

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anita DAMCHEVSKA

**ZMANJŠEVANJE TVORBE HETEROCIKLIČNIH  
AROMATSKIH AMINOV V TOPLOTNO  
OBDELANEM PIŠČANČJEM MESU Z EKSTRAKTI  
BRINA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anita DAMCHEVSKA

**ZMANJŠEVANJE TVORBE HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH  
AMINOV V TOPLOTNO OBDELANEM PIŠČANČJEM MESU Z  
EKSTRAKTI BRINA**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**REDUCTION OF THE FORMATION OF THE HETEROCYCLIC  
AROMATIC AMINES IN HEAT-TREATED CHICKEN MEAT BY  
ADDING JUNIPER EXTRACTS**

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

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Katedri za tehnologije 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 in za recenzentko prof. dr. Polono Jamnik

Mentor: doc. dr. Tomaž Polak

Recenzentka: prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Anita Damchevska

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 637.54:637.526:547.554(043)=163.6  
KG meso/ piščančje meso/ toplotna obdelava/ pečenje mesa/ antioksidanti/ ekstrakti brina/ kreatin/ kreatinin/ proste aminokisljine/ fenolne spojine/ HPLC-MC/ heterociklični aromatski amini/ karcinogene spojine/ mutagene spojine  
AV DAMCHEVSKA, Anita, dipl. inž. predelave živalskih produktov (UN)  
SA POLAK, Tomaž (mentor)/ JAMNIK, Polona (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2015  
IN ZMANJŠEVANJE TVORBE HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV V TOPLOTNO OBDELANEM PIŠČANČJEM MESU Z EKSTRAKTI BRINA  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)  
OP X, 50 str., 13 pregl., 13 sl., 55 vir.  
IJ sl  
JI sl/en

AI Namen magistrske naloge je bil zmanjševanje tvorbe heterocikličnih aromatskih aminov (HCA) v toplotno obdelanih piščančjih filejih (običajne in obogatene z n-3) ter vpliv dodatka ekstrakta brina v rafiniranem sončničnem olju na tvorbo HCA. Poleg tega smo določili količino ekstrakta brina, ki najbolj optimalno preprečuje tvorbo HCA. Eksperiment je potekal tako, da smo najprej pripravili tri brinove ekstrakte z različno koncentracijo, in sicer: BR (50 ml ekstrakta brinovitih jagod), BR (koncentracija 1:1) in BR (koncentracija 1:2) in za vsako koncentracijo 12 filejev navadnega ter n-3 piščančjega mesa. Tako pripravljene fileje smo 4 minute pekli na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240 °C. Po njihovi ohladitvi smo določili vsebnosti HCA. Navadni piščančji fileji z dodanimi brinovimi ekstrakti so v povprečju vsebovali 25 µg HCA/kg vzorca za razliko od n-3 mini piščančjih filejev z dodanimi brinovimi ekstrakti, ki so v povprečju vsebovali 16 µg HCA/kg vzorca. Z metodo Folin–Ciocalteu smo določili skupne fenolne spojine v brinovitih ekstraktih. Koncentracija skupnih fenolnih spojin je bila največja v ekstraktu BR (2,60 mg/l), sledi ekstrakt BR (1:1) z 1,73 mg/l in BR (1:2) z 1,36 mg/l. Kot najuspešnejši ekstrakt za zmanjševanje tvorbe HCA se je izkazal ekstrakt BR (1:2) (14,5 µg HCA/kg), sledi ekstrakt BR (1:1) (22,5 µg HCA/kg) ter na koncu ekstrakt BR (22,9 µg HCA/kg). Dodatek brinovitih ekstraktov na splošno ne vpliva na zmanjšanje HCA v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Izjema je ekstrakt BR (1:2), ki zmanjša HCA le v n-3 vzorcih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 637.54:637.526:547.554(043)=163.6
- CX meat/ chicken meat/ grilling/antioxidants/ juniper extracts/ creatine/ creatinine/ free amino acids/ phenolic compounds/ HPLC-MC/ heterocyclic aromatic amines/ cancerogens/ mutagens
- AU DAMCHEVSKA, Anita
- AA POLAK, Tomaž (advisor)/ JAMNIK, Polona (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2015
- TY REDUCTION OF THE FORMATION OF THE HETEROCYCLIC AROMATIC AMINES IN HEAT-TREATED CHICKEN MEAT BY ADDING JUNIPER EXTRACTS
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
- NO X, 50 p., 13 tab., 13 fig., 55 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The aim of this master thesis was the reduction of the formation of Heterocyclic Aromatic Amines (HCA) in heat-treated chicken fillets (conventional and n-3) and the influence of the juniper added in refined sunflower oil in the formation of HCA. In addition, we determined the optimal concentration of juniper for preventing the formation of HCA. For the experiment three different concentration of juniper were used: BR (50 ml extract of juniper berries), BR (concentration 1:1) and BR (concentration of 1:2). For each concentration 12 fillets of conventional and n-3 meat were prepared and then fried on two-plate grill for 4 minutes at a temperature of 240 °C. After cooking, the concentration of HCA was determined. Conventional chicken samples with added juniper extracts contained an average of 25 mg HCA/kg comparing to the concentration of n-3 mini chicken samples, which on average contained 16 mg HCA/kg. With Folin-Ciocalteu method, the total phenolic compounds in juniper extracts were determined. Concentration of the phenolic compounds was the highest in the extract BR (2.60 mg/l), followed by BR (1:1) with 1.73 mg/l and BR (1:2) with 1.36 mg/l. As the most effective extract to reduce the formation of HCA has proved extract BR (1:2) (14.5 µg HCA/kg), followed by BR (1:1) (22.5µg HCA/kg) and at the very end extract BR (22.9 mg HCA/kg). In general the juniper extracts did not affect the reduction of the HCA in comparison with the control samples. An exception is the extract BR (1:2), which reduced the amount of HCA only in n-3 samples.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PIŠČANČJE MESO .....	3
<b>2.1.1 Mikrostruktura mišičnega vlakna (piščančje meso) .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Pretvorba mišic v meso .....</b>	<b>4</b>
2.2 SESTAVA NAVADNEGA IN N-3 PIŠČANČJEGA MESA .....	7
<b>2.2.1 Voda .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2 Ogljikovi hidrati .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.3 Beljakovine .....</b>	<b>7</b>
2.3 PREKURZORJI HCA V PIŠČANČJEM MESU .....	8
<b>2.3.1 Kreatin/kreatinin .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2 Proste aminokisline .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 Ogljikovi hidrati .....</b>	<b>9</b>
2.4 HCA .....	9
<b>2.4.1 Polarni HCA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.2 Napolarni HCA .....</b>	<b>14</b>
2.5 POSTOPKI TOPLOTNE OBDELAVE PIŠČANČJEGA MESA IN TVORBA HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV .....	14
<b>2.5.1 Maillardova reakcija in tvorba HCA .....</b>	<b>16</b>
2.6 ZMANJŠEVANJE TVORBE HCA .....	18
<b>2.6.1 Naravni antioksidanti .....</b>	<b>19</b>
2.6.1.1 Brin .....	21
<b>2.6.2 Sintetični antioksidanti .....</b>	<b>22</b>

<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1	MATERIAL IN NAČRT DELA .....	23
3.2	METODE DELA.....	25
3.2.1	Toplotna obdelava piščančjih filejev .....	25
3.2.2	Izračun izgube mase med pečenjem.....	25
3.2.3	Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu .....	26
3.2.3.1	Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin.....	26
3.2.3.2	Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v ekstraktih	27
3.2.4	Določanje vsebnosti HCA v pečenih navadnih in n-3 mini piščančjih filejih ..	27
3.2.4.1	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije.....	28
3.2.4.2	Statistična analiza .....	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>31</b>
4.1	IZGUBA MASE MED TOPLOTNO OBDELAVO MINI PIŠČANČJIH FILEJEV ..	31
4.2	DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN Z METODO FOLIN- CIOCALTEU..	32
4.2.1	Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin.....	32
4.3	DOLOČANJE VSEBNOSTI HCA V PEČENIH MINI PIŠČANČJIH FILEJIH .....	33
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>42</b>
5.1	RAZPRAVA .....	42
5.2	SKLEPI .....	42
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>47</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO SLIK

Slika 1: Glavne spremembe, ki potekajo med pretvorbo mišic v meso (Szas-Barber in sod., 2010).....	5
Slika 2: Shematski prikaz reakcij ne encimskega porjavenja (Hodge, 1953).....	18
Slika 3: Shematski prikaz postopka izdelave brinovitih ekstraktov.....	23
Slika 4: Shematski prikaz postopka mariniranja piščančjih filejev.....	24
Slika 5: Shematski prikaz celotnega poteka eksperimenta.....	25
Slika 6: Strukturna formula hesperetina.....	26
Slika 7: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na izgubo mase med toplotno obdelavo Navadnih in n-3 mini piščančjih filejev.....	31
Slika 8: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin.....	33
Slika 9: Povprečne vsebnosti HCA v $\mu\text{g}$ HCA na kg toplotno obdelanega piščančjega mesa .....	35
Slika 10: Povprečne vsebnosti HCA v $\mu\text{g}$ HCA na kg toplotno obdelanega piščančjega mesa brez PhIP.....	36
Slika 11: Vsota vseh HCA, ki so nastali med toplotno obdelavo navadnih in n-3 piščančjih filejev.....	36
Slika 12: Vpliv dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo IQ, IQx in Glu-P-2 v toplotno obdelanih n-3 piščančjih filejih.....	37
Slika 13: Vpliv dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo 4,8- DiMeIQx v toplotno obdelanih navadnih piščančjih filejih.....	37



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kratice, imena in formule HCA (Murkovic, 2004).....	11
Preglednica 2: Kemijske spremembe v mesu glede na temperaturo toplotne obdelave (Garcia-Macias, 2010).....	15
Preglednica 3: Identificirane fenolne spojine v ekstraktu brina (Miceli in sod., 2011).....	22
Preglednica 4: Podatki za pripravo umeritvene krivulje .....	26
Preglednica 5: Podatki za pripravo vzorcev za določanje skupnih fenolnih spojin.....	27
Preglednica 6: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju HCA.....	28
Preglednica 7: Masni detektor: Micromass Quattro Micro; Waters.....	29
Preglednica 8: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu.....	29
Preglednica 9: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v brinovitih ekstraktih, izraženi kot hesperetin v mg na liter ekstrakta .....	32
Preglednica 10: Rezultati določanja HCA v navadnih mini piščančjih filejih z dodanimi ekstrakti brina z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n=36).....	34
Preglednica 11: Rezultati določanja HCA v n-3 mini piščančjih filejih z dodanimi ekstrakti brina z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n=36) .....	35
Preglednica 12: Statistična verjetnost vpliva dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo posameznih HCA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) v toplotno obdelanih navadnih in n-3 mini piščančjih filejih.....	38
Preglednica 13: Vpliv dodatka ekstrakta na tvorbo vseh identificiranih HCA ( $\mu\text{g}$ HCA/kg) v toplotno obdelanih navadnih in n-3 mini piščančjih filejih.....	40

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A $\alpha$ C	2-amino-9H-pirido [2,3-b]indol
AIA	aminoimidazo – azaareni
ATP	adenozin trifosfat
ADP	adenozin difosfat
BHA	butiliran hidroksianizol
BHT	butiliran hidroksitoluen
BR	50 ml ekstrakta brinovih jagod (Maestro)
BR (1:1)	50 ml ekstrakta brinovih jagod (Maestro), koncentracija 1:1
BR (1:2)	50 ml ekstrakta brinovih jagod (Maestro), koncentracija 1:2
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DMIP	2-amino-1,5-4dimetilimidazo[4,5-b]piridin
FC	Folin – Ciocalteu
Glu-P-1	2-amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
GC	plinska kromatografija
HCA	heterociklični amini
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)
HPLC/MC	tekočinska kromatografija v povezavi z masno sprektometrijo
Harman	9-metil-9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido [3,4-b] indol
IARC	Mednarodna agencija za raziskavo raka (ang. International Agency for Research on Cancer)
IQ	2-amino-3metilimidazo[4,5-f]kinolin
IQx	2-amino-3metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (International Union of Pure and Applied Chemistry)
LC-MC	tekočinska kromatografija/masna spektrometrija
LC	tekočinska kromatografija
[M+H] <sup>+</sup>	deprotonirani ioni
MeA $\alpha$ C	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol
MeIQ	2-amino 3,4dimetilimidazo[4,5f]kinolin
MeIQx	2-amino-3,8dimetilimidazo[4,5f]kinoksalin
MK	maščobne kisline
MC	masna spektrometrija
n-3	piščančje meso obogateno z VNMK
Norharman	9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido [3,4-b] indol
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
SFS	skupne fenolne snovi
SPE	ekstrakcija na trdi fazi (angl. Solid Phase Extraction)
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
T <sub>s</sub>	središčna temperatura
TMIP	2-amino-1,5-6rtimetilimidazo[4,5-b]piridin
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline

4'-OH-PhIP	2-amino-6-(hidroksifenil)-1-metilmidazo[4,5-b] piridin
7,8-DiMeLQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f] kinoksalin
4-CH <sub>2</sub> OH-MeIQx	4-hidroksimetil-2-amino-3,4,8-dimetilimidazol [4,5f] kinoksalin
4,8-DiMeLQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f] kinoksalin

## 1 UVOD

Perutnina vključuje vse domače ptice, kot so purani, piščanci, gosi, race, fazani itd. Danes te predstavljajo najbolj uporabna živila v prehrani človeka. Njihova poraba s strani človeka narašča, najbrž zaradi nižje cene, hitre in enostavne priprave ter vsebnosti hranilnih snovi, kot so beljakovine, esencialne aminokisliline, mineralne snovi (fosfor in železo) in vitamini skupine B. Poleg tega perutninsko meso vsebuje relativno malo maščob (Vombergar in Hostnik, 2006).

Uravnotežena prehrana je prehrana, ki vsebuje hranilne snovi v količinah, ki so potrebne za optimalno delovanje človeškega organizma. Uravnotežena prehrana ne sme vsebovati škodljivih spojin, ki pa se žal med toplotno obdelavo mesa tvorijo. Mednje sodijo rakotvorne spojine, imenovane heterociklični aromatski amini (HCA).

Danes je izoliranih več kot 25 heterocikličnih aromatskih aminov. Vsi HCA so spojine z visokim mutagenim in kancerogenim potencialom. Poleg tega imajo HCA sposobnost, da povzročajo poškodbe DNA molekul, ki privedejo do nastanka raka (Sugimura, 1997).

HCA lahko razdelimo v dve skupini, in sicer: polarni ali IQ tipi ter nepolarni oziroma ne-IQ tipi. Za tvorbo polarnih HCA je obvezna prisotnost kreatina oziroma kreatinina. Po drugi strani pa za tvorbo nepolarnih tipov ni obvezna prisotnosti kreatina/kreatinina. (Murkovic, 2004):

Znano je, da HCA nastajajo v proteinsko bogati hrani med normalnimi postopki toplotne obdelave, kot so cvrenje, praženje ter pečenje. Nastajajo kot rezultat Streckerjeve razgradnje in Maillardove reakcije. Prekurzorji HCA so: kreatin/kreatinin, proste aminokisliline in sladkor (Kizil in sod., 2011).

Pri nižji temperaturi toplotne obdelave HCA v mesu nastanejo v majhnih količinah (ng/g), pri višji temperaturi pa se njihova tvorba poveča. Nastajanje HCA je odvisno tudi od ostalih dejavnikov, kot so: vrsta mesa, način in čas toplotne obdelave, temperatura in stopnja porjavitve med toplotno obdelavo (Murkovic, 2004).

Agencija za raziskavo raka pravi, da je tretjina od vseh obolelih povezana z načinom prehranjevanja. Številne študije so pokazale, da dolgoročno uživanje mesa, ki vsebuje HCA, povzroča raka pri ljudeh in živalih. Poleg tega lahko inducira rast tumorja na različnih delih: debelem in tankem črevesu, prostati, pljučih, koži, prsih, jetrih in mlečnih žlezah (IARC, 1993).

Znanih je več možnosti za zmanjšanje tvorbe HCA v toplotno obdelanem mesu, in sicer (Rahman in sod., 2014):

- uporaba nižje temperature toplotne obdelave,
- optimalno povečanje količine sladkorjev,
- mariniranje in paniranje,
- dodatek antioksidantov,
- povečanje vlažnosti med toplotno obdelavo,

- uporaba različnih ekstraktov.

## 1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil zmanjšati tvorbo HCA v toplotno obdelanih piščančjih filejih, tako navadnih kot tistih z večjo vsebnostjo n-3 maščobnih kislin, z uporabo ekstraktov brina. Želeli smo ugotoviti tudi vpliv dodatka ekstrakta brina v rafiniranem sončničnem olju na tvorbo HCA ter določiti optimalno količino dodanega ekstrakta, ki preprečuje tvorbo HCA.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo 2 hipotezi:

- 1) Predvidevamo, da bo dodatek ekstrakta brina v sončničnem olju zmanjševal nastajanje HCA v pečenih piščančjih filejih.
- 2) Predvidevamo, da bomo določili primerno koncentracijo brinovega ekstrakta, ki bo zagotavljal najmanjšo tvorbo HCA, hkrati pa ohranjal senzorično sprejemljivost izdelka.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PIŠČANČJE MESO

V poznem devetnajstem stoletju se je razvila sodobna perutninska industrija v Evropi in Ameriki. Danes je ta ena najpomembnejših živilorejskih panog v svetu. V času druge svetovne vojne se je proizvodnja in poraba perutninskih izdelkov bistveno povečala za razliko od svinjine in govedine. K močnemu napredku perutnine je pripomogla uporaba novih materialov, splošen tehnološki napredek, genetski inženiring in selekcija ter spoznanja in znanja strokovnjakov (FAO, 2010).

Perutnina vključuje vse domače ptice, in sicer: purane, piščance, gosi, race, fazane itd (Hui in Guerro-Legarreta, 2010).

Trend povečevanja proizvodnje perutninskega mesa na mednarodni ravni se še vedno povečuje. Čas, v katerem piščanec doseže težo 2 kg, preden gre v prodajo, se je zmanjšal z 63 dni v letu 1976 na 35 dni v letu 2001 (Ravindran, 2004).

Piščančje meso je v prehrani zelo razširjeno, ker je bogato z beljakovinami in predstavlja dober vir esencialnih aminokislin, mineralnih snovi (fosfor in železo) in vitaminov skupine B. Poleg tega vsebuje relativno malo maščob. Delež nenasičenih maščobnih kislin je večji od nasičenih. Zaradi tega naj bi bilo perutninsko meso bolj zdravo od rdečega mesa. To je tudi vzrok za naraščanje potrošnje piščančjega mesa. Ostala dejavnika, ki prispevata k večji priljubljenosti, sta: nizka cena, ki je posledica nezahtevne reje, ter enostavna priprava filejev (FAO, 2010).

#### 2.1.1 Mikrostruktura mišičnega vlakna (piščančje meso)

Osnovna enota skeletne mišice je mišično vlakno, ki je sestavljeno iz sarkoleme, sarkoplazme, miofilamentov, miofibrile, jedra in celičnih organel (Taylor, 2004).

**Mišična vlakna** predstavljajo 75–92 % celotnega volumna mišic. Preostali delež pripada vezivnemu tkivu, ekstracelularim tekočinam in živčnim vlaknom. Različni avtorji različno klasificirajo mišična vlakna. Taylor (2004) jih klasificira na naslednji način:

- Tip I – majhna, rdeča, počasi krčljiva in oksidativna. Vlakna so bogata z mioglobinom, maščobo, mitohondriji ter imajo manjšo miozin ATP-azno aktivnost.
- Tip II A – hitro krčljiva vlakna. Vlakna so bogata z mitohondriji in mioglobinom ter imajo večjo miozin ATP-azno aktivnost.
- Tip II B – bela in hitro krčljiva vlakna. Vlakna niso bogata z mitohondriji in mioglobinom ter imajo večjo miozin ATP-azno aktivnost.

