

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nina JANŽEKVIČ

**VPLIV DODATKA KSANTOHUMOLA NA
ZMANJŠANJE TVORBE PRODUKTOV
MAILLARDOVE REAKCIJE V SEKLJANCIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nina JANŽEKVIČ

**VPLIV DODATKA KSANTOHUMOLA NA ZMANJŠANJE TVORBE
PRODUKTOV MAILLARDOVE REAKCIJE V SEKLJANCIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**THE EFFECTS OF ADDING XANTHUMOL ON THE DECREASE
OF THE FORMATION OF MAILLARD REACTION PRODUCTS IN
MINCED BEEF**

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 Tehnologijo mesa in vrednotenje živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Tomaža Polaka, za somentorico prof. dr. Leo Demšar in za recenzenta prof. dr. Blaža Cigića.

Mentor: doc. dr. Tomaž Polak

Somentorica: prof. dr. Lea Demšar

Recenzent: prof. dr. Blaž Cigić

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.

Nina Janžekovič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 637.514.5:641.526:547.554:547.56(043)=163.6
- KG goveje meso / mesni izdelki / goveji sekljanci / rastlinski ekstrakti / ekstrakt hmelja / antioksidanti / fenolne spojine / ksantohumol / Maillardova reakcija / heterociklični aromatski amini
- AV JANŽEKovič, Nina, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
- SA POLAK, Tomaž (mentor)/DEMŠAR, Lea (somentorica)/ CIGIČ, Blaž (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2015
- IN VPLIV DODATKA KSANTOHUMOLA NA ZMANJŠANJE TVORBE
PRODUKTOV MAILLARDOVE REAKCIJE V SEKLJANCIH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
- OP IX, 60 str., 21 pregl., 12 slik, 76 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, kako dodatek ekstraktov hmelja različnih sort in letnikov vpliva na preprečevanje tvorbe heterocikličnih aminov (HCA) v govejih sekljancih. Pripravili smo etanolne ekstrakte hmeljev sort Aurora, Bobek, Celeia in Savinjski golding, dveh letnikov, in sicer 2009 in 2013 ter jih vezali na sol. Ekstrakte hmelja vezane na NaCl smo dodali govejim sekljancem v dveh količinah (0,5 in 1,0 g) in jih 4 minute pekli na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240° C. Na ohlajenih in homogeniziranih govejih sekljancih smo določili osnovno kemijsko sestavo mesa in vsebnost HCA. V etanolnih ekstraktih hmelja smo določili vsebnost ksantohumola. Najvišja vsebnost ksantohumola v hmelju letnika 2009 je bila določena v sorti Bobek (0,06 mg/ml), letnika 2013 pa v sorti Aurora (0,16 mg/ml). Sekljanci z dodanimi ekstrakti hmelja so v povprečju vsebovali 82,55 µg/kg HCA. Toplotno obdelani goveji sekljanci v povprečju vsebujejo največ Glu-P-2 (22,35 µg/kg), MeIQx (19,36 µg/kg), PhIP (14,26 µg/kg) in harmana (13,62 µg/kg). V manjših količinah zasledimo še norharman (8,48 µg/kg), IQx (3,59 µg/kg) in IQ (0,90 µg/kg). V pečenem kontrolnem sekljancu, z dodanim NaCl brez ekstrakta hmelja, je nastalo 138,46 µg/kg HCA. Najbolj uspešno nastanek HCA v pečenih govejih sekljancih preprečuje ekstrakt hmelja v koncentraciji ksantohumola 1,5-2,0 mg/kg sorte Bobek (26,67 µg/kg), sledi mu Savinjski golding (32,61 µg/kg) v koncentraciji 0,5-1,0 mg/kg. Iz dobljenih rezultatov ne moremo potrditi, katera koncentracija ksantohumola najuspešneje zavira nastanek HCA, večji vpliv ima sorta hmelja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 637.514.5:641.526:547.554:547.56(043)=163.6
CX beef meat / meat products / beef patties / plant extracts / hop extract / antioxidants / phenolic compounds / xanthohumol / Maillard reaction / heterocyclic aromatic amines
AU JANŽEKOVIČ, Nina
AA POLAK, Tomaž (supervisor)/DEMŠAR, Lea (co-advisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2015
TY THE EFFECTS OF ADDING XANTHOTHUMOL ON THE DECREASE OF THE FORMATION OF MAILLARD REACTION PRODUCTS IN MINCED BEEF
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO IX, 60 p., 21 tab., 12 fig, 76 ref.
LA sl
Al sl/en

AB The aim of this master's thesis was to determine the influence of hop extracts of different varieties and harvests on the formation of heterocyclic amines (HCA) in minced beef. We have prepared ethanolic extracts of hop varieties Aurora, Bobek, Celeia and Savinja Golding of the harvest years 2009 and 2013 and bound them to salt. Hop extracts bound to NaCl were added to minced beef in two quantities (0.5 and 1.0 g). Beef was grilled for 4 minutes on a two-plate grill at 240 °C. We determined the basic chemical structure and HCA content of grilled minced beef. Xanthohumol content was determined in ethanolic extracts of hop. The highest xanthohumol content for the year 2009 was found in the Bobek variety (0.06 mg/ml) and among hops from 2013 in the Aurora variety (0.16 mg/ml). Grilled minced beef with added hop extracts contained on average 82.55 µg/kg of HCA, of which Glu-P-2 22.35 µg/kg, MeIQx 19.36 µg/kg, PhIP 14.26 µg/kg and Harman 13.62 µg/kg. Smaller amounts of Norharman (8.48 µg/kg), IQx (3.59 µg/kg) and IQ (0.90 µg/kg) were also found. Grilled minced beef with added NaCl without the hop extract representing the control contained 138.46 µg/kg of HCA. The most successful in preventing HCA formation was extract from Bobek variety (26.67 µg/kg) with xanthohumol concentration in the range of 1.5-2.0 mg/kg, followed by Savinja Golding (32.61 µg/kg) in the concentration range of 0.5-1.0 mg/kg. Hop variety has larger influence on HCA formation than xanthohumol content in the hop extract.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 HMELJ.....	3
2.1.1 Sorte hmelja.....	3
2.1.2 Kemijska sestava hmelja	5
2.2 POLIFENOLI.....	6
2.2.1 Polifenoli hmelja.....	8
2.2.2 Prenilirani flavonoidi in ksantohumul	9
2.3 MAILLARDOVA REAKCIJA.....	11
2.3.1 Potek Maillardove reakcije	11
2.3.2 Vpliv Maillardove reakcije na aromo in barvo živil.....	13
2.3.3 Vpliv Maillardove reakcije na prehransko vrednost.....	14
2.3.4 Antioksidativna aktivnost	15
2.4 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI (HCA).....	15
2.4.1 Vrste HCA in njihov nastanek.....	15
2.4.2 Mutagenost in kancerogenost heterocikličnih aromatskih aminov.....	18
2.4.3 Izpostavljenost in dnevni vnos heterocikličnih aromatskih aminov	19
2.4.4 Ukrepi za zmanjševanje nastanka heterocikličnih aromatskih aminov	20
3 MATERIALI IN METODE.....	21
3.1 MATERIAL IN POTEK DELA.....	21
3.2 METODE.....	22
3.2.1 Osnovna kemijska sestava presnega mesa.....	22
3.2.2 Določanje vsebnosti ksantohumola v ekstraktih hmelja	22
3.2.3 Določanje vsebnosti HCA v pečenih govejih sekljancih	24
4 REZULTATI	27
4.1 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA PRESNEGA MESA.....	27

4.1.1 Fizikalno-kemijske analize določanja osnovne kemijske sestave mesa	27
4.1.2 Instrumentalna metoda določanja osnovne kemijske sestave presnega mesa .	27
4.2 DOLOČANJE KSANTOHUMOLA V EKSTRAKTIH HMELJA	27
4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI HCA V PEČENIH GOVEJIH SEKLJANCIH	28
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	39
5.1 RAZPRAVA	39
5.1.1 Vsebnost ksantohumola v etanolnih ekstraktih hmelja	39
5.1.2 Vsebnost HCA v govejih sekljancih	41
5.2 SKLEPI	51
6 POVZETEK.....	52
7 VIRI	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Sinteza ksantohumola in izomerizacija v izoksanthumol (Gonçalves in sod., 2013)	11
Slika 2: Shema Maillardove reakcije (Martins in sod., 2001).....	13
Slika 3: Strukturne formule nekaterih HCA (Bermudo in sod., 2005)	18
Slika 4: Umeritvena krivulja za določanje ksantohumola v ekstraktih hmelja	24
Slika 5: Odstotek ksantohumola v različnih sortah hmelja letnika 2013	40
Slika 6: Vsebnost ksantohumola v etanolnih ekstraktih različnih sort in letnikov hmelja	40
Slika 7: Povprečne vsebnosti posameznih HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v pečenih govejih sekljancih	42
Slika 8: Vsebnost vseh HCA v kontrolnem govejem sekljancu in sekljancih z dodatkom etanolnega ekstrakta hmelja vezanega na sol	45
Slika 9: Vsebnost vseh HCA v kontrolnem govejem sekljancu in sekljancih z dodatkom etanolnega ekstrakta različnih sort hmelja letnikov 2009 in 2013 vezanih na sol	46
Slika 10: Vpliv koncentracije ksantohumola v ekstraktu hmelja različnih letnikov na vsebnost vseh HCA v govejih sekljancih	47
Slika 11: Vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v govejih sekljancih v kontrolnem vzorcu in vzorci z dodatkom 0,5 in 1,0 g soli z vezanimi ekstrakti različnih sort hmelja letnika 2009	48
Slika 12: Vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v govejih sekljancih v kontrolnem vzorcu in vzorci z dodatkom 0,5 in 1,0 g soli z vezanimi ekstrakti različnih sort hmelja letnika 2013	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Slovenske sorte hmelja (Čerenak in Ferant, 2012)	4
Preglednica 2: Povprečna kemijska sestava posušenega hmelja (Almaguer in sod., 2014)	5
Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Balasundram in sod., 2006)	7
Preglednica 4: Skupine polifenolov v hmelju (Almaguer in sod., 2014)	8
Preglednica 5: HCA, ki jih lahko najdemo v hrani in modelnih sistemih (Toribio in sod., 2000)	16
Preglednica 6: Vsebnost HCA (vsota IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQ in PhIP) v nekaterih živilih (Skog, 2002)	20
Preglednica 7: Gradient tekočinske kromatografije	23
Preglednica 8: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR (Selected Ion Recording) načinu	23
Preglednica 9: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju HCA	25
Preglednica 10: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu	26
Preglednica 11: Rezultati osnovne kemijske analize presnega govejega mesa z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri	27
Preglednica 12: Rezultati osnovne kemijske analize presnega govejega mesa z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri	27
Preglednica 13: Vsebnost ksantohumola (mg/l) v ekstraktih hmelja letnikov 2009 in 2013 ..	28
Preglednica 14: Vsebnost ksantohumola (mg/g) v hmelju letnikov 2009 in 2013	28
Preglednica 15: Rezultati določanja HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v govejih sekljancih z dodanimi ekstrakti hmelja vezanih na sol z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri ($n = 107$)	28
Preglednica 16: Vpliv dodanega ekstrakta hmelja različnih sort na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 107$, LSM test, $\alpha = 0,05$)	29
Preglednica 17: Vpliv dodanega ekstrakta različnih sort hmelja letnika 2009 na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 71$, LSM test, $\alpha = 0,05$)	32
Preglednica 18: Vpliv dodanega ekstrakta različnih sort hmelja letnika 2013 na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 36$, LSM, $\alpha = 0,05$)	33
Preglednica 19: Rezultati določanja HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v sekljancih glede na količino ekstrakta hmelja letnika 2009 vezanega na sol ($n = 71$, LSM test, $\alpha = 0,05$)	35
Preglednica 20: Rezultati določanja HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v sekljancih glede na količino ekstrakta hmelja letnika 2013 vezanega na sol ($n = 36$, LSM test, $\alpha = 0,05$)	37
Preglednica 21: Delež zmanjšanja skupnih HCA v sekljancih glede na sorto hmelja in koncentracijo ksantohumola	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIA	aminoimidazol-azareni
CoA	koencim A
DMIP	2-amino-1,6-dimetil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin
DNA	deoksiribonukleotinska kislina
Glu-P-2	2-aminodipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol
Harman	9-metil- β -karbolin
HCA	heterociklični aromatski amini
HMF	hidroksimetilfurfural
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, (angl. High Performance Liquid Chromatography)
HPLC/MS	tekočinska kromatografija v povezavi z masno spektrometrijo
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinolin
IQx	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinolin
NaCl	natrijev klorid
NIR	bližnja infrardeča spektroskopija
Norharman	9-(4'-amino-fenil)9-H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol oziroma β -karbolin
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin
RNA	ribonukleinska kislina
SPE	ekstrakcija na trdni fazi, (angl. Solid Phase Extraction)
TriMeIQx	2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin
UV	ultravijolično valovanje
XN	ksantohumol

1 UVOD

Meso pred zaužitjem običajno toplotno obdelamo. Toplotna obdelava uniči patogene mikroorganizme in vpliva na razvoj specifičnih senzoričnih lastnosti. Pomemben vpliv ima tudi na prehransko vrednost mesnih izdelkov, hkrati pa lahko nastajajo toksične spojine (Kondjoyan in sod., 2014).

Maillardova reakcija je ena izmed najpomembnejših reakcij, ki med toplotno obdelavo živil. Vključuje verižne reakcije med reducirajočimi sladkorji in amino spojinami. Vpliva na elemente kakovosti hrane, kot so barva, okus in prehranska vrednost. Med reakcijo nastaja veliko produktov, ki imajo antioksidativne, protimikrobne ter mutagene ali kancerogene lastnosti (Jaeger in sod., 2010). Med Maillardovo reakcijo nastajajo tudi heterociklični aromatski amini (HCA) (Vitaglione in Fogliano, 2004).

Heterociklični aromatski amini so spojine z velikim mutagenim in kancerogenim potencialom. Nastajajo med toplotno obdelavo. Tvorijo se v proteinsko bogatih živilih, kot so meso in ribe. Glavna dejavnika, ki vplivata na tvorbo HCA sta vrsta mesa in pogoji toplotne obdelave, še posebej temperatura in čas toplotne obdelave (Ristic in sod., 2004).

HCA se tvorijo že pri običajnih pogojih toplotne obdelave. Znanstveniki poskušajo najti načine za zmanjšanje njihove vsebnosti, kar bi pripomoglo k zmanjšanju vnosa HCA in s tem zmanjšalo tveganje za zdravje (Wong in sod., 2012).

Fenolne spojine, ki jih najdemo v užitnih in neužitnih rastlinah, imajo veliko bioloških učinkov, vključno z antioksidativno aktivnostjo. V živilski industriji se povečuje zanimanje po ekstraktih sadja, zelišč, zelenjave, žit in drugih rastlinskih materialov, saj lahko ti izboljšajo kakovost in prehransko vrednost živil (Önder in sod., 2013).

Pomembno vlogo pri zmanjšanju vsebnosti HCA imajo sintetični in naravni antioksidanti ter rastlinska živila z visoko vsebnostjo antioksidantov, kot so zeleni čaj, sadni ekstrakti, deviško oljčno olje in karotenoidi (Janoszka, 2010). Antioksidanti delujejo kot lovilci prostih radikalov, ki nastajajo med Maillardovo reakcijo in tako preprečujejo tvorbo HCA (Gibis in Weiss, 2012). Polifenoli hmelja, med njimi tudi ksantohumol, imajo veliko antioksidativno učinkovitost, zato so primerni za zmanjšanje nastanka HCA, kar smo tudi dokazali v tem magistrskem delu.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bilo zmanjšanje tvorbe produktov Maillardove reakcije, natančneje heterocikličnih aromatskih aminov v govejih sekljancih. Za zmanjšanje tvorbe smo uporabili ekstrakte različnih sort hmelja dveh letnikov. Želeli smo ugotoviti najprimernejšo koncentracijo ksantohumola, ki bi zagotavljala najmanjšo tvorbo HCA.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bodo dodatki ekstraktov hmelja zmanjšali nastajanje HCA v pečenih govejih sekljancih.

Predpostavili smo, da bomo določili primerno koncentracijo ksantohumola, kot komponento etanolnega ekstrakta, ki bo zagotavljala najmanjšo tvorbo HCA, hkrati pa zagotovila senzorično sprejemljivost izdelka.

Predpostavili smo, da bodo ekstrakti hmelja različnih sort in letnikov, imeli različno sposobnost preprečevanja tvorbe HCA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJ

Hmelj je zelnata trajnica, ovijalka. Botanično ga uvrščamo med dvokaličnice, v red koprivovcev (*Urticales*) in družino konopljevčev (*Cannabaceae*). Hmelj, ki ga gojimo danes, izhaja iz divje rastočih hmeljev Evrope in zahodne Azije. V rodu *Humulus* poznamo 2 vrsti, in sicer navadni hmelj (*Humulus lupulus*) in enoletni ali japonski hmelj (*Humulus japonicus*). V toku evolucije in z razširjanjem s prvotnih rastišč, so se razvili različni tipi divjega navadnega hmelja, ki jih danes smatramo za podvrste. Med seboj se razlikujejo v zgradbi listov in drugih lastnostih. V Evropi prevladuje evropski hmelj (*Humulus lupulus* ssp. *europaeus*), v Ameriki novomehiški hmelj (*Humulus lupulus* spp. *neomexicanus*) in srčastolistni hmelj (*Humulus lupulus* spp. *cordifolius*) na Japonskem (Rode in sod., 2002; Ferant, 2012).

Hmelj je dvodomna rastlina, kar pomeni, da na eni rastlini najdemo le moške ali le ženske cvetove (Ferant, 2012). Pridelujemo le ženske rastline, v glavnem za uporabo v pivovarski industriji, manjši del pa za uporabo v medicini (Patzak in sod., 2010).

Ženska socvetja – hmeljni storžki so bogati s polifenoli in aciliranimi floriglucidi, ki dajejo pivu značilno aromo in okus. Sprva so hmelj zaradi njegove antimikrobne aktivnosti uporabljali kot konzervans. Šele kasneje so ga začeli uporabljati zaradi grenkega okusa, ki ga daje pivu. Hmelj vsebuje izo-alfa-kislino, ki so zelo hidrofobne in s tem vplivajo na stabilnost pene. Tudi ksantohumol in isoksantohumol imata pozitiven učinek na stabilnost pene (Zanoli in Zavatti, 2008).

Hmelj je široko uporabljen tudi v medicini. Kot blago pomirjevalo se uporablja za zdravljenje nespečnosti in duševne napetosti. Tradicionalno so ga uporabljali za zdravljenje napetosti, nemira, povečanje apetita in izboljšanje prebave, zdravljenje zobobola, bolečih ušes ter nevralgije. Hmelj ima tudi diuretični in antispazmodičen učinek (Zanoli in Zavatti, 2008).

2.1.1 Sorte hmelja

Vzgoja novih rastlin je postopek, s katerim človek z izbiro izboljšuje posamezno ali več lastnosti kmetijskih rastlin. Pri hmelju se, kot pri drugih kmetijskih rastlinah, daje največji poudarek povečanju pridelka, izboljšanju kvalitete in odpornosti na pomembne bolezni in škodljivce. Z uvajanjem določene sorte hmelja z območja, kjer je bila požlahtnjena, na drugo območje, se lahko spremenijo razrast rastlin, količina in kvaliteta pridelka, spremeni pa se tudi stopnja odpornosti na posamezne bolezni in škodljivce. Posledica vsega navedenega je, da ima vsaka dežela, ki se ukvarja s pridelovanjem hmelja v malo večjem obsegu, razvit svoj žlahtniteljski program.

Sorte hmelja delimo glede na pridelovalne lastnosti, zlasti pa glede na količino grenčice ter kakovost arome (preglednica 1).

Po pridelovalnih lastnostih delimo sorte predvsem na čas zrelosti. Ločimo:

- zgodnje,
- srednje pozne in
- pozne sorte.

Glede na količino grenčice in arome delimo sorte v 3 skupine:

- aromatični hmelj (količina alfa-kislin do 8 % v suhi snovi) je hmelj s tipično hmeljsko aromo in z majhno količino grenčičnih smol (npr. Savinjski golding),
- grenčični hmelj (količina alfa-kislin 8-14 % v suhi snovi) je hmelj z večjo količino grenčičnih smol in s prijetno aromo (npr. Aurora),
- visoko grenčični hmelj, kamor spadajo sorte z visoko vsebnostjo alfa-kislin (nad 14 % v suhi snovi; npr. Dana).

Preglednica 1: Slovenske sorte hmelja (Čerenak in Ferant, 2012)

Sorta*	Osnovna razvrstitev	Alfa-kislina (% v suhi snovi)	Eterično olje (% v suhi snovi)
Ahil	grenčični	9,4-11,3	1,5-1,8
Apolon	grenčični	9,0-11,0	0,8-1,2
Atlas	grenčični	9,3-10,9	0,9-3,0
Aurora	aromatični	7,2-12,6	0,9-1,6
Blisk	grenčični	5,0-7,0	0,4-3,4
Bobek	aromatični	3,5-7,8	0,7-4,0
Buket	aromatični	6,4-10,1	1,2-4,2
Celeia	aromatični	3,0-8,7	0,6-3,6
Cekin	aromatični	4,0-7,1	0,4-2,3
Cerera	aromatični	3,4-7,0	1,3-2,8
Cicero	aromatični	6,0-9,5	0,9-2,3
Dana	grenčični	12,5-19,3	3,1-4,6
Savinjski golding	aromatični	2,8-6,1	0,3-1,7
Styrian gold	aromatični	3,5-6,5	1,3-2,3

*sorte označene s krepko pisavo smo uporabili v našem poskusu

Savinjski golding je edina sorta, ki se je obdržala vse od samega začetka uvajanja hmelja na slovenskem pa do danes. Je prilagojena različica angleške sorte Fuggle. Še po več kot 100 letih pridelovanja se prideluje na precejšnjem deležu hmeljišč. Zaradi svoje prepoznavne fine hmeljske arome je sloves slovenskega hmelja razširila po vsem svetu (Čerenak in Ferant, 2012). Vsebnost ksantohumola v suhi snovi je 0,2-0,3 % (IHPS, 2012).

Sorta **Aurora** je zraven nekaterih drugih (Atlas, Ahil, Apolon) rezultat prvih križanj tujih sort in slovenskih moških hmeljnih rastlin v šestdesetih letih prejšnjega stoletja. To sorto danes pridelujemo na več kot 60 % slovenskih hmeljišč in je naša vodilna. Aurora je sorta, ki zaradi svoje dobre prilagojenosti in odpornosti na bolezen hmeljarjem daje visoko kakovosten in stabilen pridelek z žlahtno hmeljsko aromo. Njena grenčica je zaradi značilne sestave grenčičnih smol zelo nežna in prijetna ter zato zelo zaželena v pivovarnah po svetu. Vsebuje 7,2-12,6 % alfa kislin in 2,7-4,4 % beta kislin (Čerenak in Ferant, 2012) ter 0,3 do 0,5 % ksantohumola v suhi snovi (IHPS, 2012).

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja so nastale 3 nove sorte hmelja: Blisk, Buket in Bobek. Cilj žlahtniteljske serije je bil žlahtnenje na boljšo aromo in večjo odpornost na škodljivce. Za hmeljarje in trgovino s hmeljem je bila in je še najbolj zanimiva sorta **Bobek**, in sicer zaradi povečanega pridelka in lastnosti, v določeni meri podobnih s sorto Aurora (Čerenak in Ferant, 2012). Aroma Bobka je intenzivna in prijetno hmeljna. Bobek je srednje skladiščno obstojen. Posebnost Bobka je najvišji delež beta kislin med slovenskimi sortami (Šuštar-Vozlič in sod., 2002). Vsebnost ksantohumola v suhi snovi je 0,3-0,4 % (IHPS, 2012).

