2,06 \mu\text{g/kg}$), sledi 7,8-DiMeIQx ($7,62 \pm 0,13 \mu\text{g/kg}$), PhIP ($2,21 \pm 0,02 \mu\text{g/kg}$) in norharman ($1,22 \pm 0,44 \mu\text{g/kg}$). Ostali HCA so v pečenih koagulatih mesnih emulzij prisotni v količini pod $1 \mu\text{g/kg}$, to so MeIQ, harman, A α C, Trp-P-2, Glu-P-2 in 4,8-DiMeIQx.

Preglednica 15: Vsebnost HCA ($\mu\text{g/kg}$) v kontrolnih koagulatih mesnih emulzij

HCA ($\mu\text{g/kg}$)	Kontrola 1	Kontrola 2	Povprečna vrednost
MeIQx	44,62	47,54	$46,08 \pm 2,06$
7,8-DiMeIQx	7,53	7,71	$7,62 \pm 0,13$
PhIP	2,19	2,22	$2,21 \pm 0,02$
norharman	0,91	1,53	$1,22 \pm 0,44$
MeIQ	1,01	0,62	$0,82 \pm 0,28$
harman	0,43	0,50	$0,47 \pm 0,05$
A α C	0,28	0,20	$0,24 \pm 0,06$
Trp-P-2	0,19	0,17	$0,18 \pm 0,01$
Glu-P-2	0,11	0,11	$0,11 \pm 0,00$
4,8-DiMeIQx	0,09	0,01	$0,05 \pm 0,06$
skupni HCA	57,37	61,42	$58,40 \pm 0,86$

V preglednici 16 je prikazan vpliv dodanih ekstraktov hmelja in brina, pridobljenih z različnimi topili in vezanih na različne nosilce, na tvorbo posameznih in skupnih HCA v mesnih emulzijah, pečenih na dvoploščnem žaru. Razvidno je, da v koagulatih mesnih emulzij vrsta nosilca, dodatek ekstrakta brina in hmelja z različnimi topili ter njuna interakcija značilno ($p < 0,001$) vplivajo na vsebnost MeIQx, PhIP, harmana, norharmana, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Glu-P-2, A α C in skupnih HCA. V koagulatih mesnih emulzij vrsta nosilca na vsebnost MeIQ in Trp-P-2 ne vpliva značilno.

V koagulatih mesnih emulzij z dodanimi ekstrakti brinovih jagod in hmelja smo po pečenju na dvoploščnem žaru s temperaturo plošč 240 °C in do središčne temperature 80 °C določili deset predstavnikov HCA v skupni količini med $66,96 \mu\text{g/kg}$ in $181,17 \mu\text{g/kg}$. V največjem obsegu je zastopan MeIQx ($56,08$ - $147,93 \mu\text{g/kg}$), sledi 7,8-DiMeIQx ($4,08$ - $27,69 \mu\text{g/kg}$) in PhIP ($1,18$ - $11,03 \mu\text{g/kg}$). Ostali HCA so v pečenih koagulatih

mesnih emulzij prisotni v količinah okoli 1 µg/kg, to pa so MeIQ, norharman, harman, AαC, Trp-P-2, Glu-P-2 in 4,8-DiMeIQx.

Preglednica 16: Vpliv dodatka ekstrakta brina in hmelja, ekstrahirana z različnimi topili, ter nosilca ekstrakta na vsebnost (LSM) HCA (µg/kg) v toplotno obdelanih koagulatih mesnih emulzij

HCA (µg/kg)	Ekstrakt	Topilo	Nosilec		SE	p vrednost
			olja	škrob		
MeIQ	brin	etanol		0,65 ^{aB}	0,38 ^{aCB}	0,02 $p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,194$ $p_{N \times ET} < 0,513$
		etilacetat	0,50 ^{aA}	0,41 ^{bCB}	0,44 ^{bCB}	
		metanol	0,50 ^{aA}	0,47 ^{aCB}	0,37 ^{bCB}	
		voda		0,93 ^{aA}	1,01 ^{aA}	
	hmelj	etanol		0,57 ^{aCB}	0,61 ^{aB}	
		etilacetat	0,50 ^{aA}	0,37 ^{bCB}	0,32 ^{bC}	
		metanol	0,29 ^{aB}	0,29 ^{aC}	0,33 ^{aC}	
		voda		0,41 ^{aCB}	0,34 ^{bC}	
MeIQx	brin	etanol		74,03 ^{aD}	84,53 ^{aED}	104,99 $p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,001$
		etilacetat	105,62 ^{aB}	57,83 ^{bE}	104,17 ^{aCB}	
		metanol	88,60 ^{bB}	56,08 ^{cE}	147,93 ^{aA}	
		voda		157,68 ^{aA}	116,48 ^{bB}	
	hmelj	etanol		109,74 ^{aB}	73,90 ^{bE}	
		etilacetat	142,62 ^{aA}	71,68 ^{cDE}	88,65 ^{bED}	
		metanol	97,77 ^{aB}	77,78 ^{bDC}	96,06 ^{aCD}	
		voda		91,70 ^{aC}	81,34 ^{bED}	
PhIP	brin	etanol		1,18 ^{aB}	1,85 ^{aCD}	3,31 $p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,001$
		etilacetat	1,75 ^{bB}	2,04 ^{bB}	3,46 ^{aB}	
		metanol	4,51 ^{baB}	6,75 ^{aA}	1,34 ^{bD}	
		voda		2,85 ^{bB}	4,36 ^{aA}	
	hmelj	etanol		2,99 ^{aB}	1,51 ^{bD}	
		etilacetat	2,01 ^{aB}	2,11 ^{aB}	1,34 ^{bD}	
		metanol	11,03 ^{aA}	1,20 ^{bB}	2,65 ^{bCB}	
		voda		3,22 ^{aB}	2,91 ^{aB}	
harman	brin	etanol		0,28 ^{bFE}	0,41 ^{aB}	< 0,01 $p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,001$
		etilacetat	0,50 ^{aBA}	0,25 ^{cF}	0,34 ^{bC}	
		metanol	0,42 ^{aB}	0,34 ^{bCD}	0,29 ^{bD}	
		voda		0,58 ^{aA}	0,58 ^{aA}	
	hmelj	etanol		0,47 ^{aB}	0,34 ^{bC}	
		etilacetat	0,52 ^{aA}	0,43 ^{bB}	0,28 ^{cD}	
		metanol	0,42 ^{aB}	0,32 ^{bDE}	0,38 ^{baCB}	
		voda		0,38 ^{aC}	0,37 ^{aCB}	
norharman	brin	etanol		0,55 ^{aD}	0,58 ^{aD}	< 0,01 $p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,001$
		etilacetat	0,65 ^{aC}	0,44 ^{bE}	0,66 ^{aC}	
		metanol	0,92 ^{aA}	0,73 ^{bC}	0,49 ^{cE}	
		voda		0,77 ^{bCB}	1,19 ^{aA}	
	hmelj	etanol		0,54 ^{bD}	0,83 ^{aB}	
		etilacetat	0,91 ^{ba}	1,17 ^{aA}	0,51 ^{cED}	
		metanol	0,82 ^{aB}	0,55 ^{bD}	0,80 ^{aB}	
		voda		0,86 ^{aB}	0,66 ^{bC}	

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 16: Vpliv dodatka ekstrakta brina in hmelja, ekstrahirana z različnimi topili, ter nosilca ekstrakta na vsebnost (LSM) HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih koagulatih mesnih emulzij

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ekstrakt	Topilo	Nosilec			SE	p vrednost
			olja	škrob	sol		
4,8-DiMeIQx	brin	etanol		0,02 ^{aC}	0,02 ^{aB}	0,02	$p_{\text{ET}} < 0,001$ $p_{\text{N}} < 0,001$ $p_{\text{N} \times \text{ET}} < 0,003$
		etilacetat	0,42 ^{aA}	0,02 ^{bC}	0,03 ^{bB}		
		metanol	0,02 ^{bB}	0,16 ^{aBC}	0,02 ^{bB}		
		voda		0,30 ^{aBAC}	0,34 ^{aA}		
	hmelj	etanol		0,39 ^{aBA}	0,13 ^{bB}		
		etilacetat	0,33 ^{aBA}	0,27 ^{aBAC}	0,05 ^{aB}		
		metanol	0,29 ^{aBA}	0,06 ^{aC}	0,08 ^{aB}		
		voda		0,50 ^{aA}	0,03 ^{bB}		
7,8-DiMeIQx	brin	etanol		5,94 ^{aC}	8,06 ^{aE}	0,96	$p_{\text{ET}} < 0,001$ $p_{\text{N}} < 0,001$ $p_{\text{N} \times \text{ET}} < 0,001$
		etilacetat	9,70 ^{bD}	4,45 ^{cD}	11,11 ^{aDC}		
		metanol	12,54 ^{bC}	4,08 ^{cD}	14,33 ^{aB}		
		voda		15,50 ^{ab}	14,99 ^{bB}		
	hmelj	etanol		18,70 ^{aA}	12,30 ^{bC}		
		etilacetat	27,69 ^{aA}	15,54 ^{bB}	15,32 ^{bB}		
		metanol	22,01 ^{aB}	14,66 ^{cB}	17,55 ^{bA}		
		voda		14,78 ^{ab}	10,27 ^{bD}		
Glu-P-2	brin	etanol		0,15 ^{aD}	0,18 ^{aFE}	< 0,01	$p_{\text{ET}} < 0,001$ $p_{\text{N}} < 0,001$ $p_{\text{N} \times \text{ET}} < 0,001$
		etilacetat	0,52 ^{aB}	0,13 ^{cD}	0,26 ^{bD}		
		metanol	0,53 ^{aB}	0,17 ^{cDC}	0,20 ^{bE}		
		voda		0,39 ^{aA}	0,45 ^{aA}		
	hmelj	etanol		0,21 ^{aC}	0,16 ^{bF}		
		etilacetat	0,54 ^{aB}	0,30 ^{cB}	0,41 ^{bB}		
		metanol	0,71 ^{aA}	0,27 ^{bB}	0,33 ^{bC}		
		voda		0,42 ^{aA}	0,36 ^{bC}		
A α C	brin	etanol		0,02 ^{aCB}	0,04 ^{aBA}	< 0,01	$p_{\text{ET}} < 0,001$ $p_{\text{N}} < 0,001$ $p_{\text{N} \times \text{ET}} < 0,001$
		etilacetat	0,05 ^{aB}	0,04 ^{bB}	0,01 ^{cB}		
		metanol	0,10 ^{aA}	0,02 ^{bCB}	0,02 ^{bB}		
		voda		0,03 ^{aCB}	0,04 ^{aBA}		
	hmelj	etanol		0,08 ^{aA}	0,06 ^{bA}		
		etilacetat	0,02 ^{bC}	0,02 ^{bCB}	0,03 ^{aBA}		
		metanol	0,02 ^{bC}	0,03 ^{bCB}	0,06 ^{aA}		
		voda		0,01 ^{aC}	0,06 ^{aA}		
Trp-P-2	brin	etanol		0,44 ^{aD}	1,36 ^{aA}	0,13	$p_{\text{ET}} < 0,001$ $p_{\text{N}} < 0,266$ $p_{\text{N} \times \text{ET}} < 0,001$
		etilacetat	1,66 ^{aA}	1,36 ^{baBC}	0,93 ^{bBAC}		
		metanol	0,71 ^{bB}	1,80 ^{aBA}	0,57 ^{bC}		
		voda		2,13 ^{aA}	1,38 ^{aA}		
	hmelj	etanol		1,27 ^{aC}	0,85 ^{bBAC}		
		etilacetat	1,23 ^{aBA}	0,77 ^{bD}	0,76 ^{bBC}		
		metanol	0,63 ^{aB}	0,34 ^{bD}	0,66 ^{aC}		
		voda		0,32 ^{bD}	1,33 ^{aBA}		

