

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška PAVČNIK

**VPLIV DODATKA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV
ROŽMARINA IN SKORJE BORA NA
PREPREČEVANJE OKSIDACIJE GOVEJIH
SEKLJANCEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška PAVČNIK

**VPLIV DODATKA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV ROŽMARINA IN
SKORJE BORA NA PREPREČEVANJE OKSIDACIJE GOVEJIH
SEKLJANCEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

**THE EFFECTS OF ADDING ROSEMARY PLANT EXTRACTS AND
PINE BARK EXTRACTS ON THE PREVENTION OF LIPID
OXIDATION IN MINCED BEEF**

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

Ljubljana, 2013

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

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za 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:

Član:

Datum zagovora:

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

Urška Pavčnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 637.514.5+664.9.03:635.7:543.61(043)=163.6
KG mesni izdelki/ goveji sekljanci/oksidacija lipidov/hidroksiholesteroli/rastlinski izvlečki/izvlečki rožmarina/izvlečki skorje bora/antioksidanti/maščobne kisline/laneno olje/senzorične lastnosti
AV PAVČNIK, Urška 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 RASTLINSKIH EKSTRAKTOV ROŽMARINA IN SKORJE BORA NA PREPREČEVANJE OKSIDACIJE GOVEJIH SEKLJANCEV
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
OP X, 64 str., 20 pregl., 13 sl., 42 vir,
IJ sl
JI sl/en
AI Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, kako dodatek različnih rastlinskih ekstraktov in skladiščenje v atmosferi O₂ vplivata na preprečevanje oksidacije holesterola in lipidov govejih sekljancev z dodanim lanenim oljem kot virom *n*-3 maščobnih kislin. Izdelali smo deset skupin sekljancev glede na vrsto in količino dodanih rastlinskih ekstraktov (1 ml in 3 ml ekstrakta skorje črnega bora iz Mislinje in z Vremščice, 0,3 in 1 ml ekstrakta rožmarina dveh proizvajalcev, 1 ml piknogenola in kontrola) v dveh ponovitvah in paralelkah. Polovico pripravljenih sekljancev smo 4 minute pekli na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240 °C, na še toplih opravili senzorično analizo, na ohlajenih pa smo po 12 urah določili vsebnost hidroksiholesterolov z LC/MS, maščobnokislinsko sestavo z GC-FID in število TBK. Ostalo polovico vzorcev smo 7 dni skladiščili v 100 % atmosferi O₂ pri (2 ± 1) °C, jih toplotno obdelali in ponovili analize. Sto gramov sekljancev vsebuje 63,9 mg holesterola in 0,215 mg hidroksiholesterolov, po enotedenskem skladiščenju pa 63,7 mg holesterola in 5,871 mg skupnih hidroksiholesterolov. Dodani ekstrakti rožmarina in skorje bora v primerjavi s kontrolnim vzorcem uspešno upočasnijo oksidacijo holesterola takoj po izdelavi in po enotedenskem skladiščenju; najuspešnejši so ekstrakti rožmarina v dodatkih 0,3 in 1,0 ml ter piknogenol, manj ekstrakti skorje bora. Oksidacijo maščob (nastanek malondialdehida) med skladiščenjem uspešno upočasnijo različni ekstrakti rožmarina, ekstrakti s piknogenolom in skorjo bora pa delujejo celo prooksidativno. Vrsta in količina dodanih rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje na maščobnokislinsko sestavo ne vplivajo značilno, pač pa vplivajo na senzorično kakovost sekljancev; dodatek ekstraktov rožmarina je v primerjavi s kontrolnimi izboljšal barvo presnih in toplotno obdelanih sekljancev, dodatek ekstraktov skorje bora je ohranil barvo presnih ter poslabšal barvo toplotno obdelanih. Zaradi dodatka lanenega olja so bili v vseh vzorcih prisotni tuji vonji in arome. Po enem tednu skladiščenja je postala zelo izrazita aroma po postanem predvsem v kontrolnem vzorcu in vzorcih z dodanimi ekstrakti skorje bora v večjih koncentracijah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 637.514.5+664.9.03:635.7:543.61(043)=163.6
CX meat products/minced beef/lipid oxidation/hydroxycholesterol/plant extracts/rosemary plant extracts/pine bark extracts/antioxidants/fatty acids/linseed oil/sensory properties
AU PAVČNIK, Urška
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 EFFECTS OF ADDING ROSEMARY PLANT EXTRACT AND PINE BARK EXTRACTS ON THE PREVENTION OF LIPID OXIDATION IN MINCED BEEF
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO X, 64 p., 20 tab., 13 fig., 42 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of this master's thesis is to determine the impact of the addition of various plant extracts and storage in an O₂ atmosphere on the prevention of cholesterol and lipid oxidation in beef mince with added flaxseed oil as a source of *n*-3 fatty acids. Ten samples of mince were prepared using various types and quantities of added plant extracts (1 ml and 3 ml of Mislinja and Vremščica black pine bark extract, 0.3 ml and 1 ml of rosemary extract from two different manufacturers, 1 ml of pycnogenol and a control sample), with two replicates and parallel tests. Half of the mince prepared was grilled for 4 minutes on a two-plate grill at 240°C. A sensory analysis was conducted while the mince was still warm. 12 hours later, we measured the content of hydroxycholesterol using LC/MS, the fatty acid composition using GC-FID and the value of TBA. The remaining half of the samples were stored for 7 days in a 100% O₂ atmosphere at (2 ± 1)°C; it was then heat treated and the analyses repeated. One hundred g of mince contains 63.9 mg of cholesterol and 0.215 mg of hydroxycholesterol; after a week's storage, it contains 63.7 mg of cholesterol and 5.871 mg of total hydroxycholesterol. In comparison with the control sample, the addition of rosemary and pine bark extracts was shown to successfully impede cholesterol oxidation immediately after processing as well as after a week's storage; rosemary extracts in concentrations of 0.3 ml and 1.0 ml and pycnogenol proved to most successful, while pine bark extracts were less effective. The rate of fat oxidation (formation of malondialdehyde) during storage is successfully decreased using various rosemary extracts, while pycnogenol and pine bark extracts actually have a pro-oxidant effect. The type and quantity of plant extracts added and the storage method have no characteristic effect on fatty acid composition; however, they do affect the sensory quality of mince. In comparison with the control sample, added rosemary extracts improved the colour of raw and heat treated mince, while the pine bark extract preserved the colour of raw mince but impaired the colour of heat treated mince. Extraneous odours and aromas were present in all samples due to the addition of flaxseed oil. After a week's storage, a stale aroma was particularly distinctive in the control sample and samples with added pine bark extracts in higher concentrations.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNO O MAŠČOBAH	3
2.1.1 Laneno olje – vir <i>n-3</i> maščobnih kislin.....	3
2.1.2 Kvar maščob	4
2.1.3 Avtooksidacija maščob.....	5
2.1.4 Žarkost in WOF.....	6
2.2 HOLESTEROL IN OKSIDI HOLESTEROLA	7
2.2.1 Holesterol.....	7
2.2.2 Metabolizem holesterola	8
2.2.3 Oksidi holesterola	8
2.3 ANTIOKSIDANTI	9
2.3.1 Mehanizem delovanja antioksidantov	11
2.3.2 Antioksidativno delovanje začimb	11
2.3.3 Rožmarin	12
2.3.4 Bor.....	14
2.3.5 Pycnogenol®	15
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 MATERIAL IN POTEK DELA	17
3.2 METODE DELA	18
3.2.1 Senzorična analiza	18
3.2.2 Določanje vsebnosti hidroksiholesterola in holesterola	20
3.2.2.1 Saponifikacija.....	20

3.2.2.2	Ekstrakcija hidroksiholesterolov	20
3.2.2.3	Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)	20
3.2.3	Določanje maščobnokislinske sestave	22
3.2.3.1	Postopek določanja maščobnokislinske sestave.....	22
3.2.4	Število tiobarbiturne kisline (število TBK)	24
3.2.4.1	Postopek določanja števila TBK	24
3.2.4.2	Priprava umeritvene krivulje	24
4	REZULTATI.....	26
4.1	VSEBNOST HOLESTEROLA IN HIDROKSIHOLESTEROLOV	26
4.2	ŠTEVILO TBK.....	31
4.3	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA.....	32
4.4	REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE	37
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	41
5.1	RAZPRAVA	41
5.1.1	Vsebnost holesterola in hidroksiholesterolov	41
5.1.2	Število TBK	42
5.1.3	Maščobnokislinska sestava	44
5.1.4	Senzorična analiza	45
5.2	SKLEPI.....	46
6	POVZETEK.....	47
7	VIRI	49
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Slika 1: Nastanek triacilglicerola (Boyer, 2005)	3
Slika 2: Strukturna formula holesterola (Boyer, 2005)	8
Slika 3: Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) (Sasikumar, 2001)	12
Slika 4: Strukturne formule antioksidativnih komponent rožmarina a.) karnozolna kislina, b.) karnozol, c.) rožmanol, d.) metil karnozat, e.) rožmarinska kislina (Rižner, 2000).....	13
Slika 5: Obmorski bor (<i>Pinus pinaster</i>) (Maimoona in sod., 2011).....	14
Slika 6: Strukturna formula monomere katehina (Yesil-Celiktas in sod., 2009)	15
Slika 7: Strukturna formula taksifolina (Yesil-Celiktas in sod., 2009)	15
Slika 8: Sestavine glavnih procianidinov, prisotnih v Pycnogenolu® (zgoraj) in njihovi morebitni oligomeri (spodaj) (D'Andrea, 2010).....	16
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje števila TBK	25
Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje števila TBK po treh mesecih skladiščenja	25
Slika 11: Barva presnih govejih sekljancev dodanimi različnimi dodatki rastlinskih ekstraktov po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika in v hladilniku pri temperaturi 4 °C (1 – R1/1, 2 – R1/0,3 , 3 – B1/3 , 4 –B1/1 , 5 –R2/1 , 6 –P/1 , 7 – R2/0,3 , 8 –B2/1 , 9 – kontrola , 10 – B2/3)	38
Slika 12: Vpliv skladiščenja govejih sekljancev z dodatkom Pycnogenola®, Herbaloxa® ter kontrole na vsebnost malondialdehida (Juhee Ahn in sod., 2006).	43
Slika 13: Vpliv enotedenskega skladiščenja v atmosferi kisika na vsebnost malondialdehida v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin in dodatkom rastlinskih ekstraktov	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vpliv naravnih antioksidantov in antioksidativnih sestavin, dodanih <i>post mortem</i> na oksidacijo lipidov v mesnih izdelkih (Žlender, 2000)	12
Preglednica 2: Sestavine in njihovi deleži v ekstraktih borovega lubja, določeni s HPLC (D'Andrea, 2010).	16
Preglednica 3: Skupine govejih sekljancev na osnovi dodatka različnih rastlinskih ekstraktov.....	17
Preglednica 4: Prehodi holesterola, 7 β -hidroksiholesterola, 25 α -hidroksiholesterola, 20 α -hidroksiholesterola in 5 α -holestena v MRM.....	22
Preglednica 5: Volumni standardne raztopine in število TBK za umeritveno krivuljo 1	24
Preglednica 6: Volumni standardne raztopine in število TBK za umeritveno krivuljo 2	24
Preglednica 7: Rezultati določanja vsebnosti holesterola in hidroksiholesterolov v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin, izdelanih z različnimi dodatki rastlinskih ekstraktov, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (<i>n</i> = 40)	26
Preglednica 8: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na vsebnost 20 α -hidroksiholesterola in 25 α -hidroksiholesterola v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, α = 0,05).....	27
Preglednica 9: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na vsebnost 7 β -hidroksiholesterola in 5 α -holestana v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, α = 0,05).....	28
Preglednica 10: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na vsoto hidroksiholesterolov in vsebnost holesterola v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, α = 0,05).....	29
Preglednica 11: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na delež hidroksiholesterolov, preračunan na skupni holesterol (%), v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, α = 0,05)	30
Preglednica 12: Rezultati števila TBK v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin, izdelanih z različnimi dodatki rastlinskih ekstraktov, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (<i>n</i> = 40).....	31
Preglednica 13: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na število TBK v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, α = 0,05).....	31
Preglednica 14: Rezultati maščobnokislinske sestave govejih sekljancev s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (<i>n</i> = 40).....	33

Preglednica 15: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)	34
Preglednica 16: Rezultati senzorične analize govejih sekljancev s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 MK, izdelanih z različnimi dodatki ekstraktov z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri ($n = 120$).....	37
Preglednica 17: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na senzorično oceno barve presnih in toplotno obdelanih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	38
Preglednica 18: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na senzorično oceno vonja obdelanih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	39
Preglednica 19: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na senzorično oceno arome obdelanih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo <i>n</i> -3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$).....	40
Preglednica 20: Maščobnokislinska sestava (ut. %/skupne MK) govejega mesa (Souci in sod., 2008; Scheeder in sod., 2001) in govejih sekljancev z dodatkom lanenega olja	45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

20 α -HC	20 α -hidroksiholesterol
25-HC	25 α -hidroksiholesterol
5 α -C	5 α -holestan
7 β -HC	7 β -hidroksiholesterol
B1/1	1 ml ekstrakta bora s področja Mislinje (500 m n.v.)
B1/3	3 ml ekstrakta bora s področja Mislinje (500 m n.v.)
B2/1	1 ml ekstrakta bora s področja Vremščice (1000 m n.v.)
B2/3	3 ml ekstrakta bora s področja Vremščice (1000 m n.v.)
BHT	butilhidroksitoluen
CH ₂ Cl ₂	metilen klorid
ENMK	enkrat nenasičene maščobne kisline
ESI	elektrozpršilna ionizacija – Electrospray Ionization
GC	plinska kromatografija
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
KOH	kalijev hidroksid
KV	koeficient variabilnosti
LC/MS	tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo
MEMK	metil estri maščobnih kislin
MK	maščobne kisline
MRM	Multi Reaction Monitoring
<i>n</i> -3	omega tri maščobne kisline
<i>n</i> -6	omega šest maščobne kisline
NaOH	natrijev hidroksid
NMK	nasičene maščobne kisline
P/1	1 ml ekstrakta piknogenola
P/S	razmerje med vsoto vseh VNMK in vsoto vseh NMK
R1/0,3	0,3 ml ekstrakta rožmarina proizvajalca Maestro
R1/1	1 ml ekstrakta rožmarina proizvajalca Maestro
R2/0,3	0,3 ml ekstrakta rožmarina proizvajalca Kotanyi
R2/1	1 ml ekstrakta rožmarina proizvajalca Kotanyi
so	standardni odklon
SPE	ekstrakcija s trdno fazo (Solid Phase Extraction)
TBK	tiobarbiturna kislina
TO	toplotna obdelava
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline
WOF	warmed over flavour

1 UVOD

Videz svežega mesa je zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na potrošnikovo vedenje in posledično na prodajo mesa. Oksidativni procesi v mesu povzročajo razgradnjo maščob in beljakovin, njihovi produkti pa prispevajo k poslabšanju arome, teksture in barve. Te biokemijske spremembe omejujejo rok uporabe svežega mesa in mesnih izdelkov.

Oksidacija je proces razgradnje maščob in beljakovin v prisotnosti kisika in je eden primarnih mehanizmov razgradnje živil, še posebno mesa in mesnih izdelkov (Bekhit in sod., 2003). Glavni problem oksidacije lipidov je njen vpliv na zdravje ljudi zlasti pri koronarnih srčnih boleznih, aterosklerozi, raku in procesih staranja. Oksidacija mesa in mesnin povzroči negativne spremembe barve, vonja, okusa in teksture ter pojav potencialno toksičnih snovi, zato moramo ustaviti ali preprečiti oksidativni kvar. Kot vsa ostala živila živalskega izvora tudi meso vsebuje holesterol, ki tako kot maščobe oksidira. Nastanejo produkti, ki jih imenujemo oksidi holesterola. Le-ti lahko povzročajo razne degenerativne bolezni, delujejo mutageno ali/in citotoksično. Oksidaciji pa so še posebno podvržene dolgoverižne večkrat nenasičene *n*-3 maščobne kisline, ki so v manjšem deležu prisotne praktično v vseh mesnih izdelkih.

Ker ljudje v zadnjih časih vse bolj stremimo k zdravemu načinu življenja in se skušamo izogniti različnim potencialnim povzročiteljem bolezni, raje posežemo po prehransko bogatejših živilih. Dodatek različnih antioksidantov lahko prepreči oksidacijo mesa in mesnih izdelkov ter posledično prepreči nastajanje rakotvornih in mutagenih snovi.

Oksidativno stabilnost mesa in mesnin lahko dosežemo z uravnavanjem prehrane živali in povečanjem količine intrinzičnih antioksidantov z dodatkom začimb (rožmarin, bor, česen, žajbelj), zmanjšanjem vsebnosti prooksidantov ter s spremembo substratov. Sintetični antioksidanti, kot sta butilhidroksitoulen in butilhidroksianizol, zavirajo oksidacijske procese, vendar pa je njihova uporaba zelo omejena, saj so zelo slabo topni v vodi in težko prodrejo v mišično tkivo, v velikih koncentracijah naj bi bili tudi toksični, zato jih tudi ni dovoljeno dodajati v živila. Kot zdrava in varna alternativa se vse več uporabljajo naravni antioksidanti, ki prav tako kot sintetični lahko uspešno zavirajo oksidacijske procese in hkrati ohranjajo kakovost mesa (Bekhit in sod., 2003). Zavirajo lahko tako oksidacijo lipidov, z njimi povezano žarkost in pojav postane - pogrete arome, kot tudi holesterola in beljakovin.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil stabilizirati mesne sekljance z dodanim lanenim oljem, bogatim z *n*-3 maščobnimi kislinami, ki so zelo nagnjene k oksidaciji. Da bi ohranili kakovost teh sekljancev in preprečili oksidacijo lipidov ter holesterola, smo uporabili različne antioksidante, ekstrakte rožmarina in skorje bora. Ugotoviti smo želeli tudi, katere koncentracije omenjenih rastlinskih ekstraktov najbolj optimalno preprečujejo oksidacijo in ali so te koncentracije sprejemljive tudi s senzoričnega vidika.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bodo dodatki ekstraktov rožmarina in skorje črnega bora zmanjšali oksidacijo holesterola in lipidov v govejih mesnih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin.

Predpostavili smo, da bomo določili najmanjši dodatek posameznih ekstraktov, ki bo uspešno zavrl oksidacijo, hkrati pa zagotovil sprejemljivo senzorično kakovost govejih sekljancev.

Predpostavili smo, da bodo ekstrakti rožmarina različnih proizvajalcev in ekstrakti skorje dveh črnih borov, ki sta rasla na različnih nadmorskih višinah, kazali različno sposobnost preprečevanja oksidacije in posledično različno vplivali na senzorično kakovost sekljancev.

Dodatek rastlinskih ekstraktov ne bo bistveno vplival na maščobnokislinski profil govejih sekljancev, temveč bo le-ta spremenjen zaradi dodanega lanenega olja, ki bo povečal delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) ter posledično izboljšal razmerje P/S.

2 PREGLED OBJAV

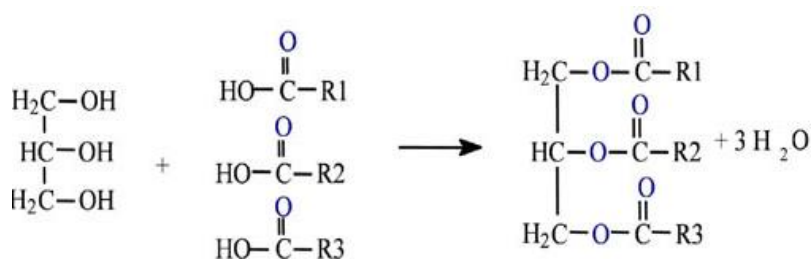
2.1 SPLOŠNO O MAŠČOBAM

Lipidi so široka in raznovrstna skupina v naravi prisotnih organskih spojin, za katere velja, da so topni v nepolarnih organskih topilih, v vodnih medijih pa večinoma ne.

Glede na strukturo delimo lipide v dve skupini:

- lipidi, ki imajo estrsko strukturo, kamor spadajo triacilgliceroli (masti, olja), glicerofosfolipidi (fosfogliceridi), sfingolipidi, glikolipidi in voski ter
- lipidi, ki niso estri, kamor uvrščamo steroide, terpene in prostaglandine.

Eno izmed lipidnih podskupin sestavljajo masti in olja. To podskupino sestavljajo estri maščobnih kislin z glicerolom. Ti t. i. trigliceridi ali triacilgliceroli so prisotni tako pri živalih kot pri rastlinah. So nepolarne hidrofobne molekule, saj v svoji strukturi ne vsebujejo močno polarnih spojin. Trigliceridi, ki se pri sobni temperaturi nahajajo v trdnem oz. poltrdnem stanju, spadajo med masti in so prisotni večinoma pri živalih. Trigliceridi, ki se pri sobni temperaturi nahajajo v tekočem stanju, pa spadajo med olja in so večinoma rastlinskega izvora (Belitz in sod., 2009).



glicerol maščobne kisline 1, 2 in 3 triacilglicerol voda

Slika 1: Nastanek triacilglicerola (Boyer, 2005)

Če so vse tri hidroksilne skupine glicerola zaestrene z isto maščobno kislino, imenujemo ester preprost triacilglicerol. Takšne estre lahko sintetiziramo le v laboratoriju. V naravi najdemo samo mešane triacilglicerole (Belitz in sod., 2009).

2.1.1 Laneno olje – vir *n*-3 maščobnih kislin

Laneno olje je sestavljeno iz 50 % linolenske kisline (vir *n*-3 MK), 20 % oleinske kisline, 20 % linolne kisline (vir *n*-6 MK), vsebuje pa tudi palmitinsko in stearinsko kislino. Uporablja se ga v vsakodnevni prehrani in tudi v industriji (barve, laki), saj ima visoko sposobnost sušenja. Laneno olje lahko med drugim vsebuje fitoestrogene, ki jih imenujemo lignani. Le-ti delujejo kot antioksidanti. Uživanje lanenega olja normalizira razmerje HDL

in LDL, zniža krvni tlak, imel naj bi antikancerogen učinek, lajša vnetja in zmanjšuje simptome Crohnove bolezni (Lazko in sod., 2010).

Esencialne maščobne kisline so tiste, ki jih telo samo ne more sintetizirati in jih moramo zato vnesti s hrano. Mednje spadajo tudi *n*-3 maščobne kisline.