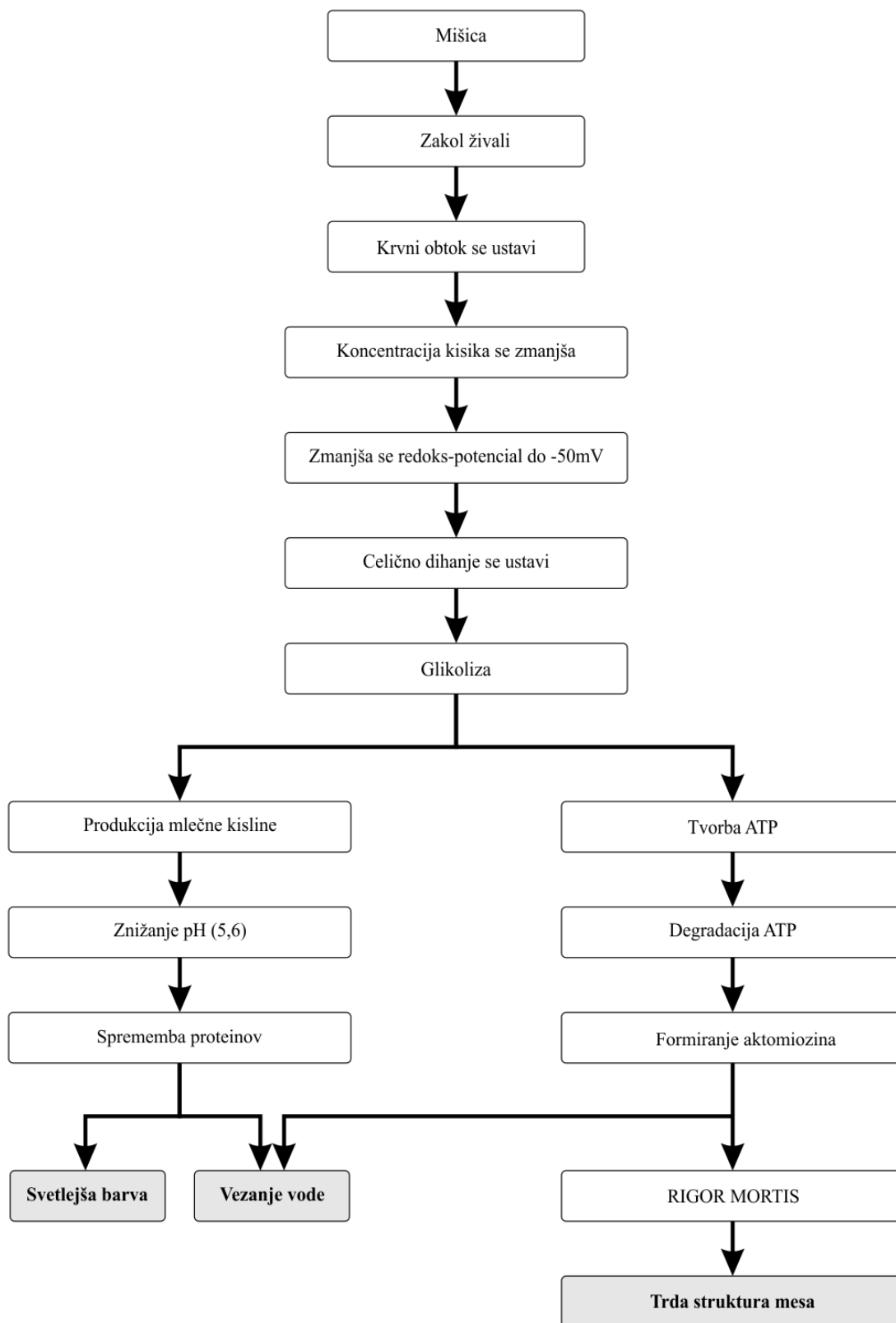
Tipi mišičnih vlaken se značilno razlikujejo glede na lokacijo mišice in področje v isti mišici. Perutninsko meso je mehkejše od ostalih klavnih živali, ker ga sestavljajo nežna

mišična vlakna. Mišična vlakna se povečujejo s starostjo. Piščanci, gojeni za pridelavo in proizvodnjo mesa, imajo večja vlakna od piščancev, gojenih za proizvodnjo jajc (Taylor, 2004).

Kakovost mesa je določena s strukturo mišic, velikostjo vlaken (večja velikost vlaken – slabše meso) in post mortem spremembami (Szasz-Barber in sod., 2010). Na kakovost mesa vplivajo tudi številni intrinzični (notranji) in ekstrinzični (zunanji) dejavniki, in sicer: mišična predispozicija, stresna občutljivost, ravnanje z živalmi pred zakolom, tehnologija zakola in pogoji obdelave trupov (Monin, 2004).

### **2.1.2 Pretvorba mišic v meso**

V mišicah živali po zakolu prevladuje anaerobni metabolizem, tvori se mlečna kislina, začnejo se metabolni procesi, ki spreminjajo *in vivo* lastnosti in povzročajo postopno pretvorbo mišic v meso. Proces pretvorbe mišic v meso lahko razdelimo na tri faze, in sicer: predrigor, *rigor mortis* oziroma *post mortis*. Čas pretvorbe je odvisen od več dejavnikov, predvsem od vrste živali in načina zakola. Glavne spremembe, ki potekajo med pretvorbo mišic v meso, so prikazane na sliki 1 (Szasz-Barber in sod., 2010).



Slika 1: Glavne spremembe, ki potekajo med pretvorbo mišic v meso (Szas-Barber in sod., 2010).



Ob zakolu živali se krvni obtok ustavi, kisik in energetsko bogate spojine (glukoza) se ne transportirajo do celice. Poleg tega metabolni produkti, ki so glavni razlog za intenzivne kemijske in fizikalne spremembe, ki povzročajo pretvorbo mišic v meso, niso odstranjeni. Celična struktura in živčne celice začnejo razpadati oziroma prenehajo delovati 15–30 min od zakola živali. Čas cepljenja triglicerolnih molekul v maščobno kislino, ki se dogaja v maščobnih celicah, je zelo počasen. Po *post mortem* se proste maščobne kisline ne morejo uporabljati za proizvodnjo visoko energetskih molekul (ATP), ker ogljikove enote (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), potrebne za proizvodnjo acetil-CoA (CH<sub>3</sub>-CO-S-CoA), potrebujejo kisik, ki ni več na voljo. Zaradi tega maščobe ostanejo v mesu relativno nespremenjene.

*Pred rigor:* Prva posledica zakola je prekinitev transporta kisika in krvi v mišice, zato začne prevladovati anaerobni metabolizem. V teh procesih je delež kisika v mišicah prenizek za vzdrževanje oksidativnih fosforilacij ADP v ATP. Edini vir ATP je glikogen, ki predstavlja glavni vir energije potreben za krčenje in sproščanje mišic, za membranski transport za metabolne procese itd. Glikogen se preko fosfohidrolitične poti pretvori v dekstrin, maltozo in glukozo. Glukoza se nato pretvori v mlečno kislino.

*Rigor mortis:* V času smrti je mišica mehka, v nekaj urah po smrti pa postane neraztegljiva in relativno trda struktura, poznana kot *rigor mortis*. Mišica je trda zaradi pomanjkanja vira energije. Po porabi ATP se fibularna struktura mišic spreminja s tvorbo trojne vezi čez vsa vlakna. Z nastankom križnih povezav postane meso trdo. Biokemijske procese, ki potekajo do začetka *rigor mortis*, lahko razdelimo na naslednje faze (Szasz-Barber in sod., 2010):

- Prva faza traja od 1 do 20 ur, odvisno od rezerve glikogena, CP ter temperature mišic. Hidroliza ATP se poveča zaradi padca vrednosti pH. Meso je elastično in mehko.
- V drugi fazi se elastičnost mesa postopoma zmanjša (2–3 ure) kot posledica znižanja koncentracije ATP.
- ATP se porabi, pride do močnega zmanjševanja obsežnosti mišic.

Na *rigor mortis* vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so na primer: vrsta živali, tip mišice, temperatura, glikogenske rezerve itd. Temperatura in vsebnost glikogena proces upočasni. Nižja temperatura pomeni počasen padec vrednosti pH. Višja vsebnost glikogena pomeni, da bo minilo več časa, dokler ne nastopi *rigor mortis*.

*Post mortem:* Glikoliza se ustavi zaradi zmanjšanja rezerve glikogena ali zaradi znižanja vrednosti pH, od 7,2 na 5,3–5,7. Hitrost zmanjšanja vsebnosti glikogena je odvisna od vrste živali. Pri govejem mesu je zmanjšanje vsebnosti glikogena počasnejše v primerjavi s svinjskim mesom. Vrednost pH se pred zakolom giblje od 7 do 7,3, po zakolu pa se zmanjša na 5,5 do 5,4. Na zmanjšanje vrednosti pH vpliva več dejavnikov, in sicer: vrsta živali, tip mišice, temperatura in stres živali. Mišice, v katerih prevladujejo bela vlakna, se vrednost pH giblje od 5,5 v piščančjem mesu in 5,8 v govejem mesu. Mišice, v katerih prevladujejo rdeča vlakna, se vrednost pH giblje od 6,1 v piščančjem mesu in 6,3 v govejem mesu. Pri visoki temperaturi pride do takojšnjega znižanja vrednosti pH. Pri nizkih temperaturah pa je potrebno več časa, da se vrednost pH zmanjša.

Ob zakolu živali potekajo le anaerobni procesi. Anaerobna razgradnja glikogena vodi do produkcije piruvične kisline oz. mlečne kisline. Takrat pride do tvorbe CO<sub>2</sub> in vode, ki tvorita 36 molekul ATP. Te procese povzročajo različne strukturne spremembe, ki vplivajo na kakovost mesa, strukturo in barvo. Piščančje meso delimo na: temno, čvrsto, suho in normalno, ali na mehko, blede in vodeno (Szas-Barber in sod., 2010).

## 2.2 SESTAVA NAVADNEGA IN N-3 PIŠČANČJEGA MESA

Mesno tkivo navadnega piščanca je sestavljeno iz petih primarnih kemijskih sestavin: vode, beljakovin, maščob, ogljikovih hidratov in anorganskih snovi (pepel ali minerali). V majhnih količinah meso vsebuje tudi neproteinske dušikove spojine (nukleotide, peptide, kreatin, kreatin fosfat itd.) in nedušikove spojine (vitamini, organske kisline itd.) (Keeton in Eddy, 2004).

Glede na osnovno kemijsko sestavo sta n-3 piščančje meso in navadno meso enaka. Razlika je v večji vsebnosti esencialnih MK. Obogatitev živil z n-3 MK je možno s pomočjo krmljenja živali na način, ki ugodno spremeni MK sestavo živil živalskega izvora. Meso, obogateno z n-3 večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK), se uporablja v prehrani ljudi, in sicer kot živilo s funkcionalnimi lastnostmi. Uporaba n-3 maščobnih kislin zmanjšuje tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja, zavira nastanek raka dojke in prostate ter je potrebna za normalno delovanje možganov. V prihodnosti se pričakuje povečana potrošnja piščančjega mesa, obogatenega z n-3 MK, zaradi nizke cene (Azcona in sod., 2008).

### 2.2.1 Voda

Voda predstavlja eno najpomembnejših komponent v mesu. Piščančje meso vsebuje okrog 75 % vode, ki predstavlja medij za transport hranilnih snovi, celičnih metabolitov in hormonov. Je tudi pomemben medij za kemijske reakcije in metabolne procese. Voda v mesu se nahaja v treh različnih stanjih, in sicer: vezana na proteine, imobilizirana (vezana na proteine in ione) in prosta, ki se nahaja med celicami (Christine in sod., 2006).

### 2.2.2 Ogljikovi hidrati

Glavna spojina ogljikovih hidratov je glikogen in predstavlja 1–1,3 % celotne mišične mase. Glikogen predstavlja rezervo, ki je v mišicah zelo pomembna pri sproščanju in krčenju mišic ter pri oksidativni fosforilaciji (Christine in sod., 2006).

### 2.2.3 Beljakovine

Delež beljakovin v mišicah je 16–22 %. Predstavljajo drugo najbolj zastopano sestavino, takoj za vodo. Beljakovine se delijo na: vezivno tkivne, miofibrilarne in sarkoplazemske. V največjem deležu so prisotne miofibrilarne beljakovine (50–60 %), ki so odgovorne za

procesu, kot so sproščanje in krčenje mišic. Sledijo sarkoplazemske beljakovine oziroma mioglobin in hemoglobin ter encimi, ki sodelujejo pri mišičnem metabolizmu (Keeton in Eddy, 2004; Christine in sod., 2006).

## 2.3 PREKURZORJI HCA V PIŠČANČJEM MESU

Različni tipi heterocikličnih aromatskih aminov nastanejo med procesom Streckerjeve razgradnje in Maillardove reakcije. HCA so mutageni, v mesu jih najdemo v zelo majhnih količinah (ng/g). Na nastanek različnih vrst HCA vpliva prisotnost vodotopnih snovi v mesu, ki jih imenujemo prekurzorji. Glavni prekurzorji HCA so: kreatin ali/in kreatinin, proste aminokisliline in ogljikovi hidrati (glukoza). Nekatere študije so pokazale, da prisotnost sladkorja oziroma glukoze ni obvezna za tvorbo HCA (Kizil in sod., 2011).

### 2.3.1 Kreatin/kreatinin

Kreatin je neesencialna sestavina in ima pomembno vlogo pri zagotavljanju energije za krčenje mišic. Človek lahko sintetizira kreatin/kreatinin v jetrih, ledvicah in pankreasu iz aminokislin (arginin, metonin in glicin), ali pa z zaužitvijo hrane živalskega izvora, ki je bogata s kreatinom/kreatininom.

Za piščančje meso je značilna visoka vsebnost kreatina, ki lahko med toplotno obdelavo reagira s prostimi aminokislinami in sladkorjem ter se pretvori v kreatinin. V procesu Maillardove reakcije in Streckerjeve razgradnje od kreatinina nastanejo imidazopiridini, imidazokinolini in imidazokinoksalini (Jaegstad in Skog, 2005).

Pretvorba kreatina v kreatinin je odvisna od temperature in vrednosti pH (višja temperatura kuhanja in nižja vrednost pH vodi do zmanjšanja kreatina in povečanja kreatinina). Kreatin in kreatinin sta odgovorna za mutagenost mesa. Kreatinin je prekurzor AIA (aminoimidazo-azaarenov), kar pomeni, da obogatitev mesa s kreatinom/kreatininom povečuje mutagene AIA (Kizil in sod., 2011).

### 2.3.2 Proste aminokisliline

Proste aminokisliline so biološko pomembne organske spojine, ki vsebujejo amino in karboksilno skupino ter stranske verige. V večjih količinah lahko nastanejo s pretvorbo mišic v meso. V tem biokemijskem procesu sodelujejo mišični encimi, ki vplivajo na aromo in okus mesa ter so vključeni v reakcijo tvorbe HCA (Honikel, 2014).

V piščančjem mesu je tvorba HCA največja, ker vsebuje več kot 40 % esencialnih aminokislin (Aristoy in Toldra, 1998). Pri višjih temperaturah toplotne obdelave se vsebnost aminokislin zmanjša (Wilkinson in sod., 2014).

### 2.3.3 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati predstavljajo najpomembnejši vir energije in delujejo kot sladila, geli in stabilizatorji. So tudi predhodniki HCA in arome mesa. Lahko jih razdelimo na monosaharide, oligosaharide in polisaharide. V mesu se lahko v večjih količinah nahajajo v obliki D-glukoze, D-fruktoze in D-riboze, v manjši količini pa v obliki D-manoze. Maillardova reakcija, ki poteka med aminokislino in reducirajočim sladkorjem, prispeva k aromi mesa in predstavlja glavno pot za nastanek intermediatov, ki so odgovorni za tvorbo HCA (Keeton in Eddy, 2004).

### 2.4 HCA

Heterociklični aromatski amini so bili prvič odkriti v mesu leta 1977. Z Amesovim testom so določili mutagene aktivnosti površinske skorje govedine in rib, pečenih nad ogljem (Skog in sod., 1998).

HCA predstavljajo kancerogene in mutagene spojine v mesu, ki je bilo izpostavljeno visoki temperaturi toplotne obdelave (temperature večje od 150 °C) ali nizki temperaturi in daljšim časom toplotne obdelave (Murkovic, 2004). Poleg temperature na tvorbo HCA močno vplivajo tudi čas in način toplotne obdelave, vrsta mesa, prekursorji HCA in okolje (Rahman in sod., 2014). Raziskave o kancerogenosti HCA segajo v leto 1939, ko je švedski znanstvenik izoliral kancerogene snovi ocvrtega konjskega mesa.

Danes je izoliranih več kot 25 HCA. Dokazano je, da so vsi HCA spojine z visokim mutagenim in kancerogenim potencialom. Poleg tega imajo sposobnost, da povzročajo poškodbe DNA molekul (Vangnai in sod., 2014). HCA so skupina 20 različnih kemijskih spojin, sestavljenih iz heterocikličnih obročev. Vsebujejo dušikove spojine, imenovane amini. Kemijska imena, ki se uporabljajo, niso v skladu z najnovejšimi IUPAC pravili. Še vedno so v rabi mednarodne kratice.

HCA lahko razdelimo v dve skupini, in sicer (Murkovic, 2004):

- polarni (aminoimidazo-azaareni (AIA)) ali IQ tipi, ki se tvorijo med kreatin/inom, ogljikovi hidrati ter prostimi aminokislinami.
- nepolarni ali ne-IQ tipi oziroma porolizini ali aminokarbonili, ki nastanejo s termičnim razpadom aminokislin pri temperaturi višji od 300 °C.

Razdelitev HCA, strukture in imena so prikazani v preglednici 1.

Danes ima meso pomembno vlogo v prehrani človeka, še posebej piščančje meso, ki je bogato z beljakovinami, z železom, cinkom ter vitamini skupine B. Te sestavine močno vplivajo na tvorbo večjih količin HCA v primerjavi z govejim in svinjskim mesom. Visoke vsebnosti maščob in vode v svinjskem mesu vplivajo na zmanjšano tvorbo večjih koncentracij HCA.

V študiji, ki govori o tvorbi HCA, se je izkazalo, da se PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin) lažje tvori pri piščančjem mesu kot pri govejem, svinjskem ali pri ribah. Po drugi strani pa je koncentracija MeIQx (2-amino-3,8dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin) nižja v piščančjem mesu kot v govejem oziroma svinjskem mesu (Keskekoglu in Uren, 2014). Običajno je koncentracija HCA izražena z vrednostjo ppb. Danes veliko študij govori o količinah HCA/dan, ki lahko povzročijo raka, na primer, če človek zaužije 41,4 ng HCA/dan, lahko pride do nastanka raka (Rahman in sod., 2014). Anderson in sod. (2002) so pokazali, da je tveganje za nastanek raka večje pri uživanju toplotno obdelanega mesa v primerjavi s sadjem in zelenjavo. Agencija za raziskavo raka IARC (1993) poroča, da meso, ki vsebuje HCA, povzroča raka pri ljudeh in živalih, in sicer: rak debelega črevesa, prostate, pljuč, kože, prsi, jeter in prebavnega trakta. MeIQ, MeIQx, PhIP in IQ so dokazano rakotvorne spojine.

