

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Andreja KNEZ KNAFELJ

**VPLIV DODATKA BIOLOŠKO AKTIVNIH  
UČINKOVIN EKSTRAKTOV BRINA, BORA IN  
ROŽMARINA NA PREPREČEVANJE TVORBE HCA**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Andreja KNEZ KNAFELJ

**VPLIV DODATKA BIOLOŠKO AKTIVNIH UČINKOVIN  
EKSTRAKTOV BRINA, BORA IN ROŽMARINA NA  
PREPREČEVANJE TVORBE HCA**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

**THE EFFECT OF ADDING BIOLOGICALLY ACTIVE EXTRACT OF  
JUNIPER, PINE BARK AND ROSEMARY PLANT ON THE  
PREVENTION OF HCA FORMATION**

M. Sc. Thesis  
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2013

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

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

Mentorica: prof. dr. Lea Demšar

Somentor: doc. dr. Tomaž Polak

Recenzent: prof. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Andreja Knez Knafelj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 637.514.5: 641.526: 547.554: 577.1 (043) = 163.6
- KG piščančje meso / piščančji sekljanci / toplotna obdelava / biološko aktivne učinkovine / antioksidanti / rastlinski ekstrakti / ekstrakt rožmarina / ekstrakt skorje bora / ekstrakt brina / heterociklični aromatski amini / karcinogene spojine / mutagene spojine / senzorične lastnosti
- AV KNEZ KNAFELJ, Andreja, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
- SA DEMŠAR, Lea (mentorica)/POLAK, Tomaž (somentor)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2013
- IN VPLIV DODATKA BIOLOŠKO AKTIVNIH UČINKOVIN EKSTRAKTOV BRINA, BORA IN ROŽMARINA NA PREPREČEVANJE TVORBE HCA
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana)
- OP X, 59 str., 20 pregl., 15 sl., 126 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, kako dodatek različnih rastlinskih ekstraktov vpliva na preprečevanje tvorbe heterocikličnih aminov (HCA) v piščančjih sekljancih. Izdelali smo tri skupine sekljancev glede na vrsto in količino dodanih rastlinskih ekstraktov (0,7 ml, 1,4 ml in 2,1 ml ekstrakta domačih brinovih jagod z Vremščice, 1 ml, 2 ml, 3 ml ekstrakta skorje črnega bora z Vremščice, ter 1 ml, 2 ml in 3 ml ekstrakta rožmarina in kontrola) v treh ponovitvah. Tako pripravljene sekljance smo 4 minute pekli na dvoploščnem žaru pri temperaturi 250 °C, na še toplih opravili senzorično analizo, na ohlajenih in homogeniziranih pa smo določili osnovno kemijsko sestavo mesa, vsebnost skupnih fenolnih spojin in HCA. Dodatek različnih ekstraktov povzroča tuje arome in vonje, poslabša splošno sprejemljivost, ne povzroča pa neželjenih obarvanj na toplotno obdelanih sekljancih. Vsebnost skupnih fenolnih snovi je bila največja v sekljancih z dodatkom ekstrakta brina (0,85 mg/g), nato bora (0,76 mg/g) in rožmarina (0,72 mg/g). Dodatek ekstrakta brina pušča močne tuje arome. Sekljanci z dodanimi rastlinskimi ekstrakti so v povprečju vsebovali 35 ng HCA/g. Pečeni piščančji sekljanci v povprečju vsebujejo največ PhIP (15,77 ng/g), Glu-P-2 (9,07 ng/g), norharmana (4,07 ng/g), harmana (3,80 ng/g), MeIQx (1,16 ng/g), ostalih HCA pa je manj kot 1 ng/g (4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx). Dodatki rastlinskih ekstraktov rožmarina, brina in bora zmanjšajo tvorbo 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx ter PhIP, medtem ko na vsebnost MeIQx, Harmana, Norharmana in Glu-P-2 ne vplivajo. V pečenem kontrolnem piščančjem sekljancu brez dodanih rastlinskih ekstraktov je nastalo 57,67 ng HCA/g. Najbolj uspešno nastanek HCA v pečenih piščančjih sekljancih preprečuje dodatek ekstrakta brina (19,35-33,95 ng/g), sledi dodatek rožmarina (28,83-37,36 ng/g) in najmanj ekstrakt bora (39,62-56,67 ng/g). Ob upoštevanju splošne senzorične sprejemljivosti in uspešnosti preprečevanja nastanka HCA lahko povzamemo, da je za piščančje sekljance najbolj primeren dodatek 1 ml ekstrakta skorje bora.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 637.514.5: 641.526: 547.554: 577.1 (043) = 163.6

CX chicken meat / chicken trimmings / thermal treatment / biologically active compounds / antioxidants / plant extracts / rosemary plant extracts / pine bark extracts / extract of juniper / heterocyclic aromatic amines / carcinogens / mutagens / sensory analysis

AU KNEZ KNAFELJ, Andreja

AA DEMŠAR, Lea (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/CIGIČ, Blaž (reviewer)

PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2013

TI THE EFFECT OF ADDING BIOLOGICALLY ACTIVE EXTRACT OF JUNIPER, PINE BARK AND ROSEMARY PLANT ON THE PREVENTION OF HCA FORMATION

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)

NO X, 59 p., 20 tab., 15 fig., 126 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of the study was to determine how the addition of various plant extracts affected the prevention of the formation of heterocyclic amines (HCA) in chicken meat trimmings. We prepared three groups of meat trimmings depending on the type and amount of added plant extracts (0.7 ml, 1.4 ml and 2.1 ml of the extract of domestic juniper berries from Vremščica, 1 ml, 2 ml, 3 ml of the extract of black pine bark from Vremščica and 1 ml, 2 ml and 3 ml of rosemary extract and a control) in three replications. Meat trimmings prepared in this way were baked for 4 minutes at 250 °C on a two plated grill. Still warm meat trimmings were sensory evaluated. Chilled meat trimmings were homogenized and determined their basic chemical composition, content of total phenolic compounds and HCA. Sensory analysis showed that addition of the extracts causes foreign flavors and odors, worsens general acceptability, but no undesirable colorations discoloration was observed on the heat-treated meat trimmings. The content of the total phenolics was greater in the meat trimmings with the addition of juniper (0.85 mg/g), pine extract (0.76 mg/g), rosemary (0.72 mg/g). The addition of the juniper extract leaves a strong foreign flavor. Meat trimmings with plant extract additions contained on average 35 ng of HCA/g. Chicken meat trimmings, average grilled, contained a the greatest occurrence of PhIP (15.77 ng/g), Glu-P-2 (9.07 ng/g), norharman (4.07 ng/g), harman (3.80 ng/g), MeIQx (1.16 ng/g), presence of other HCA was less than 1 ng/g (4.8-DiMeIQx and 7.8-DiMeIQx). Additions of plant extracts such as rosemary, juniper and pine reduce the formation of 4,8-DiMeIQx and 7,8-DiMeIQx and also PhIP, while MeIQx, harman, norharman and Glu-P-2 do not. However, 57.67 ng/g of HCA was formatted in the baked chicken meat trimmings without added plant extracts (a control). The formation of HCA in grilled chicken meat trimmings is the most successfully prevented by the addition of juniper extract (19.35 to 33.95 ng/g), followed by the addition of rosemary (from 28.83 to 37.36 ng/g) and at least extract of pine bark (39.62 to 56.67 ng/g). According to the overall sensory acceptability and effectiveness of prevention of HCA occurrence we can conclude that the addition of 1 ml of pine bark extract for the chicken meat trimmings is the most suitable.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE FENOLNIH SPOJIN.....	3
2.2 ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA MESA .....	5
2.3 NARAVNI ANTIOKSIDANTI.....	6
<b>2.3.1 Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2 Bor (<i>Pinus</i>).....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 Brin (<i>Juniperus communis</i>).....</b>	<b>10</b>
2.4 PIŠČANČJE MESO .....	12
<b>2.4.1 Sestava piščančjega mesa.....</b>	<b>12</b>
2.4.1.1 Voda.....	12
2.4.1.2 Ogljikovi hidrati .....	12
2.4.1.3 Beljakovine.....	12
2.5 PREKURZORJI HCA V PIŠČANČJEM MESU .....	12
<b>2.5.1 Kreatin in kreatinin.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5.2 Ogljikovi hidrati .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.3 Proste aminokisline.....</b>	<b>13</b>
2.6 SPLOŠNO O HCA .....	13
<b>2.6.1 Nepolarni oz. pirolizni HCA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6.2 Polarni HCA oz. aminoimidazoazaareni (AIA).....</b>	<b>16</b>
2.7 HCA V TOPLOTNO OBDELANEM PIŠČANČJEM MESU .....	16
2.8 NAČINI ZMANJŠANJA TVORBE HCA .....	17
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>21</b>
3.1 MATERIAL IN NAČRT DELA .....	21
3.2 METODE DELA .....	22
<b>3.2.1 Določanje osnovne kemijske sestave mesa z metodo NIR.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2 Izračun izgube mase med pečenjem.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.3 Senzorično ocenjevanje piščančjih sekljancev z dodanimi ekstrakti.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.4 Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu .....</b>	<b>23</b>

3.2.4.1	Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin.....	24
3.2.4.2	Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v ekstraktih .....	24
3.2.4.3	Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v sekljancih.....	25
<b>3.2.5</b>	<b>Določanje suhe snovi v ekstraktih bora, brina in rožmarina .....</b>	<b>26</b>
3.2.5.1	Izračun skupnih fenolnih spojin v 1 gramu suhe snovi ekstraktov.....	26
<b>3.2.6</b>	<b>Določanje vsebnosti HCA v pečenih piščančjih sekljancih.....</b>	<b>27</b>
3.2.6.1	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije.....	27
3.2.6.2	Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom in internim standardom .....	29
3.2.6.3	Izkoristek postopka čiščenja z ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) .....	29
3.2.6.4	Statistična analiza .....	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>30</b>
4.1	DOLOČANJE OSNOVNE KEMIJSKE SESTAVE PIŠČANČJEGA MESA Z NIR METODO .....	30
4.2	IZGUBA MASE MED TOPLOTNO OBDELAVO .....	30
4.3	REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE .....	31
4.4	DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN Z METODO FC .....	33
4.5	DOLOČANJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH BORA, BRINA IN ROŽMARINA .....	36
4.6	DOLOČANJE VSEBNOSTI HCA V PEČENIH PIŠČANČJIH SEKLJANCIH .....	37
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>40</b>
5.1	RAZPRAVA.....	40
5.1.1	Senzorična analiza .....	41
5.1.2	Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu .....	42
5.1.3	Določanje suhe snovi v ekstraktih bora, brina in rožmarina .....	44
5.1.4	Določanje vsebnosti HCA v pečenih piščančjih sekljancih.....	44
5.2	SKLEPI.....	47
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>50</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula katehina (D'Andrea, 2010).....	8
Slika 2: Strukturna formula epikatehina (D'Andrea, 2010).....	8
Slika 3: Strukturna formula proantocianidina (Queiroz in sod., 2002) .....	9
Slika 4: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram in Simčič, 1997; Abram, 2000).....	9
Slika 5: HPLC-DAD analiza ekstrakta brina ( <i>Juniperus drupacea</i> ) v metanolu (Miceli in sod., 2011).....	11
Slika 6: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin .....	24
Slika 7: Vpliv dodatka ekstraktov rožmarina, jagod brina in skorje bora na tuje vonje in arome v pečenih piščančjih sekljancih .....	41
Slika 8: Vpliv dodatka ekstraktov rožmarina, jagod brina in skorje bora na sprejemljivost pečenih piščančjih sekljancev .....	42
Slika 9: Koncentracija skupnih fenolnih spojin določena z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brina, bora in rožmarina, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta.....	44
Slika 10: Koncentracije dodanih antioksidantov, iz ekstraktov rožmarina, brina in bora, posameznemu piščančjemu sekljancu v mg antioksidanta na celoten sekljanec, izraženo kot galna kislina.....	44
Slika 11: Povprečna koncentracija skupnih fenolnih spojin v mg/l ekstrakta sekljanca izraženih kot galna kislina .....	44
Slika 12: Povprečne vsebnosti HCA v ng HCA na gram pečenega piščančjega sekljanca.....	45
Slika 13: Vsota vseh HCA nastalih med toplotno obdelavo pri kontrolnem sekljancu in v sekljancih z dodatkom rastlinskih ekstraktov .....	46
Slika 14: Vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov na tvorbo PhIP v pečenih piščančjih sekljancih .....	46
Slika 15: Vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov na znižanje tvorbe 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQX v pečenih piščančjih sekljancih.....	46



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih snovi v rastlinah (Balasundram in sod., 2006).....	4
Preglednica 2: Retencijski časi, absorpcijski vrhovi ter protonirani in deprotonirani ioni nekaterih snovi prisotnih v rožmarinu (Almela in sod., 2006).....	7
Preglednica 3: Delitev fenolnih spojin (Vrhovšek in sod., 1996) .....	10
Preglednica 4: Snovi, identificirane v ekstraktu brina ( <i>Juniperus drupacea</i> ) (Miceli in sod., 2011).....	11
Preglednica 5: Kratice in imena HCA (Murkovic in sod., 2004).....	15
Preglednica 6: Skupine piščančjih sekljancev na osnovi dodatka različnih rastlinskih ekstraktov.....	21
Preglednica 7: Gradient tekočinske kromatografije .....	28
Preglednica 8: Pogoji detekcije na masnem spektrometru v SIR (Selected Ion Recording) načinu.....	28
Preglednica 9: Rezultati osnovne kemijske analize presnega piščančjega fileja in pečenih piščančjih sekljancev .....	30
Preglednica 10: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na izgubo mase med toplotno obdelavo (250 °C/4 min) piščančjih sekljancev (Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ) .....	30
Preglednica 11: Rezultati senzorične analize piščančjih sekljancev, izdelanih z različnimi dodatki ekstraktov, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri ( $n = 120$ ).....	31
Preglednica 12: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na senzorično oceno obarvanja, tuje vonje in arome ter sprejemljivost pečenih piščančjih sekljancev (Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ) .....	32
Preglednica 13: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brina, bora in rožmarina, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta.....	34
Preglednica 14: Rezultati določanja koncentracije dodanih antioksidantov, iz ekstraktov rožmarina, brina in bora, posameznemu piščančjemu sekljancu v mg antioksidanta na celoten sekljanec, izraženo kot galna kislina.....	34
Preglednica 15: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v piščančjih sekljancih, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta sekljanca, mg na gram piščančjega sekljanca in mg na celotni pečeni piščančji sekljanec. ....	34
Preglednica 16: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na vsebnost skupnih fenolnih spojin v piščančjih sekljancih po toplotni obdelavi, določenih z metodo Folin-Ciocalteu, izraženi kot galna kislina v mg na liter ekstrakta, mg na gram sekljanca in mg na celotni 90 g piščančji sekljanec (Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ). ....	35
Preglednica 17: Količina skupnih fenolnih snovi v 1 g suhe snovi ekstrakta skorje bora, jagod brina in rožmarina.....	36

Preglednica 18: Rezultati določanja HCA v piščančjih sekljancih z dodanimi rastlinskimi ekstrakti z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 60) .....	37
Preglednica 19: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na tvorbo posameznih HCA (ng HCA/g) v toplotno obdelanih piščančjih sekljancih (Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	38
Preglednica 20: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na tvorbo vseh identificiranih HCA (ng HCA/g) v toplotno obdelanih piščančjih sekljancih (Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	39

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A $\alpha$ C	2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol
AIA	aminoimidazo - azaareni
BHA	butiliran hidroksianizol
BHT	butiliran hidroksitoluen
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FC	Folin – Ciocalteu
Glu-P-1	2-amino-6- metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
HCA	heterociklični amini
HPLC	(angl. High Performance Liquid Chromatography), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC/MS	tekočinska kromatografija v povezavi z masno spektrometrijo
IARC	(ang. International Agency for Research on Cancer), Mednarodna agencija za raziskavo raka
[M+H] <sup>+</sup>	protonirani ioni
[M+H] <sup>-</sup>	deprotonirani ioni
MeA $\alpha$ C	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
NIR	bližnja infrardeča spektroskopija
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
R <sup>2</sup>	koeficient determinacije
SFS	skupne fenolne snovi
SPE	(angl. Solid Phase Extraction), ekstrakcija na trdni fazi
SS	suha snov
TAC	(angl. Total Antioxidant Capacity), antioksidativna kapaciteta
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol
T <sub>s</sub>	središčna temperatura
VNМК	večkratnenasičene maščobne kisline
1 BO	1 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
2 BO	2 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
3 BO	3 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
0,7 BR	0,7 ml ekstrakta brinovih jagod (Vremščica, 1000 m n.v.)
1,4 BR	1,4 ml ekstrakta brinovih jagod (Vremščica, 1000 m n.v.)
2,1 BR	2,1 ml ekstrakta brinovih jagod (Vremščica, 1000 m n.v.)
1 R	1 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
2 R	2 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
3 R	3 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]kinoksalin
7,8-DiMeIQx	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin

## 1 UVOD

Meso ima pomembno mesto v tradicionalni prehrani ljudi, zaradi svoje privlačne arome, teksture in predvsem visoke hranilne vrednosti. Čeprav ga opredeljujemo kot beljakovinsko živilo, je glede na svojo sestavo tudi pomemben vir drugih hranilnih snovi, kot so esencialne maščobne kisline ter biološko visokovredni vitamini in minerali. V uravnoteženi prehrani človeka so vse te komponente zaželjene in obenem nujno potrebne (Ferguson, 2009; Oz in sod., 2010a).

Rak in druge civilizacijske bolezni, v razvitih deželah iz dneva v dan naraščajo. Kar tretjina vseh onkoloških obolenj je neposredno povezanih z načinom prehranjevanja. Različne raziskave dokazujejo, da je dolgoročno uživanje hrane, ki vsebuje prokarcinogene spojine lahko nevarno.

Skupno vsem karcinogenim dejavnikom je, da spremenijo celično DNA. Dokazano je, da heterociklični amini (HCA) lahko povzročijo nastanek raka na različnih tarčnih organih, kajti to so spojine z visokim mutagenim in karcinogenim potencialom in že majhna količina metabolitov HCA, ki se veže na DNA, je lahko dovolj za nastanek tumorjev in drugih toksičnih učinkov (Došler, 2007).

Dodatek HCA v prehrano miši in podgan inducira rast tumorjev na različnih organih teh živali: na jetrih, pljučih, želodcu, debelem in tankem črevesju, prostati, mlečnih žlezah, koži (Jägerstad in Skog, 2005).

Vrsta in količina nastalih HCA tekom toplotne obdelave je odvisna od vrste mesa, mišičnine, fizikalnih parametrov, kot so čas in temperatura toplotne obdelave, središčna temperatura ob koncu pečenja, način toplotne obdelave, predvsem pa od vsebnosti prekursorjev HCA ter dodatka aditivov in različnih začimb.

HCA nastanejo predvsem z neencimskim porjavenjem oziroma Maillardovo reakcijo. Ugotovljeno je, da so prekursorji HCA proste aminokisline in monosaharidi ter da je za tvorbo polarnih HCA obvezna prisotnost kreatina oz. kreatinina. Natančni mehanizmi nastanka HCA še vedno niso povsem znani, zato ostajajo predmet nadaljnjih raziskav (Lukan, 2010).

Dejstvo je, da se med klasičnimi postopki toplotne obdelave mesa tvorijo HCA, za katere so številne epidemiološke raziskave pokazale potencialno karcinogenost za človeka. Z namenom zmanjšanja tvorbe HCA v mesu so bili opravljeni že številni poskusi modifikacij in optimizacije postopkov toplotne obdelave ter uporabe raznih dodatkov, ki inhibirajo tvorbo HCA.

Eden od načinov kako zmanjšati tvorbo HCA v toplotno obdelanem mesu je tudi ta, da mesu pred toplotno obdelavo dodamo začimbe, kot na primer rožmarin, bor, brin, ki zmanjšujejo nastanek HCA, kot smo dokazali v tem magistrskem delu.

## 1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil zmanjšati tvorbo HCA v pečenih piščančjih sekljancih. To smo poskušali storiti z dodatkom biološko aktivnih učinkovin ekstraktov brina, bora in rožmarina. Ugotoviti smo želeli tudi, katere koncentracije omenjenih rastlinskih ekstraktov najbolj optimalno preprečujejo tvorbo HCA in ali so te koncentracije sprejemljive tudi s senzoričnega vidika.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bo dodatek ekstraktov iz jagod brina, skorje bora in rožmarina zmanjšal tvorbo HCA v pečenih piščančjih sekljancih.

Predpostavili smo, da bomo določili najmanjši dodatek ekstrakta, ki bo uspešno zavrnil tvorbo HCA, hkrati pa zagotovil sprejemljivo senzorično kakovost piščančjih sekljancev.

Predpostavili smo, da bodo ekstrakti iz jagod brina, skorje bora in rožmarina, kazali različno sposobnost preprečevanja tvorbe HCA in posledično različno vplivali na senzorično kakovost sekljancev.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE FENOLNIH SPOJIN

Antioksidanti so naravne ali sintetične snovi, ki imajo sposobnost, da že v majhnih koncentracijah preprečujejo ali zavirajo nezaželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih. Z biološkimi sistemi je mišljena hrana in živi organizmi (Salobir, 2000). So tiste sestavine živil oz. tisti dodatki živilom, ki so bodisi lovilci prostih radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšujejo pojav žarkosti živil in druge oksidativne spremembe senzoričnih in prehranskih lastnosti živil (Lolinger, 1991).

Osrednji cilj uporabe antioksidantov v živilih je preprečiti oksidacijo lipidnih komponent, zaradi katere živila izgubijo na kakovosti, spremeni pa se jim tudi hranilna vrednost. Z dodatkom antioksidantov se prepreči pojav nezaželene arome in barve, razgradnja nekaterih pomembnih vitaminov in tvorba sekundarnih, potencialno toksičnih spojin (Moure in sod., 2001).

Količina antioksidantov v hrani je odvisna od tega, katero vrsto rastline izberemo, in od načina predelave (Velioglu in sod. 1998).

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več hidroksilnih skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več hidroksilnimi skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime – polifenoli (Abram in Simčič, 1997; Strack, 1997).