V smislu funkcionalnega živila je gotovo fiziološko najpomembnejša sestavina maščob skupina večkrat nenasičenih *n*-3 maščobnih kislin. Tri najpomembnejše *n*-3 maščobne kisline so α -linolenska kislina (ALA 18:3, *n*-3), eikozapentaenojska kislina (EPA 20:5, *n*-3) in dokozaheksaenojska kislina (DHA 22:6, *n*-3) (Salobir, 2000).

Glavni vir *n*-3 maščobnih kislin v prehrani je α -linolenska. *n*-3 maščobne kisline zmanjšujejo tveganje za nastanek srčnih bolezni in kapi. EPA in DHA znižujeta agregacijo trombocitov, krvni tlak, možnost za nenadno smrt, znižujeta tudi nivo trigliceridov (Lichtenstein, 2005). *n*-3 maščobne kisline imajo ključno vlogo tudi pri preprečevanju srčno žilnih obolenj, hipertenziji, sladkorni bolezni tipa 2, ledvičnih boleznih, revmatoidnem artritisu, ulceracijskem kolitisu, Crohnovi bolezni, kroničnih pljučnih boleznih ...

Nuernberg in sod. (2004) so proučevali vpliv dodatka 5 % olivnega olja ter 5 % lanenega olja v dnevni prehrani prašičev. V raziskavo je bilo vključenih 13 samic in 12 kastriranih samcev. Sama prehrana ni vplivala na sestavo trupa ter kakovost mesa. Prašičem, ki so v dnevni prehrani dobivali dodatek 5 % lanenega olja, se je bistveno povečala vsebnost linolenske kisline in dolgoveržnih *n*-3 maščobnih kislin v maščobah mišic, hrbtne slanine in srca. Ugotovili so, da laneno olje negativno vpliva na splošno aromo mesa, kar se je izkazalo predvsem pri kastriranih prašičih.

2.1.2 Kvar maščob

Kvar maščob v živilih (tudi v mesu in mesnih izdelkih) je najpogostejše posledica hidrolitičnih in oksidativnih sprememb. Hidrolitične spremembe potekajo pod vplivom lipaz, ki se nahajajo v živilih ali v prebavnem traktu sesalcev ali pa jih izločajo mikroorganizmi. Posledica hidrolitičnih sprememb je hidrolitična žarkost. Le-ta nastane zaradi hidrolize estrskih vezi v triacilglicerolu, kjer se sproščajo proste maščobne kisline in glicerol. Reakcijo pospešuje visoka temperatura, prisotnost kislin, lipolitičnih encimov in velika vsebnost vode. Hidrolitične spremembe senzorično zaznamo kot rezek, trpek okus, ki je posledica sproščanja prostih maščobnih kislin. Učinek hidrolitičnih reakcij lahko zmanjšamo s skladiščenjem na hladnem, primernim transportom in pakiranjem ter sterilizacijo. Oksidativne spremembe maščob v hrani predstavljajo oksidacijo nenasičenih maščobnih kislin (oleinske, linolne, linolenske) v hidroperokside, ki se nato razgrajujejo v različne spojine. Na oksidativne spremembe lipidov vplivajo maščobnokislinska sestava, prisotni encimi in zunanji dejavniki. Lipidi se lahko razgradijo v oksidirane in polimerizirane maščobe med različnimi postopki predelave, skladiščenjem (lahko že pri sobni temperaturi), predvsem pa med toplotno obdelavo (Honikel, 2009).

Oksidacija lipidov je eden od primarnih mehanizmov razgradnje živil, še posebej mesa in mesnih izdelkov. Glavni problem oksidacije lipidov je njen vpliv na zdravje ljudi, zlasti pri koronarnih srčnih boleznih, aterosklerozi, raku in procesih staranja (Skvarča, 2000). Lipidi so podvrženi oksidaciji, ki vpliva na nenasičene vezi v maščobnih kislinah.

Zaradi oksidativne razgradnje lipidov prihaja pri proizvodnji in skladiščenju živil do znatnih ekonomskih izgub. Oksidacija nasičenih maščob ne povzroča le neprijetnih vonjev in okusov, ampak tudi zmanjša prehransko vrednost in varnost s tvorbo sekundarnih reakcijskih spojin. Dvojne vezi v nenasičenih maščobnih kislinah so podvržene oksidaciji.

Ločimo več vrst oksidacij:

- avtooksidacija s kisikom (se po navadi prične s prostim radikalom ali singlet kisikom),
- singlet kisik nastane tudi med fotooksidacijo nenasičenih lipidov in v prisotnosti vzpodbujevalcev,
- tudi številni encimi prisotni v semenih oljnic ali živalskih tkivih, kot so lipooksigenaze, katalizirajo encimske oksidacijske reakcije.

Razlika med avtooksidacijo in oksidacijo maščob z lipooksigenazami je v tem, da je reakcija maščobne kisline s kisikom v hidroperoksid v drugem primeru encimsko katalizirana. Pri oksidaciji lipidov triacilglicerolov se tvori večje število hlapnih in nehlapnih spojin. Ker so hlapne spojine izredno aktivne sestavine arom, je mogoče zaznati oksidacijo maščob v živilih z že majhno vsebnostjo nenasičenih acilglicerolov (Honikel, 2009).

2.1.3 Avtooksidacija maščob

Avtooksidacija je dokaj kompleksna reakcija in vključuje veliko število medsebojno povezanih reakcij intermediatov. Na stopnjo oksidacije vplivajo sestava maščobnih kislin, stopnja nenasičenosti, prisotnost oz. odsotnost anti- in prooksidantov, parcialni tlak kisika, narava površine izpostavljene kisiku, zunanji dejavniki (vlaga, temperatura ...). Na stopnjo avtooksidacije prav tako vpliva položaj dvojne vezi v maščobni kislini. Dvojne vezi predstavljajo v vseh maščobah aktivni center, ki lahko med drugim reagirajo tudi s kisikom, kar vodi do nastanka primarnih, sekundarnih in terciarnih oksidacijskih produktov (Belitz in sod., 2009).

Avtooksidacija je spontana neencimska oksidacija maščob, ki so izpostavljene zraku, kjer gre za verižno reakcijo prostih radikalov in obsega naslednje stopnje:

1. stopnja: začetek reakcije: $R^\circ + H^\circ$ (RH je molekula maščobe)
2. stopnja: razvoj:
 $R^\circ + O_2 \rightarrow ROO^\circ$
 $ROO^\circ + RH \rightarrow R^\circ + ROOH$
 $RO^\circ + RH \rightarrow R^\circ + ROH$
3. stopnja: cepitev: $ROOH \rightarrow RO^\circ + OH^\circ$ (ali R° , ROO°)
4. stopnja: konec:
 $R^\circ + R^\circ \rightarrow RR$
 $R^\circ + ROO^\circ \rightarrow ROOR$
 $ROO^\circ + ROO^\circ \rightarrow ROOR + O_2$

V prvi stopnji se nekaj molekul maščobe RH aktivira s toploto, svetlobo ali kovinskim katalizatorjem, da se cepi v nestabilne radikale $R^\circ + H^\circ$. Vodik C-atoma ob dvojni vezi odcepi pri povišani temperaturi (segrevanje – cvrenje). Ko se vodik odcepi, nastanejo prosti radikali. Prosti radikali so atomi, ioni ali molekule, ki imajo nesparjen elektron, so zelo reaktivni in kratkotrajno obstojni. Že pri sobni temperaturi tvori radikal veliko število hidroperoksidov preden nastopi konec verižne reakcije (Zelenik-Blatnik, 1992).

Prosti radikali se običajno povežejo v RH, RR, H_2 , H_2O , itd. Toda v prisotnosti molekularnega kisika se pri reakciji $R^\circ + O_2$ tvori peroksidni radikal ROO° . Ta radikal reagira z novo molekulo maščobe RH, pri čemer se tvori hidroperoksid ROOH in prost radikal R° , s čimer se nadaljuje verižna reakcija. Prosti radikali se sedaj tvorijo brez začetnih aktivatorjev. Reakcija se nadaljuje in več molekul se pretvori v hidroperoksidi (Zelenik-Blatnik, 1992).

V tretji stopnji se hidroperoksid lahko razgradi na različne proste radikale. Reakcija se zaključi, ko se prosti radikali povežejo z drugimi prostimi radikali ali z inaktivatorji ob tvorbi stabilnih spojin, ki se nakopičijo v sistemu (Belitz in sod., 2009).

Hidroperoksidi (ROOH) so pomembni primarni produkti oksidacije lipidov. So nehlapni, brez vonja in okusa. Njihova tvorba in akumulacija predstavljata napredovanje avtooksidacije, ne pomenita pa pojava žarkosti. Oksidacija nenasičenih lipidov v živilih je katalizirana s toploto, svetlobo, sevanjem, sledovi kovin (železo, baker) in tudi z delovanjem encimov. Dolžina indukcijske faze avtooksidacije je odvisna od stranskih komponent, prooksidantov (večkrat nenasičene maščobne kisline) in antioksidantov. Hidroperoksidi so relativno neobstoječe spojine. Razgradnja peroksidov se smatra kot začetna točka pri tvorbi hlapnih reakcijskih produktov. Bolj stabilne produkte razgradnje imenujemo sekundarni produkti. Sem prištevamo številne spojine (peroksidi), najbolj pomembne so karbonilne spojine (aldehidi, ketoni). Aldehidi se radi oksidirajo in nastanejo organske kisline, ki so terciarni produkti. Ti končni produkti povzročajo žarek vonj in nadaljnje reakcije, ki vodijo do poslabšanja kakovosti (Zelenik-Blatnik, 1992).

2.1.4 Žarkost in WOF

Oksidacija lipidov je eden od primarnih mehanizmov poslabšanja kakovosti mesa in še posebej mesnih izdelkov. Spremembe kakovosti se manifestirajo v nezaželenih spremembah arome, barve, teksture, prehranske vrednosti, in v potencialno nevarnem pojavu toksičnih substanc.

Razvoj oksidiranih tujih arom – žarkosti je že dolgo poznan kot resen problem med shranjevanjem in distribucijo mesa in mesnin. Žarkost v mesu se prične razvijati takoj po smrti živali in se nadaljuje ter intenzivira do stopnje, ko meso ali izdelek postaneta nesprejemljiva za uživanje.

Poškodbe oziroma porušenje celovitosti mišičnih membran z mehanskim odkoščevanjem, z mletjem, s sekljanjem, preoblikovanjem in toplotno obdelavo povzročijo bistvene spremembe celične ureditve. To olajša interakcije prooksidantov z močno nenasičenimi

maščobnimi kislinami membranskih fosfolipidov, kar se odraža v generiranju prostih radikalov ter hitri propagaciji oksidacijskih reakcij.

Če nerazsoljeno meso skladiščimo po toplotni obdelavi, se bodo spremembe arome pojavile zelo hitro, to je najpozneje v 48 urah. To je znan pojav postane - pogrete arome (WOF), ki se razlikuje od običajne žarkosti v presnem mesu, maščobnih tkivih in topljeni masti po skladiščenju več tednov ali mesecev. WOF se pojavi tudi v presnem zmletem mesu, če je izpostavljen delovanju kisika v toplotno neobdelanih izdelkih, kot sta mehansko odkoščeno meso ali preoblikovano meso, kjer je mišična struktura porušena in inkorporiran zrak (Honikel, 2009).

WOF je oblika oksidativne žarkosti, ki se razvije v nekaj urah ali dneh v nasprotju z običajno žarkostjo, ki se razvije med večmesečnim skladiščenjem ali zamrzovanjem. WOF nastane zaradi oksidacije večkrat nenasičenih maščobnih kislin v mesnih fosfolipidih, pri čemer nastajajo produkti, kot so malondialdehid, pentanal in heksanal (Gaonkar in McPhearson, 2005). Pomembno je poudariti, da vsebnost fosfolipidov glede na vrsto mesa močno variira. Tako največ fosfolipidov vsebuje svinjsko meso, ki je posledično bolj podvrženo WOF, najmanj fosfolipidov pa vsebuje ovčje meso (Jayathilakan in sod., 2007).

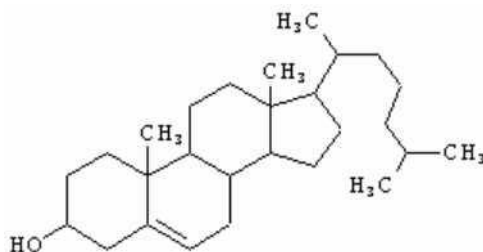
Žarkost in WOF se kot sprememba arome v praksi mnogokrat enačita. WOF senzorično zaznamo kot tujo, neprijetno aromo po lepenki ali oljnati barvi, ki prikrije zaželeno svežo aromo toplotno obdelanega mesa. Sčasoma med skladiščenjem toplotno obdelanega mesa opisano WOF aromo prikrijejo druge dominantne arome s standardno oksidirano – žarko noto. Hidroperoksidi kot primarni produkti oksidacije lipidov so brez vonja, toda se naprej razgradijo v številne hlapne in nehlapne produkte sekundarne oksidacije. Karbonili imajo pri tem velik vpliv na pojav žarke arome bolj kot ogljikovodiki, furani in alkoholi. Najbolj pa neprijetno žarko aromo oblikujejo aldehidi, ker jih senzorično zaznamo v zelo nizkih koncentracijah. Raziskave so pokazale, da se vsebnost heterocikličnih žveplovih komponent, ki največ prispevajo k aromi toplotno obdelanega mesa, med skladiščenjem bistveno ne spreminja. Torej lahko poslabšanje prijetne arome toplotno obdelanega mesa med skladiščenjem pripišemo t. i. učinku maskiranja ali prikrivanja zelenih arom z neželenimi aromami, nastalimi z oksidacijo lipidov in ne z razgradnjo zelenih sestavin arome (Honikel, 2009).

2.2 HOLESTEROL IN OKSIDI HOLESTEROLA

2.2.1 Holesterol

Holesterol je lesketajoča bela kristalinična snov. Gre za enkrat nenasičeno lipofilno molekulo z dvojno vezjo pri C5. V prisotnosti kisika, svetlobe, toplote, sevanja, prostih radikalov in kovinskih ionov je močno občutljiv na oksidacijo (Hur in sod., 2006). Njegovo poimenovanje izhaja iz mesta nahajanja v telesu. Raziskovalci so ga našli v žolčnih kamnih, njegovo ime izhaja iz grških besed *kholé*, kar pomeni žolč in *stereos*, ki pomeni trdno. Empirična formula holesterola je $C_{27}H_{45}OH$, njegova molska masa pa znaša 386,7 g/mol. Holesterol sestavljajo trije šestčlenski obroči in en petčlenski (slika 2). Holesterol ima na enem koncu steroidno ogrodje s hidroksilno skupino (glava) in na

drugem fleksibilen kratek nepolaren ogljikovodikov konec (rep). Takšna zgradba vpliva na njegove lastnosti. Holesterol se praktično ne topi v vodi, delno je topen v alkoholu, dobro pa se topi v nepolarnih topilih, kot so benzen, heksan, petroleter, olja ... (Sheppard in sod., 2003). Najdemo ga v živilih živalskega izvora, žolču, žolčnih kamnih, živčevju, možganih, plazmi in v krvi.



Slika 2: Strukturna formula holesterola (Boyer, 2005)

2.2.2 Metabolizem holesterola

Metabolizem holesterola je kompleksen. Holesterol dnevno zaužijemo s hrano (eksogeni holesterol), sintetizira pa se tudi v celicah (endogeni holesterol). Je ena izmed najbolj ubikvitarnih sestavin v našem telesu, saj je vitalna komponenta vsake celice. Pri ljudeh predstavlja holesterol približno 0,2 % celotne človeške mase. Z običajno prehrano dnevno zaužijemo 300 - 400 mg holesterola. V telesu povprečnega odraslega človeka je približno 150 g holesterola. Za nadomeščanje fekalnih in drugih izgub mora organizem dnevno sintetizirati od 700 do 1500 mg holesterola. Holesterol je za organizem neizogibno potreben, njegovo pomanjkanje ali presežek zdravju lahko škodujeta. Holesterol najdemo predvsem v živilih živalskega izvora. Največ ga je v jajcih, drobovini, mesu, mleku in mlečnih izdelkih. Ob vstopu v telo se holesterol zaestri z določeno maščobno kislino in skupaj z ostalo maščobo vstopi v hilomikrone. Holesterol potuje do jeter najprej po limfi in nato po žilah. Največ holesterola se sintetizira v jetrih. Holesterol in njegovi metaboliti se izločajo v obliki žolčnih soli v črevesju, kjer se deloma resorbirajo preko enterohepatičnega kroženja (Arnold in Kwiterovich, 2003).

2.2.3 Oksidi holesterola

Oksidi holesterola spadajo v skupino sterolov in so toksične spojine. So skupina sterolov, ki imajo podobno strukturo kot holesterol, vendar oksidi oz. produkti holesterola vsebujejo še dodatno hidroksi (t.i. hidroksiholesteroli), ketonsko ali epoksidno skupino na stranski verigi njihovih molekul (Hur in sod., 2006).

Oksidacija holesterola poteka podobno kot oksidacija lipidov. Sproži jo prisotnost kisika, visoka temperatura in/ali svetloba, rezultat je oksidacija ali fotooksidacija. Prav tako jo sprožijo tudi prosti radikali in hidroksiperoksidi, ki nastanejo med oksidacijo lipidov (Azadmard-Damirchi in Dutta, 2009). Čeprav je holesterol pri visokih temperaturah stabilen, je v kombinaciji s triacilgliceroli podvržen procesom razgradnje. Tako nastajajo oksisteroli, katerih struktura je odvisna od maščobnih kislin v živilu. Vsi običajni oksidi holesterola so produkti holesteril estrske oksidacije, vendar je njihov nastanek bistveno

hitrejši ob prisotnosti VNMK (sojino, sončnično, ribje olje) kot ob prisotnosti nasičenih maščob.

Oksidi holesterola so prisotni v zelo nizkih koncentracijah v surovih živilih živalskega izvora (meso, mleko, jajca, morska živila). Njihova koncentracija se močno poveča s skladiščenjem, toplotno obdelavo in predelavo, pri izpostavljenosti svetlobi, kovinam in kisiku (Boselli in sod., 2001).

Nekateri oksidi holesterola imajo nezaželene biološke učinke na celičnem, tkivnem in encimskem nivoju: izzovejo lahko razne kronične in degenerativne bolezni (rak, pospešeno staranje, ateroskleroza), delujejo mutageno in citotoksično (Boselli in sod., 2001).

Dovzetnost za oksidacijo je odvisna tudi od razmerja nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin v živilu. Tako zaradi velike vsebnosti *n*-3 maščobnih kislin najhitreje oksidirajo ribe, sledi jim perutninsko, prašičje, goveje in ovčje meso (Brown in Jessup, 1999).

Poznanih je okoli 80 različnih oksidov holesterola. Med njimi se v hrani najpogosteje pojavljajo naslednje oblike: 7-ketoholesterol, 6-ketoholesterol, 7 α -hidroksiholesterol, 7 β -hidroksiholesterol, 5,6 α -epoksiholesterol, 5,6 β -epoksiholesterol, 25-hidroksiholesterol, 20-hidroksiholesterol in holestantriol. Znano je, da so oksidi holesterola zelo škodljivi za arterijske celice, celo veliko bolj kot čisti holesterol in so bolj neposredno povezani z razvojem ateroskleroze ter z boleznimi srca in ožilja (Boselli in sod., 2001).

2.3 ANTIOKSIDANTI

Maščobne komponente so podvržene oksidativni razgradnji. Kakovost maščob in maščobnih izdelkov je odvisna tudi od inhibicije teh sprememb in posredno od uporabe antioksidantov. Antioksidante prištevamo med inhibitorje oksidacije. Inhibitorji so snovi, ki preprečujejo ali zadržujejo oksidacijo snovi (Skvarča, 2000).

Antioksidante pogosto uvrščamo v veliko skupino živilskih dodatkov, ki živilom podaljšajo obstojnost, saj jih zaščitijo pred oksidativnimi spremembami. Njihov pomemben vpliv pri maščobah je zadrževanje ali preprečevanje žarkosti oziroma nastanek nezaželenih arom kot produktov oksidacije. Poznamo veliko število naravnih in sintetičnih antioksidantov. Slednji so običajno cenejši in bolj učinkoviti, vendar je sodoben trend močno v prid naravnim antioksidantom. Najpomembnejši naravni antioksidanti, ki se najpogosteje uporabljajo za maščobe, so tokoferoli, askorbinska kislina (kot ester palmitinske kisline), ekstrakti nekaterih začimb (žajbelj, rožmarin) in drugi (Skvarča, 2000).

Ločimo:

- antioksidante, snovi, ki delujejo antioksidativno in
- sinergiste, snovi, ki niso antioksidanti, vendar znatno povečajo njihovo delovanje.

Vloga antioksidantov, spojin, ki so v živilih naravno prisotne, ali pa jih dodajamo, ker se med predelavo izgubijo ali uničijo, je preprečevanje oksidacije in s tem ohranjanje senzoričnih lastnosti (videza, vonja, okusa in barve), prehranske vrednosti in tudi

obstoynosti živila. Antioksidanti, ki se dodajajo maščobam in maščobnim živilom, se strogo nadzorujejo. Dodajajo se samo dovoljene substance v predpisanih količinah, ki pa so odvisne tudi od pravilnikov v posameznih državah. Ker se zahteva varna uporaba antioksidantov, moramo vedeti v kakšnih mejah lahko pričakujemo riziko in kakšno je tveganje oksidiranih maščob in olj.

Antioksidanti morajo preprečevati mikrobiološki razkroj, hidrolitično in ketonsko žarkost, reverzijo arome in ne smejo vplivati na aromo nekakovostnih maščob in olj, kjer se oksidativna žarkost razvije.

Idealni antioksidant mora slediti naslednjim zahtevam:

- biti mora varen za uporabo,
- ne sme imeti nezaželenih vonjev, okusov in barve,
- biti mora učinkovit v nizkih koncentracijah,
- njegovo vključevanje mora biti enostavno, prenesti mora proces toplotne obdelave (pečenje, cvrenje),
- biti mora dostopen po nizkih cenah (Skvarča, 2000).