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 16: Vpliv dodatka ekstrakta brina in hmelja, ekstrahirana z različnimi topili, ter nosilca ekstrakta na vsebnost (LSM) HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih koagulatih mesnih emulzij

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ekstrakt	Topilo	olje	Nosilec		SE	<i>p</i> vrednost
skupni HCA	brin	etanol		85,76 ^{ad}	97,42 ^{ade}	103,92	$p_{\text{ET}} < 0,001$ $p_{\text{N}} < 0,001$ $p_{\text{N} \times \text{ET}} < 0,001$
		etilacetat	121,35 ^{acB}	66,96 ^{be}	121,40 ^{ac}		
		metanol	108,79 ^{bc}	70,60 ^{ce}	165,56 ^{aa}		
		voda		181,17 ^{aa}	140,83 ^{bb}		
	hmelj	etanol		134,88 ^{ab}	90,69 ^{be}		
		etilacetat	175,27 ^{aa}	92,65 ^{bd}	107,68 ^{bdc}		
		metanol	133,99 ^{ab}	95,50 ^{cd}	118,90 ^{bc}		
		voda		112,59 ^{ac}	97,66 ^{bde}		

Legenda: LSM – ocenjene srednje vrednosti; SE – standardna napaka ocene; p_{ET} , statistična verjetnost vpliva ekstrakta, ekstrahiranega z različnimi topili; p_{N} , statistična verjetnost vpliva vrste nosilca ekstrakta; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C,D,E,F,G}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi ekstrakti, ekstrahiranimi z različnimi topili).

4.3.1 Vpliv različnih ekstrakcijskih topil na vsebnost posameznih in skupnih HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij

Iz preglednice 16 je razvidno, da smo v koagulatih mesnih emulzij z dodanimi vodnimi in etanolnimi ekstrakti, vezanimi na škrob, določili največjo skupno vsebnost HCA (brin: 181,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 85,76 $\mu\text{g}/\text{kg}$; hmelj: 112,59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 134,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ter značilno manjšo in podobno pri dodanih metanolnih in etilacetatnih ekstraktih (brin: 70,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 66,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$; hmelj: 95,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 92,65 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Največjo vsebnost skupnih HCA smo ugotovili v emulzijah z dodanimi metanolnimi ekstrakti hmelja, vezanimi na sol (brin: 165,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$; hmelj: 118,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$), manjšo pri dodanih vodnih in etil-acetatnih ekstraktih brina (140,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 121,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ter etilacetatnih ekstraktih hmelja (107,68 $\mu\text{g}/\text{kg}$), najmanjšo pa v emulzijah z etanolnim ekstraktom brina (97,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oz. vodnih in etanolnih ekstraktih hmelja (97,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 90,69 $\mu\text{g}/\text{kg}$). V primeru, da je bil ekstrakt vezan na olje, smo v emulziji določili največjo skupno vsebnost HCA v primeru etilacetatnega (175,27 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in metanolnega (133,99 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ekstrakta hmelja, bistveno več kot pri etilacetatnih in metanolnih ekstraktih brina (121,35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 108,79 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

V pečenih emulzijah, ki smo jim dodali etanolne, etilacetatne in metanolne ekstrakte (ne velja za vodne ekstrakte) brina, vezane na škrob, je tvorba MeIQx in 7,8-DiMeIQx manjša kot z ekstrakti hmelja, pridobljenimi z enakimi ekstrakcijskimi topili in vezanimi na škrob (brin: 56,08-74,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. hmelj: 71,68-109,74 $\mu\text{g}/\text{kg}$; brin: 4,08-5,94 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. hmelj: 15,54-18,70 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Tvorba PhIP (1,18-3,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ni odvisna od uporabe ekstrakcijskega topila (nosilec ekstrakta škrob), izjema je le metanolni ekstrakt brina, ki v mesnih emulzijah bistveno ne zmanjša tvorbe PhIP (6,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Kadar pa smo emulzijam dodali etilacetatne, metanolne in vodne (ne velja za etanolne) ekstrakte hmelja, vezane na sol, se je v primerjavi z ekstrakti brina, pridobljenimi z enakimi topili in prav tako vezanimi na sol, tvorila manjša količina MeIQx (hmelj: 81,34-96,06 µg/kg vs. brin: 104,17-147,93 µg/kg). Na manjšo količino nastalega PhIP je prav tako vplivala kombinacija etanolnih, etilacetatnih in vodnih ekstraktov hmelja, vezanih na sol (ne velja za metanolne ekstrakte, kjer je obratno) v primerjavi z brinovimi ekstrakti enakih topil, na soli kot nosilcu, ki niso tako učinkoviti zaviralci tvorbe PhIP kot omenjeni ekstrakti hmelja (hmelj: 1,34-2,91 µg/kg vs. brin: 1,34-4,36 µg/kg). Dodatek etanolnih, etilacetatnih in metanolnih ekstraktov brina, vezanih na sol, je zmanjšal tvorbo 7,8-DiMeIQx v primerjavi z dodajanjem ekstraktov hmelja enakih topil (brin: 8,06-14,33 µg/kg vs. hmelj: 12,30-17,55 µg/kg).

Metanolni ekstrakti brina in hmelja in etilacetatni ekstrakt brina, vezani na olje, v večji meri zmanjšajo tvorbo MeIQx v pečenih mesnih emulzijah kot etilacetatni ekstrakt hmelja, vezan na olje (88,60 µg/kg, 97,77 µg/kg in 105,62 µg/kg vs. 142,62 µg/kg). Metanolni ekstrakt hmelja, vezan na olje, v manjši meri zmanjša tvorbo PhIP kot etilacetatni ekstrakti brina in hmelja ter metanolni ekstrakt brina (11,03 µg/kg vs. 1,75 µg/kg, 2,01 µg/kg in 4,51 µg/kg). Tvorbo 7,8-DiMeIQx etil-acetatni in metanolni ekstrakti brina, vezani na olje, intenzivneje zavirajo kot omenjeni ekstrakti hmelja vezani na isti nosilec (9,70 in 12,54 µg/kg vs. 27,69 in 22,01 µg/kg).

4.3.2 Vpliv nosilca ekstraktov na vsebnost posameznih in skupnih HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij

V pečenih emulzijah, ki smo jim dodali etilacetatne in metanolne ekstrakte brina in hmelja, vezane na škrob, je tvorba MeIQx manjša kot z ekstrakti, vezanimi na sol in olje (škrob: brin, 56,08 µg/kg in 56,08 µg/kg, hmelj, 71,68 µg/kg in 77,78 µg/kg, sol: brin, 84,53 µg/kg in 147,93 µg/kg, hmelj, 88,65 µg/kg in 96,06 µg/kg; olje; brin 105,61 µg/kg in 88,60 µg/kg, hmelj, 142,62 µg/kg in 97,77 µg/kg). V primeru vezave etanolnih in vodnih ekstraktov na škrob se v pečenih mesnih emulzijah tvori več MeIQx kot v primeru vezave na sol, izjema je le etanolni brinov ekstrakt, kjer je razlika obratna, a neznačilna (škrob: brin, 74,03 µg/kg in 157,68 µg/kg, hmelj, 109,74 µg/kg in 91,70 µg/kg, sol: brin, 84,53 µg/kg in 116,48 µg/kg, hmelj, 73,90 µg/kg in 81,34 µg/kg).

Etanolni in etilacetatni ekstrakti brina, vezani na škrob, zmanjšajo tvorbo PhIP v primerjavi z omenjeni ekstrakti, vezanimi na sol (1,18 µg/kg in 2,04 µg/kg vs. 1,85 µg/kg in 3,46 µg/kg). Obratno velja pri hmeljevih ekstraktih omenjenih topil, kjer sol kot nosilec uspešneje zmanjša tvorbo PhIP v primerjavi s škrobom (1,51 µg/kg in 1,34 µg/kg vs. 2,99 µg/kg in 2,11 µg/kg).