Polifenoli so sekundarni metaboliti rastlin, ki imajo dobre antioksidativne lastnosti in jih uvrščamo med biološko aktivne spojine. Hidroksilne skupine jim omogočajo antioksidativno delovanje (Haslam, 1998). Zelene rastline jih uporabljajo za zaščito pred sevanji (zlasti ultravijoličnim sevanjem) ter za obrambo pred boleznimi, škodljivci in drugimi stresnimi dejavniki (Kreft in sod., 2000).

Največjo skupino rastlinskih fenolov predstavljajo flavonoidi, spojine z majhno molekularno maso, zgrajene iz petnajstih ogljikovih atomov s konfiguracijo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Balasundram in sod., 2006).

### Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih snovi v rastlinah (Balasundram in sod., 2006)

Skupina	Strukturna formula
enostavni fenoli, benzokvinoni	$C_6$
hidroksibenzojske kisline	$C_6-C_1$
fenilacetne kisline	$C_6-C_2$
hidroksicimetne kisline, fenilpropeni (kumarini, izokumarini, kromoni, kromeni)	$C_6-C_3$
naftokinoni	$C_6-C_4$
ksantoni	$C_6-C_1-C_6$
stilbeni, antrakinoni	$C_6-C_2-C_6$
flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6-C_3-C_6$
lignini, neolignini	$(C_6-C_3)_2$
biflavonoidi	$(C_6-C_3-C_6)_2$
lignini	$(C_6-C_3)_n$
kondenzirani tanini(proantocianidini ali flavoloni)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Antioksidativna učinkovitost izoliranih fenolnih spojin je odvisna tako od njihove kemijske strukture, postopka izolacije, vrste in polarnosti ekstrakcijskega topila, čistosti aktivne komponente, kot tudi od testnega sistema, izbire matriksa (topila) in substance, ki jo mora nek antioksidant zaščititi (Rice-Evans in sod., 1996; Moue in sod., 2001; Foti, 2007; Robards, 2003). Ekstrakti rastlinskega izvora so tako vedno kompleksna mešanica najrazličnejših fenolnih spojin, od njihovih najbolj enostavnih do visoko polimeriziranih oblik. Pogosto je neizogiben tudi dodaten korak, s katerim iz vzorca odstranimo nezaželene spojine, kot so razni voski, maščobe, terpeni. Ekstrakcija na trdni fazi (SPE) je ena izmed pogosteje uporabljenih tehnik čiščenja ekstraktov (Naczki in Shahidi, 2006).

Zaradi potencialne toksičnosti sintetičnih antioksidantov in ozaveščenosti kupcev, ki težijo k nakupu živil čim bolj naravnega izvora, mesna industrija zavzeto išče izvore naravnih antioksidantov. Rastline so dober vir polifenolov in zato dobra alternativa sintetičnim antioksidantom, kot sta butiliran hidroksianizol (BHA) in butiliran hidroksitoluen (BHT). Pri izbiri alternativ je bistvenega pomena senzorična sprejemljivost in vpliv na kakovost samega izdelka po dodatku antioksidanta (Karre in sod., 2013).

Uporabo antioksidantov v živilski industriji ureja država z zakoni in predpisi ali internacionalnimi standardi. V Evropski Uniji o uporabi antioksidantov odloča Evropski parlament in Direktiva evropskega parlamenta in sveta št. 95/2/ES z dne 20. februarja 1995, o aditivih za živila razen barvil in sladil (1995).

Druga organizacija, ki ureja uporabo antioksidantov v živilih, pa je *Codex Alimentarius*, zbirka pravno neobvezujočih mednarodnih standardov za živila, smernic, priporočil in dobre prakse, ki so namenjeni pridelovalcem in predelovalcem hrane, državnim organom ter potrošnikom (Mikova, 2001).

Leta 2010 je Evropska Unija odobrila uporabo ekstrakta rožmarina, kot novega prehranskega aditiva za uporabo v živilski industriji, z Direktivama 2010/67/EU in

2010/69/EU in mu dodelila številko E in sicer E 392. Z odobritvijo karnozolne kisline in karnozola iz ekstrakta rožmarina, kot varnega naravnega antioksidanta – alternativa sintetičnim antioksidantom, se je začel pojavljati trend po odkrivanju novih, naravnih antioksidantov (Karre in sod., 2013).

## 2.2 ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA MESA

Meso ima v prehrani človeka velik pomen, predvsem zaradi velike vsebnosti visoko kakovostnih proteinov, ki so vir esencialnih aminokislin. Vsebuje tudi mnogo esencialnih mikrohranil, kot so nekatere nenasičene maščobne kisline, vitamini in minerali (Tornberg, 2005).

Meso je zaradi kompleksne fizikalne in kemijske zgradbe močno podvržen oksidaciji (Wood in sod., 2008). Oksidativna stabilnost mesa je zato močno odvisna od ravnotežja in medsebojnega vpliva endogenih anti- in pro- oksidativnih snovi ter od sestave substrata nagnjenega k oksidaciji, vključujoč večkratnenasičene maščobne kisline (VNMK), holesterol, proteine in pigmente (Bertelsen in sod., 2000). Endogeni antioksidativni sistem sestoji iz neencimskih hidrofilnih in lipofilnih snovi, kot so vitamin E, vitamin C, karotenoidi, ubikvini, polifenoli, celični tioli in encimi superoksid dismutaze, katalaze in glutation-peroksidaze. Encimski in neencimski antioksidativni sistem deluje tako, da preprečuje oksidacijo v mišičnem tkivu v živih živalih in tudi po zakolu (Chan in Decker, 1994).

Sestava endogenih antioksidantov in pro-oksiantov se razlikuje glede na vrsto živali, kot tudi znotraj iste vrste, če so živali hranjene z različno krmo (Pradhan in sod., 2000; Descalzo in sod., 2007).

Meso pred uživanjem toplotno obdelamo in tekom toplotne obdelave se spreminja tako struktura kot tudi sestava mesa, kar vpliva na skupno vsebnost antioksidantov v mesu, tako imenovano TAC vrednost (Palka in Daun, 1999; Tornberg, 2005).

Skupna vsebnost antioksidantov v mesu (TAC) narašča tekom toplotne obdelave 5 do 10 minut, nato pa začne upadati. Razlog temu je denaturacija proteinov, ki so glavna sestavina mesa.

Toplotna obdelava spremeni sekundarno in terciarno strukturo proteina (Tironi in sod., 2002; Sante-Lhoutellier in sod., 2007). Razvijanje proteina poveča zmožnost vezave prostih radikalov zaradi večje dostopnosti aminokislin, ki imajo vlogo antioksidantov. Te aminokisline so pred toplotno obdelavo v nepolarni sredici nativne oblike proteina in ne morejo reagirati s prostimi radikali (Elias in sod., 2007).

Po 15. minutah toplotne obdelave začne TAC vrednost pri piščančjem in govejem mesu ter ribah zopet naraščati. Razlog je Maillardova reakcija, reakcija med reducirajočimi sladkorji in prostimi aminokislinami. Produkti, ki pri tem nastajajo delujejo kot antioksidanti, zato se TAC vrednost poveča (Bailey in Um, 1992; Borrelli in sod., 2002; Serpen in sod., 2012).



## 2.3 NARAVNI ANTIOKSIDANTI

Vedno večji interes živilske industrije po zamenjavi sintetičnih antioksidantov z naravnimi, se kaže s številnimi raziskavami opravljenimi na tem področju. Vzrok zamenjave je tudi potencialna toksičnost sintetičnih antioksidantov in visoki stroški pridobivanja le teh.

Rastline sintetizirajo veliko različnih, kompleksnih molekul, ki nimajo neposrednega vpliva na rast ali metabolno aktivnost. To so t.i. sekundarni metaboliti. So potencialni vir naravnih antioksidantov, na primer fenolni diterpeni, flavonoidi, tanini in fenolne kisline (Dawidowicz in sod., 2006).

Z dodatkom antioksidantov se prepreči pojav nezaželenih arome in barve, razgradnja nekaterih pomembnih vitaminov in tvorba sekundarnih, potencialno toksičnih spojin (Moure in sod., 2001).

### 2.3.1 Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*)

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) je olesenela zimzelena večletna rastlina, ki izvira iz južne Evrope in pripada družini usnatic (*Lamiaceae*). Zaradi svojih aromatskih, antioksidativnih, antimikrobnih in protitumorskih lastnosti je zelo cenjena in raziskana rastlina (Almela in sod., 2006). Odpornost proti suši mu omogoča, da brez težav uspeva v mediteranskem podnebju (Petersen in Simmonds, 2003).

Rezultati različnih raziskav kažejo na to, da ima rožmarin zelo dobro antioksidativno aktivnost, identično čistemu  $\alpha$ -tokoferolu in večjo kot butiliran hidroksitoluen (BHT) (Almela in sod., 2006).

Antioksidativno aktivnost rastlinskih ekstraktov povezujemo z njihovimi fenolnimi snovmi, katere lahko pri rožmarinu razdelimo v tri skupine in sicer fenolni diterpeni, flavonoidi in fenolne kisline (Almela in sod., 2006).

Glavni antioksidanti v rožmarinu so karnozolna kislina in karnozol, abietinski diterpeni, rožmarinska kislina in estri hidroksicimetne kisline. Vse te snovi imajo skupaj z ostalimi izoprenoidi (steroli, izopreni, mono in diterpeni, tokoferoli ali karotenoidi) vlogo fotozaščite in se štejejo za biološko aktivne snovi rožmarina (Almela in sod., 2006).

V izvlečku iz listov rožmarina lahko kar 90 % antioksidativnega delovanja pripišemo karnozolu in karnozolni kislini (Huang in Zheng, 2006).

Karnozolna kislina nastane iz izopentil difosfata preko metileritriol fosfata in se nahaja v kloroplastih in drugih intracelularnih membranah, prav tako kot karnozol, ki nastane z oksidacijo karnozojnske kisline.

Rožmarinska kislina je ester kavne in 3,4-dihidroksifenilmlečne kisline. Prekursorja za njeno sintezo sta dve aromatski aminokislini, tirozin in fenilalanin (Petersen in Simmonds, 2003).

Količine teh snovi zelo variirajo od pogojev okolja, v katerem rožmarin raste (Almela in sod., 2006).

Raziskava, ki jo je opravil Erkan s sodelavci, (2008) navaja, da je v ekstraktu rožmarina približno 6 % karnozolne kisline in 8 % rožmarinske kisline. Z uporabo Folin-Ciocalteujeve metode so določili tudi skupno vsebnost fenolnih snovi v ekstraktu rožmarina, ki je znašala 162 mg/g izraženih kot galna kislina.

V raziskavi, ki jo je opravil Almela s sodelavci (2006), so določili retencijske čase, absorpcijske vrhove in protonirane ter deprotonirane ione nekaterih snovi prisotnih v rožmarinu, kar je prikazano v preglednici 2.

**Preglednica 2: Retencijski časi, absorpcijski vrhovi ter protonirani in deprotonirani ioni nekaterih snovi prisotnih v rožmarinu (Almela in sod., 2006)**

snovi	retencijski čas (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>
6-hidroksiluteolin-7-GI	6,50	(255), 274, 347	465,2	
homoplantagin	12,45	270, 340	463,0	461,3
rožmarinska kislina	13,02	(290), 330		359,1
skutelarein	14,72	272, 334	287,0	
kirsimaritin	19,72	216, 278, 336	315,1	
rozmanol	20,00	287	347,1	
epirozmanol	20,46	(230), 289	347,1	
epiisorozmanol	21,01	287	347,2	
epirozmanol metil eter	24,00	(230), 289	361,2	359,2
genkvanin	21,82	270, 338	285,1	
karnozol	24,53	287	331,2	
rozmadial	25,50	235, 289		343,2
4'-metoksitektokrisin	26,40	270, 332	299,1	
karnozinska kislina	28,42	(238), 287	333,2	331,3
metil karnozat	31,52	(236), 285		345,8
apigenin			271,1	

Nekatere raziskave dokazujejo, da lahko z dodatkom antioksidantov v mesu zmanjšamo tvorbo heterocikličnih aminov. Med potekom Maillardove reakcije se namreč tvorijo radikali, ki jih antioksidanti vežejo in tako zmanjšajo tvorbo rakotvornih HCA (Murkovic in sod., 1998). Gibis in Weiss (2012) sta dokazala zmanjšano tvorbo MeIQx in PhIP v mariniranih govejih sekancih, z dodatkom rožmarinovega ekstrakta v sončničnem olju (*Rosmarinus officinalis*; 0,12, 0,2, 0,6, 1,0 in 1,5 g/100 g). Vsebnost MeIQx in PhIP se je zmanjšala za kar 57 % in 90 % pri uporabi marinad z večjimi koncentracijami ekstrakta rožmarina.

### 2.3.2 Bor (*Pinus*)

Bor (*Pinus*) je iglasto drevo iz rodu borovcev (*Pinus*) v družini borovk (*Pinaceae*). Je zimzelena rastlina, domorodna na večjem delu severne poloble. Obstaja približno 80 vrst borov med katerimi so pomembnejše vrste: rdeči bor (*Pinus sylvestris*), črni bor (*Pinus nigra*), obmorski bor (*Pinus pinaster*) in karibski bor (*Pinus caribae*) (Praprotnik, 2002).

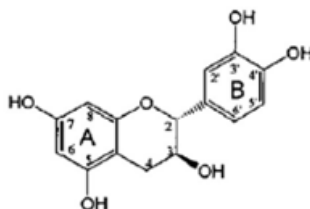
Bor je eden izmed industrijsko najbolj pomembnih drevesnih vrst, cenjen zaradi lesa, lesne celuloze, terpentina in užitnih semen (pinjole) (Gernandt in sod., 2005).

Borova skorja je bila še pred nekaj leti v lesni industriji nekoristen odpadek z zelo omejeno uporabo. Danes pa jo zaradi velike vsebnosti naravnih polifenolov uporabljajo v prehrani, farmaciji in zdravstvu (Kähkönen in sod., 1999).

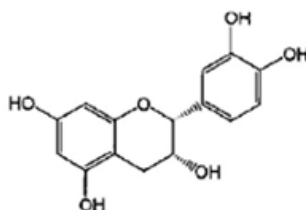
Med najbolj raziskanimi vrstami bora je francoski obmorski bor *Pinus pinaster*, iz skorje katerega pridobivajo koncentriran naravni izvleček piknogenol.

Piknogenol vsebuje med 65 % in 75 % proantocianidinov. Glavni del predstavljata katehin in epikatehin. V manjših količinah pa vsebuje tudi fenolne kisline, derivate cimetine kisline, kot npr. galna, kavna, ferulna in kumarna kislina.

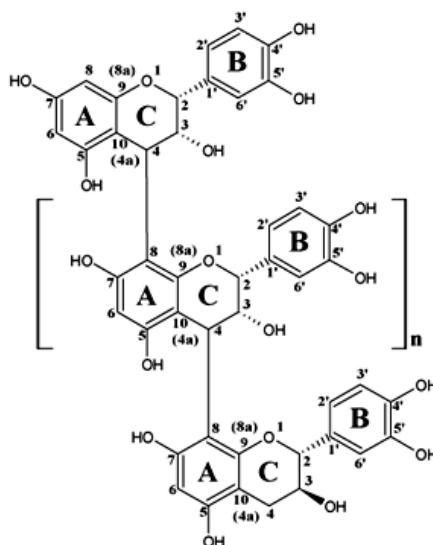
Proantocianidini nastanejo s polimerizacijo flavan-3-olov in so sicer njihovi di-, tri- in tetrameri (Plahuta, 2004).



Slika 1: Strukturna formula katehina (D'Andrea, 2010)

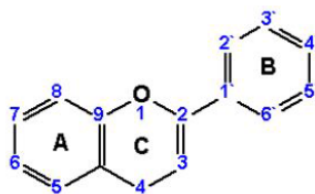


Slika 2: Strukturna formula epikatehina (D'Andrea, 2010)



**Slika 3: Strukturna formula proantocijanidina (Queiroz in sod., 2002)**

Fenolne kisline, polifenoli in posamezni flavonoidi so zgrajeni iz enega ali več aromatskih obročev, na katere je direktno vezanih najmanj ena ali več -OH skupin in so zaradi tega sposobni loviti proste radikale (Rice-Evans in sod., 1996). Osnovno strukturno formulo flavonoidov oziroma 2-fenilbenzopirana prikazuje slika 4.



**Slika 4: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram in Simčič, 1997; Abram, 2000)**

Med flavonoide spadajo spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C3 obroča, kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B in C. Zato ne preseneča podatek, da je do sedaj poznanih že več kot 5000 različnih flavonoidov. V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani, kar pomeni, da imajo na obroč vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza) ali pa tudi daljše verige. Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon (Abram, 2000).

Po aglikonu flavonoide ločimo na flavone, flavonole, katehine, flavanone, dihidroflavonole, flavan-3,4-diole, antocijanidine, izoflavone, neoflavone, kalkone, dihidrokalkone in avrone (Jovanovic in sod., 1997).

Skupne fenole delimo glede na njihovo osnovno kemijsko strukturo na flavonoidne fenole in neflavonoidne fenole (Macheix in sod., 1990).

### Preglednica 3: Delitev fenolnih spojin (Vrhovšek in sod., 1996)

Flavonoidni fenoli	Neflavonoidni fenoli
flavan-3-oli (katehin in epikatehin)	hidroksicimetne kisline (kaftarna kislina, kutarna kislina, fertarna kislina, kavna kislina, kumarna kislina, ferulan kislina)
proantocianidini (dimeri in trimeri katehina in epikatehina)	hidroksibenzojske kisline (galna kislina, vanilijeva kislina, siringinska kislina)
antocianidini (malvin, delfinin, peonin, cianin, palargonin, petunin)	stilbeni (resveratrol)
flavonoli (kvarcetin, miricetin, rutin, izoramnetin, kampferol)	

Največja pozornost vzbujajoča lastnost piknogenola pa je prav gotovo njegovo močno antioksidativno delovanje (D'Andrea, 2010). V raziskavi, ki jo je opravil Ustun s sod., (2012), so z uporabo Folin-Ciocalcau jeve metode v 1 gramu ekstrakta piknogenola določili kar  $572,28 \pm 5,10$  mg skupnih fenolnih snovi izraženih kot galna kislina, kar je daleč največ od vseh ostalih preiskovanih vrst borov (*P. brutia*, *P. halepensis*, *P. nigra*, *P. pinea*, *P. sylvestris*).

#### 2.3.3 Brin (*Juniperus communis*)

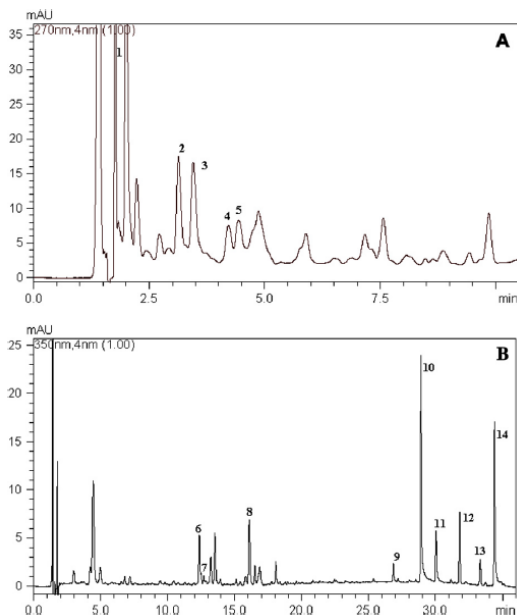
Brin (*Juniperus communis*) izhaja iz družine cipresovk (*Cupressaceae*). Je zimzeleni grm ali drevo, ki raste na suhih neobdelanih predelih Azije, Evrope, Severne Azije in Severne Amerike. Brinove jagode in iglice vsebujejo eterično olje, ki ima značilen aromatičen vonj in grenak okus. Zaradi svojih diuretičnih lastnosti in pozitivnih učinkov na prebavo je bil v medicini poznan že pred mnogimi stoletji. Brinovo eterično olje je naravni izdelek, ki se uporablja tako v farmacevtski in živilski industriji kot tudi v kozmetiki. Vrsta je zaradi velike razširjenosti zelo raznolika, z več podvrstnimi taksoni (Orav in sod., 2010; Maarse, 1991).

V raziskavi, ki jo je opravil Miceli in sod. (2011), je ugotovljeno, da vsebuje 1 gram ekstrakta brina (*Juniperus drupacea*)  $48,06 \pm 0,99$  mg fenolnih snovi izraženih kot galna kislina. Fenolne snovi, vključno s fenoli, fenolnimi kisljinami, flavonoidi, tanini in lignani, so glavni naravni antioksidanti. Fenoli delujejo kot antioksidanti na več načinov, in sicer lahko so lovilci prostih radikalov, kajti fenolne skupine so odlični nukleofili, inhibirajo pa lahko tudi peroksidacijo lipidov in upočasnijo oksidacijske reakcije, z vezanjem prostih radikalov. Poleg tega so kelatorji kovinskih ionov, ki povzročajo oksidacijo (Han in Baik, 2008).

V tej isti raziskavi, Miceli in sod. (2011), so s HPLC-DAD-ESI-MS analizo opravili karakterizacijo celotnega fenolnega profila ekstrakta brina (*Juniperus drupacea*). Več kot 60 % celotnih fenolnih snovi predstavljajo fenolne kisline in tirozol je ena od glavnih ( $1324 \pm 0,64$   $\mu\text{g/g}$  ekstrakta). Med flavonoidi je prevladoval amentoflavon ( $927 \pm 0,35$   $\mu\text{g/g}$  ekstrakta). Identificirane snovi lahko na osnovi kemijske strukture in časa potrebnega za elucijo, razvrstimo v dve skupini. V prvo skupino sodijo fenolne kisline, kot so galna kislina, protokatehnična kislina, tirozol, 7-hidroksikumarna kislina in klorogena kislina. Vse so eluirale v prvih petih minutah elucije pri 270 nm. V drugo skupino pa spadajo rutin, katehin, hipolaetin-7-pentozid, kupresoflavon, amentoflavon, biflavoni in

metil biflavoni, ki so eluirali po desetih minutah in imajo absorpcijske maksimume pri več kot 300 nm.

Na sliki 5 je prikazan kromatogram eluiranih snovi, v preglednici 4 pa so navedene vse fenolne snovi, ki so bile identificirane v tej raziskavi.