Antioksidante v živilih uvrščamo v tri skupine:

Primarni antioksidanti nastajajo v organizmu ali pa jih tvorijo mikroorganizmi. V to skupino prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije. Po navadi antioksidant poseže v reakcijo avtooksidacije s tem, da odda vodikov atom radikal, ki pa bi sicer omogočil tvorbo peroksidnih radikalov ali hidroperoksidov (Kovač in Raspor, 2000)

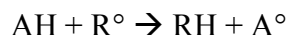
Naloga **sekundarnih antioksidantov** je, da nevtralizirajo novotvorjene proste radikale in preprečujejo, da bi ti vstopali v verižne reakcije ter tvorili nove proste radikale. Mednje zvrščamo vitamin C, E, karoten, albumine, polifenole in nekatere flavonoide (Kovač in Raspor, 2000).

Terciarni antioksidanti popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice (encimi, ki »popravljajo« poškodbe DNK – metionin sufoksid reduktaza) (Kovač in Raspor, 2000).

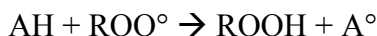
2.3.1 Mehanizem delovanja antioksidantov

Delovanje antioksidantov je prikazano na primeru delovanja polifenolov v vlogi antioksidanta (Belitz in sod., 2009).

Antioksidanti ustavijo reakcijo, ker se povežejo s prostimi radikali, kot je npr. radikal maščobne kisline ali alkilperoksidni radikal:

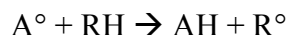


ali s peroksidnim radikalom:



(A° se deaktivira z nadaljnjo oksidacijo do kinonov in tako ustavi reakcijo)
Edino fenolne spojine, ki se zlahka pretvorijo v kinone, so učinkoviti antioksidanti.

Antioksidanti lahko v velikih koncentracijah delujejo prooksidativno. Takrat poteče naslednja reakcija (Belitz in sod., 2009):



Antioksidant ne veže kisika, temveč proste radikale ter tako preprečuje avtooksidacijo. Antioksidant je učinkovit, v kolikor ga dodamo v začetni fazi oksidacije. Če je oksidacija že v teku, so že prisotni peroksidi, s katerimi se antioksidant ne veže. Antioksidanti preprečujejo oksidacijo, dokler se ne porabijo. Koliko časa bo antioksidant deloval, je odvisno od vrste antioksidanta, dodane koncentracije, vrste maščobe in razmer med skladiščenjem (Bernot-Sotenšek, 2001). Zavedati se moramo, da antioksidant ne zmore preprečiti mikrobiološkega razkroja, preprečiti hidrolitske žarkosti, preprečiti reverzije arome in izboljšati arome maščob (Bernot-Sotenšek, 2001).

2.3.2 Antioksidativno delovanje začimb

Pri pripravi dobrih in obstojnih prehranskih izdelkov, zlasti takih, ki vsebujejo maščobe in so namenjeni daljšemu skladiščenju, je nujna uporaba antioksidantov. Z njimi preprečimo oziroma omejimo razvoj žarkosti. Da bi se izognili uporabi sintetičnih antioksidantov, obstaja čedalje več poskusov uporabe naravnih antioksidantov in začimb. Antioksidativna učinkovitost naravnih antioksidantov je v prvi vrsti odvisna od kakovosti rastline, geografskega porekla, klimatskih pogojev, časa obiranja ... (Bernot-Sotenšek, 2001).

Preglednica 1: Vpliv naravnih antioksidantov in antioksidativnih sestavin, dodanih post mortem na oksidacijo lipidov v mesnih izdelkih (Žlender, 2000)

Antioksidanti	Izdelek	Pogoji skladiščenja	Vpliv
α -tokoferol	TO puranji sekljanci	aerobni, 4 °C, 9 dni	+
	TO prašičje/perutninske klobase	4 °C, 8 tednov	+
	TO goveji sekljanci	vakuumsko, 5 °C, 30 dni	+
	svinjska pečenka	aerobni/vakuumsko, 4 °C, 8 dni/8 tednov	+
β -karoten	TO goveji sekljanci	vakuumsko, 5 °C, 30 dni	+
majaron, ingver, curry, nageljnovе žbice, timijan, žajbelj, cimet, kumina, bazilika, meta	mleto piščančje meso	alu folija, -18 °C, 6 mesecev	+
	mleta svinjina	ali 4 °C, 7 dni	+
	TO svinjina		+
rožmarin	sterilizirana svinjina	aerobni, 20 °C, 8-9 tednov	+
	TO piščančje meso	aerobni, 4 °C, 4 dni	+
sezamovo olje, rutin, kvarcetin, rožmarinov oleorezin	prašičji sekljanci	aerobni, 4 °C, 7 dni	+
	TO prašičji sekljanci	aerobni, 4 °C, 7 dni	+
Češnje	goveji sekljanci	aerobni, 4 °C, 9 dni	+
	TO goveji sekljanci	aerobni, 4 °C, 4 dni	+
Poper	TO mleta govedina	vakuumsko, 4 °C, 8 dni	+

TO – toplotno obdelano, aerobno – pakiranje v za zrak propustno folijo; alu folija – pakiranje v alu folijo + - zaustavi oksidacijo

2.3.3 Rožmarin

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (slika 3) je gost, zelo aromatičen trajen, zimzeleni grm visok do 2 metra in izvira iz Mediterana ter spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*). Ima 2–4 cm dolge, kosmate, lepljive in ozke liste. Zgornja površina listov je temnozelene barve, medtem ko je spodnja stran smolnata in bele barve (Sasikumar, 2001).

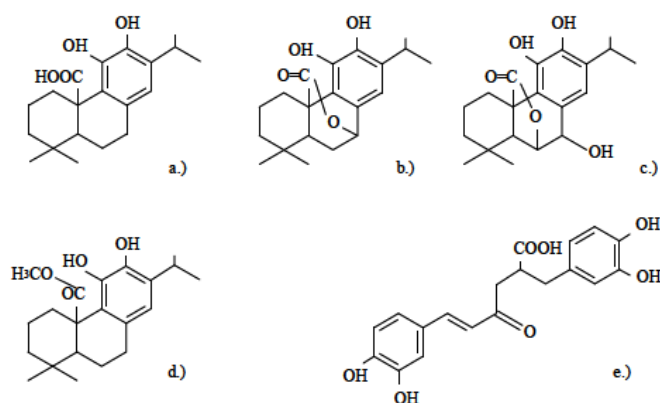
Cvetovi so svetlomodri do svetlovijoličasti in se razvijejo v skupinicah na zgornjih delih stebela. Cvetijo spomladi in zgodaj poleti. Iz listov, cvetov, stebel lahko pridobimo eterično olje in oleoresin, ki sta cenjena v aromaterapiji, tradicionalni in moderni medicini ter industriji arom in dišav. Eterično olje vsebuje 1,8-cineol, kamfor, α -pinen, kamfen, borneol, bornilacetat, limonen in druge monoterpene. Prav tako ima rožmarin visoko kulinarično vrednost (Sasikumar, 2001).



Slika 3: Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Sasikumar, 2001)

Rožmarin je poznan po svojem raznovrstnem fiziološkem delovanju: antioksidativno, protimikrobno, antikancerogeno in antihipertenzijsko (Herrero in sod., 2009). Zaradi teh lastnosti ga množično uporabljajo v prehrani, medicini, kozmetični industriji ter pri izdelovanju parfumov (Santos-Gomes in sod., 2002).

Karnozolna kislina, fenolni diterpen je glavna antioksidativna komponenta v svežem rožmarinu, pod vplivom vlage, temperature, svetlobe in kisika se spremeni v karnozol. Antioksidativni potencial karnozola je znatno manjši od karnozolne kisline (Bezjak, 2004). Sveže obrani listi rožmarina ne vsebujejo karnozola. Glede na to je mogoče sklepati, da rožmanol, rozmaridifenol, metil karnozat in rožmarinska kislina, ki se nahajajo v rožmarinu, nastanejo iz karnozolne kisline pod vplivom oksidacijskih razmer. Karnozolna kislina, karnozol, rožmanol in epirožmanol spadajo v skupino diterpenov in so bili izolirani iz rožmarinovih listov. Ti fenolni diterpeni ščitijo biološke sisteme pred oksidativnim stresom. V bioloških membranah se nahaja veliko nenasičenih maščobnih kislin, katerih oksidacija vodi v uničenje in nepravilno delovanje bioloških sistemov. Karnozolna kislina preprečuje oksidativno hemolizo eritrocitov. Lipidi v eritrocitih so močno nenasičeni, zato so le-ti podvrženi hitri oksidaciji. Rdeče krvničke vsebujejo tudi hemoglobin, ki pospešuje oksidacijo eritrocitov (Bezjak, 2004).



Slika 4: Strukturne formule antioksidativnih komponent rožmarina a.) karnozolna kislina, b.) karnozol, c.) rožmanol, d.) metil karnozat, e.) rožmarinska kislina (Rižner, 2000)

Celotna rastlina se uporablja pri izdelavi eteričnega olja in oleorezina, ki ima pomembno mesto v tradicionalni in moderni medicini. Rožmarin učinkuje kot sredstvo proti vetrovom (flavonoidi), kot antidepresiv, sredstvo proti krčem (hlapna olja), sredstvo za pordečenje kože (fenoli), ima protimikrobni (diterpeni), protivnetni in antikancerogeni učinek (karnozol). Uporabljajo ga tudi kot sredstvo za razstrupljanje jeter (karnozol in izvleček cele rastline), protirevmatično sredstvo (rožmarinsko mazilo) in sredstvo za povzročitev splava (vodni izvleček) (Jones in Dangl, 2006).

2.3.4 Bor

Bor je iglasto drevo iz rodu borovcev (*Pinus*) in spada k družini borovk (*Pinaceae*). Obstaja približno 115 vrst borov. Je zimzelena rastlina, ki ima zelo debelo deblo in v višino zraste približno 30–40 metrov.



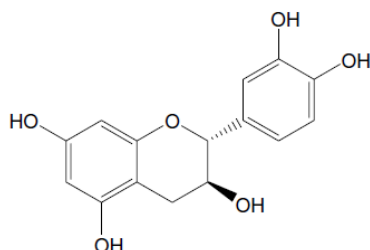
Slika 5: Obmorski bor (*Pinus pinaster*) (Maimoona in sod., 2011)

Sokół-Łętowska in sod. (2007) navajajo, da je bor bogat s proantocianidini ali tako imenovanimi kondenziranimi tanini. Ekstrakt iz lubja bora se je že v preteklosti množično uporabljal kot zdravilo, danes pa kot prehransko dopolnilo. Uživanje bora zmanjšuje tveganje za nastanek srčno-žilnih obolenj, hkrati pa koristi tudi tistim, ki obolevajo za kronično vensko insuficienco.

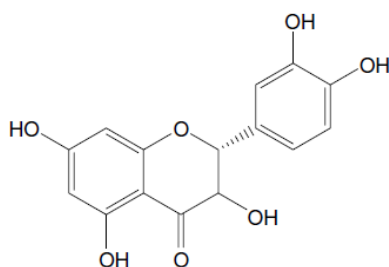
Maimoona in sod. (2011) trdijo, da ekstrakt skorje bora:

- zmanjšuje tveganje za nastanek kardiovaskularnih bolezni,
- zmanjšuje tveganje za nastanek ateroskleroze,
- zmanjšuje tveganje za nastanek kronične venske insuficience,
- znižuje raven krvnega tlaka,
- znižuje simptome astme pri vseh starostnih skupinah,
- zmanjšuje tudi škodljive učinke kemoterapije,
- pomaga pri nevroloških motnjah (AHDH (*angl.* attention deficit and hyperactivity disorder), migrene ...),
- poveča hranilno vrednost živilom ter rok uporabe,
- uporablja se kot oksidativni stabilizator za shranjevanje živil.

Najpogostejše fenolne komponente, zastopane v obmorskem boru (*P. pinaster*), so katehini, epikatehini, dihidrokvercetin, taksifolin in številne fenolne kisline (procianidni dimeri, trimeri, oligomeri in polimeri). Yesil-Celiktas in sod. (2009) navajajo, da imata katehin in taksifolin antimutagen in antikancerogen učinek kot tudi velik antioksidativni potencial.



Slika 6: Strukturna formula monomere katehina (Yesil-Celiktas in sod., 2009)



Slika 7: Strukturna formula taksifolina (Yesil-Celiktas in sod., 2009)

Borovo lubje vsebuje tudi maščobne kisline, alifatske kisline, smolne kisline, sterole in druge lipofilne spojine, ki imajo antioksidativni učinek in povzročajo sinergijske učinke z drugimi antioksidanti (Braga in sod., 2008).

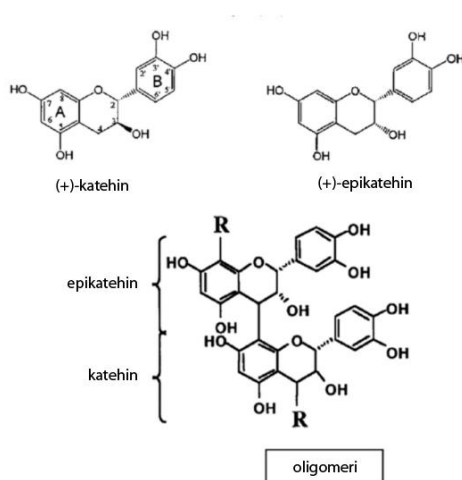
Yesil-Celiktas in sod. (2009) so z LC/MS proučevali kemijsko sestavo štirih različnih vrst bora, in sicer *P. brutia*, *P. nigra*, *P. sylvestris* in *P. pinea*. Ugotovili so, da bora vrste *P. brutia* in *P. nigra* vsebujeta večje koncentracije fenolnih snovi kot vrsti *P. sylvestris* in *P. pinea*. Ekstremno veliko taksifolina (18,5 %) vsebuje bor vrste *P. brutia*. Ugotovili so, da imajo vse vrste bora visoko biološko aktivnost in so kot take primerne za uporabo v živilski in farmacevtski industriji.

2.3.5 Pycnogenol®

Pycnogenol® (piknogenol) je standardiziran rastlinski ekstrakt, pridobljen iz skorje francoskega obmorskega bora *P. pinaster* (včasih znan kot *P. maritima*), Aiton, podvrsta *Atlantica des Villar*. Ta vrsta bora raste na obalah jugozahodne Francije. 65–75 % piknogenola sestavljajo procianidini, ki so sestavljeni iz dveh podenot, in sicer katehina ter epikatehina. Vsebuje še nekatere druge sestavine, kot so polifenolni monomeri, fenolna in cimetna kislina ter njuni glikozidi. Izkazalo se je, da ima piknogenol izjemno antioksidativno učinkovitost. To lahko pripišemo fenolnim kislinam, polifenolom in zlasti flavonoidom, sestavljenim iz enega ali več aromatskih obročev, na katere je vezana še ena ali več hidroksilnih skupin, ki so potencialno dobri lovilci prostih radikalov (D'Andrea, 2010).

Preglednica 2: Sestavine in njihovi deleži v ekstraktih borovega lubja, določeni s HPLC (D'Andrea, 2010).

Sestavina	Odstotek (%)
galna kislina	3,2
dimeri (katehin, epikatehin)	40,9
katehin	18,9
neznana sestavina	12,8
kavna kislina	1,9
epikatehin	0,2
kumarna kislina	0,2
taksifolin	2,1
ferulna kislina	0,5
ostalo, vključno s trimeri, tetrameri	19,0



Slika 8: Sestavine glavnih procianidinov, prisotnih v Pycnogenolu® (zgoraj) in njihovi morebitni oligomeri (spodaj) (D'Andrea, 2010).

D'Andrea (2010) opisuje zdravilne učinke pknogenola. Dopolnitev prehrane kardiovaskularnih bolnikov s pknogenolom je zmanjšala agregacijo trombocitov ter posledično izboljšala mikrocirkulacijo. Odkrili so, da ima ekstrakt skorje bora tudi protivnetne učinke. Pozitiven učinek ima pri astmatikih, saj lajša simptome astme. Zanimivo je, da pknogenol deluje analgetično pri težavah z menstrualnimi krči.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL IN POTEK DELA

Delo je temeljilo na izdelavi govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (laneno olje) in različnih dodatkih rastlinskih ekstraktov (rožmarin, bor in piknogenol). Poskus je bil razdeljen na tri dele, in sicer na tehnološki, kemijski in senzorični del. Poskus smo v celoti opravili v dveh ponovitvah. Pred tem pa smo izvedli tudi predposkus.

V poskusu smo uporabili meso plečet dveh mladih bikov simentalске pasme, starih približno 18 mesecev in vzorčenih 48 ur po komercialnem zakolu. Iz mesa dveh plečet smo pripravili dve ločeni ponovitvi poskusa. Goveje pleče smo obrezali oziroma odstranili kite in vezivo. Obrezano meso smo zmleli v mesoreznici z luknjačo premera 8 mm. Dodali smo sol, mešanico lanenega olja in koruznega škroba, ekstrakte (preglednica 3), nato smo oblikovali deset skupin vzorcev po dva sekljanca (paralelki). Za pripravo dveh govejih sekljancev (oz. ene skupine vzorcev) smo potrebovali 180 g mletega mesa, 20 g mešanice laneno olje: koruzni škrob v razmerju 1 : 1 in 3,7 g soli. Ekstrakte, ki smo jih uporabili v poizkusu, smo predhodno pripravili iz v trgovini kupljenega rožmarina dveh proizvajalcev (Maestro in Kotanyi), skorje črnih borov rodu *Pinus nigra*, ki so rasli na nadmorski višini 500 m (okolica Mislinje) in 1000 m (na Vremščici) in iz tablete Pycnogenol® Forte. Priprava in količine ekstraktov, ki smo jih dodali v sekljance, so opisane v nadaljevanju in v preglednici 3. Koncentracije ekstraktov smo določili na podlagi dobljenih rezultatov za analizo določanja skupnih polifenolov po metodi Folin-Ciocalteu.

Preglednica 3: Skupine govejih sekljancev na osnovi dodatka različnih rastlinskih ekstraktov.

Skupina	Dodatek ekstrakta
kontrola	ni dodatkov
P/1	1 ml ekstrakta Pycnogenol®
B1/1	1 ml ekstrakta skorje črnega bora (Mislinja, 500 m n.v.)
B1/3	3 ml ekstrakta skorje črnega bora (Mislinja, 500 m n.v.)
B2/1	1 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
B2/3	3 ml ekstrakta skorje črnega bora (Vremščica, 1000 m n.v.)
R1/1	1 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
R1/0,3	0,3 ml ekstrakta rožmarina (Maestro)
R2/1	1 ml ekstrakta rožmarina (Kotanyi)
R2/0,3	0,3 ml ekstrakta rožmarina (Kotanyi)

Priprava ekstraktov rožmarina in bora

Rastlinske ekstrakte rožmarina in bora smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali 10 g vzorca (tj. zdrobljenih sušenih iglastih listov rožmarina ali zmleto skorjo črnega bora) in dodali 200 ml etanola (Merck, 1.00971). Sledilo je stresanje na stresalniku (IKA minshaker

MS2). Raztopino 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. Vsebinske bučke smo zopet dobro premešali in jo prelili v plastične posodice, ki smo jih do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 2 °C.

Priprava ekstrakta piknogenola

Ekstrakt piknogenola smo pripravili tako, da smo 1 tableto (50 mg) Pycnogenol® Forte ekstrahirali v 10 ml etanola. Ekstrakt smo hranili v hladilniku pri temperaturi 2 °C.

Polovico pripravljenih govejih sekljancev (po en sekljanec iz vsake skupine v dveh paralelkah = 20 sekljancev) smo 4 minute pekli na dvoploščnem žaru pri temperaturi 240 °C, na še toplih opravili senzorično analizo (10 vzorcev), na ohlajenih (10 vzorcev) pa po 12-ih urah tudi kemijske analize (določili smo vsebnost hidroksiholesterola, maščobnokislinsko sestavo in število TBK). Ostalo polovico (tj. 10 vzorcev) govejih sekljancev smo zapakirali v plastične vrečke s 100 % atmosfero kisika in jih skladiščili v hladilniku pri temperaturi 2 °C. Po enem tednu smo vzorce toplotno obdelali pri enakih pogojih kot predhodne vzorce in na njih opravili tako kemijske kot tudi senzorično analizo. Poskus smo ponovili tako, da smo vse eksperimentalne skupine sekljancev izdelali z mesom plečeta drugega mladega bika.

Po opravljeni analizi smo vzorce 3 mesece skladiščili v zamrzovalniku pri -21 °C in nato še enkrat ponovili analize za določanje števila TBK.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Senzorična analiza

Za senzorično ocenjevanje je bil panel sestavljen iz treh šolanih preskuševalcev. V senzoričnem laboratoriju so ocenjevali senzorične lastnosti šifriranih vzorcev govejih sekljancev. Preskuševalci so imeli za svoje delo definirane, natančno predpisane, kontrolirane in ponovljive pogoje delovanja.

Prostor za senzorično ocenjevanje

Prostor, kjer je bilo izvedeno senzorično ocenjevanje, ustreza mednarodnim predpisom (velikost prostora, zračnost, osvetljenost, temperatura, enakovredna delovna mesta) (Golob in sod., 2006). Prostor je bil primerno osvetljen z naravno svetlobo, obstajala pa je tudi možnost reguliranja umetne svetlobe. Temperatura v senzoričnem laboratoriju je bila optimalna, 20 ± 2 °C, relativna vlaga pa med 60 in 75 %.

Posoda za ocenjevanje

Vzorce govejih sekljancev so senzorični preskuševalci ocenjevali na belih porcelanastih krožnikih, ki ne prenašajo vonja in okusa ter niso vplivali na oceno barve ocenjevanega vzorca.

Količina vzorca

Vsak preskuševalec je na krožnik dobil dva koščka ($2\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 1\text{ cm}$) govejega sekljanca takoj po pečenju.

Označevanje vzorcev

Vzorci so bili označeni tako, da je bila zagotovljena anonimnost.

Za vrednotenje senzoričnih lastnosti smo uporabili deskriptivno senzorično analizo z nestrukturirano točkovno lestvico (Golob in sod., 2006) (od 1 do 7 točk). Pri tem sistemu je 1 točka pomenila, da lastnost ni izražena, ali pa je popolnoma nesprejemljiva, in 7 točk, da je lastnost močno ali odlično izražena.