Na zmanjšanje tvorbe 7,8-DiMeIQx v pečenih emulzijah podobno in v večji meri vplivajo etilacetatni in metanolni ekstrakti brina, vezani na škrob, v primerjavi z enakimi ekstrakti, vezanimi na sol (4,45 µg/kg in 4,08 µg/kg vs. 11,11 µg/kg in 14,33 µg/kg). Etilacetatni, metanolni in vodni ekstrakti hmelja vplivajo na zmanjšanje tvorbe 7,8-DiMeIQx (14,66-15,54 µg/kg), pri čemer je vezava omenjenih ekstraktov manj učinkovita pri vezavi na škrob kot na sol (10,27-15,32 µg/kg), razen metanolnih ekstraktov hmelja, ki so pri vezavi na škrob učinkovitejši zaviralci tvorbe omenjenih HCA.

Če so etilacetatni ekstrakti brina vezani na olje in sol, se v pečeni emulziji tvori podobna količina skupnih HCA, vendar večja količina kot v emulziji omenjenih ekstraktov, vezanih na škrob (121,35 µg/kg in 121,40 µg/kg vs. 66,96 µg/kg). Podobna je količina nastalih skupnih HCA, ko so etil-acetatni ekstrakti hmelja, vezani na škrob in sol (92,65 µg/kg in 107,68 µg/kg). Podobna količina skupnih HCA se tvori tudi med pečenjem emulzij, ki so jim dodani etanolni ekstrakti brina, vezani na škrob in sol (85,76 in 97,42 µg/kg).

4.3.3 Interakcija med vrsto ekstrakta, ekstrakcijskim topilom in nosilcem

Na tvorbo skupnih HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij značilno vplivata sočasno rastlinska ekstrakta, ekstrahirana z različnimi topili in nosilci ekstraktov (preglednica 16). Drugače rečeno, najmanj skupnih HCA se tvori v pečenih mesnih emulzijah, v katere smo dodali etilacetatne in metanolne ekstrakte, predvsem, če so nato vezani na škrob, v primeru etanolnih ekstraktov pa tudi na sol. Če pa upoštevamo še dejstvo, da se največ skupnih HCA tvori v pečenih mesnih emulzijah z ekstrakti hmelja, vezanega na škrob, lahko oblikujemo sklep. Torej, z vidika zmanjševanja tvorbe HCA v pečenih mesnih emulzijah je najprimernejše uporabiti etilacetatne in metanolne ekstrakte brina in hmelja, vezane na škrob, etanolne ekstrakte brina in hmelja, vezane na sol, ter etanolne brinove ekstrakte, vezane na škrob (preglednica 17).

Nobena izmed interakcij pa ni zmanjšala tvorbe skupnih ali posameznih HCA pod vrednost, ki smo jo dobili v kontrolnih vzorcih, ki niso vsebovali dodatka ekstrakta ali drugih dodanih komponent, ki bi lahko vplivale na zmanjšanje tvorbe HCA.

Preglednica 17: Zbirna preglednica, ki prikazuje povezavo med vrsto ekstrakta, topilom in nosilcem, povezano z zmanjševanjem tvorbe HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij

Material	Topilo	Tvorba HCA
ekstrakt brinovih jagod	etanol:	škrob = sol
	etilacetat:	škrob < sol = olje
	metanol:	škrob < olje < sol
	voda:	sol < škrob
hmelj	etanol:	sol < škrob
	etilacetat:	škrob = sol < olje
	metanol:	škrob < sol < olje
	voda:	sol < škrob
Material	Nosilec	
ekstrakt brinovih jagod	olje:	metanol < etil-acetat
	škrob:	etilacetat = metanol < etanol = voda
	sol:	etanol < etilacetat < voda < metanol
hmelj	olje:	metanol < etilacetat
	škrob:	etilacetat = metanol < voda < etanol
	sol:	etanol = voda < etilacetat = metanol
Nosilec	Topilo	
olje	Etilacetat	brin < hmelj
	Metanol	brin < hmelj
škrob	etanol	brin < hmelj
	etilacetat	brin < hmelj
	Metanol	brin < hmelj
	Voda	hmelj < brin
sol	etanol	brin = hmelj
	etilacetat	brin = hmelj
	Metanol	hmelj < brin
	Voda	hmelj < brin

Legenda: prečrtano – nesprejemljivo zaradi drugega pogoja

4.4 SENZORIČNA ANALIZA

Poskus smo opravili na dveh ponovitvah, senzorično analizo pa smo izvedli samo na eni ponovitvi. Senzorična analiza koagulatov v našem poskusu ni bila osrednja naloga, ampak smo z njo želeli pridobiti le osnovne informacije o sprejemljivosti izdelanih emulzij. Senzorični panel štirih preskuševalcev, ki dobro poznajo področje ocenjevanja mesnih izdelkov, je naenkrat ovrednotil po en vzorec iz vsake od dvaindvajsetih eksperimentalnih skupin. Ker se mesne emulzije v mesni industriji uporabljajo za izdelavo barjenih klobas, ki se običajno uživajo hladne, so preskuševalci ocenili hladne koagulate mesnih emulzij in ne pečenih, na katerih so bile opravljene samo analize vsebnosti posameznih in skupnih HCA.

Preglednica 18: Vpliv dodatka ekstrakta brina in hmelja, ekstrahirana z različnimi toplili, ter nosilcev ekstrakta na aromo (LSM) toplotno obdelanih mesnih emulzij

Lastnost (0-4)	Ekstrakt	Topilo	Nosilec			SE	p vrednost
			olja	škrob	sol		
tuji vonji	brin	etanol		0,6 ^B	0,6	0,2	$p_{ET} < 0,004$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,084$
		etilacetat	1,9 ^{aB}	0,6 ^{bB}	0,6 ^b		
		metanol	2,6 ^{aA}	0,9 ^{bB}	0,9 ^b		
		voda		1,9 ^{aA}	0,9 ^b		
	hmelj	etanol		1,0 ^B	0,8		
		etilacetat	2,9 ^{aA}	0,5 ^{bB}	0,9 ^b		
		metanol	2,5 ^{aBA}	0,5 ^{bB}	0,5 ^b		
		voda		1,0 ^B	0,6		
tuje arome	brin	etanol		0,9 ^B	0,8	0,2	$p_{ET} < 0,019$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,004$
		etilacetat	2,4 ^{aB}	0,9 ^{bB}	0,6 ^b		
		metanol	2,9 ^{aBA}	0,9 ^{bB}	1,1 ^b		
		voda		2,4 ^{aA}	0,6 ^b		
	hmelj	etanol		1,0 ^B	0,8		
		etilacetat	3,3 ^{aA}	0,8 ^{bB}	1,0 ^b		
		metanol	2,9 ^{aBA}	1,1 ^{bB}	0,6 ^b		
		voda		1,1 ^B	0,5		
aroma brina	brin	etanol		0,0 ^{bB}	0,8 ^{aBA}	0,1	$p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,001$
		etilacetat	1,0 ^a	0,5 ^{baBA}	0,3 ^{bBC}		
		metanol	1,0 ^a	0,0 ^{bB}	0,5 ^{baBAC}		
		voda		1,0 ^A	1,0 ^A		
	hmelj	etanol		0,0 ^B	0,0 ^C		
		etilacetat	1,0 ^a	0,8 ^{aA}	0,0 ^{bC}		
		metanol	1,0 ^a	0,0 ^{bB}	0,8 ^{aBA}		
		voda		0,5 ^{aBA}	0,0 ^{aC}		
aroma hmelja	brin	etanol		1,0 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,1	$p_{ET} < 0,001$ $p_N < 0,001$ $p_{N \times ET} < 0,001$
		etilacetat	0,0 ^{bA}	0,5 ^{baBA}	0,8 ^{aA}		
		metanol	0,0 ^{bA}	1,0 ^{aA}	0,3 ^{bB}		
		voda		0,0 ^B	0,0 ^B		
	hmelj	etanol		0,8 ^A	0,5 ^{BA}		
		etilacetat	0,0 ^{bA}	0,0 ^{bB}	1,0 ^{aA}		
		metanol	0,0 ^{bA}	0,8 ^{aA}	0,0 ^{bB}		
		voda		0,5 ^{aBA}	1,0 ^{aA}		

Legenda: SE – standardna napaka ocene; p_{ET} , statistična verjetnost vpliva ekstrakta, ekstrahiranega z različnimi toplili; p_N , statistična verjetnost vpliva vrste nosilca ekstrakta; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi nosilci ekstrakta); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C,D,E,F,G}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi ekstrakti, ekstrahiranimi z različnimi toplili).

Iz preglednice 18 lahko razberemo, da so bili koagulati emulzij iz prašičjega mesa, izdelani z različnimi ekstrakti in toplili ter vezani na različne nosilce, ocenjeni na lestvici od 0 do 4. Največja napaka ocene (0,2) je bila izračunana pri ocenah vonja, kar je pričakovano, saj ekstrakti zaradi tipičnega in lahko prepoznavnega vonja vplivajo na omenjene lastnosti.

4.4.1 Vpliv različnih ekstrakcijskih topil na tuje vonje in arome v koagulatih mesnih emulzij

Preskuševalci so ocenili, da se najintenzivnejše oblikujejo tuji vonji v emulzijah z dodanimi etilacetatnimi in metanolnimi ekstrakti hmelja in brina, vezanimi na olje, in sicer (od možnih štirih) z vrednostmi od 2,5 do 2,9 (razen etilacetatnega ekstrakta brina z manjšo vrednostjo 1,9). Manj izstopajoče tuje vonje v emulzijah so preskuševalci opazili v primeru dodanih etanolnih, etil-acetatnih, metanolnih in vodnih ekstraktov brina in hmelja, vezanih na škrob, z vrednostmi med 0,5–1,0 (razen vodni ekstrakt brina z vrednostjo 1,9). Ekstrakti, vezani na sol, v emulzijah puščajo najmanj tujih vonjev, ocenjeni so bili z vrednostmi med 0,5 in 0,9.