V devetdesetih letih so bile priznane štiri nove sorte hmelja: Celeia, Cerera, Cekin in Cicero, žlahtnjene na kakovost Savinjskega goldinga in na velik pridelek. Najbolje sprejeta pri vseh sodelujočih v hmeljarski panogi, hmeljarjih, trgovcih s hmeljem in pivovarjih je **Celeia**, ki zavzema v zadnjih letih primerljiv delež površin kot sorti Savinjski golding in Bobek. Znana je po harmonični hmeljski aromi, ki daje pivcu piva zaokrožen hmeljski okus (Čerenak in Ferant, 2012). Vsebnost ksantohumola v suhi snovi je 0,1-0,2 % (IHPS, 2012).

2.1.2 Kemijska sestava hmelja

Pridelek hmelja so storžki. V storžku je lupulin, v katerem so pomembne sestavine za pivovarstvo. Lupulin vsebuje snovi, ki dajejo pivu okus, vonj in obstojnost. Najpomembnejše sestavine storžka hmelja so hmeljne smole, eterično olje in polifenoli (Ferant in Košir, 2012). Storžki vsebujejo tudi proteine, lipide, voske, celulozo in aminokislino. Povprečna kemijska sestava sveže posušenega hmelja je prikazana v preglednici 2 (Almaguer in sod., 2014).

Preglednica 2: Povprečna kemijska sestava posušenega hmelja (Almaguer in sod., 2014)

Sestavina hmelja	Vsebnost (%)
Celuloza	43
Skupne smole	15-30
Beljakovine	15
Voda	10
Pepel	8
Polifenoli (tanini)	4
Monosaharidi	2
Pektin	2
Aminokislino	0,1
Eterično olje	0,5-3
Voski in steroidi	v sledovih-25

Suhi storžki vsebujejo 0,5-2,0 % eteričnega olja (Čerenak in sod., 2011). Nekaterih viri navajajo večjo vsebnost eteričnega olja, tja do 3 % (Almaguer in sod., 2014). Eterično olje je, tako kot hmeljne smole, sekundarni metabolit hmelja (Almaguer in sod., 2014). Pridobivamo ga z destilacijo z vodno paro. Eterično olje hmelja sestavlja več kot 400 komponent, lahko hlapnih in težko hlapnih. Komponente, ki sestavljajo eterično olje, uvrščamo v 3 skupine: ogljikovodike, spojine s kisikom in spojine z žveplom (Košir in Klezin, 2012). Ogljikovodiki so zelo hlapni. Lahko jih razdelimo na 3 podskupine, in sicer alifatske ogljikovodike, monoterpene in seskviterpene. Med ogljikovodiki je najpomembnejši in najbolj zastopan monoterpene β -mircen, ki lahko predstavlja 30-60 % vsega eteričnega olja. β -mircen je glavna komponenta, ki je odgovorna za oster in vsiljiv vonj svežega hmelja. Ostali monoterpene, ki so v eteričnem olju prisotni v bistveno manjših količinah, so ocimen, β -pinen, limonen in

drugi. Glavne spojine, ki sestavljajo seskviterpene so α -humulen, β -kariofilen in β -farnezen. Ti imajo višjo točko vrelišča kot monoterpeni. V najvišji koncentraciji se nahajata α -humulen in β -kariofilen. Monoterpen mircen ter seskviterpena, β kariofilen in humulen, predstavljajo do 80-90 % eteričnega olja. Spojine s kisikom predstavljajo znatno nižji delež eteričnega olja (do 30 %). Sestavljene so iz alkoholov, aldehydov, kislin, ketonov, epoksidov in estrov. Spojine z žveplom so v eteričnem olju prisotne le v sledovih, vendar imajo vpliv na aromo hmelja in piva, saj imajo nizek prag senzorične zaznave (Almaguer in sod., 2014).

Spojine eteričnega olja vplivajo na aromo piva v obliki sadne, cvetlične, citrusne, zeliščne in tipično hmeljne note. Vsaka sorta hmelja vsebuje komponente teh aromatičnih skupin, vendar le nekatere komponente olja v posamezni sorti prevladujejo (Košir in Klezin, 2012).

Količina in sestava eteričnega olja je odvisna od številnih dejavnikov kot so sorta hmelja, rastni pogoji, zrelost ob pobiranju, pogoji med sušenjem in skladiščenjem ter starost hmelja (Almaguer, 2014).

Hmeljne smole so nosilec grenkega okusa piva. Skupne smole so opredeljene kot frakcija, ki je topna v dietiletru in hladnem metanolu. Nadalje lahko smole razdelimo v mehke in trde. Mehke smole so topne v heksanu, delimo jih na alfa-kisline in beta-frakcijo, ki jo sestavljajo beta-kisline in nedoločene mehke smole (Almaguer in sod., 2014). Mehke smole imenujemo tudi grenke kisline. Grenke kisline, ki predstavljajo 5-20 % suhe teže hmeljnega storžka, so derivati floroglucinola. Grenke kisline v hmelju tvorijo kompleksno mešanico spojin v različnih koncentracijah. Glavne alfa-kisline predstavljajo humuloni (35-70 % vseh alfa-kislin), kohumuloni (20-65 %) in adhumuloni (10-15 %). Beta-kisline so lupuloni (30-55 % vseh beta-kislin), kolupuloni in adlupuloni. V pivovarstvu alfa-kisline določajo kvaliteto hmelja, saj vplivajo na stabilnost pene in imajo antibakterijski učinek. Alfa-kisline se pri visoki vrednosti pH in visoki temperaturi izomerizirajo v izo-alfa-kisline, ki so bolj topne in grenke (Zanoli in Zavatti, 2008).

Polifenoli so predvsem v listih in vretenu storžka ter lupulinu. Povečana količina polifenolov vpliva na aromo, barvo, peno in stabilnost okusa. Količina in sestava polifenolov je odvisna od sorte, najbolj pa od skladiščenja hmelja (Ferant in sod., 2012)

2.2 POLIFENOLI

Polifenoli ali fenolne spojine je skupno ime za strukturno raznolike spojine, ki jih najdemo v naravi. Fenolne snovi so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinski celici (Abramovič in sod., 2008) in vplivajo na senzorično in hranilno vrednost zelenjave, sadja in ostalih rastlin. Za rastlino so posebnega pomena, saj imajo pomembno vlogo v fiziologiji in morfologiji. Ta velika skupina bioaktivnih spojin ima številne biološke funkcije, pomembno vlogo igra pri rasti in reprodukciji, ščiti pred škodljivci ter je odgovorna za atraktivno barvo listov, sadežev in cvetov (Ignat in sod., 2011; Balasundram in sod., 2006; Leopoldini in sod., 2011).

Znano je, da imajo polifenoli pozitiven vpliv na zdravje, saj so vir antioksidantov in imajo hranilno vrednost. Polifenole najdemo v sadju, zelenjavi, oreščkih, semenih, pijačah in v predelani hrani, kot komponento uporabljenih rastlinskih sestavin. Najpogostejši vir polifenolov v prehrani so jabolka, čaj, jagodičevje, kava, vino, čokolada in čebula. Živila vsebujejo različne skupine fenolnih spojin, ki se razlikujejo v polarnosti in velikosti, od enostavnih fenolnih spojin do oligomerov. Vse te spojine so prisotne v nizkih koncentracijah (Motilva in sod., 2013).

Fenolne spojine so sestavljene iz vsaj enega aromatskega obroča, na katerega je vezana ena ali več hidroksilnih skupin. Njihova struktura lahko variira od preproste fenolne molekule do kompleksnih polimerov z visoko molekulsko maso. Zaenkrat ni univerzalne klasifikacije fenolnih snovi, najpogostejša je razvrstitev glede na število aromatskih obročev in funkcionalne skupine (Ignat in sod., 2011; Leopoldini in sod., 2011). Leopoldini in sod. (2011) so fenolne spojine glede na število fenolnih obročev razdelili na enostavne fenole in polifenole. K enostavnim prištevamo fenolne kisline. Polifenole, spojine, ki vsebujejo vsaj 2 fenolna obroča, delimo na flavonoide in stilbene. Fenolne spojine s tremi ali več fenolnih obročev imenujemo tanini. Balasundram in sod. (2006) jih delijo glede na osnovni skelet (preglednica 3).

Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Balasundram in sod., 2006)

Skupina	Osnovni skelet/strukturna formula
Fenoli	C_6
Hidroksibenzojske kisline	$C_6.C_1$
Acetofenoli, fenilacetne kisline	$C_6.C_2$
Hidroksicimetne kisline, fenilpropeni	$C_6.C_3$
Naftokinoni	$C_6.C_4$
Ksantoni	$C_6.C_1.C_6$
Stilbeni, antrakinoni	$C_6.C_2.C_6$
Flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6.C_3.C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6.C_3)_2$
Biflavonoidi	$(C_6.C_3.C_6)_2$
Lignini	$(C_6.C_3)_n$
Kondenzirani tanini	$(C_6.C_3.C_6)_n$

Fenolne kisline imajo na fenolni obroč vezano eno karboksilno funkcionalno skupino. Naprej jih razdelimo na hidroksicimetne in hidroksibenzojske strukture. V naravi so pogostejše hidroksicimetne kisline. Flavonoidi so obsežna skupina nizko molekularnih fenolnih spojin, ki so derivati benzo- γ -pirona (Leopoldini in sod., 2011). Zgrajeni so iz 15 ogljikovih atomov, ki so urejeni v $C_6-C_3-C_6$ strukturo. Sestavljeni so iz dveh aromatskih obročev, A in B, ki ju povezuje heterociklični obroč C. Glede na stopnjo oksidacije heterocikličnega obroča C in substituentne na obroču C delimo flavonoide na flavonole, flavone, flavanone, flavanole (ali katehine), izoflavone, flavanonole in anticianidine (Ignat in sod., 2011). V skupino stilbenov prištevamo številne spojine, med katerimi so glavni predstavniki resveratrol, pterostilbeni in piceatanol, ki imajo fenolna obroča povezana z dvojno vezjo (Leopoldini in sod., 2011).

Lignini nastanejo iz dveh fenilpropanoidnih enot, povezanimi s kisikovim mostom. Visok delež ligninov vsebujejo lanena in sezamova semena, najdemo pa jih tudi v žitih in rastlinskih oljih (Motilva in sod., 2013). Tanine, polimerne molekule, delimo na kondenzirane in hidrolizabilne. Kondenzirani tanini so polimeri flavonoidov, hidrolizabilni tanini pa imajo ogljikohidratno jedro zaestreno z galno kislino ali podobno spojino (Leopoldini in sod., 2011).

2.2.1 Polifenoli hmelja

Posušeni storžki hmelja vsebujejo 4-14 % polifenolov (preglednica 4). Večino polifenolov predstavljajo spojine z visoko molekulsko maso, kot so kondenzirani tanini. Polifenoli z nizko molekulsko maso, na primer katehini, proantocianidini, fenolne kisline in flavonoli sestavljajo samo 20 % polifenolov hmelja (Magalhães in sod., 2010). Aromatične sorte hmelja vsebujejo več polifenolov z nižjo molekulsko maso kot grenčični hmelji. Povečanje alfa-kislin se namreč lahko zgodi samo na račun zmanjšanja vsebnosti polifenolov (Almaguer in sod., 2014). V zelo nizkih koncentracijah se v hmelju nahaja tudi resveratrol. Vsaka rastlina ima značilno polifenolno sestavo, nekateri polifenoli hmelja so značilni samo za to rastlinsko vrsto. Hmelj je tudi bogat vir preniliranih polifenolov (Magalhães in sod., 2010).

Preglednica 4: Skupine polifenolov v hmelju (Almaguer in sod., 2014)

Skupina polifenolov	Spojina
Flavonoli	kvercetin kamferol glikozidi flavonola rutin astragalin
Flavan-3-oli	katehin epikatehin dimeri flavanola oligomeri flavanola tanini
Fenolne (karboksilne) kisline	ferulna kislina
Ostali polifenoli	prenilirani flavonoidi resveratrol

Flavonoide v hmelju predstavljajo predvsem katehini in njihovi polimeri, proantocianidini, kvercetin in kamferol. Kvercetin in kamferol se ne nahajata v prosti obliki, ampak kot glikozid. Kvercetin ima najvišji antioksidativni potencial med znanimi flavonoli (Almaguer in sod., 2014).

Glavna predstavnika flavanolov v hmelju sta katehin in epikatehin. Monomeri katehina in epikatehina se povezujejo v dimere, trimere in polimere. Te polimere imenujemo proantocianidini ali kondenzirani tanini. Proantocianidini so sestavljeni iz največ 8 monomerov, kondenzirane tanine pa sestavlja več kot 8 monomernih enot (Almaguer in sod., 2014).

2.2.2 Prenilirani flavonoidi in ksantohumul

Iz hmeljnih storžkov so poleg eteričnih olj in grenkih kislin identificirali tudi številne prenilflavonoide (Zanoli in Zavatti, 2008).

Prenilizacija je kemijska ali encimska adicija hidrofobne stranske verige na molekulo, ki je lahko terpenoidna, aromatska spojina, protein ali drugo. Prenilacija aromatskih sekundarnih metabolitov ima pomembno vlogo pri sintezi velike skupine molekul, ki imajo tudi farmakološko delovanje (Epifano in sod., 2007).

Za razliko od ostalih fenolnih snovi, prenilirane flavonoide najdemo le v redkih družinah rastlin. Od približno 1100 vseh znanih preniliranih flavonoidov so jih 80 % izolirali iz treh družin rastlin, konopljevok (skupaj s hmeljem), nebinovk in metuljnic. V zahodnem načinu prehranjevanja nobena od teh rastlin ne predstavlja pomembnega vira preniliranih flavonoidov. Najpomembnejši vir preniliranih flavonoidov predstavlja pivo (Stevens in sod., 1999).

Prenilirani flavonoidi, ki se pojavljajo v hmelju so ksantohumul, izokgantohumul, desmetilksantohumul, 6-prenilnaringenin, 8-prenilnaringenin in 6-geranilnaringenin (Chen in sod., 2012). Med prenilflavonoidi je najbolj zastopan halkan ksantohumul (Zanoli in Zavatti, 2008).

2.2.2.1 Sinteza flavonoidov

Sinteza flavonoidov se začne s kondenzacijo p-kumaril koencima A (CoA) s tremi molekulami malonil-CoA. Produkt reakcije, ki jo katalizira halkan sintaza, je naringenin halkan (tetrahidroksihalkan) (Stevens in Page, 2004; Cooper-Driver, 2001). Večina rastlin ne akumulira halkanov, zato poteče izomerizacija z encimom halkan izomeraza. Tvori se t.i. C obroč, nastane prvi flavanon, naringenin. Flavoni predstavljajo pomembno točko v biosintezi flavonoidov, saj so prekurzorji flavonov, izoflavonov in dihidroflavonolov, iz katerih nastajajo flavonoli in antocianidini (Cooper-Driver, 2001; Schijlen in sod., 2004).

2.2.2.2 Ksantohumul

Ksantohumul (3'-3,3-dimetil alil-2',4',4-trihidroksi-6'-metoksihalkan) predstavlja do 1 % suhe teže hmeljnih storžkov (Poplonski in sod., 2013). Ksantohumul, polifenol iz skupine prenilflavonoidov, se nahaja v lupulinskih žlezah skupaj z alfa- in beta-kislinami ter eteričnimi olji. Vsebnost ksantohumola in njegovo razmerje z alfa-kislinami je odvisno od sorte hmelja, lokacije in rastnih razmer (Hrastar in sod., 2006).

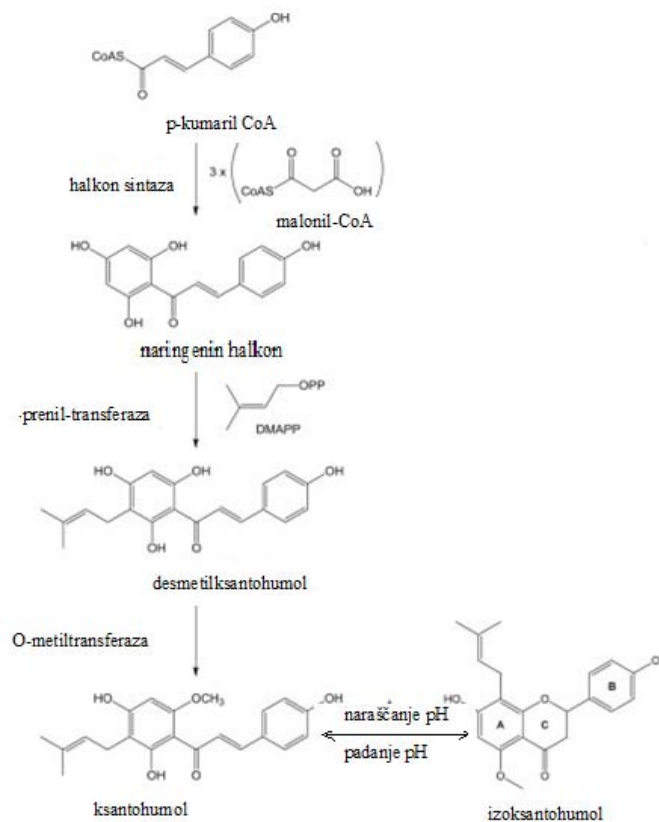
Terpenofenolne spojine, kot sta ksantohumul in humulon, imajo v rastlinah vlogo zaščite pred insekti, ki se hranijo s storžki in semeni (Stevens in Page, 2004).

Pod vplivom toplotne obdelave in povišane vrednosti pH se ksantohumol lahko pretvori v prenilflavanon izoksanthumol. Izoksanthumol je najbolj zastopan prenilflavonoid v pivu (Zanoli in Zavatti, 2008). Njegova koncentracija se giblje med 0,04 in 3,44 mg/L (Magalhães in sod., 2007). Tudi ostali halkoni, ki se pojavljajo v 10-100 kratnih nižjih koncentracijah, se izomerizirajo v ustrezne flavanone (Zanoli in Zavatti, 2008). V hmeljnih storžkih so zasledili najmanj 13 ostalih halkonov (Chen in sod., 2012; Magalhães in sod., 2010).

Ksantohumol je znan po širokem spektru bioloških aktivnosti, kot so antioksidativna, protivnetna, antibakterijska in protivirusna ter antikancerogena (Poplonski in sod., 2013). Ksantohumol zavira oksidacijo lipoproteinov nizke gostote. Nekatere študije kažejo, da bi ksantohumol lahko uporabljali pri zdravljenju virusa HIV in pri inhibiciji zajedalca *Plasmodium falciparum*, ki povzroča malarijo (Magalhães in sod., 2007). Ksantohumol vpliva na zmanjšanje genotoksičnosti, ki jo povzročajo reaktivni kisikovi radikali in deluje na različne skupine mutagenov, ki jih najdemo v hrani, kot so policiklični aromatski ogljikovodiki in heterociklični aromatski amini (Ferk in sod., 2010). Raziskovalci vlagajo veliko truda v povečanje biološke aktivnosti ksantohumola (Poplonski in sod., 2013).

Sinteza ksantohumola

Ksantohumol nastane iz naringenin halkona. V tem primeru je nastanek flavanona inhibiran, saj ne poteče izomerizacija s halkon izomerazo. Prenilizacija obroča A poteče z dimetilalildifosfatom, pri tem nastane desmetilksantohumol. V naslednjem koraku poteče metilacija 6'-hidroksilne skupine, pri čemer nastane ksantohumol. Vrstni red prenilizacije in metilacije še ni natančno določen, ampak prisotnost desmetilksantohumola v hmelju nakazuje, da prenilizacija poteče pred metilacijo (Stevens in Page, 2004). Sintezo ksantohumola prikazuje slika 1.



Slika 1: Sinteza ksantohumola in izomerizacija v izoksantohumol (Gonçalves in sod., 2013)

2.3 MAILLARDOVA REAKCIJA

Maillardova reakcija je ena najpomembnejših kemijskih reakcij, ki poteka med toplotno obdelavo živil. Med reakcijo nastajajo številni produkti, ki lahko imajo antioksidativne, antimikrobne, mutagene ali kancerogene lastnosti (Jaeger in sod., 2010).

Maillardova reakcija poteka brez prisotnosti encimov med reducirajočimi sladkorji in prostimi amino skupinami (Finot, 2003). Povzroča porjavenje hrane, vpliva na aromo živil in prehransko vrednost. Med reakcijo lahko nastanejo tako toksične snovi (kot sta na primer akrilamid in heterociklični aromatski amini), kot tudi antioksidanti (Boekel, 2006). Maillardova reakcija v glavnem poteka samo na površini hrane. Potek Maillardove reakcije je odvisen od temperature in časa toplotne obdelave, vrednosti pH, vodne aktivnosti in vrste ter razpoložljivosti reaktantov (Jaeger in sod., 2010).

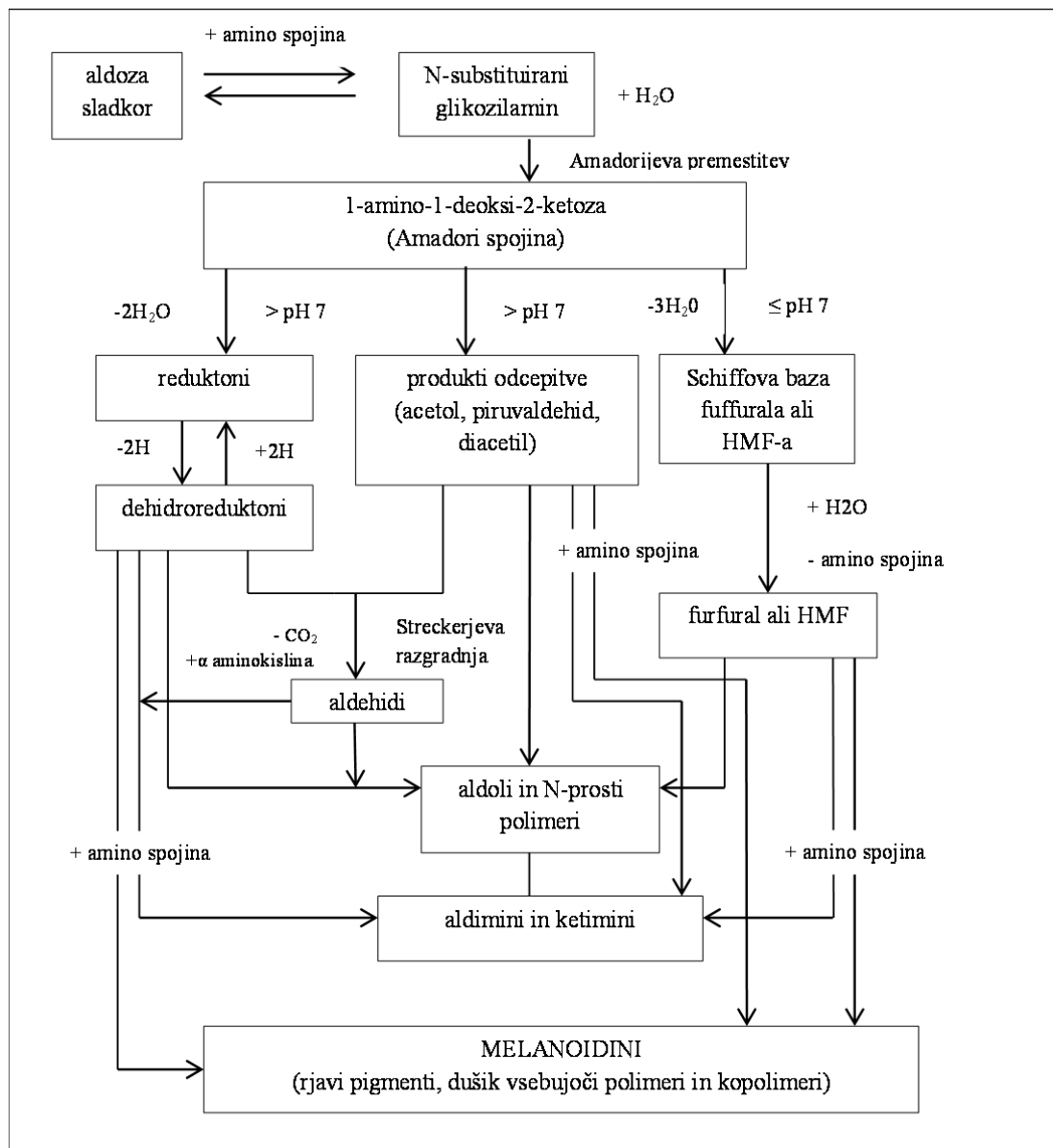
2.3.1 Potek Maillardove reakcije

Maillardova reakcija je skupek kemijskih reakcij, ki nastane med segrevanjem reducirajočih sladkorjev in spojin, ki imajo prosto amino skupino (aminokisljine, amini, proteini) (Ames, 2003). Kemizem Maillardove reakcije je zelo zapleten. Ne zajema ene reakcijske poti, ampak celo mrežo različnih reakcij (Murkovic, 2004) (slika 2). Maillardovo reakcijo delimo v 3 faze. V začetni fazi poteka kondenzacija med amino skupino in reducirajočim sladkorjem, pri

čemer nastane N-glikozilamin, ki se v primeru aldoze pretvori v t.i. amadorijev produkt, v heynsov produkt v pa primeru, da je reducirajoči sladkor ketoza (Boekel, 2006). Nastanek amadorijevega produkta je nujen za nadaljevanje reakcije (Finot, 2003).