Merila za ocenjevanje posameznih lastnosti so bila naslednja:

Barva govejega sekljanca pred toplotno obdelavo (1–7 točk):

- 1 – rožnata barva, brez odtenka, brez oksidirane barve
- 7 – temnosiva barva, oksidirana barva

Barva govejega sekljanca po toplotni obdelavi (1–7 točk):

- 1 – svetlosiva rjava barva
- 7 – temnosiva barva

Tuji vonji (1–7 točk):

- 1 – tuji vonji niso izraziti
- 7 – tuji vonji so močno izraziti (po žarkem, po ribah)

Vonj po postanem (1–7 točk):

- 1 – vonj po postanem ni izrazit
- 7 – vonj po postanem je močno izrazit

Tuje arome (1–7 točk):

- 1 – tuje arome niso izrazite
- 7 – tuje arome so močno izrazite

Aroma po postanem (1–7 točk):

- 1 – aroma po postanem ni izrazita
- 7 – aroma po postanem je močno izrazita

3.2.2 Določanje vsebnosti hidroksiholesterola in holesterola

Za določanje vsebnosti oksidov holesterola smo uporabili metodo po Polak in sod. (2010), sestavljeno iz hladne saponifikacije, ekstrakcije, postopka SPE in ločbe oksisterolov s tekočinsko kromatografijo s tandemskim masnim spektrometrom (LC/MS).

3.2.2.1 Saponifikacija

V erlenmajerice s teflonskim pokrovčkom smo odtehtali 2 g ($\pm 0,001$ g) vzorca. Dodali smo 3 ml metilen klorida (CH_2Cl_2) (Merck, 1.06044) in 7 ml 1 M raztopine KOH (Merck, 1.05033) v 96 % etanolu (Merck, 1.00971). Vsebino smo temeljito premešali, jo postavili na magnetno mešalo in mešali 18-20 ur pri sobni temperaturi.

3.2.2.2 Ekstrakcija hidroksiholesterolov

Vzorci smo po mešanju kvantitativno prenesli v 50 ml centrifugirke, dodali 10 ml destilirane vode in 10 ml dietiletra (Merck, 1.00921). Vsebino smo intenzivno premešali, jo za 15 minut postavili na ultrazvočno kopel (Branson 3510E-DTH, Branson, Nemčija) in nato na centrifugo (Eppendorf, centrifuge 5810) ($1700 \times g$ za 6 min). Polarna in nepolarna faza se ločita. Spodnjo polarno fazo smo v večji meri (10 ml) odstranili. V organsko fazo, ki je ostala v centrifugirki, smo dodali 5 ml 0,5 M KOH (Merck, 1.05033) v destilirani vodi, temeljito premešali in ponovno tretirali na ultrazvoku in centrifugi pri enakih pogojih. Ob ločitvi obeh faz smo ponovno odstranili spodnjo polarno fazo. V ostanek smo dodali 5 ml destilirane vode. Vzorce smo ponovno temeljito premešali, postavili na ultrazvočno kopel ter centrifugirali pri že omenjenih pogojih. Po končani ekstrakciji smo s stekleno pipeto natančno odpipetirali 5 ml zgornje organske faze v temne vialice in vsebino prepihali z dušikom. Suh preostanek smo raztopili v 2 ml mešanice heksan (Merck, 1.04371) : dietileter (Merck, 1.00921) (75 : 25).

3.2.2.3 Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)

Ekstrakcija s trdno fazo (solid-phase extraction; SPE) je danes že dobro uveljavljena tehnika in se uporablja za analize številnih skupin komponent v različnih vrstah matrikov. Zaradi možnosti uporabe velikih volumnov vzorcev se SPE uporablja za določanje organskih onesnaževalcev v vzorcih voda iz okolja. Uporablja se tudi za analize v biomedicini, farmaciji ter za analize hrane in pijač.

Za ekstrakcijo smo uporabili kolono Strata SI-1 (Phenomenex, 500 mg/3ml), ki smo jo predhodno kondicionirali z 2,5 ml heksana (Merck, 1.04371) (eluat zavržemo). Nato v kolono uvajamo ves (2 ml) predhodno pripravljen vzorec ter pazili, da je zaradi boljše vezave holesterola in hidroksiholesterola počasi potoval skozi kolono (eluat zavržemo). Potem smo kolono spirali z 2,5 ml heksana (Merck, 1.04371) in 2,5 ml mešanice heksana (Merck, 1.04371) ter dietiletra (Merck, 1.00921) (90:10) (eluat zavržemo). Na koncu smo na kolono nanесли 2 ml mešanice heksana (Merck, 1.04371) in dietiletra (Merck, 1.00921) (60:40) ter eluat zbirali v majhne bučke. Topilo smo odparili na rotavaporju (program heksan, 40 °C) ter predhodno v bučke dolili malo heksana. Suh preostanek smo raztopili v

1 ml mešanice acetonitrila (Sigma-Aldrich, 34851) in izopropanola (Merck, 1.09634), v razmerju (55:45). Vzorec smo prefiltrirali v 2 ml viala ter jih hranili v hladilniku pri temperaturi 2 °C do analiz na LC/MS.

Pogoji določanja vsebnosti holesterola in hidroksiholesterolov

Vsebnost holesterola in hidroksiholesterolov smo določili s HPLC sistemom Agilent 1100, sestavljen iz:

- vakuumskega razplinjevalnika (Agilent 1100, G1379A),
- binarne črpalke (Agilent 1100, G1312A),
- avtomatskega vzorčevalnika (Agilent 1100, G1330B),
- termostata kolone (Agilent 1100, G1316A),
- kromatografske kolone: Kinetex C18 (2,6 μm $\times$ 2,1 $\times$ 100 mm); proizvajalec Phenomenex (Torrance, CA, ZDA, 00F-4439-B0).

Vsebnost holesterola smo določili s primerjavo retenzijskega časa in absorpcijskega spektra standarda holesterola (Sigma, C-8667).

Kromatografski pogoji

- pretok: 0,400 ml/min
- način kromatografije: RP
- mobilna faza A: H₂O
- mobilna faza B: AcN
- volumen injiciranja: 10 μl
- temperatura vzorcev: 8 °C
- temperatura kolone: 45 °C
- detektor: DAD (Diode Array Detector) (Agilent 1100, G1315B)

Kot detektor smo uporabili masni spektrometer (Micromass Quattro micro ® API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (Electrospray Ionization – ESI).

Deloval je pri naslednjih pogojih:

- napetost vhodne leče 30 V,
- temperatura izvora 120 °C,
- napetost kapilare 3,20 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+)
- razpršilni plin dušik je imel temperaturo 350 °C in pretok 400 l/h,
- plin vhodne leče (dušik) je imel pretok 50 l/h,
- detekcija na masnem detektorju je potekala v MRM (angl.: Multi Reaction Monitoring).

Preglednica 4: Prehodi holesterola, 7 β -hidroksiholesterola, 25 α -hidroksiholesterola, 20 α -hidroksiholesterola in 5 α -holestena v MRM

	m/z	prehod	cona (V)	(V)	Rt (min)
Holesterol	369,18	147,22	30	30	7,81
7 β -hidroksiholesterol	367,22	145,22	30	30	3,90
25 α -hidroksiholesterol	367,22	147,22	30	30	2,75
20 α -hidroksiholesterol	367,22	147,22	30	30	3,13
5 α -holesten	371,27	149,26	30	30	8,32

Sledila je obdelava podatkov v programu Quantify v MassLynxTM V4.0.

3.2.3 Določanje maščobnokislinske sestave

Maščobnokislinsko sestavo mišične maščobe smo določili z metodo, modificirano po Parku in Goinsu (1994). Za to analizo smo morali najprej pripraviti metilne estre maščobnih kislin (MEMK), ki so bolj hlapni in bolj nepolarni kot maščobne kisline. Pri postopku priprave MEMK smo izvedli ekstrakcijo in transesterifikacijo (*in situ transesterifikacija*) v eni fazi. Maščobnokislinsko sestavo smo za tem določili s plinsko kromatografijo (GC). Ta metoda je hitra, glede na toksičnost reagentov bolj varna, izognemo se tudi morebitnim izgubam MEMK.

3.2.3.1 Postopek določanja maščobnokislinske sestave

V 10 ml epruvete s teflonskim pokrovčkom na navoj smo odtehtali 0,400 g homogeniziranega vzorca govejega sekljanca, dodali 200 μ l metilenklorida (CH₂Cl₂; Merck, 1.06044) in 3 ml 0,5 M sveže pripravljenega natrijevega hidroksida (NaOH; Merck, 1.06498) v metanolu (Merck, 1.06007). Epruvete smo tesno zaprli s teflonskim pokrovčkom in premešali. Dobro premešane vzorce smo segrevali v termobloku (VLM EC1) pri 90 °C 10 minut in jih vmes večkrat premešali. Sledilo je hitro hlajenje v ledeni vodi (0 °C). Ohlajeni zmesi smo dodali 3 ml 14 % BF₃ v metanolu (Sigma, B1252), epruvetke dobro premešali ter ponovno segrevali v termobloku 10 min pri 90 °C. Nato smo zmes ohladili na sobno temperaturo (23 °C) ter dodali 3 ml 10 % raztopine NaCl (Merck, 1.06404) v vodi in 2 ml heksana (Merck, 1.04371). Epruvete smo 1 minuto močno stresali, da je prišlo do čim boljše ekstrakcije MEMK iz vodne faze v nepolarno heksansko fazo in centrifugirali 10 min pri 2000 $\times$ g (Eppendorf, centrifuge 5810), nato smo odpipetirali zgornjo heksansko fazo v majhne vialice in 1 μ l injicirali v plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID).

Plinska kromatografija

Vsebnost in deleže posameznih maščobnih kislin smo določili s plinsko kromatografijo na plinskem kromatografu Agilent Technologies 6890 s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Uporabili smo kapilarno kolono SPTM - 2380 (Supleco, 2411) (60 mm $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,2 μ m).

Ločevanje in detekcija sta potekali po sledečem temperaturnem programu: 150 °C (4 min), 4 °C/min do 180 °C (5 min), 3 °C/min 240 °C (2 min). Ostali pogoji pa so bili sledeči:

- temperatura injektorja: 250 °C
- temperatura detektorja FID: 280 °C
- injektor: split:splitless: 1:30, volumen 1,0 µl
- nosilni plin: He 2,3 ml/min
- maskirni plin: N₂ 45 ml/min
- plin detektorja: H₂ 40 ml/min
- sintetični zrak (21 % O₂) 450 ml/min

Za določitev in ovrednotenje rezultatov smo uporabili naslednje standarde metilnih estrov maščobnih kislin (MEMK): standardno mešanico Nu Check 85 Prep., Inc, standardno mešanico Nu Check 68 D Prep. Inc in standardno mešanico FAME Mix C4-c24 (Supelco, 18919-1AMP).

Določanje faktorja odzivnost (Rf) plamensko ionizacijskega detektorja (FID)

Faktor odzivnosti detektorja (R_f) je potrebno določiti za natančno kvantitativno ovrednotenje kromatogramov. Določimo ga s standardno mešanico (Nu Check 85 Prep. Inc.), kjer so znani utežni % posameznih MK.

$$R_f = \frac{ut.\%_{posamMEMK} \times \sum_{i=1}^n A_i}{A_i \times 100 \text{ ut.\%}} \quad \dots(2)$$

A_i = površina posameznega MEMK-standarda

ut. % posameznih MEMK v Nu Check 85 Prep. Inc znaša 3,03, razen za metilne estre heksadekanojske (palmitinske) MK, kjer znaša 6,06.

Določanje konverzijskega faktorja (FA_i) za posamezno MK

Faktor za pretvorbo MEMK v MK (FA_i) smo določili po sledeči formuli

$$FA_i = \frac{MrMK_i}{MrMEMK_i} = \frac{MrMK_i}{MrMK_i + 14} \quad \dots(3)$$

MrMK_i = molska masa posamezne maščobne kisline

MrMEMK_i = molska masa posameznega metilnega estra maščobnih kislin, ki se od MrMK_i razlikuje za Mr (CH₂) skupine = 14

Izračun utežnih deležev maščobnih kislin (ut. %)

Utežni delež MK v vzorcu smo izračunali iz relativne površine vrha posamezne MK na kromatogramu (A_i), z upoštevanjem faktorja odzivnosti detektorja (R_f_i) ter konverzijskega faktorja (FA_i) pretvorbe MEMK v MK.

$$ut. \% MK = \frac{(R_{f_i} \times FA_i \times A_i)}{\sum_{i=1}^n (R_{f_i} \times FA_i \times A_i)} \times 100 \quad \dots(4)$$

A_i = površina posamezne maščobne kisline

R_f_i = faktor odzivnosti detektorja za posamezno maščobno kislino

FA_i = konverzijski faktor za posamezno maščobno kislino

3.2.4 Število tiobarbiturne kisline (število TBK)

Test s tiobarbiturno kislino uporabljamo za ugotavljanje oksidativnega kvara – žarkosti – maščob in živil, ki vsebujejo maščobe. Osnova temu testu je oblikovanje rdečega barvila, ki nastane iz tiobarbiturne kisline in malondialdehida pri segrevanju. Malondialdehid je produkt oksidacije večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Barvilo kaže značilni absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 532 nm. Število TBK je definirano s številom mg malondialdehida v 1000 g maščobe (Gašperlin in sod., 2011).

3.2.4.1 Postopek določanja števila TBK

V suho Hachovo epruvetko smo zatehtali 0,100 g vzorca, dodali 1 ml 35 % raztopine trikloroacetne kisline (Merck, 1.00807) ter 2 ml reagenta tiobarbiturne kisline (Sigma-Aldrich, T-550). Epruvete smo zamašili s pokrovčkom in 5 minut dobro stresali. Nato smo dodali še 1 ml 0,9 % BHT (Sigma-Aldrich, 81K0200) v heksanu (Fluka, 34484), premešali ter postavili zaprte epruvete v termo blok (100 °C) za 30 minut. Po ohlaiditvi smo dodali 1 ml očetne kisline (Merck, 1.00063) in 2 ml kloroforma (Sigma-Aldrich, 32211), premešali in centrifugirali pri 1000 x g 10 minut. S pipeto smo prenesli zgornjo (vodno) plast v kiveto spektrofotometra in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 532 nm. Vzoredno z vzorcem smo pripravili še slepi vzorec (namesto vzorca smo zatehtali 0,1 g vode).

3.2.4.2 Priprava umeritvene krivulje

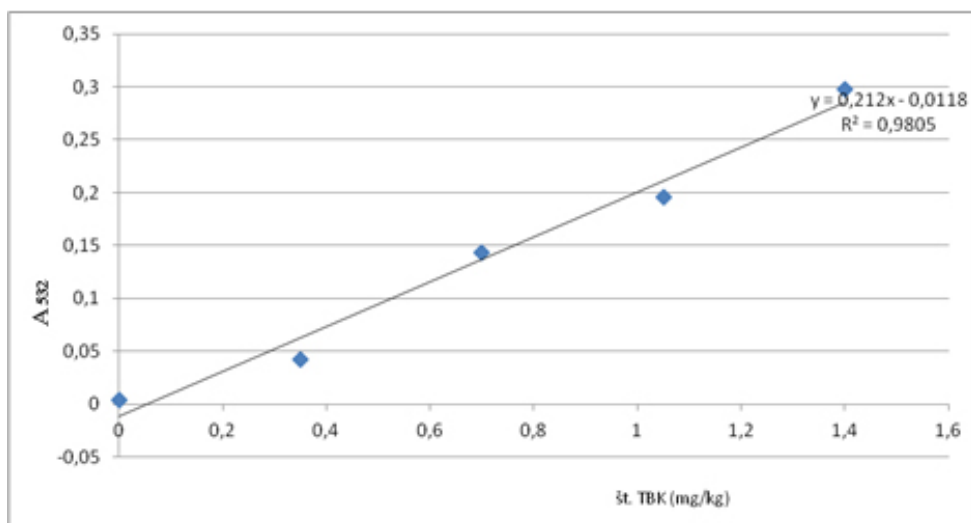
Pripravili smo standardno raztopino 1,1,3,3 tetraetoksipropna (7,0 mg/100 ml heksana). V 100 ml merilno bučko smo zatehtali 7 mg 1,1,3,3 tetraetoksipropna in dopolnili do 100 ml s heksanom. Nato smo 10 ml te standardne raztopine odpipetirali v 100 ml bučko ter zopet do oznake dopolnili s heksanom. V suhe Hachove epruvete smo odpipetirali naslednje volumne 10-krat razredčene standardne raztopine (preglednici 5 in 6).

Preglednica 5: Volumni standardne raztopine in število TBK za umeritveno krivuljo 1

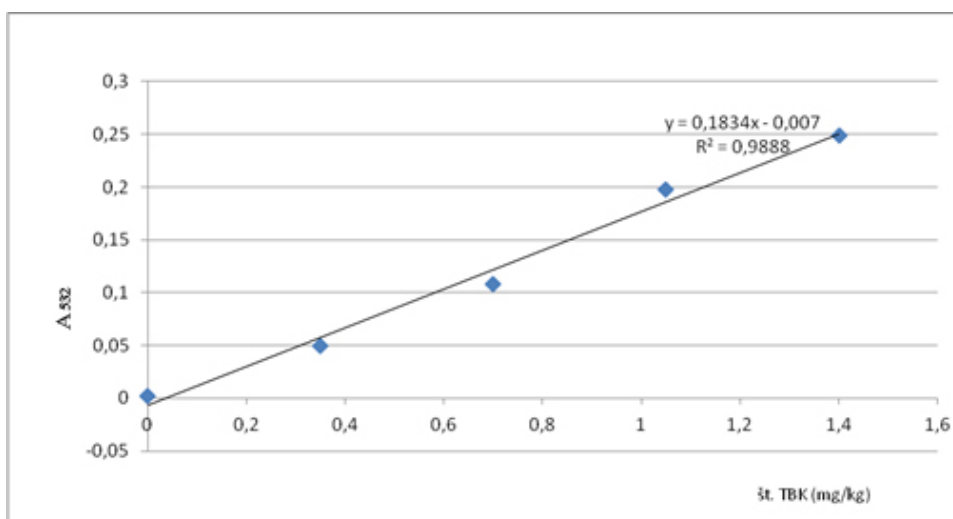
epruveta	1 – slepi vzorec	2	3	4	5
ml.st.razt.	0	0,05	0,1	0,15	0,2
Št.TBK*	0	0,35	0,70	1,05	1,4

Preglednica 6: Volumni standardne raztopine in število TBK za umeritveno krivuljo 2

epruveta	1 – slepi vzorec	2	3	4	5
ml.st.razt.	0	0,1	0,2	0,3	0,4
Št.TBK*	0	0,70	1,40	2,10	2,8



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje števila TBK



Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje števila TBK po treh mesecih skladiščenja

4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST HOLESTEROLA IN HIDROKSIHOLESTEROLOV

Rezultati določanja vsebnosti holesterola in hidroksiholesterolov v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin so prikazani v preglednici 7. Iz rezultatov je razvidno, da so vzorci glede vsebnosti holesterola zelo homogeni, saj je koeficient variabilnosti za parameter 0,5 %. Vsebnost hidroksiholesterolov v poskusu močno variira (25 α -hidroksiholesterol – 187 %, 7 β -hidroksiholesterol – 180 %), predvsem zaradi nekaterih hidroksiholesterolov, ki so pod mejo detekcije (< 0,001 mg/100 g) ter zaradi različnih dodatkov rastlinskih ekstraktov, ki imajo velik vpliv na tvorbo sterolov. Kot prikazuje preglednica, so goveji sekljanci s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin na 100 g v povprečju vsebovali 63,71 mg holesterola in 0,829 mg hidroksiholesterolov (1,3 % od skupnega holesterola).

Preglednica 7: Rezultati določanja vsebnosti holesterola in hidroksiholesterolov v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin, izdelanih z različnimi dodatki rastlinskih ekstraktov, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 40)

Parameter (mg/100 g)	Vrednost			so	KV (%)
	povprečna	najmanjša	največja		
20 α -HC	0,239	0,000	1,340	0,385	161
25 α -HC	0,178	0,000	1,560	0,333	187
7 β -HC	0,184	0,003	1,560	0,331	180
5 α -C	0,227	0,022	1,630	0,336	148
vsota hidroksiholesterolov	0,829	0,034	6,090	1,304	157
holesterol	63,71	63,12	64,20	0,35	0,5
% hidroksiholesterolov glede na skupni holesterol	1,25	0,05	8,67	1,88	151

n – število obravnavanj v poskusu, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti, 25 α -HC – 25 α -hidroksiholesterol; 5 α -C – 5 α -holesten; 7 β -HC – 7 β -hidroksiholesterol; 20 α -HC – 20 α -hidroksiholesterol.

Iz preglednic 8, 9 in 10 lahko v splošnem povzamemo, da dodatki rastlinskih ekstraktov rožmarina, skorje bora in piknogenola značilno vplivajo na vsebnost nekaterih hidroksiholesterolov v govejih sekljancih takoj po izdelavi ter na vsebnost vseh hidroksiholesterolov po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika.

Takoj po izdelavi je bila vsebnost **20 α -HC** v sekljancih pod mejo detekcije, ne glede na vrsto in dodatek rastlinskih ekstraktov. Po enem tednu skladiščenja (100 % kisik) sekljancev pa ugotavljamo, da značilno največ 20 α -HC nastane v kontrolnem vzorcu (brez dodanih ekstraktov, 1,287 mg/100 g), sledita vzorca z dodanim piknogenolom (0,925 mg/100 g) in B1/1 (0,825 mg/100 g), nato vzorci B1/3, B2/3 in B2/1 (0,430–0,665 mg/100 g) ter vzorci z dodanim ekstraktom rožmarina, R1/0,3, R2/1, R1/1 in R2/0,3 (0,066–0,088 mg/100 g).

Po enem tednu skladiščenja se je značilno povečala vsebnost 20 α -HC v sekljancih z dodanim ekstraktom bora (B1/1 in B2/1), rožmarina (R1/0,3 in R1/1) in piknogenola. Z vidika antioksidativnega delovanja rastlinskih ekstraktov so zanimivejše statistično neznačilne razlike v obsegu tvorbe 20 α -HC med enotedenskim skladiščenjem sekljancev (v aerobnih pogojih) z dodano večjo koncentracijo ekstraktov bora (B1/3 in B2/3) in rožmarina (R2/0,3 in R2/0,3).