Preskuševalci so ocenili, da se najintenzivnejše oblikujejo tuje arome v emulzijah z dodanimi etilacetatnimi in metanolnimi ekstrakti brina in hmelja, vezanimi na olje, in sicer v vrednostih med 2,4 in 2,9, razen etil-acetatnega ekstrakta hmelja, ki z vrednostjo 3,3 izraža najintenzivnejše tuje arome. Manj izstopajoče tuje arome v emulzijah so preskuševalci opazili v primeru dodanih etanolnih, etilacetatnih, metanolnih in vodnih ekstraktov brina in hmelja, vezanih na škrob z vrednostmi med 0,8 in 1,1, ter sol z vrednostmi med 0,5 in 1,1, razen vodnega ekstrakta brina, vezanega na škrob, ki po intenzivnosti izstopa z vrednostjo 2,4.

Aromo po brinovih jagodah (aromo brina) so preskuševalci zaznali v skoraj vseh eksperimentalnih emulzijah, z izjemo etanolnega in metanolnega ekstrakta brina, vezanega na škrob. Aromo po hmelju so preskuševalci zaznali v emulzijah z dodanimi etanolnimi in vodnimi (v primeru soli tudi etilacetatnimi in škroba tudi metanolnimi) ekstrakti hmelja, vezanimi na škrob in sol, ne pa na olje. Preskuševalci so velikokrat tudi zamenjevali aromo brina in hmelja, saj so v emulzijah z brinovimi ekstrakti zaznali aromo po hmelju (v primeru vezave etilacetatnih in metanolnih ekstraktov na olje, etilacetatnih na škrob, metanolnih na sol in vodnih ekstraktov na škrob), in obratno, v emulzijah s hmeljevimi ekstrakti zaznali aromo po brinu (v primeru vezave etilacetatnih in metanolnih ekstraktov na škrob in sol ter etanolnih ekstraktov na škrob).

4.4.2 Vpliv dodatka nosilca ekstrakta na tuje vonje in arome v koagulatih mesnih emulzij

Preskuševalci so ocenili, da se tuji vonji in arome najmočneje izražajo v mesnih emulzijah z etilacetatnimi in metanolnimi ekstrakti brina in hmelja, vezanimi na olje, značilno manj v primeru vezave na škrob in sol, pa tudi vodnega ekstrakta brina, vezanega na škrob.

Ocene ločenih zaznav arome brina in hmelja so najverjetneje zaradi podobnosti pogosto nepravilne, predvsem pri vezavi hmeljnih ekstraktov na olje so preskuševalci zaznali

močno aromo brina, pa tudi pri vezavi na škrob in sol so aromi velikokrat zamenjali. Izjema je zaznana aroma brina vseh ocenjevalcev v vodnih ekstraktih brina, vezanega na škrob in sol ter nezaznavne arome brina v etanolnih ekstraktih hmelja, vezanih na omenjena nosilca.

Torej, z vidika ohranjanja senzorične kakovosti mesnih emulzij je najprimerneje uporabiti etanolne in etilacetatne ekstrakte brina in hmelja, vezane na škrob in sol, metanolne ekstrakte brina, vezane na škrob, vodne ekstrakte brina, vezane na sol, metanolne in vodne ekstrakte hmelja, vezane na sol (preglednica 19).

Preglednica 19: Zbirna preglednica, ki prikazuje interakcijo med vrsto ekstrakta, topilom in nosilcem, povezano z oceno* tujih vonjev in arom v koagulatih mesnih emulzij

Material	Topilo	Tuji vonji	Tuje arome
ekstrakt brinovitih jagod	etanol:	škrob = sol	sol = škrob
	etilacetat:	škrob = sol < olje	sol = škrob < olje
	metanol:	škrob = sol < olje	škrob = sol < olje
	voda:	sol = škrob	sol < škrob
hmelj	etanol:	sol = škrob	sol = škrob
	etilacetat:	škrob = sol < olje	sol = škrob < olje
	metanol:	škrob = sol < olje	sol = škrob < olje
	voda:	sol = škrob	sol = škrob
Material	Nosilec		
ekstrakt brinovitih jagod	olje:	etilacetat < metanol	etilacetat = metanol
	škrob:	etanol = etilacetat = metanol < voda	etanol = etilacetat = metanol < voda
	sol:	etanol = etilacetat = metanol = voda	voda = etilacetat = etanol = metanol
hmelj	olje:	metanol = etilacetat	metanol = etilacetat
	škrob:	etilacetat = metanol = etanol = voda	etilacetat = etanol = metanol = voda
	sol:	metanol = voda = etanol = etilacetat	voda = metanol = etanol = etilacetat
Nosilec	Topilo		
olje	etilacetat:	brin < hmelj	brin < hmelj
	metanol:	hmelj = brin	brin = hmelj
škrob	etanol:	brin = hmelj	brin = hmelj
	etilacetat:	hmelj = brin	hmelj = brin
	metanol:	brin = hmelj	brin = hmelj
	voda:	hmelj < brin	hmelj < brin
sol	etanol:	hmelj = brin	brin = hmelj
	etilacetat:	brin = hmelj	brin = hmelj
	metanol:	hmelj = brin	hmelj = brin
	voda:	hmelj = brin	hmelj = brin

Legenda: * sprejemljivo pri vrednosti 1 ali manj, prečrtano – nesprejemljivo zaradi drugega pogoja

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Osnovni namen naloge je bil ugotoviti vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov brina in hmelja, vezanih na različne nosilce, na tvorbo heterocikličnih aminov (HCA) med pečenjem na dvoploščnem žaru. Vpliv rastlinskih ekstraktov smo vrednotili glede na vir ekstrakta, uporabljeno ekstrakcijsko topilo in nosilec ekstrakta. Predvidevali smo, da bo posamezna kombinacija učinkovine, topila in nosilca optimalno zmanjšala neželene produkte (HCA), ob tem pa bo emulzija senzorično sprejemljiva za potrošnika.

Iz dneva v dan narašča izpostavljenost potencialno nevarnim in škodljivim snovem, med katerimi so trenutno najbolj aktualne prav spojine iz skupine HCA. Raziskovalci so dokazali njihov visok mutageni in karcinogeni potencial, kar lahko vodi do poškodb DNA in nastanka raka na različnih organih (Persson in sod., 2003; Oz in sod., 2010; Quelhas in sod., 2010).

HCA se poleg nastajanja v kondenzatu tobačnega dima in izpušnih plinih tvorijo predvsem med toplotno obdelavo mesa in rib. Količina je odvisna od vrste mesa, temperature, trajanja in načina toplotne obdelave. Veliko študij govori o zmanjšanju omenjenih neželenih snovi z uporabo sintetičnih in naravnih antioksidantov, ki obenem vplivajo na senzorične lastnosti in kakovost izdelka. Številne študije kažejo, da lahko dodatki različnih ekstraktov z antioksidativnim potencialom zmanjšajo tvorbo HCA (Nauwelaers in sod., 2011; Rounds in sod., 2013; Turesky, 2007).

5.1.1 Vsebnost skupnih fenolnih snovi

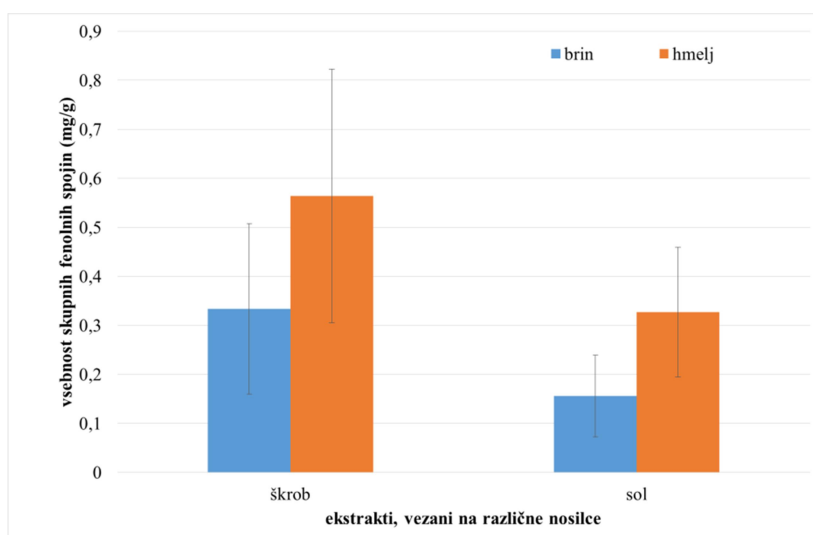
Veljović in sod. (2011) so določili vsebnost skupnih fenolnih snovi v pivu z dodatki različnih količin brinovih jagod in jih izrazili v mg galne kisline v 1 litru piva. Vsebnosti skupnih fenolnih spojin v kontrolnem vzorcu (samo pivina brez brinovih jagod ali drugih dodatkov) z vzorci piva z dodanimi tremi različnimi koncentracijami brinovih jagod (0,24, 0,48 in 72 g brinovih jagod na 1 l čiste pivine). Kontrolni vzorec je vseboval $385,6 \pm 6,6$ mg fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina v litru piva, vzorec z dodanimi 72 g jagod pa $450,0 \pm 3,1$ mg/l.

Arsene in sod. (2015) so v raziskavi poleg antimikrobne in antioksidativne aktivnosti v etanolnem ekstraktu hmelja določili tudi vsebnost skupnih fenolnih spojin z Folin-Ciocalteu metodo. Koncentracijo skupnih fenolov so izrazili v mg galne kisline v g suhe teže listov hmelja, in sicer je v omenjeni raziskavi znašala $151,42 \pm 23,97$ mg/g.

Kratchanova in sod. (2010) so v raziskavi med drugim primerjali vsebnost skupnih fenolnih snovi v ekstraktu hmelja, ekstrahiranim z vodo in acetonom, ter ugotovili, da je aceton bistveno boljše topilo (5728 ± 262 vs. 1697 ± 25 mg galne kisline/100 g suhe mase hmelja).