HCA nastanejo pri uporabi klasičnih postopkov toplotne obdelave mesa, pojavljajo se v različnih koncentracijah ter negativno vplivajo na zdravje ljudi. Povzamemo lahko, da so za odkrivanje HCA potrebne sodobne tehnike (GC, LC, HPLC ter MS) (Murkovic, 2004; Barcelo-Barrachina in sod., 2004).

Preglednica 1: Kratice, imena in formule HCA (Murkovic, 2004).

Kratice HCA	Ime HCA	Formula
<b>Kinolilni (polarni)</b>		
IQ	2-amino-3metilimidazo[4,5-f]kinolin	
MeIQ	2-amino-3,4dimetilimidazo[4,5f]kinolin	
<b>Kinoksalini (polarni)</b>		
IQx	2-amino-3metilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
MeIQx	2-amino-3,8dimetilimidazo[4,5f]kinoksalin	
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	
4-CH2OH-MeIQx	4-hidroksimetil-2-amino-3,8,4dimetilimidazol [4,5f] kinoksalin	

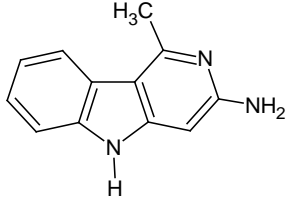
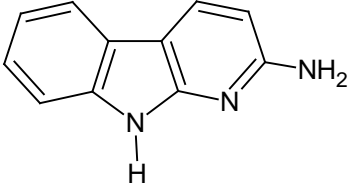
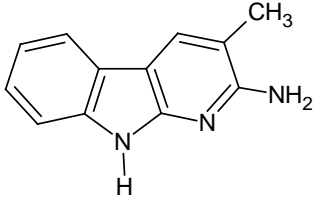
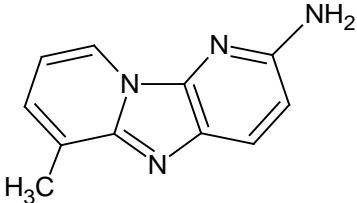
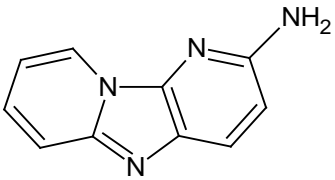
Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 1: Kratice, imena in formule HCA (Murkovic, 2004).

Kratika HCA	Ime HCA	Formula
<b>Piridini (nepolarni)</b>		
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin	
DMIP	2-amino-1,5,4-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	
<b>Piridoimidazoli in idoli (nepolarni)</b>		
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol	

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje preglednice 1: Kratice, imena in formule HCA (Murkovic, 2004).

Kratice HCA	Ime HCA	Formula
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-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol	
Glu-P-2	2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol	

### 2.4.1 Polarni HCA

Polarni HCA ali IQ tipi (aminoimidazo-azaareni (AIA)) so produkti, ki nastanejo pri reakciji med prostimi aminokislinami in keratinom. Lahko nastanejo tudi pri daljšem času pečenja mesnih izdelkov pri nizkih temperaturah. Pri tvorbi polarnih HCA imata veliko vlogo Maillardova reakcija in Streckerjeva razgradnja. Metilirani piridin in mirazin sta prekurzorja omenjenih reakcij. Po drugi strani se kot produkti lahko pojavijo tudi aldehidi. Pojavijo se kot posledica reakcij pri visoki temperaturi, ki kreatin pretvorijo v imidazo, ki je del polarnih HCA (Murkovic, 2004). Koncentracijo AIA zmanjšamo, če povečamo koncentracijo monosaharidov. Če želimo povečati koncentracijo AIA, povečamo koncentracijo prostih aminokislin (Murkovic, 2004; Kizil in sod., 2011).



## 2.4.2 Napolarni HCA

Nepolarni HCA ali ne-IQ tipi se pojavijo pri temperaturi, višji od 300 °C. Nepolarni HCA se lahko pojavijo tudi z denaturacijo proteinov oziroma s segrevanjem aminokislin. Produkti, ki nastanejo med termičnim razpadom, reagirajo s prostimi radikali in tvorijo heterociklično strukturo. Pri tvorbi nepolarnih HCA ni obvezna prisotnost kreatina oziroma kreatinina. Aminokarbonili se lahko pojavijo tudi v sredini, saj ne vsebujejo kreatina/kreatinina, čeprav so v modelnih sistemih pokazali, da dodatek kreatina poveča b-karbonil. Ta ni mutagen, ker na obroču nima vezanih aminoskupin, vendar njegova prisotnost povečuje genotoksičnost HCA (Murkovic, 2004; Alaejos in Afonso, 2011).

## 2.5 POSTOPKI TOPLOTNE OBDELAVE PIŠČANČJEGA MESA IN TVORBA HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV

Toplotna obdelava mesa vključuje različne toplotne procese, in sicer: prevodnost, naravna konvekcija, prisilna konvekcija, sevanje, mikrovalovno sevanje itd. V vsakem primeru je postopek obdelave različen in je odvisen od temperaturnih razlik med izvorom ogrevanja in sestavo mesa, ki je lahko zelo spremenljiva. Eden izmed največjih problemov pri natančnem opisovanju toplotnih procesov je vsebnost maščob, ki je prisotna v presnem mesu ali mesnih izdelkih (Jaegerstad in Skog, 2005).

Pri toplotni obdelavi mesa zmanjšamo število prisotnih mikroorganizmov, ki lahko negativno vplivajo na zdravje ljudi. Z njihovim uničenjem povečujemo tudi rok uporabnosti mesa. Toplota povzroči beljakovinsko koagulacijo in aktivacijo encimov in zaželeno spremembo nekaterih senzoričnih lastnosti (barva, vonj, okus, tekstura itd). V mesu, ki ga segrevamo pri temperaturi, višji od 150 °C, lahko pride do reakcije med proteini in žveplovimi spojinami, kar povzroča tvorbo neprijetnega vonja in slabši okus. Poleg tega lahko pride do tvorbe mutagenih oziroma kancerogenih spojin (HCA), ki povzročajo zmanjšanje senzorične sprejemljivosti mesa (Garcia-Macias, 2010).

Kakovost oziroma hranilna vrednost mesa je odvisna od: razmerja med temperaturo in časom toplotne obdelave, beljakovin, peptidov, lipidov, bakterij (ki niso uničene s toplotno obdelavo) ter encimske inaktivacije (se lahko spreminja s toploto).

V času toplotne obdelave mišice utrpijo različne fizične spremembe, kot so krčenje, osvoboditev tekočin, spremembe barve in zmanjšanje njihove površine. Istočasno se dogajajo tudi druge kemijske spremembe, ki so natančneje opisane v preglednici 2 (Garcia-Macias, 2010).

Preglednica 2: Kemijske spremembe v mesu glede na temperaturo toplotne obdelave (Garcia-Macias, 2010).

Temperatura (°C)	Spremembe v mesu
20–30	Ni sprememb v kemijsko–koloidnih lastnosti. Pojav miozin ATP-azne aktivnosti pri segrevanju pri 30 °C in več.
30–50	Spremembe v miofibrilarnih proteinih. Spremembe v kapacitetah za zadrževanje vode, trdnosti, topnosti proteinov, vrednosti pH, SH koncentracije, barve, Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> . ATP ni več aktiviran.
50–55	Zmanjšana funkcionalnost miofibrilarnih beljakovin. Sprememba barve.
55–80	Pri 65 °C povečana agregacija beljakovin. Kolagen gelira.
Nad 80	Povečano povezovanje sulfhidrilov. Osnovne skupine aminokislin se začnejo povezovati. Poteka Maillardova reakcija. Povečana občutljivost.

Študije govorijo o različnih postopkih toplotne obdelave in prehranjevalnih navadah ljudi, kar prispeva k povzročitvi raka preko zaužitja genotoksičnih spojin, kot so: akrilamidi, heterociklični amini, nitrozamini, poliaromatski ogljikovodiki itd. (Jaegerstad in Skog, 2005).

Meso lahko pripravimo s številnimi postopki toplotne obdelave. Vsebuje lahko različne količine mutagenih oziroma kancerogenih HCA (ppm). Nekateri postopki so podrobneje opisani v nadaljevanju (Skog in Solyakov, 2002).

**Kuhanje** zaradi nizkih temperatur, ki so nižje od 100 °C, ne povzroča nastanka velikih količin mutagenih oziroma kancerogenih HCA (Skog in sod., 1998). V študiji Nagao, (1999) se je izkazalo, da vzorci kuhanega piščanca vsebujejo Harman ali Norharman. Harman ali Norharman sta ko-mutageni substanci, ki povečata mutagene aktivnosti drugih spojin. Rezultat ko-mutagenosti lahko dokažemo s pomočjo Ames testa.

**Pri kuhanju z mikrovalovnim sevanjem** se toplota generira v izdelek. Temperatura na površini mesa ni višja od temperature v drugih delih izdelka. Raziskovalci so v različnih vzorcih piščančjega mesa, ki je bilo obdelano s pomočjo mikrovalovnega sevanja, odkrili Harman, Norharman, Trp-P-2, Trp-P-22, AαC, MeAαC, vendar pa niso odkrili HCA (IQ-tip ali PhIP). Svetujejo obdelavo mesa z mikrovalovnim sevanjem pred kuhanjem, ki pri visoki temperaturi zmanjša nastajanje HCA oziroma MeIQx in PhIP (Felton in sod., 1994).

**Cvrtje** predstavlja način obdelave mesa z vročo maščobo. Cvrtje proizvaja nizke količine HCA, ki so pod 0,5 ng/g. Izkazalo se tudi, da so v piščančjih filejih (temperatura 100–150

°C), odkrili okoli 10 različnih HCA v koncentraciji od 1 ng/g do 3 ng/g (Chiu in sod., 1998).

S cvrtjem pride do pojava MeIQx, ki se giblje od 0–3 ng/g. Nekatere študije so pokazale, da so v vzorcih piščančjih in puranjih prsi odkrili večje količine MeIQx (10,4 ng/g) in PhIP (20–70 ng/g) (Sinha in Rothman, 1999).

**S praženjem v pečici** ne pride do pojava visokih koncentracij HCA, ki so lahko: 3,2 ng/g za MeIQx in 3 ng/g za PhIP. V piščančjem mesu, ki je bilo pečeno 25 min v lončeni posodi pri temperaturi 200 °C, sta bila zaznana Harman in Norharman. Prav tako so pri piščančjem mesu, ki je bilo pečeno pri temperaturi 275 °C za 30 min, odkrili MeIQx (0,5 ng/g) in PhIP (37,5 ng/g pri prsih oziroma 8,0 ng/g pri stegnih) (Richling in sod., 1998).

**Pečenje, pečenje na plošči in pečenje na žaru** – pri teh metodah prihaja do tvorbe HCA v različnih koncentracijah. V piščančjem mesu, ki je bilo tretirano s pečenjem, pečenjem na plošči ali pečenjem na žaru, se lahko pojavi MeIQx (3 ng/g in več) in PhIP (40 ng/g in več). Izjemno visoke koncentracije (100 ng/g) se pojavijo pri toplotni obdelavi piščančjih prsi, 6 minut nad odprtim plamenom pri zelo visoki temperaturi (Salomon in sod., 1997).

V piščančjih filejih so bile pri različnih načinih toplotne obdelave odkrite mutagene oziroma kancerogene snovi (HCA). Heterociklični aromatski amini, kot so: IQ, IQx, MeIQ, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC in MeAαC se nahajajo v mesu, ampak v manjših količinah od PhIP. PhIP je prisoten s koncentracijo večjo od 40 ng/g, Harman in Norharman s koncentracijo okoli 10 ng/g, MeIQx s koncentracijo okoli 3 ng/g ter DiMeIQx s koncentracijo okoli 2 ng/g (Skog in sod., 1998; Skog in Solyakov, 2002).

### 2.5.1 Maillardova reakcija in tvorba HCA

Leta 1912 je na Univerzi v Nancyju v Franciji profesor Louis Maillard opazil, da se s segrevanjem aminokislin v prisotnosti različnih sladkorjev tvorijo različni vonji in barva se spremeni v rjavo. Maillardova reakcija se uporablja za opis kemijskih reakcij med karbonilnimi spojinami in primarnimi ali sekundarnimi aminoskupinami v živilih. Maillardova reakcija predstavlja obliko ne-encimskega porjavenja, ki se začne pri temperaturi 80 °C in več, potek je hitrejši pri temperaturi 140–165 °C. S povečanjem temperature je karamelizacija bolj izražena. Produkti Maillardove reakcije so barvne in hlapne spojine, ki vplivajo na aromo, okus in barvo živila (Shahidi in Samaranyaka, 2004).

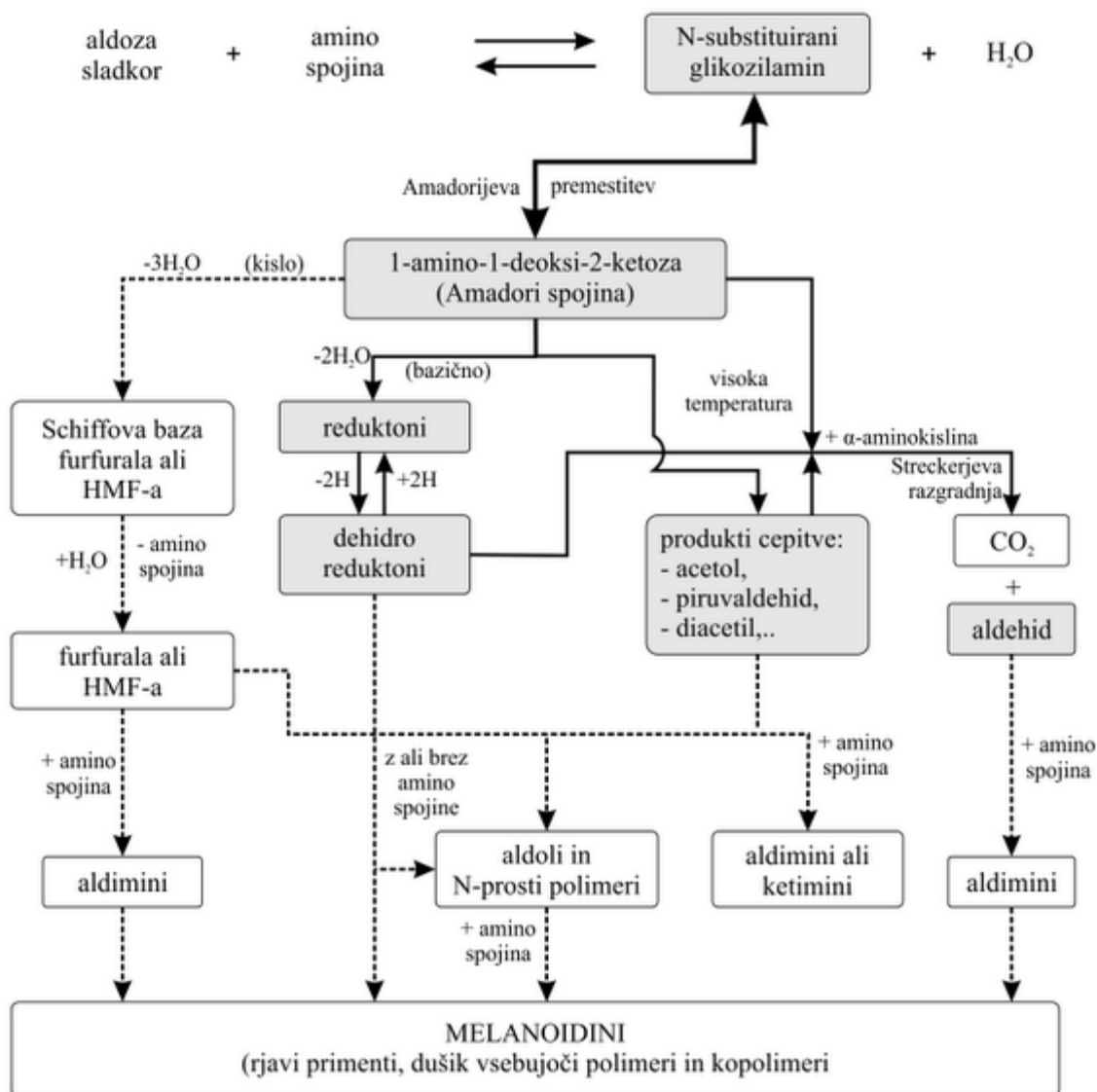
V prvem koraku Maillardove reakcije se tvorijo  $\alpha$ -dikarbonili (preko N-substituiranega glikozilamina) in Amadorijeve spojine. Pri razgradnji omenjenih spojin nastanejo furfurali, glikozamini in dekarbonili. Te spojine so zelo pomembni za oblikovanje arome mesa in lahko reagirajo z amini, aminokislinami in drugimi aldehidi, ki tvorijo O-, N-, S-heterociklične produkte (Shahidi in Samaranyaka, 2004).

Na produkte Maillardove reakcije vplivajo: temperatura, čas kuhanja, vodna aktivnost, vsebnost vode, vrednost pH, koncentracija reaktantov ter prekursorji. Reakcija med

aminokislinami in  $\alpha$ -dikarbonilnimi spojinami je ena najpomembnejših reakcij, znana tudi kot Streckerjeva reakcija. Ta vodi do tvorbe aldehydov, poznanih tudi kot Streckerjevi aldehydi ter vsebuje en ogljikov atom manj v primerjavi z aminokislinami in ogljikovim dioksidom. Po drugi strani pa dikarbonili izvirajo iz saharidov in se lahko pretvorijo v  $\alpha$ -aminoketone, ki predstavljajo pomembne posrednike pri tvorbi heterocikličnih spojin. V Streckerjevi razgradnji nastanejo tudi številne reaktivne spojine, in sicer: aldehydi, amonijak, vodikov sulfid itd. (Shahidi in Samaranayaka, 2004).

Maillardova reakcija igra pomembno vlogo pri tvorbi HCA. O tvorbi mutagenih spojin med Maillardovo reakcijo in Streckerjevo razgradnjo govorijo številne raziskave. Ugotovljeno je bilo, da:

- IQ spojine nastanejo kot produkt Streckerjeve razgradnje.
- HCA nastanejo v proteinsko bogatih živilih kot rezultat Maillardove reakcije. Predstavljajo produkt reakcije med kreatinom/kreatininom, aminokislinami in sladkorjem (Kizil in sod., 2011).
- Je prvi korak pri nastajanju MeIQx in DiMeIQx je odvisen od kinetike Maillardove reakcije in Streckerjeve razgradnje, ki se začne s formacijo piridinskih in pirizinskih prostih radikalov. Za stabilizacijo formacije prostih radikalov, piridinski in pirizinski produkti začnejo reagirati s kreatinom. Segrevanje kreatina 3 ure (2,5-dimetilpirazin ali 2-metilpiridin in acetaldehid) pri temperaturi 130 °C povzroča nastanek MeIQx in DiMeIQx (Skog in sod., 1998).



Slika 2: Shematski prikaz reakcij neencimskega porjavenja (Hodge, 1953).

## 2.6 ZMANJŠEVANJE TVORBE HCA

Večina mesa se pred uživanjem toplotno obdela. Žal se med toplotno obdelavo mesa tvorijo tudi spojine, ki so škodljive za zdravje človeka. Take škodljive spojine so lahko heterociklični aromatski amini (HCA). Ugotovili so, da te spojine nastajajo v majhnih količinah (ng/g), v proteinsko bogati hrani pri normalnih postopkih toplotne obdelave (cvrenje, praženje in pečenje). Obstaja tudi več različnih možnosti za zmanjšanje tvorbe HCA pri toplotni obdelavi mesa, in sicer (Rahman in sod., 2014):

- uporaba nižjih temperatur obdelave,
- izogibanje stika mesnih površin s plamenom,
- tretiranje z mikrovalovi pred toplotno obdelavo,
- zmanjšanje časa kuhanja,
- mariniranje mesa pred cvrtjem,
- pečenje na žaru z uporabo različnih začimb (rožmarin, timijan, žajbelj, česen, škrob, sadni ekstrakti itd.),
- z dodajanjem sojinih proteinov in polisaharidov, za povečanje vlažnosti med toplotno obdelavo,
- z dodajanjem različnih komponent, ki delujejo kot antioksidanti.