**Slika 5: HPLC-DAD analiza ekstrakta brina (*Juniperus drupacea*) v metanolu. Fenolni tip snovi (kromatogram posnet pri 270nm – A), flavonoidi (kromatogram posnet pri 350 nm – B), identifikacija vrhov v preglednici 4 (Miceli in sod., 2011).**

**Preglednica 4: Snovi, identificirane v ekstraktu brina (*Juniperus drupacea*) (Miceli in sod., 2011)**

Vrhovi	Snovi	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup>
1	galna kislina	220, 270	169,0137
2	protokatehnična kislina	218, 258, 293	153,0188
3	tirozol	223, 276	137,0602
4	7-hidroksikumarin	205, 317	161,0239
5	klorogena kislina	218, 300, 324	353,0873
6	rutin	276, 352	609,1456
7	katehin	205, 278	289,0712
8	hipolaetin-7-pentozid	202, 267, 344	433,0771
9	kupresoflavon	232, 273, 334	537,0822
10	amentoflavon	230, 270, 337	537,0822
11	biflavon	230, 270, 337	537,0822
12	biflavon	230, 270, 337	537,0822
13	metil-biflavon	232, 370, 334	551,0978
14	metil-biflavon	232, 370, 334	551,0978

## 2.4 PIŠČANČJE MESO

K perutnini prištevamo udomačene vrste živali, kot so piščanci, purani, race, gosi, prepelice, fazani itd. Proizvodnja perutninskega mesa po celem svetu v zadnjih letih strmo narašča. Dolgoletni genetski inženiring in selekcija takih vrst, pri katerih je omogočena najhitrejša vzreja sta pripeljala do vedno večje porabe piščančjega mesa (Ravindran, 2004).

Piščančje meso je v prehrani zelo razširjeno, kajti vsebuje velike količine visoko vrednih beljakovin, ima relativno majhno vsebnost maščob in se zaradi enostavne predelave uporablja za izdelavo različnih konvencionalnih in gotovih izdelkov. Je vir vseh esencialnih aminokislin, vitaminov skupine B in mineralnih snovi, kot sta železo in fosfor. Ima tudi veliko kalija, kalcija, magnezija in bakra. Vsebnost ogljikovih hidratov in vlaknin pa je zanemarljiva. Perutninsko meso je mehkejše od mesa ostalih klavnih živali, ker ga sestavljajo nežna mišična vlakna. Mišičnino piščancev delimo na svetlo (predvsem prsi) in temno (noge). Vsebudeta različne količine mioglobina in maščobe. Svetlo meso vsebuje večje količine nikotinske kisline, temno meso pa ima več maščob, riboflavina, železa in cinka (Maurer, 2003).

### 2.4.1 Sestava piščančjega mesa

#### 2.4.1.1 Voda

V piščančjem mesu je več kot 75 % vode. Služi kot medij za transport različnih hranilnih snovi, hormonov in drugih celičnih metabolitov. Obenem je voda medij za kemijske reakcije in metabolne procese. V mesu se pojavlja v treh različnih stanjih, in sicer kot vezana, imobilizirana, in prosta voda (Alvarado in Owens, 2006).

#### 2.4.1.2 Ogljikovi hidrati

Zaloga ogljikovih hidratov v mišici je zelo majhna. Glavna spojina je glikogen, ki predstavlja uskladiščeno rezervo glukoze. Glikogen lahko predstavlja 1–1,3 % mišične mase. Glukoza posredno omogoči oksidativno fosforilacijo in krčenje ter relaksacijo mišic (Alvarado in Owens, 2006).

#### 2.4.1.3 Beljakovine

Mišico sestavlja 16–22 % beljakovin, ki se delijo na miofibrilarne, sarkoplazemske in vezivno- tkivne beljakovine. Večji del predstavljajo miofibrilarne beljakovine (50–60 %) in so odgovorne za procese krčenja in raztezanja mišice. Tem sledijo sarkoplazemske beljakovine (mioglobin in hemoglobin) in različni encimi, ki sodelujejo pri mišičnem metabolizmu (Keeton in Eddy, 2004).

## 2.5 PREKURZORJI HCA V PIŠČANČJEM MESU

### 2.5.1 Kreatin in kreatinin

Pri toplotni obdelavi mesa se kreatin iz notranjosti transportira na površino mesa in se pretvori v kreatinin (Felton in sod., 2004). Iz kreatinina se nato v procesu Maillardove

reakcije, ki vključuje tudi Streckerjevo razgradnjo, tvorijo imidazopiridini, imidazokinolini in imidazokinoksalini (Jägerstad in Skrog, 2005).

Imidni del molekule kreatinina nastane s ciklizacijo in eliminacijo vode iz kreatina. Za mutagenost spojin skupine IQ in IQx naj bi bila odgovorna predvsem imido skupina z 2-amino skupino (Skog in sod., 1998).

### 2.5.2 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati, ki se v mesu pojavljajo kot rezultat glikolize, so D-glukoza, D-fruktoza, D-riboza in D-manoza (Cambero in sod., 2000). Maillardova reakcija, reakcija med reducirajočimi sladkorji (mono-, di-, trisaharidi) in prostimi aminokislinami, je glavna pot nastanka intermediatov za tvorbo HCA. V tej reakciji se tvorijo tudi spojine, ki so odgovorne za nastalo aromo v toplotno obdelanem mesu (Tikk in sod., 2006).

### 2.5.3 Proste aminokisliline

Za potek pretvorbe mišičnine v meso so potrebne številne fiziološke in biokemijske spremembe. Pri tej pretvorbi sodelujejo številni mišični encimi, s katerimi se v mesu tvorijo posamezne proste aminokisliline, ki služijo kot prekurzorji za oblikovanje tipičnega okusa in arome mesa, mesu izboljšujejo prehransko vrednost, obenem pa sodelujejo v reakciji tvorbe HCA (Aristoy in Toldrá, 1998).

## 2.6 SPLOŠNO O HCA

V prvi polovici 20. stoletja so bile opravljene prve raziskave povezane s tvorbo HCA in njihovimi karcinogenimi učinki na človeka. Švedski znanstvenik Widmark je leta 1939 izoliral karcinogene snovi iz zapečenega konjskega mesa, ki so inducirale razvoj tumorja na koži miši. Sugimura s sodelavci pa je leta 1976 z Amesovim testom določil mutageno aktivnost zapečene površinske skorje govedine in rib, pečenih nad ogljem (Skog in sod., 1998; Sugimura, 1997; Wakabayashi in sod., 1993).

HCA so mutagene ali karcinogene spojine, ki se tvorijo v mesu in ribah med toplotno obdelavo pri temperaturi nad 150 °C (Knize in sod., 1997). Mutagenost HCA je v primerjavi z ostalimi mutagenimi snovmi, ki jih najdemo v hrani 100-krat večja od aflatoksina B1 in več kot 2000-krat večja od benzopirena (Stavric, 1994; Oz in Kaya, 2006).

Mednarodna agencija za raziskave raka IARC smatra nekatere HCA kot potencialne karcinogene (MeIQ, MeIQx, PhIP, HAs, AαC, MeAαC, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, razred 2B), ter enega kot verjetnega povzročitelja rakavih obolenj (IQ, razred 2A) (Murkovic in sod., 2004). Številne epidemiološke raziskave kažejo, da lahko pogosto uživanje bolj pečenega mesa, ki vsebuje HCA, poveča nevarnost za razvoj rakastih obolenj na debelem črevesju, prostati in prsni. Nekatere vrste HCA so prisotne tudi v cigaretnem dimu in dizelskih izpušnih plinih (Turesky, 2007).



Z Amesovim testom z bakterijo *Salmonella typhimurium*, seva TA98 in TA100, so raziskovali mutagenost posameznih HCA in dokazali, da so vsi HCA, ki so mutageni v bakterijskih celicah, mutageni tudi v celicah živali in človeka. Razlika je le v stopnji mutagenosti. Na izražanje mutagenosti in razvoj raka ima močan vpliv posameznik s svojo metabolično sposobnostjo tvorbe aktivnih karcinogenih spojin oziroma detoksifikacijo mutagenih snovi (Nagao, 2000).

Do danes je bilo izoliranih več kot 25 različnih mutagenih in/ali karcinogenih HCA (Alaejos in sod., 2008). Od vseh znanih HCA pa vsi niso direktno mutageni, ampak so t.i. ko-mutageni, norharman (9H-pirido[3,4-b]indol) in harman (2-metil- $\beta$ -karbolin), kar pomeni, da ti dve snovi povečata mutagenost ostalih HCA (Aaslyng in sod., 2013).

Tvorba in količina HCA je odvisna od številnih dejavnikov, kot so vrsta mesa, čas toplotne obdelave, temperatura toplotne obdelave, način toplotne obdelave, vrednost pH medija, vodne aktivnosti ter vsebnosti prekursorjev HCA (proste aminokisljine, kreatin/kreatinin, ogljikovi hidrati) (Paris in sod., 1999; Oz in sod., 2007, 2010a, 2010b, 2010c). V dveh evropskih študijah so dokazali, da naj bi bil povprečen dnevni vnos HCA med 103 in 160 ng/dan (Augustsson in sod., 1999).

V raziskavi, ki so jo opravili Iwasaki in sod. (2010), so ugotovili, da vsebuje piščančje meso večjo vsebnost HCA, predvsem PhIP, v primerjavi z govejim in svinjskim mesom ter ribami. Na primer, vsebnost PhIP v dobro pečenem mesu je bila 34,6 ng/g pri piščancu s kožo, 0,58 ng/g v govejem mesu, 7,25 ng/g v svinjini in 2,28 ng/g v sardinah. Tudi Skog in Solyakov (2002) sta dokazala, da je med tvorjenimi HCA v piščančjem mesu v največji količini prisoten PhIP, katerega vsebnost se pogosto giblje okrog 40  $\mu$ g/kg. Medtem ko je vsebnost MeIQx manjša pri pečenem piščancu kot pri pečeni govedini ali svinjini. Glede na to, da je poraba perutnine v gospodinjstvu velika, predstavlja le ta velik del vnosa HCA (Skog in sod., 1998).

HCA se običajno tvorijo v ppb vrednostih (Murkovic in sod., 2004).

Glede na kemijske lastnosti se HCA delijo na polarne (aminoimidazo-azaareni (AIA) ali IQ tip), ki imajo imidazokinolinsko, imidazokinoksalinsko ali imidazopiridinsko strukturo in nepolarne HCA (ne-IQ tip), ki imajo piridoindolno ali dipiridoimidazolno strukturo (Murkovic in sod., 2004). Med seboj se razlikujejo glede na način tvorbe.

V pečeni hrani-mesu se najpogosteje pojavljata dva HCA, in sicer MeIQx in PhIP s tem, da se pri nižji temperaturi središča tvori več MeIQx, ki je tudi termolabilen, in pri višji temperaturi središča več PhIP (Polak in sod., 2009).

**Preglednica 5: Kratice in imena HCA (Murkovic in sod., 2004)**

<b>Kratice HCA</b>	<b>Ime HCA</b>
<b>kinolini (polarni)</b>	
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin
<b>kinoksalini (polarni)</b>	
IQx	2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]kinoksalin
7,8-DiMeIQx	2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
4-CH <sub>2</sub> OH-MeIQx	4-hidroksimetil-2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f] kinoksalin
7,9-DiMeIQx	2-amino-3,7,9-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin
<b>piridini (nepolarni)</b>	
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
4'-OH-PhIP	2-amino-6-(4-hidroksifenil)-1-metilimidazo[4,5-b] piridin
DMIP	2-amino-1,5-dimetilimidazo[4,5-b]piridin
TMIP	2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5-b]piridin
IFP	2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]piridin
<b>piridoimidazoli in indoli (nepolarni)</b>	
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol
A $\alpha$ C	2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol
MeA $\alpha$ C	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol
Glu-P-1	2-amino-6- metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol

### 2.6.1 Nepolarni oz. pirolizni HCA

Nepolarni oz. pirolizni HCA (ne-IQ tip) oz. aminokarbolini so derivati karbonilov. Nastajajo pri temperaturah višjih od 300 °C s pirolizo (termičnim razpadom) aminokislin in proteinov (Murkovic in sod., 2004). Vmesni produkti pirolize reagirajo s prostimi radikali drugih snovi ter tvorijo heterociklično strukturo (Alaejos in Afonso, 2011).

Tvorba aminokarbolinov je možna tudi brez kreat(in)ina, a se ob njegovi prisotnosti, tvorijo večje količine  $\beta$ -karbolinov (Jägerstad in sod., 1998). Strukturno se  $\beta$ -karbolini od ostalih HCA ločijo po tem, da na obroču nimajo vezane amino skupine in zato ne kažejo mutagenega potenciala. Njihova prisotnost pa povečuje genotoksičnost mutagenih HCA (Alaejos in Afonso, 2011).

## 2.6.2 Polarni HCA oz. aminoimidazoazaareni (AIA)

Polarni HCA oz. aminoimidazoazaareni (AIA) (IQ tip) se tvorijo v sistemu kompleksnih reakcij med prostimi aminokislinami, ogljikovimi hidrati ter kreatin(in)om. Kreatin(in) ima še posebno pomembno vlogo, kajti ob njegovi odsotnosti se IQ in IQx tip HCA ne morejo tvoriti. Nastajajo že pri temperaturah, ki se običajno uporabljajo v gospodinjstvu, in sicer med 150 in 225 °C (Murkovic in sod., 2004). Osrednjo pot pri tvorbi aminoimidazoazaarenov predstavlja Maillardova reakcija, ki vključuje tudi Streckerjevo razgradnjo. Pri tem nastajajo intermediati, ki nastopajo kot prekursorji za tvorbo AIA. Ti prekursorji so derivati acetaldehida, pirazini, metilirani piridini in kreatinin, ki tvorijo imidazo strukturo vseh polarnih HCA. Vsi AIA vsebujejo imidno skupino, ki izhaja iz kreatina ali kreatinina. Imidni del molekule kreatinina nastane s ciklizacijo in eliminacijo vode iz kreatina. Za mutagenost spojin skupine IQ in IQx HCA naj bi bila odgovorna predvsem imido skupina z 2-amino skupino (Skog in sod., 1998; Sugimura in Adamson, 2000; Murkovic in sod., 2004).

Dokazano je, da največ AIA nastane, če so proste aminokisljine, monosaharidi in kreat(in)in v molskem razmerju 1:1:1 (Skog in sod., 1998). S povečevanjem prostih aminokisljin se poveča tudi nastajanje mutagenih snovi v mesu, z večanjem koncentracije monosaharidov pa pride do obratnega učinka in sicer do zmanjšane nastanka HCA. Mnogo večji vpliv na tvorbo HCA kot fruktoza imata monosaharida glukoza in riboza (Taylor in sod., 1984 a,b).

## 2.7 HCA V TOPLOTNO OBDELANEM PIŠČANČJEM MESU

Piščančje meso lahko pripravimo z različnimi postopki toplotne obdelave in ob tem nastajajo različne koncentracije mutagenih snovi (Skog in Solyakov, 2002).

Kuhanje in kuhanje nad paro se je izkazalo kot zelo dober način toplotne obdelave, če se želimo izogniti nastanku HCA, kajti ob tem se tvori nezaznavna količina HCA. Razlog je verjetno v nizki temperaturi, ki ne preseže 100 °C (Skog in sod., 1998).

Mikrovalovi so se izkazali kot dober način za predhodno toplotno obdelavo pred nadaljnji postopki pečenja, kajti s tem lahko bistveno pripomoremo k zmanjšanju tvorbe MeIQx in PhIP, zaradi izgube prekursorjev HCA (Felton in sod., 1994). V študiji, ki jo je opravil Jinap in sod. (2013), so s predhodno obdelavo piščančjega mesa z mikrovalovi uspeli zmanjšati koncentracijo tvorjenih HCA. Uporaba mikrovalov za 30 sekund in nato cvrenje v palmovem olju sta se izkazala za zelo učinkovit način priprave piščančjega mesa, kajti pri tem se je tvorila zelo majhna količina MeIQx (3,44 ng/g).

Pri cvrenju v cvrtniku, kjer je hrana v celoti obdana z vročim oljem, nastaja le majhna količina HCA, pod 0,5 ng/g (Skog in Solyakov, 2002). Nasprotno pa je v svoji raziskavi ugotovil Liao in sod. (2010), kajti pri cvrenju v cvrtniku za 10 min na 180 °C se je tvorilo kar 21,3 ng/g HCA.

Cvrenje v ponvi povzroči nastanek MeIQx nad 3 ng/g, poročajo pa tudi o vrednostih nad 10,4 ng/g (Krul in sod., 2000), obenem nastaja tudi PhIP v količinah nad 20 ng/g (Norrish

in sod., 1999; Sinha in Rothman, 1999; Krul in sod., 2000; Solyakov in Skog, 2002). Liao in sod. (2010) poročajo o nastanku 27,4 ng skupnih HCA/g pri desetminutnem cvrenju v ponvi pri temperaturi 180 °C. Največjo vsebnost PhIP, 70 ng/g, so določili v pečenem piščancu brez kosti in kože (Sinha in sod., 1995).

Med praženjem HCA nastajajo v manjšem obsegu. Vrednosti se gibljejo nad 3,2 ng/g za MeIQx in 5,3 ng/g za PhIP (Richling in sod., 1998). Praženje običajno poteka približno 25 minut pri temperaturi 200 °C. Pri tem postopku so razsikovalci identificirali zgolj harman in norharman (Solyakov in Skog, 2002). Liao in sod. (2010) pa poročajo, da med 20 minutnim praženjem pri temperaturi 200 °C nastane 4 ng skupnih HCA/g.

Pečenje na žaru z ogljem je zelo pogost in priljubljen način priprave piščanca. Pri tem pa se, kot je v raziskavi ugotovil Liao in sod. (2010), tvorijo največje količine HCA. Pri peki na žaru z ogljem (200 °C na površini mesa, 20 minut) je bilo v piščančjih prsih identificiranih devet HCA. V največji količini sta bila pristotna Norharman in Harman, sledijo PhIP, AαC, Trp-P-2, 4,8-DiMeIQx, Me AαC, Trp-P-1 in MeIQx. Skupna vsebnost HCA je bila 112 ng/g.

Mesni sok, ki nastane pri peki piščanca, vsebuje zelo malo skupnih HCA in sicer pod 1 ng/g (Skog in sod., 1997).

Težko je primerjati različne načine toplotne obdelave, kajti temperatura na površini mesa se zelo hitro spreminja in jo je težko nadzirati (Holder in sod., 1997), jasno pa je, da se pri toplotni obdelavi piščančjega mesa v največji meri tvori PhIP, več kot 40 ng/g, sledita harman in norharman, manj kot 10 ng/g, MeIQx manj kot 3 ng/g in DiMeIQx manj kot 2 ng/g. Ostali HCA, IQ, IQx, MeIQ, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC in Me AαC, so ponavadi določeni v vrednostih pod 1 ng/g (Skog in Solyakov, 2002).

## 2.8 NAČINI ZMANJŠANJA TVORBE HCA

Meso pred uživanjem toplotno obdelamo, pri tem pa se v skorji mesa tvorijo HCA. Številne epidemiološke raziskave kažejo povezavo med pogostim uživanjem dobro pečenega mesa in nastankom raka na želodcu, debelem črevesju, mehurju, prostati in prsih (Gibis in Weiss, 2010). Z namenom zmanjšanja tvorbe HCA je bilo opravljenih mnogo raziskav, s katerimi so znanstveniki poskušali inhibirati nastanek teh potencialno rakotvornih snovi.

Zelo pomemben dejavnik, ki pripomore k zmanjševanju nastanka HCA sta temperatura in čas toplotne obdelave, kajti s povečevanjem temperature nad 200 °C in povečevanjem časa toplotne obdelave se povečuje tudi količina nastalih HCA, predvsem PhIP (Aaslyng in sod., 2013). Felton in sod. (1994) poročajo o trikratnem povečanju vsebnosti HCA pri temperaturah med 200 in 250 °C.

Pri piščančjem mesu na nastanek HCA pomembno vpliva tudi koža. Pri piščancu brez kože, pečenem na dvoploščnem žaru, se je tvorilo bistveno več HCA kot pri piščancu s kožo. Koža služi kot sloj izolacije in v primerjavi z mesom vsebuje bistveno manjše količine prekurzorjev za tvorbo HCA, predvsem manj prostih aminokislin, kot so

izolevcin, levcin in tirozin, ki so prokurzorji za tvorbo PhIP. Vsebuje komaj zaznavne količine kreatina, kreatinina in reducirajočih sladkorjev (Demšar in sod., 2009).

Predhodna obdelava mesa z mikrovalovi lahko za 3- do 9-krat zmanjša nastanek mutagenih HCA pri nadaljnjih postopkih toplotne obdelave, zaradi izgube prekursorjev HCA (Felton in sod., 1994).

Z bolj pogostim obračanjem kosa mesa med pečenjem, lahko bistveno zmanjšamo nastanek HCA, kajti s tem dosežemo, da se v zgornji ploskvi temperatura zniža in se obrne smer potovanja prekursorjev HCA. S tem je na površini mesa onemogočena tvorba HCA. Obenem je tudi hitreje dosežena ustrezna središčna temperatura in s tem mikrobiološka varnost živila (Knize in Felton, 2005; Alaejos in Afonso, 2011).

Skog in sod. (2003) so ugotovili, da lahko tvorbo HCA v mesu zmanjšamo s paniranjem mesa, kajti pri cvrenju paniranega mesa se tvori manj mutagenih spojin, kot če je meso nepanirano. Panada zmanjša prenos v vodi topnih prekursorjev na površino mesa, kjer poteka tvorba HCA. Prav tako pa lahko z dodatkom snovi, ki izboljšajo sposobnost vezanja vode (škrob, NaCl, sojini proteini), učinkovito zmanjšamo tvorbo HCA, ker je omejen transport prekursorjev iz notranjosti na površino mesa (Knize in Felton, 2005; Dundara in sod., 2012). Pri mletem mesu, kjer je zaradi porušene strukture izguba vode še večja, je dodatek snovi, ki vežejo vodo še toliko bolj pomemben (Skog in sod., 1998).