Takoj po izdelavi je bila vsebnost **25 α -HC** v sekljancih največja v kontrolnem vzorcu (0,050 mg/100 g) in vzorcih z ekstraktom bora 1 (B1/1 0,033 mg/100 g in B1/3 0,34 mg/100 g), sledita vzorca z dodanim ekstraktom bora 2 (B2/1 0,023 mg/100 g in B2/3 0,026 mg/100 g), bistveno manjša je njegova vsebnost v vzorcih z dodanim piknogenolom (0,008 mg/100 g) in ekstraktom različnih rožmarinov v dveh koncentracijah (< 0,001–0,004 mg/100 g). Po enem tednu skladiščenja (100 % kisik) sekljancev pa ugotavljamo, da značilno največ 25 α -HC spet nastane v kontrolnem vzorcu (1,508 mg/100 g), sledijo vzorci z dodanimi ekstrakti bora (0,150–0,343 mg/100 g), vzorci z dodanimi ekstrakti rožmarina (0,111–0,237 mg/100 g) in vzorec z dodanim piknogenolom (0,035 mg/100 g).

V vzorcih, ki so vsebovali ekstrakt piknogenola, se je vsebnost 25 α -HC po sedmih dneh skladiščenja v atmosferi kisika povečala za štirikrat, medtem ko se je pri kontrolnem vzorcu povečala kar za 30-krat. Tudi pri vzorcih, ki so vsebovali ekstrakte rožmarina in bora, se je vsebnost 25 α -HC povečala, vendar bistveno manj kot pri kontrolnem vzorcu.

Preglednica 8: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na vsebnost 20 α -hidroksiholeserola in 25 α -hidroksiholeserola v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

Dodatek ekstrakt/čas	Parameter (mg/100 g)					
	20 α -HC			25 α -HC		
	Takoj	7 dni	z.	Takoj	7 dni	z.
kontrola	< 0,001B	1,287 $\pm$ 0,075aA	**	0,050 $\pm$ 0,007aB	1,508 $\pm$ 0,074aA	**
P/1	< 0,001B	0,925 $\pm$ 0,092bA	**	0,008 $\pm$ 0,004ecdB	0,035 $\pm$ 0,004gA	*
B1/1	< 0,001B	0,825 $\pm$ 0,064bA	**	0,033 $\pm$ 0,017baB	0,343 $\pm$ 0,004cA	**
B1/3	< 0,001	0,665 $\pm$ 0,304cb	nz	0,034 $\pm$ 0,016baB	0,150 $\pm$ 0,000efA	**
B2/1	< 0,001B	0,355 $\pm$ 0,021edA	**	0,023 $\pm$ 0,000bcdB	0,452 $\pm$ 0,001bA	***
B2/3	< 0,001	0,430 $\pm$ 0,170cd	nz	0,026 $\pm$ 0,011bcB	0,183 $\pm$ 0,005eA	**
R1/0,3	< 0,001B	0,088 $\pm$ 0,001eA	***	0,003 $\pm$ 0,000edB	0,198 $\pm$ 0,007edA	***
R1/1	< 0,001B	0,070 $\pm$ 0,006eA	**	0,004 $\pm$ 0,001edB	0,111 $\pm$ 0,002fA	***
R2/0,3	< 0,001	0,066 $\pm$ 0,042e	nz	0,003 $\pm$ 0,001edB	0,237 $\pm$ 0,000dA	***
R2/1	< 0,001	0,072 $\pm$ 0,038e	nz	< 0,001eB	0,161 $\pm$ 0,004efA	***
Z.	nz	***		**	***	

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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja); srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d,e,f,g) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med dodatki ekstraktov); 25 α -HC – 25 α -hidroksiholeserol; 20 α -HC – 20 α -hidroksiholeserol.

Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi glede **7β-HC**; takoj po izdelavi je bila njegova vsebnost v sekljancih največja v kontrolnem vzorcu (0,052 mg/100 g) in vzorcu z ekstraktom bora 1 (B1/3 0,065 mg/100 g), sledijo vzorci z dodanim ekstraktom bora 1 (B1/1 0,038 mg/100 g in B1/1 0,028 mg/100 g) in B2/3 (0,031 mg/100 g), bistveno manj pa v vzorcih z dodanim pknogenolom (0,017 mg/100 g) in ekstraktom različnih rožmarinov v obeh koncentracijah (0,004–0,016 mg/100 g). Po enem tednu skladiščenja (100 % kisik) sekljancev pa ugotavljamo, da značilno največ 7β-HC spet nastane v kontrolnem vzorcu (1,509 mg/100 g), sledijo vzorci z dodanimi ekstrakti bora (0,348–0,456 mg/100 g) in rožmarina (0,200–0,241 mg/100 g) v manjši koncentraciji, vzorci z dodanimi ekstrakti rožmarina in bora v večji koncentraciji (0,115–0,184 mg/100 g) ter vzorec z dodanim pknogenolom (0,040 mg/100 g).

V vzorcih, ki so vsebovali ekstrakt pknogenola, se je vsebnost 7β-HC po sedmih dneh skladiščenja v atmosferi kisika povečala za dvakrat, medtem ko se je pri kontrolnem vzorcu povečala kar za 29-krat. Tudi pri vzorcih, ki so vsebovali ekstrakte rožmarina in bora, se je vsebnost 7β-HC bistveno povečala. Vse razlike v vsebnosti 7β-HC v sveže pripravljenih in skladiščenih vzorcih so statistično značilne.

Preglednica 9: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na vsebnost 7β-hidroksiholesterola in 5α-C v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo n-3 maščobnih kislin (Duncanov test, α = 0,05)

Dodatek	Parameter (mg/100 g)					
	7β-HC			5α-C		
ekstrakt/čas	Takoj	7 dni	z.	Takoj	7 dni	z.
kontrola	0,052 ± 0,006baB	1,509 ± 0,073aA	**	0,113 ± 0,065B	1,567 ± 0,089aA	**
P/1	0,017 ± 0,004dfeB	0,040 ± 0,002gA	*	0,069 ± 0,044	0,076 ± 0,020f	nz
B1/1	0,038 ± 0,017bcB	0,348 ± 0,008cA	**	0,058 ± 0,011B	0,396 ± 0,053cA	*
B1/3	0,065 ± 0,013aB	0,153 ± 0,001efA	*	0,142 ± 0,030	0,200 ± 0,063ed	nz
B2/1	0,028 ± 0,006dceB	0,456 ± 0,002bA	***	0,081 ± 0,036B	0,509 ± 0,062bA	*
B2/3	0,031 ± 0,008dcB	0,184 ± 0,006eA	**	0,038 ± 0,001B	0,223 ± 0,015edA	**
R1/0,3	0,010 ± 0,000feB	0,200 ± 0,009edA	**	0,089 ± 0,013B	0,245 ± 0,014dA	**
R1/1	0,012 ± 0,001dfeB	0,115 ± 0,005fA	**	0,066 ± 0,063	0,129 ± 0,006ef	nz
R2/0,3	0,004 ± 0,002fB	0,241 ± 0,001dA	***	0,059 ± 0,012B	0,269 ± 0,020dA	**
R2/1	0,016 ± 0,006dfeB	0,168 ± 0,007efA	**	0,027 ± 0,007B	0,187 ± 0,011edA	**
Z.	***	***		nz	***	

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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja); srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d,e,f) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med dodatki ekstraktov); 7β-HC – 7β-hidroksiholesterol.

Takoj po izdelavi in toplotni obdelavi je bila vsebnost **5α-C** v sekljancih med 0,027–0,142 mg/100 g, razlike med vzorci z dodanimi različnimi ekstrakti in kontrolo so statistično neznačilne (preglednica 9). Po enem tednu skladiščenja (100 % kisik) sekljancev pa ugotavljamo, da značilno največ holestana nastane v kontrolnem vzorcu (1,567 mg/100 g), najmanj pa v vzorcu z dodanim pknogenolom (0,076 mg/100 g). Po vsebnosti holestana

kontrolnemu vzorcu sledijo vzorci z dodanimi ekstrakti bora (0,396–0,509 mg/100 g) in rožmarina (0,245–0,269 mg/100 g) v manjši koncentraciji ter vzorci z dodanimi ekstrakti rožmarina (0,129–0,187 mg/100 g) in bora (0,200–0,223 mg/100 g) v večji koncentraciji.

Preglednica 10: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na vsoto hidroksiholesterolov in vsebnost holesterola v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

Dodatek ekstrakt/čas	Parameter (mg/100 g)					
	vsota hidroksiholesterolov			holesterol		
	Takoj	7 dni	z.	Takoj	7 dni	z.
kontrola	0,215 ± 0,078abB	5,871 ± 0,311aA	**	63,891 ± 0,410	63,651 ± 0,751	nz
P/1	0,093 ± 0,051cB	1,076 ± 0,118cdA	**	63,565 ± 0,043	63,732 ± 0,549	nz
B1/1	0,129 ± 0,045bcB	1,912 ± 0,128bA	**	63,852 ± 0,148	64,062 ± 0,184	nz
B1/3	0,240 ± 0,059a	1,168 ± 0,368c	nz	63,250 ± 0,099	63,872 ± 0,222	nz
B2/1	0,132 ± 0,029bcB	1,772 ± 0,038bA	***	63,732 ± 0,343	64,086 ± 0,051	nz
B2/3	0,095 ± 0,020cB	1,020 ± 0,166cA	*	63,729 ± 0,388	63,264 ± 0,083	nz
R1/0,3	0,102 ± 0,012cB	0,731 ± 0,003deA	***	64,098 ± 0,091	63,713 ± 0,689	nz
R1/1	0,082 ± 0,062cB	0,425 ± 0,006eA	*	63,386 ± 0,073	63,533 ± 0,163	nz
R2/0,3	0,066 ± 0,015cB	0,814 ± 0,061cdeA	**	63,715 ± 0,116	63,642 ± 0,308	nz
R2/1	0,043 ± 0,013cB	0,589 ± 0,061eA	**	63,355 ± 0,092B	64,016 ± 0,020A	*
Z.	*	***		nz	nz	

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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja); srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d,e,f,g) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med dodatki ekstraktov).

Takoj po izdelavi je bila **vsota hidroksiholesterolov** v sekljancih največja v vzorcu B1/3 in kontrolnem vzorcu (0,240 mg/100 g in 0,215 mg/100 g) ter vzorcih z ekstraktom bora (B1/1 0,129 mg/100 g, B2/1 0,132 mg/100 g in B2/3 0,095 mg/100 g), pknogenola (0,093 mg/100 g) in ekstrakti različnih rožmarinov v dveh koncentracijah (0,043–0,102 mg/100 g) (preglednica 9). Po enem tednu skladiščenja (100 % kisik) sekljancev pa ugotavljamo, da značilno največ hidroksiholesterolov nastane v kontrolnem vzorcu (5,871 mg/100 g), sledijo vzorci z dodanimi ekstrakti bora (1,020–1,912 mg/100 g), vzorci z dodanim pknogenolom (1,076 mg/100 g) in vzorci z dodanimi ekstrakti rožmarina (0,425–0,814 mg/100 g).

V vzorcih, ki so vsebovali ekstrakt pknogenola, se je vsota hidroksiholesterolov po sedmih dneh skladiščenja v atmosferi kisika povečala za dvanajstkrat, medtem ko se je pri kontrolnem vzorcu povečala kar za 27-krat. Tudi pri vzorcih, ki so vsebovali ekstrakte rožmarina in bora, se je vsota hidroksiholesterolov bistveno povečala, za pet do petnajstkrat. Najbolj uspešni pri zaviranju oksidacije holesterola so ekstrakti rožmarina 1 v koncentraciji 1,0 ml in 0,3 ml in bora 1 v koncentraciji 3 ml, saj se je vsebnost hidroksiholesterolov v sekljancih po enem tednu povečala le za 5–7-krat. Ostali ekstrakti (B2/3 in B2/1, R2/1 in R2/0,3 ter B1/1) so po uspešnosti inhibicije oksidacije holesterola podobni pknogenolu, vsebnost hidroksiholesterolov se v sekljancih poveča za 11–15-krat.

Vsi dodani rastlinski ekstrakti so v določeni meri zavrli oksidacijo holesterola, vendar je potrebno upoštevati, da je tudi laneno olje, ki smo ga dodali v goveje sekljance, zelo podvrženo oksidaciji nenasičenih maščobnih kislin, ki jih olje vsebuje v velikem deležu.

V preglednici 10 sta prikazana tudi vpliva dodatka različnih rastlinskih ekstraktov v različnih koncentracijah in čas skladiščenja na vsebnost holesterola v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin. Povzamemo lahko, da sta oba vpliva statistično neznačilna, torej odstopanja v vsebnosti holesterola med vzorci so zgolj naključna, z izjemo vzorca R2/1, kjer se vsebnost holesterola med skladiščenjem značilno poveča za 0,6 mg/100 g.

V preglednici 11 so rezultati določanja hidroksiholesterolov v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin prikazani **v % od skupnega holesterola**. Ker pa se vsebnost holesterola med vzorci in med enotedenskim skladiščenjem ni spreminjala, lahko tako kot za vsoto hidroksiholesterolov v splošnem povzamemo, da dodatek rastlinskih ekstraktov rožmarina, bora in piknogenola značilno vpliva na delež hidroksiholesterolov v govejih sekljancih takoj po izdelavi ($p \leq 0,05$) kot tudi po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika ($p \leq 0,001$). Takoj po izdelavi je odstotek hidroksiholesterolov v sekljancih med 0,06–0,37 % preračunano na skupni holesterol, po enotedenskem skladiščenju pa med 0,66–8,44 %.

Preglednica 11: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na delež hidroksiholesterolov, preračunan na skupni holesterol (%), v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

Dodatek ekstrakt/čas	Parameter (%)		
	takoj	7 dni	z.
kontrola	0,33 ± 0,11abB	8,44 ± 0,31aA	***
P/1	0,14 ± 0,08cB	1,66 ± 0,19cdA	**
B1/1	0,20 ± 0,07bcB	2,89 ± 0,19bA	**
B1/3	0,37 ± 0,09a	1,79 ± 0,55c	nz
B2/1	0,20 ± 0,04bcB	2,69 ± 0,05bA	***
B2/3	0,14 ± 0,03cB	1,58 ± 0,25cdA	*
R1/0,3	0,15 ± 0,01cB	1,13 ± 0,00defA	***
R1/1	0,12 ± 0,09cB	0,66 ± 0,00fA	*
R2/0,3	0,10 ± 0,02cB	1,26 ± 0,08cdeA	**
R2/1	0,06 ± 0,02cB	0,91 ± 0,09efA	**
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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja); srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d,e,f) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med dodatki ekstraktov).

4.2 ŠTEVILO TBK

Preglednica 12 prikazuje rezultate in izračunane osnovne statistične parametre za število TBK v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin. Glede na visok koeficient variabilnosti (147 %) lahko sklepamo, da število TBK med vzorci močno variira, kar je po vsej verjetnosti posledica dodatka različnih vrst in koncentracij rastlinskih ekstraktov ter načina oz. časa skladiščenja.

Preglednica 12: Rezultati števila TBK v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin, izdelanih z različnimi dodatki rastlinskih ekstraktov, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 40)

Vrednost				
Povprečna	najmanjša	največja	so	KV (%)
5,35	0,24	24,84	7,88	147

n – število obravnavanj v poskusu, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

Preglednica 13: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na število TBK v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

Dodatek	pečeni tako po izdelavi	pečeni po 7-ih dneh skladiščenja	z.	pečeni tako po izdelavi	pečeni po 7-ih dneh skladiščenja	z.
+ trimesečno zamrzovanje (-18 °C)						
kontrola	1,65 ± 1,09B	14,8 ± 2,42aA	*	2,68 ±1,17cdB	21,2 ± 2,15cA	**
P/1	1,15 ± 0,10B	18,5 ± 0,71aA	***	5,12 ± 0,76bB	36,0 ± 1,66bA	**
B1/1	0,81 ± 0,54	5,22 ± 3,43b	nz	11,1 ± 1,55a	52,7 ± 16,1a	nz
B1/3	0,68 ± 0,62B	20,1 ± 6,75aA	*	3,41 ± 0,42cB	34,7 ± 1,68bA	**
B2/1	1,27 ± 0,88B	20,4 ± 2,65aA	*	3,53 ± 0,49cB	40,6 ± 0,39abA	***
B2/3	0,97 ± 0,20B	18,0 ± 3,96aA	*	2,37 ± 0,12cdeB	27,5 ± 5,21bcA	*
R1/0,3	0,46 ± 0,06	0,70 ± 0,06b	nz	1,61 ± 0,90de	1,15 ± 0,02d	nz
R1/1	0,28 ± 0,05	0,34 ± 0,02b	nz	0,75 ± 0,25e	1,85 ± 0,60d	nz
R2/0,3	0,47 ± 0,13	0,76 ± 0,06b	nz	3,05 ± 0,22cd	4,52 ± 3,84d	nz
R2/1	0,25 ± 0,02	0,32 ± 0,03b	nz	0,87 ± 0,23e	1,01 ± 0,27d	nz
z.	nz	***		***	***	

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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja); srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med dodatki ekstraktov); TBK – tiobarbiturna kislina.

Iz preglednice 13 je razvidno, da dodatek različnih rastlinskih ekstraktov v goveje sekljance s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin takoj po izdelavi ne vpliva statistično značilno ($p > 0,05$), po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika pa vpliva značilno ($p \leq 0,001$) na število TBK v toplotno obdelanih vzorcih.

Takoj po izdelavi in toplotni obdelavi je bilo število TBK v sekljancih med 0,25 in 1,65, razlike med vzorci z dodanimi različnimi ekstrakti in kontrolo so statistično neznailne (preglednica 13). Po enem tednu skladiščenja (100 % kisik) sekljancev pa ugotavljamo, da je značilno največje število TBK v vzorcih z dodanim ekstraktom skorje bora (B2/1, B1/3 in B2/3), sledi vzorec z dodanim ekstraktom pknogenola (18,5) in kontrolni vzorec (14,8), najmanj pa v vzorcih z dodanimi ekstrakti rožmarina (0,32-0,76). Med skladiščenjem v vseh vzorcih poteče oksidacija lipidov, oziroma števila TBK se povečajo, vendar so povečanja značilna pri kontrolnem vzorcu, vzorcu z dodanim pknogenolom in vzorcih z dodanimi ekstrakti skorje bora B1 v večji koncentraciji in bora B2 v obeh koncentracijah. Sklepamo lahko, da sta ekstrakta rožmarina R1 in R2 zelo dobra antioksidanta, ker sta med enotedenskim skladiščenjem v 100 % atmosferi kisika po vsej verjetnosti preprečila oksidacijo večkrat nenasičenih maščobnih kislin in posledično tvorbo malondialdehida. Med vsemi dodanimi ekstrakti so se za slabše izkazali predvsem vzorci bora, saj so očitno delovali že rahlo prooksidativno.

Po trimesečnem zamrzovanju homogeniziranih vzorcev smo analize ponovili in prišli do skoraj identičnih rezultatov, le da so števila bistveno večja (preglednica 13). Med vsemi dodanimi ekstrakti so zopet najslabšo antioksidativno aktivnost pokazali vzorci z dodanim ekstraktom bora in pknogenola, v primerjavi s kontrolnim (21,2) vzorcem so delovali močno prooksidativno (27,5-52,7).

4.3 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

Preglednica 14 prikazuje rezultate analize maščobnokislinske sestave govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri. Razvidno je, da največji % v povprečju predstavljajo VNMK, in sicer kar 55,73 %, sledijo jim ENMK s 27,42 % ter NMK s 16,85 %.

Med NMK sta najbolj zastopani palmitinska (C16:0), ki jo je v povprečju 8,94 % in oktadekanojska (C18:0) kislina, ki predstavlja 6,92 % vseh maščobnih kislin. Med ENMK je glavna (25,29 %) oleinska kislina (C18:1), linolne kisline (C18:2 *n*-6) je 11,88 %, α -linolenske kisline (C18:3 *n*-3) pa 42,6 % vseh VNMK. Velik delež linolne in α -linolenske maščobne kisline v govejih sekljancih lahko pripišemo dodatku lanenega olja, saj je le-ta bogat vir omenjenih maščobnih kislin.

Razmerje med *n*-6 in *n*-3 maščobnimi kislinami je iz prehranskega vidika zelo pomembno, saj naj bi pozitivno vplivalo na naše zdravje. Razmerje *n*-6/*n*-3 naj bi bilo okoli 5:1, v korist *n*-6 maščobnim kislinam. Z današnjim tempom in načinom življenja je to razmerje zelo težko doseči, zato se vrednosti le tega gibljejo tudi okoli 10:1, lahko pa tudi več. V povprečju je razmerje *n*-6/*n*-3 v naših govejih sekljancih zelo majhno, in sicer 0,29, zaradi povečane vsebnosti *n*-3 maščobnih kislin na račun dodanega lanenega olja.

V preglednici 14 je prikazano tudi razmerje P/S, ki pomeni razmerje med VNMK in NMK. Razmerje P/S nad 0,5 je ugodno. V naših govejih sekljancih je razmerje P/S v povprečju 3,36.