Kot antioksidant se šteje vse, kar prispeva k zmanjšanju HCA v mesu, ki je bilo obdelano pri visoki temperaturi. Veliko znanstvenikov je uporabilo naravne antioksidante in ugotovilo, da lahko ti antioksidanti igrajo pomembno vlogo pri zmanjševanju količine HCA (Rahman in sod., 2014).

### **2.6.1 Naravni antioksidanti**

Danes obstajajo različne študije, ki govorijo o zmanjševanju HCA, v povezavi z uporabo naravnih antioksidantov. Na podlagi študije lahko trdimo, da ekstrakti, ki vsebujejo polifenolne antioksidante, zmanjšajo nastajanje HCA. Razlog je lovljenje prostih radikalov (Hasjaraca in sod., 2014).

Oguri in sod. (1998) so dokazali, da med 20 različnimi vrstami antioksidantov zeleni čaj, ki je bogat s polifenolnimi spojinami, kot sta katehin in epigalokatehin, zavira nastanek MeIQx od 21 % do 35 %. Weisburger in sod. (1994) so prav tako proučevali učinek zelenega in črnega čaja na zmanjšanje nastanka MeIQx in PhIP.

Monti in sod. (2001) so v svoji raziskavi kot antioksidant uporabili le zeleni čaj zmešan z oljnim oljem in ugotovili, da so rezultati boljši. Poudarili so, da ima oljno olje sposobnost za eliminacijo HCA (IQ tip) iz mesnih izdelkov.

Rounds in sod. (2013) so v raziskavi uporabili izvlečke različnih vrst sadja in zelenjave (marelice, pomaranče, ohrovt, korenje, rumene in rdeče paprike ter paradižnik) za zmanjševanje HCA. Prišli so do zaključka, da se je koncentracija IQ zaradi prisotnosti karotenoidov in ksantofilov v ekstraktih zmanjšala. Karotenoidi v koncentraciji od 1000 ppm zmanjšajo koncentracijo IQ (MeIQx) za 36 %.

Nekateri vitamini delujejo kot antioksidanti (vitamina C in E). Njihova učinkovitost za zmanjševanje HCA je bila raziskana s strani Balogh in sod. (2000). Odkrili so, da se z dodatkom vitamina E, s koncentracijo 1-10 %, na površini goveje pleskavice zmanjša

nastajanje HCA za 45–75 %. Na zmanjšanje HCA imajo vpliv tudi sojini beljakovinski koncentraciji. Razlog je prisotnost klorogenske kisline, ki ima antioksidativni učinek.

Balogh in sod. (2000) so v goveje meso dodajali različne koncentracije rožmarina pred cvrtjem in opazovali zmanjšanje vsebnosti HCA. Oz in Kaya (2011) sta poročala, da tudi rdeča paprika deluje kot antioksidant in pomaga pri eliminaciji HCA, ki se tvorijo med toplotno obdelavo pri visoki temperaturi. Puangsombat in sod. (2011) so prikazali zmanjševanje HCA. Uporabili so galangal (18,4 % zmanjšanje), korenino ingverja (35,5 % zmanjšanje) in kurkumo (39,2 % zmanjšanje). Shin in sod. (2002) pravijo, da česen, ki ga dodamo neposredno med toplotno obdelavo mesa, zmanjša tvorbo HCA za 46-81 %.

Rounds in sod. (2013) so pokazali, da uporaba začimb in rastlinskih ekstraktov inhibira rakotvorne HCA ter zavira rast *E. coli* O157:H7. Pokazali so tudi minimalno koncentracijo dodatka s sposobnostjo za zmanjševanje rakotvornih HCA in inhibicijo *E. coli* O157:H7, ki za rastlinske ekstrakte in začimbe v prahu znaša 5 %. Z uporabo teh ekstraktov zmanjšujemo tudi učinkovitost PhIP in MeIQx. 5 % dodatek oljčnega ekstrakta zmanjša MeIQx za 79,5 % in PhIP za 84,3 % (Rounds in sod., 2013). Glavna aktivna sestavina oljčnega ekstrakta je hidroksitirisol, znan kot močan antioksidant, in zmanjša nastanek HCA. Dodatek jabolčnega ekstrakta zmanjša MeIQx za 50,9 % in PhIP za 65,2 %. Dodajanje manjših koncentracij teh ekstraktov ne vpliva na zmanjševanje HCA. Po drugi strani, koncentracije, večje od 3 %, ne vplivajo na senzorične lastnosti izdelka. Pokazalo se je, da tudi dodatek 3 % čebule v prahu PhIP učinkovito zmanjša do 80,7 %, medtem ko MeIQx do 47 %. Ta je bogata z antioksidativnimi spojinami in flavonoidi, ki zavirajo proste radikale.

Dodatek mlete čebule (2 g) zmanjša nastanek PhIP do 79 %. Dodajanje čebule v prahu (1 %) poveča vsebnost MeIQx za 26,2 % in zmanjša PhIP za 30,8 %. Rezultati so v nasprotju s tistimi, kjer je bila uporabljena 3 % čebula v prahu. Razlog, zakaj se rezultati med seboj razlikujejo, je v prostih radikalih, kot sta piridin in pirazin, ki sta zelo pomembna za tvorbo MeIQx, ampak ne dovolj za njegovo zmanjšanje. Antioksidativno delovanje eteričnega olja na nastanek MeIQx nima vpliva. Dodatek 0,3 % eteričnega olja je povečal koncentracijo MeIQx za 19,7 %, dodatek 0,5 % pa za 61,5 %. Po drugi strani pa se je koncentracija PhIP, pri dodatku 0,3 % eteričnega olja, zmanjšala za 21,9 %, pri 0,5 % eteričnem olju pa povečala za 23,1 % (Rounds in sod., 2013).

Številne študije kažejo pozitiven učinek polifenolnih snovi na zmanjšanje tvorbe HCA v modelnih sistemih za različne mesne izdelke, in sicer:

- Persson in sod. (2003) so pokazali, da ima cvrtje burgerjev v deviškem oljčnem olju večji učinek na zmanjšanje tvorbe HCA v primerjavi s cvrtjem burgerjev v rafiniranem oljčnem olju. Razlog je vsebnost fenolnih spojin.
- Monti in sod. (2001) so pokazali, da sveže oljčno olje, ki vsebuje več fenolnih spojin, v večji meri zavira nastanek HCA v primerjavi z leto dni starim oljčnim oljem.
- Smith in sod. (2008) so odkrili, da goveje meso, marinirano s komercialno marinado, zmanjša tvorbo HCA za 88 %.

- Viegas in sod. (2012) so dokazali, da marinade, bogate z antioksidanti, močno zavirajo nastanek HCA v ocvrti govedini.

V študiji (Murkovic, 2004) so meso marinirali z gozdnimi sadeži in rožmarinovim ekstraktom, ki so jih nato dispergirali v emulzijo vode in sončničnega olja. Cilj študije je bil preveriti sposobnost antioksidantov pri nastanku HCA v mesu. Prišli so do zaključka, da vse fenolne kisline povečajo nastanek PhIP.

Na osnovi modelne študije lahko zaključimo, da marinade z rožmarinom in/ali gozdnimi sadeži poleg antioksidantov vsebujejo tudi druge sestavine, kot sta pentoza in heksoza, ki lahko zavirajo nastanek HCA. To je tudi razlog, zakaj v govejih pleskavicah najdemo majhne koncentracije PhIP, kljub temu da v vzorcih nimamo rastlinskih izvlečkov. Z neposrednim dodajanjem rožmarinovega ekstrakta zmanjšamo nastajanje HCA v govejem mesu za 69 %. Jabolčni ekstrakt ima največji vpliv na zmanjšanje MeIQx, 4,8-DiMeIQx in PhIP, in sicer do 70 %. V modelnem sistemu, kjer je uporabljen jabolčni ekstrakt, so bili proantocianidi opredeljeni kot glavni aktivni inhibitor HCA. V vzorcih tretirani z začimbami se je vsebnost HCA zmanjšala za <60 %. Dodatek začimb lahko vpliva na senzorične lastnosti mesa, kar lahko predstavlja problem pri prodaji. Zaključimo lahko, da je primerna količina rožmarinovega ekstrakta <1 g na 100 g olja (Murkovic, 2004).

#### 2.6.1.1 Brin

Brin (*Junipers communis* L.) je igličasti zimzeleni grm in predstavlja eno izmed najbolj cenjenih rastlin, ki je bogata z biološko aktivnimi sestavinami. Rod *Juniperus* spada v družino Cupressaceae, ki obsega okoli 70 različnih vrst. Morfološke značilnosti se razlikujejo glede na vrsto. Brin ima tanko, rjavo in vlaknasto lubje, ki se lušči na tanke trakove. Veje se širijo ali naraščajo. Ko je mlad, so veje rumenkaste ali zelene, porjavijo in strdijo pa se s starostjo. Listi so enostavni in trdi ter razporejeni v obliki vencev. Barva listov je zelena. Plodovi so okrogle ali jajčaste oblike z velikostjo 6–13 mm. Ti imajo rdečo barvo na začetku, z zorenjem pa postanejo modro-črne. Zorijo približno 2–3 leta. Brin lahko preživi pri nizkih temperaturah, ampak lahko zaradi poznih zmrzali pride do poškodbe ploda. Zahteva suho ali vlažno zemljo, raste lahko tudi na različnih tipih zemlje. Glede razširjenosti brinove jagode rastejo po celi Evropi, Severni Afriki, Severni Ameriki, zahodni Aziji in na Japonskem. Brin se zbira jeseni, nato se počasi suši v senci, s čimer se izognemo izgubi olja. V človeški prehrani se brin uporablja za aromatiziranje živil (kislo zelje, paštete itd.), aromatiziranje pijač (čaj, gin), kot kavni nadomestek, za izdelavo eteričnih olj itd. (Lander, 2015). V skandinavski kuhinji se uporablja tudi kot začimba, ki daje oster okus mesnim jedem (Garcia-Macias, 2010). Brin vsebuje številne aromatične hlapne komponente (Lander, 2015).

Miceli in sod. (2011) so opravili HPLC-DAD analizo brinovega ekstrakta (*Juniperus drupacea*) v metanolu. Cilj te raziskave je bil karakterizacija fenolnega profila ekstrakta. Ugotovili so, da 1 g brinovega ekstrakta (*Juniperus drupacea*) vsebuje  $48,6 \pm 0,99$  mg fenolnih spojin, izraženih v obliki galne kisline.



Fenolne spojine delujejo kot antioksidanti, lovijo proste radikale, upočasnijo oksidacijske reakcije ali inhibirajo peroksidacijske lipide. Identificirane spojine v ekstraktu brina na osnovi kemijske strukture so prikazane v preglednici 3 (Miceli in sod., 2011).

Preglednica 3: Identificirane fenolne spojine v ekstraktu brina (Miceli in sod., 2011).

vrhovi	spojine	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[M-H]^{-1}$	$\mu\text{g/g}$ ekstrakt (srednja vrednost $\pm$ % KV)
1	galna kislina	220,270	169,0137	1016 $\pm$ 1,66
2	protokatehuličnakislina	218,258,293	153,0188	1097 $\pm$ 0,14
3	tirizol	223 276	137,0602	1324 $\pm$ 0,64
4	7-hidroksikumarnakislina	205,317	161,0239	433 $\pm$ 3,05
5	klorogena kislina	218,300,324	353,0873	703 $\pm$ 1,68
6	rutin	276,352	609,1456	208 $\pm$ 2,18
7	katehin	205,278	289,0712	181 $\pm$ 1,70
8	hipolaetin-7-pentozid	202,267,344	433,0771	311 $\pm$ 0,54
9	kupresoflavon	232,273,334	537,0822	82 $\pm$ 5,20
10	amentoflavon	230,270,337	537,0822	927 $\pm$ 0,35
11	biflavoni	230,270,337	537,0822	194 $\pm$ 4,65
12	metil-biflavon	232,370,334	551,0978	114 $\pm$ 0,79

$\lambda_{\max}$  (nm): vrhovi absorbance v nanometrih,  $[M-H]^{-1}$ : identificirani ioni, % KV: koeficient variacije.

### 2.6.2 Sintetični antioksidanti

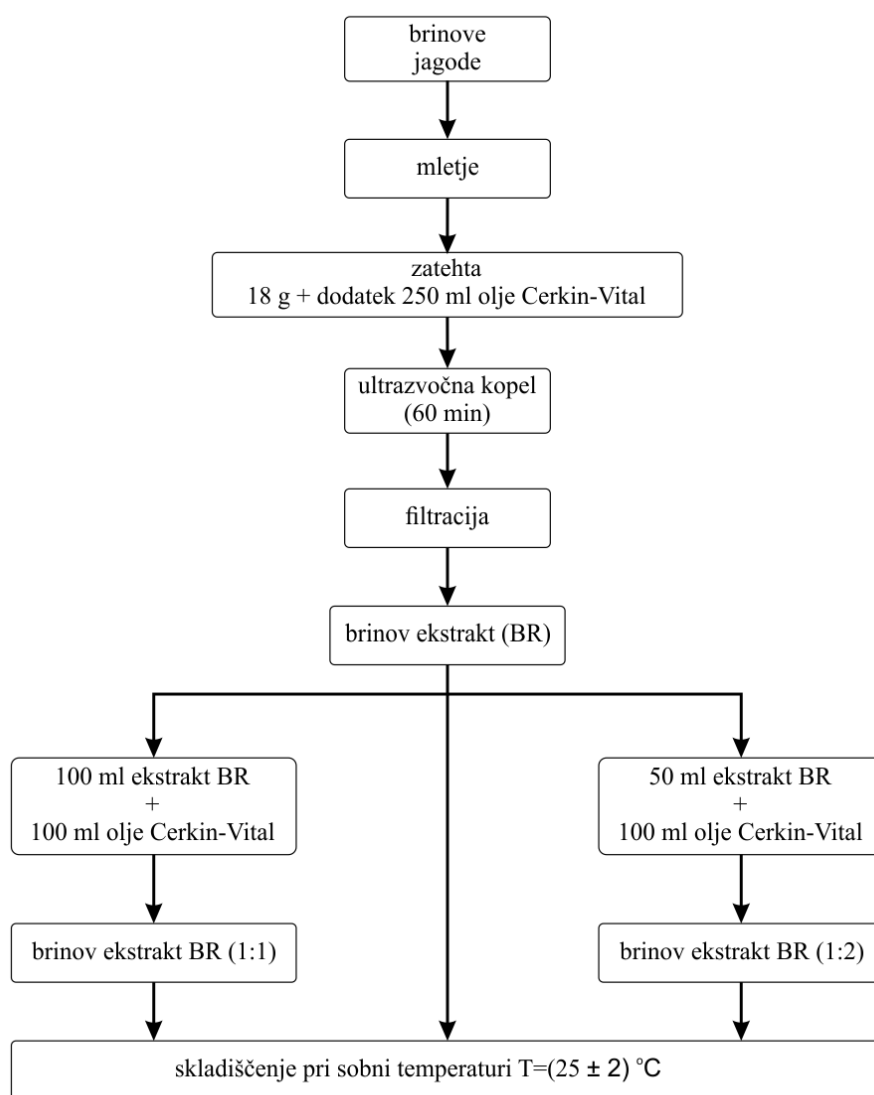
Danes imamo na voljo veliko sintetičnih antioksidantov, ki so močni zaviralci nastanka HCA. Ugotovili so, da butiliran hidroksianizol (BHA), butiliran hidroksitoluen (BHT), propil galat (PG) in butiliran hidrokinon (TBHQ) zmanjšajo tvorbo HCA. BHT, TBHQ in PG močni preprečevalci nastajanja HCA oziroma MeIQ<sub>x</sub>.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL IN NAČRT DELA

V okviru eksperimentalnega dela naloge smo določili: vsebnost fenolnih spojin v brinovih ekstraktih z metodo Folin-Ciocalteu, vpliv dodatka ekstrakta brina v rafiniranem sončničnem olju na tvorbo HCA v toplotno obdelanih mini piščančjih filejih (navadni in z večjo vsebnostjo n-3 maščobnih kislin) ter najučinkovitejšo količino dodatka ekstrakta.

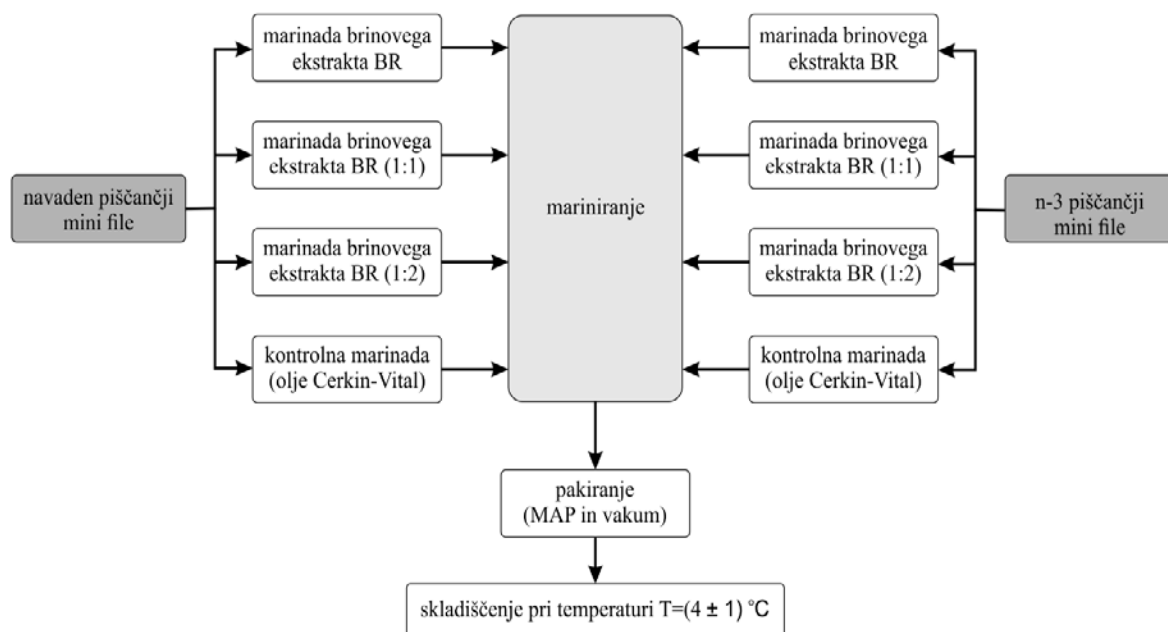
Ekstrakti brina, uporabljeni v poskusu, so bili predhodno pripravljene iz brinovih jagod (Maestro, BIH, letnik 2003). Način priprave je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Shematski prikaz postopka priprave brinovih ekstraktov.

Glavni ekstrakt brinovih jagod smo pripravili tako, da smo v čašo natehtali 18 g vzorca (zdrobljenih iglic brina (Maestro)) in dodali 250 ml olja Cekin – Vital. Sledila je ultrazvočna kopel (3510 Branson) za 60 minut. Rastopino smo nato prefiltrirali in vsebino prelili v 250 ml merilne bučke ter dopolnili z oljem Cekin-Vital do oznake. Iz tako pripravljenega glavnega ekstrakta (BR) smo pripravili še dva delovna ekstrakta z različnimi koncentracijami. Za ekstrakt brinovih jagod v razmerju 1:1 smo zmešali 100 ml ekstrakta BR in 100 ml sončničnega olja Cekin-Vital. Za ekstrakt brinovih jagod v razmerju 1:2 pa smo uporabili 50 ml ekstrakta BR in 100 ml sončničnega olja Cekin-Vital.