Vmesna faza se začne z amadorijevim oz. heynsovim produktom in vodi do fragmentacije sladkorja in sprostitvev amino skupine (Boekel, 2006). Razpad Amadorijevega produkta je odvisen od vrednosti pH. Pri vrednosti pH, nižji od 7, poteče 1,2-enolizacija, pri čemer nastane furfural ali hidroksimetilfurfural. Nastanek furfurala ali hidroksimetilfurala je odvisen od tega ali v reakcijo vstopa pentoza ali heksoza. Pri vrednosti pH višji od 7, amadorijev produkt razpade na 4-hidroksi-5-metil-2,3-dihidrofuran-3-on in različne produkte kot so acetol, pirivaldehid in diacetil. Vse te spojine so zelo reaktivne in lahko sodelujejo v nadaljnjih reakcijah. Karbonilne skupine se lahko kondenzirajo s prostimi amino skupinami, kar pomeni vključitev dušika v reakcijske produkte. Dikarbonili lahko reagirajo z aminokislinami, pri čemer nastanejo aldehidi in α -aminoketoni. Ta reakcija je znana kot Streckerjeva razgradnja (Martins in sod., 2001). Streckerjeva razgradnja značilno vpliva k razvoju arome (Boekel, 2006). V zadnji fazi potečejo dehidracija, fragmentacija, ciklizacija in polimerizacija, v katerih ponovno nastopa amino skupina (Boekel, 2006). Končni produkti reakcije so rjavi dušikovi polimeri in kopolimeri, znani kot melanoidini (Martins, 2001). V reakciji nastanejo tudi aldehidi, ketoni, dikarbonili in heterociklični amini, ki prispevajo k aromi živil (Wong in sod., 2012).

Maillardova reakcija lahko torej poteka po več poteh, odvisno od temperature, vrednosti pH in lastnosti reaktantov (vrsta sladkorja, vrsta aminokislina ali proteina) (Boekel, 2006). Obseg reakcije lahko zmanjšamo z odstranitvijo prekurzorjev, npr. reducirajočih sladkorjev iz hrane bogate s proteini ali amino skupin iz hrane bogate z ogljikovimi hidrati. Hitrost Maillardove reakcije narašča s temperaturo. Reakcija najhitreje poteče pri vodni aktivnosti od 0,5 do 0,8. Pri nižji vodni aktivnosti poteka počasneje, saj so reaktanti manj mobilni. Zato se produkti Maillardove reakcije tvorijo v skorji toplotno obdelanih živil, kjer je zaradi toplotne dehidracije manjša vsebnost vode (Ames, 2003).



Slika 2: Shema Maillardove reakcije (Martins in sod., 2001)

2.3.2 Vpliv Maillardove reakcije na aromo in barvo živil

Znanstveniki so identificirali na stotine spojin, ki nastanejo med Maillardovo reakcijo in vplivajo na aromo živil. Večina teh snovi je hlapnih in zato vplivajo na vonj, nekatere vplivajo tudi na okus. Maillardova reakcija je odgovorna za značilno aromo pražene kave, toplotno obdelanega mesa, kruha, piškotov, kosmičev, praženih oreščkov in pečenega krompirja (Ames, 2003).

Hlapne spojine, ki nastanejo med Maillardovo reakcijo, lahko razdelimo v 3 skupine:

- spojine, ki nastanejo iz sladkorjev (furani, pironi, ciklopenteni, karbonili, kisline),

- spojine, ki nastanejo iz aminokislin (piroli, piridini, pirazini, oksazoli),
- spojine, ki za nastanek potrebujejo sladkorje in aminokislino (žveplove spojine, aldehide, tiazole, ciklične poližveplove spojine) (Ames, 2003).

Strogo gledano, med Maillardovo reakcijo nastanejo samo spojine iz tretje skupine (Ames, 2003).

Tvorba aromatskih snovi med Maillardovo reakcijo je odvisna od vrste sladkorjev in aminokislin ter od reakcijske temperature, časa, vrednosti pH in vsebnosti vode. Vrsta sladkorjev in aminokislin vpliva na vrsto aromatskih spojin, ki bodo nastale. Reakcijska temperatura, trajanje, pH in vsebnost vode vplivajo na kinetiko reakcije. Na aromo mesa v glavnem vplivajo žveplove spojine, ki nastanejo iz cisteina in riboze. Za aromo živil so prav tako pomembni tudi aldehidi, ki nastanejo med Streckerjevo razgradnjo in produkti, ki nastanejo iz njih (Boekel, 2006).

Manj je znano o produktih Maillardove reakcije, ki vplivajo na okus. Nekateri derivati pirola lahko vplivajo na grenak okus pražene kave in slada (Ames, 2003).

Spojine, ki se tvorijo na začetku Maillardove reakcije so brez barve in absorbirajo žarke v UV spektru. Med nadaljevanjem reakcije nastajajo tudi kromofori, ki absorbirajo v vidnem delu spektra. Nastanejo rumena, oranžna in rjava barva. Maillardova reakcija je odgovorna za zaželeno rumeno in rjavo barvo živil, kot so skorja kruha, krompirjev čips, pokovka in piškoti. Maillardova reakcija lahko vodi do diskoloracij segrelih sadnih sokov in mleka v prahu (Ames, 2003).

Barvne produkte Maillardove reakcije lahko razdelimo na 2 skupini, nizko molekularne in visoko molekularne spojine. Nizko molekularne spojine imajo do pet povezanih obročev. Med visoko molekularne spojine prištevamo melanoidine (Ames, 2003).

2.3.3 Vpliv Maillardove reakcije na prehransko vrednost

Maillardova reakcija ima neposreden in posreden vpliv na prehransko vrednost. Neposredno vpliva s kemijsko modifikacijo esencialnih hranil, s čimer jih naredi nedostopne, posredno pa prisotnost produktov reakcije moti metabolizem ostalih hranil (Finot, 2003).

Maillardova reakcija lahko s tvorbo Amadorijevih produktov vpliva na zmanjšanje dostopnosti esencialnih aminokislin. V večini živil je navečja razgradnja lizina. Askorbinska kislina in vitamini s prosto amino skupino (npr. tiamin) lahko sodelujejo v Maillardovi reakciji, kar vpliva na zmanjšano aktivnost vitaminov (Ames, 2003). Posredni vpliv Maillardove reakcije na prehransko vrednost se kaže v zmanjšanju prebavljivosti beljakovin. Peptidaze in proteaze namreč ne morejo hidrolizirati peptidne vezi, ki vključuje modificirane aminokislino (Finot, 2003). Različni produkti Maillardove reakcije lahko vežejo prehransko pomembne kovine, kot so baker, cink in železo ter zmanjšajo njihovo dostopnost (Ames, 2003).

2.3.4 Antioksidativna aktivnost

Melanoidini in ostali produkti Maillardove reakcije imajo antioksidativne lastnosti, saj lahko lovijo proste radikale ali kelirajo kovine. Najvišjo antioksidativno aktivnost imajo produkti, ki nastanejo iz histidina. Produkti Maillardove reakcije, ki imajo v svoji strukturi amino reduktone, imajo antioksidativno in prooksidativno aktivnost, ki je odvisna od pogojev reakcije (Yilmaz in Toledo, 2005).

Maillardova reakcija lahko vpliva na oksidativno stabilnost živil, saj lahko nekateri produkti zavirajo oksidacijo lipidov. Antioksidativno aktivnost lahko izboljšamo s povečanjem vrednosti pH, saj s tem vplivamo na povečan nastanek melanoidinov in prav tako v produkte Maillardove reakcije vključimo dušik (Ames, 2003).

2.4 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI (HCA)

Heterociklični aromatski amini so spojine, ki nastanejo med toplotno obdelavo mesa in rib (Vitaglione in Fogliano, 2004). Nastajajo v majhnih količinah (ng/g) pri toplotni obdelavi mišične hrane nad 150 °C (Knize in sod., 1997). HCA so mutagene in kancerogene spojine (Murkovic, 2004). Številne epidemiološke raziskave kažejo, da pogosto uživanje mesa, ki vsebuje HCA, povečuje tveganje za nastanek raka na debelem črevesju, prostati in dojkah. HCA in njihovi metaboliti so prisotni tudi v človeških tkivih, kar kaže, da HCA povzročajo genetske poškodbe že pri tako nizkih koncentracijah, kot so v toplotno obdelanem mesu (Turesky, 2007). HCA se tvorijo med Maillardovo reakcijo med kreatinom/kreatininom, prostimi aminokislinami in monosaharidi (Skog in sod., 1998; Balogh in sod., 2000).

Do zdaj so iz hrane izolirali in identificirali več kot 25 vrst HCA (Hasnol in sod., 2014). Preglednica 5 prikazuje nekatere HCA, ki jih lahko najdemo v hrani in modelnih sistemih.

2.4.1 Vrste HCA in njihov nastanek

Glede na nastanek lahko HCA delimo v 2 skupini, in sicer na aminoimidazol-azarene (AIA) in amino-karbonile. Glede na kemijske lastnosti jih lahko delimo na polarne (AIA) in nepolarne (amino-karbonili) (Pais in Knize, 2000). AIA nastanejo med Maillardovo reakcijo, in sicer v kompleksnih reakcijah, ki vključujejo kreatin, proste aminokislino in ogljikove hidrate. (Quelhas in sod., 2010). Aminoimidazol-azareni ne morejo nastajati brez prisotnosti kreatina (Murkovic, 2004). V eni izmed stopenj Maillardove reakcije nastanejo pirazini in pirido[3,4-d]imidazoli, ki so vključeni v nastanek HCA (Murkovic, 2004). Domnevajo, da v začetni fazi nastanejo dihidropirazini (ali piridini) in aldehidi, ki so produkti Maillardove reakcije. V končni fazi poteče kondenzacija teh komponent s kreatinom (Kikugawa, 1999). AIA nastajajo pri običajnih temperaturah toplotne obdelave, med 100 in 225 °C (Pais in Knize, 2000).

HCA iz skupine aminoimidazol–azarenov so bistveno bolj mutageni kot ostale spojine. Problem predstavlja tudi dejstvo, da nastajajo pri običajnih pogojih kuhanja (Pais in Knize, 2000).

Amino-karbonili nastanejo s pirolizo proteinov ali aminokislin pri temperaturah nad 250 °C (Quelhas in sod., 2010). β karbonila harman in norharman veljata za izjemi, saj nastajata že pri običajnih temperaturah toplotne obdelave (Gibis in Weis, 2010). Amino-karbonili se verjetno tvorijo med reakcijami prostih radikalov, vendar še mehanizem ni povsem znan. Med pirolizo nastane veliko reaktivnih fragmentov, ki se tvorijo preko reakcij prostih radikalov. Ti fragmenti se verjetno kondenzirajo in tvorijo novo heterociklično strukturo (Skog in sod., 2000). Piroliza triptofana in glutaminske kisline vodi do nastanka Trp-P-1, Trp-P-2 in Glu-P-1 ter Glu-P-2. V modelnih sistemih, v katerih sta prisotna triptofan in glukoza, nastaneta harman in norharman (Bordas, 2004).

Pri vlažnih postopkih toplotne obdelave mesa nastajajo manjše količine HCA. Pri temperaturi nad 150 °C pa njihova količina strmo naraste. Temperature nad 150 °C dosežemo na površini mesa, kadar ga cvremo, pečemo, pečemo na žaru ali pražimo (Murkovic, 2004).

HCA imajo planarno zgradbo (slika 3). Sestavljeni so iz 3 aromatskih obročev, imajo amino skupino, vsaj en dušikov atom in do štiri metilne skupine kot funkcionalne skupine. Obstaja tudi nekaj izjem. Na primer PhIP in DMIP imata samo dva povezana aromatska obroča, harman in norharman nimata amino skupine, IFP ima v obroču kisikov atom (Skog, 2004). Nastanek HCA je odvisen od veliko dejavnikov: temperature in časa toplotne obdelave, koncentracije prekurzorjev, prisotnosti inhibitorjev in pospeševalcev, količine lipidov in vode ter vrednosti pH (Toribio in sod., 2000). Najpomembnejša fizikalna dejavnika sta temperatura in čas toplotne obdelave. Količina HCA narašča premo sorazmerno s temperaturo in časom toplotne obdelave (Ahn in Grün, 2005).

Preglednica 5: HCA, ki jih lahko najdemo v hrani in modelnih sistemih (Toribio in sod., 2000)

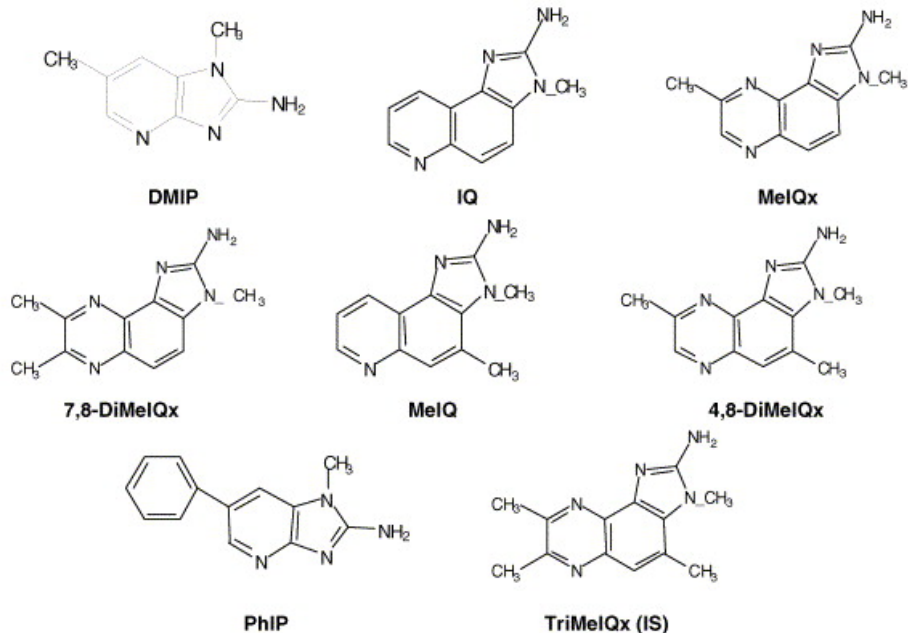
Ime	Okrajšava
Aminoimidazo azareni	
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin	IQ
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin	MeIQ
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin	IQx
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	4-MeIQx
2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	8-MeIQx

se nadaljuje

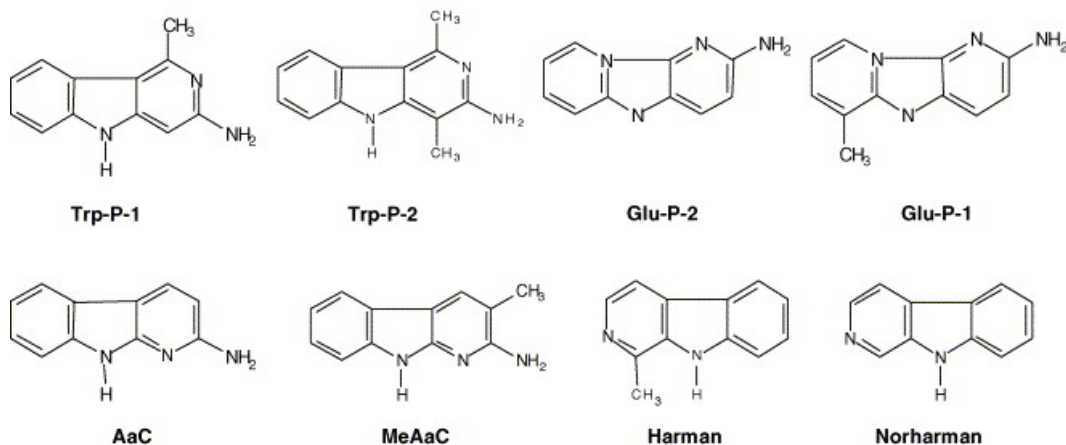
nadaljevanje preglednice 5: HCA, ki jih lahko najdemo v hrani in modelnih sistemih (Toribio in sod., 2000)

Ime	Okrajšava
2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin	4,8-DiMeIQx
2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin	7,8-DiMeIQx
2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin	TriMeIQx
2-amino-4-hidroksimetil-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinoksalin	4-CH ₂ OH-8-MeIQx
2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5- <i>g</i>]kinoksalin	7,9-DiMeIgQx
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	PhIP
2-amino-1,6-dimetil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	DMIP
2-amino-1-metil-6-(4-hidroksifenil)imidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	4'-OH-PhIP
2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2- <i>e</i>]imidazo [4,5- <i>b</i>]piridin	IFP
Amino-karbonili	
2-amino-9H-pirido[2,3- <i>b</i>]indol	AαC
2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3- <i>b</i>]indol	MeAαC
1-metil-9H-pirido[4,3- <i>b</i>]indol	H
9H-pirido[4,3- <i>b</i>]indol	NH
3-amino-1,4-dimetil-5H- pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-1
3-amino-1-metil-5H- pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-2
2-amino-6-metildipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-1
2-aminodipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-2
2-amino-5-fenilpiridin	Phe-P-1
4-amino-6-metil-1H-2,3,10,10b-tetraazafluoranten	Orn-P-1
4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1H,6H-pirololo[3,4- <i>f</i>]benzimidazole-5,7-dione	Cre-P-1
3,4-ciklopentenopirido[3,2- <i>a</i>]karbazol	Lys-P-1 (Liz-P-1)
9-metil-β-karbolin	Harman
9-(4'-amino-fenil)9-H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol oziroma β-karbolin	Norharman

Aminoimidazo azareni



Amino karbonili



Slika 3: Strukturne formule nekaterih HCA (Bermudo in sod., 2005)

2.4.2 Mutagenost in kancerogenost heterocikličnih aromatskih aminov

Kancerogenost HCA so dokazali na miših in podganah. Mednarodna agencija za raziskovanje raka je klasificirala IQ kot verjetno kancerogena za ljudi in MeIQ, MeIQx, PhIP in nepolarne HCA kot možne kancerogene (Murkovic, 2004). Nekateri HCA lahko v živalskih modelih povzročijo nastanek tumorjev na debelem črevesju, prostati in dojkah. Epidemiološke študije kažejo, da obstaja pozitivna koleracija med uživanjem dobro pečenega rdečega mesa (well done) in tveganjem za razvoj določenih vrst raka (Wong in sod., 2012).

HCA so potencialno mutageni po metabolni aktivaciji. Harman in norharman nista mutagena, vendar povečata mutagenost ostalih HCA (Toribio in sod., 2000). Metaboliti HCA se lahko kovalentno vežejo na DNA, RNA in proteine. Takšne adukte so našli v skoraj vseh vrstah tkiv pri miših, podganah in primatih. Tudi, če samo majhen del HCA tvori adukte, je to lahko dovolj za indukcijo tumorjev in ostalih toksičnih učinkov (Skog, 2004).

Aktivacija HCA poteče v 2 korakih. V prvem koraku poteče N-hidroksilacija eksociklične amino skupine z encimom citokrom P450. Pozneje poteče esterifikacija N-hidroksilamina. Visoko reaktivni derivati estrov tvorijo DNA adukte. HCA-DNA adukti povzročajo mutacije, ki lahko privedejo do karcinogeneze. Metabolna aktivacija HCA ima ključno vlogo pri razvoju karcinogeneze (Snyderwine in sod., 1997).

2.4.3 Izpostavljenost in dnevni vnos heterocikličnih aromatskih aminov

Izpostavljenost HCA lahko ocenimo s prehransko oceno in kombinacijo analitičnih podatkov o vsebnosti HCA v različnih živilih. Količino zaužitih HCA lahko ovrednotimo tudi z biološkimi markerji ali s kombinacijo prehranske ocene z biološkimi markerji, na primer z določanjem metabolitov v urinu po zaužitem obroku. Pri podatkih iz literature se lahko pojavi težava, saj so bili nekateri poskusi izvedeni pod nedoločenimi pogoji ali pri zelo visokih temperaturah in daljšem času toplotne obdelave. Težavno je tudi posploševanje med različnimi populacijami, saj se načini toplotne obdelave in prehranske navade med populacijami razlikujejo. Na primer, na Švedskem običajno ostanke iz ponve, kjer je ponavadi več HCA v primerjavi z mesom, uporabijo za pripravo omake. Če zaužijemo samo meso, brez ostankov iz ponve, lahko zaužijemo za polovico manj HCA. V epidemioloških študijah je bilo dokazano, da je uživanje takšnih omak povezano s povečanim tveganjem za razvoj raka na debelem črevesju, danki in mehurju (Skog, 2002).

Za oceno izpostavljenosti HCA je potrebno hrano pripraviti na način, ki se običajno uporablja v gospodinjstvu in restavracijah. Povezava med stopnjo pečenosti in porjavenjem na površini se lahko razlikuje, ker živilo cvremo krajši čas pri višji temperaturi oziroma daljši čas pri nižji temperaturi. Zelo močno porjavenje površine je povezano s povečanim tveganjem za razvoj raka na debelem črevesu in danki. Različni pogoji priprave hrane lahko vodijo do enake stopnje porjavenja površine, medtem ko se količina HCA lahko razlikuje (Skog, 2002).

Vnos HCA je odvisen od vrste živila in načina priprave ter od velikosti porcije in pogostosti uživanja. Izračunani dnevni vnosi HCA so na Švedskem od 0-7 μg , Novi Zelandiji 1 μg ter ZDA med 0,3 in 0,5 μg (Skog, 2002).

Največ HCA je na površini mesa, manjše količine pa so lahko prisotne tudi v notranjosti ocvrtega mesa. V mesu je vsebnost HCA višja kot v ribah. Prav tako je vsebnost HCA višja v živilih iz ene vrste mesa, v primerjavi z živilih iz več vrst mesa. Komercialno pripravljena živila običajno vsebujejo zelo nizke količine HCA, lahko tudi pod mejo detekcije (Skog in sod., 1998).

Preglednica 6: Vsebnost HCA (vsota IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQ in PhIP) v nekaterih živilih (Skog, 2002)

Vrsta živila	HCA (ng/g)		
	Meso	Ostaneq v ponvi	Vsota
Slanina	26	1	27
Goveje pleskavice	7	10	17
Puranji zrezek	5	7	12
Piščanec	11	1	12
Mesne kroglice	9	2	11

2.4.4 Ukrepi za zmanjševanje nastanka heterocikličnih aromatskih aminov

Z nekaterimi ukrepi lahko zmanjšamo nastanek HCA. Med njih uvrščamo:

- zavijanje mesa v aluminijasto folijo, s čimer preprečimo direkten kontakt s plamenom/ognjem (Oguri in sod., 1998),
- predhodno segrevanje mesa v mikrovalovni pečici z namenom odstranitve kreatina/kreatinina (izguba prekursorjev z izcejo) (Oguri in sod., 1998),
- odstranjevanje zapečenih delov mesa (Oguri in sod., 1998),
- dodatek antioksidantov (Oguri in sod., 1998),
- dodatek snovi, ki vežejo vodo, npr. soli, sojinih beljakovin in škroba, ki preprečijo migracijo vodotopnih prekursorjev proti površini mesa (Skog in sod., 1998),
- meso ali mesne izdelke pred toplotno obdelavo paniramo ali mariniramo (Skog in sod., 1998).