Mnogo študij poroča o načinih zniževanja tvorbe HCA z dodatkom naravnih antioksidantov, kot so flavonoidi, askorbinska kislina in vitamin E ter sintetičnih antioksidantov, kot so BHA, BHT, PG in TBHQ. Tudi polifenoli iz čaja, češnje, inulin in olivno olje so se izkazali kot dobri inhibitorji tvorbe mutagenih snovi (Oz in Kaya, 2011).

Ena od možnosti zmanjšanja tvorbe HCA pa je tudi mariniranje mesa pred postopkom toplotne obdelave. Pri tem se mesu izboljšajo senzorične lastnosti, kot so mehkoba, sočnost in aroma (Melo in sod., 2008). Marinade so običajno sestavljene iz začimb, soli, kisa, olja, vina in sladkorja (Salmon in sod., 1997). Komponente z visokim antioksidativnim delovanjem, ki so prisotne v marinadah, vežejo produkte Maillardove reakcije in s tem preprečujejo tvorbo mutagenih in karcinogenih HCA (Gibis in Weiss, 2012).

Gibis in Weiss (2012) sta z mariniranjem govejih sekancev z marinado iz ekstrakta grozdnih pešk (0,2, 0,4, 0,6, in 0,8 g/100g) in ekstrakta rožmarina (0,12, 0,2, 0,6, 1,0, in 1,5 g/100 g) uspela zmanjšati tvorbo MeIQx in PhIP za kar 57–90 % (pri marinadah z večjo koncentracijo ekstraktov).

Dodatek črnega popra mesnim kroglicam je zmanjšal tvorbo PhIP in 4,8-DiMeIQx za 100 %, obenem pa se je zmanjšala tudi vsebnost skupnih HCA (Oz in Kaya, 2011).

Gibis in Weiss (2010) poročata o 50 % zmanjšanju tvorbe MeIQx in PhIP po mariniranju govejih sekancev z ekstraktom hibiskusa. Obraten efekt pa je imelo mariniranje na tvorbo ko-mutagenih snovi, harmana in norharmana, ki sta se ob večji koncentraciji dodanega ekstrakta hibiskusa povečala.

Fenolne snovi iz kože češnje so zmanjšale tvorbo PhIP za kar 93 %, obenem pa upočasnijo tudi oksidacijo lipidov mesa (Britt in sod., 1998).

Prav tako tvorbo HCA zmanjša mariniranje mesa z rdečim vinom, pivom ali rastlinskimi ekstrakti v kombinaciji z mešanici začimb ali omak za žar (Tikkanen in sod., 1996; Salmon in sod., 1997; Shin in Ustunol, 2004).

Zeleni čaj je bogat z antioksidanti in se lahko glede uporabnosti za mariniranje primerja z alkoholnimi pijačami, čeprav uporaba zelenega čaja kot marinade v zahodnih deželah ni običajna. Njegova uporaba za mariniranje govejega mesa je zmanjšala koncentracijo PhIP in AaC medtem, ko sta vsebnosti 4,8-diMeIQx in MeIQx ostali nespremenjeni. Po 6 urah mariniranja se je vsebnost skupnih HCA zmanjšala za kar 70 % in tudi senzorična analiza je pokazala dobro sprejemljivost govejega mesa, mariniranega v zelenem čaju. Zeleni čaj bi lahko bil dobra alternativa za uporabo pri otrocih in ljudeh, ki ne uživajo alkoholnih pijač (Quelhas in sod., 2010).

Več študij poroča o možnosti zmanjšanja koncentracije HCA v pečenem mesu, z dodatkom ekstrakta rožmarina, česna, žajblja in timijana (Murkovic in sod., 1998; Balogh in sod., 2000).

Ekstrakt rožmarina dodan govejim sekancem je zmanjšal nastanek PhIP (Balogh in sod., 2000), prav tako pa je dodatek ekstrakta rožmarina olivnemu olju za cvrenje govejih sekljancev znižal vsebnost skupnih HCA (Persson in sod., 2003). Močan vpliv na redukcijo nastalih HCA pri toplotni obdelavi, predvsem MeIQx, ima tudi ekstrakt bora (Ahn in Grun, 2006).

Demašius in sod. (2011) so z dodatkom 0,2 % in 0,5 % timijana, origana in šetraja v govejem mesu uspeli zmanjšati tvorbo PhIP. Zanimivo je, da se je tvorba PhIP po dodatku ekstrakta bazilike povečala. Prav tako se je po dodatku ekstrakta origana in bazilike povečala koncentracija Trp-P-2. Vsebnost Trp-P-2 se je povečala za 31 % v primeru dodatka ekstrakta bazilike, ob dodatku ekstrakta origana pa se je povečala za 20 %. Ugotovili so, da je bolj kot dodatek začimb pomemben način toplotne obdelave mesa in s tem povezana tvorba HCA. V primeru povečanja HCA v mesu je bilo meso toplotno obdelano v zaprti posodi z dodatkom sončničnega olja na 200 °C za 30 minut. Ob zmanjšani tvorbi HCA pa so meso pekli v odprti posodi z dodatkom dietilen glikola in enakimi parametri toplotne obdelave (200 °C za 30 minut).

Dodatek askorbinske kisline je v študiji, ki jo je opravil Dundara in sod. (2012), zmanjšal vsebnost nastalih IQ, MeIQx, MeIQ in PhIP. Podobne rezultate je dobil tudi Chen in sod. (1992), ki je ugotovil, da dodatek askorbinske kisline, bisulfita, nitritov in vitamina E uspešno prepreči tvorbo IQ, MeIQx in 4,8-DiMeIQx.

Vpliv maščobe na tvorbo mutagenih in karcinogenih HCA je še v fazi raziskav (Gray in sod., 1996). Maščoba je dober prevodnik toplote in med procesom toplotne obdelave, kot rezultat oksidacije lipidov in toplotne degradacije, prihaja do tvorbe številnih spojin, kot so aldehidi, alkoholi, ketoni, organske kisline in dušikove spojine. Obenem prihaja tudi do interakcij med prostimi radikali ter produkti Maillardove reakcije. Vse to vpliva na povečano tvorbo HCA. Dodatek maščobe med toplotno obdelavo tvorbo mutagenih snovi

še dodatno poveča, predvsem če se temperatura poviša nad temperaturo 200 °C (Dundara in sod., 2012).

Raziskovalci predvidevajo, da prosti radikali, ki se tvorijo iz maščobnih kislin, spodbujajo nastanek mnogih produktov Maillardove reakcije, med katere štejemo tudi mutagene HCA (Gray in sod., 1996).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL IN NAČRT DELA

V okviru eksperimentalnega dela naloge smo določili osnovno kemijsko sestavo presnega piščančjega mesa in pečenega sekljanca, ter vsebnost posameznih HCA, skupnih fenolnih spojin in senzorični profil piščančjih sekljancev, izdelanih iz mletega piščančjega fileja, soli in različnih dodatkov rastlinskih ekstraktov (rožmarin, brin in skorja bora). Poskus je bil razdeljen na tri dele, in sicer na tehnološki, kemijski in senzorični del. Poskus smo v celoti opravili v treh ponovitvah.

V poskusu smo uporabili mišice fileja (*m. pectoralis superficialis*) piščancev – brojlerjev provenience Ross 308. File smo zmleli v mesoreznici z luknjačo 8 mm, dodali 1,6 % soli, maso premešali v mešalniku ter v petrijevkah oblikovali 90 gramske sekljance, v katere smo različne dodatke rastlinskih ekstraktov.

Ekstrakte, ki smo jih uporabili v poizkusu, smo predhodno pripravili iz v trgovini kupljenega rožmarina (Maestro), skorje črnih borov rodu *Pinus nigra*, ki so rasli na nadmorski višini 1000 m (na Vremščici) in jagod brina, ki so rasle na nadmorski višini 1000 m (na Vremščici). Priprava in količine ekstraktov, ki smo jih dodali v sekljance, so opisane v nadaljevanju. Koncentracije ekstraktov smo določili na podlagi dobljenih rezultatov za analizo določanja skupnih polifenolov po metodi Folin-Ciocalteu.

**Preglednica 6: Skupine piščančjih sekljancev na osnovi dodatka različnih rastlinskih ekstraktov.**

Rastlinski ekstrakt	Dodatek ekstrakta
1R	1 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
2R	2 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
3R	3 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
0,7BR	0,7 ml ekstrakta brinovih jagod (Vremščica, 1000 m n.v.)
1,4BR	1,4 ml ekstrakta brinovih jagod (Vremščica, 1000 m n.v.)
2,1BR	2,1 ml ekstrakta brinovih jagod (Vremščica, 1000 m n.v.)
1BO	1 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
2BO	2 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
3BO	3 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
kontrola	ni dodatka

Rastlinske ekstrakte rožmarina, brina in bora smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali 10 g vzorca (tj. zdrobljenih sušenih iglastih listov rožmarina, zdrobljenih iglic brina ali zmleto skorjo črnega bora) in dodali 200 ml etanola (Merck, 1.00971). Sledilo je stresanje na stresalniku (IKA minshaker MS2). Rastopino smo nato prefiltrirali skozi naguban filter papir (Satorius, tefnični filter papir, 388) in etanol (Merck, 1.00971) odparili z rotavaporjem. Suhemu preostanku smo dodali nekaj kapljic etanola, dobro premešali in vsebino prelili v 100 ml merilne bučke ter dolili etanol (Merck, 1.00971) do oznake.



Vsebino bučke smo zopet dobro premešali in jo prelili v plastične posodice, ki smo jih do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 2 °C.

Za vsako koncentracijo ekstrakta brina, bora in rožmarina smo pripravili po tri sekljance, v katere smo dodali enake koncentracije posamičnega ekstrakta (30 sekljancev). Pripravljene, temperirane v hladilniku ( $4 \pm 1$ ) °C, in stehtane (tehtnica Soehle, Nemčija) piščančje sekljance (po en sekljanec iz vsake skupine = 10 sekljancev) smo 4 minute pekli na dvoploščnem žaru s teflonsko prevleko (Silex, Model Kitchen Genius 610.95<sup>®</sup>, Nemčija) pri temperaturi 250 °C oz. do središčne temperature ( $T_s$  v geometrijskem središču sekljanca) 94 °C (vbodni termometer Testo 0554 1765 USB-Interface, Nemčija), na še polovici vsakega toplega sekljanca opravili senzorično analizo. Drugo polovico vsakega sekljanca smo zapakirali v polietilensko vrečko in zamrznili pri  $(-30 \pm 1)$  °C. Zamrznjene vzorce smo homogenizirali z mlinom (Retsch GM 200, Nemčija) do homogene strukture, jih ponovno embalirali v polietilenske vrečke in zamrznjene pri  $(-30 \pm 1)$  °C hranili do kemijske analize.

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Določanje osnovne kemijske sestave mesa z metodo NIR

Princip:

Merjenje odboja svetlobe temelji na absorpciji elektromagnetnega valovanja pri različnih valovnih dolžinah. Pri analizi merimo delež vpadnega valovanja, ki se razpršeno odbije od pripravljene vzorca. Če z infrardečo svetlobo obsevamo snovi organskega izvora, se različne kemijske vezi raztegujejo in ukrivljajo ter tako absorbirajo del valovanja. Tako dobimo podatek o elementarnih sestavinah in molekulah, ki sestavljajo organske snovi (Rudan Tasič in Klofutar, 2007).

Aparatura:

- FoodScan TM Lab (Nemčija)

Izvedba:

Vsebnost vode, maščobe, beljakovin, ter razmerje med vodo in beljakovinami smo določili z NIR metodo na piščančjem mesu in pečenih sekljancih.

### 3.2.2 Izračun izgube mase med pečenjem

Princip:

Med toplotno obdelavo, se iz mesa izceja mesni sok, obenem pa mesni sok tudi izpareva, kar prispeva k zmanjšanju mase piščančjega sekljanca.

Aparature:

- tehtnica Soehle (max 5 kg, Nemčija)

Postopek:

Sekljanec smo pred in po toplotni obdelavi stekali ter iz razlik izračunali izgubo mase med pečenjem. Tako smo ugotovili kolikšen vpliv ima dodatek rastlinskih ekstraktov na izgubo mase med pečenjem.

### **3.2.3 Senzorično ocenjevanje piščančjih sekljancev z dodanimi ekstrakti**

Princip:

Pri senzoričnem ocenjevanju ugotavljamo in vrednotimo vpliv dodatka ekstraktov bora, brina in rožmarina na sprejemljivost (videz, okus, vonj in aromo) sekljancev. Za vrednotenje senzoričnih lastnosti smo uporabili deskriptivno senzorično analizo z nestrukturirano točkovno lestvico (od 0 do 4 točk) (Golob in sod., 2006). Pri tem sistemu je 0 točka pomenila, da lastnost ni izražena, ali pa je popolnoma nesprejemljiva, in 4 točk, da je lastnost močno ali odlično izražena.

Izvedba:

Ocenjevalno senzorično komisijo so sestavljali štirje izšolani preskuševalci, ki so ocenjevali kolikšen vpliv imajo dodatki ekstraktov, v različnih koncentracijah, na sprejemljivost posameznega piščančjega sekljanca.

Merila za ocenjevanje posameznih lastnosti so bila:

#### **Obarvanje piščančjega sekljanca po toplotni obdelavi (0–4 točk):**

0 – svetlosiva rjava barva

4 – temnosiva barva

#### **Tuji vonji (0–4 točk):**

0 – tuji vonji niso izraziti

4 – tuji vonji so močno izraziti

#### **Tuje arome (0–4 točk):**

0 – tuje arome niso izrazite

4 – tuje arome so močno izrazite

#### **Sprejemljivost (0–4 točk):**

0 – ni sprejemljiv

4 – zelo dobro sprejemljiv

### **3.2.4 Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu**

Princip:

Spektrofotometrična metoda temelji na oksidaciji fenolnih spojin s FC reagentom, ki vsebuje volframat in molibdat. Obarvanemu produktu izmerimo absorbanco pri 700 nm. Za umeritveno krivuljo uporabimo raztopino galne kisline, ki se uporablja kot standardna referenčna raztopina za določanje skupnih fenolnih spojin (Beretta in sod., 2005).



filtriramo skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter in izmerimo absorbanco pri 700 nm proti slepemu vzorcu. Vsak vzorec je bil analiziran v paralelki.

Pri določanju skupnih fenolnih spojin na ekstraktih bora, brina in rožmarina, izrazimo rezultate v mg galne kisline na liter ekstrakta ter kot koncentracijo antioksidanta, ki smo ga dodali v 90 gramski sekljanec.

Izračun:

$$c_{\text{ekstrakt}} (\text{mg} / \text{l}) = \frac{A \times R_1 \times R_2 \times R_3}{0,0474} \quad \dots (1)$$

$$R_1 = 300 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l} = 3$$

$$R_2 = 5000 \mu\text{l} / 300 \mu\text{l} = 50/3$$

$$R_3 = 1000 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l} = 10$$

100  $\mu\text{l}$  je volumen ekstrakta, ki smo ga nato razredčili z 900  $\mu\text{l}$  EtOH, nato pa od teh 1000  $\mu\text{l}$  odvzeli 300  $\mu\text{l}$  za določanje skupnih fenolnih spojin s FC metodo.

5000  $\mu\text{l}$  je znašal volumen matične raztopine galne kisline, s katero smo pripravili umeritveno krivuljo, 300  $\mu\text{l}$  pa je bil volumen ekstrakta pri določanju skupnih fenolnih spojin s FC metodo.

$$c_{\text{antioksidanta dodanega v sekljanec}} (\text{mg} / \text{sekljanec}) = c_{\text{antioksidanta}} (\text{mg} / \text{ml}) \times V_{\text{dodanega antioksidanta}} (\text{ml}) \quad \dots(2)$$

### 3.2.4.3 Določanje skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v sekljancih

Izvedba:

V stekleno epruveto zatehtamo približno 1 g pečenega sekljanca in dodamo 2 ml 70 % etilnega alkohola. Dobro premešamo na vrtničnem mešalu in centrifugiramo (\*rcf 1000/10 min). Filtriramo skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter.

Odpipetiramo 100  $\mu\text{l}$  vzorca, oziroma 100  $\mu\text{l}$  70 % etilnega alkohola za slepo probo, mu dodamo 3850  $\mu\text{l}$  bidestilirane vode, 1000  $\mu\text{l}$  10 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 250  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu reagenta. Hitro premešamo na vrtničnem mešalu in počakamo 60 minut (štoparica). Celoten volumen mešanice je znašal 5 ml. Po 60 minutah filtriramo skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter in izmerimo absorbanco pri 700 nm proti slepemu vzorcu. Vsak vzorec je bil analiziran v paralelki.

Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v ekstraktih in v sekljancih smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z raztopino galne kisline v koncentraciji od 0,72 do 20,16 mg/l.  $R^2$  je znašal 0,9933.

Pri določanju skupnih fenolnih spojin v sekljancih rezultate podamo v mg galne kisline na liter ekstrakta sekljanca, v mg galne kisline na gram sekljanca, ter v mg galne kisline na celotni sekljanec po pečenju.

Izračun:

$$c_{ekstr.sekljanca} (mg / l) = \frac{A \times R_1 \times R_2}{0,0474} \quad \dots (3)$$

$$R_1 = 300 \mu l / 100 \mu l = 3$$
$$R_2 = 5000 \mu l / 300 \mu l = 50/3$$

$$c_{ekstr.v.sekljanca} (mg / g) = c_{ekstr.sekljanca} \times \frac{V_{ekstrakta}}{1000 l \times m_{mletega.sekljanca}} \quad \dots (4)$$

$$c_{na.sekljanec} (mg / 90 g) = c_{ekstr.sekljanca} \times \frac{V_{ekstrakta}}{1000 l \times m_{mletega.sekljanca}} \times m_{sekljanca.pocenju} \quad \dots (5)$$

### 3.2.5 Določanje suhe snovi v ekstraktih bora, brina in rožmarina

Princip:

Določanje vsebnosti suhe snovi temelji na sušenju ekstraktov sprva pri nižji, sobni temperaturi, da ne pride do polimerizacije ekstraktov, nato pa v termobloku pri  $60 (\pm 1) ^\circ C$ , do konstantne teže.

Aparature:

- termoblok (VLM EC1, Nemčija)
- tehtnica Sartorius CPA324S, Nemčija

Postopek:

V steklene epruvete, ki smo jih predhodno stehali, smo dali po 1 ml posameznega ekstrakta skorje bora, jagod brina in rožmarina, ter en dan pustili na sobni temperaturi ( $20 \pm 1) ^\circ C$ , da je etanol sam po sebi izhlapeval. Nato smo epruvete dali v termoblok na  $60 (\pm 1) ^\circ C$  in sušili do konstantne teže.

#### 3.2.5.1 Izračun skupnih fenolnih spojin v 1 gramu suhe snovi ekstraktov

Količino skupnih fenolnih spojin v 1 g suhe snovi ekstrakta bora, brina in rožmarina smo izračunali po enačbi:

$$c_{SS} (mg / g) = \frac{c_{SFS} \times V_{ekstr.}}{m_{SS}} \quad \dots (6)$$

SS = suha snov

SFS = skupne fenolne spojine

ekst. = volumen ekstrakta

Rezultati so podani kot mg skupnih fenolnih spojin izraženih na galno kislino v 1 g suhe snovi ekstraktov bora, brina, rožmarina.

### 3.2.6 Določanje vsebnosti HCA v pečenih piščančjih sekljancih

#### Princip:

Heterociklične aromatske amine smo ekstrahirali z ekstrakcijo s trdno fazo in jih določili s HPLC-MS/MS. Dobljene kromatograme smo obdelali z računalniškim programom Mass Lynx™ V 4,0 (Micromass, 2004). Vsak vzorec je bil analiziran v paralelki.

#### Reagenti:

- NaOH (Merck, 1.06498.1000)
- Extrelut ® NT (Merck, 1.15092.1000)
- interni standard TriMeIQx (0,632 µg/g)
- etilacetat (Sigma-Aldrich, 34858-252)
- metanol (Merck, 1.06007.2500)
- diklorometan (Merck, 1.06044.2500)
- 0,1 M HCl (Merck, 1.09060.1000)
- 25 % NH<sub>3</sub> (Merck, 1.05432.1000).

#### Aparatura:

- magnetni mešalnik Variomac Electronicrührer MULTIPOINT HP1S, Nemčija
- Vacuum Pump V-700, PSet=420 mb, BÜCHI Schwitserland
- Vacuum Controller V-850, Supelco Visiprep™, BÜCHI Schwitserland
- Vakumska črpalka Genevac Technologies HT – 4 Series II, Genevac LTD IPSWICH, England

#### Izvedba:

Za določanje vsebnosti HCA smo uporabili modificirani metodi po Santos in sod. (2004) in Barcelo in sod. (2004). V 100 ml čaše smo zatehtali približno 3 g homogeniziranega vzorca, jim dodali 12 ml 1M raztopine NaOH in 100 µl internega standarda TriMeIQx. Čaše smo pokrili s parafilmom in jih za 12 ur postavili na magnetni mešalnik. V homogenat smo vmešali 13 g diatomejske zemlje – Extrelut ® NT in s to zmesjo napolnili stekleno kolono. Ekstrakcijo HCA smo opravili s 70 ml ekstrakcijskega topila etilacetata in eluat lovili v čašo. Sledilo je čiščenje vzorca z metodo ekstrakcije s trdno fazo (SPE). Uporabili smo kolonice Oasis MCX 3cc 60 mg, LP Extraction Cartridges, cat: 186000253, Waters, Ireland. Ves eluat smo injicirali na MCX sorbent, ki smo ga kondicionirali z 2 ml metanola in uravnotežili z 2 ml zmesi topil etilacetata in diklorometana (1:1). Čiščenje je potekalo z 2 ml 0,1 M raztopine HCl in z 2 ml metanola. Na MCX sorbent ujete polarne in nepolarne HCA smo eluirali z 2 ml zmesi topil metanol : amoniak (19:1). Nato smo vzorce odparevali v vakumski črpalki in jih tik pred ločevanjem na HPLC – MS sistemu raztopili v 250 µl 20 % metanola.