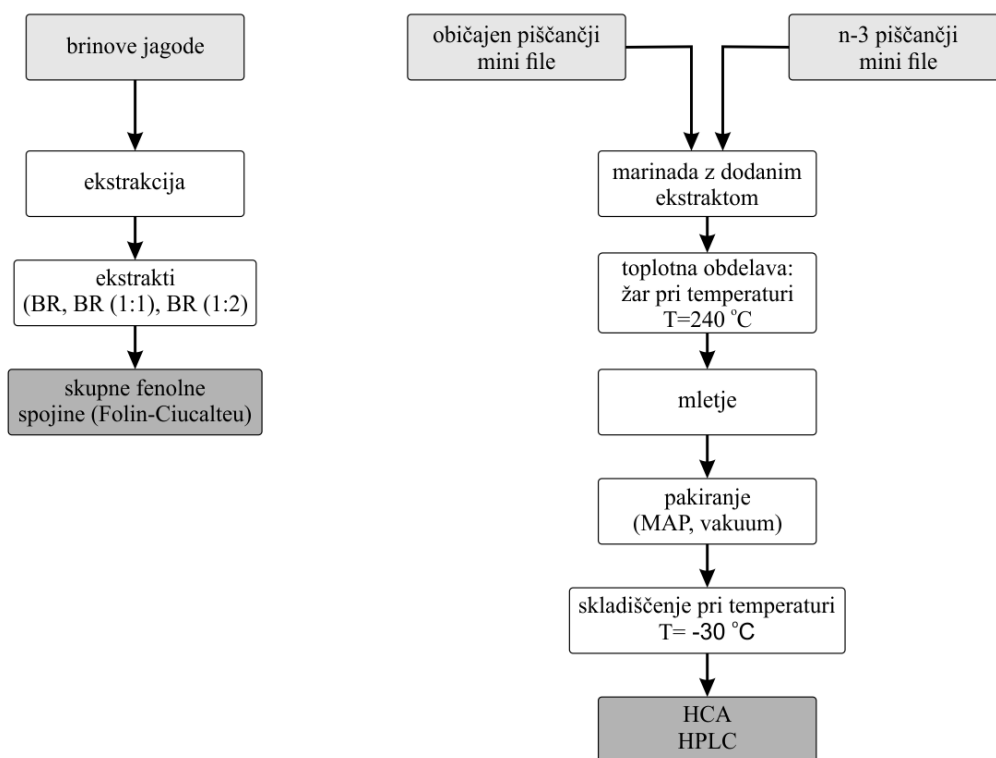
V poskusu smo uporabili mišice (*m. pectoralis superficialis*) navadnega in n-3 piščančjega fileja. Mini piščančje fileje smo tretirali z brinovimi ekstrakti (3 različne koncentracije), pripravljenimi v rafiniranem sončničnem olju. Uporabili smo olje Cekin-Vital (Gea d.d., Slovenska Bistrica). Gre za jedilno sončnično olje z visoko vsebnostjo oleinske kisline. Primerno je za dušenje, pečenje, cvrtje in pripravo hladnih jedi. Za vsako koncentracijo brinovega ekstrakta smo v polietilensko vrečko zapakirali 12 kosov mini filejev navadnega in n-3 piščančjega mesa ter dodali 50 ml posameznega delovnega ekstrakta. Shema priprave vzorcev je prikazana na sliki 4. Tako pripravljene in stehane fileje smo hranili v hladilniku pri 4 °C.



Slika 4: Shematski prikaz postopka mariniranja piščančjih filejev.

## 3.2 METODE DELA

Eksperimentalni del naloge je potekal v dveh delih, pri čemer smo določili skupne fenolne spojine v brinovitih ekstraktih z metodo Folin-Ciocalteu in HCA v mariniranih piščančjih mini filejih (navadni in tiste z večjo vsebnostjo VNMK). Na sliki 5 je prikazana celotna shema eksperimenta.



Slika 5: Shematski prikaz celotnega poteka eksperimenta.

### 3.2.1 Toplotna obdelava piščančjih filejev

Piščančje fileje smo toplotno obdelali na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240 °C oziroma do središčne temperature 84 °C (vbojni termometer Testo 0554 1765 USB-Interface, Nemčija). Fileje smo nato zmleli na volku (Retsch GM, 200, Slovenija), potem pa zapakirali v polietilenske vrečke. Nato smo fileje zamrznili pri -30 °C in jih shranili do nadaljnjih analiz.

### 3.2.2 Izračun izgube mase med pečenjem

Piščančje fileje smo pred in po toplotni obdelavi stehali (tehtnica Soehle, Nemčija) ter iz razlik izračunali izgube mase med pečenjem. Na ta način smo ugotovili, kakšen vpliv ima dodatek rastlinskih ekstraktov na izgubo mase.

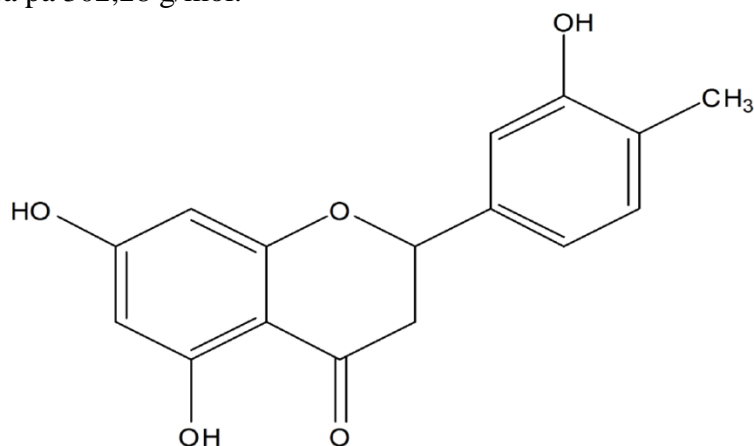
### 3.2.3 Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu

Princip:

Folin-Ciocalteu je spektrofotometrična metoda, ki temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju, ki s FC reagentom, ki vsebuje volframat in molibdat, daje modro obarvan kompleks. Obarvanemu produktu izmerimo absorbanco (Singleton in sod., 1999).

#### 3.2.3.1 Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Za pripravo umeritvene krivulje smo namesto galne kisline uporabili hesperetin, ki predstavlja standardno referenčno spojino za določanje fenolnih spojin. Hesperetin, oziroma 5,7-trihidroksi-4-metoksiflavonon oziroma 5,7-dihidroksi-2(3-hidroksi-4-metoksifenil) 4-chromanon je biflavonoid. Empirična formula hesperetina je  $C_{16}H_{14}O_6$ , molekulska masa pa 302,28 g/mol.



Slika 6: Strukturna formula hesperetina.

Izvedba:

Za umeritveno krivuljo smo pripravili štiri paralelke. V štirih epruvetah smo dolili po 100  $\mu$ l od posameznih ekstraktov (BR, BR (1:1), BR (1:2)) oziroma kontrole. V vsako epruveto smo posamezno dolili različne količine MeOH (95, 90, 85, 80  $\mu$ l), hesperetin (5, 10, 15, 20  $\mu$ l) s koncentracijo 3,5 mg/10 ml MeOH. Na koncu pa smo dolili še MQ vode, FC reagenta ter  $Na_2CO_3$  (20 %) (Preglednica 4).

Preglednica 4: Podatki za pripravo umeritvene krivulje.

ekstrakt	količina ( $\mu$ l)	MeOH ( $\mu$ l)				hesperetin ( $\mu$ l)				MQ vode ( $\mu$ l)	reagent Folin-Ciocalteu ( $\mu$ l)	$Na_2CO_3$ ( $\mu$ l)
		I	II	III	IV	I	II	III	IV			
BR	100	95	90	85	80	5	10	15	20	1300	300	300
BR (1:1)	100	95	90	85	80	5	10	15	20	1300	300	300
BR (1:2)	100	95	90	85	80	5	10	15	20	1300	300	300
kontrola	100	95	90	85	80	5	10	15	20	1300	300	300

I, II, III, IV: posamezne paralelke.

### 3.2.3.2 Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v ekstraktih

Izvedba:

V steklene epruvete s pokrovčki na navoj smo odtehtali 2 g ( $\pm 0,001$  g) posameznega vzorca ekstrakta oziroma olja Cekin-Vital kot kontrolo. Dodali smo 1 ml 80 % MeOH, premašalina vrtničnem mešalu (240 obratov, 35 minut), nato je sledilo centrifugiranje (15 minut,  $1500\times g$ ). Po centrifugiranju smo iz vsake epruvete odpipetirali 100  $\mu$ l zgornje faze, oziroma 100  $\mu$ l 80 % MeOH kot slepo probo ter dodali 1300  $\mu$ l MQ vode, 300  $\mu$ l 20 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 300  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagenta. Vsebinsko smo premešali, da ni prišlo do nastanka oborine ter počakali 60 min. Nato smo izmerili absorbanco pri 760 nm proti slepemu vzorcu. Podatki za pripravo vzorcev so prikazani v preglednici 5. Rezultate smo izrazili v mg hesperetina na liter ekstrakta ter kot koncentracijo antioksidantov.

Preglednica 5: Podatki za pripravo vzorcev za določanje skupnih fenolnih spojin.

ekstrakti	količina ( $\mu$ l)	MQ vode ( $\mu$ l)	reagent Folin-Ciocalteu ( $\mu$ l)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ ( $\mu$ l)
BR	100	1300	300	300
BR (1:1)	100	1300	300	300
BR (1:2)	100	1300	300	300
kontrola	100	1300	300	300

### 3.2.4 Določanje vsebnosti HCA v pečenih navadnih in n-3 mini piščančjih filejih

Princip:

Heterociklične aromatske amine smo ekstrahirali z ekstrakcijo s trdno fazo ter jih določili s HPLC-MS v kombinaciji z masnim spektrometrom. Dobljene kromatograme smo nato obdelali z računalniškim programom Mass Lynx<sup>TM</sup> V 4,1 (Micromass. let. 2004).

Izvedba:

Za določanje vsebnosti HCA smo uporabili modificirano metodo po Barcelo-Barrachina in sod., (2004). V 100 ml čaše smo odtehtali 3 g ( $\pm 0,001$  g) predhodno homogeniziranega vzorca, dodali 12 ml 1M NaOH (Merck, 1.06498) ter 100  $\mu$ l internega standarda TriMelQx (TRC, A630000) v metanolu. Čaše smo pokrili s parafilmom ter jih čez noč pustili na magnetnem mešalniku. V homogenat smo dodali 12 g diatomejske zemlje EXtrelut®NT (Merck, 1.15092) in premešali s stekleno palčko. Stekleno kolono smo napolnili s 70 ml etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252), naložili vzorec in počasi ekstrahirali. Eluat smo zbirali v čašo. Sledilo je čiščenje vzorca z metodo ekstrakcije s trdno fazo (SPE). Uporabili smo kolone Oasis MCX 60 mg (Waters, 186000253). Ves eluat smo injicirali na kolono, ki smo jo predhodno kondicionirali z 2 ml metanola (Merck, 1.09060) in uravnotežili z 2 ml etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252). Sledilo je spiranje z 2 ml 0,1 M raztopine HCl in 2 ml metanola (Merck, 1.06007). Kolono smo posušili v toku zraka. Elucija polarnih in nepolarnih HCA je potekala z 2 ml mešanice metanol (Merck, 1.06007):25 % raztopine amonijaka (Merck, 1.05432) v razmerju 19:1 (v/v). Nato smo vzorec do suhega evaporirali v centrifugi (Genevac, HT-4X Evaporator) ter suh preostanek raztopili v 200  $\mu$ l metanola (Merck, 1.09060).

### 3.2.4.1 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

Preiskovane komponente oz. heterociklične aromatske amine smo ločili s HPLC sistemom Agilent Technology 1100, ki je sestavljen iz binarne črpalke (G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (G1379A), termostata kolone (G1316A) in avtomatskega vzorčevalnika (G1330B).

Pogoji detekcije:

Način kromatografije: RP (reverzna faza)

Kromatografska kolona: Kinetex C18 (2,6  $\mu\text{m}$   $\times$  2,1  $\times$  100 mm) (Phenomenex, Torrance, ZDA, 00F-4439-B0)

Mobilna faza A: 30 mm amonijev formiat (HCOOHNH<sub>4</sub>; Fluka; pH 3,2)

Mobilna faza B: acetonitril (acn; Merck)

Volumen injiciranja: 1  $\mu\text{l}$

Temperatura vzorcev: 8 °C

Temperatura kolone: 30 °C

Preglednica 6: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju HCA.

čas (min)	mobilna faza A (%)	mobilna faza B (%)	pretok (ml/min)
0	95	5	0,500
10	40	60	0,500
11	0	100	0,500
12,1	95	5	0,500
15	95	5	0,500

Posamezni HCA so bili določeni na podlagi retencijskih časov in m/z HCA standardov (TRC: Harman, H105000; Norharman, N700000; IQ, H785000; MeIQ, A605200; IQ<sub>x</sub>, A616900; MeIQ<sub>x</sub>, A606600; 4,8-DiMeIQ<sub>x</sub>, A631000; 7,8-DiMeIQ<sub>x</sub>, A869500; 4,7,8-TriMeIQ<sub>x</sub>, A630000; PhIP, A617000, A $\alpha$ C, A629002; Glu-P-2, N493810; Trp-P-1, N493780; Trp-P-2, N493985).

Preglednica 7: Masni detektor: Micromass Quattro Micro; Waters.

način:	ESI+
kapilara (kV)	3,50
napetost vhodne leče (V)	40
leča (V)	2
ekstraktor (V)	0,5
temperatura vhodne leče (°C)	120
temperatura razpršilnega N <sub>2</sub> (°C)	350
pretok N <sub>2</sub> Cone (l/h)	50
pretok razpršilnega N <sub>2</sub> (l/h)	450
način	SIR (ang. Selected Ion Recording)

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

Detekcija na masnem spektrometru je potekala v SIR načinu pri pogojih, ki so navedeni v preglednici 8.

Preglednica 8: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu.

HCA	m/z (ESI+)	cona (V)
IQ	199,20	40
IQx	200,20	40
MeIQx	214,20	40
Glu-P-2	185,20	40
Harman	183,28	40
Norharman	169,26	40
PhIP	255,20	40
TriMeIQx	242,26	40

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

Rezultati so bili obdelani s funkcijo Quantify v programu Mass Lynx™ V 4.1 (Micromass. let. 2004).

### 3.2.4.2 Statistična analiza

Rezultate, pridobljene iz analiz, smo pripravili in uredili s programom Microsoft Excel 2007. Osnovne statistične parametre smo izračunali s programom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Analiza podatkov je bila izvedena s programsko opremo Statistical Analysis System (SAS) software, version 8.1 (SAS Institute, Cary, NC, ZDA).

Eksperiment za vrednotenje nastanka posameznih in skupnih HCA v piščančjih mini filejih je bil zastavljen kot faktorski poskus  $2 \times 4$  (dva tipa mini piščančjega fileja (navaden, n-3), 4 koncentracije dodanega ekstrakta brina (t. j. kontrola, BR (1:2), BR (1:1), BR). Poskus je bil opravljen v šestih ponovitvah. Interakcija tip fileja  $\times$  koncentracije dodanega ekstrakta



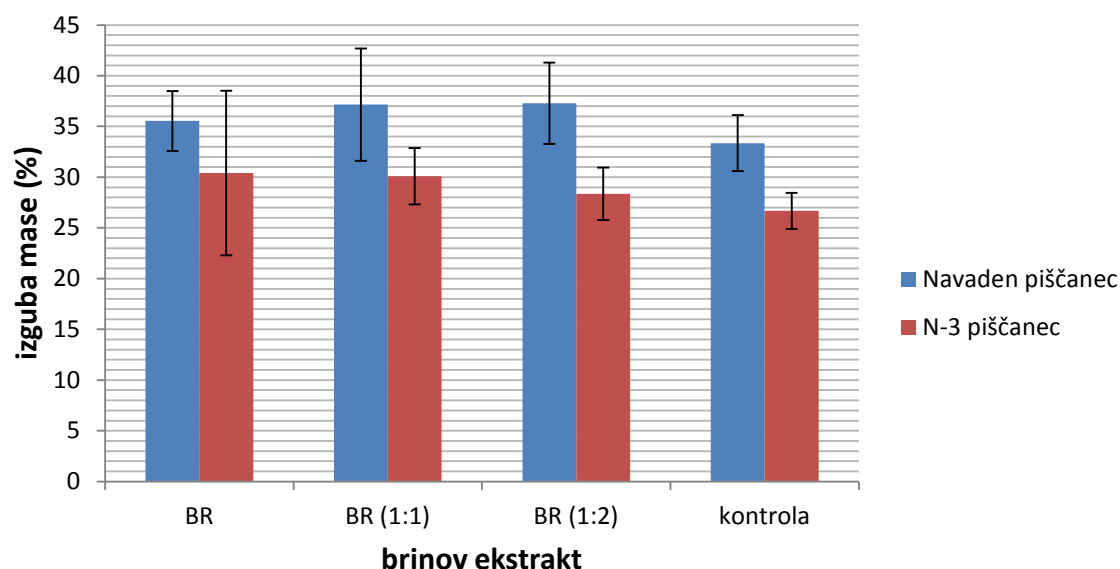
brina je bila statistično neznačilna ( $p > 0,05$ ) in zato izključena iz modela. Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z Duncanovim testom in primerjane pri 5 % tveganju.

## 4 REZULTATI

Vrednotili smo vpliv dodatka ekstrakta brina v rafiniranem sončničnem olju na tvorbo HCA v toplotno obdelanih piščančjih mini filejih, tako navadnih kot v tistih z večjo vsebnostjo n-3 maščobnih kislin in določili najučinkovitejšo količino dodatka. V nadaljevanju so prikazani dobljeni rezultati.

### 4.1 IZGUBA MASE MED TOPLOTNO OBDELAVO MINI PIŠČANČJIH FILEJEV

Piščančje mini fileje smo toplotno obdelali na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240 °C in jih pekli 4 minute. V času pečenja se je iz mesa izcejel in izpareval mesni sok, ki je vzrok za zmanjšanje mase filejev.



Slika 7: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na izgubo mase med toplotno obdelavo navadnih in n-3 mini piščančjih filejev, BR: brinov ekstrakt brez razredčitve, BR (1:1), BR (1:2): brinovi ekstrakti z razredčitvijo. Način razredčitve je opisan v poglavju 3.1

Slika 7 prikazuje rezultate vpliva dodanih ekstraktov na izgubo mase med toplotno obdelavo navadnega in n-3 mini piščančjega fileja. Najmanjša izguba mase v navadnih piščančjih filejih je bila pri kontrolnih vzorcih, prav tako pri vzorcih obogatenih z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK). Povprečna izguba mase pri navadnih piščančjih mini filejih je  $35,83 \pm 4,042$  % oziroma  $28,87 \pm 4,515$  % pri n-3 piščančjih filejih.

Če primerjamo kontrolne vzorce in vzorce mesa obogatene z n-3 VNMK (slika 7), največje odstopanje v izgubi mase opazimo pri vzorcih mesa tretiranih z BR in BR (1:2). Vendar če primerjamo kontrolne vzorce in vzorce navadnih piščancev, imamo največje odstopanje v izgubi mase pri vzorcih tretiranih z BR (1:1) in BR (1:2).

Mariniranje piščančjega mesa z brinovim ekstraktom (ne glede na koncentracijo) vpliva na večjo izgubo mase med toplotno obdelavo na dvoploščnem žaru v primerjavi s piščančjim mesom, ki smo ga marinirali le v olju.