Fenolne spojine lahko z lovljenjem prostih radikalov zmanjšajo nastajanje HCA v modelnih sistemih in mesnih produktih (Gibis in Weiss, 2010). Antioksidanti lahko teoretično zmanjšajo nastanek HCA, saj lahko lovijo proste radikale, ki vodijo v nastanek HCA. Dokazano je, da dodatek posameznih ali mešanice antioksidantov inhibira mutagenozo ali karcinogenozo inducirano s HCA. Ta učinek je verjetno končni rezultat različnih akcij v več korakih, ki vplivajo na razvoj in aktivacijo HCA. Antioksidanti delujejo kot inhibitorji, ki preprečujejo nastanek mutagenov z lovljenjem prostih radikalov, kot zaviralci, ki z inhibicijo metabolne aktivacije preprečujejo biotransformacijo mutagenov v reaktivne metabolite, s stimulacijo detoksifikacijskih encimov, lovljenjem reaktivnih molekul, kot agensi, ki preprečujejo znotrajcelične procese, ki so vključeni v popravljalne mehanizme DNA, promocijo in progresijo tumorja (Vitaglione in Fogliano, 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL IN POTEK DELA

V okviru eksperimentalnega dela naloge smo določili osnovno kemijsko sestavo presnega govejega mesa, določili vsebnost ksantohumola v etanolnih ekstraktih hmelja ter vsebnost posameznih heterocikličnih aminov v govejih sekljancih, izdelanih iz govejega mesa in kuhinjske soli, na katero smo predhodno vezali etanolni ekstrakt hmelja.

Ekstrakte hmelja smo pripravili iz 4 različnih sort hmelja (Aurora, Bobek, Celeia in Savinjski golding), dveh letnikov, 2009 in 2013. Ves hmelj je bil pridelan v Hmeljarstvu Čas/Lupoin d.d.

Ekstrakte hmelja smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali 10 g predhodno zmletih suhih hmeljnih storžkov (IKA®, A11 basic) in dodali 200 ml 70 % etanola (Kefo, 1000800). Sledilo je mešanje na magnetnem mešalu. Vsebino čaše smo prelili v 50 ml centrifugirke (Sarstedt, 62.548.004) in 5 minut centrifugirali (Eppendorf, centrifuge 5810). Supernatant smo dvakrat filtrirali, najprej skozi naguban filter papir (Satorius, filter papir, 388) in kasneje skozi filter papir (Satorius, filter papir, 391) v 200 ml merilno bučko. Vsebino merilne bučke smo do oznake dopolnili z etanolom (Kefo, 1000800). Ekstrakte smo shranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Za vezavo ekstraktov hmeljev letnika 2009 na sol smo v 100 ml okroglo bučko odpipetirali 10 ml ekstrakta hmelja v 70 % etanolu, dodali 10 g NaCl (Droga, fino mleta morska sol) in 50 ml 70 % etanola (Kefo, 1000800). Vsebino bučke smo na rotavaporju (Buchi, rotavapor R-215) odparevali do suhega in sušili v sušilniku pri 105 °C. Sol z vezanim ekstraktom smo zdrobili v terilniku in prenesli v plastične posodice s pokrovom.

Za vezavo ekstraktov hmeljev letnika 2013 na sol smo uporabili drugačen postopek. V plastično posodico smo zatehtali 10 g NaCl (Droga, fino mleta morska sol) in ji dodali 10 ml etanolnega ekstrakta s hmeljem, dobro premešali ter čez noč sušili v sušilniku pri 60 °C. Po sušenju smo sol zdrobili v terilniku in jo shranili v plastične posode.

Za pripravo pleskavic smo uporabili stegno mlade govedi, ki smo ga zmleli v mesoreznici z luknjačo premera 8 mm. Zatehtali smo 80 g mletega mesa in mu dodali dve količini ekstraktov hmelja vezanih na sol, in sicer 0,5 g ekstrakta hmelja vezanega na sol (+ 0,5 g NaCl) ter 1,0 g ekstrakta vezanega na sol. Kontrolnemu sekljancu smo dodali 1,0 g NaCl. Maso smo premešali v mešalniku in v petrijevkah oblikovali sekljance, ki smo jih 4 min pekli na dvoploščnem žaru s teflonsko prevleko (Silex, Nemčija) pri 240 °C. Sekljance smo stehali, zapakirali v polietilenske vrečke, jih zamrznili in nato zmleli v mlinčku (IKA, A11 basic) do homogene strukture in jih takoj uporabili za analizo. Preostanek sekljancev smo vakuumsko zapakirali in zamrznili pri -35 °C.

3.2 METODE

3.2.1 Osnovna kemijska sestava presnega mesa

Osnovno kemijsko analizo vzorca smo določili s fizikalno-kemijskimi in instrumentalnimi analizami.

Goveje meso smo homogenizirali v mlinčku (Retsch, GRINDOMIX GM 2000) in mu določili osnovno kemijsko sestavo. Preostanek mesa smo zapakirali v polietilenske vrečke in zamrznili. Vse parametre smo določali v 6 paralelkah.

3.2.1.1 Fizikalno-kemijske analize določanja osnovne kemijske sestave mesa

Vsebnost vode v presnem govejem mesu smo določili s sušenjem po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 950.46 (1997), vsebnost beljakovin (skupni dušik $\times 6,25$) po uradnem postopku opisanem v AOAC Official Method 928.08 (1997), vsebnost maščobe po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 991.36 (1997) in vsebnost skupnih mineralnih snovi po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 920.153 (1997)

3.2.1.2 Instrumentalna metoda določanja osnovne kemijske sestave mesa

Osnovno kemijsko sestavo mesa smo analizirali tudi z metodo NIR. To je hitra metoda določanja, ki temelji na uporabi bližnje infrardeče svetlobe.

Homogeniziran vzorec smo prenesli na posebne okrogle pladnje (FOSS, 60000304). Vsebnost vode, beljakovin in maščob smo določili z aparatom Food Scan™ Meat Analyser (FOSS), ki se uporablja za analizo mesa in mesnih izdelkov.

3.2.2 Določanje vsebnosti ksantohumola v ekstraktih hmelja

Ksantohumol smo ekstrahirali z ekstrakcijo s trdno fazo in ga določili s HPLC. Kromatograme smo obdelali z računalniškim programom Mass Lynx™ V4,1 (Micromass, 2006).

Za ekstrakcijo ksantohumola smo uporabili kolono Strata-X 500 mg (8B-S100-HBJ, Phenomenex), ki smo jo predhodno kondicionirali z 8 ml metanola (Merck, 1.06007) in uravnotežili z 8 ml destilirane vode. Nanesli smo vzorec, pripravljen iz 1 ml etanolnega ekstrakta hmelja in 5 ml destilirane vode, končna vsebnost etanola v ekstraktu je znašala 12 %. Kolono smo sprali z 8 ml destilirane vode. Sledilo je 5 minutno sušenje in eluiranje fenolnih snovi z 8 ml mešanice metanol (Merck, 1.06007): acetonitril (Fluka, 34967) (1:1). Epruvete z vzorci smo shranili v hladilniku pri 4 °C in jih pred analizo na HPLC prelili v 2 ml vial.

3.2.2.1 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

HPLC: Agilent Technology 1100

Vakuumski razplinjevalnik: G1379A

Binarna črpalka: G1312A
Avtomatski vzorčevalnik: G1330B
Termostat kolone: G1316A
DAD: G1315B

Pogoji

Način kromatografije: RP
Kromatografska kolona: Kinetex C18 2,6 μm \times 2,1 \times 100 mm; Phenomenex
Mobilka A: 0,1 % HCOOH v vodi
Mobilka B: AcN
Volumen injiciranja: 10 μl
Temperatura vzorcev: 8 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura kolone: 30 $^{\circ}\text{C}$

Preglednica 7: Gradient tekočinske kromatografije

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

Masni detektor: Micromass Quattro Micro; Waters

Način: ESI+
Kapilara (kV): 3,50
Cona (V): 22,00
Eksreaktor(V): 2,00
Leča (V): 0,5
Temperatura Cone ($^{\circ}\text{C}$): 100
Temp. razpršilnega N_2 ($^{\circ}\text{C}$): 350
Pretok N_2 Cone (l/h): 50
Pretok razpršilnega N_2 (l/h): 400
Način detekcije: SIR (Selected Ion Recording)

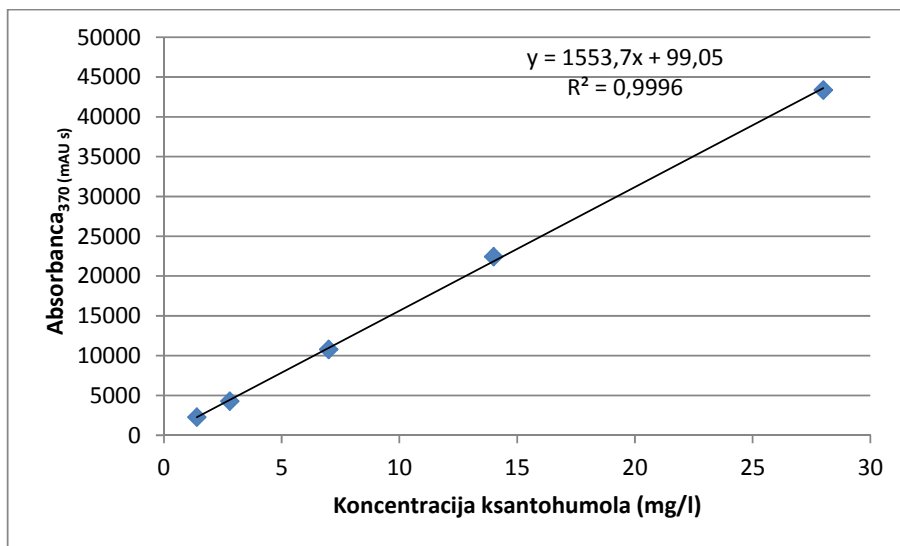
Preglednica 8: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR (Selected Ion Recording) načinu

Spojina	m/z (UV)
Ksantohumol	355,146

Kontrola DAD 240-600 nm

3.2.2.2 Umeritvena krivulja

Za pripravo umeritvene krivulje (slika 4) smo raztopino ksantohumola z začetno koncentracijo 140 mg/l razredčili, tako da so koncentracije znašale 1,4; 2,8; 7,0; 14 in 28 mg/l. S tako pripravljenimi raztopinami smo postopali enako kot z vzorci.



Slika 4: Umeritvena krivulja za določanje ksantohumola v ekstraktih hmelja

3.2.3 Določanje vsebnosti HCA v pečenih govejih sekljancih

HCA smo ekstrahirali z ekstrakcijo s trdno fazo in jih določili s HPLC-MS v kombinaciji z masnim spektrometrom. Kromatograme smo obdelali z računalniškim programom Mass Lynx™ V4,1 (Micromass, 2006).

3.2.3.1 Priprava vzorca

Za določanje vsebnosti HCA smo uporabili modificirano metodo, kot jo opisujejo Santos in sod. (2004). V 100 ml čašo smo odtehtali približno 3 g homogeniziranega vzorca in dodali 12 ml 1 M raztopine NaOH (Merck, 1.06498) ter 100 µl internega standarda (0,632 µg/g) TriMelQx (TRC, A630000) v metanolu. Čaše smo pokrili s parafilmom in jih čez noč homogenizirali na magnetnem mešalu. V homogenat smo dodali 12 g diatomejske zemlje EXTrelut®NT (Merck, 1.15092) in dobro premešali s stekleno palčko. Stekleno kolono smo napolnili s 70 ml etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252), naložili vzorec in počasi ekstrahirali. Eluat smo očistili z metodo ekstrakcije s trdno fazo. Uporabili smo kolono Oasis MCX 3cc 60 mg (Waters, 186000253), ki smo jo kondicionirali z 2 ml metanola (Merck, 1.06007) in uravnovežili z 2 ml etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252). Nanesli smo ves eluat in ga najprej sprali z 2 ml 0,1 M raztopine HCl (Merck, 1.09060) in nato še z 2 ml metanola

(Merck, 1.06007). Kolono smo posušili v toku zraka. Sledilo je eluiranje polarnih in nepolarnih heterocikličnih aromatskih aminov z 2 ml mešanice metanol (Merck, 1.06007): 25 % amonijak (Merck, 1.05432) v razmerju 19:1 (v/v). Vzorec smo do suhega evaporirali v vakuumski črpalki (Genevac, HT-4X Evaporator) in ga raztopili v 250 mg metanola (Merck, 1.09060). Določevanje HCA je potekalo na LC-MS.

3.2.3.2 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

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

Pogoji

Način kromatografije:	RP (reverzna faza)
Kromatografska kolona:	Kinetex C18 2,6 μm \times 2,1 \times 100 mm; Phenomenex
Mobilna faza A:	30 ml amonijev formiat (HCOONH_4 ; Fluka, 09739; pH 3,2)
Mobilna faza B:	acetonitril (Merck, 1.00030)
Volumen injiciranja:	1 μl
Temperatura vzorcev:	8 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura kolone:	30 $^{\circ}\text{C}$

Preglednica 9: Kromatografski pogoji (gradienti mobilne faze) pri določanju HCA

Čas (min)	mobilna faza A (%)	mobilna faza B (%)	pretok (ml/min)
0,00	95	5	0,350
14,00	40	60	0,350
14,50	0	100	0,350
17,00	0	100	0,350
20,00	95	5	0,350
26,00	95	5	0,350

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

Masni detektor: Micromass Quattro Micro; Waters

Način:	ESI (Electrospray Ionization)
Kapilara (kV):	3,50
Eksreaktor (V):	2,00
Temperatura vhodne leče ($^{\circ}\text{C}$):	120
Temperatura razpršilnega N_2 ($^{\circ}\text{C}$):	350
Pretok N_2 vhodne leče (l/h):	50
Pretok razpršilnega N_2 (l/h):	350

Način detekcije: SIR (Selected Ion Recording)

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

Preglednica 10: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR načinu

HCA	m/z (ESI+)	Cona (V)
IQ	199,20	40
IQx	200,20	40
MeIQx	214,20	40
Glu-P-2	185,20	40
harman	183,28	40
norharman	169,26	40
PhIP	225,20	40
TriMeIQx	242,26	40

3.2.3.3 Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom in internim standardom

Za pripravo umeritvene krivulje smo pripravili mešanice standardov HCA (norharman, harman, Glu-P-2, IQ, IOx, MeIQ, MeIQx in PhIP) v različnih koncentracijah (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 µg/g), le da jih nismo podvrgli čiščenju. Tako smo lahko izračunali izkoristek postopka čiščenja za posamezne HCA (Polak, 2003).

3.2.3.4 Statistična obdelava podatkov

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 govejih sekljancih je bil zastavljen kot faktorski poskus $4 \times 4 \times 2$ (4 vrste hmelja (Aurora, Bobek, Celea in Savinjski golding), 4 skupin glede koncentracije dodanega ksantohumola (t.j. 0,1-0,5 mg/kg, 0,5-1,0 mg/kg, 1,0-1,5 mg/kg in 1,5-2,0 mg/kg) in 2 ponovitvi). Interakcija vrsta hmelja \times koncentracija dodanega ksantohumola je bila statistično značilna ($p < 0,05$) in zato vključena v model. Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane s testom LSM in primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

4.1 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA PRESNEGA MESA

Osnovno kemijsko sestavo presnega mladega govejega stegna smo določili s fizikalno-kemijsko analizo in z instrumentalno metodo, ki temelji na uporabi NIR.

4.1.1 Fizikalno-kemijske analize določanja osnovne kemijske sestave mesa

Rezultati analiz osnovne kemijske sestave so prikazani v preglednici 11. Mlado goveje stegno v povprečju vsebuje 76,95 % vode, 22,47 % beljakovin, 0,83 % maščob in 1,09 % skupnih mineralnih snovi.

Preglednica 11: Rezultati osnovne kemijske analize presnega govejega mesa z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

Parameter (g/100 g)	n	\bar{x}	min	max	so	KV (%)
Voda	6	76,95	76,95	77,20	0,13	0,17
Beljakovine	6	22,47	21,09	24,63	1,27	5,64
Maščobe	6	0,83	0,75	0,92	0,07	7,86
Skupne mineralne snovi	6	1,09	1,05	1,10	0,02	1,75

n-število vzorcev, \bar{x} -povprečna vrednost, min-najmanjša vrednost, max-največja vrednost, so-standardni odklon, KV-koeficient variabilnosti

4.1.2 Instrumentalna metoda določanja osnovne kemijske sestave presnega mesa

V preglednici 12 so podani rezultati osnovne kemijske sestave pleskavic, ki smo jih določili z instrumentalno metodo določanja, ki temelji na uporabi bližnje infrardeče svetlobe (NIR). Presno goveje meso vsebuje 77,10 % vode, 21,40 % beljakovin in 1,4 % maščob. V primerjavi s fizikalno-kemijskimi analizami se odstopanje kaže v vsebnosti maščob in beljakovin.

Preglednica 12: Rezultati osnovne kemijske analize presnega govejega mesa z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

Parameter (g/100 g)	N	\bar{x}	min	max	so	KV (%)
Voda	6	77,10	76,79	77,51	0,24	0,31
Beljakovine	6	21,40	21,31	21,49	0,06	0,28
Maščobe	6	1,46	1,42	1,55	0,04	2,99

n-število vzorcev, \bar{x} -povprečna vrednost, min-najmanjša vrednost, max-največja vrednost, so-standardni odklon, KV-koeficient variabilnosti

4.2 DOLOČANJE KSANTOHUMOLA V EKSTRAKTIH HMELJA

V preglednici 13 so zbrani rezultati vsebnosti ksantohumola v ekstraktih hmelja. Sorte hmelja letnika 2009 vsebujejo manjšo količino ksantohumola. Med sortami letnika 2009 največ ksantohumola vsebuje Bobek (61,4 mg/l), sledita mu Aurora (53,1 mg/l) in Celeia (27,0 mg/l). Letnik 2013 vsebuje bistveno več ksantohumola. Med njimi izstopata Aurora

(156,3 mg/l) in Bobek (125,9 mg/l). Sledita Savinjski golding (69,7 mg/l) in Celeia (64,5 mg/l).

Preglednica 14 prikazuje vsebnost ksantohumola v posušeni storžkih hmelja letnikov 2009 in 2013.

Preglednica 13: Vsebnost ksantohumola (mg/l) v ekstraktih hmelja letnikov 2009 in 2013

Letnik	2009			2013				
	Sorta	Aurora	Bobek	Celeia	Aurora	Bobek	Celeia	Savinjski golding
Ksantohumul (mg/l)		53,06	61,40	26,96	156,30	125,94	64,52	69,74

Preglednica 14: Vsebnost ksantohumola (mg/g) v hmelju letnikov 2009 in 2013

Sorta	Letnik	Ksantohumul (mg/g)
Aurora	2009	1,05
	2013	3,12
Bobek	2009	1,22
	2013	2,52
Celeia	2009	0,54
	2013	1,29
Savinjski golding	2013	1,39

4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI HCA V PEČENIH GOVEJH SEKLJANCIH

Preglednica 15: Rezultati določanja HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v govejih sekljancih z dodanimi ekstrakti hmelja vezanih na sol z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri ($n = 107$)

Parameter ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Vrednost			Standardni odklon	Koeficient variabilnosti (%)
	povprečna	najmanjša	največja		
Norharman	8,48	0,29	28,96	5,42	64
Harman	13,62	0,78	27,97	9,19	78
Glu-P-2	22,35	0,00	78,93	26,64	119
IQ	0,90	0,00	5,09	1,65	183
IQx	3,59	0,00	51,29	8,32	232
MeIQx	19,36	2,05	52,74	9,21	48
PhIP	14,26	0,51	28,53	11,00	77
vsota skupnih* HCA	82,55	9,73	180,11	49,19	60

n - število obravnavanj v poskusu, skupnih* - norharman, harman, Glu-P-2, IQ, IQx, MeIQx in PhIP.

Rezultati določanja vsebnosti HCA v govejih sekljancih z dodatkom ekstraktov hmelja vezanih na sol so prikazani v preglednici 15. Iz rezultatov je razvidno, da so vzorci glede vsebnosti skupnih HCA dokaj nehomogeni. Vsebnost posameznih HCA v poskusu precej variira zaradi različne količine dodanega ekstrakta hmelja vezanega na sol. V našem poskusu so količine HCA v območju med 0,00 (Glu-P-2, IQ in IOx) in 78,93 (Glu-P-2) $\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca. Toplotno obdelani goveji sekljanci vsebujejo v povprečju največ Glu-P-2 (22,35 $\mu\text{g}/\text{kg}$), MeIQx (19,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in PhIP (14,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Sledijo Harman (13,62 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Norharman (8,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in IQx (3,59 $\mu\text{g}/\text{kg}$). V najmanjši količini je prisoten IQ (0,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Goveji sekljanci vsebujejo v povprečju 82,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ HCA.

V preglednici 16 so prikazane vrednosti posameznih in skupnih HCA, ki so se tvorili med pečenjem govejih sekljancev na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240 °C. Sekljancem smo dodali sol, na katero smo vezali ekstrakte hmelja različnih sort in letnikov. Prikazane so tudi vrednosti HCA v kontrolni skupini, kjer smo sekljancem dodali 1,0 g kuhinske soli (NaCl)(NaCl). Tako smo ovrednotili količino 7 različnih HCA, in sicer norharmana, harmana, Glu-P-2, IQ, IOx, MeIQx in PhIP. Vsota skupnih HCA predstavlja seštevek vseh naštetih HCA.

Koncentracijo ksantohumola v ekstraktih hmelja, ki smo ga kasneje vezali na sol, smo zaradi lažje obdelave rezultatov razdelili v štiri skupine, in sicer 0,1-0,5; 0,5-1,0; 1,0-1,5 in 1,5-2,0 mg/kg sekljanca. Kot lahko vidimo v tabeli, niso vse sorte hmelja zastopane v vseh skupinah, saj nekatere sorte hmelja vsebujejo nižjo vsebnost ksantohumola. Tako je v vseh skupinah koncentracije zastopana samo sorta Aurora.

Vsebnosti ksantohumola v soli z vezanimi ekstrakti hmelja nismo določali, saj bi prisotnost soli (NaCl) motila analizo.