V magistrski nalogi pa smo pri določanju vsebnosti skupnih fenolnih spojin z omenjeno metodo ugotovili, da hmeljni ekstrakti, vezani na nosilce, v povprečju vsebujejo večjo koncentracijo omenjenih snovi kot brinovi ($444,38$ vs. $263,11$ μg galne kisline/g ekstrakta na nosilcu).

Prav tako lahko iz rezultatov na sliki 4 zaključimo, da je škrob najboljši nosilec ekstrahiranih spojin, ne glede na ekstrakcijsko topilo. Če upoštevamo še ugotovitve iz preglednice 16, pa je z vidika ohranjanja fenolnih spojin najprimernejše uporabiti ekstrakte hmelja, jih ekstrahirati z metanolom ali etanolom in vezati na škrob.



Slika 4: Primerjava vsebnosti skupnih fenolnih snovi hmeljevih in brinovih ekstraktov, vezanih na škrob in sol

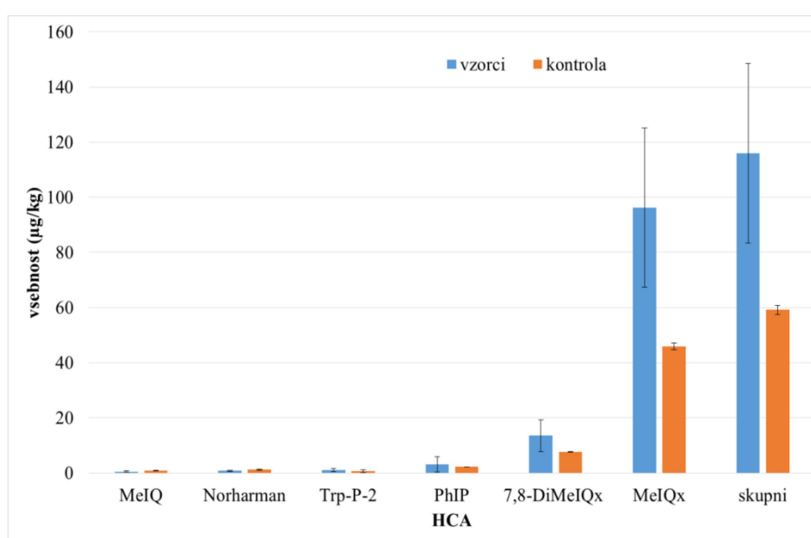
5.1.2 Vsebnost HCA

Temperatura, potrebna za tvorbo znatne količine HCA, je med 150 in 250 °C. Pri omenjenih temperaturah se običajno tvorijo polarni HCA, pri višjih temperaturah pa se tvorijo predvsem nepolarni HCA, produkti pirolize (Murkovic, 2004).

V našem poskusu smo v mesnih emulzijah po toplotni obdelavi na dvoploščnem žaru z metodo HPLC določili vsebnost HCA. Od skupnih HCA s povprečno vrednostjo 115,98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ je analiziran vzorec emulzij v povprečju vseboval MelQx (96,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 7,8-DiMeIQx (13,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in PhiP (3,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$). V manjših količinah smo določili tudi Tr-

P-2 (1,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$), norharman (0,73 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in MeIQ (0,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Iz rezultatov je razvidno, da 83 % vseh nastalih HCA med toplotno obdelavo emulzije predstavlja MeIQx, več kot 11 % 7,8-DiMeIQx, ostali HCA, ki smo jih analizirali in zaznali, pa predstavljajo le okrog 6 %.

Damchevska (2015) je v toplotno obdelanem piščančjem mesu določila bistveno manjše vsebnosti posameznih HCA, saj so piščančji fileji z dodanimi brinovimi ekstrakti v enem kilogramu v povprečju vsebovali 25 μg HCA. Janžekovič (2015) pa je v govejih pleskavicah z dodatkom hmeljevih ekstraktov, vezanih na sol, določila povprečno 82,55 μg HCA/kg mesa.



Slika 5: Povprečne vsebnosti posameznih in skupnih HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v pečenih mesnih emulzijah

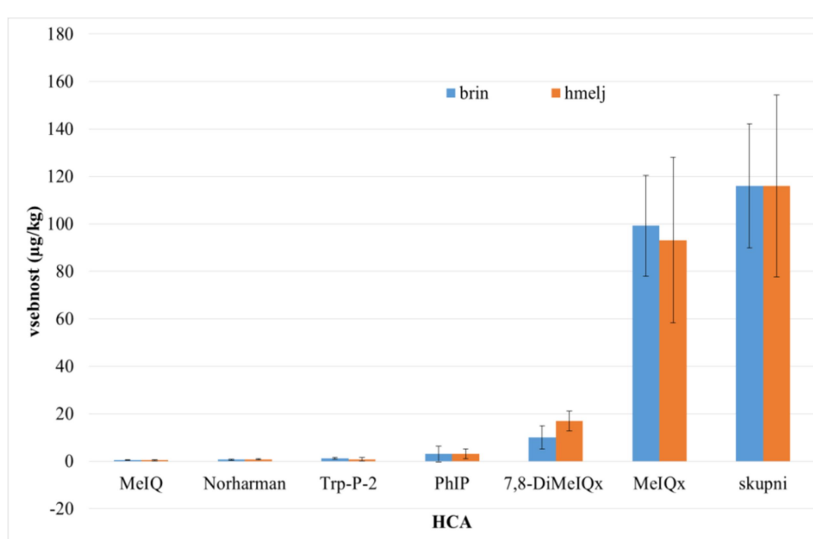
Na tvorbo HCA v našem poskusu so vplivali ekstrakti hmelja in brina, ekstrahirani z različnimi topili, vrsta nosilca in njihova interakcija. Zelo relativno in težavno je primerjati rezultate naše študije z rezultati podobnih študij. Kompleksnost in prilagajanje načinu izvedbe posamezne analize oz. poskusa, kar zavzema pripravo vzorcev in njihovo kakovost, pogoji in potek metode so dejavniki, ki neposredno primerjavo praktično onemogočajo. Med dejavnike uvrščamo na primer:

- geografsko poreklo učinkovine in način pridelave, ki vplivata na koncentracijo fenolnih snovi,
- vzreja, zakol in priprava mesa,
- delovne pogoje in naprave (vlažnost, temperatura, način mešanja, natančnost tehtanja ...),
- trajanje procesa analize in posameznih stopenj,
- način toplotne obdelave in natančnost merjenja temperatura/čas,
- natančnost čiščenja itd.

Ključen podatek o dodajanju ekstraktov v emulzije pa jasno nakazuje, da omenjene učinkovine po toplotni obdelavi dodatno povečajo tvorbo HCA v primerjavi z kontrolnimi vzorci, ki niso vsebovali dodatka ekstraktov, kar je razvidno iz preglednic 15 in 16, saj kontrolni vzorci povprečno vsebujejo manjšo vsebnost HCA kot vzorci z dodatki ekstraktov brina in hmelja. Sklepamo lahko, da bi z novimi poskusi, v katerih bi povečali spekter koncentracij ekstraktov, povečali dodatek ekstraktov v emulzije, optimizirali temperaturne režime toplotne obdelave in druge podobne dejavnike, lahko dosegli zmanjšanje tvorbe HCA. Torej, v našem poskusu smo sicer dokazali, da je pri dodatku ekstrakta v emulzije prišlo do povečane tvorbe HCA, vendar glede na že izvedene druge raziskave upravičeno lahko pričakujemo, da bi z natančnejšim načinom vzorčenja in optimiziranjem interakcij učinkovin, topila in nosilca, zmanjšali tvorbo HCA.

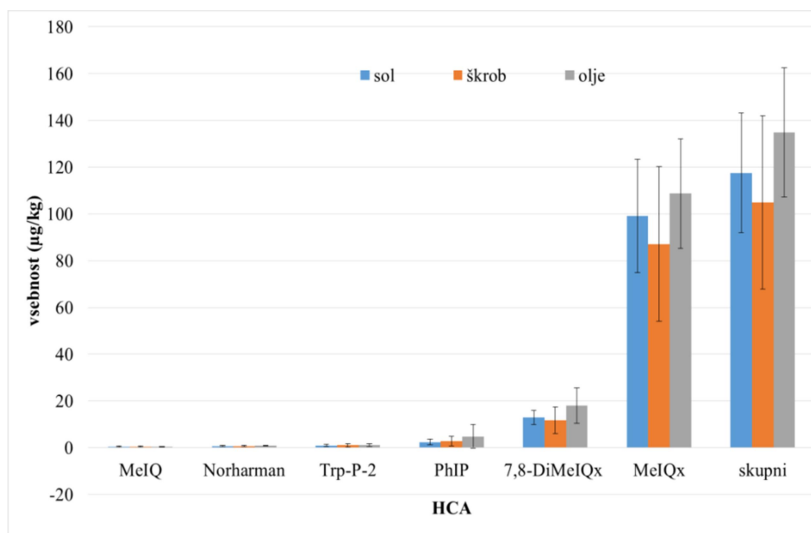
5.1.2.1 Vpliv ekstraktov, ekstrahiranih z različnimi topili, na tvorbo HCA

Slika 6 prikazuje razlike v vsebnosti posameznih in skupnih HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah z dodanimi ekstrakti brina in hmelja ne glede na vrsto topila in nosilca. V poskusu se je izkazalo, da ekstrakti brinovih jagod povprečno v emulzijah po toplotni obdelavi v enaki meri povečajo tvorbo HCA kot hmeljevi ekstrakti. Boljši ekstrakcijski topili v primerjavi z vodo in etilacetatom predstavljata metanol in etanol, kar smo lahko že predvideli iz poglavja 4.2, saj v večji meri ekstrahirata fenolne spojine. Pomembne razlike v tvorbi HCA opazimo šele, če upoštevamo vezavo ekstraktov na razne nosilce; takrat se v primeru ekstraktov brina, vezanega na olje in škrob, tvori nekoliko manj posameznih in skupnih HCA kot v primeru ekstraktov hmelja. V primeru vezave ekstraktov na sol pa je ravno obratno (preglednica 16).