#### 4.2 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN Z METODO FOLIN-CIOCALTEU

Pri določanju skupnih fenolnih spojin v ekstraktih BR, BR (1:1) in BR (1:2) z metodo Folin-Ciocalteu smo ugotovili, da največ skupnih fenolnih spojin, izraženih kot hesperetin v mg na liter ekstrakta, vsebuje ekstrakt BR (250 ml olja in 18 g brinovih jagod), in sicer 2,60 mg/l. Sledi ekstrakt BR (1:1), ki vsebuje 1,73 mg/l skupnih fenolnih spojin, kar je 33 % manj kot ekstrakt BR. Na koncu sta ekstrakt BR (1:2) (1,36 mg/l) ter kontrola, ki po pričakovanjih vsebuje najmanj fenolnih spojin v primerjavi z ostalimi ekstrakti. Rezultati so prikazani v preglednici 9.

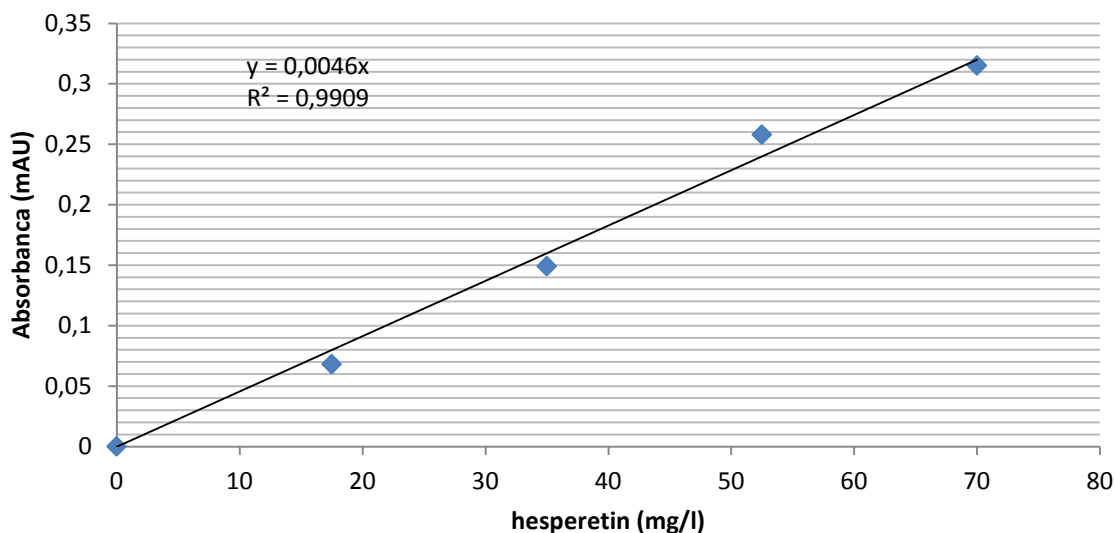
Preglednica 9: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v brinovih ekstraktih, izraženih kot hesperetin v mg na liter ekstrakta.

ekstrakt	C <sub>SFS</sub> (mg/l)
BR	2,60
BR (1:1)	1,73
BR (1:2)	1,36
kontrola	1,29

C<sub>SFS</sub> (mg/l): koncentracija skupnih fenolnih spojin, izražena kot količina hesperetina v mg na liter ekstrakta.

##### 4.2.1 Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Na sliki 8 je prikazana umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin. S pomočjo dobljene absorbance lahko izračunamo fenolne spojine v različnih ekstraktih (BR, BR (1:1), BR (1:2)).



Slika 8: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

#### 4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI HCA V PEČENIH MINI PIŠČANČJIH FILEJIH

Rezultati določanja vsebnosti HCA v navadnih mini piščančjih filejih z dodanimi brinovimi ekstrakti (BR, BR (1:1) in BR (1:2)) z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri so prikazani v preglednici 10. Iz rezultatov je razvidno, da so bili vzorci dokaj nehomogeni, saj je koeficient variabilnosti 49 %. Vsebnost posameznih HCA se je močno spreminjal (Glu-P-2 – 165 %, Norharman – 46 %), ne glede na to, da smo uporabili tri brinove ekstrakte, pripravljene na enak način, le z različno koncentracijo. Kot smo pričakovali, je uporaba brinovitih ekstraktov različno vplivala na tvorbo HCA.

Navadni mini piščančji fileji z dodanimi brinovimi ekstrakti na kg vzorca so v povprečju vsebovali 25 µg HCA. Med posameznimi HCA je najbolj izstopal PhIP, katerega povprečna vsebnost je bila 19 µg/kg, ki je bila veliko večja od drugih HCA. Temu je sledil IQ z vsebnostjo 1,13 µg/kg, MeIQx z 0,885 µg/kg, IQx z 0,83 µg/kg, Norharman z 0,769 µg/kg, Harman z 0,733 µg/kg, MeIQ z 0,64 µg/kg, Glu-P-2 z 0,221 µg/kg, 4,8-DiMeLQx z 0,141 µg/kg ter 7,8-DiMeLQx z 0,137 µg/kg.

Preglednica 10: Rezultati določanja HCA v navadnih mini piščančjih filejih z dodanim ekstraktom brina z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n=36).

HCA	vrednost (µg HCA/kg vzorca navadnega piščanca)				
	povprečna	najmanjša	največja	standardni odklon	koeficient variabilnosti (%)
MeIQ	0,642	0,286	1,473	0,304	47,251
MeIQx	0,909	0,405	2,084	0,430	47,251
PhIP	19,019	5,185	52,612	10,124	53,229
Harman	0,741	0,289	1,892	0,346	46,718
Norharman	0,769	0,248	2,031	0,358	46,510
4,8-DiMeLQx	0,142	0,005	0,470	0,130	91,544
7,8-DiMeLQx	0,137	0,000	0,642	0,204	148,848
Glu-P-2	0,221	0,000	1,264	0,364	165,037
IQ	1,134	0,035	2,968	0,604	53,271
IQx	0,820	0,111	2,368	0,489	59,573
vsota skupnih* HCA	24,535	7,375	63,759	12,133	49,452

n: število obravnavanj v poskusu.

Rezultati določanja vsebnosti HCA v n-3 mini piščančjih filejih z dodanimi brinovimi ekstrakti BR, BR (1:1), BR (1:2) so prikazani v preglednici 12. Iz rezultatov je razvidno, da so bili vzorci dokaj nehomogeni, podobno kot vzorci navadnega piščanca. Koeficient variabilnosti je znašal 158 %. Vsebnost posameznih HCA v poskusu je močno variirala (4,8-DiMeLQx–248 %, Norharman – 52 %).

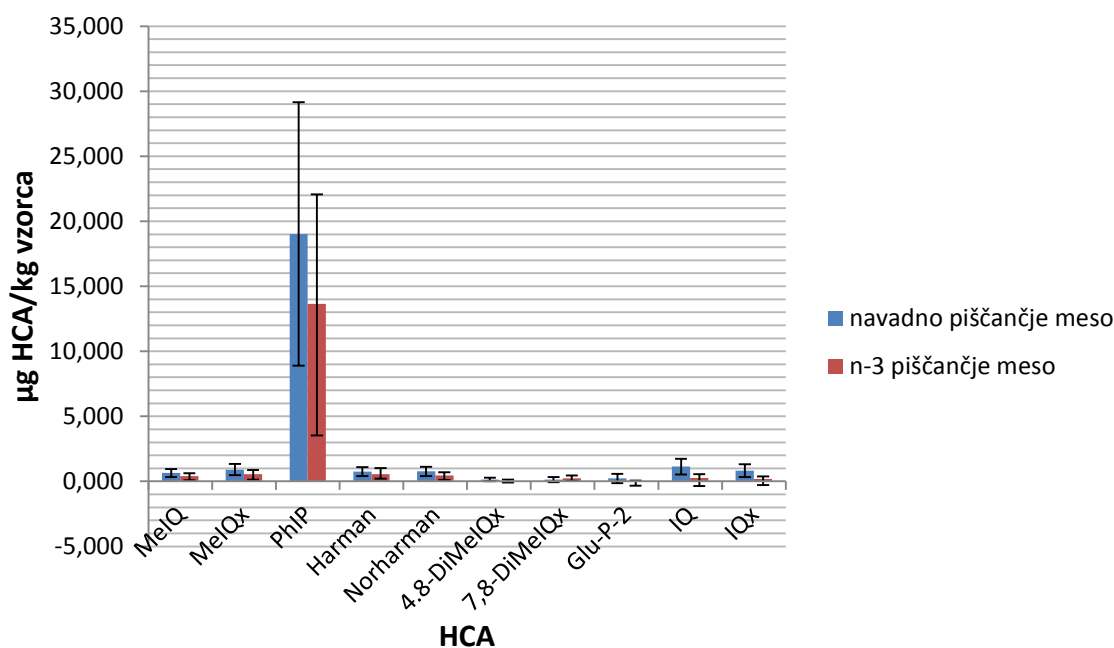
n-3 mini piščančji fileji, ki vsebujejo dodatek brinovega ekstrakta brina na kg vzorca, so v povprečju vsebovali 16 µg HCA. Med posameznimi HCA je najbolj izstopal PhIP, povprečna vsebnost je bila 13,69 µg/kg. Sledil je MeIQx z vsebnostjo 0,568 µg/kg, Harman z 0,559 µg/kg, Norharman z 0,465 µg/kg, MeIQ z 0,396 µg/kg, IQ z vsebnostjo 0,251 µg/kg, 7,8-DiMeLQx z 0,245 µg/kg, IQx z 0,195 µg/kg, 4,8-DiMeLQx z 0,039 µg/kg ter Glu-P-2 z 0,026 µg/kg

Primerjava vsebnosti HCA v navadnem piščančjem fileju in fileju obogatenem z n-3 maščobnimi kislinami je pokazala, da se koeficient variabilnosti razlikuje. Poleg ekstrakta brina so na tvorbo HCA vplivale tudi VNMK. Vsota skupnih HCA je bila občutno manjša pri n-3 piščančjem fileju. Med posameznimi HCA je najbolj izstopal PhIP. Na slikah 9-A in 9-B so prikazane povprečne vrednosti µg HCA na kg obdelanega piščančjega mesa.

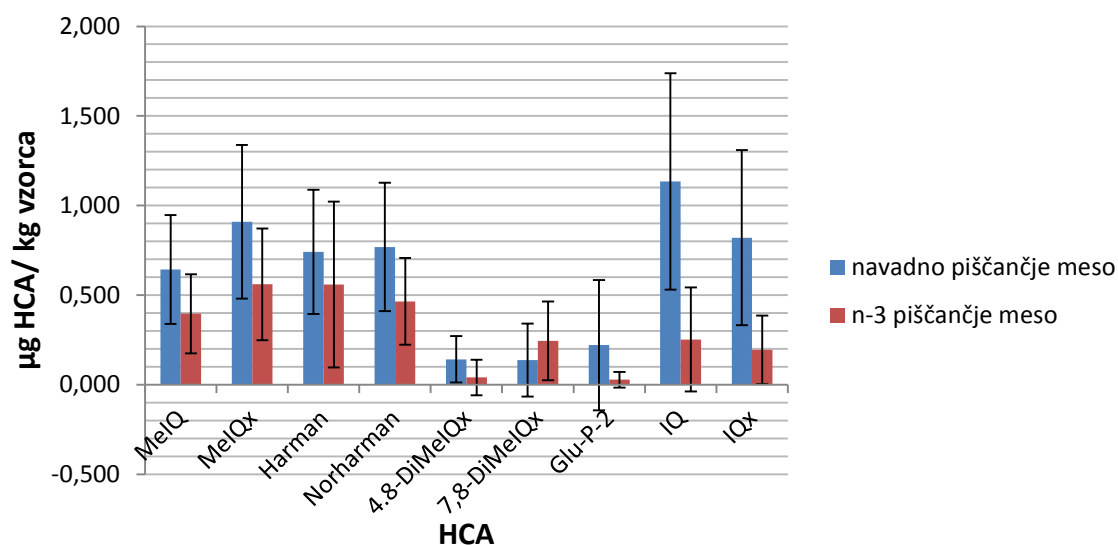
Preglednica 11: Rezultati določanja HCA v n-3 mini piščančjih filejih z dodanimi ekstrakti brina z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n=36).

HCA	vrednost ( $\mu\text{g HCA/kg}$ vzorca n-3 piščanca)				
	povprečna	najmanjša	največja	standardni odklon	koefficient variabilnosti %
MeIQ	0,396	0,019	0,987	0,220	55,679
MeIQx	0,560	0,028	1,396	0,312	55,679
PhIP	13,644	1,238	34,414	8,434	61,811
Harman	0,559	0,108	2,018	0,463	82,810
Norharman	0,464	0,054	1,221	0,242	52,135
4,8-DiMeLQx	0,040	0,000	0,577	0,099	248,391
7,8-DiMeLQx	0,245	0,000	1,014	0,220	89,815
Glu-P-2	0,027	0,000	0,142	0,044	158,613
IQ	0,252	0,000	1,097	0,291	115,283
IQx	0,195	0,010	1,069	0,191	97,910
Vsota skupnih* HCA	16,383	1,736	38,129	9,300	56,767

n: število obravnavanj v poskusu.

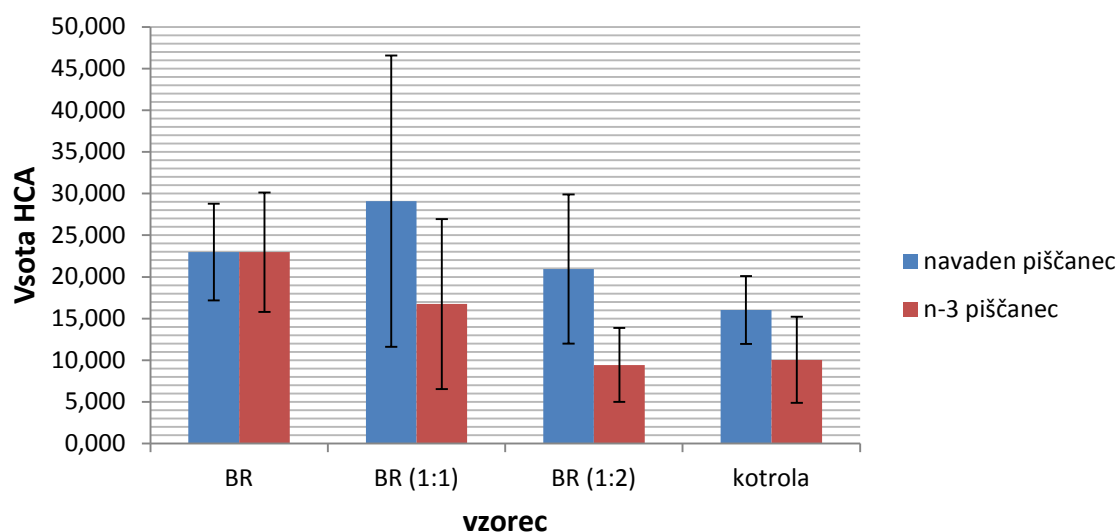


Slika 9: Povprečne vsebnosti posameznih HCA v  $\mu\text{g HCA}$  na kg toplotno obdelanega piščančjega mesa.



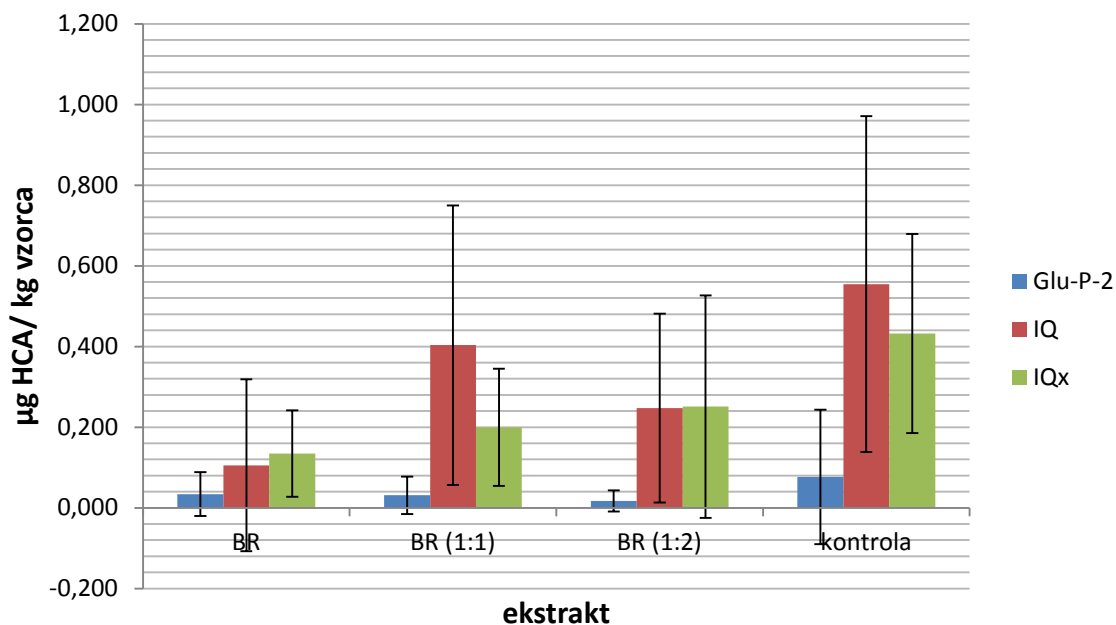
Slika 10: Povprečne vsebnosti posameznih HCA v µg HCA na kg toplotno obdelanega piščančjega mesa brez PhIP.

Iz dobljenih rezultatov je bilo razvidno, da je bila tvorba HCA v n-3 piščančjih filejih v najmanjša v kontrolnih vzorcih, česar pa nismo pričakovali. Če primerjamo posamezne ekstrakte (slika 11), vidimo, da se je kot najbolj uspešen ekstrakt pri zmanjševanju tvorbe HCA med toplotno obdelavo navadnih in n-3 mini piščančjih filejev izkazal ekstrakt BR (1:2). V vzorcih, ki so bili tretirani z brinovim ekstraktom BR (1:2), se je v povprečju tvorilo 9 µg HCA/kg mesa, kar je za 35,5 % manj v primerjavi z vzorci, ki so bili tretirani z brinovim ekstraktom BR (1:1) (16 µg HCA/ kg mesa). Najmanj uspešen ekstrakt pri zmanjševanju tvorbe HCA med toplotno obdelavo navadnih in n-3 mini piščančjih filejev je bil ekstrakt BR, kjer se je v povprečju tvorilo 22 µg HCA/kg.



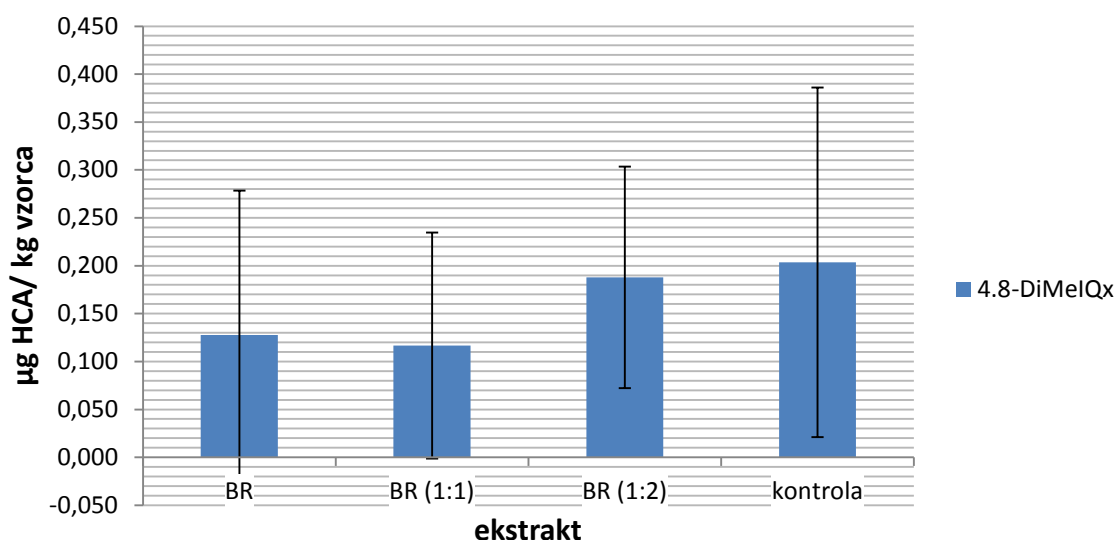
Slika 11: Vsota vseh HCA, ki so nastali med toplotno obdelavo navadnih in n-3piščančjih filejev, ki so bili tretirani z različnimi koncentracijami brinovega ekstrakta.