Preglednica 16: Vpliv dodanega ekstrakta hmelja različnih sort na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 107$, LSM test, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Konc XN (mg/kg sekljanca)	Sorta hmelja				P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	Savinjski golding	
Norharman	kontrola	8,07±0,99aAB	8,07±0,99aB	8,07±0,99aA	8,07±1,16aA	1,0000
	0,1-0,5	8,23±2,74abAB	9,29±2,96aB	6,04±2,10bcB	4,46±0,89cB	0,0015
	0,5-1,0	10,11±3,25bA	18,43±9,78aA	2,37±2,16cC	1,23±0,15cC	0,0008
	1,0-1,5	6,03±1,05B				
	1,5-2,0	7,41±0,29aAB	2,71±2,16bB			0,0200
	P_K	0,2123	0,0005	0,0002	0,0002	
Harman	kontrola	24,51±3,82aA	24,51±3,82aA	24,51±3,82aA	24,51±4,49aA	1,0000
	0,1-0,5	9,50±2,99aB	7,63±2,78abC	5,60±1,51bB	8,05±1,91abB	0,0019
	0,5-1,0	9,16±2,40abB	12,00±4,35aB	5,32±7,44bcB	1,11±0,15cC	0,0052
	1,0-1,5	4,42±0,60C				
	1,5-2,0	4,75±0,48aC	1,86±1,38bD			0,0264
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 17: Vpliv dodanega ekstrakta hmelja različnih sort na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 107$, LSM test, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Konc XN (mg/kg sekljanca)	Sorta hmelja				P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	Savinjski golding	
Glu-P-2	kontrola	51,05±23,98aA	51,05±23,98aA	51,05±23,98aA	51,05±28,12a A	1,0000
	0,1-0,5	<0,001bB	<0,001bB	5,81±7,86bB	19,51±2,27aA	0,0002
	0,5-1,0	2,32±2,51cB	3,28±2,99cB	16,10±6,17bB	24,29±6,40aA	<0,000 1
	1,0-1,5	0,72±0,63B				
	1,5-2,0	10,94±4,93aB	8,76±5,46aB			0,6346
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1185	
IQ	kontrola	1,70±2,50aA	1,70±2,20aA	1,70±2,50aA	1,70±2,94aA	1,0000
	0,1-0,5	0,55±0,35aA	0,54±0,32aA	0,42±0,66aA	1,22±1,11aA	0,3941
	0,5-1,0	0,19±0,25bA	0,18±0,27bA	0,13±0,11bA	1,69±1,53aA	0,0026
	1,0-1,5	0,68±0,42A				
	1,5-2,0	0,25±0,22aA	0,32±0,30aA			0,7805
	P_K	0,2958	0,1494	0,1147	0,9476	
IQx	kontrola	<0,001C	<0,001B	<0,001A	<0,001B	
	0,1-0,5	<0,001bC	<0,001bB	4,72±7,66abA	6,51±1,30aA	0,2013
	0,5-1,0	4,48±6,82abB	13,08±18,16aA	1,06±1,83bA	<0,001bB	0,0199
	1,0-1,5	10,42±2,92A				
	1,5-2,0	13,22±1,03aA	4,22±7,31aAB			0,1023
	P_K	<0,0001	0,0109	0,0200	<0,0001	
MeIQx	kontrola	25,67±4,40aA	25,67±4,40aA	25,67±4,40aA	25,67±5,17aA	1,0000
	0,1-0,5	15,73±6,19aB	15,42±4,81aAB	15,36±5,76aB	13,25±3,67aB	0,8634
	0,5-1,0	15,91±2,82abB	25,08±15,23aA	6,39±2,26bC	3,60±2,45bC	0,0315
	1,0-1,5	8,18±3,37C				
	1,5-2,0	20,74±1,49aAB	7,26±6,34bB			0,0231
	P_K	<0,0001	0,0695	<0,0001	0,0014	
PhIP	kontrola	27,46±1,41aA	27,46±1,41aA	27,46±1,41aA	27,46±1,65aA	1,0000
	0,1-0,5	5,26±2,23bBC	5,00±1,82bC	6,45±5,78bB	12,76±2,97aB	0,1006
	0,5-1,0	7,93±6,65bB	11,12±6,13aB	1,56±0,82cC	0,70±0,18cC	<0,000 1
	1,0-1,5	7,07±1,49B				
	1,5-2,0	2,70±0,17aC	1,55±1,10aC			0,1504
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 18: Vpliv dodanega ekstrakta hmelja različnih sort na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 107$, LSM test, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Konc XN (mg/kg sekljanca)	Sorta hmelja				P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	Savinjski golding	
Vsota skupnih HCA	kontrola	138,46 \pm 16,61aA	138,46 \pm 16,61aA	138,46 \pm 16,61aA	138,46 \pm 19,4 7aA	1,0000
	0,1-0,5	39,27 \pm 12,53bC	37,88 \pm 11,21bC	44,40 \pm 17,91bB	65,76 \pm 10,70 aB	0,0918
	0,5-1,0	50,10 \pm 19,96bBC	83,17 \pm 45,81aB	32,92 \pm 17,95bB	32,61 \pm 7,82b C	0,0014
	1,0-1,5	37,52 \pm 6,68C				
	1,5-2,0	60,02 \pm 6,59aB	26,67 \pm 17,74bC			0,0380
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	

n , število določanj znotraj skupine; P_H , statistična verjetnost vpliva sorte hmelja; P_K , statistična verjetnost vpliva koncentracije ksantohumola; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami hmelja); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi koncentracijami ksantohumola)

Vsebnost IQx v kontrolnem vzorcu je pod mejo detekcije. Vpliv ksantohumola na tvorbo IQx v sekljancih z dodanimi ekstrakti hmelja je različen. V nekaterih primerih na tvorbo HCA nima vpliva, denimo pri najmanjši koncentraciji ksantohumola sorte Aurora in Bobek, pri obeh koncentracijah ksantohumola sorte Celeia in pri koncentraciji 0,5-1,0 mg/kg Savinjskega goldinga. V ostalih koncentracijah se je vsebnost tega HCA statistično značilno povečala na do 13,08 (Bobek) in 13,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Aurora).

Dodatek ekstraktov hmelja na norharman deluje povsem različno, odvisno od koncentracije ksantohumola in sorte hmelja. Od štirih zastopanih koncentracij ksantohumola sorte Aurora, le koncentracija 1,0-1,5 mg/kg statistično značilno vpliva na zmanjšanje njegove vsebnosti. Dodatek ekstrakta hmelja sorte Bobek statistično značilno vsebnost norharnama bodisi poveča ali nanj nima vpliva. Povsem nasprotno delovanje opazimo pri sortah Celeia in Savinjski golding, kjer se z naraščajočo koncentracijo ksantohumola, vsebnost norharmana statistično značilno zmanjšuje. Koncentracija ksantohumola 0,1-0,5 mg/kg zmanjša vsebnost norharmana za 1,3- (Celea) in 1,8-krat (Savinjski golding), koncentracija 0,5-1,0 mg/kg pa kar za 3,4- (Celeia) in 6,6-krat (Savinjski golding).

Količina harmana se je ob dodatku ekstrakta hmelja vezanega na sol statistično značilno zmanjšala pri vseh koncentracijah ksantohumola in sortah hmelja. V govejih sekljancih, z dodatkom ekstraktov hmelja vezanih na sol, se je vsebnost norharmana zmanjšala za 51,0 % (12,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sorta Bobek) do 95,5 % (1,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sorta Savinjski golding).

Tvorba MeIQx je ob dodatku ekstrakta hmelja vezanega na sol zmanjšana pri vseh koncentracijah ksantohumola in sortah hmelja, z izjemo najmanjših koncentracij ksantohumola (0,1-0,5 mg/kg in 0,5-1,0 mg/kg) sorte Bobek.

Tvorba PhIP se je ob dodatku ekstraktov hmelja statistično značilno zmanjšala za 53,5 % (12,76 µg/kg, sorta Bobek) do 97,5 % (0,70 µg/kg, sorta Bobek).

Vsebnost prevladujočega HCA, Glu-P-2, se je statistično značilno zmanjšala pri vseh sortah in koncentracijah v enakem obsegu, razen pri sorti Savinjski golding, na katerega nima statistično značilnega vpliva. Delež zmanjšanja količine Glu-P-2 znaša od 52,4 (Celea) do 100 % (Aurora, Bobek).

Vsebnosti vseh HCA, ki jih je količinsko največ, se z dodatkom ekstraktov hmeljev, vezanih na sol zelo znižajo, kar pomembno vpliva na vsebnost skupnih HCA.

Največ skupnih HCA je nastalo v kontrolni skupini, kar je bilo pričakovano. Vsebnost skupnih HCA se je zmanjšala pri vseh koncentracijah ksantohumola in vseh sortah hmelja.

V preglednicah 17 in 18 so predstavljeni rezultati določanja HCA v govejih sekljancih, ločeni po letnikih hmelja (2009 in 2013), iz katerih smo pripravili ekstrakte in jih vezali na sol.

Preglednica 19: Vpliv dodanega ekstrakta različnih sort hmelja letnika 2009 na vsebnost HCA (µg/kg) v toplotno obdelanih govejih sekljancih (n = 71, LSM test, $\alpha = 0,05$)

HCA (µg/kg sekljanca)	Konc XN (mg/kg sekljanca)	Sorta hmelja			P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	
Norharman	kontrola	8,07±1,00aA	8,07±1,00aB	8,07±1,00aA	1,0000
	0,1-0,5	8,23±2,74abA	9,29±2,96aB	6,12±2,20bB	0,0075
	0,5-1,0	10,11±3,25bA	22,94±5,97aA		<0,0001
	P_K	0,2204	<0,0001	0,0213	
Harman	kontrola	24,51±3,88aA	24,51±3,88aA	24,51±3,88aA	1,0000
	0,1-0,5	9,50±2,99aB	7,63±2,78abC	5,53±1,66bB	0,0022
	0,5-1,0	9,16±2,40bB	14,00±2,83aB		0,0002
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Glu-P-2	kontrola	51,05±24,35aA	51,05±24,35aA	51,05±24,35aA	1,0000
	0,1-0,5	<0,001aB	<0,001aB	5,53±8,31aB	0,1116
	0,5-1,0	2,32±2,51aB	3,51±3,47aB		0,2356
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
IQ	kontrola	1,70±2,94aA	1,70±2,54aA	1,70±2,54aA	1,0000
	0,1-0,5	0,55±0,35aA	0,54±0,32aA	0,19±0,19bB	0,0017
	0,5-1,0	0,19±0,25aA	0,12±21,21aA		0,5138
	P_K	0,1719	0,1513	0,0511	
IQx	kontrola	<0,001aB	<0,001aB	<0,001aA	
	0,1-0,5	<0,001bB	<0,001bB	3,61±7,90aA	1,0000
	0,5-1,0	4,48±6,82bA	13,86±21,21aA		0,0297
	P_K	0,0253	0,0272	0,0368	
MeIQx	kontrola	25,67±4,47aA	25,67±4,47aAB	25,67±4,47aA	1,0000
	0,1-0,5	15,73±6,19aB	15,42±4,81aB	15,73±6,15aB	0,8814
	0,5-1,0	15,90±2,82bB	30,12±14,29aA		0,0131
	P_K	0,0004	0,0767	0,0005	
PhIP	kontrola	27,46±1,43aA	27,46±1,43aA	27,46±1,43aA	1,0000
	0,1-0,5	5,26±2,23aB	4,80±1,82aC	4,82±4,75aB	0,0072
	0,5-1,0	7,93±6,65bB	11,06±7,18aB		0,0011
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 20: Vpliv dodanega ekstrakta različnih sort hmelja letnika 2009 na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 71$, LSM test, $\alpha = 0,05$)

skupni HCA	kontrola	138,46 \pm 16,86aA	138,46 \pm 16,86aA	138,46 \pm 16,86aA	1,0000
	0,1-0,5	39,27 \pm 12,53aB	37,88 \pm 11,21aC	41,53 \pm 18,47aB	0,8707
	0,5-1,0	50,10 \pm 19,96bB	95,62 \pm 46,67aB		0,0004
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

n , število določanj znotraj skupine; P_H , statistična verjetnost vpliva sorte hmelja; P_K , statistična verjetnost vpliva koncentracije ksantohumola; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami hmelja); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi koncentracijami ksantohumola)

Dodatek soli z vezanim ekstraktom hmelja letnika 2009 ni vplival na nastanek IQ v govejih sekljancih. Zmanjšanje količine IQ opazimo le pri sorti Celeia (pri koncentraciji ksantohumola 0,1-0,5 mg/kg).

Vsebnost IQx se je v primerjavi s kontrolo povečala v sekljancih, ki smo jim dodali ekstrakt hmelja vezanega na sol v koncentraciji ksantohumola 0,5-1,0 mg/kg. Opazimo statistično značilen vpliv koncentracije in sorte hmelja. Nižja koncentracija ksantohumola (0,1-0,5 mg/kg) ne vpliva na tvorbo IQx.

Nastanek norharmana v govejih sekljancih z dodatkom soli z vezanim ekstraktom hmelja letnika 2009 je zelo odvisen od sorte. Pri sorti Aurora ne opazimo statistično značilnega zmanjšanja količine norharmana. Pri Bobku se pri koncentraciji ksantohumola med 0,5 do 1,0 mg/kg njegova vsebnost statistično značilno poveča (184 % v primerjavi s kontrolo), medtem ko manjša koncentracija ksantohumola ne vpliva na nastanek norharmana. Pri sorti hmelja Savinjski golding opazimo zmanjšanje vsebnosti norharmana v govejih sekljancih (pri koncentraciji 0,1-0,5 mg/kg).

Pri ostalih HCA se je z dodatkom ekstraktov hmelja vezanega na sol količina posameznega HCA zmanjšala.

Preglednica 21: Vpliv dodanega ekstrakta različnih sort hmelja letnika 2013 na vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 36$, LSM, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Konc (mg/kg sekljanca)	XN	Sorta hmelja				P_H
			Aurora	Bobek	Celeia	Savinjski golding	
Norharman	kontrola		8,07 \pm 1,16aA	8,07 \pm 1,16aA	8,07 \pm 1,16aA	8,07 \pm 1,16aA	1,0000
	0,1-0,5				5,67 \pm 1,88aAB	4,46 \pm 0,89aB	0,3714
	0,5-1,0			4,91 \pm 4,12aA	2,37 \pm 2,16aB	1,23 \pm 0,15aC	0,3014
	1,0-1,5		6,03 \pm 1,05B				
	1,5-2,0		7,41 \pm 0,29aAB	2,71 \pm 2,16bA			0,0200
	P_K		0,0839	0,1350	0,0220	0,0002	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 22: Vpliv dodanega ekstrakta različnih sort hmelja letnika 2013 na vsebnost HCA ($\mu\text{g/kg}$) v toplotno obdelanih govejih sekljancih ($n = 36$, LSM, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g/kg}$ sekljanca)	Konc XN (mg/kg sekljanca)	Sorta hmelja				P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	Savinjski golding	
Harman	kontrola	24,51±4,48aA	24,51±4,48aA	24,51±4,48aA	24,51±4,48aA	1,0000
	0,1-0,5			5,93±0,32aB	8,05±1,91aB	0,1310
	0,5-1,0		5,99±0,38aB	5,32±7,44aB	1,11±0,15aC	0,3817
	1,0-1,5	4,42±0,60B				
	1,5-2,0	4,75±0,48aB	1,86±1,38bB			0,0264
	P_K	<0,0001	<0,0001	0,0053	0,0001	
Glu-P-2	kontrola	51,05±28,12aA	51,05±28,12aA	51,05±28,12aA	51,05±28,12aA	1,0000
	0,1-0,5			7,14±6,43bB	19,51±2,27aA	0,0348
	0,5-1,0		2,58±0,37bB	16,10±6,17aB	24,39±6,40aA	0,0058
	1,0-1,5	0,72±0,63B				
	1,5-2,0	10,94±4,93aB	8,76±5,46aB			0,6346
	P_K	0,0214	0,0225	0,0429	0,1185	
IQ	kontrola	1,70±2,94aA	1,70±2,94aA	1,70±2,94aA	1,70±2,94aA	1,0000
	0,1-0,5			1,48±1,09aA	1,22±1,11aA	0,7854
	0,5-1,0		0,37±0,32aA	0,13±0,11aA	1,69±1,53aA	0,1554
	1,0-1,5	0,68±0,42A				
	1,5-2,0	0,25±0,22aA	0,32±0,30aA			0,7805
	P_K	0,5983	0,5683	0,5501	0,9476	
IQx	kontrola	<0,001aB	<0,001aB	<0,001aB	<0,001aB	
	0,1-0,5			9,87±4,00aA	6,51±1,30aA	0,2385
	0,5-1,0		10,75±1,55aA	1,06±1,83bB	<0,001bB	<0,0001
	1,0-1,5	10,42±2,92A				
	1,5-2,0	13,22±1,03aA	4,22±7,31aAB			0,1023
	P_K	0,0002	0,0584	0,0058	<0,0001	
MelQx	kontrola	25,67±5,17aA	25,67±5,17aA	25,67±5,17aA	25,67±5,17aA	1,0000
	0,1-0,5			13,64±3,77aB	13,25±3,67aB	0,9044
	0,5-1,0		9,93±1,03aB	6,39±2,26abB	3,60±2,45bC	0,0237
	1,0-1,5	8,18±3,37B				
	1,5-2,0	20,74±1,49aA	7,26±6,34bB			0,0231
	P_K	0,0028	0,0065	0,0027	0,0014	
PhIP	kontrola	27,46±1,65aA	27,46±1,65aA	27,46±1,65aA	27,46±1,65aA	1,0000
	0,1-0,5			14,05±3,98aB	12,76±2,97aB	0,6764
	0,5-1,0		11,28±0,73aB	1,56±0,82bC	0,70±0,18bC	<0,0001
	1,0-1,5	7,07±1,49B				
	1,5-2,0	2,70±0,17aC	1,55±1,10aC			0,1504
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
skupni HCA	kontrola	138,46±19,47aA	138,46±19,47aA	138,46±19,47aA	138,46±19,47aA	1,0000
	0,1-0,5			57,78±4,63aB	65,76±10,70aB	0,3014
	0,5-1,0		45,82±6,36aB	32,92±17,95aB	32,61±7,82aC	0,3627
	1,0-1,5	37,52±6,68B				
	1,5-2,0	60,02±6,59aB	26,67±17,74bB			0,0380
	P_K	<0,0001	0,0003	0,0004	0,0002	

n , število določanj znotraj skupine; P_H , statistična verjetnost vpliva sorte hmelja; P_K , statistična verjetnost vpliva koncentracije ksantohumola; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami hmelja); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi koncentracijami ksantohumola)

Pri sekljancih, ki smo jih pripravili z dodatkom soli z vezanimi ekstrakti hmelja letnika 2013 opazimo podobne značilnosti kot pri sekljancih, pri katerih smo na sol vezali ekstrakte hmelja letnika 2009.

Ekstrakt hmelja vezan na sol ni vplival na tvorbo IQ, saj se vrednost tega HCA med poskusom ni statistično značilno zmanjšala.

Dodatek ekstrakta hmelja vezanega na sol je vsebnost IQx bodisi povečal ali nanj ni imel statistično značilnega vpliva.

Za razliko od sekljancev z ekstrakti hmeljev letnika 2009 se pri ekstraktih hmelja letnika 2013 vsebnost norharmana ni povečala pri nobeni sorti hmelja. Izjema je sorta Bobek, kjer ne opazimo statistično značilnih razlik med kontrolo in vzorci sekljancev z dodanimi ekstrakti hmelja vezanega na sol.

V preglednicah 19 in 20 so zbrani podatki določanja HCA glede na količino soli z vezanimi ekstrakti hmelja, ki smo jo dodali sekljancem. Dodali smo 0,5 in 1,0 g soli, na katero smo predhodno vezali ekstrakte hmeljev sort Aurora, Bobek, Celeia in Savinjski golding, letnikov 2009 in 2013. Sorte Savinjski golding letnika 2009 nismo imeli.

Preglednica 23: Rezultati določanja HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v sekljancih glede na količino ekstrakta hmelja letnika 2009 vezanega na sol ($n = 71$, LSM test, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Ekstrakt hmelja vezan na sol (g)	Sorta hmelja			P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	
Norharman	kontrola	8,07 \pm 1,00aA	8,07 \pm 1,00aB	8,07 \pm 1,00aA	1,0000
	0,5	8,23 \pm 2,74aA	9,29 \pm 2,96aB	4,20 \pm 1,57bB	0,0174
	1,0	10,11 \pm 3,25bA	22,94 \pm 5,97aA	7,19 \pm 1,75bA	<0,0001
	P_K	0,2204	<0,0001	0,0017	
Harman	kontrola	24,51 \pm 3,88aA	24,51 \pm 3,88aA	24,51 \pm 3,88aA	1,0000
	0,5	9,50 \pm 2,99aB	7,63 \pm 2,78abC	4,51 \pm 1,02bB	0,0216
	1,0	9,16 \pm 2,40bB	14,00 \pm 2,83aB	6,10 \pm 1,71cB	<0,0001
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Glu-P-2	kontrola	51,05 \pm 24,35aA	51,05 \pm 24,35aA	51,05 \pm 24,35aA	1,0000
	0,5	<0,001bB	<0,001bB	10,26 \pm 13,27aB	0,0572
	1,0	2,32 \pm 2,51aB	3,51 \pm 3,47aB	2,90 \pm 1,61aB	0,4359
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
IQ	kontrola	1,70 \pm 2,54aA	1,70 \pm 2,54aA	1,70 \pm 2,54aA	1,0000
	0,5	0,55 \pm 0,35aA	0,54 \pm 0,32aA	<0,001bA	0,0113
	1,0	0,19 \pm 0,25aA	0,12 \pm 0,23aA	0,29 \pm 0,15aA	0,1747
	P_K	0,1719	0,1513	0,1520	
IQx	kontrola	<0,001aB	<0,001aB	<0,001aA	1,0000
	0,5	<0,001aB	<0,001aB	<0,001aA	
	1,0	4,48 \pm 6,82bA	13,86 \pm 21,21aA	5,62 \pm 9,42bA	0,0288
	P_K	0,0253	0,0272	0,0746	
MeIQx	kontrola	25,67 \pm 4,47aA	25,67 \pm 4,47aB	25,67 \pm 4,47aA	1,0000
	0,5	15,73 \pm 6,19aB	15,42 \pm 4,81aB	14,90 \pm 6,83aB	0,9687
	1,0	15,91 \pm 2,82bB	30,12 \pm 12,29aA	16,19 \pm 6,11bB	0,0053
	P_K	0,0004	0,0767	0,0021	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 24: Rezultati določanja HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v sekljancih glede na količino ekstrakta hmelja letnika 2009 vezanega na sol ($n = 71$, LSM test, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Ekstrakt hmelja vezan na sol (g)	Sorta hmelja			P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	
PhIP	kontrola	27,46±1,43aA	27,46±1,43aA	27,46±1,43aA	1,0000
	0,5	5,26±2,23aB	5,00±1,82aC	2,20±1,42bC	0,0342
	1,0	7,93±6,65bB	11,06±7,18aB	6,28±5,37bB	<0,0001
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
skupni HCA	kontrola	138,46±16,86aA	138,46±16,86aA	138,46±16,86aA	1,0000
	0,5	39,27±12,53aB	37,88±11,21aC	36,06±20,88aB	0,9308
	1,0	50,10±19,96bB	95,62±46,67aB	44,75±17,54bB	<0,0001
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

n , število določanj znotraj skupine; P_H , statistična verjetnost vpliva sorte hmelja; P_K , statistična verjetnost vpliva koncentracije ksantohumola; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami hmelja); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi koncentracijami ksantohumola)

Dodatek soli z vezanimi ekstrakti hmelja letnika 2009 različno vpliva na nastanek posameznih HCA. Na nastanek nekaterih HCA nima vpliva, medtem ko se vsebnosti nekaterih HCA zmanjšajo ali povečajo. Splošno lahko rečemo, da se vsebnost HCA z dodatkom soli z vezanimi ekstrakti hmelja zmanjša. Vsota posameznih HCA se je statistično značilno zmanjšala pri vseh sortah hmelja, pri obeh količinah soli z vezanimi ekstrakti hmelja.

Dodatek 0,5 in 1,0 g soli z vezanim ekstraktom hmelja vseh treh sort uporabljenih v poskusu, ne vpliva na nastanek IQ. Prav tako dodatek 0,5 g soli z vezanimi ekstrakti hmelja sort Aurora, Bobek in Celea nima vpliva na nastanek IQx. Dodatek 1,0 g soli z ekstraktom hmelja poveča vsebnost IQx pri vseh treh sortah, s tem, da je povečanje statistično značilno le za dodatek soli z vezanim ekstraktom hmelja sort Aurora in Bobek.

Dodatek soli z vezanimi ekstrakti hmeljev letnika 2009 na vsebnost norharmana bodisi nima statistično značilnega vpliva (Aurora v količini 0,5 in 1,0 g; Bobek: 0,5 g ter Celea: 1,0 g) ali ga poveča (Bobek: 1,0 g). Zmanjšanje vsebnosti norharmana opazimo le pri dodatku 0,5 g soli z vezanim ekstraktom Celeie. Pri obeh količinah dodane soli z ekstraktom hmelja opazimo statistično značilen vpliv sorte.

Vsebnosti harmana, MeIQx, Glu-P-2 in PhIP se z dodatkom soli z vezanimi ekstrakti hmelja statistično značilno zmanjšajo. Vpliv količine dodane soli (0,5 ali 1,0 g) na vsebnost harmana nima statistično značilnega vpliva (razen 0,5 g soli z vezanim ekstraktom Bobka). Prav tako obe količini soli z vezanimi ekstrakti hmeljev statistično značilno v enaki meri zmanjšata vsebnosti Glu-P-2 in MeIQx, z izjemo dodatka 1,0 g soli z ekstraktom Bobka, ki vsebnost MeIQx statistično značilno poveča. Zmanjšanje vsebnosti PhIP v govejih sekljancih je statistično značilno večje pri dodatku 0,5 g soli z dodanima ekstraktoma hmeljev Bobek in Celea.

Opazimo lahko, da zmanjšanje skupnih HCA z naraščajočo koncentracijo soli z vezanimi ekstrakti hmeljev letnika 2009 ni statistično značilno. V primeru ekstrakta Bobka, vezanega

na sol, opazimo statistično značilno večje zmanjšanje pri manjšem dodatku soli z vezanim ekstraktom (0,5 g).