Preglednica 14: Rezultati maščobnokislinske sestave govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (*n* = 40)

Parameter (ut.% od SMK)	Vrednost			so	KV (%)
	povprečna	najmanjša	največja		
NMK	16,85	13,91	20,54	1,68	10
C 8:0	0,01	0,00	0,04	0,01	90
C 14:0	0,34	0,22	0,53	0,09	25
C 14:1 c9	0,12	0,08	0,18	0,03	25
C 15:0	0,10	0,08	0,16	0,02	20
C 15:1 c5	0,44	0,25	0,61	0,07	17
C 16:0 palmitinska MK	8,94	7,67	10,57	0,80	8,9
C 16:1 c9	0,15	0,12	0,21	0,03	17
C 16:1 t9	0,53	0,36	0,78	0,11	21
C 17:0	0,27	0,19	0,37	0,05	19
C 17:1 t9	0,38	0,16	0,58	0,11	28
C 17:1 c9	0,25	0,10	0,38	0,07	28
C 18:0 oktadekanojska MK	6,92	5,37	8,69	0,85	12
C 18:1 oleinska MK	25,29	22,47	28,51	1,34	5,3
C 18:2 cc linolna MK	11,88	10,71	12,97	0,55	4,6
C 20:0	0,32	0,28	0,35	0,02	4,8
C 18:3 c9,12,15 α -linolenska MK	42,59	36,66	47,57	2,81	6,6
C 20:1 c11	0,19	0,00	0,25	0,06	29
C 20:4 & C 20:3	0,64	0,51	0,79	0,07	11
C 22:5 c10,13,16,19	0,17	0,13	0,21	0,02	12
NMK	16,85	13,91	20,54	1,68	10
ENMK	27,42	24,38	31,25	1,61	5,9
VNMK	55,73	48,69	61,70	3,26	5,8
C 18:1	25,29	22,47	28,51	1,34	5,3
<i>n</i> -6	12,55	11,32	13,76	0,56	4,5
<i>n</i> -3	42,93	36,82	47,72	2,81	6,5
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	0,29	0,27	0,32	0,01	3,3
P/S	3,36	2,38	4,43	0,52	16

n – število obravnavanj v poskusu, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti; nasičene maščobne kisline – NMK: C8:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0; enkrat nenasičene maščobne kisline – ENMK: C14:1 c9, C15:1 c5, C16:1 c9, C16:1 t-9, C17:1 c9, C17:1 t9, C18:1 c9, C18:1 c11, C20:1 c11; večkrat nenasičene maščobne kisline – VNMK: C18:2 cc, C18:3 c9,12,15, C20:4 in C20:3, C22:5 c 10,13,16,19; NMK – nasičene maščobne kisline, ENMK – enkrat nenasičene maščobne kisline, VNMK – večkrat nenasičene maščobne kisline, *n*-6/*n*-3 – razmerje med *n*-6 in *n*-3 maščobnimi kislinami; P/S = VNMK/NMK

V preglednicah 14 in 15 je prikazan vpliv skladiščenja na maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin. Na splošno dodatek rastlinskih ekstraktov ne vpliva ($p > 0,05$) na maščobnokislinsko sestavo obdelanih govejih sekljancev, zato v preglednicah ta vpliv ni posebej prikazan.

Preglednica 15: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

MK	C8:0			C14:0			C 14:1		
ekstrakt/čas	takoj	1 teden	z.	Takoj	1 teden	z.	takoj	1 teden	z.
kontrola	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,00	nz	0,33 ± 0,12	0,33 ± 0,15	nz	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,06	nz
P/1	0,02 ± 0,01A	< 0,01B	*	0,30 ± 0,05	0,33 ± 0,03	nz	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,02	nz
B1/1	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,02	nz	0,38 ± 0,12	0,40 ± 0,13	nz	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,04	nz
B1/3	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02	nz	0,31 ± 0,08	0,38 ± 0,08	nz	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,03	nz
B2/1	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	nz	0,32 ± 0,08	0,35 ± 0,13	nz	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03	nz
B2/3	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,01	nz	0,35 ± 0,09	0,36 ± 0,17	nz	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,06	nz
R1/0,3	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	nz	0,33 ± 0,09	0,28 ± 0,07	nz	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,02	nz
R1/1	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	nz	0,41 ± 0,17	0,33 ± 0,01	nz	0,14 ± 0,06	0,11 ± 0,00	nz
R2/0,3	0,02 ± 0,00A	< 0,01B	*	0,25 ± 0,03	0,33 ± 0,03	nz	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,00	nz
R2/1	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,00		0,44 ± 0,13	0,32 ± 0,08	nz			
ekstrakt/MK	C 15:0			C 15:1			C 16:0		
kontrola	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,03	nz	0,49 ± 0,03	0,32 ± 0,11	nz	8,84 ± 1,27	9,13 ± 1,32	nz
P/1	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	nz	0,48 ± 0,12	0,53 ± 0,05	nz	8,59 ± 0,48	8,94 ± 0,18	nz
B1/1	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,03	nz	0,41 ± 0,00	0,49 ± 0,03	nz	8,92 ± 1,08	9,85 ± 0,94	nz
B1/3	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,01	nz	0,47 ± 0,01	0,42 ± 0,04	nz	8,42 ± 1,06	9,50 ± 0,51	nz
B2/1	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	nz	0,48 ± 0,02	0,42 ± 0,01	nz	8,78 ± 0,75	9,24 ± 1,07	nz
B2/3	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03	nz	0,38 ± 0,04	0,40 ± 0,06	nz	8,80 ± 0,65	9,40 ± 1,65	nz
R1/0,3	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,02	nz	0,42 ± 0,06	0,47 ± 0,20	nz	8,50 ± 0,71	8,42 ± 0,64	nz
R1/1	0,12 ± 0,05	0,10 ± 0,00	nz	0,40 ± 0,08	0,48 ± 0,07	nz	9,44 ± 1,35	8,78 ± 0,02	nz
R2/0,3	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	nz	0,48 ± 0,08	0,47 ± 0,06	nz	7,93 ± 0,20	8,83 ± 0,26	nz
R2/1	0,13 ± 0,04	0,10 ± 0,02	nz	0,38 ± 0,11	0,40 ± 0,04	nz	9,76 ± 0,89	8,72 ± 0,70	nz
ekstrakt/MK	C 16:1 c			C 16:1 trans			C 17:0		
kontrola	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,04	nz	0,54 ± 0,13	0,59 ± 0,23	nz	0,26 ± 0,08	0,26 ± 0,09	nz
P/1	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,01	nz	0,46 ± 0,11	0,48 ± 0,06	nz	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,00	nz
B1/1	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,04	nz	0,55 ± 0,11	0,63 ± 0,13	nz	0,27 ± 0,08	0,32 ± 0,07	nz
B1/3	0,14 ± 0,03	0,16 ± 0,02	nz	0,50 ± 0,11	0,63 ± 0,07	nz	0,24 ± 0,06	0,29 ± 0,03	nz
B2/1	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,03	nz	0,52 ± 0,08	0,62 ± 0,17	nz	0,25 ± 0,04	0,27 ± 0,06	nz
B2/3	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,06	nz	0,55 ± 0,14	0,62 ± 0,23	nz	0,25 ± 0,04	0,28 ± 0,10	nz
R1/0,3	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	nz	0,49 ± 0,16	0,43 ± 0,10	nz	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,05	nz
R1/1	0,17 ± 0,05	0,15 ± 0,01	nz	0,58 ± 0,14	0,48 ± 0,03	nz	0,29 ± 0,10	0,27 ± 0,01	nz
R2/0,3	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,02	nz	0,40 ± 0,03B	0,49 ± 0,01A	*	0,21 ± 0,02	0,27 ± 0,02	nz
R2/1	0,18 ± 0,03	0,15 ± 0,03	nz	0,61 ± 0,09	0,48 ± 0,08	nz	0,32 ± 0,07	0,26 ± 0,05	nz

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 15: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

MK	C 17:1 t9			C 17:1 c9			C 18:0		
rastlinski ekstrakt	takoj	1 teden	z.	takoj	1 teden	z.	6,47 ± 1,42	8,15 ± 0,77	nz
kontrola	0,46 ± 0,13	0,27 ± 0,16	nz	0,25 ± 0,09	0,23 ± 0,14	nz	6,60 ± 0,21	7,41 ± 0,26	nz
P/1	0,39 ± 0,21	0,49 ± 0,12	nz	0,23 ± 0,04	0,28 ± 0,04	nz	6,08 ± 0,51	6,64 ± 0,54	nz
B1/1	0,36 ± 0,06	0,45 ± 0,05	nz	0,21 ± 0,13	0,33 ± 0,04	nz	6,27 ± 1,27	7,67 ± 0,12	nz
B1/3	0,43 ± 0,05	0,39 ± 0,12	nz	0,25 ± 0,08	0,30 ± 0,02	nz	6,71 ± 0,77	7,08 ± 0,94	nz
B2/1	0,45 ± 0,02	0,38 ± 0,05	nz	0,21 ± 0,14	0,28 ± 0,06	nz	6,37 ± 0,21	7,31 ± 1,26	nz
B2/3	0,29 ± 0,10	0,35 ± 0,13	nz	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,12	nz	6,62 ± 1,50	7,06 ± 1,15	nz
R1/0,3	0,35 ± 0,14	0,40 ± 0,26	nz	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,09	nz	7,15 ± 1,37	7,23 ± 0,52	nz
R1/1	0,32 ± 0,14	0,43 ± 0,11	nz	0,28 ± 0,08	0,24 ± 0,01	nz	5,77 ± 0,37B	7,17 ± 0,14A	*
R2/0,3	0,37 ± 0,04	0,44 ± 0,09	nz	0,15 ± 0,07	0,25 ± 0,02	nz	7,56 ± 0,78	7,06 ± 0,70	nz
R2/1	0,31 ± 0,16	0,34 ± 0,12	nz	0,30 ± 0,05	0,25 ± 0,06	nz			
ekstrakt/MK	C 18:1			C 18:2 cc			C 20:0		
kontrola	25,31±1,91	26,56±2,02	nz	12,15 ± 0,70	11,67 ± 0,97	nz	0,31 ± 0,00	0,32 ± 0,01	nz
P/1	24,67±0,53	25,34±0,03	nz	12,14 ± 0,06	11,92 ± 0,06	nz	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	nz
B1/1	24,67±1,59	26,94±1,23	z.	11,92 ± 0,73	11,65 ± 0,98	nz	0,30 ± 0,01	0,33 ± 0,00	nz
B1/3	24,09±2,29	26,73±0,13	nz	12,30 ± 0,92	11,45 ± 0,35	nz	0,32 ± 0,00B	0,33 ± 0,00A	*
B2/1	25,26±0,86	26,45±1,27	nz	11,95 ± 0,67	11,64 ± 0,85	nz	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	nz
B2/3	24,99±1,02	26,91±2,27	nz	11,90 ± 0,50	11,46 ± 1,06	nz	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,02	nz
R1/0,3	24,15±0,36	24,61±0,72	nz	12,10 ± 0,06	12,25 ± 0,28	nz	0,31 ± 0,05	0,34 ± 0,00	nz
R1/1	23,91±0,58	25,15±0,06	nz	11,70 ± 0,87	11,80 ± 0,10	nz	0,29 ± 0,00B	0,33 ± 0,01A	*
R2/0,3	23,37±0,65	25,34±0,19	nz	12,54 ± 0,60	11,76 ± 0,11	nz	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,00	nz
R2/1	26,22±0,50	25,21±0,75	nz	11,46 ± 0,52	11,79 ± 0,49	nz	0,30 ± 0,00B	0,33 ± 0,00A	**
ekstrakt/MK	C18:3c9,12,15			C 20:1 c11			C20:4&C20:3		
kontrola	42,73 ± 4,65	41,51 ± 4,55	nz	0,17 ± 0,02	0,23 ± 0,01a	nz	0,71 ± 0,00A	0,53 ± 0,03B	*
P/1	43,79 ± 1,59	41,81 ± 0,02	nz	0,16 ± 0,06	0,22 ± 0,01ba	nz	0,69 ± 0,12	0,67 ± 0,07	nz
B1/1	43,94 ± 4,27	38,60 ± 2,52	nz	0,10 ± 0,15	0,23 ± 0,01a	nz	0,63 ± 0,03	0,58 ± 0,00	nz
B1/3	44,60 ± 4,20	40,15 ± 0,83	nz	0,19 ± 0,03	0,23 ± 0,02a	nz	0,66 ± 0,02	0,56 ± 0,06	nz
B2/1	43,09 ± 2,22	41,30 ± 3,03	nz	0,17 ± 0,07	0,23 ± 0,01a	nz	0,67 ± 0,03A	0,54 ± 0,00B	*
B2/3	43,90 ± 1,58	40,47 ± 5,39	nz	0,21 ± 0,00	0,23 ± 0,01a	nz	0,65 ± 0,03	0,57 ± 0,05	nz
R1/0,3	45,18 ± 0,78	43,79 ± 2,23	nz	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,05b	nz	0,66 ± 0,07	0,72 ± 0,07	nz
R1/1	41,77 ± 4,29	42,66 ± 0,26	nz	0,17 ± 0,05	0,22 ± 0,02ba	nz	0,70 ± 0,06	0,65 ± 0,05	nz
R2/0,3	46,68 ± 0,62A	42,64 ± 0,78B *		0,09 ± 0,13	0,22 ± 0,01a	nz	0,70 ± 0,13	0,63 ± 0,07	nz
R2/1	40,38 ± 2,32	42,87 ± 2,02	nz	0,20 ± 0,08	0,21 ± 0,00ba	nz	0,67 ± 0,02	0,64 ± 0,01	nz

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 15: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n-3* maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

MK	C22:5c10,13,16,19		NMK		ENMK		
ekstrakt/čas	Takoj	1 teden	z. Takoj	1 teden	z. takoj	1 teden	z.
kontrola	0,19 ± 0,00A	0,14 ± 0,01bB *	16,50 ± 3,00	17,28 ± 2,68	nz 27,51 ± 2,31	28,50 ± 2,72	nz
P/1	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,03ba	nz 16,32 ± 0,57	17,56 ± 0,30	nz 26,66 ± 0,96	27,93 ± 0,15	nz
B1/1	0,16 ± 0,00	0,15 ± 0,01ba	nz 16,49 ± 2,78	19,19 ± 1,91	nz 26,59 ± 2,12	29,42 ± 1,51	nz
B1/3	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,02b	nz 15,69 ± 2,50	18,34 ± 0,69	nz 26,24 ± 2,63	29,01 ± 0,37	nz
B2/1	0,18 ± 0,00	0,14 ± 0,01b	nz 16,51 ± 1,69	17,42 ± 2,20	nz 27,35 ± 1,15	28,67 ± 1,56	nz
B2/3	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,02ba	nz 16,52 ± 1,33	17,81 ± 3,18	nz 27,09 ± 1,43	29,16 ± 2,95	nz
R1/0,3	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02a	nz 15,58 ± 0,28	16,18 ± 1,05	nz 26,09 ± 0,41	26,59 ± 1,33	nz
R1/1	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02ba	nz 15,31 ± 0,50	17,07 ± 0,57	nz 25,68 ± 0,55	27,33 ± 0,14	nz
R2/0,3	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,03ba	nz 14,63 ± 0,65	17,04 ± 0,45	nz 25,09 ± 0,74B	27,78 ± 0,04A *	
R2/1	0,18 ± 0,00	0,17 ± 0,01ba	nz 18,60 ± 1,87	16,96 ± 1,36	nz 28,37 ± 0,88	27,26 ± 1,08	nz
ekstrakt/MK	VNMK		<i>n-6</i>		<i>n-3</i>		
kontrola	56,00 ± 5,31	54,22 ± 5,40	nz 12,86 ± 0,71	12,19 ± 1,01	nz 42,92 ± 4,65	41,65 ± 4,56	nz
P/1	57,03 ± 1,53	54,52 ± 0,44	nz 12,83 ± 0,06A	12,59 ± 0,00B *	43,97 ± 1,56	41,99 ± 0,01	nz
B1/1	56,92 ± 4,89	51,39 ± 3,42	nz 12,55 ± 0,75	12,23 ± 0,97	nz 44,11 ± 4,27	38,75 ± 2,51	nz
B1/3	58,07 ± 5,14	52,65 ± 1,06	nz 12,95 ± 0,90	12,02 ± 0,29	nz 44,76 ± 4,19	40,30 ± 0,81	nz
B2/1	56,14 ± 2,84	53,91 ± 3,77	nz 12,63 ± 0,70	12,18 ± 0,85	nz 43,27 ± 2,22	41,44 ± 3,02	nz
B2/3	56,39 ± 2,76	53,03 ± 6,14	nz 12,62 ± 0,43	12,03 ± 1,00	nz 43,50 ± 2,40	40,62 ± 5,37	nz
R1/0,3	58,33 ± 0,69	57,22 ± 2,37	nz 12,76 ± 0,01	12,97 ± 0,21	nz 45,35 ± 0,77	43,98 ± 2,21	nz
R1/1	59,01 ± 1,05	55,60 ± 0,44	nz 13,00 ± 0,08A	12,45 ± 0,15B *	45,83 ± 1,17	42,83 ± 0,28	nz
R2/0,3	60,28 ± 1,39A	55,18 ± 0,41B *	13,24 ± 0,73	12,39 ± 0,03	nz 46,87 ± 0,65A	42,81 ± 0,76B *	
R2/1	53,04 ± 2,75	55,78 ± 2,43	nz 12,13 ± 0,54	12,42 ± 0,50	nz 40,56 ± 2,33	43,04 ± 2,01	nz
ekstrakt/MK	<i>n-6/n-3</i>		P/S				
kontrola	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,01	nz 3,48 ± 0,96	3,20 ± 0,81	nz		
P/1	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,00	nz 3,50 ± 0,22	3,11 ± 0,08	nz		
B1/1	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,00	nz 3,53 ± 0,89	2,70 ± 0,45	nz		
B1/3	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,00	nz 3,78 ± 0,93	2,87 ± 0,17	nz		
B2/1	0,29 ± 0,00	0,29 ± 0,00	nz 3,43 ± 0,52	3,13 ± 0,61	nz		
B2/3	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	nz 3,43 ± 0,44	3,06 ± 0,89	nz		
R1/0,3	0,28 ± 0,00	0,30 ± 0,01	nz 3,74 ± 0,11	3,55 ± 0,38	nz		
R1/1	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,00	nz 3,86 ± 0,20	3,26 ± 0,14	nz		
R2/0,3	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,00	nz 4,13 ± 0,28	3,24 ± 0,11	nz		
R2/1	0,30 ± 0,00	0,29 ± 0,00	nz 2,87 ± 0,44	3,31 ± 0,41	nz		

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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$).

4.4 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE

V preglednici 16 so podani rezultati senzorične analize govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin, 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 koeficient variabilnosti med 33 % in 44 %. Tako velika variabilnost ni samo posledica neusklajenosti ocenjevalcev, temveč izvira iz narave poskusa, saj smo v sekljance dodali tri različne ekstrakte oz. rastlinske izvlečke v zelo različnih koncentracijah. Tudi ocene za barvo presnega mesa so zelo variirale (22 %), kar je posledica dejstva, da so nekateri dodatki preprečili oksidacijo barve, drugi pa so delovali nasprotno, celo prooksidativno in so povzročili oksidacijo mesnega barvila na površini.

Preglednica 16: Rezultati senzorične analize govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 MK, izdelanih z različnimi dodatki ekstraktov z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri (n = 120)

Lastnost (točke)	Vrednost			so	KV (%)
	povprečna	najmanjša	največja		
barva presno (1-7)	3,9	1,0	6,0	0,8	22
barva TO (1-7)	5,4	4,0	6,0	0,5	8
tuji vonji (1-7)	3,0	1,5	6,0	1,1	35
vonj po postanem (1-7)	1,3	1,0	3,0	0,5	38
tuje arome (1-7)	3,5	1,5	6,0	1,2	33
aroma po postanem (1-7)	1,5	1,0	3,5	0,6	44

n – število obravnavanj v poskusu, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

Dodajanje ekstraktov vpliva značilno na barvo toplotno obdelanih sekljancev ($p \leq 0,001$) in tuje arome ($p \leq 0,05$), ne vpliva pa na vonj po postanem. **Skladiščenje** značilno vpliva na barvo po toplotni obdelavi, vonj in aromo po postanem ($p \leq 0,001$), ne vpliva pa na barvo presnih sekljancev in pojav tujih vonjev in arom (podatki niso prikazani v preglednicah).

Preglednice 17, 18 in 19 natančneje prikazujejo vpliv vrste in količine dodanih ekstraktov ter skladiščenja na senzorično kakovost govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin.

Iz preglednice 17 je razvidno, da **dodatek rastlinskih ekstraktov** in čistega piknogenola ne vpliva na barvo presnih sekljancev, ki je ocenjena z enakim številom točk kot kontrolni vzorec. Na površini presnih vzorcev vseh skupin so ocenjevalci barvo ovrednotili kot rožnato-sivo z oceno 4 točke. Optimalno barvo presnih govejih sekljancev smo smatrali kot rožnato-sivo barvo, brez oksidirane pigmenta. Po enem tednu v 100 % atmosferi kisika in v hladilniku pri temperaturi 4 °C so imeli presni sekljanci zelo različno barvo. Najslabšo je imel kontrolni vzorec (5,5 točke) in je bil na površini popolnoma oksidiran, dokaj temno sivo-rjave barve (slika 11). Barvo, kot ob izdelavi, so ohranili vzorci z dodanim ekstraktom borovega lubja (koncentracija in vrsta bora ne vplivata značilno),

vendar pa je boljša kot pri kontrolnem vzorcu. V primerjavi s kontrolnim vzorcem in vzorci z ekstraktom borovega lubja so vzorci z dodanim rožmarinom R1/1, R1/0,3 in R2/0,3 bolj rožnate barve, s komaj vidnim slojem oksidirane barvila. Med vsemi dodatki rožmarina se je za značilno slabšo izkazal dodatek R2/1, ki je mogoče deloval na barvo že rahlo prooksidativno.



Slika 11: Barva presnih govejih sekljancev dodanimi različnimi dodatki rastlinskih ekstraktov po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika in v hladilniku pri temperaturi 4 °C (1 – R1/1, 2 – R1/0,3, 3 – B1/3, 4 – B1/1, 5 – R2/1, 6 – P/1, 7 – R2/0,3, 8 – B2/1, 9 – kontrola, 10 – B2/3)

Preglednica 17: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na senzorično oceno barve presnih in toplotno obdelanih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo n -3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

Rastlinski ekstrakt	Parameter (točke)						
	barva presno (1-4-7)			barva TO (1-7)			
	Čas	Takoj	7 dni	z.	takoj	7 dni	z.
Kontrola		4,0 ± 0,0B	5,5 ± 0,5aA	***	6,0 ± 0,0Aa	5,5 ± 0,3Babc	**
P/1		4,0 ± 0,0	3,8 ± 0,8b	nz	5,7 ± 0,3Ab	5,3 ± 0,3Bbcde	***
B1/1		4,0 ± 0B	4,3 ± 0,3bA	*	5,5 ± 0Ac	4,9 ± 0,7Bde	*
B1/3		4,0 ± 0B	4,3 ± 0,3bA	*	5,5 ± 0Ac	4,8 ± 0,8Be	*
B2/1		4,0 ± 0	4,0 ± 0,5b	nz	5,6 ± 0,2Abc	5,2 ± 0,4Bcde	*
B2/3		4,0 ± 0B	4,3 ± 0,3bA	*	5,5 ± 0Ac	4,8 ± 0,8Bde	*
R1/0,3		4,0 ± 0,0	3,3 ± 1,4dc	nz	5,5 ± 0,0c	5,3 ± 0,3abc	nz
R1/1		4,0 ± 0,0	2,8 ± 1,9d	nz	5,5 ± 0,0c	5,7 ± 0,3ab	nz
R2/0,3		4,0 ± 0,0	3,0 ± 1,6d	nz	5,6 ± 0,2Abc	5,1 ± 0,5Bcde	*
R2/1		4,0 ± 0,0	3,8 ± 0,8bc	nz	5,5 ± 0,0Bc	5,8 ± 0,3Aa	*
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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja); srednje vrednosti z različno črko

(a,b,c,d,e) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med dodatki ekstraktov).