Ekstrakti BR, BR (1:1) in BR (1:2), dodani v n-3 piščančjih filejih, so vplivali na zmanjšanje tvorbe IQx, IQ in Glu-p-2.



Slika 12: Vpliv dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo IQ, IQx in Glu-P-2 v toplotno obdelanih n-3 piščančjih filejih.

Ekstrakti BR, BR (1:1) in BR (1:2), dodani v navadnih piščančjih filejih, so značilno vplivali na zmanjšanje tvorbe 4,8-DiMeIQx.



Slika 13: Vpliv dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo 4,8- DiMeIQx v toplotno obdelanih navadnih piščančjih filejih.



Preglednica 12: Statistična verjetnost vpliva dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo posameznih HCA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) v toplotno obdelanih navadnih in n-3mini piščančjih filejih.

HCA	meso	Ekstrakti			kontrola	$p_{ME}$
		BR	BR (1:1)	BR (1:2)		
MeIQ	navad	0,791 <sup>Aa</sup>	0,652 <sup>Aba</sup>	0,453 <sup>Ab</sup>	0,504 <sup>Ab</sup>	0,008(0,243)
MeIQ	n-3	0,449 <sup>Ba</sup>	0,428 <sup>Ba</sup>	0,31 <sup>Aa</sup>	0,304 <sup>Ba</sup>	0,176(0,202)
	$p_E$	0,018(0,328)	0,023 (0,223)	0,050 (0,161)	<0,001(0,117)	
MeIQx	navad	1,119 <sup>Aa</sup>	0,923 <sup>Aba</sup>	0,642 <sup>Ab</sup>	0,714 <sup>Ab</sup>	0,008(0,344)
MeIQx	n-3	0,636 <sup>Ba</sup>	0,606 <sup>Ba</sup>	0,439 <sup>Aa</sup>	0,43 <sup>Ba</sup>	0,176(0,268)
	$p_E$	0,018(0,464)	0,023 (0,316)	0,050(0,228)	<0,001 (0,166)	
PhIP	navad	17,206 <sup>Aba</sup>	22,918 <sup>Aa</sup>	16,515 <sup>Aba</sup>	12,286 <sup>Ab</sup>	0,041(8,737)
PhIP	n-3	19,915 <sup>Aa</sup>	13,745 <sup>Ab</sup>	7,272 <sup>Bc</sup>	7,375 <sup>Bc</sup>	<0,001(6,273)
	$p_E$	0,277(5,959)	0,077 (12,129)	<0,001 (5,519)	0,004 (3,752)	
Harman	navad	0,76 <sup>Aba</sup>	0,85 <sup>Aa</sup>	0,589 <sup>Aba</sup>	0,555 <sup>Ab</sup>	0,069(0,299)
Harman	n-3	0,854 <sup>Aa</sup>	0,497 <sup>Ab</sup>	0,325 <sup>Bb</sup>	0,298 <sup>Bb</sup>	0,002(0,366)
	$p_E$	0,525(0,355)	0,108(0,516)	0,003(0,185)	<0,001(0,128)	
Norharman	navad	0,767 <sup>Aba</sup>	0,878 <sup>Aa</sup>	0,641 <sup>Aba</sup>	0,511 <sup>Ab</sup>	0,038(0,312)
Norharman	n-3	0,567 <sup>Ba</sup>	0,475 <sup>Bba</sup>	0,351 <sup>Bb</sup>	0,372 <sup>Bb</sup>	0,058(0,221)
	$p_E$	0,031(0,213)	0,035(0,437)	<0,001 (0,154)	0,015(0,128)	
4.8-iMeIQx	navad	0,128 <sup>Aa</sup>	0,117 <sup>Aa</sup>	0,188 <sup>Aa</sup>	0,204 <sup>Aa</sup>	0,389(0,145)
4.8-iMeIQx	n-3	0,034 <sup>Ba</sup>	0,068 <sup>Aa</sup>	0,018 <sup>Ba</sup>	0,027 <sup>Ba</sup>	0,525(0,087)
	$p_E$	0,046(0,109)	0,420(0,144)	<0,001 (0,082)	0,003(0,130)	
7.8-iMeIQx	navad	0,069 <sup>Aa</sup>	0,191 <sup>Aa</sup>	0,155 <sup>Aa</sup>	0,049 <sup>Ba</sup>	0,190(0,181)
7.8-iMeIQx	n-3	0,246 <sup>Aa</sup>	0,292 <sup>Aa</sup>	0,197 <sup>Aa</sup>	0,177 <sup>Aa</sup>	0,501(0,200)
	$p_E$	0,071(0,228)	0,305(0,235)	0,572(0,168)	0,005(0,101)	
Glu-P-2	navad	0,504 <sup>Aa</sup>	0,062 <sup>Ab</sup>	0,071 <sup>Ab</sup>	0 <sup>Ab</sup>	<0,001(0,262)
Glu-P-2	n-3	0,034 <sup>Ba</sup>	0,031 <sup>Aa</sup>	0,017 <sup>Aa</sup>	0,077 <sup>Aa</sup>	0,424(0,092)
	$p_E$	0,002(0,333)	0,520(0,117)	0,242(0,104)	0,125(0,118)	
IQ	navad	0,981 <sup>Aba</sup>	1,443 <sup>Aa</sup>	0,948 <sup>Aba</sup>	0,562 <sup>Ab</sup>	0,012(0,613)
IQ	n-3	0,106 <sup>Bc</sup>	0,403 <sup>Bba</sup>	0,248 <sup>Bbc</sup>	0,555 <sup>Aa</sup>	0,007(0,314)
	$p_E$	<0,001(0,235)	<0,001(0,628)	<0,001 (0,375)	0,973(0,580)	
IQx	navad	0,662 <sup>Ab</sup>	1,053 <sup>Aa</sup>	0,73 <sup>Aba</sup>	0,632 <sup>Ab</sup>	0,088(0,439)
IQx	n-3	0,135 <sup>Bb</sup>	0,2 <sup>Bb</sup>	0,25 <sup>Bb</sup>	0,432 <sup>Aa</sup>	0,007(0,206)
	$p_E$	<0,0001(0,169)	<0,001(0,484)	0,003(0,336)	0,111(0,240)	

$p_{ME}$ , statistična verjetnost vpliva dodatka ekstrakta; SEM, standardna napaka povprečja;  $p_E$ , statistična verjetnost vpliva obogatitve mesa z n-3 VNMK; vrednosti z različno črko znotraj vrstice (<sup>a,b,c,d</sup>) se statistično značilno razlikujejo ( $p \leq 0,05$ ; značilnost razlik med dodatki ekstraktov); vrednosti z različno črko znotraj stolpca (<sup>A,B</sup>) se statistično značilno razlikujejo ( $p \leq 0,05$ ; značilnost razlik med navadnimi in n-3 obogatimi piščančjih filejev); BR (1:1), BR (1:2): brinovi ekstrakti z razredčitvijo. Način razredčitve je opisan v poglavju 3.1

V preglednici 12 so podani rezultati vpliva dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo posameznih HCA v navadnih in n-3 mini piščančjih filejih. Dodatki brinovitih ekstraktov, kot so BR, BR (1:1) in BR (1:2), statistično visoko značilno vplivajo na tvorbo Glu-P-2 ( $p \leq 0,001$ ), statistično značilno pa na tvorbo MeIQ, MeIQx, IQ, PhIP, Norharmana ( $p \leq 0,05$ ). Po drugi strani pa na tvorbo Harmana, 4,8-DiMeLQx, 7,8-DiMeLQx ( $p \geq 0,05$ ) ne vplivajo.

Sklepamo lahko, da razlika med dodanimi ekstrakti ( $p \leq 0,05$ ) značilno vpliva na tvorbo Glu-P-2, MeIQ, MeIQx, PhIP, IQ in Norharmana v primerjavi z vplivom na tvorbo Harmana, 4,8-DiMeLQx, 7,8-DiMeLQx, ki je statistično neznačilen.

Iz rezultatov je razvidno, da ima na zmanjšanje Glu-P-2, MeIQ in MeIQx največji vpliv ekstrakt BR (1:2), sledita ekstrakta BR (1:1) in BR. Obratno se dogaja pri zmanjševanju PhIP, pri katerem ima največji vpliv ekstrakt BR (1:2), sledita BR in BR (1:1).

V preglednici 12 so podani tudi rezultati vpliva dodanih brinovitih ekstraktov na tvorbo posameznih HCA v n-3 piščančjih filejih. Dodatki brinovitih ekstraktov BR, BR (1:1) in BR (1:2) statistično visoko značilno vplivajo na tvorbo PhIP ( $p \leq 0,001$ ), statistično značilno vplivajo na tvorbo IQ, IQx, Harmana ( $p \leq 0,05$ ), medtem ko na tvorbo Norharmana, 4,8-DiMeLQx, 7,8-DiMeLQx, Glu-P-2, MeIQ, MeIQx ( $p \geq 0,05$ ) nimajo vpliva.

Zaključimo lahko, da razlika med dodanimi ekstrakti ( $p \leq 0,05$ ) močno vpliva na tvorbo PhIP, Harmana, IQ, IQx. Po drugi strani pa razlika med dodanimi ekstrakti ( $p \geq 0,05$ ) neznačilno vpliva na tvorbo MeIQ, MeIQx, Norharmana, 4,8-DiMeLQx, 7,8-DiMeLQx in Glu-P-2. Na zmanjšanje PhIP in Harmanaima ima največji vpliv ekstrakt BR (1:2), sledita ekstrakta BR (1:1) in BR. Obratno se dogaja pri zmanjševanju IQ in IQx, kjer ima največji vpliv ekstrakt BR, sledita BR (1:1) in BR (1:2).

Ekstrakti BR, BR (1:1) in BR (1:2) različno vplivajo na tvorbo posameznih HCA v navadnem piščančjem fileju oziroma v piščančjem fileju obogatim z n-3 maščobnimi kislinami. Opazili smo tudi, da na tvorbo HCA, poleg dodanih brinovitih ekstraktov, vpliva tudi sončnično olje, ki smo ga uporabili za pripravo brinovega ekstrakta.

V preglednici 12 so podani tudi rezultati statistične verjetnosti vpliva obogatitve mesa z n-3 VNMK. Vrednosti, podane v stolpcih se razlikujejo med običajnimi in n-3 obogatimi mini piščančjimi fileji.

Na tvorbo IQ, IQx in Norharmana značilno vpliva obogatitev mesa z n-3 VNMK ( $p \leq 0,05$ ). Po drugi strani pa obogatitev mesa ( $p \geq 0,05$ ) neznačilno vpliva na tvorbo 7,8-DiMeIQx.

Če primerjamo rezultate vzorcev tretiranih le z brinovimi ekstrakti, brez kontrolnih vzorcev, lahko sklepamo, da ekstrakti različno vplivajo na meso obogateno z n-3 VNMK, prispevajo k zmanjšanju oziroma povečanju HCA. V splošnem lahko rečemo, da ima piščančje meso, ki je bilo obogateno z n-3 VNMK in tretirano z brinovimi ekstrakti, manjšo vsebnost HCA v primerjavi z navadnim piščančjim mesom.

Preglednica 13: Vpliv dodatka ekstrakta na tvorbo vseh identificiranih HCA ( $\mu\text{g HCA/kg}$ ) v toplotno obdelanih navadnih in n-3 mini piščančjih filejih.

HCA	meso	ekstrakti				
		BR	BR (1:1)	BR (1:2)	kontrola	$p_{ME}$
	navadno	22,986 <sup>Aba</sup>	29,086 <sup>Aa</sup>	20,931 <sup>Aba</sup>	16,016 <sup>Ab</sup>	0,034(10,502)
	n-3	22,975 <sup>Aa</sup>	16,747 <sup>Bb</sup>	9,427 <sup>Bc</sup>	10,046 <sup>Bc</sup>	<0,001(7,099)
	$p_E$	0,997(6,513)	0,046(14,308)	<0,001(6,84)	0,005(4,651)	0,997(6,513)

$p_E$  verjetnost vpliva obogatitve mesa z n-3 VNMK,  $p_{ME}$ , statistična verjetnost vpliva dodatka ekstrakta; vrednosti z različno črko znotraj vrstice (<sup>a,b</sup>) se statistično značilno razlikujejo ( $p \leq 0,05$ ); značilnost razlik med dodatki ekstraktov); vrednosti z različno črko znotraj stolpca (<sup>A,B</sup>) se statistično značilno razlikujejo ( $p \leq 0,05$ ; BR (1:1), BR (1:2): brinovi ekstrakti z razredčitvijo. Način razredčitve je opisan v poglavju 3.1

V preglednici 13 so podani rezultati vpliva dodatka brinovitih ekstraktov na tvorbo vseh identificiranih HCA v toplotno obdelanih navadnih in n-3 mini piščančjih filejih. Statistična verjetnost vpliva dodatka ekstrakta pri n-3 vzorcih je  $p_{ME} < 0,001$ , pri navadnih piščančjih filejih pa  $p_{ME} < 0,034$ . V vzorcih obeh tipov vidimo značilno razliko med dodanimi brinovimi ekstrakti.

Tvorba skupnih HCA je bila največja v vzorcih navadnega piščančjega fileja, tretiranega z brinovitim ekstraktom BR (1:1) (29,086  $\mu\text{g/kg}$ ). Sledijo vzorci tretirani z BR (22,986  $\mu\text{g/kg}$ ) in BR (1:2) (20,931  $\mu\text{g/kg}$ ). Najmanj skupnih HCA se je tvorilo v kontrolnih vzorcih (16,016  $\mu\text{g/kg}$ ), kar je v nasprotju z našimi pričakovanji. Kontrolne vzorce smo pripravili s sončničnim oljem brez dodatka brinovitih ekstraktov. Razlog za najmanjšo vsebnost skupnih HCA je verjetno visoka vsebnost antioksidantov v olju.

Če primerjamo rezultate navadnih piščančjih filejev in vzorce, obogatene z VNMK, lahko sklepamo, da je največ skupnih HCA nastalo v vzorcih, ki so bili obogateni z VNMK in predhodno tretirani z brinovitim ekstraktom BR (22,975  $\mu\text{g/kg}$ ). Sledijo vzorci tretirani z BR (1:1) (16,747  $\mu\text{g/kg}$ ) in kontrolni vzorci (10,046  $\mu\text{g/kg}$ ). Najmanj HCA se je tvorilo v vzorcih, ki so bili obogateni z VNMK in predhodno tretirani z BR (1:2) (9,427  $\mu\text{g/kg}$ ).

Značilno najmanj HCA (9,427  $\mu\text{g/kg}$ ) je nastalo v n-3 vzorcih, ki so bili tretirani z brinovitim ekstraktom BR (1:2) (9,427  $\mu\text{g/kg}$ ), in sicer trikrat manj v primerjavi z vzorci navadnega piščančjega mesa, ki so bili tretirani z brinovitim ekstraktom BR (1:1) (29,086  $\mu\text{g/kg}$ ).

Če primerjamo vse vzorce, ki so bili tretirani samo z brinovimi ekstrakti (brez kontrolnega vzorca), sklepamo, da povprečno tvorbo HCA najbolj zavira brinov ekstrakt BR (1:2). To je najbolj opazno pri vzorcih navadnega in n-3 piščančjega fileja. Iz podatkov je razvidno tudi, da je vsota identificiranih HCA večja v navadnih piščančjih filejih kot v filejih, ki so bili obogateni z VNMK.

Brinovi ekstrakti BR so vplivali na zmanjšanje tvorbe posameznih tipov HCA, in sicer na IQx v vzorcih n-3 piščančjih filejev. Ponovno najmanj IQx se je tvorilo v vzorcih, ki so bili tretirani z BR ekstraktom. Povprečno se je pri vseh vzorcih tvorilo dvakrat manj IQx (2,35  $\mu\text{g/kg}$ ) v primerjavi s kontrolnim vzorcem (5,19  $\mu\text{g/kg}$ ). Poleg tega je ekstrakt BR vplival na zmanjšanje tvorbe IQ (3,02  $\mu\text{g/kg}$ ), ki se je v povprečju zmanjšala za najmanj dvakrat, v

primerjavi s kontrolnim vzorcem (6,65 µg/kg). Z dodatkom ekstrakta BR (1:1) se je tvorba Glu-P-2 (0,37 µg/kg) zmanjšala za 2,5-krat v primerjavi s kontrolnim vzorcem (0,93 µg/kg).

Ekstrakti BR, BR (1:1) in BR (1:2) v navadnem piščančjem mesu so značilno vplivali na zmanjšanje tvorbe 4,8-DiMeIQx. Najmanj 4,8-DiMeIQx je nastalo v vzorcih, ki so bili tretirani z ekstraktom BR (1:1). Povprečna tvorba 4,8-DiMeIQx (1,60 µg/kg) je bila najmanj dvakrat manjša v primerjavi s tvorbo v kontrolnem vzorcu (2,44 µg/kg). Na ostale tipe HCA brinovi ekstrakti niso imeli vpliva primerjavi s kontrolnimi vzorci.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Med toplotno obdelavo mesa se tvorijo heterociklični aromatski amini, ki so zdravju škodljivi. Danes obstajajo različne študije, ki govorijo o zmanjševanju HCA. Poleg tega mesna industrija uporablja veliko sintetičnih in naravnih antioksidantov, ki lahko vplivajo na senzorične lastnosti in kakovost izdelka. Študije kažejo, da lahko z dodatkom različnih ekstraktov z antioksidativnim potencialom vplivamo na zmanjšanje tvorbe HCA. Antioksidanti lovijo proste radikale, ki nastajajo med Maillardovo reakcijo ter na ta način zmanjšajo prisotnost HCA (Rounds in sod., 2013).

Cilj naloge je bil ugotoviti vpliv dodanih brinovih ekstraktov v rafiniranem sončničnem olju na tvorbo HCA v toplotno obdelanih mini piščančjih filejih, tako navadnih kot tistih z večjo vsebnostjo n-3 maščobnih kislin, ter določiti najučinkovitejšo količino dodatka ekstrakta brina.

Balogh in sod. (2000) so izvedli študijo, kjer so v goveje meso dodajali različne koncentracije rožmarina pred toplotno obdelavo ter opazovali zmanjšanje vsebnosti HCA. Vsebnost HCA se je v mesu zmanjšala tudi z dodatkom rdeče paprike, ki deluje kot antioksidant (Oz in Kaya, 2011).