Preglednica 25: Rezultati določanja HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v sekljancih glede na količino ekstrakta hmelja letnika 2013 vezanega na sol ($n = 36$, LSM test, $\alpha = 0,05$)

HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sekljanca)	Ekstrakt hmelja vezan na sol (g)	Vrsta hmelja				P_H
		Aurora	Bobek	Celeia	Savinjski golding	
Norharman	kontrola	8,07±1,16aA	8,07±1,16aA	8,07±1,16aA	8,07±1,16aA	1,0000
	0,5	6,03±1,05aB	4,91±4,12aA	5,67±1,88aAB	4,46±0,89aB	0,8440
	1,0	7,41±0,29aAB	2,71±2,16bA	2,37±2,16bB	1,23±0,15bC	0,0052
	P_K	0,0839	0,1350	0,0220	0,0002	
Harman	kontrola	24,51±4,48aA	24,51±4,48aA	24,51±4,48aA	24,51±4,48aA	1,0000
	0,5	4,42±0,60bB	5,99±0,38bB	5,93±0,32bB	9,05±1,91aB	0,0171
	1,0	4,75±0,48aB	1,86±1,38aB	5,32±7,44aB	1,11±0,15aC	0,4791
	P_K	<0,0001	0,0001	0,0053	0,0001	
Glu-P-2	kontrola	51,05±28,12aA	51,05±28,12aA	51,05±28,12aA	51,05±28,12aA	1,0000
	0,5	0,72±0,63bB	2,58±0,37bB	7,14±6,43bB	19,51±2,27aA	0,0006
	1,0	10,94±4,93bB	8,76±5,46bB	16,10±6,17abB	24,29±6,40aA	0,0440
	P_K	0,0214	0,0225	0,0429	0,1185	
IQ	kontrola	1,70±2,94A	1,70±2,94aA	1,70±2,94aA	1,70±2,94aA	1,0000
	0,5	0,68±0,42aA	0,37±0,32aA	1,48±1,09aA	1,22±1,11aA	0,3920
	1,0	0,25±0,22aA	0,32±0,30aA	0,13±0,11aA	1,70±1,53aA	0,1258
	P_K	0,5983	0,5683	0,5501	0,9476	
IQx	kontrola	<0,001aB	<0,001aB	<0,001aB	<0,001aB	1,0000
	0,5	10,42±2,92aA	10,75±1,55aA	9,87±4,00aA	6,51±1,30aA	0,2633
	1,0	13,22±1,03aA	4,22±7,31bAB	1,06±1,83bB	<0,001bB	0,0104
	P_K	0,0002	0,0584	0,0058	<0,0001	
MeIQx	kontrola	25,67±5,17aA	25,67±5,17aA	25,67±5,17aA	25,67±5,17aA	1,0000
	0,5	8,18±3,37aB	9,93±1,03aB	13,64±3,77aB	13,25±3,67aB	0,1811
	1,0	20,74±1,49aA	7,26±6,34bB	6,39±2,26bB	3,60±2,45bC	0,0019
	P_K	0,0028	0,0065	0,0027	0,0014	
PhIP	kontrola	27,46±1,65aA	27,46±1,65aA	27,46±1,65aA	27,46±1,65aA	1,0000
	0,5	7,07±1,49bB	11,28±0,73abB	14,05±3,98aB	12,76±2,97aB	0,0514
	1,0	2,70±0,17aC	1,55±1,10abC	1,56±0,82abC	0,70±0,18bC	0,0486
	P_K	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
skupni HCA	kontrola	138,46±19,47aA	138,46±19,47aA	138,46±19,47aA	138,46±19,47aA	1,0000
	0,5	37,52±6,68cB	45,82±6,36bcB	57,78±4,63abB	65,75±10,70aB	0,0072
	1,0	60,02±6,59aB	26,67±17,74bB	32,92±17,95bB	32,61±7,82bC	0,0654
	P_K	0,0001	0,0003	0,0004	0,0002	

n , število določanj znotraj skupine; P_H , statistična verjetnost vpliva sorte hmelja; P_K , statistična verjetnost vpliva koncentracije ksantohumola; vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (^{a,b,c}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi sortami hmelja); vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (^{A,B,C}) se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$; značilnost razlik med različnimi koncentracijami ksantohumola)

Pri dodatku soli z vezanimi ekstrakti hmelja letnika 2013 opazimo podobne značilnosti kot pri dodatku soli z vezanimi ekstrakti hmelja letnika 2009. Pri večini HCA opazimo zmanjšanje njihove vsebnosti, medtem ko pri nekaterih ne opazimo vpliva soli z vezanim ekstraktom hmelja ali pa se njihova vsebnost poveča.

Tako kot v sekljancih z dodatkom ekstraktov hmeljev letnika 2009, tudi ekstrakti hmeljev letnika 2013 statistično značilno ne vplivajo na nastanek IQ.

Medtem, ko dodatek 0,5 g soli z vezanimi ekstrakti hmelja ne vpliva na vsebnost IQ_x, se vsebnost ob dodatku 1,0 g soli z vezanimi ekstrakti hmeljev statistično značilno zmanjša, razen pri dodatku soli z vezanim ekstraktom Aurore, ki nima vpliva na tvorbo IQ_x.

Tvorba harmana je v primerjavi s kontrolnim vzorcem statistično značilno manjša pri obeh dodatkih soli z vezanimi ekstrakti hmelja. Statistično značilen vpliv naraščajoče količine soli z vezanimi ekstrakti opazimo le pri Savinjskem goldingu. Vpliv sorte hmelja je značilen le pri dodatku 0,5 g soli z vezanimi ekstrakti.

Tvorbo Glu-P-2 smo z dodatkom soli z ekstraktom hmeljev statistično značilno zmanjšali. Med dodatkoma soli z ekstraktom hmeljev (0,5 in 1,0 g) ni statistično značilnega vpliva koncentracije. Izjema je dodatek soli z ekstraktom Savinjskega goldinga, ki sicer zmanjša njegovo vsebnost za 0,5- in 2,6-krat, vendar zmanjšanje ni statistično značilno.

Vsebnost MeIQ_x se pri dodatku 0,5 g soli z ekstraktom hmelja značilno zmanjša pri vseh sortah hmelja. Vpliv sorte na tvorbo MeIQ_x ni statistično značilen. Z dodatkom 1,0 g soli z ekstraktom hmelja se vsebnost omenjenega zmanjša, zmanjšanje ni značilno le za sorto Aurora. Tudi pri večjem dodatku soli z ekstraktom hmelja je vpliv sorte statistično značilen.

PhiP je edini HCA, pri katerem vsebnost pada z naraščajočo količino dodane soli z vezanimi ekstrakti hmelja. Večji dodatek soli z ekstrakti hmeljev značilno uspešneje zmanjšajo vsebnost PhiP. Pri obeh količinah dodane soli z vezanimi ekstrakti je značilen vpliv sorte.

Vsota vseh opazovanih HCA se z dodatkom ekstrakta hmelja zmanjša, in sicer pri obeh količinah soli z vezanimi ekstrakti hmelja in pri vseh sortah hmelja. Pri sorti Savinjski golding ne opazimo statistično značilnega vpliva količine dodane soli z vezanim ekstraktom hmelja.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Ljudje smo izpostavljeni številnim potencialno toksičnim spojinam, ki lahko imajo kancerogene in mutagene lastnosti. Eno izmed teh skupin spojin predstavljajo heterociklični aromatski amini. To je raznolika skupina spojin, ki jih najdemo v beljakovinsko bogatih živilih.

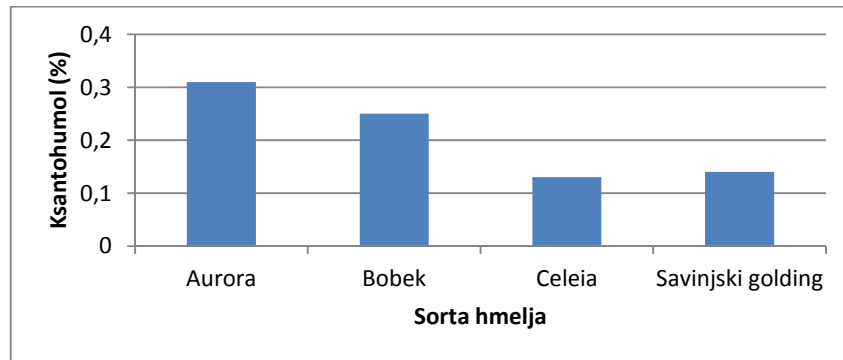
Številne študije kažejo, da lahko nastanek HCA, natančneje aminoimidazol-azarenov, zmanjšamo z dodatkom spojin z antioksidativnim potencialom (Quelhas in sod., 2010). Antioksidanti bi lahko lovili proste radikale, ki nastajajo med Maillardovo reakcijo in s tem znižali tvorbo HCA (Gibis in Weiss, 2012).

Naravni in sintetični antioksidanti (flavonoidi, vitamina C in E) ter živila rastlinskega izvora z visokim deležem naravno prisotnih antioksidantov imajo pomembno vlogo pri inhibiciji tvorbe HCA (Janoszka, 2010). Raziskovalci so dokazali inhibitorno delovanje številnih antioksidantov, kot so karotenoidi iz paradižnika, polifenoli iz pravega čaja ter številna zelišča (Gibis in Weiss, 2012).

Namen naloge je bil ugotoviti vpliv dodatka ksantohumola iz etanolnega ekstrakta hmelja na tvorbo heterocikličnih aromatskih aminov v toplotno obdelanih govejih sekljancih in določiti najučinkovitejšo količino dodatka. Ekstrakte hmelja smo zaradi lažjega rokovanja vezali na kuhinjsko sol (NaCl). Po dodatku soli z vezanimi ekstrakti hmelja smo oblikovali sekljance in jih toplotno obdelali na dvoploščnem žaru ter jih kemijsko analizirali. Določili smo tudi osnovno sestavo presnega mesa in količino ksantohumola v etanolnih ekstraktih hmelja.

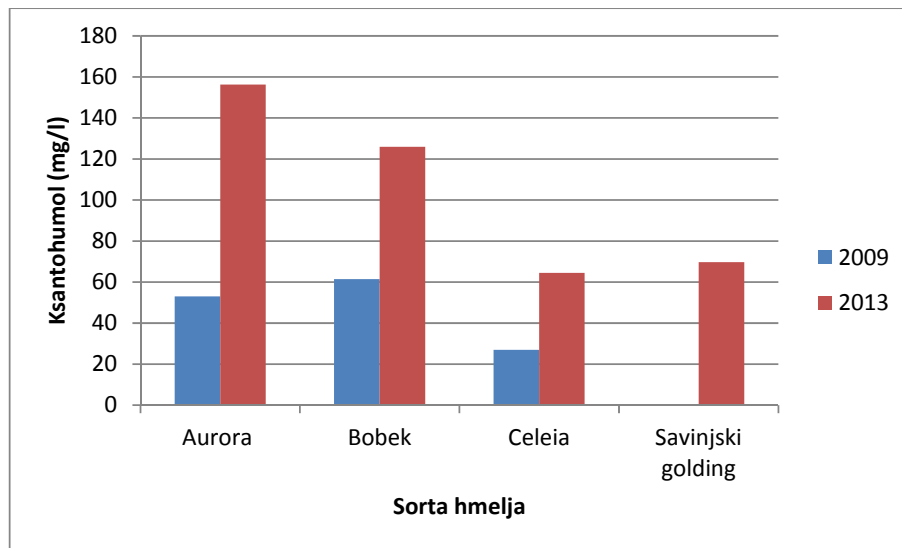
5.1.1 Vsebnost ksantohumola v etanolnih ekstraktih hmelja

Ksantohumol je sekundarni metabolit hmelja. Ksantohumol, polifenol iz skupine prenilflavonoidov, je del lupolina skupaj s hmeljnimi smolami in aromatičnimi snovmi. Vsebnost ksantohumola in njegovo razmerje z alfa-kislinami je odvisno od sorte hmelja, lokacije in rastnih razmer. Posušeni hmeljevi storžki vsebujejo od 0,2 do 1,1 % ksantohumola (Hrastar in sod., 2006). Predvidevali smo manjšo vsebnost ksantohumola v hmelju starejšega letnika (2009). Prav tako smo predvidevali razlike v vsebnosti ksantohumola med sortami hmelja. Hmelj, uporabljen v našem poskusu, vsebuje od 0,05 do 0,31 % ksantohumola (slika 5).



Slika 5: Odstotek ksantohumola v različnih sortah hmelja letnika 2013

Hrastar in sod. (2006) so določili podobne količine ksantohumola v slovenskih sortah hmelja letnika 2005. Njihovi rezultati potrjujejo vpliv sorte na vsebnost ksantohumola. Po veliki vsebnosti ksantohumola izstopa sorta Aurora (0,38 %), z manjšimi vsebnostmi pa sorta Celeia (0,16 %). Bobku in Savinjskemu goldingu so določili 0,31 % in 0,23 % ksantohumola. V primerjavi z našimi rezultati opazimo največje odstopanje pri sorti Savinjski golding, pri kateri so Hrastar in sod. (2006) določili 0,23 % ksantohumola, mi pa 0,14 %.



Slika 6: Vsebnost ksantohumola v etanolnih ekstraktih različnih sort in letnikov hmelja

Vsebnost ksantohumola v etanolnem ekstraktu hmelja znaša od 26,96 do 156,30 mg/l (slika 6). Največ ksantohumola v etanolnem ekstraktu smo določili pri sortah Aurora (156,30 mg/l) in Bobek (125,94 mg/l) letnika 2013. Na splošno se vsebnost ksantohumola med staranjem zmanjšuje. Hmelji letnika 2013 vsebujejo približno dva- (Bobek, Celeia) do trikrat (Aurora) več ksantohumola kot letnik 2009.

Med predelavo in skladiščenjem hmelja se vsebnost sekundarnih metabolitov hmelja spreminja. Spremembe pri alfa-kislinah in eteričnih oljih so dobro raziskane. Vpliv

skladiščenja na ostale pomembne spojine hmelja, kot so beta-kislina, polifenoli in antioksidativna aktivnost, ni dovolj znan. Po obiranju hmelja se večina posušenih hmeljnih storžkov predela v pelete in hmeljne ekstrakte. Nepredelan hmelj predstavlja samo 2 % hmelja na tržišču. Sestava sekundarnih metabolitov hmelja se spreminja tudi po zorenju, med njegovo obdelavo, skladiščenjem in transportom. Staranje hmelja je odvisno od več dejavnikov, med katerimi so najbolj pomembni čas, temperatura in prisotnost kisika ter svetlobe. Staranje je odvisno tudi od sorte hmelja (Mikyška in Krofta, 2012).

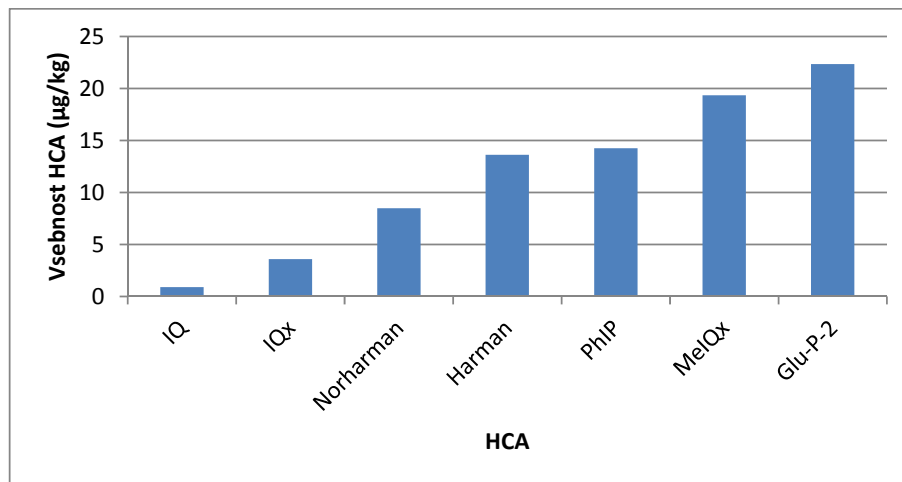
Mikyška in Krofta (2012) sta proučevala spremembe sekundarnih metabolitov hmelja med dolgotrajnim skladiščenjem hmeljnih peletov pri različnih pogojih skladiščenja. V preizkus sta zajela 4 češke sorte hmelja, ki sta jih skladiščila vakuumsko zapakirane pri 2 °C in 20 °C ter ob prisotnosti kisika pri 20 °C. Vsi vzorci so bili skladiščeni v temi. Med 12- mesečnim skladiščenjem se je vsebnost skupnih polifenolov zmanjšala za 30-40 %, flavonoidov pa za 20-30 %. Razlike v zmanjšanju različnih skupin polifenolov nakazujejo, da se med skladiščenjem spremeni zlasti vsebnost fenolnih kislin. Pogoji skladiščenja niso bistveno vplivali na vsebnost polifenolov. Nekoliko večje zmanjšanje vsebnosti polifenolov je bilo opaziti v aerobnih pogojih pri 20 °C, vendar le v okviru analitskih napak. Vsebnost polifenolov je bila določena v vrelem vodnem ekstraktu hmelja, kar je stimuliralo vpliv temperature in oksidacije med vrenjem pивine. Čeprav se je vsebnost skupnih polifenolov med dolgotrajnim skladiščenjem brez dostopa kisika zmanjšala, se antioksidativna aktivnost ni bistveno spremenila.

Precejšnjo razliko v vsebnosti ksantohumola v ekstraktu hmelja opazimo tudi med sortami hmelja. Znotraj letnika 2009 ima najmanjšo vsebnost ksantohumola sorta Celeia (26,96 mg/l), in sicer dvakrat manjšo kot Bobek (61,40 mg/l), ki ima največjo vsebnost ksantohumola. Bobku sledi Aurora, ki vsebuje (53,06 mg/l) ksantohumola. Sorte Savinjski golding letnika 2009 v poskusu nismo imeli. Pri sortah letnika 2013 opazimo podobne značilnosti, le da tu po deležu ksantohumola prednjači sorta Aurora (156,30 mg/l), sledi ji Bobek (125,94 mg/l). Savinjski golding in Bobek imata 2,2- in 2,4-krat manj ksantohumola kot Aurora.

5.1.2 Vsebnost HCA v govejih sekljancih

Heterociklični aromatski amini se običajno tvorijo kot končni produkt Maillardove reakcije pri temperaturi od 150-200 °C in kot produkt pirolize pri temperaturi večji od 200 °C. Govedina vsebuje kreatinin in triptofan, kar lahko vodi do nastanka HCA že pri temperaturi višji od 90-100 °C (Kondjoyan in sod., 2014).

V našem poskusu smo v toplotno obdelanih govejih sekljancih določili povprečno 82,55 µg/kg HCA (slika 7). Med analiziranimi HCA po povprečni vrednosti izstopata Glu-P-2 (22,35 µg/kg) in MeIQx (19,36 µg/kg), ki predstavljata kar polovico vseh HCA. Sledita PhIP (14,26 µg/kg) in harman (13,62 µg/kg), v manjših količinah pa še norharman (8,48 µg/kg), IQx (3,59 µg/kg) in IQ (0,90 µg/kg).



Slika 7: Povprečne vsebnosti posameznih HCA (µg/kg) v pečenih govejih sekljancih

Primerjava rezultatov z rezultati drugih študij je težavna, saj se priprava vzorcev, metode in pogoji analize lahko zelo razlikujejo. Razlike se lahko pojavijo med pogoji toplotne obdelave, kot so način, temperatura in čas toplotne obdelave, nastanek HCA pa je močno odvisen od naštetih dejavnikov. Pomembna sta tudi sestava in priprava mesa pred toplotno obdelavo. Rezultati se lahko razlikujejo glede na uporabljene postopke čiščenja in uporabljene metode detekcije HPLC (Warzecha in sod., 2004). Upoštevati moramo tudi to, da se število in vrsta analiziranih HCA v posameznih poskusih lahko razlikujejo. Ne glede na to, so vrednosti HCA, ki smo jih določili v tem poskusu večje od vrednosti v literaturi.

Balogh in sod. (2000) so v govejih sekljancih, pečenih v ponvi s teflonskim premazom (6 min/stran pri 225 °C), določili 24,6 µg/kg skupnih HCA (IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx in PhIP). Vsebnost skupnih HCA, pečenih dlje časa (10 min/stran) pri enaki temperaturi, je znašala 50,8 µg/kg. Quelhas in sod. (2010) so v govejih sekljancih določili 53,9 µg/kg HCA (MeIQx, PhIP, AαC, 4,8-DiMeIQx). V poskusu so meso pekli v ponvi s teflonskim premazom, 4 min na vsaki strani, pri temperaturi 180-200 °C. V našem poskusu kontrolni vzorec, torej vzorec, ki mu je dodana samo kuhinjska morska sol vsebuje kar 138,46 µg/kg HCA. Podobno visoko vsebnost HCA (140,68 µg/kg) so določili tudi Jinap in sod. (2013), in sicer v marinirani govedini, narezani na majhne kocke in pripravljene na žaru na oglje (8 min).

V kontrolnem vzorcu prevladujejo Glu-P-2 (51,05 µg/kg), PhIP (27,46 µg/kg), MeIQx (25,67 µg/kg) in harman (24,51 µg/kg). Našteti HCA predstavljajo skupaj kar 93 % vseh HCA v govejih sekljancih. Prevladujočo vsebnost PhIP, MeIQx potrjujejo tudi Balogh in sod. (2000), ki so v govejih sekljancih določili 31,4 ng/g PhIP in 5,8 ng/g MeIQx. Gibis in Weiss (2012) sta v govejih sekljancih, premazanih s sončničnim oljem in pripravljene na dvoploščnem žaru (2:40 min), določila največjo vsebnost harmana in MeIQx.

V našem poskusu smo z dodatkom ekstraktov hmelja, vezanimi na sol, uspešno zmanjšali vsebnost HCA v govejih pleskavicah. Vsebnost skupnih HCA se je statistično značilno

zmanjšala pri vseh sortah hmelja, ki smo jih vezali na sol in pri vseh koncentracijah ksantohumola. Kot je razvidno iz preglednice 21, se je z dodatkom ekstraktov hmelja, vezanim na sol, delež skupnih HCA zmanjšal za 40 do 81 %. Najmanj je na vsebnost skupnih HCA vplival ekstrakt Bobka 2009 v koncentraciji ksantohumola 0,5-1,0 mg/kg hmelja, najbolj pa ekstrakt Bobka 2013 v koncentraciji ksantohumola 1,5-2,0 mg/kg hmelja.

Na zmanjšanje vsebnosti HCA v govejih sekljancih sta med ekstrakti hmelja sorte Aurora najuspešnejše delovali koncentraciji ksantohumola 0,1-0,5 mg/kg (71,6 %) in 1,0-1,5 mg/kg (72,9 %), Bobek v koncentraciji ksantohumola 0,1-0,5 mg/kg (72,6 %) in 1,5-2,0 mg/kg (80,7 %). Celeia je v obeh prisotnih koncentracijah ksantohumola (0,1-0,5 in 0,5-1,0 mg/kg) statistično značilno zmanjšala vsebnost skupnih HCA v enaki meri (67,9 in 76,2 %). Le pri sorti Savinjski golding opazimo, da se z naraščajočo koncentracijo ksantohumola statistično značilno zmanjšuje tudi vsebnost skupnih HCA. Torej ne moremo na splošno trditi, da z naraščajočo koncentracijo ksantohumola koncentracija skupnih HCA pada. Vsekakor ne moremo trditi, da na zmanjšanje vsebnosti HCA vpliva samo ksantohumol, saj smo govejim sekljancem dodajali ekstrakt hmeljev, ki je poleg ksantohumola verjetno vseboval tudi druge fenolne snovi.