Optimalno barvo presnih govejih sekljancev so senzorični preskuševalci opisali kot rožnato-sivo z oceno 4 točke. Po enem tednu skladiščenja v atmosferi s 100 % O₂ se je za optimalno barvo smatrala rožnato-siva barva brez vidnega oksidiranega pigmenta (pod 4 točke).

Optimalno barvo toplotno obdelanih govejih sekljancev so senzorični preskuševalci opisali kot sivo-rjavo barvo z oceno 4 točke.

Preglednica 18 prikazuje vpliv dodanih ekstraktov in časa skladiščenja na senzorično oceno vonja obdelanih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin. Dodani rastlinski ekstrakti so vplivali statistično neznačilno ($p > 0,05$) na tuje vonje, le-te so preskuševalci definirali kot vonj po žarkem. Tuje vonje so preskuševalci zaznali tudi po enotedenskem skladiščenju, tako da lahko sklepamo, da na tuje vonje vpliva tako dodatek ekstraktov (ekstrakta rožmarina, skorje bora ter piknogenola) kot tudi skladiščenje. V primeru sekljancev R2/1 tuji vonji po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika niso prevladovali, lastnost je bila za 1,3 točke bolje ocenjena. Podobno so preskuševalci ugotovili tudi pri sekljancih R1/1.

Dodatek rastlinskih ekstraktov ne vpliva statistično značilno na vonj po postanem v takoj pečenih sekljancih, kar je razvidno iz preglednice 18. Pri skladiščenih vzorcih po enem tednu v 100 % atmosferi s kisikom je bil vonj po postanem rahlo zaznaven, predvsem pri vzorcih B2/1 (2,1 točke), kontroli (1,8 točke), R2/1 (1,8 točke) in B1/3 (1,7 točke).

Preglednica 18: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na senzorično oceno vonja obdelanih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

Dodatek	Parameter (točke)					
	tuji vonji (1-7)			vonj po postanem (1-7)		
čas	takoj	7 dni	z.	takoj	7 dni	z.
kontrola	2,8 ± 1,1	2,5 ± 0,8	nz	1,0 ± 0,0B	1,8 ± 0,6A	*
P/1	3,4 ± 1,1	2,8 ± 0,7	nz	1,0 ± 0,0B	1,5 ± 0,4A	*
B1/1	2,0 ± 0,3	2,8 ± 0,9	nz	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4	nz
B1/3	3,1 ± 1,0	3,3 ± 0,5	nz	1,0 ± 0,0B	1,7 ± 0,5A	*
B2/1	3,7 ± 1,2	3,8 ± 1,2	nz	1,0 ± 0,0B	2,1 ± 0,8A	**
B2/3	2,7 ± 1,2	3,8 ± 1,3	nz	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,6	nz
R1/0,3	2,8 ± 1,1	2,4 ± 0,2	nz	1,0 ± 0,0B	1,5 ± 0,3A	**
R1/1	3,3 ± 1,1	2,6 ± 0,6	nz	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4	nz
R2/0,3	2,3 ± 1,0	3,2 ± 1,4	nz	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8	nz
R2/1	4,0 ± 1,6	2,7 ± 0,5	nz	1,0 ± 0,0B	1,8 ± 0,4A	**
z.	nz	nz	-	nz		

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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja).

Preglednica 19 prikazuje vpliv vrste dodanih ekstraktov in skladiščenja na senzorično oceno arome toplotno obdelanih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin. Preskuševalci so tuje arome zaznali na vseh vzorcih, najbolj pa v vzorcih B1/3 (4,5 točke), R1/1 (4,3 točke), B2/3 (4,1 točke) in B2/1 (4,0 točke), razlike med vzorci so statistično značilne. Sklepamo lahko, da večje koncentracije rastlinskih ekstraktov na vzorcih povzročajo izrazitejšo tujo aromo. Pri vzorcu R1/1 je potrebno poudariti, da v goveji sekljanec nismo dodali soli (nenamerno), zato je po vsej verjetnosti prišlo tudi do drugačne, neizrazite, mogoče tudi tuje arome. Pri vzorcu B1/1 so ocenjevalci zaznali žarko aromo.

Tudi po skladiščenju v 100 % atmosferi kisika po enem tednu so preskuševalci zaznali tujo aromo, predvsem pri vzorcih B2/1, B1/3, R1/1, R2/1 in kontroli. Povzamemo lahko, da večje koncentracije rastlinskih ekstraktov negativno vplivajo na aromo govejih sekljancev.

Iz preglednice 19 je razvidno, da ekstrakti rožmarina in skorje bora ne vplivajo na aromo po postanem toplotno obdelanih govejih sekljancev takoj po izdelavi. Po enem tednu skladiščenja v atmosferi kisika in v hladilniku pri temperaturi 4 °C so preskuševalci zaznali zelo izrazito aromo po postanem, predvsem pri vzorcih B2/1 (za 1,6 točke), kontroli (za 1,4 točke) in B1/3 (za 1,3 točke).

Preglednica 19: Vpliv dodanih rastlinskih ekstraktov in skladiščenja na senzorično oceno arome obdelanih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin (Duncanov test, $\alpha = 0,05$)

Dodatek	Parameter (točke)					
	tuje arome (1-7)			aroma po postanem (1-7)		
	Takoj	7 dni	z.	takoj	7 dni	z.
kontrola	3,1 ± 1,2abc	3,9 ± 1,0	nz	1,0 ± 0,0B	2,4 ± 0,6Aab	***
P/1	3,2 ± 0,9abc	2,9 ± 1,1	nz	1,0 ± 0,0B	1,9 ± 0,6Aabcd	**
B1/1	2,7 ± 1,0bc	3,2 ± 1,6	nz	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5d	nz
B1/3	4,5 ± 0,5a	4,0 ± 1,2	nz	1,0 ± 0,0B	2,3 ± 0,4Aabc	***
B2/1	4,0 ± 1,0ab	4,2 ± 0,7	nz	1,0 ± 0,0B	2,6 ± 0,7Aa	***
B2/3	4,1 ± 0,9a	3,4 ± 0,7	nz	1,0 ± 0,0B	2,0 ± 0,6Aabc	**
R1/0,3	3,2 ± 1,1abc	2,8 ± 0,8	nz	1,0 ± 0,0B	1,4 ± 0,4Ad	*
R1/1	4,3 ± 1,1a	4,1 ± 0,7	nz	1,0 ± 0,0B	1,7 ± 0,4Adc	**
R2/0,3	2,5 ± 1,3c	2,8 ± 1,4	nz	1,0 ± 0,0B	1,7 ± 0,6Adc	**
R2/1	4,2 ± 1,2a	4,0 ± 1,0	nz	1,0 ± 0,0B	1,8 ± 0,5Adc	**
Z.	*	nz	-		***	

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; nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A,B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik časi skladiščenja); srednje vrednosti z različno črko (a,b,c,d) znotraj stolpca se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med dodatki ekstraktov).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naloge je bil ugotoviti vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov rožmarina, skorje črnega bora (v dveh različnih koncentracijah) ter piknogenola na preprečevanje oksidacije govejih sekljancev, ki smo jim kot vir *n*-3 maščobnih kislin dodali laneno olje. Spremljali smo tudi, kako skladiščenje govejih sekljancev v 100 % atmosferi kisika vpliva na oksidacijo holesterola in lipidov. Polovico govejih sekljancev smo takoj po dodatku ekstraktov (rožmarina, skorje črnega bora ali piknogenola) toplotno obdelali in jih senzorično in kemijsko analizirali. Drugo polovico sekljancev smo zapakirali v 100 % atmosfero kisika, jih en teden hranili pri temperaturi hladilnika ter nato po toplotni obdelavi tudi senzorično in kemijsko analizirali. Senzorični preskuševalci so ocenili barvo presnega in toplotno obdelanega mesa, vonj in aromo toplotno obdelanih sekljancev. Od kemijskih analiz smo opravili analize vsebnosti holesterola, hidroksiholesterolov in malondialdehida (število TBK) ter določili maščobnokislinsko sestavo.

V zadnjih desetih letih je med potrošniki vse več zanimanja za *n*-3 maščobne kisline, saj je bilo že večkrat dokazano, da pozitivno delujejo na človeško telo. Imajo pa to slabost, da so zelo podvržene oksidaciji. Oksidaciji je podvržen tudi holesterol, pri čemer nastanejo oksidi holesterola, ki prav tako lahko negativno vplivajo na zdravstveno stanje ljudi, saj povzročajo civilizacijske bolezni, kot so ateroskleroza in razna rakasta obolenja. Poleg tega oksidacija negativno vpliva tudi na izgled, predvsem barvo in pa aromo določenega izdelka. Znano je, da je barva svežega mesa najpomembnejša lastnost, ki vpliva na potrošnikovo odločitev za nakup (Sánchez-Escalante in sod., 2001). Z dodatkom različnih rastlinskih ekstraktov (antioksidanti) lahko omejimo negativne učinke oksidacije na mesu oz. mesnih izdelkih. Potrošniki raje izbirajo izdelke z dodanimi naravnimi antioksidanti, ki po njihovem mnenju v primerjavi s sintetičnimi antioksidanti nimajo stranskih učinkov na naše telo. Poleg tega so naravni rastlinski ekstrakti bogat vir polifenolov in imajo specifično aromo. Antioksidanti lahko v večji meri preprečijo oksidacijo in posledično ohranijo hranilne komponente v mesu ter zvišajo hranilno vrednost nutrientov. Kot zdravo alternativo sintetičnim antioksidantom smo v goveje sekljance dodajali različne koncentracije rastlinskih ekstraktov rožmarina in skorje črnega bora, saj tako za rožmarin kot skorjo bora velja, da sta zelo močna antioksidanta. Za pozitivno kontrolo smo uporabili piknogenol, standardiziran rastlinski ekstrakt, pridobljen iz skorje francoskega obmorskega bora, ki je bogat vir polifenolov.

5.1.1 Vsebnost holesterola in hidroksiholesterolov

Pri živilih, ki so bila izpostavljena visokim temperaturam, se vsebnost hidroksiholesterolov poveča (Boselli in sod., 2001). Dovzetnost za oksidacijo je namreč odvisna od razmerja nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin v živilu. Tako zaradi velike vsebnosti *n*-3 maščobnih kislin najhitreje oksidirajo ribe, sledijo pa jim perutninsko, prašičje, goveje in ovčje meso (Brown in Jessup, 1999). Predvideli smo obsežno oksidacijo v vzorcih govejih sekljancev, obogatenih z *n*-3 maščobnimi kislinami. Zato smo v goveje sekljance s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin dodali različne ekstrakte in določili vsebnost

hidroksiholesterolov, saj smo predvidevali, da bodo ekstrakti rožmarina, skorje bora ter piknogenola preprečili ali vsaj v večji meri omilili oksidacijo maščob ter posledično tvorbo hidroksiholesterolov. Znanstveniki ugotavljajo, da se v določenih jedeh holesterol lahko nahaja od 1 % do 10 % v obliki oksidov (Hur in sod., 2006). V naši raziskavi pa smo po izdelavi in toplotni obdelavi sekljancev v njih določili med 0,06–0,37 % hidroksiholesterolov preračunano na skupni holesterol, po enotedenskem skladiščenju pa med 0,66–8,44 %. Največ hidroksiholesterolov takoj po izdelavi ali pa po enem tednu skladiščenja v 100 % atmosferi kisika nastane kontrolnem vzorcu (0,33–8,33 %), sledijo vzorci z dodanimi ekstrakti bora (0,14–2,89 %), vzorci z dodanim piknogenolom (0,14–1,66 %) in vzorci z dodanimi ekstrakti rožmarina (0,06–0,66 %).

20 α -hidroksiholesterol nastane med oksidacijo stranske verige holesterola (Hur in sod., 2006). Tega oksida smo v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin v povprečju določili največ, in sicer 0,239 mg/100 g. Najmanjše vrednosti tega oksida po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika in pri temperaturi hladilnika, smo določili pri vseh koncentracijah rožmarina. Torej ekstrakt rožmarina najuspešneje inhibira tvorbo tega hidroksiholesterola.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da se najmanj ($p \leq 0,05$) 25 α -hidroksiholesterola tvori ob dodatku ekstraktov rožmarina v obeh koncentracijah (1 ml in 0,3 ml) in piknogenola (1 ml). Rastlinski ekstrakti rožmarina in tudi skorje bora so se izkazali za uspešne zaviralce tvorbe 25 α -hidroksiholesterola, saj so v primerjavi s kontrolnim vzorcem po enotedenskem skladiščenju upočasnili tvorbo tega oksida tudi za desetkrat, najuspešnejši pa je piknogenol.

Pri oksidaciji B obroča holesterola se tvori 7 β -hidroksiholesterol (Hur in sod., 2006). Dodatek rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje značilno vplivata ($p \leq 0,001$) na tvorbo tega hidroksiholesterola. Najmanjše vrednosti 7 β -hidroksiholesterola po sedemdnevem skladiščenju je moč zaznati v vzorcih, ki jim je bil dodan piknogenol (0,040 mg/100 g), kar je skoraj 38-krat manj kot v kontrolnem vzorcu, v katerega nismo dodali antioksidantov. Spet so se za boljše zaviralce tvorjenja tega hidroksiholesterola izkazali ekstrakti skorje bora ter rožmarina v večji koncentraciji.

V govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin ter z dodatkom različnih naravnih ekstraktov smo v povprečju določili 63,71 mg holesterola. Izkazalo se je, da dodatek ekstraktov ter skladiščenje ne vplivata značilno ($p < 0,05$) na vsebnost holesterola. Vsebnosti holesterola v govejem mesu se običajno gibljejo okrog 61 mg/100 g (Higgs in Pratt, 2003).

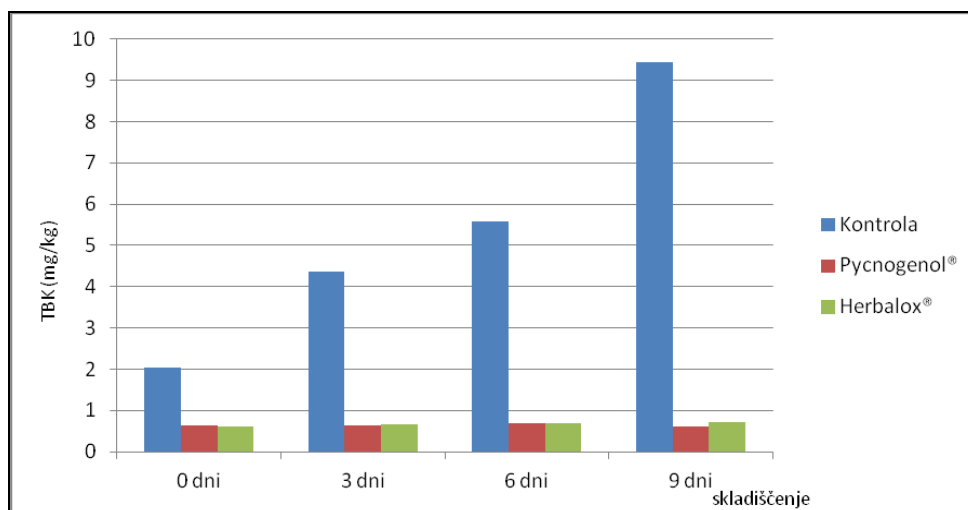
5.1.2 Število TBK

Število TBK (mg malondialdehida/kg) je med vzorci govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin in dodatkom različnih rastlinskih ekstraktov močno variiralo. Ugotovili smo, da dodatek različnih ekstraktov statistično ne vpliva značilno na vsebnost malondialdehida (TBK) takoj po izdelavi in toplotni obdelavi. Učinek ($p \leq 0,001$) zaviranja tvorbe malondialdehida smo ugotovili na sekljancih po enotedenskem

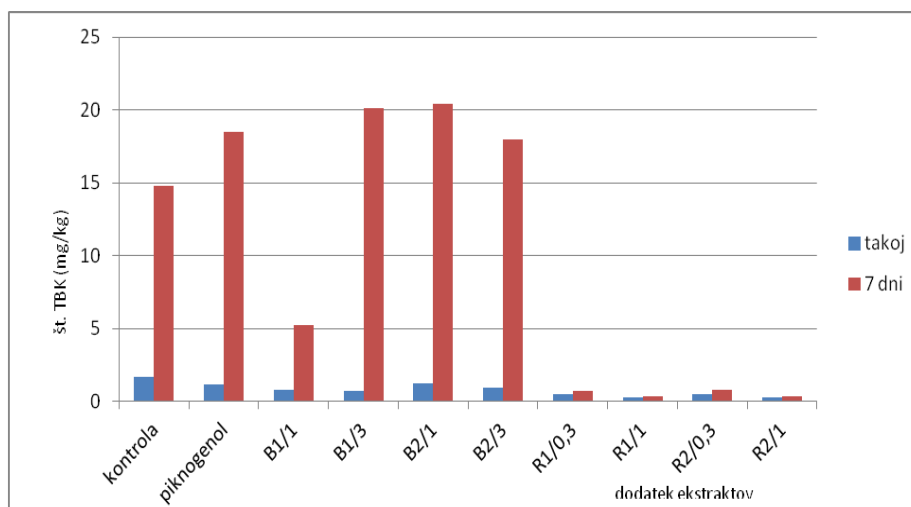
skladiščenju v 100 % atmosferi kisika, pri obeh koncentracijah (1 ml in 0,3 ml) ekstrakta obeh vrst rožmarina. Sklepamo lahko, da sta ekstrakta rožmarina R1 in R2 zelo dobra antioksidanta, ker sta med enotedenskim skladiščenjem v 100 % atmosferi kisika po vsej verjetnosti preprečila oksidacijo večkrat nenasičenih maščobnih kislin in posledično tvorbo malondialdehida. Med vsemi dodanimi ekstrakti so slabšo antioksidativno sposobnost pokazali predvsem vzorci skorje bora, saj so očitno delovali že rahlo prooksidativno.

Veliko tujih avtorjev je že dokazalo, da ekstrakt rožmarina učinkovito vpliva na upočasnitev oksidacije vseh vrst mesa. Sánchez-Escalante in sod. (2001) so spremljali, kako so goveji sekljanci z dodatkom askorbinske kisline, tavrina, karnozina in rožmarina, pakirani v modificirano atmosfero (70 % O₂ + 20 % CO₂ + 10 % N₂) podvrženi oksidaciji. Goveje sekljance so 20 dni hranili pri temperaturi (2 ± 1) °C ter določili število TBK. Ugotovili so, da je rožmarin v času skladiščenja konstantno izražal antioksidativen učinek. V govejih sekljancih z dodatkom rožmarina so izmerili 2 mg TBK/1000 g, medtem ko je kontrola vsebovala 6 mg TBK/1000 g. Ekstrakti rožmarina R1 in R2 z dodatkom 1 ml in 0,3 ml so se tudi v našem primeru izkazali kot zelo učinkoviti, saj so bile vrednosti TBK tudi po enem tednu skladiščenja v atmosferi kisika v teh primerih najmanjše (0,32-0,76) v primerjavi s kontrolo, kjer smo izmerili 14,8 mg TBK/kg (slika 13).

Juhee Ahn in sod. (2006) so raziskovali vpliv BHA/BHT, ekstrakta pešk grozdja (ActiVin™), ekstrakta lubja bora (Pycnogenol®) in smole rožmarina (Herbalox®) na spremembo barve in oksidacijo lipidov kuhanega mletega govejega mesa. Glede na to, da smo tudi v naši raziskavi uporabili Pycnogenol® in rožmarin, lahko naše rezultate primerjamo z rezultati, ki so jih pridobili Juhee Ahn in sod. (2006) (slika 12 in slika 13). Juhee Ahn in sod. (2006) so dokazali, da dodatek Pycnogenola® ter Herbaloxa® mletemu govejemu mesu v devetih dneh skladiščenja zmanjša število TBK za 94 % oz. 92 %, kar nakazuje tudi slika 12. V naši raziskavi smo dobili nasprotno rezultate, saj se je po sedmih dneh skladiščenja število TBK, v primeru dodatka piknogenola, močno povečalo.



Slika 12: Vpliv skladiščenja govejih sekljancev z dodatkom Pycnogenola®, Herbaloxa® ter kontrole na vsebnost malondialdehida (Juhee Ahn in sod., 2006).



Slika 13: Vpliv enotedenskega skladiščenja v atmosferi kisika na vsebnost malondialdehida v govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin in dodatkom rastlinskih ekstraktov

5.1.3 Maščobnokislinska sestava

V govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin in z dodatkom različnih rastlinskih ekstraktov smo določali tudi maščobnokislinsko sestavo. V povprečju so goveji sekljanci vsebovali 16,85 % NMK, 27,42 % ENMK in 55,73 % VNMK. Pričakovali in dokazali smo, da dodatek lanenega olja, ki je bogat vir linolne in α -linolenske kisline, poveča vsebnost le-teh maščobnih kislin v govejih sekljancih ter posledično skupen delež VNMK. Na splošno dodatek rastlinskih ekstraktov in skladiščenje ne vplivata značilno ($p > 0,05$) na maščobnokislinsko sestavo obdelanih govejih sekljancev.

Preglednica 19 prikazuje vsebnost maščobnih kislin v govejem mesu z dodanim lanenim oljem v krmo živali in govejih sekljancih z dodanim lanenim oljem. Souci in sod. (2008) so ugotovili, da goveje meso v povprečju vsebuje 47,3 % NMK, 46,6 % ENMK ter 4 % VNMK. Scheeder in sod. (2001) so preučevali maščobnokislinsko sestavo mesa rjavih švicarskih goved, ki so jim v vsakodnevno krmo dodajali laneno olje. V primerjavi z mesom goveda, ki so bila hranjena z normalno silažo, sta se približno za 1 % povečala deleža oleinske in α -linolenske kisline. Maščobnokislinski profil govejega mesa (Souci in sod., 2008; Scheeder in sod., 2001) je povsem drugačen kot pri sekljancih iz naše raziskave, saj le-ti vsebujejo občutno več VNMK na račun dodanega lanenega olja in bistveno manj NMK. Večja sta deleža linolne in α -linolenske kisline, saj smo laneno olje v sekljance dodali neposredno, medtem ko so rezultati, ki so jih dobili v mesu Scheeder in sod. (2001), za omenjeni maščobni kislini rejsko pogojeni.