V magistrski nalogi smo določili vsebnost HCA v toplotno obdelanih mini piščančjih filejih tretiranih z brinovim ekstraktom. Rezultati so pokazali, da toplotno obdelani navadni piščančji fileji vsebujejo 25 µg/kg HCA, n-3 piščančji fileji pa 16 µg/kg HCA. Med posameznimi HCA je najbolj izstopal PhIP, v navadnih piščančjih filejih je bila njegova vsebnost 19,09 µg/kg, oziroma 13,64 µg/kg v n-3 piščančjih filejih. Sledijo MeIQx, Harman in Norharman. Do podobnih ugotovitev je prišla tudi Janžekovič (2015). Določala je zmanjševanje HCA z dodatkom ekstraktov hmelja v govejem mesu. Manjša koncentracija dodatka rastlinskega ekstrakta zmanjša vsebnost HCA, medtem ko povečevanje koncentracije rastlinskega ekstrakta ponovno poveča vsebnost HCA v primerjavi s kontrolo. Za razliko od naših rezultatov je izstopal Glu-P-2, sledili so MeIQx, PhIP in Harman.

Iz dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da je v kontrolnem vzorcu, navadnem in n-3, prevladoval PhIP (12,38 µg/kg v navadnem oziroma 7,37 µg/kg v n-3 piščančjem mesu). Prevladujočo vsebnost PhIP potrjujejo tudi Balogh in sod. (2000). V govejih sekljancih so določili 31,4 ng/g PhIP.

Glede na postavljeni hipotezi so bili dobljeni rezultati precej kontradiktorni. Pričakovali smo namreč, da bo dodatek ekstrakta brina v sončničnem olju vplival na zmanjšano tvorbo HCA v toplotno obdelanih piščančjih filejih. Rezultati so pokazali, da večji dodatek ekstrakta brina povečuje nastajanje HCA. Izjema je ekstrakt BR (1:2), ki je vplival na zmanjševanje tvorbe skupnih HCA v n-3 piščančjih filejih. Razlike v zmanjševanju niso statistično značilne. Do takšnih rezultatov smo prišli verjetno zato, ker smo kot ekstrakt uporabili brinove jagode, vezane na olje. Na splošno večina dodanih ekstraktov vpliva na zmanjšanje tvorbe HCA v mesu po toplotni obdelavi,

vendar sta med ključnimi dejavniki, ki vplivajo na zmanjšanje vsebnosti HCA, tudi način toplotne obdelave ter nosilec, na katerega vežemo ekstrakt. V primeru, da bi kot nosilec ekstrakta uporabili sol ali škrob, bi verjetno prišli do rezultatov, ki bi potrdili postavljeno hipotezo.

Predvidevali smo tudi, da bomo lahko določili primerno koncentracijo brinovega ekstrakta, katera bo zagotavljala najmanjšo tvorbo HCA v toplotno obdelanem piščančjem mesu. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da na zmanjšanje tvorbe HCA vplivamo z manjšo koncentracijo brinovega ekstrakta oziroma olje ni primeren nosilec za tovrstne rastlinske ekstrakte. Verjetno je sol bistveno boljši nosilec tovrstnih ekstraktov.

Iz vseh rezultatov, ki smo jih pridobili lahko zaključimo, da je tvorba HCA zelo kompleksen proces, ki ni odvisen samo od osnovnih prekurzorjev (sladkorjev, kreatinina, aminokislin), ampak tudi od drugih interakcij s spojinami, ki direktno ne sodelujejo v samem kemizmu nastanka HCA. Naloga je odprla mnoga nova vprašanja o sami interakciji tako kompleksnega sistema.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da:

- Povprečna izguba mase med pečenjem n-3 piščančjega mesa je bila 28,75 g/100 g.
- Povprečna izguba mase med pečenjem navadnega piščančjega mesa je bila 35,83 g/100 g.
- Povprečna izguba mase v vzorcih, ki so bili tretirani z brinovimi ekstrakti, je bila večja v primerjavi s kontrolo.
- Koncentracija skupnih fenolnih spojin je bila največja v ekstraktu BR (2,60 mg/l), sledi ekstrakt BR (1:1) z 1,73 mg/l in BR (1:2) z 1,36 mg/l.
- Navadni mini piščančji fileji z dodanimi brinovimi ekstrakti so v povprečju vsebovali 25 µg HCA/kg vzorca.
- n-3 mini piščančji fileji z dodanimi brinovimi ekstrakti so v povprečju vsebovali 16 µg HCA/kg vzorca.
- Med posameznimi HCA v navadnih mini piščančjih filejih je najbolj izstopal PhIP, katerega povprečna vsebnost je bila 18,90 µg/kg.
- Med posameznimi HCA v n-3 mini piščančjih filejih je najbolj izstopal PhIP, katerega povprečna vsebnost je bila 19 µg/kg.
- Brinovi ekstrakti BR, BR (1:1) in BR (1:2) v navadnem piščančjem mesu statistično visoko značilno vplivajo na tvorbo Glu-P-2 ( $p \leq 0,001$ ), statistično značilno vplivajo na tvorbo MeIQ, MeIQx, IQ, PhIP in Norharmana ( $p \leq 0,05$ ), medtem ko na tvorbo Harmana, 4,8-DiMeLQx in 7,8-DiMeLQx ( $p \geq 0,05$ ) nimajo značilnega vpliva.
- Brinovi ekstrakti BR, BR (1:1) in BR (1:2) v n-3 piščančjem mesu statistično visoko značilno vplivajo na tvorbo PhIP ( $p \leq 0,001$ ), statistično značilno vplivajo na IQ, IQx in Harmana ( $p \leq 0,05$ ), medtem ko na tvorbo Norharmana, 4,8-DiMeLQx, 7,8-DiMeLQx, Glu-P-2, MeIQ in MeIQx ( $p \geq 0,05$ ) nimajo značilnega vpliva.
- Najuspešnejši ekstrakt za zmanjševanje nastanka HCA med toplotno obdelavo navadnih in n-3 mini piščančjih filejev je bil ekstrakt BR (1:2) (9,42 µg HCA/kg), sledi ekstrakt BR (1:1) (16,7 µg HCA/kg) ter ekstrakt BR (22,9 µg HCA/kg).
- Na splošno dodatek brinovitih ekstraktov ne zmanjša vsebnosti HCA v primerjavi z kontrolnimi vzorci. Izjema je ekstrakt BR (1:2), ki vpliva na zmanjšanje vsote HCA le v n-3 vzorcih.
- Brinovi ekstrakti vplivajo na zmanjšanje tvorbe samo posameznih tipov HCA, in sicer:
  - V n-3 piščančjem mesu na IQx, IQ in Glu-P-2.
  - V navadnem piščančjem mesu na 4,8- DiMeIQx.

## 6 POVZETEK

Namen naše naloge je bil zmanjšati tvorbo HCA v toplotno obdelanih mini piščančjih filejih, tako navadnih kot tistih z večjo vsebnostjo n-3 maščobnih kislin. Želeli smo ugotoviti tudi vpliv dodatka ekstrakta brina v rafiniranem sončničnem olju na tvorbo HCA ter določiti količino dodatka, ki najbolj optimalno preprečuje tvorbo HCA.

Predpostavili smo, da bo dodatek ekstrakta brina v sončničnem olju vplival na zmanjšanje tvorbe HCA v toplotno obdelanih piščančjih filejih in da bomo določili primerno koncentracijo brinovega ekstrakta, ki bi zagotavljal najmanjšo tvorbo HCA, hkrati pa ohranil senzorično sprejemljivost izdelka.

V poskusu smo uporabili mišice (*m. pectoralis superficialis*) piščančjega n-3 in navadnega fileja. Mini piščančje fileje smo tretirali z brinovimi ekstrakti BR, BR (1:1), BR (1:2). Za vsako koncentracijo brinovega ekstrakta smo pripravili 12 kosov mini filejev navadnega ter n-3 piščančjega mesa. Dodali smo enake količine posameznega ekstrakta. Piščančje fileje brez dodanih ekstraktov smo uporabili kot kontrolo. Fileje smo toplotno obdelali na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240 °C. Določili smo skupne fenolne spojine v brinovitih ekstraktih z metodo Folin – Ciocalteu ter vsebnosti HCA v toplotno obdelanih navadnih in n-3 mini piščančjih filejih.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da je bila povprečna izguba mase med toplotno obdelavo n-3 piščančjega mesa 28,75 g/100 g, povprečna izguba mase med pečenjem navadnega piščančjega mesa pa 35,83 g/100 g. Koncentracija skupnih fenolnih spojin je bila največja v ekstraktu BR (2,60 mg/l), sledi ekstrakt BR (1:1) z 1,73 mg/l in BR (1:2) z 1,36 mg/l. Navadni piščančji fileji z dodanimi brinovimi ekstrakti so v povprečju vsebovali 25 µg HCA/kg vzorca. n-3 mini piščančji fileji z dodanimi brinovimi ekstrakti so v povprečju vsebovali 16 µg HCA/kg vzorca.

Dodatek brinovitih ekstraktov BR, BR (1:1) in BR (1:2) v n-3 piščančjem mesu statistično visoko značilno vpliva na tvorbo PhIP ( $p \leq 0,001$ ), statistično značilno vpliva na IQ, IQx in Harmana ( $p \leq 0,05$ ), medtem ko na tvorbo Norharmana, 4,8-DiMeLQx, 7,8-DiMeLQx, Glu-P-2, MeIQ in MeIQx ( $p \geq 0,05$ ) nima značilnega vpliva. Kot najuspešnejši ekstrakt za zmanjševanje tvorbe HCA med toplotno obdelavo navadnih in n-3 piščančjih filejev se je izkazal ekstrakt BR (1:2) (14,5 µg HCA/kg), sledi ekstrakt BR (1:1) (22,5 µg HCA/kg) ter na koncu ekstrakt BR (22,9 µg HCA/kg). Dodatek brinovitih ekstraktov na splošno ne vpliva na zmanjšanje vsote HCA v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Izjema je ekstrakt BR (1:2), ki zmanjša vsoto HCA le v n-3 vzorcih. Brinovi ekstrakti zmanjšajo tvorbo samo posameznih tipov HCA, in sicer: v n-3 piščančjem mesu IQx, IQ in Glu-P-2, v navadnem piščančjem mesu pa 4,8- DiMeIQx.

Naše hipoteze, da bo dodatek ekstrakta brina v sončničnem olju zmanjšal nastajanje HCA v toplotno obdelanih piščančjih filejih, nismo potrdili. Vsi brinovi ekstrakti, ki so bili dodani v piščančjih filejih, so povečali vsoto identificiranih HCA. Zaključimo lahko, da ni smiselno pripravljati brinovega ekstrakta v olju, ki je bogato z antioksidanti. Dodatek brinovitih ekstraktov vpliva na zmanjšanje samo posameznih tipov HCA.



Predvidevali smo tudi, da bomo določili primerno koncentracijo brinovega ekstrakta, ki bo zagotavljala najmanjšo tvorbo HCA, hkrati pa ohranila senzorično sprejemljivost izdelka. Če primerjamo samo ekstrakte in njihov vpliv na zmanjševanje HCA, se je za najuspešnejšega izkazal ekstrakt BR (1:2).

## 7 VIRI

- Ahn J., Grün I. U. 2005. Heterocyclic amines: Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *Journal of Food Science*, 70, 4: 263-268
- Alaejos M. S., Afonso A.M. 2011. Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 2: 52-108
- Anderson K. E., Sinha R., Kulldorff M., Gross M., Lang N. P., Barber C., Harnack L., Kadlubar F. F. 2002. Meat intake and cooking techniques: associations with pancreatic cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506: 225-231
- Aristoy M. C., Toldrá F. 1998. Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, 50, 3: 327-332
- Azcona J. O., Schang M. J., Garcia P. T., Gallinger C., Ayerza J. R., Coates W. 2008. Omega-3 enriched broiler meat: The influence of dietary  $\alpha$ -linolenic- $\omega$ -3 fatty acid sources on growth, performance and meat fatty acid composition. *Canadian Journal of Animal Science*, 88, 2: 257-269
- Balogh G. 2000. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 5: 395-401
- Barcelo-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galceran M. T. 2004. Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *Journal of Chromatography A*, 1023, 1: 67-78
- Björkroth J. 2005. Microbiological ecology of marinated meat products. *Meat Science*, 70, 3: 477-480
- Borgen E., Alexey S., Kerstin S. 2001. Effects of precursor composition and water on the formation of heterocyclic amines in meat model systems. *Food Chemistry*, 74, 1: 11-19
- Chiu C. P., Yang D.Y., Chen B. H. 1998. Formation of heterocyclic amines in cooked chicken legs. *Journal of Food Protection*, 61, 6: 712-719
- Christine Z., Alvarado O., Casey M. 2006. Poultry: chemistry and biochemistry. V: Handbook of food science, technology, and engineering. Vol. 1. Hui Y. H. (ed). Boca Raton, Taylor & Francis: 31-1 - 31-13
- FAO. 2010. Agribusiness handbook: poultry, meat and eggs. Rome, Food and Agriculture Organization: 75 str.  
[http://www.eastagri.org/publications/pub\\_docs/6\\_Poultry\\_web.pdf](http://www.eastagri.org/publications/pub_docs/6_Poultry_web.pdf) (maj, 2015)
- Felton J. S., Fultz E., Dolbear F. A., Knize M. G. 1994. Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 897-903

- Garcia-Macias J. A. 2010. Heating, drying, and chemicals. V: Handbook of poultry science and technology. Vol. 1: Primary processing. Guerro-Legarreta I., Hui Y. H. (eds.). Hoboken, John Wiley & Sons: 421-428
- 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, 11: 1971-1978
- Haskaraca G., Demirok E., Kolsarıcı N., Öz F., Özsaraç N. 2014. Effect of green tea extract and microwave pre-cooking on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried chicken meat products. Food Research International, 63: 373-381
- Hodge J. E. 1953. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1, 15: 928-943
- Honikel K. 2014. Conversion of muscle to meat. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 3. 2<sup>nd</sup> ed. Dikeman M., Devine C. (eds.). London, Elsevier: 353-357
- Hui Y. H., Guerro-Legarreta I. 2006. Poultry biology, classification, and trade descriptions. V: Handbook of poultry science and technology. Vol. 1: Primary processing. Guerro-Legarreta I., Hui Y. H. (eds.). Hoboken, John Wiley & Sons: 3-19
- IARC. 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 56: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, International Agency for Research on Cancer: 609 str. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf> (maj, 2015)
- Jaegerstad M., Skog K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 574, 1: 156-172
- Keeton J. T., Eddy S. 2004. Chemical and physical characteristics. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 1. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M. (eds.). Oxford, Elsevier: 210-218
- Keşkekoğlu H., Üren A. 2014. Inhibitory effects of pomegranate seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs after cooking by four different methods. Meat Science, 96, 4: 1446-1451
- Kizil M., Oz F., Besler H.T. 2011. A review on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic. Journal of Food Processing & Technology, 2, 5: 120, doi: 10.4172/2157-7110.1000120: 5 str
- Lander. 2015. Grassland species profiles: *Juniperus communis* L. Rome, Food and Agriculture Organization: 2 str. <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000461.htm> (maj, 2015)
- Miceli N., Trovato A., Marino A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Taviano M. F. 2011. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. Food and Chemical Toxicology, 49, 10: 2600-2608

- Monin G. 2004. Colour and texture deviations. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 1. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M. (eds.). Oxford, Elsevier: 323-330
- Monti S. M., Ritieni A., Sacchi R., Skog K., Borgen E., Fogliano V. 2001. Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 8: 3969-3975
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. Journal of Chromatography B, 802, 1: 3-10
- Nagao M. 1999. A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens-heterocyclic amines-based od molecular information. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 431, 1: 3-12
- Oguri A., Suda M., Totsuka Y., Sugimura T., Waka-Bayashi, K. 1998. Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 402: 237-245
- Oz F., Kaya M. 2011. The inhibitory effect of red pepper on heterocyclic aromatic amines in fried beef *Longissimus dorsi* muscle. Journal of Food Processing and Preservation, 35, 6: 806-812
- Persson E., Graziani G., Ferracane R., Fogliano V., Skog K. 2003. Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. Food and Chemical Toxicology, 41, 11: 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, 3: 739-746
- Rahman 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, 1: 229-233
- Ravindran V. 2004. Poultry. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 2. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 925-927
- Richling E., Haring D., Herderic M., Schreier P. 1998. Determination of heterocyclic aromatic amines (HAA) in commercially available meat products and fish by high performance liquid chromatography-Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). Chromatographia, 48, 3-4: 258-262
- Rounds L., Havens C. M., Feinstein Y., Friedman M., Ravishanka 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, 4: 461-467
- Salomon C. P., Knize M. G., Felton J. S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. Food and Chemical Toxicology, 35, 5: 433-441

- Szas-Barber E., Fernandey-Lopez J., Sendra-Nadal E. 2010. Biochemical changes during onset and resolution of rigor mortis under ambient temperature. V: Handbook of poultry science and technology. Vol. 1: Primary processing. Guerro-Legarreta I., Hui Y.H. (eds.). Hoboken, John Wiley & Sons, 15: 220-237
- Shahidi F., Samaranyaka A.G.P. 2004. Maillard reaction and browning. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 2. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M. (eds.). Oxford, Elsevier: 578-592
- Shin H. S., Rodgers W. J., Goma E. A., Strasburg G.M., Gray J.I. 2002. Inhibition of heterocyclic aromatic amine formation in fried ground beef patties by garlic and selected garlic-related sulfur compounds. *Journal of Food Protection*, 65, 11: 1766-1770
- Sinha R., Rothman N. 1999. Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters*, 143, 2: 189-194
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178
- Skog K., Solyakov A. 2002. Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 8: 1213-1221
- 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, 9: 879-896
- Smith J. S., Ameri F., Gadgil P. 2008. Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks. *Journal of Food Science*, 73, 6: T100-T105
- Sugimura T. 1997. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 361, 1: 211-219
- Taylor G. R. 2004. Muscle fibre types and meat quality. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol 2. Jensen W. K., Devine C., Dikeman M (eds.). Oxford, Elsevier: 876-882
- Vangnai k., Houser T. A., Hunt M. C., Smith J. S. 2014. Effect of enhancement on the formation of heterocyclic amines in cooked pork loins: Preliminary studies. *Meat Science*, 92, 2: 88-93
- Viegas O., Amaro L. F., Ferreira I. M., Pinho O. 2012. Inhibitory effect of antioxidant-rich marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 24: 6235-6240
- Vombergar B., Hostnik S. 2006. Tehnologija mesa in mesnih izdelkov: učebnik za predmet tehnologija v 4. letniku programa Živilski tehnik in v 2. letniku programa Živilski tehnik. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 194 str.
- Weisburger, J. H., Veliath, E., Larios, E., Pittman, B., Zang, E., Hara, Y. 2002. Tea polyphenols inhibit the formation of mutagens during the cooking of meat. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 516: 19-22

Wilkinson B. H. P., Lee E., Purchas R. W., Morel P. C. H. 2014. The retention and recovery of amino acids from pork *longissimus muscle* following cooking to either 60 °C or 75 °C. *Meat Science*, 96, 1: 361-365

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tomažu Polaku za svetovanje, strokovno usmerjanje, strokovno pomoč, statistično obdelavo podatkov, nasvete in vložen trud pri nastajanju magistrskega dela.

Lepo se zahvaljujem tudi recenzentki prof. dr. Poloni Jamnik, za hitri pregled naloge.

Hvala vsem na Katedri za tehnologijo mesa, ki ste me sprejeli in mi omogočili delo pri vas.

Hvala ga. Lini Makivič za pregled virov in končni pregled magistrskega dela.

Posebna zahvala gre moji družini, predvsem mami in očetu za vso podporo pri študiju.

Zahvaljujem se tudi bratu, sostanovalcema in prijateljem za podporo v celotnem času študija in pri pripravi magistrskega dela.

Gogo, hvala za pomoč, potrpežljivost, čustveno in moralno podporo in to, da si vseskozi verjel vame in me bodril – brez tebe te magistrske naloge ne bi bilo. Hvala!