Preglednica 26: Delež zmanjšanja skupnih HCA v sekljancih glede na sorto hmelja in koncentracijo ksantohumola

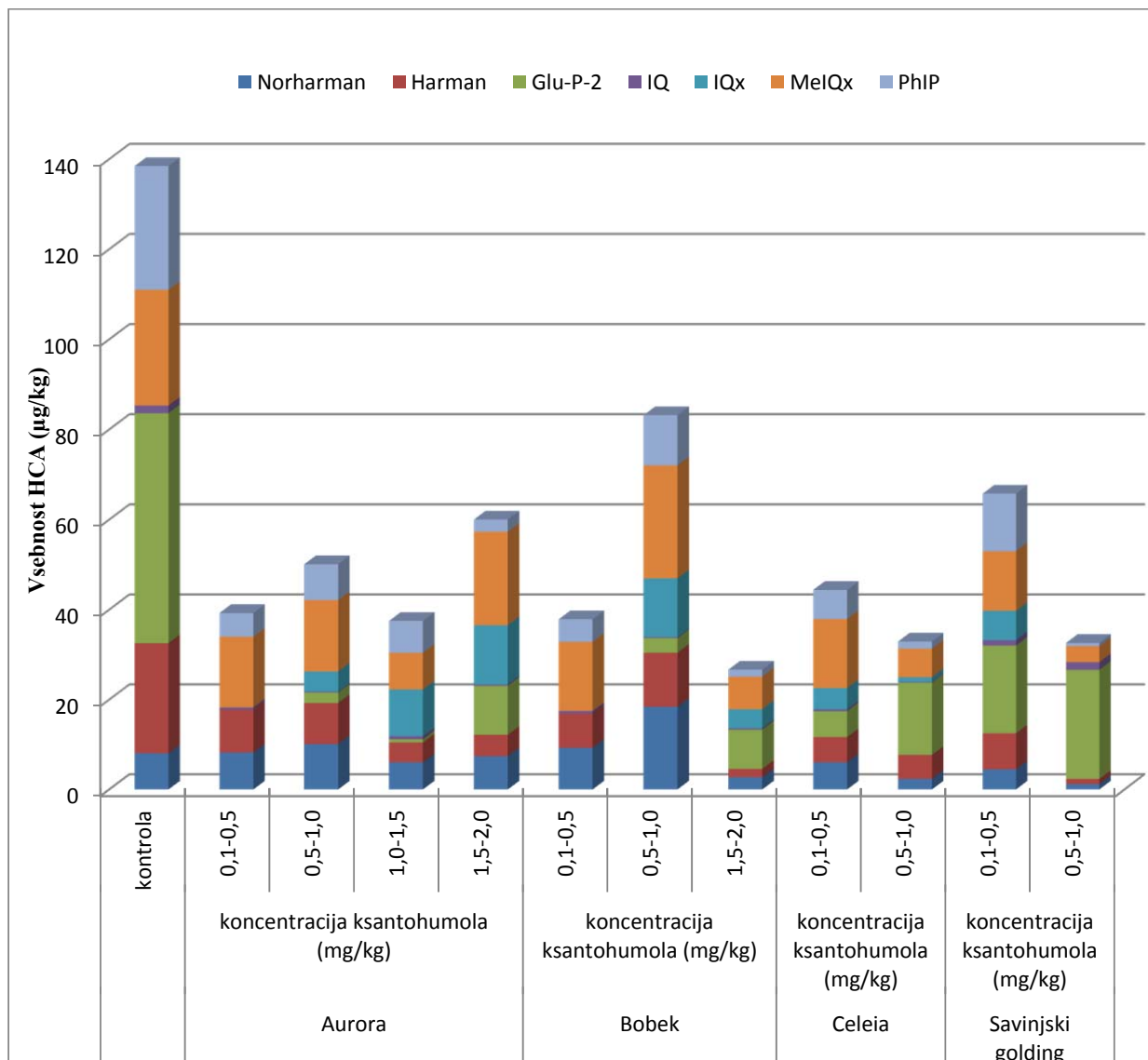
Sorta hmelja	Koncentracija ksantohumola (mg/kg)	Delež zmanjšanja skupnih HCA (%)
Bobek	0,5-1,0	39,9
Savinjski golding	0,1-0,5	52,5
Aurora	1,5-2,0	56,7
Aurora	0,5-1,0	63,8
Celeia	0,1-0,5	67,9
Aurora	0,1-0,5	71,6
Bobek	0,1-0,5	72,6
Aurora	1,0-1,5	72,9
Celeia	0,5-1,0	76,2
Savinjski golding	0,5-1,0	76,5
Bobek	1,5-2,0	80,7

Raziskovalci že od odkritja HCA iščejo načine, s katerimi bi zmanjšali ali preprečili njihovo tvorbo med toplotno obdelavo živil. Kot učinkovite so se izkazale spojine z visokim antioksidativnim potencialom. V literaturi nismo zasledili, da bi vpliv ksantohumola na tvorbo HCA v živilih že bil raziskan. Precej dobro pa je raziskan vpliv polifenolov na tvorbo HCA. Znanstveniki so z dodatkom različnih začimb in rastlinskih ekstraktov zmanjšali vsebnost HCA. Balogh in sod. (2000) so z dodatkom oljnega ekstrakta rožmarina (1 in 10 %) zmanjšali skupno vsebnost HCA (IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx in PhIP) za 51,5 % oz. 46,3 %. Puangsombat in sod. (2011) so vsebnost HCA (MeIQx in PhIP) zmanjšali z dodatkom rožmarina za 43,5 % in z dodatkom kurkume za 39,2 %. Oz in Kaya (2011a) sta z dodatkom posušene rdeče paprike v kosmičih zmanjšala vsebnost HCA (IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP) za 75,7 % do 100 %, odvisno od temperature toplotne obdelave.

Kot je razvidno iz slike 8, enake koncentracije ksantohumola v etanolnem ekstraktu hmelja različno vplivajo na tvorbo posameznih HCA. Pri koncentraciji ksantohumola 0,5-1,0 mg/kg se delež MeIQx zmanjša za 2,3 % (Bobek), 38,0 % (Aurora), 75,1 % (Celeia) in 86,0 % (Savinjski golding). Koncentracija ksantohumola 0,5-1,0 mg/kg poveča vsebnosti norharmana za 128,4 % (Bobek) in 25,3 % (Aurora), medtem ko se vsebnosti istega HCA zmanjšata pri dodatku ekstrakta Savinjskega goldinga vezanega na sol za 84,8 % in za 70,6 % (Celeia). Nasprotno pa ne opazimo statistično značilnega vpliva sorte hmelja na zmanjšanje vsebnosti MeIQx v koncentraciji ksantohumola 0,1-0,5 mg/kg. Njegova vsebnost se namreč zmanjša za 38,8 % (Aurora), 40,0 % (Bobek), 40,2 % (Celea) in 48,4 % (Savinjski golding). To bi lahko nakazovalo, da je vsebnost HCA odvisna tudi od ostalih polifenolov, ki se nahajajo v hmelju. Različne sorte hmelja imajo različno sestavo polifenolov, njihova sestava in deleži se spreminjajo med staranjem hmelja. Posledično se vrednosti posameznih HCA lahko razlikujejo ravno zaradi različne vsebnosti in sestave polifenolov. Na tvorbo HCA bi prav tako lahko vplivale tudi ostale komponente ekstrakta hmelja.

Vsebnost posameznih prevladujočih HCA (Glu-P-2, PhIP, MeIQx in harmana) se je z dodatkom ekstraktov hmelja uspešno zmanjšala. Vsebnost Glu-P-2 se je zmanjšala za 52,4 do 100 %, PhIP za 53,5-97,5 %, MeIQx za 2,3 do 86,0 % ter harmana za 51,0-95,5 %. Naše ugotovitve potrjujejo Rounds in sod. (2013), ki so vsebnost MeIQx in PhIP v govejem sekljancu z dodatkom olivnega ekstrakta zmanjšali za 30,5-49,1 % in 42,8-50,6 %. Balogh in sod. (2000) so z dodatkom oljnega ekstrakta rožmarina vsebnost MeIQx zmanjšali za 30,1 (1 % ekstrakta) in 12,1 % (10 % ekstrakta) ter PhIP za 44,0 % (1 % ekstrakta) in 44,6 % (10 % ekstrakta). Oz in Kaya (2011b) sta v govejih mesnih kroglicah, praženih pri 225 °C, z dodatkom črnega popra zmanjšala vsebnost PhIP za 100 %. Puangsombat in sod. (2011) so določali vsebnost MeIQx in PhIP v govejih sekljancih, pečenih v ponvi s teflonskim premazom pri 204 °C. Z dodatkom rožmarina in kurkume so vsebnost MeIQx zmanjšali za 50,0 in 40,9 % ter vsebnost PhIP za 36,4 in 37,5 %. Večina študij, ki jih najdemo v literaturi, je omejenih na zmanjševanje vsebnosti MeIQx in PhIP. Dong in sod. (2011) so eni redkih, ki so analizirali večje število HCA v govejih sekljancih. Določali so vsebnost 7 aminoimidazolazarenov in 8 amino karbonilov. Z dodatkom čebule (4 g/sekljanec) so vsebnost MeIQx, harmana, norharmana, PhIP in Glu-P-2 zmanjšali za 73, 89, 91, 92 in 97 %.

Sekljanec z dodanimi ekstrakti hmelja vezanimi na sol smo senzorično ocenili. Člani senzoričnega panela niso zaznali razlik med sekljanci z dodanimi ekstrakti hmelja in kontrolnim sekljancem brez dodanega ekstrakta.



Slika 8: Vsebnost vseh HCA v kontrolnem govejem sekljancu in sekljancih z dodatkom etanolnega ekstrakta hmelja vezanega na sol

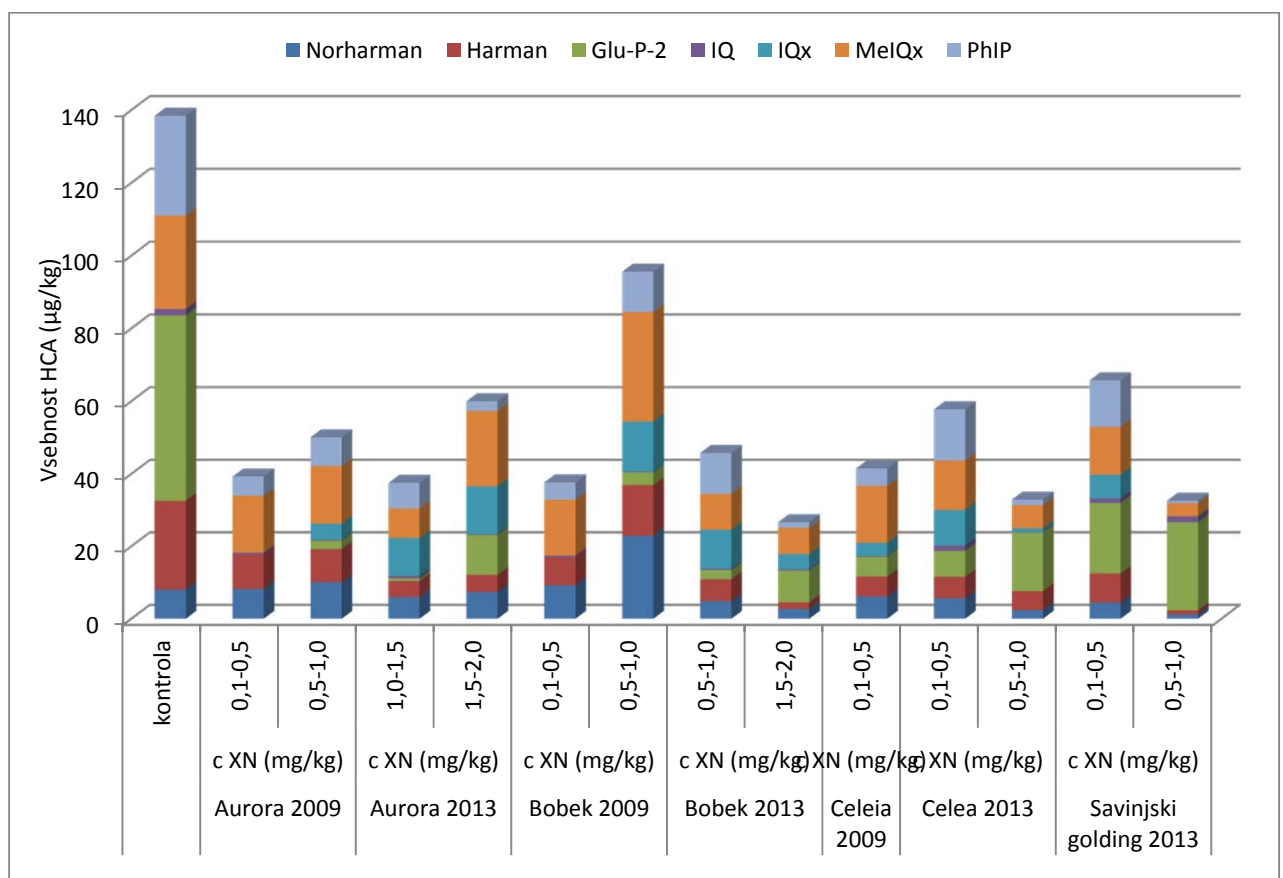
Primerjava vsebnosti HCA v govejih sekljancih z ekstrakti hmelja vezanih na sol glede na letnik

Ekstrakti hmeljev letnika 2009 so vsebnost skupnih HCA v govejih sekljancih zmanjšali za 31 do 73 %, letnik 2013 pa za 53 do 81 %. Z izjemo ekstrakta Bobka letnika 2009 ne moremo trditi, da obstajajo velike razlike med letnikoma (slika 9).

Pri obeh letnikih sorte Aurora in Bobku letnika 2009 opazimo manjšo tvorbo skupnih HCA pri manjši koncentraciji ksantohumola. Statistična analiza prikazuje, da v zmanjšanju skupnih HCA ni statistično značilnih razlik med posameznimi koncentracijami ksantohumola sorte Aurora. Zmanjšanje skupnih HCA je z dodatkom ekstrakta Bobka letnika 2009, vezanega na sol, statistično značilno večje pri manjši koncentraciji ksantohumola. Ksantohumol (in ostali

polifenoli) lahko deluje kot antioksidant, v nekaterih pogojih, kot je povečana koncentracija, lahko deluje prooksidativno. To potrjujejo tudi Balogh in sod. (2000), ki navajajo, da je zmanjšanje vsebnosti skupnih HCA večje pri 1 % oljnega ekstrakta rožmarina kot pri 10 % ekstrakta (zmanjšanje za 52 in 46 %).

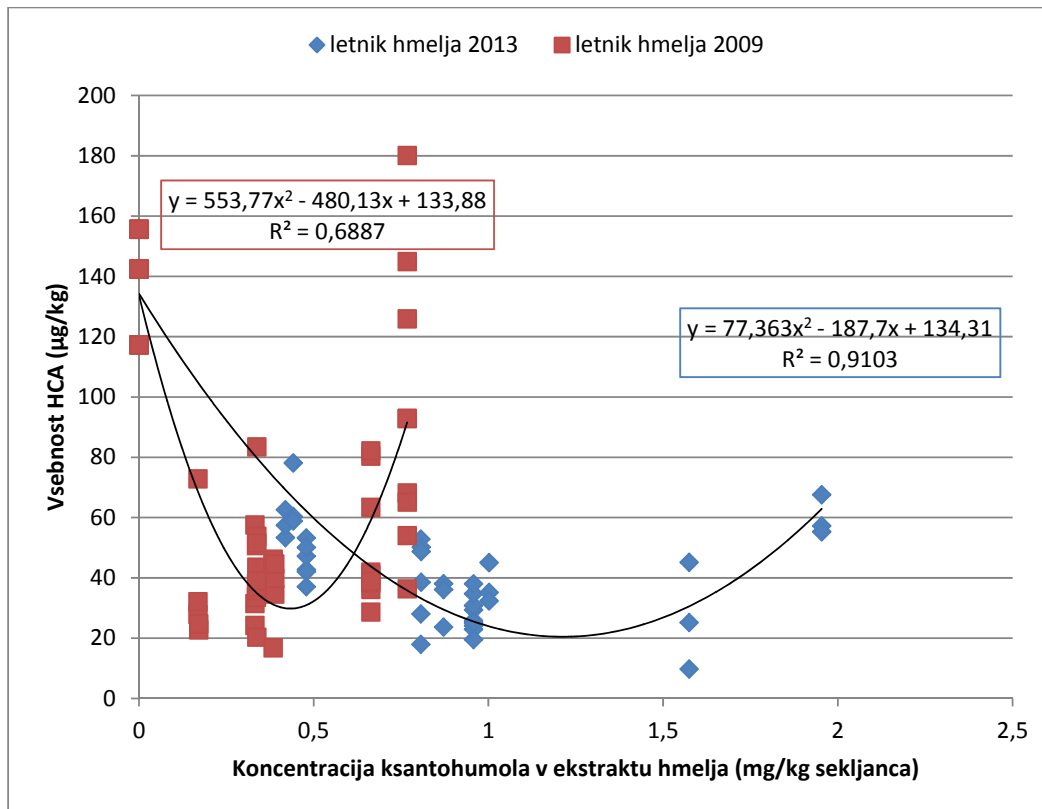
Bobek, Celeia in Savinjski golding letnika 2013 prikazujejo nasprotno delovanje, saj pri teh sortah na zaviranje nastanka skupnih HCA učinkoviteje delujejo večje koncentracije ksantohumola. Vpliv koncentracije ksantohumola je statistično značilen le za sorto Savinjski golding, pri ostalih dveh sortah hmelja ni statistično značilnih razlik. Podobno navajata tudi Puangsombat in Smith (2010), ki sta z dodatkom 0,05 % vodnega ekstrakta rožmarina skupno vsebnost HCA v govejih sekljancih zmanjšala za 55 %, z 0,5 % vodnega ekstrakta pa za 71 %.



Slika 9: Vsebnost vseh HCA v kontrolnem govejem sekljancu in sekljancih z dodatkom etanolnega ekstrakta različnih sort hmelja letnikov 2009 in 2013 vezanih na sol

Slika 10 prikazuje vpliv koncentracije ksantohumola v ekstraktu hmelja, ki smo ga vezali na sol in dodali govejim sekljancem. Pri obeh letnikih hmelja opazimo manjšo tvorbo HCA pri nižjih koncentracijah ksantohumola, z naraščanjem vsebnosti ksantohumola pa se vsebnost HCA poveča. Glede na rezultate lahko sklepamo, da pri večji količini dodanega ekstrakta hmelja (torej 1,0 g ekstrakta hmelja vezanega na sol) na povečanje vsebnosti HCA delovala

neka druga snov etanolnega ekstrakta. HCA se tvorijo med toplotno obdelavo iz aminokislin, kreatina oz. kreatinina in sladkorjev, etanolni ekstrakt hmelja pa zraven ksantohumola vsebuje tudi druge spojine lupulina, ki bi lahko bili prekurzorji HCA.



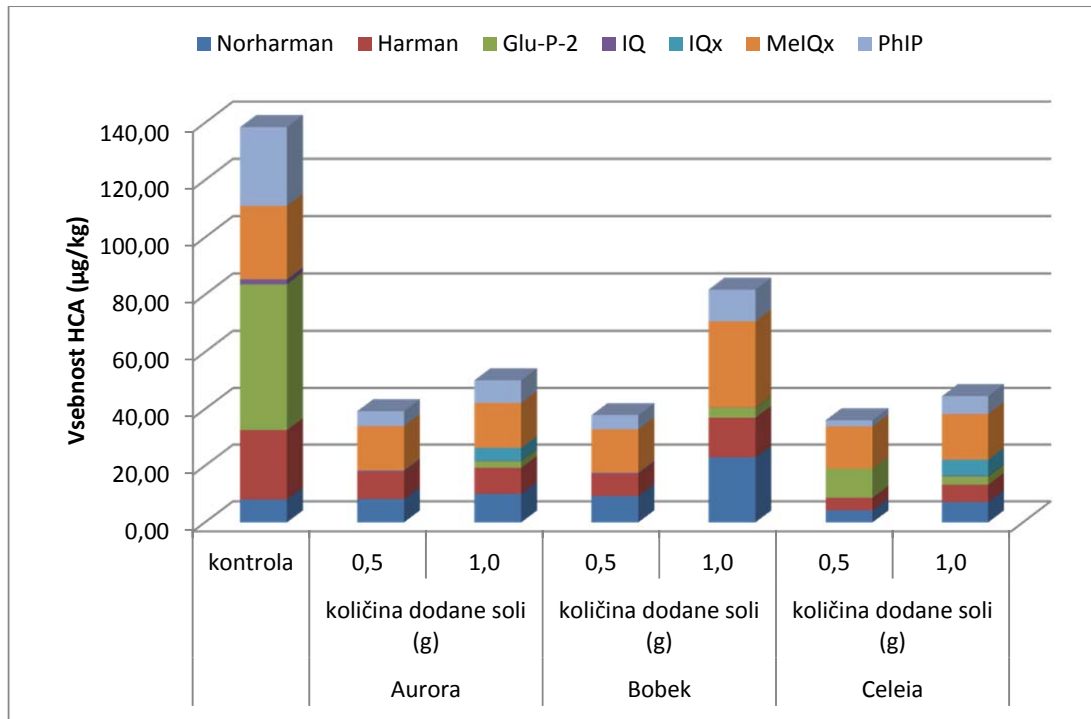
Slika 10: Vpliv koncentracije ksantohumola v ekstraktu hmelja različnih letnikov na vsebnost vseh HCA v govejih sekljancih

Primerjava vsebnosti HCA v govejih sekljancih z dodatkom ekstraktov hmelja vezanih na sol glede na količino dodatka

Manjši dodatek ekstrakta hmelja letnika 2009 vezanega na sol (0,5 g) učinkoviteje zmanjša vsebnost HCA v govejih sekljancih v primerjavi z večjim dodatkom (1,0 g) (slika 11). Razlike v zmanjšanju med dvema količinama ekstraktov vezanima na sol so statistično značilne le za sorto Bobek. Med ekstrakti hmelja letnika 2009 ima Bobek največjo vsebnost ksantohumola, zato je mogoče, da je ksantohumol v večji koncentraciji deloval prooksidativno.

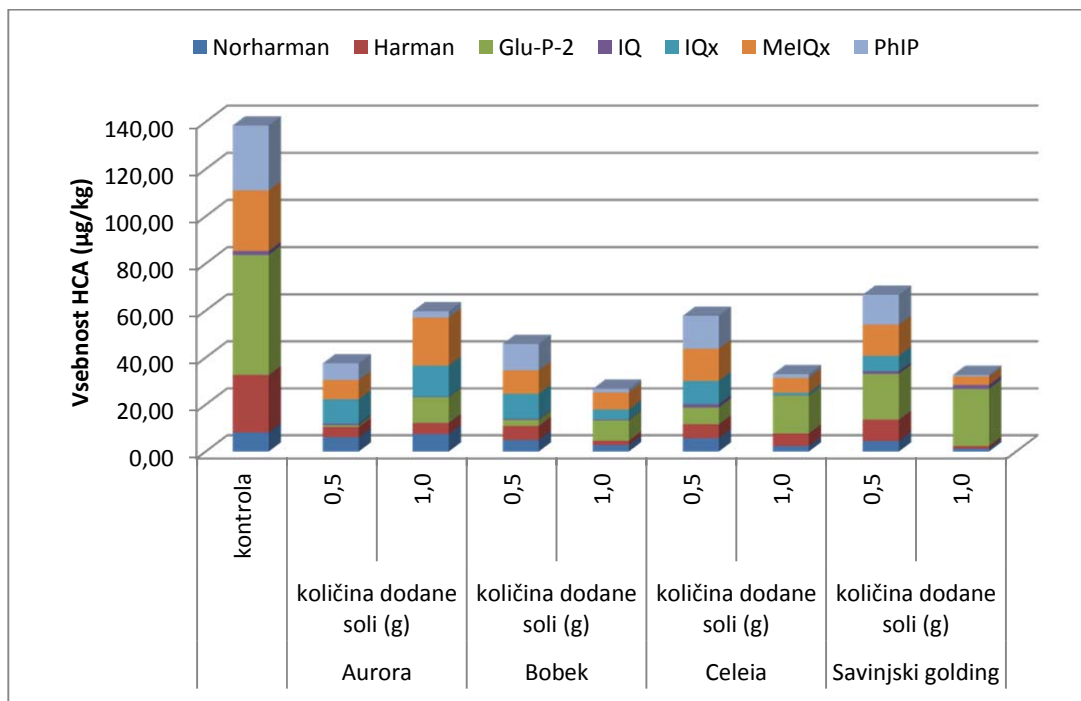
Med toplotno obdelavo govejih sekljancev z dodanimi ekstrakti hmeljev (letnik 2009) vezanimi na sol je nastalo največ MeIQx. V primerjavi s kontrolnim vzorcem se je vsebnost zmanjšala za 36,9 % (1,0 g: Celeia) do 42,0 % (0,5 g: Celeia). Ob dodatku 1,0 g soli z vezanim ekstraktom Bobka se je vsebnost MeIQx, v primerjavi s kontrolnim vzorcem, povečala za 17,3 %.