#### 3.2.6.1 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

##### HPLC: Agilent Technology 1100

Vakuumski razplinjevalnik: G1379A  
Binarna črpalka: G1312A  
Avtomatski vzorčevalnik: G1330B

Termostat kolone: G1316A

### Pogoji

Način kromatografije: RP  
Kromatografska kolona: Kinetex  
Mobilna faza A: 1% HCOOH v vodi  
Mobilna faza B: AcN  
Volumen injiciranja: 1  $\mu$ l  
Temperatura vzorcev: 8 °C  
Temperatura kolone: 30 °C

**Preglednica 7: Gradient tekočinske kromatografije**

Čas (min)	obilka A (%)	obilka B (%)	Pretok (ml/min)
0	95	5	0,500
10	40	60	0,500
11	0	100	0,500
12,1	95	5	0,500
15	95	5	0,500

**Masni detektor:** Micromass Quattro Micro; Waters

Način: ESI+  
Kapilara (kV): 3,50  
Napetost vhodne leče (V): 40  
Leča (V): 2  
Eksreaktor (V): 0,5  
Temperatura vhodne leče (°C): 120  
Temp. razpršilnega N<sub>2</sub> (°C): 350  
Pretok N<sub>2</sub> Cone (l/h): 50  
Pretok razpršilnega N<sub>2</sub> (l/h): 450  
Način: SIR (Selected Ion Recording)

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

HCA	m/z (ESI+)	Cona (v)
IQ	199,20	40
IQx	200,21	40
MeIQ	213,25	40
MeIQx	214,28	40
4,8-DiMeIQx	228,30	40
7,8-DiMeIQx	228,30	40
Glu-P-2	185,20	40
Norharman	169,26	40
Harman	183,28	40

Trp-P-1	221,20	40
Trp-P-2	198,20	40
PhIP	225,24	40
TriMeIQx	242,26	40

Obdelava: Quantify v MassLynx™ V4.

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

Pripravili smo mešanice standardov HCA (IQ, PhIP, MeIQ, MeIQx, TriMeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Glu-P-2, Harman in Norharman) v različnih koncentracijah posameznih HCA 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 µg/g. S tako pripravljenimi standardnimi mešanicami smo postopali enako kot z vzorci, da smo se izognili napakam, ki bi nastale zaradi različnih izgub posameznih HCA med čiščenjem vzorcev. Tudi pogoji kromatografije (HPLC – MS) so bili enaki kot pri vzorcih (Polak, 2003).

### 3.2.6.3 Izkoristek postopka čiščenja z ekstrakcijo s trdno fazo (SPE)

Pripravili smo enake mešanice standardov HCA (IQ, PhIP, MeIQ, MeIQx, TriMeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Glu-P-2, Harman in Norharman) v različnih koncentracijah posameznih HCA 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).

$$H_{HCA_i} = \frac{HCA_{i(SPE)}}{HCA_i} \quad \dots (7)$$

$HCA_{i(SPE)}$  = masa posameznega HCA podvrženega postopku ekstrakcije s trdno fazo  
 $HCA_i$  = masa posameznega HCA

### 3.2.6.4 Statistična analiza

V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s postopkom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Rezultati poskusa so bili analizirani po metodi najmanjših kvadratov s postopkom GLM.

Za analizo vpliva skupine (različnega dodatka rastlinskih ekstraktov) na kemijske parametre (osnovna kemijska sestava...) in senzorične lastnosti piščančjih sekljancev smo uporabili statistični model, v katerega smo vključili fiksna vpliva skupine (S: 1R, 2R, 3R, 0,7BR, 1,4BR, 2,1BR, 1BO, 2BO, 3BO in kontrola) in ponovitve (1-4):  $y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + e_{ijk}$ . Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z Duncanovim testom in primerjane pri 5 % tveganju.



## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE OSNOVNE KEMIJSKE SESTAVE PIŠČANČJEGA MESA Z NIR METODO

Rezultati analize osnovne kemijske sestave presnega in pečenega sekljanca (vsebnost beljakovin, maščob, vode, soli, kolagena in razmerje voda/beljakovine) so prikazani v preglednici 9.

**Preglednica 9: Rezultati osnovne kemijske analize presnega piščančjega fileja in pečenih piščančjih sekljancev**

Parameter (g/100 g)	Presen sekljanec	Pečen sekljanec
beljakovine	22,77	32,83
maščoba	1,14	1,65
voda	71,22	64,09
voda/beljakovine	3,13	1,95

Iz rezultatov v preglednici 9 je razvidno, da sta se deleža beljakovin in maščob v sekljancih po toplotni obdelavi povečala, medtem ko se količina vode ter razmerje med vodo in beljakovinami zmanjša.

### 4.2 IZGUBA MASE MED TOPLOTNO OBDELAVO

Med toplotno obdelavo na dvoploščnem žaru, pri 250 °C za 4 minute, se je iz sekljancev izcejal mesni sok, obenem pa je mesni sok tudi izpareval, kar je razlog za zmanjšanje mase sekljanca.

**Preglednica 10: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na izgubo mase med toplotno obdelavo (250 °C/4 min) piščančjih sekljancev (Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ )**

Rastlinski ekstrakt	izgube (g/100 g)
1R	8,15 ±1,28bc
2R	8,89 ±2,22ab
3R	5,93 ±1,28c
0,7BR	8,15 ±1,28bc
1,4BR	8,15 ±1,28bc
2,1BR	8,15 ±1,28bc
1BO	8,15 ±1,28bc
2BO	8,15 ±1,28bc
3BO	8,89 ±0,00ab
kontrola	11,11 ±0,00a
z.	*

z. – značilnost: \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (a,b,c) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med dodatki ekstraktov). 1R – 1 ml ekstrakta rožmarina; 2R – 2 ml ekstrakta rožmarina; 3R – 3 ml ekstrakta rožmarina; 0,7BR – 0,7 ml ekstrakta brinovih jagod; 1,4BR – 1,4 ml ekstrakta brinovih jagod; 2,1BR – 2,1 ml ekstrakta brinovih jagod; 1BO – 1 ml ekstrakta skorje bora; 2BO – 2 ml ekstrakta skorje bora; 3BO – 3 ml ekstrakta skorje bora.

V preglednici 10 so podani rezultati vpliva dodanih rastlinskih ekstraktov na izgubo mase med toplotno obdelavo piščančjih sekljancev. Razvidno je, da dodatek ekstraktov značilno vpliva na izgubo mase med pečenjem. V primerjavi s kontrolnim vzorcem vidimo največje odstopanje v izgubi mase pri vzorcu 3R, ki je izgubil 2-krat več mase kot kontrolni vzorec in 1,5-krat več mase kot ostali vzorci piščančjih sekljancev. Povprečna izguba mase med pečenjem je bila 8,37 g/100 g.

#### 4.3 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE

**Preglednica 11: Rezultati senzorične analize piščančjih sekljancev, izdelanih z različnimi dodatki ekstraktov, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 120)**

Lastnost (točke)	Vrednost			Standardni odklon	Koefficient variabilnosti (%)
	povprečna	najmanjša	največja		
obarvanje (0-4)	0	0	0	0	-
tuji vonji (0-4)	0,7	0	2,5	0,6	86
tuje arome (0-4)	1,9	0	3,5	1,0	50
sprejemljivost (0-4)	2,9	1	4	0,7	25

n – število obravnavanj v poskusu

V preglednici 11 so podani rezultati senzorične analize piščančjih sekljancev, izdelanih z različnimi dodatki ekstraktov, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri. Razvidno je, da so najbolj variabilne senzorične lastnosti povezane z vonjem in aromo, pri katerih je koefficient variabilnosti med 50 % in 86 %. Tako velika variabilnost ni samo posledica neuskklajenosti ocenjevalcev, ampak izvira iz narave poskusa, saj smo v sekljance dodali tri različne ekstrakte oz. rastlinske izvlečke v zelo različnih koncentracijah. Tudi ocene za sprejemljivost piščančjih sekljancev so zelo variirale (25 %), kar je posledica različnih preferenc ocenjevalcev do sprejemljivosti posameznega rastlinskega ekstrakta v piščančjih sekljancih.

**Preglednica 12: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na senzorično oceno obarvanja, tuje vonje in arome ter sprejemljivost pečenih piščančjih sekljancev (Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ )**

Rastlinski ekstrakt	Lastnost (točke 0-4)			
	obarvanje	tuji vonji	tuje arome	sprejemljivost
1R	0 ±0	0,8 ±0,6abc	1,3 ±0,8de	3,2 ±0,4bcd
2R	0 ±0	0,6 ±0,7bc	1,7 ±0,6cd	3,3 ±0,5bc
3R	0 ±0	0,3 ±0,2c	2,3 ±0,5bc	2,6 ±0,3ef
0,7BR	0 ±0	0,9 ±0,7ab	2,3 ±0,5b	2,6 ±0,3ef
1,4BR	0 ±0	0,8 ±0,7bc	2,4 ±0,6b	2,5 ±0,5f
2,1BR	0 ±0	1,3 ±0,7a	3,1 ±0,4a	1,6 ±0,6g
1BO	0 ±0	0,5 ±0,5bc	1,0 ±0,8e	3,5 ±0,5ab
2BO	0 ±0	0,7 ±0,7bc	2,0 ±0,9bc	2,9 ±0,6cde
3BO	0 ±0	1,0 ±0,5ab	2,3 ±0,8bc	2,8 ±0,4def
kontrola	0 ±0	0,5 ±0,4bc	0,8 ±0,6e	3,8 ±0,2a
Z.	-	**	***	***

z. – značilnost: \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv; \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv; \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d,e,f,g) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med dodatki ekstraktov). 1R – 1 ml ekstrakta rožmarina; 2R – 2 ml ekstrakta rožmarina; 3R – 3 ml ekstrakta rožmarina; 0,7BR – 0,7 ml ekstrakta brinovitih jagod; 1,4BR – 1,4 ml ekstrakta brinovitih jagod; 2,1BR – 2,1 ml ekstrakta brinovitih jagod; 1BO – 1 ml ekstrakta skorje bora; 2BO – 2 ml ekstrakta skorje bora; 3BO – 3 ml ekstrakta skorje bora.

Preglednica 12 natančneje prikazuje vpliv vrste in količine dodanih ekstraktov na senzorično kakovost piščančjih sekljancev. Dodajanje ekstraktov značilno vpliva na tuje arome ( $p \leq 0,001$ ), sprejemljivost ( $p \leq 0,001$ ) in tuje vonje ( $p \leq 0,01$ ) toplotno obdelanih sekljancev, ne vpliva ( $p > 0,05$ ) pa na obarvanje presnih piščančjih sekljancev, saj poslabšanja barve oz. obarvanje ocenjevalci niso zasledili pri nobenem vzorcu.

Ocenjevalci so že na kontrolnem vzorcu zasledili rahle tuje vonje, ki so jih v povprečju ocenili z 0,5 točke. Najbolj je odstopal vzorec, v katerega smo dodali 2,1 ml ekstrakta brina (2,1BR); tuje vonje na tem vzorcu so ocenjevalci ovrednotili z največjim številom točk (1,3). Izrazitejši tuji vonji so bili prisotni tudi v vzorcih 3BO, 0,7BR in 1R, ovrednoteni med 1 in 0,8 točke.

Na kontrolnem vzorcu so ocenjevalci poleg tujih vonjev zaznali tudi tuje arome, ki so jih ocenili z 0,8 točke. V podobnem obsegu so tuje arome zaznali tudi pri vzorcih 1BO in 1R, v katera smo dodali najmanjše količine ekstraktov bora in rožmarina. V nasprotju z njima pa najmanjši dodatek ekstrakta brina (0,7BR) v sekljancih pušča že močne tuje arome, ki so jih ocenjevalci ovrednotili z 2,3 točke. V povprečju je dodatek ekstrakta brina najbolj prispeval k tujim aromam v piščančjih sekljancih. Najbolj izražene tuje arome so tako ocenjevalci zaznali pri vzorcu z 2,1 ml dodanega ekstrakta brina (2,1BR), ki je bil ovrednoten z najvišjim številom točk (3,1). Sklepamo lahko, da tako majhen kot velik dodatek rastlinskega ekstrakta brina na sekljancih povzročata izrazite tuje arome.

Najmanj sprejemljiv je bil vzorec 2,1BR, ki je bil ovrednoten z najmanjšim številom točk (1,6), predvsem zaradi motečih tujih vonjev in arom v sekljancu. Ponovno so bili glede sprejemljivosti najslabše ocenjeni vzorci z dodatkom ekstrakta brina (0,7BR, 1,4BR in 2,1BR).

#### 4.4 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN Z METODO FC

**Preglednica 13: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brina, bora in rožmarina, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta.**

Rastlinski ekstrakt	C <sub>SFS</sub> (mg/l)	Standardni odklon
brin	4535,9	0,0
bor	2985,2	14,9
rožmarin	2352,3	74,6

C<sub>SFS</sub> (mg/l) – koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženi kot galna kislina v mg na liter ekstrakta.

V preglednici 13 so podani rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brina, bora in rožmarina, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta. Največ skupnih fenolnih snovi vsebuje ekstrakt brina in sicer 4535,9 mg/l, izraženih kot galna kislina, temu sledi ekstrakt bora z 2985,2 mg/l, ter ekstrakt rožmarina z 2352,3 mg/l, izraženih kot galna kislina.

**Preglednica 14: Rezultati določanja koncentracije dodanih antioksidantov, iz ekstraktov rožmarina, brina in bora, posameznemu piščančjemu sekljancu v mg antioksidanta na celoten sekljanec, izraženo kot galna kislina.**

Rastlinski ekstrakt	C <sub>antioksidanta</sub> dodanega v sekljanec (mg/sekljanec)
1R	2,353
2R	4,706
3R	7,057
0,7BR	3,175
1,4BR	6,350
2,1BR	9,525
1BO	2,985
2BO	5,970
3BO	8,956
kontrola	0,000

1R – 1 ml ekstrakta rožmarina; 2R – 2 ml ekstrakta rožmarina; 3R – 3 ml ekstrakta rožmarina; 0,7BR – 0,7 ml ekstrakta brinovih jagod; 1,4BR – 1,4 ml ekstrakta brinovih jagod; 2,1BR – 2,1 ml ekstrakta brinovih jagod; 1BO – 1 ml ekstrakta skorje bora; 2BO – 2 ml ekstrakta skorje bora; 3BO – 3 ml ekstrakta skorje bora.

Iz preglednice 14 je razvidno, da smo največ antioksidantov dodali v primeru dodatka 2,1BR, kjer je bila količina dodanih antioksidantov v piščančji sekljanec 9,525 mg. Zelo

malo razlike je bilo v primeru dodatka 3BO, kjer je bil dodatek antioksidantov 8,956 mg, ter v primeru dodatka 3R, ko je bil dodatek antioksidanta 7,057 mg, izraženih kot galna kislina. Najmanj antioksidantov smo dodali ob dodatku 1R in sicer zgolj 2,353 mg, ter v primeru dodatka 1BO, 2,985 mg in 0,7 BR, 3,175 mg antioksidantov na sekljanec, izraženo kot galna kislina.

**Preglednica 15: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v piščančjih sekljancih, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta sekljanca, mg na gram piščančjega sekljanca in mg na celotni piščančji sekljanec po pečenju.**

Parameter	Vrednost			Standardni odklon	Koefficient variabilnosti (%)
	povprečna	najmanjša	največja		
c <sub>SFS</sub> (mg/l)	260,4	221,5	315,4	24,1	9,3
c <sub>SFS</sub> (mg/g)	0,775	0,660	0,940	0,070	9,2
c <sub>SFS</sub> (mg/ sekljanec)	64,04	54,11	78,93	5,982	9,5

c<sub>SFS</sub> (mg/l) – koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženi kot galna kislina v mg na liter ekstrakta; c<sub>SFS</sub> (mg/g) – koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženi kot galna kislina v mg na gram sekljanca; c<sub>SFS</sub>/sekljanec – koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženi kot mg galne kisline na pečen piščančji sekljanec.

V preglednici 15 so podani rezultati določanja skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu v piščančjih sekljancih, izraženi kot galna kislina v mg na liter ekstrakta sekljanca, mg na gram piščančjega sekljanca in mg na celotni pečeni piščančji sekljanec. Povprečno je bilo v litru ekstrakta določenih 260 mg skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina. Vzorci so bili glede vsebnosti skupnih fenolnih snovi v mg na liter ekstrakta dokaj homogeni, saj je koefficient variabilnosti za parameter 9,3 %. Torej lahko sklepamo, da ni izrazitih razlik v koncentracijah skupnih fenolnih snovi med posameznimi rastlinskimi ekstrakti.

Dokaj podobni so bili rezultati določanja skupnih fenolnih snovi v mg na gram piščančjega sekljanca, izraženi kot galna kislina. Tudi tu vidimo, da so bili vzorci precej homogeni, kajti koefficient variabilnosti za ta parameter je 9,2 %. Razlika med najmanjšo in največjo koncentracijo je zgolj 1,4.

V povprečju je gram sekljanca vseboval 0,775 mg skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina.

Zopet zelo majhna variabilnost med vzorci se kaže pri določanju skupnih fenolnih snovi na celotni pečeni piščančji sekljanec, kjer je koefficient variabilnosti 9,5 %.

Povprečno je pečeni sekljanec vseboval 64,04 mg skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina.

**Preglednica16: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na vsebnost skupnih fenolnih spojin v piščančjih sekljancih po toplotni obdelavi, določenih z metodo Folin-Ciocalteu, izraženi kot galna kislina v mg na liter ekstrakta sekljanca, mg na gram sekljanca in mg na celotni 90 g piščančji sekljanec (Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).**

Rastlinski ekstrakt	c <sub>SFS</sub> (mg/l)	c <sub>SFS</sub> (mg/g)	c <sub>SFS</sub> (mg/sekljanec)
1R	238,7 ±10,6cd	0,71 ±0,03f	58,96 ±2,71e
2R	244,2 ±10,4cd	0,73 ±0,03cd	59,81±2,37d
3R	241,2 ±13,2cd	0,72 ±0,04a	60,58±3,52ab
0,7BR	285,0 ±16,8a	0,84 ±0,04g	69,67±4,16e
1,4BR	290,1 ±16,7a	0,87 ±0,05e	71,61±4,92d
2,1BR	286,9 ±19,1a	0,85 ±0,06b	70,35±4,93bc
1BO	267,4 ±12,3b	0,79 ±0,04f	65,50±3,33e
2BO	256,0 ±15,4bc	0,76 ±0,05c	63,13±3,73cd
3BO	242,6 ±6,3cd	0,72 ±0,02a	59,32±1,36a
kontrola	235,8 ±2,2d	0,70 ±0,01d	56,30±0,53f
z.	***	***	***

z. – značilnost: \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d,e,f,g) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med dodatki ekstraktov). 1R – 1 ml ekstrakta rožmarina; 2R – 2 ml ekstrakta rožmarina; 3R – 3 ml ekstrakta rožmarina; 0,7BR – 0,7 ml ekstrakta brinovih jagod; 1,4BR – 1,4 ml ekstrakta brinovih jagod; 2,1BR – 2,1 ml ekstrakta brinovih jagod; 1BO – 1 ml ekstrakta skorje bora; 2BO – 2 ml ekstrakta skorje bora; 3BO – 3 ml ekstrakta skorje bora; SFS – skupne fenolne snovi.

Iz preglednice 16 je razvidno, da dodatek rastlinskih ekstraktov značilno vpliva ( $p \leq 0,001$ ) tako na koncentracijo skupnih fenolnih spojin v mg na liter ekstrakta sekljanca in v mg na gram sekljanca, izraženih kot galna kislina, kot tudi na koncentracijo skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina, v celotnem piščančjem sekljancu po pečenju.

Koncentracija skupnih fenolnih spojin v mg na liter ekstrakta sekljanca je največja v vzorcih brina (0,7BR, 1,4BR in 2,1BR) in v povprečju znaša 287 mg/l. Najvišja vsebnost skupnih fenolnih spojin v mg na liter ekstrakta sekljanca, izraženih kot galna kislina, je bila določena v vzorcu 1,4BR. Nekaj manjšo koncentracijo skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta sekljanca, smo določili v ekstraktu bora (1BO, 2BO in 3BO), katerih vsebnost je bila v povprečju 255 mg/l. Največ skupnih fenolnih snovi je bilo določenih v vzorcu 1BO. Najmanj skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina, v mg na liter ekstrakta sekljanca pa smo določili v ekstraktu rožmarina (1R, 2R in 3R), in sicer v povprečju 241 mg/l. Zanimivo je, da se kontrola zelo malo razlikuje od ostalih vzorcev z dodanimi rastlinskimi ekstrakti, saj reagent Folin-Ciocalteu reagira tudi s produkti Maillardove reakcije, aminokislinskimi ostanki, reducirajočimi sladkorji, hemoglobinom itd., kar da pozitiven rezultat pri določanju skupnih fenolnih spojin in moramo kontrolo dejansko odšteti od dobljenih rezultatov.

V 1 gramu piščančjega sekljanca smo največje koncentracije skupnih fenolnih snovi prav tako določili v sekljancih z dodanim ekstraktom brina (0,7BR, 1,4BR in 2,1BR), kjer je bila povprečna vrednost skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina, 0,85 mg/g. Temu so po koncentraciji skupnih fenolnih snovi v mg na gram sekljanca sledili vzorci

1BO, 2BO in 3BO, torej vzorci z dodanim ekstraktom bora, s povprečno 0,76 mg/g skupnih fenolnih snovi, in na koncu še vzorci z dodanim ekstraktom rožmarina (1R, 2R in 3R), s povprečno koncentracijo 0,72 mg/g skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina. Med posameznimi vzorci sta največjo koncentracijo skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina, v 1 g sekljanca imela vzorca 1,4 BR (0,87 mg/g) in 2,1 BR (0,85 mg/g). Tudi v tem primeru smo v kontroli določili velike koncentracije skupnih fenolnih snovi (0,70 mg/g), izraženih kot galna kislina, kar je posledica že zgoraj omenjenega dejstva.

Pri določanju koncentracije skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina, v celotnem piščančjem sekljancu, kjer smo upoštevali še maso sekljanca po pečenju, je bila največja koncentracija določena v vzorcih 1,4BR (71,61 mg/sekljanec) in 2,1BR (70,35 mg/sekljanec). Povprečno gledano je bila največja koncentracija skupnih fenolnih snovi (70,54 mg/sekljanec) določena v vzorcih 0,7BR, 1,4BR in 2,1BR temu so sledili vzorci 1BO, 2BO, 3BO (59,78 mg/sekljanec) ter vzorci 1R, 2R in 3R (59,78 mg/sekljanec).