Slika 6: Primerjava vpliva ekstraktov brina in hmelja na vsebnost posameznih in skupnih HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah ne glede na vrsto topila in nosilca

5.1.2.2 Vpliv nosilcev na tvorbo HCA



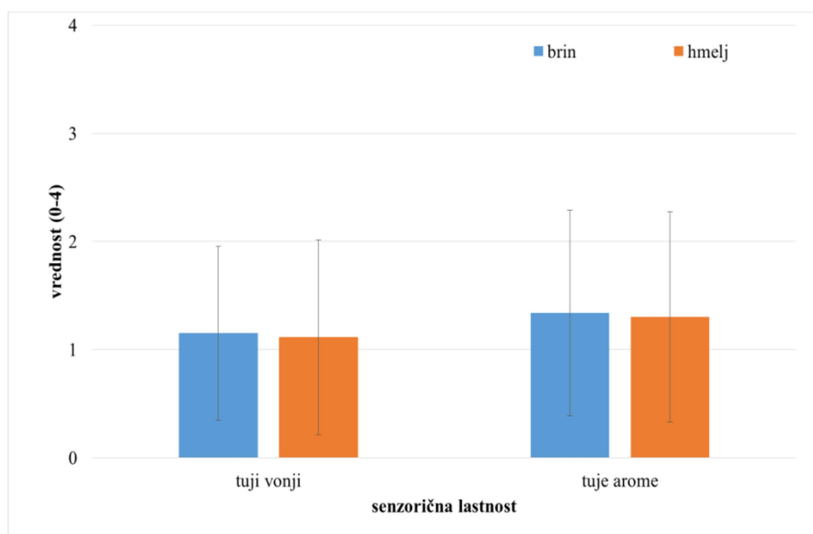
Slika 7: Vpliv nosilcev na vsebnosti posameznih in skupnih HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah ne glede na vrsto ekstrakta in ekstrakcijskega topila

Kakor same učinkovine rastlin in topilo, s katerim smo te učinkovine ekstrahirali, pomembno vlogo pri učinkovitosti rastlin igra tudi nosilec, na katerega ekstrahirano učinkovino vežemo in ga v nadaljevanju dodamo v emulzijo. Tako je posamezna snov ali interakcija teh snovi vplivala na najmanjše povečanje HCA po toplotni obdelavi emulzije. Škrob velja za učinkovitejši nosilec kot sol, olje pa, po rezultatih sodeč (slika 7), najslabše veže fenolne spojine, kar pomeni, da so ekstrakti, vezani na škrob, v povprečju manj povečali tvorbo HCA v primerjavi z ekstrakti, katerih nosilec sta bila sol in olje.

5.1.3 Senzorična analiza

Poleg osnovnega cilja naše naloge – določanja vsebnosti HCA v mesnih emulzijah z dodatki fenolnih snovi preko brinovih in hmeljevih ekstraktov – smo izvedli tudi senzorično analizo kakovosti proizvedenih eksperimentalnih skupin mesnih emulzij. Rezultati teh analiz so ključnega pomena, saj nam povedo, ali je izdelek sploh primeren in sprejemljiv za potrošnika.

Tuje arome in tuji vonji v emulzijah so bili v največji meri zaznani v pripravkih, katerih ekstrakti brina ali hmelja so bili predhodno vezani na olje, manj na škrob, najmanj pa so bili izraziti v emulzijah, ki so imele ekstrakt vezan na sol (slika 8).



Slika 8: Primerjava intenzivnosti izraženih tujih vonjev in arom v mesni emulziji

5.1.4 Zaključne ugotovitve

Pri oblikovanju zaključnih ugotovitev o izbiri optimalno pridobljenega rastlinskega ekstrakta za zmanjšanje tvorbe HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij iz prašičjega mesa smo izhajali iz naslednji predpostavk, ki so zaradi poenostavitve prikazane tudi v preglednici 20:

- fenolne spojine brinovih jagod in hmelja se z metanolom in etanolom ekstrahirajo v večjem obsegu kot z etil-acetatom in vodo;
- več skupnih fenolnih spojin se veže na škrob, manj na sol in najmanj na olje;
- ekstrakt brinovih jagod vsebuje več skupnih fenolnih spojin kot ekstrakt hmelja;
- iz vidika ohranjanja fenolnih spojin je najprimerneje uporabiti metanolne in etanolne ekstrakte hmelja, vezane na škrob (preglednica 14);
- manj skupnih HCA se tvori pri uporabi etil-acetatnih, metanolnih in etanolnih ekstraktov kot pri uporabi vodnih ekstraktov;
- manj skupnih HCA se tvori pri uporabi ekstraktov, vezanih na škrob, več pri vezavi na sol, največ pa pri vezavi na olje;
- manj skupnih HCA se tvori pri uporabi ekstraktov brinovih jagod, vezanih na olje in škrob, kot pri uporabi ekstrakta hmelja; pri uporabi soli kot nosilca je obratno;
- z vidika zmanjševanja tvorbe HCA je najprimerneje uporabiti etilacetatne in metanolne ekstrakte brina in hmelja, vezane na škrob, etanolne ekstrakte brina in hmelja, vezane na sol, ter etanolne brinove ekstrakte, vezane na škrob (preglednica 17);
- tuji vonji in arome so bolj izraženi pri uporabi vodnih in metanolnih brinovih ekstraktov ter pri uporabi vodnih in etil-acetatnih ekstraktov hmelja;

- tuji vonji in arome so bolj izraženi pri uporabi ekstraktov, vezanih na olje kot na sol in škrob;
- ekstrakti brinovih jagod in hmelja puščajo tuje vonje in arome;
- z vidika ohranjanja senzorične kakovosti mesnih emulzij je najprimerneje uporabiti etanolne in etilacetatne ekstrakte brina in hmelja, vezane na škrob in sol, metanolne ekstrakte brina, vezane na škrob, vodne ekstrakte brina, vezane na sol, metanolne in vodne ekstrakte hmelja, vezane na sol (preglednica 19).

Preglednica 20: Izbira najprimernejšega ekstrakta na osnovi rezultatov našega poskusa

Ekstrakt	Topilo/nosilec	Primernost mesne emulzije		
		olje	škrob	sol
brinove jagode	<i>etanol</i>	×	HCA S	HCA S
	<i>etilacetat</i>	–	HCA S	S
	<i>metanol</i>	–	HCA S	–
	voda	×	–	S
hmelj	etanol	×	SFS S	HCA S
	<i>etilacetat</i>	–	HCA S	S
	metanol	–	SFS HCA	S
	voda	×	–	S

Legenda: × – eksperimentalna skupina manjka; – neprimerno; HCA – najmanjša tvorba HCA v poskusu, SFS – največja vsebnost skupnih fenolnih spojin v poskusu; S – senzorično sprejemljivo (vrednost 1 ali manj); krepko označeni HCA in S – optimalna kombinacija material, topila učinkovin in nosilca ekstrakta, ki ustreza najmanj dvema pogojem, vendar mora biti senzorično sprejemljiva; poševno – optimalno topilo učinkovin ali nosilec ekstrakta

Na osnovi preglednice 20 lahko določimo kombinacijo ekstrakta in nosilca, ki najmanj povečata tvorbo HCA in hkrati zagotavlja sprejemljivo senzorično kakovost mesnih emulzij iz prašičjega mesa. Take kombinacije so tri: metanolni, etanolni in etil-acetatni ekstrakti brinovih jagod, vezani na škrob, etanolni ekstrakti brinovih jagod in hmelja, vezani na sol, in etil-acetatni ekstrakti hmelja, vezani na škrob. Vendar pa je na tem mestu potrebno posebej poudariti, da dodane učinkovine po toplotni obdelavi povečajo tvorbo HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij, saj smo v kontrolnih vzorcih toplotno obdelanih emulzij določili povprečno polovico manj skupnih HCA v primerjavi z vzorci, ki smo jim dodali brinove in hmeljeve ekstrakte.

5.2 SKLEPI

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko sklepamo:

Kontrolni vzorci pečenih mesnih emulzij iz prašičjega mesa vsebujejo povprečno polovico manj skupnih heterocikličnih aminov (HCA) v primerjavi z vzorci, ki smo jim med izdelavo nadeva mesne emulzije dodali brinove in hmeljeve ekstrakte, iz česar lahko sklepamo, da dodane učinkovine po pečenju povečajo tvorbo HCA:

- kontrolne mesne emulzije po pečenju vsebujejo deset HCA v skupni količini $58,40 \pm 0,86 \mu\text{g/kg}$, od tega $46,08 \mu\text{g MeIQx}$, $7,62 \mu\text{g 7,8-DiMeIQx}$, $2,21 \mu\text{g PhIP}$ in $1,22 \mu\text{g norharmana}$, ostali so prisotni v količini pod $1 \mu\text{g}$, to pa so MeIQ, harman, A α C, Trp-P-2, Glu-P-2 in 4,8-DiMeIQx;
- koagulati mesnih emulzij z dodanimi ekstrakti brina in hmelja po pečenju v povprečju vsebujejo $115,98 \pm 32,56 \mu\text{g HCA/kg}$, od tega $96,21 \mu\text{g MeIQx}$, $13,48 \mu\text{g 7,8-DiMeIQx}$, $3,05 \mu\text{g PhiP}$, $1,03 \mu\text{g TrP2}$, $0,73 \mu\text{g norharmana}$ in $0,48 \mu\text{g MeIQ}$; 83 % vseh HCA predstavlja MeIQx;

Ekstrakcijska topila (70 % etanol, metanol, etilacetat in voda) različno ekstrahirajo biološko aktivne učinkovine brinovitih jagod in hmelja ter s tem različno vplivajo na tvorbo HCA v pečenih koagulatih mesnih emulzij iz prašičjega mesa:

- fenolne spojine brinovitih jagod in hmelja se z metanolom in etanolom ekstrahirajo v večjem obsegu kot z etil-acetatom in vodo;
- več skupnih fenolnih spojin se veže na škrob, manj na sol in najmanj na olje;
- ekstrakt brinovitih jagod vsebuje več skupnih fenolnih spojin kot ekstrakt hmelja;
- z vidika ohranjanja fenolnih spojin je najprimerneje uporabiti metanolne in etanolne ekstrakte hmelja, vezane na škrob;

Dodatek ekstraktov brinovitih jagod in hmelja, vezanih na različne nosilce (kuhinjska sol, rafinirano sončnično olje ali koruzni škrob), različno vpliva na tvorbo HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah iz prašičjega mesa:

- manj skupnih HCA se tvori pri uporabi etilacetatnih, metanolnih in etanolnih ekstraktov kot pri uporabi vodnih ekstraktov;
- manj skupnih HCA se tvori pri uporabi ekstraktov vezanih na škrob, več pri vezavi na sol, največ pa pri vezavi na olje;
- manj skupnih HCA se tvori pri uporabi ekstraktov brinovitih jagod, vezanih na olje in škrob, kot pri uporabi ekstrakta hmelja; pri uporabi soli kot nosilca je obratno;
- z vidika zmanjševanja tvorbe HCA je najprimerneje uporabiti etilacetatne in metanolne ekstrakte brina in hmelja, vezane na škrob, etanolne ekstrakte brina in hmelja, vezane na sol, ter etanolne brinove ekstrakte, vezane na škrob;

Dodatek ekstraktov različno vpliva na senzorično kakovost mesnih emulzij iz prašičjega mesa:

- tuji vonji in arome so bolj izraženi pri uporabi vodnih in metanolnih brinovih ekstraktih ter uporabi vodnih in etilacetatnih ekstraktih hmelja;
- tuji vonji in arome so bolj izraženi pri uporabi ekstraktov vezanih na olje kot na sol in škrob;
- ekstrakti brinovih jagod in hmelja puščajo tuje vonje in arome;
- z vidika ohranjanja senzorične kakovosti mesnih emulzij je najprimerneje uporabiti etanolne in etilacetatne ekstrakte brina in hmelja, vezane na škrob in sol, metanolne ekstrakte brina, vezane na škrob, vodne ekstrakte brina, vezane na sol, metanolne in vodne ekstrakte hmelja, vezane na sol;

Določili smo kombinacijo ekstrakta in nosilca, ki najmanj povečata tvorbo HCA in hkrati zagotavlja sprejemljivo senzorično kakovost mesnih emulzij iz prašičjega mesa, in sicer:

- metanolni, etanolni in etilacetatni ekstrakti brinovih jagod, vezani na škrob,
- etanolni ekstrakti brinovih jagod in hmelja, vezani na sol, in
- etilacetatni ekstrakti hmelja, vezani na škrob.

6 POVZETEK

Prehranjevanje spada med ključne dejavnike preživetja. Kakovost prehrane pa je zagotovo pomemben dejavnik, ki vpliva na zdravje, počutje in delovanje telesa. Z naravnimi začimbami, učinkovinami in drugimi aditivi bi lahko v veliki meri, če ne že v celoti, nadomestili sintetične spojine in konzervanse, ki ogrožajo omenjene dejavnike in ogrožajo človeško telo na kratki in dolgi rok. Intenzivni razvoj civilizacijskih bolezni, alergijskih reakcij in drugih nepojasnjenih stanj pri ljudeh lahko pripišemo možni interakciji stresnega življenja, tempa, predvsem pa načina priprave, kakovosti živil ter načina prehranjevanja.

Priprava mesa običajno poteka pri visokih temperaturah pečenja, cvrtja ali drugih podobnih načinih toplotne obdelave, ki vplivajo na tvorbo škodljivih snovi, med katerimi so tudi heterociklični amini (HCA).

Namen naloge je bil zmanjšati tvorbo HCA v modelnih mesnih emulzijah. To smo poskušali storiti z dodatkom biološko aktivnih učinkovin ekstraktov brinovih jagod in hmelja. Ugotoviti smo želeli tudi, kako vrsta nosilca, t.j. kuhinjska sol, rafinirano sončnično olje in koruzni škrob, na katerega smo vezali etanolne, metanolne, etilacetatne in vodne ekstrakte, vpliva na tvorbo HCA in ali so kombinacije nosilec/ekstrakt sprejemljive tudi s senzoričnega vidika. Pripravili smo tudi kontrolne vzorce, ki niso vsebovali ekstrakta.

Predpostavili smo naslednje hipoteze:

- da bodo ekstrakcijska topila (70 % etanol, metanol, etilacetat in voda) različno ekstrahirala biološko aktivne učinkovine brinovih jagod in hmelja ter s tem različno vplivala na tvorbo HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah iz prašičjega mesa;
- da bo dodatek ekstraktov brinovih jagod in hmelja, vezanih na različne nosilce (kuhinjska sol, rafinirano sončnično olje ali koruzni škrob), prav tako različno vplival na tvorbo HCA v toplotno obdelanih mesnih emulzijah iz prašičjega mesa;
- da bomo določili kombinacijo ekstrakta in nosilca, ki bo uspešno zmanjšala tvorbo HCA, hkrati pa zagotovila sprejemljivo senzorično kakovost mesnih emulzij iz prašičjega mesa.

Eksperimentalni del naloge je obsegal pripravo mesnih emulzij in optimizacijo pridobivanja rastlinskih ekstraktov z namenom zmanjšati tvorbo HCA v modelnih mesnih emulzijah. V izdelanih koaguliranih modelnih emulzijah z dodanimi različnimi rastlinskimi ekstrakti (vezanimi na različne nosilce) smo po pečenju na dvoploščnem žaru pri temperaturi plošč 240 °C do središčne temperature 80 °C določili vsebnost posameznih in skupnih HCA (s kromatografsko metodo v kombinaciji z masnim spektrometrom), v istih koagulatih pa smo pred pečenjem določili še vsebnost skupnih fenolov (z metodo Folin-

Ciocalteu) in senzorično, z metodo kvantitativne deskriptivne analize, ocenili sprejemljivost vonja in arome.

Ugotovili smo, da mesne emulzije v 100 g vsebujejo 69,24 g vode, 15,46 g beljakovin in 11,90 g maščob. Hmeljevi listi v povprečju vsebujejo višjo koncentracijo skupnih fenolov, izraženih v μg galne kisline na g nosilca z ekstraktom, kot brinove jagode (0,44 mg/g vs. 0,26 mg/g). Največ skupnih fenolnih snovi vsebujeta metanolni in etanolni ekstrakt hmelja, vezana na škrob (0,81 mg/g).

Kontrolni vzorci pečenih emulzij (brez dodanih ekstraktov) vsebujejo povprečno polovico manj skupnih HCA v primerjavi z vzorci, ki smo jim dodali brinove in hmeljeve ekstrakte, iz česa lahko sklepamo, da učinkovine po toplotni obdelavi dodatno povečajo tvorbo HCA. Kontrolne mesne emulzije po pečenju vsebujejo deset HCA v skupni količini $58,40 \pm 0,86 \mu\text{g/kg}$, od tega $46,08 \mu\text{g MeIQx}$, $7,62 \mu\text{g 7,8-DiMeIQx}$, $2,21 \mu\text{g PhIP}$ in $1,22 \mu\text{g}$ norharmana, ostali so prisotni v količini pod $1 \mu\text{g}$, to pa so MeIQ, harman, A α C, Trp-P-2, Glu-P-2 in 4,8-DiMeIQx. Koagulati mesnih emulzij z dodanimi ekstrakti brina in hmelja pa po pečenju v povprečju vsebujejo $115,98 \pm 32,56 \mu\text{g HCA/kg}$, od tega $96,21 \mu\text{g MeIQx}$, $13,48 \mu\text{g 7,8-DiMeIQx}$, $3,05 \mu\text{g PhiP}$, $1,03 \mu\text{g TrP2}$, $0,73 \mu\text{g}$ norharmana in $0,48 \mu\text{g MeIQ}$; 83 % vseh HCA predstavlja MeIQx. Ugotovili smo, da je z vidika ohranjanja fenolnih spojin najprimerneje uporabiti metanolne ali etanolne ekstrakte hmelja, vezane na škrob, z vidika zmanjševanja tvorbe HCA je najprimerneje, da ekstraktov brinovih jagod in hmelja NE dodajamo! Če pa ekstrakte brinovih jagod in hmelja dodamo z drugim namenom kot povečati antioksidativno kapaciteto mesne emulzije, se priporoča dodatek metanolnih, etanolnih in etilacetatnih ekstraktov brinovih jagod, vezanih na škrob, etanolnih ekstraktov brinovih jagod in hmelja, vezanih na sol, in etilacetatne ekstrakte hmelja, vezane na škrob. Te kombinacije rastlinskih materialov, topil učinkovin in nosilcev ekstraktov relativno najugodnejše vplivajo na zmanjšanje tvorbe HCA in hkrati zagotavljajo sprejemljivo senzorično kakovost mesnih emulzij iz prašičjega mesa.

Osnovne hipoteze, da bo dodatek ekstraktov brinovih jagod in hmelja zmanjšal tvorbo HCA, nismo potrdili. Na tem mestu je potrebno posebej poudariti, da dodane učinkovine rastlinskih ekstraktov po pečenju povečajo tvorbo HCA v koagulatih mesnih emulzij v primerjavi s kontrolnimi vzorci.