Vsebnost skupnih HCA se je ob dodatku 0,5 g soli z vezanimi ekstrakti hmelja letnika 2009 zmanjšala za 71,6 do 74,0 % (Aurora: 71,6 %, Bobek: 72,6 %, Celeia: 74,0 %). Ob dodatku 1,0 g soli z vezanimi ekstrakti pa za 31,0 % (Bobek), 63,8 % (Aurora), 67,7 % (Celeia).



Slika 11: Vsebnost HCA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v govejih sekljancih v kontrolnem vzorcu in vzorci z dodatkom 0,5 in 1,0 g soli z vezanimi ekstrakti različnih sort hmelja letnika 2009

Dodatek 0,5 g ekstraktov Aurore, Bobka, Celeie in Savinjskega goldinga letnika 2013 vezanih na sol zmanjšajo vsebnost skupnih HCA za 72,9 %, 66,9 %, 58,3 % in 52,5 %. Ob dodatku 1,0 g ekstraktov vezanih na sol pa za 56,7 % (Aurora), 80,7 % (Bobek), 76,2 % (Celeia) in 76,5 % (Savinjski golding) (slika 12).



Slika 12: Vsebnost HCA (µg/kg) v govejih sekljancih v kontrolnem vzorcu in vzorci z dodatkom 0,5 in 1,0 g soli z vezanimi ekstrakti različnih sort hmelja letnika 2013

Koncentracija ksantohumola, ki zagotavlja najmanjšo tvorbo HCA, je odvisna od sorte. Enostavneje je določiti, katera količina dodatka ekstrakta hmelja je najbolj primerna. Zaključimo lahko, da je najprimernejša količina odvisna od letnika hmelja, in sicer za letnik 2009 0,5 g ekstrakta hmelja vezanega na sol ter za letnik 2013 1,0 g ekstrakta hmelja vezanega na sol.

Razlog, zakaj je med letnikoma razlika v optimalni količini ekstrakta hmelja vezanega na sol, je lahko tudi ta, da se med staranjem hmelja vsebnost in koncentracija različnih polifenolov spreminjata. Tako je verjetno, da so na zmanjšanje vsebnosti HCA v letniku 2009 vplivale druge spojine kot pri letniku 2013 (zraven ksantohumola). To nakazuje prooksidativno delovanje večje količine dodatka (1,0 g) letnika 2009, česar pri letniku 2013 ne zasledimo.

Kot je že bilo omenjeno, se antioksidativna aktivnost med 12-mesečnim skladiščem hmelja v anaerobnih pogojih praktično ne spremeni, v pogojih z dostopom kisika se zmanjša za 10-25 % (Mikyška in Krofta, 2012). Tudi mi smo dokazali, da ekstrakti hmelja starejšega letnika (enako) uspešno zavirajo tvorbo HCA, kar pomeni, da bi za preprečevanje tvorbe HCA med toplotno obdelavo lahko uporabili hmelj, ki po sezoni ostane v skladiščih. Mikyška in Krofta (2012) omenjata, da po sezoni v skladiščih in manjših pivovarnah ostane precejšen delež hmelja, ki ima zaradi sprememb sekundarnih metabolitov zmanjšano pivovarsko vrednost.

Zaključimo lahko, da ne moremo določiti optimalne koncentracije ksantohumola, ki bi v največji meri preprečevala tvorbo HCA, saj je le-ta odvisna od sorte hmelja. Znotraj posamezne koncentracije ksantohumola namreč opazimo velike razlike v vsebnosti posameznih HCA. Pri enaki koncentraciji ksantohumola lahko pri eni sorti opazimo

zmanjšanje tvorbe posameznega HCA, medtem ko druga sorta hmelja poveča vsebnost HCA v primerjavi s kontrolnim vzorcem, ali na tvorbo HCA nima vpliva. Na splošno se vsebnost skupnih HCA statistično značilno zmanjša pri vseh dodanih koncentracijah ksantohumola in vseh sortah hmelja, s čimer smo potrdili hipotezo, da dodatek ekstraktov hmelja zmanjša tvorbo HCA v pečenih govejih sekljancih.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov smo oblikovali naslednje sklepe:

- osnovna kemijska sestava presnega govejega mesa je naslednja: 77,0 % vode, 22,5 % beljakovin, 0,8 % maščob in 1,1 % skupnih mineralnih snovi;
- med hmelji letnika 2009 največ ksantohumola vsebuje Bobek (1,22 mg/g hmelja), v letniku 2013 pa Aurora (3,12 mg/g hmelja);
- hmelji letnika 2013 vsebujejo dva- (Bobek in Celeia) do tri-krat (Aurora) več ksantohumola kot letnik 2009;
- pečeni goveji sekljanci z dodatkom ekstraktov hmeljev vezanih na sol vsebujejo povprečno: 22,35 µg/kg Glu-P-2, 19,36 µg/kg MeIQx, 14,26 µg/kg PhIP, 13,62 µg/kg harmana, 8,48 µg/kg norharmana, 3,59 µg/kg IQx in 0,90 µg/kg IQ;
- v pečenih govejih sekljancih brez dodatka ekstrakta hmelja je nastalo 138,46 µg/kg HCA;
- v sekljancih z dodatkom ekstraktov hmelja vezanih na sol se tvori 1,7- do 5,2-krat manj skupnih HCA v primerjavi s kontrolnim vzorcem;
- koncentracija ksantohumola, ki v največji meri zavre nastanek HCA je odvisna od sorte hmelja; za sorto Aurora 0,1-0,5 in 1,0-1,5 mg/kg, Bobek 0,1-0,5 in 1,5-2,0 mg/kg, Celeio 0,1-0,5 in 0,5-1,0 mg/kg ter Savinjski golding 0,5-1,0 mg/kg;
- govejim sekljancem smo dodali ekstrakt hmelja, ki zraven ksantohumola vsebuje tudi ostale v etanolu topne spojine, ki bi lahko vplivale na tvorbo HCA. Vpliv ostalih komponent hmelja je viden predvsem pri večji količini dodanega ekstrakta hmelja;
- med količino dodanega ekstrakta hmelja vezanega na sol (0,5 ali 1,0 g) ni statistično značilnih razlik na tvorbo HCA, z izjemo Bobka letnika 2009 in Savinjskega goldinga letnika 2013.

6 POVZETEK

Način prehranjevanja lahko deluje kot dejavnik tveganja za zdravje posameznika, lahko pa tudi kot zaščitni dejavnik, ki pripomore k ohranjanju zdravja. Meso je pomemben vir beljakovin in nam zagotavlja vse esencialne aminokisliline ter različne mikronutriente. Tako je dragocen vir nekaterih ključnih hranil. Obenem se pa ob prisotnosti mesa v prehrani težko izognemo tvorbi mutagenih in kancerogenih spojin, ki se tvorijo med toplotno obdelavo. Raziskovalci se trudijo poiskati načine zmanjšanja tvorbe teh spojin, med katere uvrščamo tudi heterociklične aromatske amine.

Namen našega poskusa je bil zmanjšati vsebnosti HCA v govejih sekljancih med toplotno obdelavo. Dodali smo ekstrakt hmelja različnih sort in letnikov, saj smo predvidevali, da bo antioksidativna aktivnost ksantohumola vplivala na tvorbo HCA. Zaradi lažjega rokovanja smo etanolni ekstrakt vezali na kuhinjsko sol (NaCl). Govejim sekljancem smo dodali 0,5 g (+0,5 g NaCl) ter 1,0 g ekstrakta hmelja vezanega na sol. Za primerjavo smo uporabili kontrolni vzorec, ki je vseboval samo kuhinjsko sol (1,0 g). Mletemu govejemu mesu smo dodali ekstrakt hmelja vezanega na sol, mešali v mešalniku in oblikovali 80 g sekljance. Nato smo jih toplotno obdelali na dvoploščnem žaru pri 240 °C za 4 min ter jih kemijsko in senzorično analizirali.

Osnovno kemijsko sestavo mesa (vsebnost vode, beljakovin, maščob in skupnih mineralnih snovi) smo analizirali na presnih vzorcih. Pripravili smo etanolne ekstrakte hmeljev 4 različnih sort dveh letnikov. V ekstraktih hmelja smo določili vsebnost ksantohumola, saj smo med sortami in letniki hmelja predvideli razlike v vsebnosti ksantohumola. Etanolne ekstrakte smo z rotavaporjem vezali na kuhinjsko sol. Vsebnosti ksantohumola in HCA smo po ekstrakciji in čiščenju s trdno fazo (SPE) določili na HPLC-MS.

Ugotovili smo, da presen goveji sekljanec povprečno vsebuje 77,0 % vode, 22,5 % beljakovin, 0,8 % maščob in 1,1 % skupnih mineralnih snovi. Vsebnost ksantohumola v hmelju letnika 2009 je največja pri sorti Bobek (1,22 mg/g), sledita Aurora (1,05 mg/g) in Celeia (0,54 mg/g). V hmelju letnika 2013 je največja vsebnost ksantohumola pri sorti Aurora (3,12 mg/g), sledijo Bobek (2,52 mg/g), Savinjski golding (1,39 mg/g) in Celeia (1,29 mg/g). Pri vseh sortah starejšega letnika (2009) je vsebnost ksantohumola 2- do 3-krat manjša v primerjavi s hmeljem letnika 2013.

Goveji sekljanec z dodanimi ekstrakti hmelja vsebuje povprečno 82,55 µg/kg skupnih HCA, od tega največ Glu-P-2 (22,35 µg/kg), MeIQx (19,36 µg/kg), PhIP (14,26 µg/kg) in harmana (13,62 µg/kg). V manjših količinah zasledimo še norharman (8,48 µg/kg), IQx (3,59 µg/kg) in IQ (0,90 µg/kg). Največ HCA (138,46 µg/kg) je nastalo v pečenem kontrolnem sekljancu z dodano kuhinjsko soljo brez ekstrakta hmelja. Vsebnost skupnih HCA se je statistično značilno zmanjšala pri obeh količinah dodanega ekstrakta hmelja, pri vseh sortah in obeh letnikih hmelja. Izmed dodanih ekstraktov hmelja, nastanek HCA v govejih sekljancih, najuspešneje preprečuje ekstrakt hmelja sorte Bobek s koncentracijo ksantohumola 1,5-2,0 mg/kg, (26,67 µg/kg), sledi Savinjski golding (32,61 µg/kg) s koncentracijo ksantohumola

0,5-1,0 mg/kg. Na splošno ne moremo potrditi, katera koncentracija ksantohumola najuspešneje zavira nastanek HCA, saj je odvisno od vsake sorte posebej. Lažje je ovrednotiti, katera količina dodanega ekstrakta vezanega na sol v večji meri preprečuje tvorbo HCA. Z dodanimi ekstrakti hmelja letnika 2009 je bila tvorba HCA manjša z dodatkom 0,5 g ekstrakta hmelja vezanega na sol. Razlike so statistično neznačilne, izjema je sorta Bobek. V letniku 2013 tvorbo HCA uspešneje zavira večja količina soli (1,0 g), razen pri sorti Aurora. Tudi v tem letniku so razlike statistično neznačilne, razen pri sorti Savinjski golding.

Naše hipoteze smo v večji meri potrdili, saj smo z dodanimi ekstrakti hmelja različnih sort in letnikov zmanjšali tvorbo HCA v govejih sekljancih. Želeli smo določiti koncentracijo ksantohumola, ki bi zagotavljala najmanjšo tvorbo HCA. V poskusu smo ugotovili, da na zmanjšanje HCA verjetno vplivajo tudi ostale komponente etanolnega ekstrakta hmelja. Zato ne moremo določiti koncentracije ksantohumola, ki bi največji meri znižala vsebnost HCA v govejih sekljancih. Sorta hmelja Aurora namreč najuspešneje zniža vsebnost HCA v koncentracijah ksantohumola 0,1-0,5 in 1,0-1,5 mg/kg, Bobek 0,1-0,5 in 1,5-2,0 mg/kg, Celeia 0,1-0,5 in 0,5-1,0 mg/kg ter Savinjski golding 0,5-1,0 mg/kg. Vsi sekljanci z dodanimi ekstrakti hmelja so bili senzorično sprejemljivi. Med kontrolnim sekljancem in sekljanci z dodanimi ekstrakti ni bilo čutiti senzoričnih razlik. Dokazali smo tudi, da ekstrakti različnih sort in letnikov hmelja različno delujejo na preprečevanje tvorbe HCA.

7 VIRI

- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave-funkcionalni dodatki k živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu-uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi 2008, Ljubljana, 17.-18. April 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Ahn J., Grün I.U. 2005. Heterocyclic amines: 1. Kinetics of formation of polar and nonpolar heterocyclic amines as a function of time and temperature. *Journal of Food Science*, 70, 2: 173-179
- Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt E.K., Becker T. 2014. *Humulus lupulus* -a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120: 289-314
- Ames J.M. 2003. Browning: Nonenzymatic. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 665-672
- AOAC Official Method 920.153. Ash of meat. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Cunniff P. (ed.). Washington, AOAC International. Chapter 39: 4-4
- AOAC Official Method 928.08. Nitrogen in meat Kjeldahl method. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Cunniff P. (ed.). Washington, AOAC International. Chapter 39: 5-6
- AOAC Official Method 950.46. Moisture in meat. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Cunniff P. (ed.). Washington, AOAC International. Chapter 39: 1-2
- AOAC Official Method 991.36. Fat (Crude) in meat and meat product. 1997. V: *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Cunniff P. (ed.). Washington, AOAC International. Chapter 39: 3-4
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203
- Balogh Z., Gray J.I., Gomaa E.A., Booren A.M. 2000. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 395-401

- Bermudo E., Ruiz-Calero V., Puignou L., Galceran M.T. 2005. Analysis of heterocyclic amines in chicken by liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 536: 83-90
- Boekel M.A.J.S. 2006. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24: 230-233
- Bordas M., Moyano E., Puignou L., Galceran M. T. 2004. Formation and stability of heterocyclic amines in meat flavour model system. Effect of temperature, time and precursors. *Journal of Chromatography B*, 802: 11-17
- Chen Q., Fu M., Chen M., Liu J., Liu X., He G., Pu S. 2012. Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 132: 619-623
- Cooper-Driver G.A. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56: 229-236
- Čerenak A., Ferant N. 2012. Sorte hmelja. V: Hmelj - od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 13-20
- Čerenak A., Pavlovič M., Oset Luskar M., Košir I.J. 2011. Characterisation of slovenian hop (*Humulus lupulus* L.) varieties by analysis of essential oil. *Hmeljarski bilten*, 18: 27-33
- Dong A., Lee J., Shin H.S. 2011. Influence of natural food ingredients on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties and chicken breasts. *Food Science and Biotechnology*, 20, 2: 359-365
- Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M. 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68: 939-953
- Ferant N. 2012. Hmelj: Rastlina hmelja. V: Hmelj od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 13-21
- Ferant N., Košir I.J. 2012. Hmelj: Kemijske lastnosti hmelja. V: Hmelj od sadike do storžkov. Čeh B. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 20-21
- Ferant N., Košir I.J., Livk J. 2012. Uporabnost hmelja. V: Priporočnik za hmeljarjenje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 130-134
- Ferk F., Huber W.W., Filipič M., Bichler J., Haslinger E, Mišik M., Nersesyan A., Grasl-Kraupp B., Žegura B., Knasmüller S. 2010. Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon

- induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo [4,5-f]quinoline (IQ). *Mutation Research*, 691: 17-22
- Finot P.A. 2003. Toxicology of nonenzymatic browning. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). 2nd ed. Amsterdam, Academic Press: 673-678
- Gibis M., Weiss J. 2010. Inhibitory effect of marinades with hibiscus extract on formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of fried beef patties. *Meat Science*, 85: 735-742
- Gibis M., Weiss J. 2012. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. *Food Chemistry*, 134: 766-774
- Gonçalves J.L., Alves V.L., Rodrigues F.P., Figueira J.A., Câmara J.S. 2013. A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers. *Journal of Chromatography A*, 1304: 42-51
- Hasnol N.D.S., Jinap S., Sanny M. 2014. Effect of different types of sugars in a marinating formulation on the formation of heterocyclic amines in grilled chicken. *Food Chemistry*, 145: 514-521
- Hrastar R., Kač M., Košir I.J. 2006. Vpliv sorte in lokacije na vsebnost ksantohumola v hmelju. *Hmeljarski bilten*, 13: 5-13
- IHPS. 2012. Katalog sort hmelja v Sloveniji. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 12 str.
<http://www.ihps.si> (november 2014)
- Ignat I., Volf I., Popa V.I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126: 1821-1835
- Jaeger H., Janositz A., Knorr D. 2010. The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathologie Biologie*, 58: 207-213
- Janoszka B. 2010. Heterocyclic amines and azaarenes in pan-fried meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry*, 120: 463-473
- Jinap S., Mohd-Mokhtar M.S., Farhadian A., Hasnol N.D.S., Jaafar S.N., Hajeb P. 2013. Effects of varying degrees of doneness on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and beef satay. *Meat Science*, 94: 202-207
- Kikugawa K. 1999. Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants. *Cancer Letters*, 143: 123-126

- Knize M.G., Salmon C.P., Mehta S.S., Felton J.S. 1997. Analysis of cooked muscle meats for heterocyclic aromatic amine carcinogenes. *Mutation Research*, 376: 129-134
- Kondjoyan A., Kohler A., Realini C.E., Portanguen S., Kowalski R., Clerjon S., Gatellier P., Chevolleau S., Bonny J.M., Debrauwer L. 2014. Towards models for the prediction of beef meat quality during cooking. *Meat Science*, 97: 323-331
- Košir I.J., Klezin J. 2012. Karakterizacija eteričnega olja sorte hmelja bobek. *Hmeljarski bilten*, 19: 17-27
- Leopoldini M., Russo N., Toscano M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125: 288-306
- Magalhães P.J., Guido L.F., Cruz J.M., Barros A.A. 2007. Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1150: 295-301
- Magalhães P.J., Vieira J.S., Gonçalves L.M., Pacheco J.G., Guido L.F., Barros A.A. 2010. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 3258-3268
- Martins S.I.F.S., Jorgen W.M.F., van Boekel M.A.J.S. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 364-373
- Mikyška A., Krofta K. 2012. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. *Journal of the Institute of Brewing*, 118: 269-279
- Motilva M.J., Serra A., Macià A. 2013. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, 1292: 66-82
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B*, 802: 3-10
- Oguri A., Suda M., Totsuka Y., Sugimura T., Wakabayashi K. 1998. Inhibitory effect of antioxidants on formation of heterocyclic amines. *Mutation Research*, 402: 237-245
- Oz F., Kaya M. 2011a. The inhibitory effect of red pepper on heterocyclic aromatic amines in fried beef *longissimus dorsi* muscle. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35: 806-812
- Oz F., Kaya M. 2011b. The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball. *Food Control*, 22: 596-600

- Önder F. C., Ay M., Sarker S.D. 2013. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus* L. and quantification of bioactive components by LC-MS/MS and GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10498-10506
- Pais P., Knize M.G. 2000. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *Journal of Chromatography B*, 747: 139-169
- Patzak J., Nesvadba V., Henychová A., Krofta K. 2010. Assessment of the generic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 136-145
- Polak T. 2003. Heterociklični aromatski amini v zoreni termično obdelani goveji dolgi hrbtni mišici. Doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93 str.
- Popłon'ski J., Tronina T., Huszcza E. 2013. Photochemical transformations of xanthohumol. *Tetrahedron Letters*, 54: 6035-6036
- Puangsoombat K., Jirapakkul W., Scott Smith J. 2011. Inhibitory activity of asian spices on heterocyclic amines formation in cooked beef patties. *Journal of Food Science*, 76, 8: 174-180
- Puangsoombat K., Scott Smith J. 2010. Inhibition of heterocyclic amine formation in beef patties by ethanolic extracts of rosemary. *Journal of Food Science*, 75, 2: 40-47
- Quelhas I., Petisca C., Viegas O., Melo A., Pinho O., Ferreira I.M.P.I.V.O. 2010. Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. *Food Chemistry* 122: 98-104
- Ristic A., Cichna M., Sontag G. 2004. Determination of less polar heterocyclic aromatic amines in standardised beef extracts and cooked meat consumed in Austria by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 802: 87-94
- Rode J., Zmrzлак M., Kovačević M. 2002. Hmeljna rastlina. V: Priporočnik za hmeljarjenje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 21-31
- Rounds L., Havens C.M., Feinstein Y., Friedman M., Ravishankar S. 2013. Concentration-dependent inhibition of *Escherichia coli* O127:H7 and heterocyclic amines in heated ground beef patties by apple and olive extract, onion powder and clove bud oil. *Meat Science*, 94: 461-467
- Santos F.J., Barcélo-Barrachina E., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., Persson E., Skog K., Messner C., Murkovic M., Nabinger U., Ristic A. 2004. Analysis of heterocyclic amines in food products: interlaboratory studies. *Journal of Chromatography B*, 802: 69-78

- Schijlen E. G. W. M., Ric de Vos C.H., van Tunen A.J., Bovy A.G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65: 2631-2648
- Skog K. 2004. Blue cotton, blue rayon and blue chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines-a review. *Journal of Chromatography B*, 802: 39-44
- Skog K.I., Johansson M.A.E., Jägerstad M.I. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 879-896
- Skog K., Solyakov A., Jägerstad M. 2000. Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to amino-carboniles in a meat juice model system. *Food Chemistry*, 68: 299-308
- Skog K. 2002. Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1197-1203
- Snyderwine E.G., Turesky R.J., Turteltaub K.W., Davis C.D., Sadrieh N., Schut H.A.J., Nagao M., Sugimura T., Thorgeisson U.P., Adamson R.H., Thorgeirsson S.S. 1997. Metabolism of food-derived heterocyclic amines in nonhuman primates. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376, 1-2: 203-210
- Stevens J.F., Taylor A.W., Deinzer M.L. 1999. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832: 97-107
- Stevens J.F., Page J.E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochemistry*, 65: 1317-1330
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. 2002. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 31-50
- Toribio F., Galceran M.T., Puinou L. 2000. Separation of heteroaromatic amines in food products. *Journal of Chromatography B*, 747: 171-202
- Turesky R.J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenes heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168: 219-227
- Vitaglione P., Fogliano V. 2004. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography B*, 802: 189-199
- Warzecha L., Janoszka B., Błaszczyk U., Stróżyk M., Bodzek D., Dobosz C. 2004. Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes. *Journal of Chromatography B*, 802: 95-106

Wong D., Cheng K.W., Wang M. 2012. Inhibition of heterocyclic amine formation by water-soluble vitamins in Maillard reaction model systems and beef patties. *Food Chemistry*, 133: 760-766

Zanoli P., Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 383-396

Yilmaz Y., Toledo R. 2005. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 93, 2: 273-278

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju doc. dr. Tomažu Polaku. Hvala za nesebično, strokovno pomoč, potrpežljivost, predvsem pa za vse spodbudne besede ob nastajanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Lei Demšar za somentorstvo in pomoč pri statistični obdelavi podatkov. Hvala tudi prof. dr. Blažu Cigiću za recenzijo naloge in Lini Burkan Makivić za hiter pregled.

Velika zahvala gre staršem, mama in ata, hvala ker sta mi s finančno in moralno podporo omogočila brezskrben študij. Petra in Sandi, hvala tudi vama.

Hvala tudi sošolcem in prijateljem za vse trenutke, ki smo jih v času študija preživeli skupaj ter za nasvete in vzpodbudo pri nastajanju magistrskega dela. Katja, tebi gre še posebna zahvala. Peter, hvala ker si mi vsa ta leta stal ob strani in ker verjameš vame.