#### 4.5 DOLOČANJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH BORA, BRINA IN ROŽMARINA

Vsebnost suhe snovi v ekstraktih iz skorje bora, brinovih jagod in rožmarina smo določili s sušenjem pri  $60 (\pm 1) ^\circ\text{C}$  do konstantne teže. Največ suhe snovi v 1 ml ekstrakta vsebuje domači brin 0,0198 g, temu sledi rožmarin 0,0044 g in borova skorja 0,0030 g.

#### **Preglednica 17: Količina skupnih fenolnih snovi v 1 g suhe snovi ekstrakta skorje bora, jagod brina in rožmarina**

<b>ekstrakt</b>	<b>c<sub>SFS</sub> (mg/g SS)</b>
brin	229,1
bor	1013,1 ± 15,60
rožmarin	542,5 ± 3,87

SS suha snov; SFS – skupne fenolne snovi.

Iz preglednice 17 lahko razberemo, da ima v 1 g suhe snovi, največjo količino skupnih fenolnih snovi, izraženih kot galna kislina, ekstrakt bora 1013,1 mg in kar za polovico manj ekstrakt rožmarina 542,5 mg. Najmanjšo količino skupnih fenolnih snovi v 1 g suhe snovi pa smo dokazali v ekstraktu brina 229,0 mg, ki ima za polovico manj skupnih fenolnih snovi kot ekstrakt rožmarina in kar za štirikrat manj kot ekstrakt bora.

#### 4.6 DOLOČANJE VSEBNOSTI HCA V PEČENIH PIŠČANČJIH SEKLJANCIH

**Preglednica 78: Rezultati določanja HCA v piščančjih sekljancih z dodanimi rastlinskimi ekstrakti z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 60)**

Parameter (ng HCA/g vzorca)	Vrednost			Standardni odklon	Koefficient variabilnosti (%)
	povprečna	najmanjša	največja		
MeIQx	1,16	< 0,01	6,27	1,58	137
PhIP	15,77	0,00	69,82	13,47	85
Harman	3,80	1,42	72,33	9,26	244
Norharman	4,09	2,63	16,94	1,92	47
4,8-DiMeIQx	0,91	0,15	3,19	0,61	67
7,8-DiMeIQx	0,19	0,15	0,41	0,07	35
Glu-P-2	9,07	7,30	14,35	1,42	16
vsota skupnih* HCA	34,99	12,15	118,50	19,98	57

n – število obravnavanj v poskusu, skupnih\* – MeIQx, PhIP, Harman, Norharman, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx in Glu-P-2.

Rezultati določanja vsebnosti heterocikličnih aminov v piščančjih sekljancih z dodanimi rastlinskimi ekstrakti bora, brina in rožmarina so prikazani v preglednici 18. Iz rezultatov je razvidno, da so vzorci glede vsebnosti skupnih HCA dokaj nehomogeni, saj je koefficient variabilnosti za omenjen parameter 57 %. Vsebnost posameznih HCA v poskusu močno variira (Harman – 244 %, MeIQx – 137 %) zaradi različnih dodatkov rastlinskih ekstraktov, ki po našem predvidevanju močno vplivajo na tvorbo HCA. Kot prikazuje preglednica 18 so piščančji sekljanci z dodanimi rastlinskimi ekstrakti na 1 g vzorca v povprečju vsebovali 35 ng HCA. Med posameznimi HCA je najbolj izstopal PhIP, katerega povprečna vsebnost je bila 15,77 ng/g kar je od 2- do 83-krat več od ostalih HCA, prisotnih v piščančjih sekljancih. Temu HCA je sledil Glu-P-2 z vsebnostjo 9,07 ng/g, Norharman z 4,09 ng/g, Harman z 3,80 ng/g ter MeIQx z 1,16 ng/g in 4,8-DiMeIQx z 0,91 ng/g. V najmanjši količini je bil prisoten 7,8-DiMeIQx z zgolj 0,19 ng/g.



**Preglednica 89: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na tvorbo posameznih HCA (ng HCA/g) v toplotno obdelanih piščančjih sekljancih (Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ )**

Rastlinski ekstrakt	ng HCA/g						
	MeIQx	PhIP	Harman	Norharman	4,8-DiMeIQx	7,8-DiMeIQx	Glu-P-2
1R	1,23 ±0,90	14,46 ±8,22bc	2,40 ±0,37	3,64 ±0,71	0,92 ±0,52bcd	0,17 ±0,05c	8,97 ±0,74
2R	1,05 ±2,17	19,34 ±8,96b	2,58 ±0,16	3,94 ±0,36	0,99 ±0,11bc	0,16 ±0,02c	9,29 ±0,55
3R	0,79 ±1,02	12,73 ±6,92bc	2,28 ±0,35	3,57 ±0,22	0,56 ±0,23cd	0,29 ±0,01a	8,62 ±0,60
0,7BR	1,85 ±2,56	8,59 ±3,99bc	2,10 ±0,19	3,41 ±0,35	0,65 ±0,22cd	0,17 ±0,03c	8,12 ±0,30
1,4BR	1,36 ±1,49	14,27 ±12,44bc	2,93 ±0,84	3,98 ±0,53	0,74 ±0,28bcd	0,15 ±0,00c	10,51 ±2,96
2,1BR	0,90 ±2,02	3,21 ±5,27c	2,34 ±0,84	3,41 ±0,48	0,36 ±0,15d	0,16 ±0,01c	8,98 ±1,50
1BO	1,13 ±1,78	10,15 ±10,53bc	2,34 ±0,71	3,38 ±0,49	0,71 ±0,27cd	0,15 ±0,02c	8,33 ±1,01
2BO	1,71 ±2,08	20,59 ±14,37b	2,81 ±0,78	4,36 ±1,70	1,32 ±0,76b	0,17 ±0,04bc	8,66 ±0,59
3BO	0,61 ±0,78	23,69 ±4,90ab	14,49 ±28,34	6,57 ±5,09	1,15 ±0,53bc	0,32 ±0,06a	9,27 ±0,22
kontrola	1,04 ±0,71	36,33 ±30,22a	3,21 ±0,99	4,74 ±1,16	2,02 ±1,14a	0,21 ±0,05b	10,12 ±2,40
z.	nz	**	nz	nz	***	***	nz

z. – značilnost: \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv; \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv; nz –  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ; značilnost razlik med dodatki ekstraktov). 1R – 1 ml ekstrakta rožmarina; 2R – 2 ml ekstrakta rožmarina; 3R – 3 ml ekstrakta rožmarina; 0,7BR – 0,7 ml ekstrakta brinovih jagod; 1,4BR – 1,4 ml ekstrakta brinovih jagod; 2,1BR – 2,1 ml ekstrakta brinovih jagod; 1BO – 1 ml ekstrakta skorje bora; 2BO – 2 ml ekstrakta skorje bora; 3BO – 3 ml ekstrakta skorje bora.

V preglednicah 19 in 20 so podani rezultati vpliva dodanih rastlinskih ekstraktov na tvorbo HCA v piščančjih sekljancih. Dodatki rastlinskih ekstraktov rožmarina, brina in bora statistično značilno vplivajo na tvorbo 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx ( $p \leq 0,001$ ) ter PhIP ( $p \leq 0,01$ ), medtem ko na tvorbo MeIQx, Harmana, Norharmana in Glu-P-2 ne vplivajo značilno ( $p > 0,05$ ).

Značilno največ skupnih HCA (57,67 ng/g) je nastalo po pričakovanjih v kontrolnem vzorcu, brez dodanih rastlinskih ekstraktov (preglednica 20). Med vzorci z dodanimi rastlinskimi ekstrakti pa se je značilno največ HCA tvorilo v vzorcu 3BO (56,10 ng/g), kljub dodani večji koncentraciji ekstrakta bora, v primerjavi z vzorcema z manjšima koncentracijama ekstrakta. Tudi povprečno imajo vzorci z dodanim ekstraktom bora največjo količino skupnih HCA. Značilno najmanj HCA (19,35 ng/g) se je tvorilo pri vzorcu z dodatkom brina (2,1BR) in sicer za tri krat manj HCA, kot v kontrolnem vzorcu (57,67 ng/g). Povprečno je tvorbo HCA najbolje zavrl ekstrakt brina, kajti v povprečju se je tvorilo zgolj 26 ng HCA/g, kar je za 1,5-krat manj kot pri vzorcih z dodatkom bora (40 ng HCA/g) in za 1,3 krat manj kot pri vzorcih z dodatkom rožmarina (33 ng HCA/g).

Dodatki rastlinskih ekstraktov so značilno zmanjšali obseg tvorbe PhIP. Najbolj uspešen je bil ekstrakt brina, ki je v povprečju omejil tvorbo PhIP kar za 4-krat (8,7 ng PhIP/g) v primerjavi s kontrolnim vzorcem (36,33 ng PhIP/g). Temu sledi ekstrakt rožmarina, ki je povprečno zmanjšal tvorbo PhIP za 2,3-krat (15,51 ng PhIP/g) v primerjavi s kontrolo ter

ekstrakt bora, ki je zmanjšal tvorbo PhIP za 2-krat (18,14 ng PhIP/g) v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Med posameznimi vzorci, v katere je bil dodan ekstrakt brina, se je najmanj PhIP tvorilo v vzorcu z dodanim 2,1 ml brina (2,1BR) in sicer zgolj 3,21 ng /g. Največ PhIP se je tvorilo v vzorcu 3BO (23,69 ng /g), kjer smo dodali 3 ml ekstrakta bora.

Ekstrakti rožmarina, brina in bora dodani piščančjim sekljancem so značilno vplivali na zmanjšanje tvorbe 4,8-DiMeIQx. Ponovno se je najmanj 4,8-DiMeIQx tvorilo pri vzorcih z dodanim ekstraktom brina. Povprečno se je v teh vzorcih tvorilo 3,5-krat manj 4,8-DiMeIQx (0,58 ng/g), kot v kontrolnem vzorcu (2,02 ng/g). Za 2,5-krat manj 4,8-DiMeIQx (0,82 ng/g) v primerjavi s kontrolo, se je tvorilo v vzorcih z dodanim ekstraktom rožmarina in za 2-krat manj 4,8-DiMeIQx (1,06 ng/g) je nastalo v vzorcih z dodatkom bora. Od vseh vzorcev se statistično najbolj razlikuje vzorec 2,1BR, kjer je nastalo najmanj 4,8-DiMeIQx (0,36 ng/g), največ 4,8-DiMeIQx pa se je tvorilo pri vzorcu 2BO (1,32 ng/g).

Prav tako dodatki rastlinskih ekstraktov značilno vplivajo na zmanjšanje tvorbe 7,8-DiMeIQx. Najmanj 7,8-DiMeIQx v primerjavi s kontrolo (0,21 ng/g) se je v povprečju tvorilo pri dodatku ekstrakta brina (0,16 ng/g), približno enaka količina 7,8-DiMeIQx kot v kontrolnem vzorcu pa se je tvorila v vzorcih z dodatkom bora (0,21 ng/g). Nekoliko manj 7,8-DiMeIQx kot v kontrolnem vzorcu se je tvorilo v vzorcih z dodatkom rožmarina (0,20 ng/g). Na splošno opazimo najmanjšo tvorbo 7,8-DiMeIQx pri vzorcih 1,4BR in 1BO (0,15 ng/g), največ 7,8-DiMeIQx pa je nastalo v vzorcu 3BO (0,32 ng/g).

**Preglednica 90: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov na tvorbo vseh identificiranih HCA (ng HCA/g) v toplotno obdelanih piščančjih sekljancih (Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ )**

Rastlinski ekstrakt	ng HCA/g
	Vsota
1R	31,77 ±10,41b
2R	37,36 ±10,96ab
3R	28,83 ±7,81b
0,7BR	24,90 ±6,58b
1,4BR	33,95 ±16,50b
2,1BR	19,35 ±7,71b
1BO	26,19 ±13,16b
2BO	39,62 ±19,96ab
3BO	56,10 ±30,97a
kontrola	57,67 ±35,57a
z.	**

z. – značilnost: \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (a,b) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo (značilnost razlik med dodatki ekstraktov). 1R – 1 ml rožmarin; 1R – 1 ml ekstrakta rožmarina; 2R – 2 ml ekstrakta rožmarina; 3R – 3 ml ekstrakta rožmarina; 0,7BR – 0,7 ml ekstrakta brinovitih jagod; 1,4BR – 1,4 ml ekstrakta brinovitih jagod; 2,1BR – 2,1 ml ekstrakta brinovitih jagod; 1BO – 1 ml ekstrakta skorje bora; 2BO – 2 ml ekstrakta skorje bora; 3BO – 3 ml ekstrakta skorje bora.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen naloge je bil ugotoviti vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov rožmarina, skorje bora ter jagod brina na preprečevanje tvorbe HCA v pečenih piščančjih sekljancih. Z metodo Folin–Ciocalteu smo v ekstraktih kot tudi v piščančjih sekljancih določili količino skupnih fenolnih spojin. Piščančje sekljance smo po dodatku ekstraktov (rožmarina, skorje bora in jagod brina) čez noč kondicionirali v hladilniku, nato pa toplotno obdelali in jih senzorično in kemijsko analizirali. Senzorični preskuševalci so ocenili barvo, vonj in aromo ter sprejemljivost toplotno obdelanih sekljancev. Določili smo osnovno sestavo mesa, vsebnost suhe snovi in skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ter vsebnost skupnih fenolnih spojin in HCA v pečenih piščančjih sekljancih.

Zaradi potencialne toksičnosti sintetičnih antioksidantov in ozaveščenosti kupcev, ki težijo k nakupu živil čim bolj naravnega izvora, mesna industrija zavzeto išče izvore naravnih antioksidantov. Rastline so dober vir polifenolov in zato dobra alternativa sintetičnim antioksidantom, kot sta butiliran hidroksianizol (BHA) in butiliran hidroksitoluen (BHT). Pri izbiri alternativ je bistvenega pomena senzorična sprejemljivost in vpliv na kakovost samega izdelka po dodatku antioksidanta (Karre in sod., 2013). Rezultati različnih raziskav kažejo na to, da ima rožmarin zelo dobro antioksidativno aktivnost, identično čistemu  $\alpha$ -tokoferolu in večjo kot butiliran hidroksitoluen (BHT). Glavni antioksidanti v rožmarinu so karnozolna kislina in karnozol, abietinski diterpeni, rožmarinska kislina in estri hidroksicimetne kisline. Vse te snovi skupaj z ostalimi izoprenoidi (steroli, izopreni, mono in diterpeni, tokoferoli ali karotenoidi) imajo vlogo fotozaščite in se štejejo za biološko aktivne snovi rožmarina (Almela in sod., 2006). Prav tako je borova skorja, ki je bila še pred leti v lesni industriji nekoristen odpadek z omejeno uporabo, bogat vir polifenolov in jo danes uporabljajo tako v farmaciji in zdravstvu, kot tudi v prehrani (Kähkönen in sod., 1999). Brinove jagode in iglice so bile zaradi svojih diuretičnih lastnosti in pozitivnih učinkov na prebavo v medicini poznane že pred mnogimi stoletji. Brinovo eterično olje je naravni izdelek, ki se uporablja v farmacevtski in živilski industriji (Orav in sod., 2010; Maarse, 1991). V raziskavi, ki jo je opravil Miceli in sod. (2011), je ugotovljeno, da vsebuje 1 gram ekstrakta brina (*Juniperus drupacea*)  $48,06 \pm 0,99$  mg fenolnih snovi izraženih kot galna kislina. Fenolne snovi, vključno s fenoli, fenolnimi kisljinami, flavonoidi, tanini in lignani, so glavni naravni antioksidanti.

Glede na pozitivne lastnosti, ki jih imajo tako rožmarin, brin in bor smo se odločili, da v piščančje sekljance dodamo različne koncentracije ekstraktov rožmarina, bora in brina, ki bodo pripomogli k znižanju tvorbe rakotvornih HCA. Obenem pa je bilo potrebno veliko pozornost nameniti senzorični sprejemljivosti posameznega piščančjega sekljanca, kajti želeli smo določiti tisto koncentracijo ekstrakta, ki bi znižala tvorbo neželenih HCA in bila obenem senzorično sprejemljiva za potrošnike.

### 5.1.1 Senzorična analiza

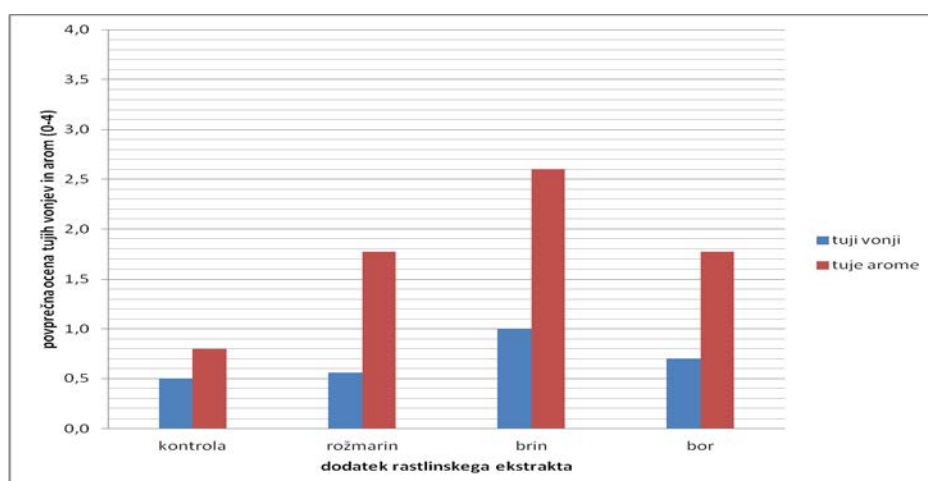
Cilj našega dela ni bil zgolj znižati koncentracijo HCA v piščančjih sekljancih tekom toplotne obdelave, temveč ugotoviti, ali so ti primerni tudi za uživanje in posamični dodani ekstrakti ne motijo posameznika pri uživanju sekljanca. Senzorično oceno barve, vonja in arome ter sprejemljivosti posameznega sekljanca je podal panel izšolanih senzoričnih ocenjevalcev na področju senzorične analize mesa in mesnih izdelkov.

Dodatek ekstraktov rožmarina, skorje bora in jagod brina je imelo značilen vpliv na tuje arome ( $p \leq 0,001$ ), sprejemljivost ( $p \leq 0,001$ ) in tuje vonje ( $p \leq 0,01$ ) toplotno obdelanih sekljancev, statistično neznačilen vpliv ( $p > 0,05$ ) pa je imalo na obarvanje toplotno obdelanih piščančjih sekljancev, saj poslabšanja barve oz. obarvanje ocenjevalci niso zasledili pri nobenem vzorcu.

Barvo toplotno obdelanih piščančjih sekljancev z dodatkom različnih rastlinskih ekstraktov so vsi ocenjevalci ocenili z 0 točkami, kar pomeni, da je bila površina mesa svetlosive rjave barve.

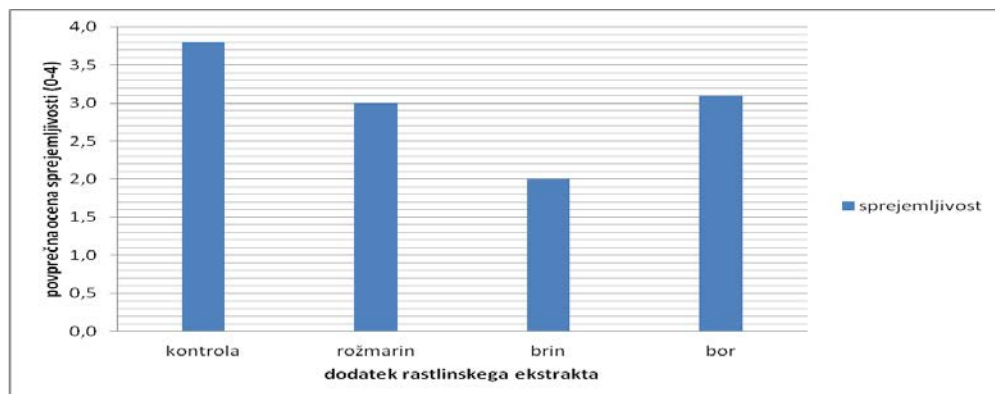
Rahle tuje vonje so ocenjevalci zasledili že na kontrolnem vzorcu. Najbolj je odstopal vzorec, v katerega smo dodali 2,1 ml ekstrakta brina. Izrazitejši tuji vonji so bili prisotni tudi v vzorcih z dodatkom 3 ml ekstrakta skorje bora, 0,7 ml ekstrakta jagod brina in 1 ml ekstrakta rožmarina.

Tudi tuje arome so ocenjevalci zaznali že v kontrolnem vzorcu. V podobnem obsegu, kot v kontrolnem vzorcu, so tuje arome zaznali tudi pri vzorcih z dodatkom 1 ml ekstrakta skorje bora in 1 ml ekstrakta rožmarina, v katere smo dodali najmanjše količine teh dveh ekstraktov. Zanimiva je ugotovitev, da je že najmanjši dodatek ekstrakta brina (0,7 ml) v sekljancih pustil močne tuje arome. V povprečju je dodatek ekstrakta brina najbolj prispeval k tujim aromam v piščančjih sekljancih. Iz tega lahko sklepamo, da tako majhen kot velik dodatek rastlinskega ekstrakta brina na sekljancih povzroča izrazite tuje arome.



Slika 7: Vpliv dodatka ekstraktov rožmarina, jagod brina in skorje bora na tuje vonje in arome v pečenih piščančjih sekljancih.