7 VIRI

- Arsene A. L., Rodino S., Butu A., Petrache P., Iordache O., Butu M. 2015. Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *Humulus lupulus*. *Farmacía*, 63: 851–857.
- 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., 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.
- 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: 79–86.
- Chaouchea T. M., Haddouchia F., Atik-Bekaraa F., Ksourib R., Azzic R., Boucherite Z., Tefianid C., Larbate R. 2015. Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MS characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Industrial Crops and Products*, 64: 182–187.
- Damchevska A. 2015. Zmanjševanje tvorbe heterocikličnih aromatskih aminov v toplotno obdelanem piščančjem mesu z ekstrakti brina. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 51 str.
- Edenharder R., Leopold C., Kries M., 1995. Modifying action of solvent extracts from fruit and vegetable residue on 2-amino-3-methyl-3-imidazo (4, 5-f) quinoline (IQ) and 2-amino-3,4-dimethylimidazo (4,5-f) quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Mutation Research*, 341: 303–318.
- Embuscado M. E. 2015. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods*, 18: 811–819.
- Fandiño M., Olmedo J. L., Martínez E. M., Valladares J., Paredes P., Rey B. J., Mota M., Cancelaa, J. J., Pereira L. S. 2015. Assessing and modelling water use and the partition of evapotranspiration of irrigated hop (*Humulus Lupulus*), and relations of transpiration with hops yield and alpha-acids. *Industrial Crops and Products*, 77: 204–217.
- Farhadian A., Jinap S., Abas F., Sakar Z. I. 2010. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21: 606–610.
- Farhadian A., Jinap S., Faridah A., Zaidul I.S.M. 2012. Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. *Food Control*, 28: 420–425.

- Felton J. S., Knize M. G. 1991. Occurrence, identification, and bacterial mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259: 205-217.
- Ferguson L. R. 2010. Meat and cancer. *Meat Science*, 84: 308–313.
- Gadekar Y. P., Sharma B. D., Shindeb A. K., Verma A. K., Mendiratta S. K. 2014. Effect of natural antioxidants on the quality of cured, restructured goat meat product during refrigerated storage ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). *Small Ruminant Research*, 119: 72–80.
- Gevaart-Durkin A., de Peyster A. 2014. High temperature cooked meats. V: *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. Wexler P. (ed.) San Diego, Academic Press: 912–915.
- Gibis M., Weiss J. 2012. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. *Food Chemistry*, 134: 766–774.
- Golob T., Korošec M., Bertonec J., Kropf U. 2005. Senzorična analiza: metode in preskuševalci. *Acta agriculturae Slovenica*, 85: 55–66.
- Grasso S., Brunton N. P., Lyng J. G., Lalor F., Monahan F. J. 2014. Healthy processed meat products - regulatory, reformulation and consumer challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 39: 4–17.
- Greenfield H., Arcot J., Barnes J. A., Cunningham J., Adorno P., Stobaus T., Tume R. K., Beilken S. L., Muller W. J. 2009. Nutrient composition of Australian retail pork cuts 2005/2006. *Food Chemistry*, 117: 721–730.
- Han H., Baik B. K. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 43: 1971–1978.
- Hasnol N. D. S., Jinap S., Sanny M. 2014. Effect of different types of sugars in a marinating formulation on the formation of heterocyclic amines in grilled chicken. *Food Chemistry*, 145: 514–521.
- IARC. 2016. Classified by the IARC Monographs. Lyon, International Agency for Research on Cancer Agents: 1-116.
http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php (julij 2016)
- Jägerstad M., Skog K., Grivas S., Olsson K. 1991. Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259: 219-233.
- Janžekovič N. 2015 Vpliv dodatka ksantohumola na zmanjšanje tvorbe produktov Maillardove reakcije v sekljancih. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.

- Jinap S., Iqbal S. Z., Selvam R. M. P. 2015. Effect of selected local spices marinades on the reduction of heterocyclic amines in grilled beef (satay). *LWT – Food Science and Technology*, 63: 919–926.
- Johansson M., Jägerstad M. 1993. Influence of oxidized deep-frying fat and iron on the formation of food mutagens in a model system. *Food and Chemical Toxicology*, 12: 971–979.
- Jones R. C., Weisburger J. H. 1988. L-Tryptophan inhibits formation of mutagens during cooking meat and in laboratory models. *Mutation Research*, 206: 343–349.
- Karakaya M., Bayrak E., Ulusoy K. 2011. Use of natural antioxidants in meat and meat Products. *Journal of Food Science and Engineering*, 1: 1–10.
- Karre L., Lopez K., Getty K. J. K. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94: 220–227.
- Kikugawa K., Kato T., Hiramoto K., Takado 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*, 1: 133–144.
- Kikugawa K. 2004. Prevention of mutagen formation in heated meats and model systems. *Mutagenesis*, 6, 19: 431–439.
- Knez Knafelj A. 2013. Vpliv dodatka biološko aktivnih učinkovin ekstraktov brina, bora in rožmarina na preprečevanje tvorbe HCA. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.
- Kratchanova M., Denev P., Ciz M., Lojek A., Mihailov A. 2010. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica*, 57: 229–234.
- Ložienė K., Rimantas Venskutonis P. 2016. Juniper (*Juniperus communis* L.). V: Essential oils in food preservation, flavor and safety. Preedy V. R. (ed.). London, Academic Press: 495-500.
- Masek A., Chrzescijanska E., Kosmalska A., Zaborski M. 2014. Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV–VIS, FTIR and GC–MS analysis. *Food Chemistry*, 156: 353–361.
- Meurillon M., Engel E. 2016. Mitigation strategies to reduce the impact of heterocyclic aromatic amines in proteinaceous foods. *Trends in Food Science & Technology*, 50: 70–84.
- Miceli N., Trovato A., Marino A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Guvenc A., De Pasquale R., Taviano M. F. 2011. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2600–2608.

- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B*, 802: 3–10.
- Nauwelaers G. C., Gu D., Fessard V., Turesky R., Langouet S. 2011. Heterocyclic aromatic amines form high levels of DNA adducts in human hepatocytes. *Toxicology Letters*, 205: 38.
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2010. Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with Oasis extraction method. *Food Science and Technology*, 43: 1345–1350.
- Pandey K. H., Mahalingan K., Sharma S., Lamsal R., Amritha V. 2014. Antioxidant properties of various fruits, herbs, spices and vegetables: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3: 1101–1109.
- Persson E., Graziani G., Ferracane R., Fogliano V., Skog K. 2003. Influence of antioxidant in virgin oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1587–1597.
- Puangsoombat K., Gadgil P., Houser T. A., Hunt M. C., Smith J. S. 2012. Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products. *Meat Science*, 90: 739–746.
- Quelhas I., Petisca C., Viegas O., Melo A., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O. 2010. Effects of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. *Food Chemistry*, 122: 98-104.
- Rahman U. U., Sahar A., Khan M. I., Nadeem M. 2014. Production of heterocyclic aromatic amines in meat: chemistry, health risks and inhibition: a review. *LWT – Food Science and Technology*, 59: 229–233.
- Reig M., Aristoy M-C., Toldrá F. 2013. Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food Chemistry*, 140: 478–482.
- Rohrmann S., Lukas J. S., Linseisen J., Pfau W. 2009. Dietary intake of meat and meat-derived heterocyclic aromatic amines and their correlation with DNA adducts in female breast tissue. *Mutagenesis*, 24:127-32.
- Rosenvold K., Andersen H. J. 2003. Factors of significance for pork quality – a review. *Meat Science*, 64: 219–237.
- Rounds L., Havens C. M., Feinstein Y., Friedman M., Ravishankar S., 2013. Concentration-dependent inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and heterocyclic amines in heated ground beef patties by apple and olive extracts, onion powder and clove bud oil. *Meat science*, 94: 461-267.
- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amines carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 433-441.

- Sánchez-Muniz F. J., Olivero-David R., Triki M., Salcedo L., González-Muñoz M. J., Cofrades S., Ruiz-Capillas C., Jiménez-Colmenero F., Benedi J. 2012. Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched *n*-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Research International*, 48: 909–915.
- SAS. Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software.
- Shah M. A., Bosco S. J. D., Mir S. A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98: 21–33.
- 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: 289–297.
- Sinha R., Rothman N. 1999. Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters*, 143: 189–194.
- Skog K., Jägerstad M. 1990. Effects of monosaccharides and disaccharides on the formation of food mutagens in model systems. *Mutation Research*, 230: 263–272.
- Skog K., Jägerstad M. 1991. Effects of glucose on the formation of PhIP in a model system. *Carcinogenesis*, 12: 2297–2300.
- Skog K. 1993. Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 31: 655–675.
- Skog K. I., Johansson M. A. E., Jägerstad 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.
- Stavric B., Matula T.I., Klassen R., Downie R.H. 1995. Evaluation of hamburgers and hot dogs for the presence of mutagens. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 815–820.
- Szterk A. 2015. Chemical state of heterocyclic aromatic amines in grilled beef: evaluation by *in vitro* digestion model and comparison of alkaline hydrolysis and organic solvent for extraction. *Food and Chemical Toxicology* 62: 653–660.
- Turesky R. J. 2007. Formation and biochemistry of genotoxic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 3, 168: 219–227.
- Uredba (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o aditivih za živila. *Uradni list Republike Slovenije*, L 354: 18 str.
- Uredba o izvajanju uredbe (ES) o aditivih za živila. *Uradni list Republike Slovenije*, L 21, 12: 1361 – 1362.

- Vázquez C. V., Rojas M. G. V., Ramírez C. A., Chávez-Servín J. L., García-Gasca T., Martínez R. A. F., García O. P., Rosado J. L., López-Sabater C. M., Castellote A. I., Montemayor H. M. A., Carbot K. T. 2015. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food Chemistry*, 176: 480–486.
- Veljović M., Despotović S., Djordjević R., Pecić S., Leskosek-Cukalović I., Nedović V. 2011. Sensory and antioxidant properties of beer with *Juniperus communis* L. V: *Food Process Engineering in a Changing World*. 11th International Congress of Engineering and food, Athens, Greece, May 22 – 26 2011. Athens, International Association of Engineering and Food: 2143 – 2144.
- Vlahova-Vangelova D., Dragoev S. 2014. Marination: effect on meat safety and human health: a review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20: 503–509.
- Wang Y., Vuolo L.L., Spingarn N.E., Weisburger J.H. 1982. The mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef. *Cancer Lett*, 16: 179– 189.
- Wood J. D., Richardson R. I., Nute G. R., Fisher A. V., Campo M. M., Kasapidou E., Sheard P. R., Enser M. 2004. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66: 21–32.
- Zanoli P., Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 383–396.