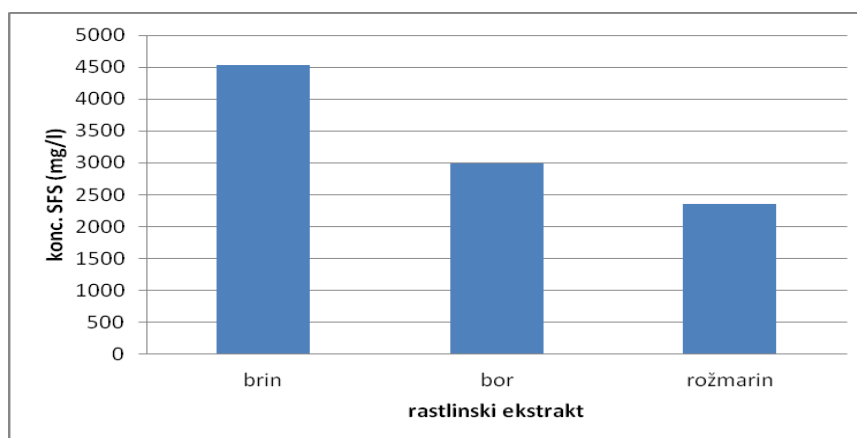
Glede sprejemljivosti posameznega sekljanca z dodatkom različnih ekstraktov je bil najmanj sprejemljiv vzorec v katerega smo dodali največjo količino ekstrakta brina (2,1 ml), predvsem zaradi motečih tujih vonjev in arom v sekljancu. Ponovno so bili glede sprejemljivosti najslabše ocenjeni vzorci z dodatkom ekstrakta brina.



**Slika 8: Vpliv dodatka ekstraktov rožmarina, jagod brina in skorje bora na sprejemljivost pečenih piščančjih sekljancev.**

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

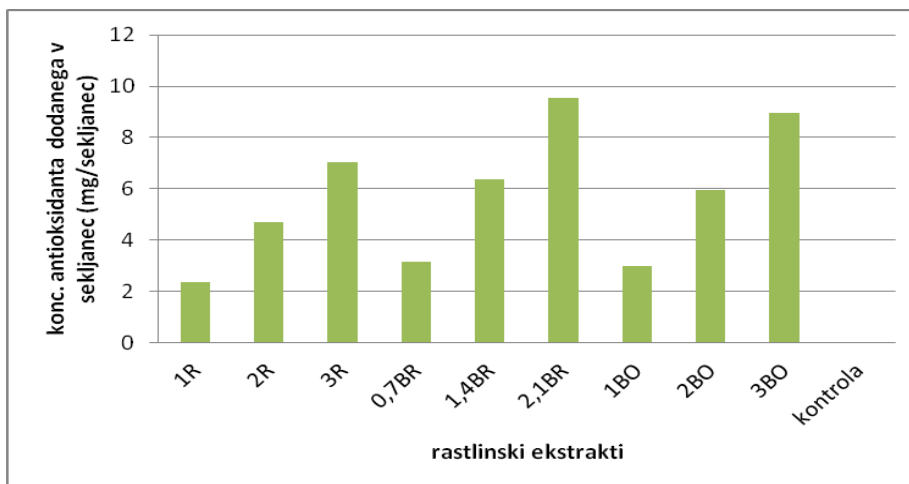
Pri določanju skupnih fenolnih spojin z metodo Folin-Ciocalteu, v rastlinskih ekstraktih brina, bora in rožmarina, smo ugotovili, da največ skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina, vsebuje ekstrakt brina in sicer 4535,9 mg/l, za 1,5 krat manj ekstrakt bora (2985,2 mg/l) ter kar za polovico manj, v primerjavi z ekstraktom brina, ekstrakt rožmarina (2352,3 mg/l).



**Slika 9: Koncentracija skupnih fenolnih spojin določena z metodo Folin-Ciocalteu v rastlinskih ekstraktih brina, bora in rožmarina, izraženih kot galna kislina v mg na liter ekstrakta.**

Obenem smo določili tudi koliko antioksidantov smo dodali posameznemu piščančjemu sekljancu. Prišli smo do zaključka, da je bilo največ antioksidantov dodanih v sekljanec v

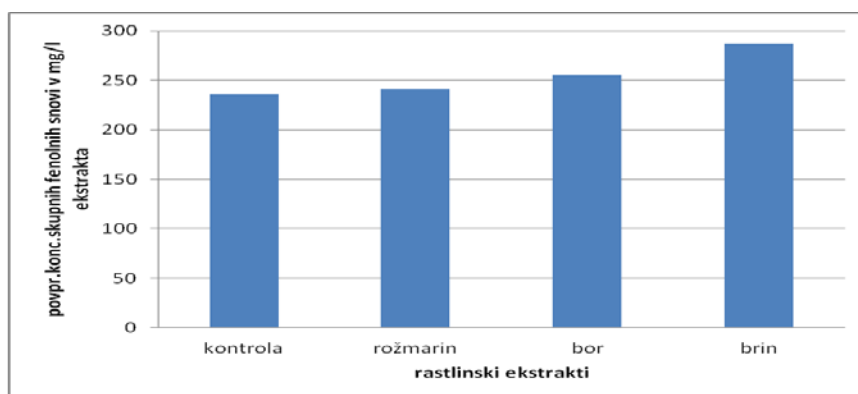
primeru dodatka 2,1BR (9,525 mg). Zelo malo razlike je bilo v primeru dodatka 3BO, kjer je bil dodatek antioksidantov 8,956 mg, ter v primeru dodatka 3R, ko je bil dodatek antioksidanta 7,057 mg, izraženih kot galna kislina. Bistveno manj antioksidantov smo dodali ob dodatku 1BO, 2,985 mg in 0,7BR, 3,175 mg in zgolj 2,353 mg antioksidantov izraženih kot galna kislina, v primeru dodatka 1R.



**Slika 10: Koncentracije dodanih antioksidantov, iz ekstraktov rožmarina, brina in bora, posameznemu piščančjemu sekljancu v mg antioksidanta na celoten sekljanec, izraženo kot galna kislina.**

Vzorci so bili glede vsebnosti skupnih fenolnih spojin v mg na liter ekstrakta sekljanca dokaj homogeni. Iz tega smo sklepali, da ni večjih razlik v koncentracijah skupnih fenolnih spojin med posameznimi rastlinskimi ekstrakti. Z metodo Folin – Ciocalteu smo v litru ekstrakta sekljanca povprečno določili 260 mg skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina. Zelo majhno razliko med največjo in najmanjšo koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo dobili pri določanju skupnih fenolnih spojin v mg na gram piščančjega sekljanca. Povprečno je gram sekljanca vseboval 0,775 mg skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina. Pri določanju skupnih fenolnih spojin na celotni pečeni piščančji sekljanec pa smo v povprečju določili 64,04 mg skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina.

Vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov smo ugotovili tako pri določanju skupnih fenolnih spojin v mg na liter ekstrakta sekljanca in v mg na gram sekljanca, kot tudi pri določanju skupnih fenolnih spojin v celotnem piščančjem sekljancu. Največjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin v mg na liter ekstrakta sekljanca smo določili v vzorcih brina, v povprečju 287 mg/l. Temu je sledil ekstrakt bora (255 mg/l), najmanj skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina, v mg na liter ekstrakta sekljanca pa smo določili v ekstraktu rožmarina (241 mg/l).



**Slika 11: Povprečna koncentracija skupnih fenolnih spojin v mg/l ekstrakta sekljanca izraženih kot galna kislina.**

Ugotovili smo da se kontrola zelo malo razlikuje od ostalih vzorcev z dodanimi rastlinskimi ekstrakti. Vzrok je v reagentu Folin-Ciocalteu, ki reagira ne samo s fenolnimi spojinami, ampak tudi s produkti Maillardove reakcije, aminokislinskimi ostanki, reducirajočimi sladkorji, hemoglobinom itd., kar da pozitiven rezultat pri določanju skupnih fenolnih spojin.

Pri določanju skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina, smo v 1 gramu sekljanca največje koncentracije določili v sekljancih z dodatkom ekstrakta brina in sicer 0,85 mg/g, temu so sledili vzorci z dodatkom ekstrakta bora z 0,76 mg/g in na koncu še vzorci z dodatkom ekstrakta rožmarina s povprečno koncentracijo 0,72 mg/g.

Ob določanju skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina, na celotnem piščančjem sekljancu, kjer smo upoštevali še izgube mase med pečenjem, smo prišli do rezultatov, da vsebujejo največ skupnih fenolnih spojin vzorci z dodatkom ekstrakta brina (70,5 mg/sekljanec), dokaj podobna pa sta bila ekstrakt bora (62,65 mg/sekljanec) in rožmarina (59,8 mg/sekljanec).

### **5.1.3 Določanje suhe snovi v ekstraktih bora, brina in rožmarina**

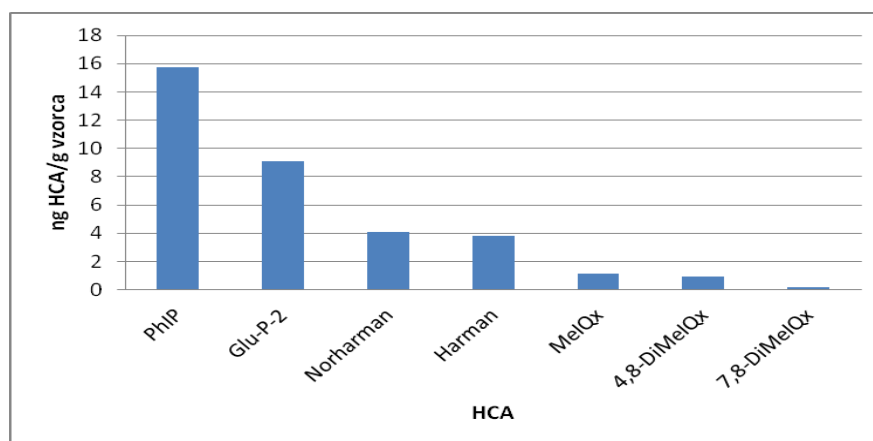
V posameznem ekstraktu smo določili koliko skupnih fenolnih spojin, izraženih kot galna kislina vsebuje 1 gram suhe snovi ekstrakta bora, brina in rožmarina. Največjo količino smo določili v ekstraktu bora 1013,1 g, za polovico manj v ekstraktu rožmarina 542,5 g ter kar za štirikrat manj v primerjavi z borom, v ekstraktu brina 229,1 g.

### **5.1.4 Določanje vsebnosti HCA v pečenih piščančjih sekljancih**

Cilj našega dela je bil zmanjšati koncentracijo nastalih heterocikličnih aromatskih aminov v piščančjih sekljancih med toplotno obdelavo. To smo tudi dosegli in sicer z dodatkom biološko aktivnih učinkovin ekstraktov brina, bora in rožmarina.

V 1 gramu piščančjih sekljancev smo po toplotni obdelavi, povprečno določili 35 ng heterocikličnih aminov. Kot sta v svoji raziskavi ugotovila Skog in Solyakov (2002), da je med tvorjenimi HCA, v piščančjem mesu v največji količini prisoten PhIP, smo do

enakega zaključka prišli tudi mi. Med vsemi HCA je najbolj izstopal PhIP, katerega povprečna vsebnost je bila 15,77 ng/g, kar je od 2- do 83-krat več od ostalih HCA. Do enakih ugotovitev je v svoji raziskavi prišel tudi Iwasaki in sod. (2010), ki je dokazal, da vsebuje piščančje meso v primerjavi z govejim in prašičjim mesom večje količine HCA, predvsem več PhIP. Temu HCA sledijo Glu-P-2 (9,07 ng/g), Norharman (4,09 ng/g), Harman (3,80 ng/g) ter MeIQx z 1,16 ng/g in 4,8-DiMeIQx (0,91 ng/g). V najmanjši količini je bil prisoten 7,8-DiMeIQx (0,19 ng/g).



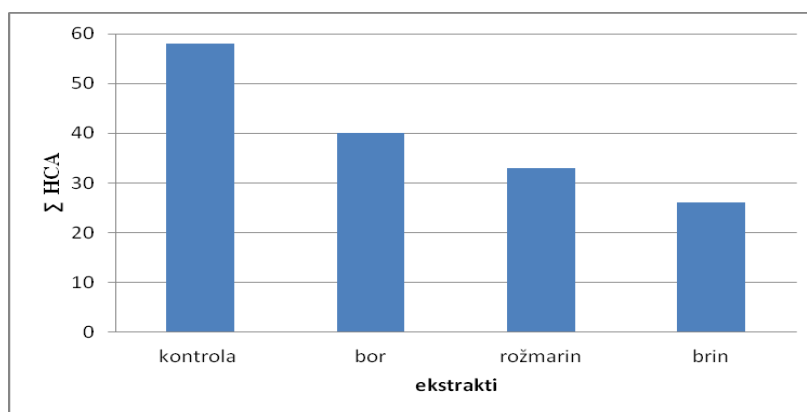
**Slika 12: Povprečne vsebnosti HCA v ng HCA na gram pečenega piščančjega sekljanca.**

Ugotovili smo, da imajo dodatki rastlinskih ekstraktov rožmarina, brina in bora statistično značilen vpliv na tvorbo 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx ( $p \leq 0,001$ ) ter PhIP ( $p \leq 0,01$ ), medtem ko na tvorbo MeIQx, Harmana, Norharmana in Glu-P-2 ne vplivajo značilno ( $p > 0,05$ ). Kot smo pričakovali je največ skupnih HCA nastalo v kontrolnem vzorcu (57,67 ng/g).

Najmanjši učinek na preprečevanje tvorbe HCA med toplotno obdelavo je imel dodatek ekstrakta bora. Povprečno se je v teh vzorcih tvorilo kar 40 ng HCA/g. Zanimiv pa je podatek, da se je pri dodatku 1 ml ekstrakta skorje bora, tvorilo zgolj 26,19 ng HCA na gram piščančjega sekljanca. Ker se je tudi pri senzorični analizi glede sprejemljivosti, dodatek 1 ml ekstrakta bora najboljše izkazal (3,5 točke od 4), bi lahko rekli, da dodatek 1 ml ekstrakta bora uspešno znižuje tvorbo HCA in je obenem tudi najbolj senzorično sprejemljiv.

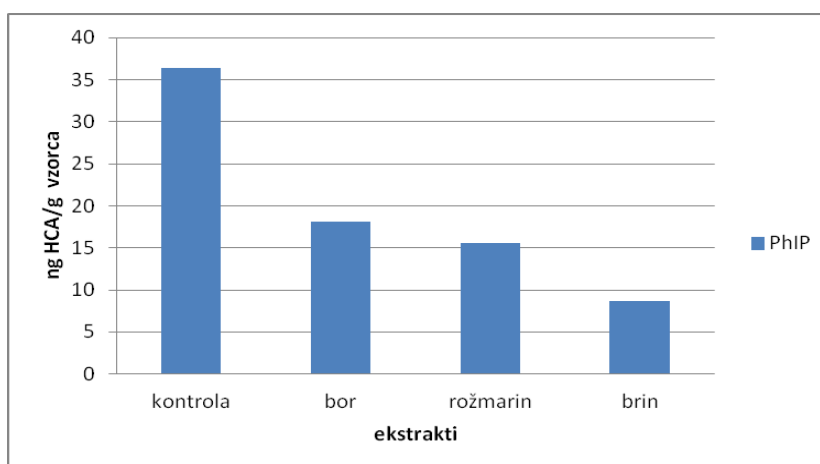
Najbolj uspešen pri zniževanju vsebnosti nastalih HCA tekom toplotne obdelave je bil ekstrakt brina. V povprečju se je v vzorcih z dodatkom ekstrakta brina tvorilo zgolj 26 ng HCA/g, kar je za 1,5-krat manj kot pri vzorcih z dodatkom bora (40 ng HCA/g) in za 1,3-krat manj kot pri vzorcih z dodatkom rožmarina (33 ng HCA/g). Toda pri senzorični analizi se je glede sprejemljivost, dodatek brina izkazal kot najslabši (2,2 točke od 4), zato ne moremo reči, da bi lahko z dodatkom ekstrakta brina uspešno zniževali tvorbo HCA in bi bili ti sekljanci tudi dobro sprejemljivi za potrošnike. Teoretično dodatek ekstrakta brina najbolj zmanjša tvorbo HCA, senzorično pa ni sprejemljiv za potrošnike.



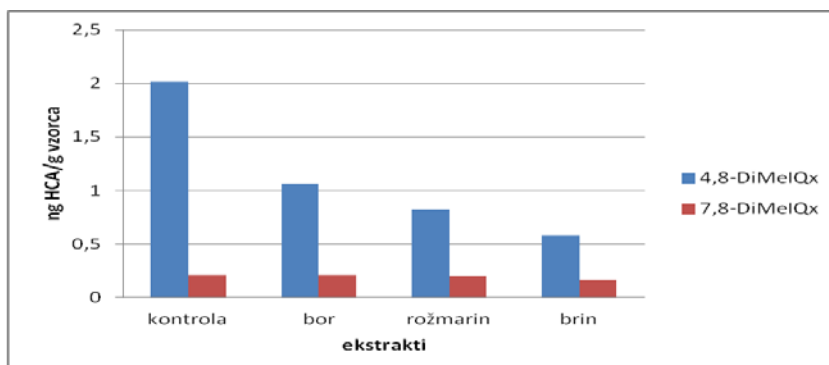


**Slika 93: Vsota vseh HCA nastalih med toplotno obdelavo pri kontrolnem sekljancu in v sekljancih z dodatkom rastlinskih ekstraktov.**

Na splošno gledano je bil dodatek ekstrakta brina najbolj učinkovit tako pri preprečevanju tvorbe PhIP, kot tudi pri preprečevanju tvorbe 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx. Po učinkovitosti sledita dodatek ekstrakta rožmarina in bora, kar je prikazano tudi na sliki 14 in 15.



**Slika 104: Vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov na tvorbo PhIP v pečenih piščančjih sekljancih.**



**Slika 115: Vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov na znižanje tvorbe 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx v pečenih piščančjih sekljancih.**

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov na piščančjih sekljancih z dodanimi rastlinskimi ekstrakti brina, bora in rožmarina lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- presen sekljanec povprečno vsebuje 22,8 % beljakovin, 1,1 % maščob in 71,2 % vode; pečen sekljanec v povprečju vsebuje 32,8 % beljakovin, 1,7 % maščob in 64,1 % vode;
- povprečna izguba mase sekljanca med pečenjem je bila 8,4 %;
- dodatek različnih ekstraktov povzroča tuje arome ( $p \leq 0,001$ ) in vonje ( $p \leq 0,01$ ), poslabša splošno sprejemljivost ( $p \leq 0,001$ ), ne povzroča ( $p > 0,05$ ) pa neželenih obarvanj na toplotno obdelanih sekljancih;
- dodatek ekstrakta brina pušča močne tuje arome v piščančjih sekljancih;
- najbolj sprejemljiv je bil vzorec z dodatkom 1 ml ekstrakta skorje bora;
- vsebnost skupnih fenolnih snovi je bila največja v ekstraktih brina (4535,9 mg/l), sledi ekstrakt bora (2985,2 mg/l) in rožmarina (2352,3 mg/l);
- največjo količino antioksidantov smo piščančjemu sekljancu dodali v primeru dodatka 2,1BR (9,525 mg) in 3BO (8,956 mg) ter 3R (7,057 mg), najmanj antioksidantov, izraženih kot galna kislina pa smo dodali v primeru dodatka 1R (2,353 mg);
- vsebnost skupnih fenolnih snovi je bila največja v pečenih sekljancih z dodatkom ekstrakta brina (0,85 mg/g), nato v ekstrakta bora (0,76 mg/g) in ekstrakta rožmarina (0,72 mg/g);
- v povprečju, pečeni piščančji sekljanci z dodanimi rastlinskimi ekstrakti od HCA vsebujejo največ PhIP (15,77 ng/g), Glu-P-2 (9,07 ng/g), norharmana (4,07 ng/g), harmana (3,80 ng/g), MeIQx (1,16 ng/g), ostalih HCA pa je manj kot 1 ng/g (4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx);
- dodatki rastlinskih ekstraktov rožmarina, brina in bora preprečujejo tvorbo 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx ( $p \leq 0,001$ ) ter PhIP ( $p \leq 0,01$ ), medtem ko na tvorbo MeIQx, Harmana, Norharmana in Glu-P-2 ne vplivajo ( $p > 0,05$ );
- v pečenem kontrolnem piščančjem sekljancu brez dodanih rastlinskih ekstraktov je nastalo 57,67 ng HCA/g;
- najbolj uspešno nastanek HCA v pečenih piščančjih sekljancih preprečuje dodatek ekstrakta brina (19,35-33,95 ng/g), sledi dodatek rožmarina (28,83-37,36 ng/g) in najmanj ekstrakt bora (39,62-56,67 ng/g);
- ob upoštevanju splošne senzorične sprejemljivosti in uspešnosti preprečevanja nastanka HCA lahko povzamemo, da je za piščančje sekljance najbolj primeren dodatek 1 ml ekstrakta skorje bora.

## 6 POVZETEK

Dandanes je v prehrani človeka piščančje meso zelo razširjeno, kajti vsebuje velike količine visoko vrednih beljakovin poleg tega pa ima relativno majhno vsebnost maščob, kar je z zdravstvenega vidika zelo zaželeno. Je vir vseh esencialnih aminokislin, vitaminov skupine B in mineralnih snovi, kot sta železo in fosfor. Obenem vsebuje tudi veliko magnezija, kalcija, kalija in bakra. Količina ogljikovih hidratov in vlaknin pa je zanemarljiva. Večji del mesa se toplotno obdela in nato zaužije. Žal pa se med toplotno obdelavo mesa in rib tvorijo tudi zdravju škodljive spojine, kot so heterociklični aromatski amini (HCA). Ugotovljeno je, da HCA nastajajo v majhnih količinah (ng/g) v proteinsko bogati hrani med normalnimi postopki toplotne obdelave, kot so cvrenje, praženje, pečenje in kuhanje. Poznanih je več možnosti za zmanjševanje tvorbe HCA v toplotno obdelanem mesu, od uporabe čim nižjih temperatur obdelave, optimalnega povečanja količine sladkorjev, mariniranja in paniranja, dodatka antioksidantov, začimb (rožmarin, timijan, žajbelj, česen), škroba, sojinih proteinov in polisaharidov kot tudi povečanja vlažnosti med toplotno obdelavo.

Namen magistrske naloge je bil ugotoviti vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov iz jagod brina, skorje bora ter rožmarina na preprečevanje tvorbe HCA v pečenih piščančjih sekljancih. Z metodo Folin-Ciocalteu smo v ekstraktih kot tudi v piščančjih sekljancih določili količino skupnih fenolnih spojin. Piščančjim sekljancem smo dodali 0,7 ml, 1,4 ml in 2,1 ml ekstrakta iz jagod brina (0,7BR, 1,4BR, 2,1BR), 1 ml, 2 ml in 3 ml ekstrakta iz skorje bora (1BO, 2BO, 3BO) ter 1 ml, 2 ml in 3 ml ekstrakta rožmarina (1R, 2R, 3R). Pripravili smo tudi sekljance brez dodatka ekstraktov, ki so nam služili kot kontrola. Za vsako koncentracijo ekstrakta brina, bora in rožmarina smo pripravili po tri sekljance, v katere smo dodali enake koncentracije posamičnega ekstrakta (30 sekljancev), vse analize pa smo opravili v paralelkah. Sekljance smo čez noč kondicionirali v hladilniku, nato pa toplotno obdelali pri 250 °C za 4 minute ter jih senzorično in kemijsko analizirali. Senzorični preskuševalci so ocenili barvo, vonj in aromo toplotno obdelanih sekljancev ter sprejemljivost posameznega sekljanca z dodatkom ekstrakta. Od kemijskih analiz smo opravili analize za določanje osnovne sestave mesa in suhe snovi v ekstraktih, analize za določanje skupnih fenolnih spojin ter analize za določanje vsebnosti HCA v pečenih piščančjih sekljancih.

Na podlagi dobljenih rezultatov na piščančjih sekljancih z dodanimi ekstrakti brina, bora in rožmarina lahko oblikujemo naslednje sklepe. Presen sekljanec povprečno vsebuje 22,8 % beljakovin, 1,1 % maščob in 71,2% vode; pečen sekljanec v povprečju vsebuje 32,8 % beljakovin, 1,7 % maščob in 64,1 % vode. Povprečna izguba mase sekljanca med pečenjem je bila 8,4 %. Dodatek različnih ekstraktov povzroča tuje arome ( $p \leq 0,001$ ) in vonje ( $p \leq 0,01$ ), poslabša splošno sprejemljivost ( $p \leq 0,001$ ), ne povzroča ( $p > 0,05$ ) pa neželjenih obarvanj na toplotno obdelanih sekljancih. Dodatek ekstrakta brina pušča močne tuje arome v piščančjih sekljancih; najbolj sprejemljiv je bil vzorec z dodatkom 1 ml ekstrakta skorje bora. Vsebnost skupnih fenolnih snovi je bila največja v ekstraktih brina (4535,9 mg/l), sledi ekstrakt bora (2985,2 mg/l) in rožmarina (2352,3 mg/l). Največjo količino antioksidantov smo piščančjemu sekljancu dodali v primeru dodatka 2,1BR (9,525 mg) in 3BO (8,956 mg) ter 3R (7,057 mg), najmanj antioksidantov, izraženih kot galna kislina pa smo dodali v primeru dodatka 1R (2,353 mg).

Vsebnost skupnih fenolnih snovi je bila največja v pečenih sekljancih z dodatkom ekstrakta brina (0,85 mg/g), nato v ekstrakta bora (0,76 mg/g) in ekstrakta rožmarina (0,72 mg/g). V povprečju, pečeni piščančji sekljanci z dodanimi rastlinskimi ekstrakti od HCA vsebujejo največ PhIP (15,77 ng/g), Glu-P-2 (9,07 ng/g), norharmana (4,07 ng/g), harmana (3,80 ng/g), MeIQx (1,16 ng/g), ostalih HCA pa je manj kot 1 ng/g (4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx). Dodatki rastlinskih ekstraktov rožmarina, brina in bora preprečujejo tvorbo 4,8-DiMeIQx in 7,8-DiMeIQx ( $p \leq 0,001$ ) ter PhIP ( $p \leq 0,01$ ), medtem ko na tvorbo MeIQx, Harmana, Norharmana in Glu-P-2 ne vplivajo ( $p > 0,05$ ). Največ HCA (57,67 ng/g) je nastalo v pečenem kontrolnem piščančjem sekljancu brez dodanih rastlinskih ekstraktov. Najbolj uspešno preprečuje nastanek HCA v pečenih piščančjih sekljancih dodatek ekstrakta brina (19,35-33,95 ng/g), sledi dodatek rožmarina (28,83-37,36 ng/g) in najmanj ekstrakt bora (39,62-56,67 ng/g). Ob upoštevanju splošne senzorične sprejemljivosti in uspešnosti preprečevanja nastanka HCA lahko povzamemo, da je za piščančje sekljance najbolj primeren dodatek 1 ml ekstrakta skorje bora.

Načeloma smo potrdili naše hipoteze, kjer smo predvidevali, da bo dodatek ekstraktov iz jagod brina, skorje bora in rožmarina zmanjšal tvorbo HCA v pečenih piščančjih sekljancih. Tvorbo posamičnih kot tudi skupnih HCA, so tako znižali vsi rastlinski ekstrakti, ki smo jih dodali sekljancem. Predpostavili smo tudi, da bomo določili najmanjši dodatek ekstrakta, ki bo uspešno zavrl tvorbo HCA, hkrati pa zagotovil sprejemljivo senzorično kakovost piščančjih sekljancev. Ta dodatek je bil 1 ml ekstrakta bora, ki je zelo učinkovito zmanjšal vsebnost skupnih HCA, obenem pa so bili sekljanci z dodatkom 1 ml ekstrakta bora tudi odlično senzorično sprejemljivi. Predpostavili smo, da bodo ekstrakti iz jagod brina, skorje bora in rožmarina, kazali različno sposobnost preprečevanja tvorbe HCA in posledično različno vplivali na senzorično kakovost sekljancev, kar pa smo v tem magistrskem delu tudi dokazali.

## 7 VIRI

- Aaslyng M.D., Duedahl-Olese L., Jensen K., Meinert L. 2013. Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef and chicken barbecued at home by Danish consumers. *Meat Science*, 93: 85–91
- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Demšar L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23–31
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573–589
- Ahn J., Grun I. U. 2006. Heterocyclic amines: 2. Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *Journal of Food Science*, 70: 263–268
- Alaejos M.S., Afonso A.M. 2011. Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 16–44
- Alaejos M. S., Ayala J. H., González V., Afonso A. M. 2008. Analytical methods applies to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *Journal of Chromatography B*, 862: 15–42
- Almela L., Sánchez-Munoz B., Fernández-López J.A., Roca M.J., Rabe V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolic and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120: 221–229
- Alvarado C.Z., Owens C.M. 2006. Poultry: Chemistry and biochemistry. V: *Handbook of food science technology and engineering*. Vol 1. Hui Y.H. (ed). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 31.1–31.13
- Aristoy M.C., Toldrá F. 1998. Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, 50: 327–332
- Augustsson K., Lindblad J., Overvik E., Steineck G. 1999. Population-based dietary inventory of cooked meat and assessment of the daily intake of food mutagens. *Food Additives and Contaminants*, 16: 215–225
- Bailey M. E., Um K. W. 1992. Maillard reaction products and lipid oxidation. *ACS Symposium Series*, 500: 122–139
- 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., Gomma 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
- Barcelo-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *Journal of Chromatography A*, 1023: 67–78
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/ fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 2: 185–191
- Bertelsen G., Jakobsen M., Juncher D., Moller J., Kroger-Ohlsen M., Weber C. 2000. Oxidation, shelf-life and stability of meat and meat products. V: Proceedings of the 46th International Congress of Meat Science and Technology, 27 august -1 september. Buenos Aires, Argentina, National Institute of Agricultural Technology, 516-524
- Borrelli R.C., Visconti A., Mennella C., Anese M., Fogliano V. 2002. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6527–6533
- Britt C., Gomaa E.A., Gray J.I., Booren A.M. 1998. Influence of cherry tissue on lipid oxidation and heterocyclic aromatic amine formation in ground beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4891–4897
- Busquets R., Puignou L., Galceran M. T., Skog K. 2006. Effect of red wine marinades on the formation of heterocyclic amines in fried chicken breast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8376–8384
- Cambero M.I., Pereira-Lima C.I., Ordonez J.A., Garcia de Fernando G.D. 2000. Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1519–1528
- Chan K.M., Decker E.A. 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34: 403–426
- Chen C., Pearson A., Gray J. 1992. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43: 177–183
- Damašius J., Venskutonis P.R., Ferracane R., Fogliano V. 2011. Assessment of the influence of some spice extracts on the formation of heterocyclic amines in meat. *Food Chemistry*, 126: 149–156
- D'Andrea G. 2010. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? Review. *Fitoterapia*, 81: 724–736
- Dawidowicz A.L., Wianowska D., Baraniak B. 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie*, 39: 308–315

- Demšar L., Lukan B., Žlender B., Polak T. 2009. Effects of skin and grilling method on formation of heterocyclic amines in chicken *pectoralis superficialis* muscle. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1313–1319
- Descalzo A. M., Rossetti L., Grigioni G., Irurueta M., Sancho A. M., Carrete J. 2007. Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Science*, 75: 299–307
- Direktiva evropskega parlamenta in sveta št. 95/2/ES z dne 20. februarja 1995, o aditivih za živila razen barvil in sladil. 1995. Uradni list Evropskih skupnosti, 38, L61: 1-40
- Direktiva komisije 2010/67/EU z dne 20. oktobra 2010 o spremembi Direktive 2008/84/ES o posebnih merilih čistosti aditivov za živila razen barvil in sladil. 2010. Uradni list Evropske unije, 53, L277: 17-26
- Direktiva komisije 2010/69/EU z dne 22. oktobra 2010 o spremembi prilog k Direktivi Evropskega parlamenta in Sveta št. 95/2/ES o aditivih za živila razen barvil in sladil. 2010. Uradni list Evropske unije, 53, L279: 22-31
- Došler D. 2007. Vpliv kakovosti, proteolize in stopnje pečenosti na nastanek heterocikličnih aromatskih aminov v dolgi hrbtni mišici prašiča. Doktorska disertacija s področja živilstva. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 109 str.
- Dundara A., Sariçobanb C., Yılmaz M. T. 2012. Response surface optimization of effects of some processing variables on carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic amine (HAA) content in cooked patties. *Meat Science*, 91: 325–333
- Elias R. J., McClements D. J., Decker E. A. 2007. Impact of thermal processing on the antioxidant mechanisms of continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 104: 1402–1409
- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110: 76–82
- Foti M.C. 2007. Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59: 1673–1685
- Felton J.S., Fultz E., Dolbeare F.A., Knize M.G. 1994. Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 897–903
- Felton J.S., Knize M.G., Bennett L.M., Malfatti M.A., Colvin M.E., Kulp K.S. 2004. Impact of environmental exposures on the mutagenicity/carcinogenicity of heterocyclic amines. *Toxicology*, 198: 135–145
- Ferguson L.R. 2009. Meat and cancer. *Meat Science*, 84: 308–313
- Gernandt D.S., Geada López G., Ortiz García S., Liston A., 2005. Phylogeny and

- classification of Pinus. *Taxon*, 54: 29–42
- 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
- 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
- Golob T., Bertonec J., Doberšek U., Jamnik M. 2006. *Senzorična analiza živil*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Gray J. I., Goma E. A., Buckley D. J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43: 111–123
- Han H., Baik, B. K. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1971–1978
- Haslam E. 1998. *Practical polyphenolics*. Cambridge, University Press, 438–438
- Holder C.L., Preece S.W., Conway S.C., Pu Y.M., Doerge D.R. 1997. Quantification of heterocyclic amine carcinogens in cooked meats using isotope dilution liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11: 1667–1672
- Huang S.S., Zheng R.L. 2006. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer letters*, 239: 271–280
- Iwasaki M., Kataoka H., Ishihara J., Takachi R., Hamada G.S., Sharma S., Marchand L.L., Tsugane S. 2010. Heterocyclic amines content of meat and fish cooked by Brazilian methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 61–69
- Jägerstad M., Skog K., Arvidsson P., Solyakov A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung = Food Research and Technology*, 207, 6: 419–427
- Jägerstad M., Skog K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*, 574: 156–172
- 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
- Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. 1997. Antioxidant properties of



- flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoid radicals. V: Flavonoids in health and disease. Rice-Evans C.A., Packer L. (eds.), New York, Marcel Dekker, Inc.: 137–161
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J-P., Pihlaja K., Kujala T.S. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954–3962
- Karre L., Lopez K., Getty K.J.K. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94: 220–227
- Keeton J.T., Eddy S. 2004. Chemical and physical characteristics of meat. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 210–264
- Knize M.G., Felton J.S. 2005. Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic aromatic amines formed from natural precursors in meat. *Nutrition Reviews*, 63: 158–165
- Knize M. G., Salmon C. P., Mehta S. S., Felton J. S. 1997. Analysis of cooked muscle meats for heterocyclic aromatic amine carcinogens. *Mutation Research*, 376: 129–134
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Demšar L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-43
- Krul C., Luiten-Schuite A., Baandagter R., Verhagen H., Mohn G., Feron V., Havenaar R. 2000. Application of a dynamic *in vitro* gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 783–792
- Liao G.Z., Wang G.Y., Xu X.L., Zhou G.H. 2010. Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. *Meat Science*, 85: 149–154
- Lolinger J. 1991. The use of antioxidants in foods. V: *Free radicals and food additives*. Aruoma O.I.H.B. (ed.). London, Taylor and Francis: 121–150
- Lukan B. 2010. Vpliv metod toplotne priprave na tvorbo heterocikličnih aromatskih aminov v piščančjem mesu. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 str.
- Maarse H. 1991. Volatile compounds in foods and beverages. New York, Marcel Dekker: 329-329
- Macheix J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruits phenolics. Boca Raton, CRC Press: 378 str.
- Maurer A.J. 2003. Poultry. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 2.

- Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4680–4686
- Miceli N., Trovato A., Marino A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Güvenç A., De Pasquale R., Taviano M.F. 2011. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2600–2608
- Mikova K. 2001. The regulation of antioxidants in food. V: Antioxidants in foods. Pokorny J., Yanisshlieva N., Gordon M. (eds.) Cambridge, Woodhead Publishing Ltd.: 266–283
- Melo A., Viegas O., Eça R., Petisca C., Pinho O., Ferreira I. M. P. L. V. O. 2008. Extraction, detection, and quantification of heterocyclic aromatic amines in Portuguese meat dishes by HPLC/diode array. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31: 772–787
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sinerio J., Domínguez H., Núñez M.J., Parajo J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145–171
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model system. *Journal of Chromatography B*, 802: 3–10
- Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/Food Research und Technology*, 207: 477–480
- Naczki M., Shahidi F. 2006. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1045: 95–111
- Nagao M. 2000. Mutagenicity. V: Food borne carcinogens: Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.) Chichester, John Wiley & Sons, LTD: 163–196
- Norrish A.E., Ferguson L.R., Knize M.G., Felton J.S., Sharpe S.J., Jackson R.T. 1999. Heterocyclic amine content of cooked meat and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 2038–2044
- Orav A., Koel M., Kailas T., Müürisepp M. 2010. Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.). *Procedia Chemistry*, 2: 161–167
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2007. Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species of trout. *Food Chemistry*, 104: 67–72
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2010a. Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with Oasis extraction method. *LWT-Food Science and Technology*, 43: 1345–1350

- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2010b. Heterocyclic aromatic amine contents of beef and lamb chops cooked by different methods to varying levels. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1436–1440
- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2010c. Effects of cooking techniques and levels on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1259–1264
- Oz F., Kaya M. 2006. Mutagenic and carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *The FEBS Journal*, 273, Suppl. 1: 301–302
- Oz F., Kaya M. 2011. The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball. *Food Control*, 22: 596–600
- Pais P., Salmon C. P., Kniz, M. G., Felton J. S. 1999. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1098–1108
- Palka K., Daun H. 1999. Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine *M. semitendinosus* during heating. *Meat Science*, 51: 237–243
- Persson E., Graziani G., Ferracane R., Fogliano V., Skog K. 2003. Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1587–1597
- Petersen M., Simmonds M. S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121–125
- Plahuta P. 2004. Veliki vinski leksikon. Ljubljana, Mladinska knjiga: 515 str.
- Polak T. 2003. Heterociklični aromatski amini v zoreni termično obdelani goveji dolgi hrbtni mišici. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93 str.
- Polak T., Andrenšek D., Žlender B., Demšar L. 2009. Effects of ageing and low internal temperature of grilling on formation of heterocyclic amines in *beef longissimus dorsi* muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 256–264
- Pradhan A. A., Rhee K. S., Hernandez P. 2000. Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. *Meat Science*, 54: 385–390
- Praprotnik N. 2002. Rastline, leksikon: rastline na Zemlji od A do Ž, slovenska in znanstvena imena, sistematika, karakteristični znaki; več kot 5000 okrasnih, zdravilnih in za prehrano uporabnih rastlin. Tržič, Učila International: 361 str.
- Queiroz C.R.A., Lemos de Moraes S.A., Nascimento E.A. 2002. Caracterizacao dos taninos da aroeira – preta (*Myracrodruon urundeuira*). *Revista Árvore*, 26, 4: 485-492
- Quelhas I., Petisca C., Viegas O., Melo A., Pinho O., Ferreira I. M. P. L. 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
- Ravindran V. 2004. Poultry. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 2. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 925–933
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933–956
- Richling E., Haring D., Herderich M., Schreier P. 1998. Determination of heterocyclic aromatic amines (HAA) in commercially available meat products and fish by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESIMS-MS). *Chromatographia*, 48: 258–262
- Robards K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000: 657–691
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 114-114, 128-128
- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amines carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 433–441
- Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih-vpliv na zdravje. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Demšar L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 288–290
- Sante-Lhoutellier V., Aubry L., Gatellier P. 2007. Effect of oxidation on *in vitro* digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5343–5348
- SAS Softwear. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc: Softwear
- Serpen A., Gökmen V., Fogliano V. 2012. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90: 60–65
- Shin H. S., Ustunol Z. 2004. Influence of honey-containing marinades on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried beef steak and chicken breast. *Journal of Food Science*, 69: 147–153
- Sinha R., Rothman N. 1999. Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters*, 143: 189–194
- Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Salmon C.P., Knize M.G., Swanson C.A., Rossi S.C., Mark S.D., Levander O.A., Felton J.S. 1995. High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Research*, 55: 4516–4519
- Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., Jagerstad M. 1997. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan

- residues. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 555–565
- Skog K., Eneroth A., Svanberg M. 2003. Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 313–323
- Skog K., Johansson M.A.E., Jägerstad M.I. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model system and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 879–896
- Skog K., Solyakov A. 2002. Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1213–1221
- Solyakov A., Skog K. 2002. Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1207–1212
- Stavric B. 1994. Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: a critical review. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 977–994
- Strack D. 1997. Phenolics metabolism. V: *Plant biochemistry*. Dey P.M., Harborne J.B. (eds.), San Diego, Academic Press, 387–416
- Sugimura T. 1997. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research*, 376: 211–219
- Sugimura T., Adamson R.H. 2000. Introduction. V: *Food borne carcinogens: Heterocyclic amines*. Nagao M., Sugimura T. (eds.) Chichester, John Wiley & Sons, LTD: 1–4
- Taylor R.T., Fultz E., Shore V. 1984a. Mutagen formation in a model beef boiling system. 1. Conditions with a soluble beef-derived fraction. *Journal of Environmental Science and Health*, 19: 791–817
- Taylor R.T., Shore V., Fultz E. 1984b. Mutagen formation in a model beef boiling system. 2. Effects of proteolysis and comparison of soluble fractions from several protein-sources. *Journal of Environmental Science and Health*, 19: 819–845
- Tikkanen L. M., Latva-Kala K. J., Heinio R.-L. 1996. Effect of commercial marinades on the mutagenic activity, sensory quality and amount of heterocyclic amines in chicken grilled under different conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 34: 725–730
- Tikk M., Tikk K., Tørngren M.A., Meinert L., Aaslyng M.D., Karlsson A.H., Andersen H.J. 2006. Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7769–7777
- Tironi V. A., Tomas M. C., Anon M. C. 2002. Structural and functional changes in myofibrillar proteins of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*) by interaction with malonaldehyde. *Journal of Food Science*, 67: 930–935

- Tornberg E. 2005. Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70: 493–508
- Turesky R.J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168: 219–227
- Ustun O., Sezer Senol F., Kurkcuoglu M., Erdogan Orhan I., Kartal M., Husnu Can Baser K. 2012. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products*, 38: 115–123
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113–4117
- Vrhovšek U., Eder R., Wendein S., 1997. Resveratrol-antioksidant v vinu. V: Tehnologija – hrana – zdravje. 1. Slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, Bled, 21 – 25 april, 1996. Knjiga del: Vol 2. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev slovenije: 635–643
- Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H., Sugimura T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Research*, 52, 7: 2092–2098
- Wood J. D., Enser M., Fisher A. V., Gute G.R., Sheard P. R., Richardson R. I. 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78: 343–358

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof.dr. Lei Demšar za strokovno pomoč, statistično obdelavo podatkov in oblikovanje magistrske naloge. Hvala tudi za potrpežljivost in razumevanje tekom nastajanja te naloge.

Hvala somentorju doc. dr. Tomažu Polaku za strokovno pomoč in koristne napotke pri izvedbi praktičnega dela magistrske naloge.

Lepo se zahvaljujem tudi recenzentu prof.dr. Blažu Cigiću za strokovni in temeljit pregled naloge, ter za vse nasvete, da je naloga dobila pravo podobo.

Hvala vsem na Katedri za tehnologijo mesa, ki ste me sprejeli medse in mi omogočili delo pri vas, predvsem pa hvala Špeli za vso nesebično pomoč in marsikateri strokovni in prijateljski nasvet. Hvala ti Špela!

Zahvala gre tudi uni.dipl.inž. Lini Burkan Makivić za pregled referenc in oblike magistrske naloge.

\*\*\*

Posebna zahvala gre tudi mojim staršem, mama in oče, hvala ker sta mi omogočila študij in mi ves ta čas stala ob strani in mi pomagala. Boštjan hvala tudi tebi za vse bratske nasvete.

Iskrena hvala tudi tašči Vidi in tastu Jožu za vso pomoč in podporo že tekom študija, predvsem pa v času pisanja te naloge – brez vaju te magistrske naloge ne bi bilo.

Zadnja, a najpomembnejša zahvala gre mojima najdražjima, možu Roku in sinčku Marku. Vem, da sta me v času nastajanja te magistrske naloge pogrešala, a upam da se vama bom uspela oddolžiti.

Hvala tudi vsem, ki ste ostali neimenovani, a ste mi v tem času stali ob strani z besedami in dejanji!