Preglednica 20: Maščobnokislinska sestava (ut. %/skupne MK) govejega mesa (Souci in sod., 2008; Scheeder in sod., 2001) in govejih sekljancev z dodatkom lanenega olja

Maščobna kislina	goveje meso (Souci in sod., 2008)	goveje meso (govedo hranjeno z lanenim oljem) (Scheeder in sod., 2001)	goveji sekljanci z dodanim lanenim oljem (naša raziskava)
C 14:0	2,3	2,07	0,34
C16:0	24,7	20,6	8,94
C 18:0	15,1	24,1	6,92
C 18:1	38,3	39	25,0
C 18:2	3,9	2,76	11,8
C 18:3	0,5	1,30	42,6

5.1.4 Senzorična analiza

Cilj našega dela pa ni bil samo analizirati vsebnosti hidroksiholesterolov, malondialdehida in določiti maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev, temveč ugotoviti, ali so ti primerni tudi za uživanje. Senzorično oceno barve, vonja in arome je podal panel izšolanih senzoričnih ocenjevalcev na področju senzorične analize mesa in mesnih izdelkov.

Barvo presnih govejih sekljancev z dodatkom različnih rastlinskih ekstraktov so vsi ocenjevalci ocenili s 4 točkami, kar pomeni, da je bila površina mesa rožnate barve. Po enotedenskem skladiščenju v atmosferi kisika so rožnato-sivo barvo ohranili goveji sekljanci, ki jim je bilo dodano borovo lubje, barva pa se je bistveno izboljšala sekljancem z dodatkom ekstrakta rožmarina. Rahlo prooksidativno delovanje se je pokazalo pri rožmarinu R2/1. Po toplotni obdelavi na žaru pri 240 °C se je barva precej poslabšala, le goveji sekljanci z dodatkom rožmarina so ohranili prvotno barvo tudi po enotedenskem skladiščenju.

Tuje vonje je bilo moč zaznati v vseh vzorcih govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin, čeprav dodatek naravnih ekstraktov ter način skladiščenja na tuje vonje nista imela statistično značilnega vpliva. Tuje vonje lahko pripišemo tudi lanenemu olju, ki smo ga dodali v meso, saj ima le ta specifičen vonj, ki marsikomu ni prijeten. Pri nekaterih vzorcih so do izraza prišle tudi hlapne aromatične komponente ekstraktov, ki smo jih dodali. Vonj po postanem ni bil tako izrazit, poslabšal pa se je po sedemdnevem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika in pri temperaturi hladilnika.

Tudi tuje arome so bile prisotne v vseh vzorcih govejih sekljancev. Dodatek ter koncentracija ekstraktov nimata značilnega statističnega vpliva na tuje arome, pa vendar smo lahko iz dobljenih rezultatov razbrali, da so predvsem večje koncentracije ekstrakta rožmarina in skorje bora vplivale na pojav tujih arom. Aroma po postanem pa je bila izrazitejša po enotedenskem skladiščenju ($p \leq 0,001$), predvsem pri kontrolnem vzorcu in vzorcih z dodanim ekstraktom skorje bora.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov na govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- 100 gramov govejih sekljancev vsebuje 63,9 mg holesterola in 0,215 mg skupnih hidroksisterolov (< 0,001 mg 20 α -hidroksiholesterola, 0,050 mg 25 α -hidroksiholesterola, 0,052 mg 7 β -hidroksiholesterola in 0,113 mg holestana), po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika pa 63,7 mg holesterola in 5,871 mg skupnih hidroksisterolov (1,287 mg 20 α -hidroksiholesterola, 1,508 mg 25 α -hidroksiholesterola, 1,509 mg 7 β -hidroksiholesterola in 1,567 mg holestana);
- vrsta in količina dodanih rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje nimajo statistično značilnega vpliva na vsebnost holesterola v govejih sekljancih;
- dodani ekstrakti rožmarina dveh proizvajalcev in skorje bora z dveh nadmorskih višin (500 in 1000 m nad morjem) v dveh koncentracijah ter piknogenol v primerjavi s kontrolnim vzorcem (brez antioksidantov) uspešno upočasnijo oksidacijo holesterola, tj. zmanjšajo tvorbo hidroksiholesterolov v govejih sekljancih takoj po izdelavi (izjema je ekstrakt rožmarina proizvajalca 1 v koncentraciji 0,3 ml) in po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika;
- glede na kontrolni vzorec (vsota OH takoj 0,215 mg/100 g vs. po 1 tednu 5,871 mg/100 g) oksidacijo holesterola med enotedenskim skladiščenjem v 100 % atmosferi kisika najuspešneje upočasnijo različni ekstrakti rožmarina v koncentracijah 0,3 in 1,0 ml in piknogenol (takoj 0,043-0,102 mg/100 g vs. po 1 tednu 0,425-1,076 mg/100 g), ekstrakti skorje bora z nadmorskih višin 500 m in 1000 m v koncentraciji 3 ml so uspešnejši (0,095-0,240 mg/100 g vs. 1,020-1,168 mg/100 g) kot tisti v koncentraciji 1 ml (0,129-0,132 mg/100 g vs. 1,772-1,912 mg/100 g);
- glede na kontrolni vzorec (TBK takoj 1,65 vs. po 1 tednu 14,8) oksidacijo maščobnih kislin med enotedenskim skladiščenjem v 100 % atmosferi kisika uspešno upočasnijo različni ekstrakti rožmarina (takoj 0,25-0,47 vs. po 1 tednu 0,32-0,76), ekstrakti s piknogenolom in skorjo bora pa delujejo celo prooksidativno (takoj 0,68-1,27 vs. po 1 tednu 5,22-20,4; povečanje značilno);
- v povprečju 100 gramov govejih sekljancev vsebuje 16,9 % NMK, 27,4 % ENMK in 55,7 % VNMK ter razmerjem *n*6/*n*3 0,29 in razmerjem P/S 3,36;
- vrsta in količina dodanih rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje ne vplivajo značilno na maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev;
- vrsta in količina dodanih rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje vplivajo na senzorično kakovost govejih sekljancev;
- dodatek različnih ekstraktov rožmarina je v primerjavi s kontrolnim izboljšal barvo presnih in toplotno obdelanih sekljancev, dodatek ekstraktov skorje bora je ohranil barvo presnih ter poslabšal barvo toplotno obdelanih;
- zaradi dodatka lanenega olja so bili v vseh vzorcih prisotni tuji vonji in arome;
- po enem tednu skladiščenja v atmosferi kisika in v hladilniku pri temperaturi 4 °C je postala zelo izrazita aroma po postanem predvsem v kontrolnem vzorcu in vzorcih z dodanimi ekstrakti skorje bora v večjih koncentracijah.

6 POVZETEK

Meso je glavni vir beljakovin z visoko biološko vrednostjo ter odličen vir nekaterih pomembnih hranil, kot npr. železa, vitamina B₁₂. Meso in mesni izdelki pa vsebujejo tudi nekatere snovi, ki lahko negativno vplivajo na naše zdravje. Do negativnih posledic na zdravje pride predvsem zaradi prisotnosti nasičenih maščob v mesu, holesterola ter njegovih oksidov, ki privedejo do raznih kardiovaskularnih bolezni, raka ter debelosti. Maščoba v mesu je ob različnih dejavnikih, kot so prisotnost kisika, svetloba, skladiščenje ter toplotna obdelava, zelo podvržena oksidaciji. Produkti oksidacije bistveno poslabšajo samo barvo ter aromo mesa, poleg tega pa se lahko tvorijo tudi mutageni in kancerogeni produkti, ki povzročajo razne degenerativne bolezni. Ob dodatku antioksidantov v meso lahko v večji meri preprečimo njegovo oksidacijo. Ker ljudje vse bolj stremijo k zdravemu in predvsem naravnemu načinu življenja, se v živilski industriji poslužujejo naravnih izvlečkov različnih rastlin, zelišč in olj.

Namen magistrske naloge je bil raziskati vpliv dodatka rastlinskih ekstraktov rožmarina ter skorje bora na preprečevanje oksidacije govejih sekljancev s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin. Sekljancem smo kot vir *n*-3 maščobnih kislin dodali laneno olje, ki je bogat vir linolne in α -linolenske maščobne kisline. Dodali smo ekstrakt skorje dveh različnih črnih borov, in sicer bora, ki je rasel na severu Slovenije na nadmorski višini 500 metrov (B1) ter bora, ki je rasel na JZ Slovenije na nadmorski višini 1000 metrov (B2). Uporabili smo dve koncentraciji 1 ml ter 3 ml (B1/1, B1/3, B2/1 in B2/3) ter ugotavljali, katera od teh prepreči oziroma omili oksidacijo mesa ter hkrati zagotavlja sprejemljivo senzorično kakovost. Dodali smo tudi dve vrsti rožmarina, ki sta se razlikovali v proizvajalcu, in sicer Kotanyi (R1) ter Maestro (R2). Tako kot pri lubju bora smo ju uporabili v dveh koncentracijah – 0,3 in 1 ml (R1/1, R1/0,3, R2/1 in R2/0,3). Za pozitivno kontrolo smo uporabili ekstrakt 1 ml zdravila Pycnogenol[®], ki velja za zelo močan antioksidant in ga pridobivajo iz skorje mediteranskega bora (P/1). Kot kontrolni vzorec nam je služil goveji sekljanec z dodanim lanenim oljem, vendar brez kakršnega koli dodatka rastlinskih ekstraktov.

Polovico pripravljenih govejih sekljancev (po en sekljanec iz vsake skupine v dveh paralelkah = 20 sekljancev) smo 4 minute pekli na žaru pri temperaturi 240 °C, na še toplih opravili deskriptivno senzorično analizo kakovosti z nestrukturirano točkovno lestvico (10 vzorcev), na ohlajenih (10 vzorcev) pa po 12-ih urah tudi kemijske analize (določili smo vsebnost hidroksiholesterolov z LC/MS, maščobnokislinsko sestavo z GC in spektrofotometrično število TBK). Ostalo polovico (tj. 10 vzorcev) govejih sekljancev smo zapakirali v plastične vrečke s 100 % atmosfero kisika in jih hranili v hladilniku pri temperaturi 2 °C. Po enem tednu smo vzorce toplotno obdelali pri enakih pogojih kot predhodne vzorce in na njih opravili tako kemijske kot tudi senzorično analizo.

Na podlagi dobljenih rezultatov na govejih sekljancih s povečano vsebnostjo *n*-3 maščobnih kislin lahko oblikujemo naslednje sklepe. 100 gramov govejih sekljancev vsebuje 63,9 mg holesterola in 0,215 mg skupnih hidroksisterolov (< 0,001 mg 20 α -hidroksiholesterola, 0,050 mg 25 α -hidroksi-holesterola, 0,052 mg 7 β -hidro-ksiholesterola in 0,113 mg holestana), po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika pa 63,7

mg holesterola in 5,871 mg skupnih hidroksisterolov (1,287 mg 20 α -hidroksiholesterola, 1,508 mg 25 α -hidroksiholesterola, 1,509 mg 7 β -hidroksiholesterola in 1,567 mg holestana) vrsta in količina dodanih rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje nimajo statistično značilnega vpliva na vsebnost holesterola v govejih sekljancih. Dodani ekstrakti rožmarina dveh proizvajalcev in skorje bora z dveh nadmorskih višin (500 in 1000 m nad morjem) v dveh koncentracijah ter piknogenol v primerjavi s kontrolnim vzorcem (brez antioksidantov) uspešno upočasnijo oksidacijo holesterola, tj. zmanjšajo tvorbo hidroksiholesterolov v govejih sekljancih takoj po izdelavi (izjema je ekstrakt rožmarina proizvajalca 1 v koncentraciji 3 ml) in po enotedenskem skladiščenju v 100 % atmosferi kisika. Glede na kontrolni vzorec (vsota OH takoj 0,215 mg/100 g vs. po 1 tednu 5,871 mg/100 g) oksidacijo holesterola med enotedenskim skladiščenjem v 100 % atmosferi kisika najuspešneje upočasnijo različni ekstrakti rožmarina v koncentracijah 0,3 in 1,0 ml in piknogenol (takoj 0,043-0,102 mg/100 g vs. po 1 tednu 0,425-1,076 mg/100 g), ekstrakti skorje bora z nadmorskih višin 500 m in 1000 m v koncentraciji 3 ml so uspešnejši (0,095-0,240 mg/100 g vs. 1,020-1,168 mg/100 g) kot tisti v koncentraciji 1 ml (0,129-0,132 mg/100 g vs. 1,772-1,912 mg/100 g). Glede na kontrolni vzorec (TBK takoj 1,65 vs. po 1 tednu 14,8) oksidacijo maščobnih kislin med enotedenskim skladiščenjem v 100 % atmosferi kisika uspešno upočasnijo različni ekstrakti rožmarina (takoj 0,25-0,47 vs. po 1 tednu 0,32-0,76), ekstrakti s piknogenolom in skorjo bora pa delujejo celo prooksidativno (takoj 0,68-1,15 vs. po 1 tednu 5,22-20,4; povečanje značilno). V povprečju 100 gramov govejih sekljancev vsebuje 16,9 % NMK, 27,4 % ENMK in 55,7 % VNMK ter razmerjem $n6/n3$ 0,29 in razmerjem P/S 3,36. Vrsta in količina dodanih rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje ne vplivajo značilno na maščobnokislinsko sestavo govejih sekljancev. Vrsta in količina dodanih rastlinskih ekstraktov ter skladiščenje vplivajo na senzorično kakovost govejih sekljancev. Dodatek različnih ekstraktov rožmarina je v primerjavi s kontrolnimi izboljšal barvo presnih in toplotno obdelanih sekljancev, dodatek ekstraktov skorje bora je ohranil barvo presnih ter poslabšal barvo toplotno obdelanih. Zaradi dodatka lanenega olja so bili v vseh vzorcih prisotni tuji vonji in arome. Po enem tednu skladiščenja v atmosferi kisika in v hladilniku pri temperaturi 4 °C je postala zelo izrazita aroma po postanem predvsem v kontrolnem vzorcu in vzorcih z dodanimi ekstrakti skorje bora v večjih koncentracijah.

V večji meri smo potrdili naše hipoteze, kjer smo predvideli, da bo dodatek naravnih rastlinskih ekstraktov v večji meri zaustavil oz. omilil oksidacijo. Če pogledamo v splošnem, lahko rečemo, da se je ekstrakt rožmarina v obeh koncentracijah ter vrstah izkazal za bolj učinkovitega, kot na primer ekstrakt skorje črnega bora, ki velja za zelo močan antioksidant. Po vsej verjetnosti smo dodali prevelike koncentracije ekstrakta skorje bora, kar je imelo na meso že prooksidativen učinek in je v bistvu samo oksidacijo še pospešilo.

7 VIRI

- Arnold D.R., Kwiterovich P.O. 2003. Cholesterol-absorption, function and metabolism. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo C.L., Finglas M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1226–1236
- Azadmard-Damirchi S., Dutta P.C. 2009. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1: 36–42
- Bekhit A.E.D., Geesink G.H., Ilian M.A., Morton J.D. 2003. The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin reducing activity in beef patties. *Food Chemistry*, 81: 175–187
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. 2009. Food chemistry. 4th ed. Berlin, Springer: 1070 str.
- Bernot-Sotenšek M. 2001. Antioksidativno učinkovanje ekstraktov rožmarina v zmrznjenih sekljanih puranjih zrezkih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 str.
- Bezjak M. 2004. Stabilizacija likopena z naravnimi antioksidanti v ketchupu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 18–19
- Boselli E., Valazco V., Caboni M.F., Ledcker G. 2001. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917: 239–244
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 211-211, 511-511
- Braga M. E. M., Santos R. M. S., Seabra I.J., Facanali R., Marques M. O.M., de Sousa H. C. 2008. Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *Journal of Supercritical Fluids*, 47: 37–48
- Brown A.J., Jessup W. 1999. Oxysterols and atherosclerosis – review article. *Atherosclerosis*, 142: 1–28
- D' Andrea G. 2010. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 81: 724-736
- Gaonkar A.G., McPhearson A. 2005. Ingredient interactions: Effects on food quality. London, CRC Press, Inc.: 229-230
- Gašperlin L., Polak T., Šegatin N. 2011. Tehnologije mesa in mesnin II, vaje za predmet Tehnologije mesa in mesnin. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 31 str.

- Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E. 2009. Green processes for the extraction of bioactives from rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and *in vitro* assays. *Journal of Chromatography A*, 10: 1016–1025
- Higgs J., Pratt J. 2003. Meat: Nutritional value. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo C.L., Finglas M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3798–3808
- Honikel K.O. 2009. Oxidative changes and their control in meat and meat products. V: *Safety of meat and processed meat*. Toldrá F. (ed.). New York, Springer: 313–340
- Hur S.J., Park G.B., Joo S.T. 2006. Formation of cholesterol oxidation products in animal products. *Food Control*, 18: 939–947
- Jayathilakan K., Sharma G. K., Radhakrishna K., Bawa A.S. 2007. Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavor in different species of meat. *Food Chemistry*, 105, 3: 908–916
- Jones J.D., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323–329
- Juhee A., Grün U., Mustapha A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24: 7–14
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11–21
- Kovač B., Raspor P. 2000. Določanje antioksidativnega potenciala biomase filamentoznih gliv. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, 2000, Portorož, 26. in 27. oktober. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93–100
- Lazko J., Dupré B., Dneilly R.M., Quéneudec M. 2010. Bicomponents based on flax short fibres and linseed oil. *Industrial Crops and Products*, 33: 317–324
- Lichtenstein A.H. 2005. Foods and oils. V: *Encyclopedia of human nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Allen L., Prentice A. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 232–236
- Maimoona A., Naeem I., Saddiqe Z., Jameel K. 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 261–277
- Nuerenberg K., Fisher K., Nuerenberg G., Kuechenmeister U., Klosowska D., Eliminowska-Wenda G., Fiedler I., Ender K. 2004. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. *Meat Science*, 70: 63–74

- Park P.W., Goins R.E. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59: 1262–1266
- Polak T., Žlender B., Lušnic M., Demšar L. 2010. Effects of coenzyme Q10, α -tocopherol and ascorbic acid on oxidation of cholesterol in chicken liver pâté. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 44: 1052–1058
- Rižner A. 2000. Izolacija aktivnih učinkovin rožmarina. Doktorska disertacija. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 102 str.
- Salobir K. 2000. Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 8., 9. november 2001. Žlender B., Demšar L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 121–135
- Sánchez-Escalante A., Djenane D., Torrescano G., Beltrán J.A., Ronscalés P. 2001. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58, 4: 421–429
- Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162: 981–987
- Sasikumar B. 2001. Rosemary. V: Handbook of herbs and spices. Vol. 2. Peter K. V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 243–250
- Scheeder M.R.L., Casutt M.M., Roulin M., Escher F., Dufey P.A., Kreuzer M. 2001. Fatty acid composition, cooking loss and texture of beef patties from meat of bulls red different fats. *Meat Science*, 58: 321–328
- Sheppard A.J., O'Dell R.G., Pennington J.A.T. 2003. Cholesterol – properties and determination. V: Encyclopedia of food science and nutrition. Vol.2. 2nd ed. Caballero B., Trugo C.L., Finglas M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1220–1221
- Skvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Demšar L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179–191
- Sokół-Lętowska A., Oszmiański J., Wojdyło A. 2007. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chemistry*, 103: 853–859
- Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H. 2008. Food composition and nutrition tables. 5th rev. completed ed. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers: 1091 str.
- Ubhayasekera S. J. K. A., Verleyen T., Dutta P. C. 2004. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry*, 84,1: 194–157

- Yesil-Celiktas O., Ganzer M., Akgun I., Sevimli C., Kormaz K., Bedir E. 2009. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 1339–1345
- Zelenik-Blatnik A. 1992. Kemične spremembe triacilglicerolov v živilih. V: *Lipidi*. 14. Bitenčevi živilski dnevi '92, Ljubljana, 4-5-junij 1992. Klofutar C., Žlender B., Hribar J., Plestenjak A. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17–27
- Žlender B. 2000. Oksidacija in stabilnost mesa in mesnin. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 129–138

ZAHVALA

Vse naše sanje se lahko uresničijo – če le imamo pogum, da gremo z njimi (W.D.)

Magistrsko delo je plod mojega dela ter vztrajnosti. Vem, da tega izdelka ne bi bilo, če ne bi bilo Vas, ki ste me vseskozi podpirali in mi pomagali.

Ob tej priložnosti se iskreno zahvaljujem moji mentorici prof. dr. Lei Demšar za vso pomoč, trud, naklonjenost, potrpežljivost in strokovne nasvete pri nastajanju tega dela. Hvala vam tudi za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Posebna zahvala gre somentorju dr. Tomažu Polaku za skrben pregled magistrskega dela ter vso pomoč v laboratoriju.

Za natančen in hiter pregled magistrske naloge se zahvaljujem recenzentu prof. dr. Blažu Cigiću.

Za prijetno vzdušje ter pomoč v laboratoriju se najlepše zahvaljujem Ani Penko, Mateji Lusnić Polak in Špeli Može Bornšek ter vsem zaposlenim na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil.

Lini Burkan Makivić se iskreno zahvaljujem za pregled referenc ter za končni pregled magistrske naloge.

Največja zahvala pa gre vama, mami in ati, da sta mi omogočila študij, ki me je neizmerno veselil ter me vseskozi podpirala na vseh področjih. Hvala tudi vsem najbližjim sorodnikom, ki ste mi kakorkoli pomagali pri uresnitvi mojih sanj.

Joni, hvala ker si verjel vame, hvala za vso moralno podporo, spodbujanje, pa tudi za ogromno mero potrpežljivosti, tako v času študija kot med ustvarjanjem tega dela.

Navsezadnje najlepša hvala tudi vsem prijateljem ter sošolcem, za vso podporo, pozitivne misli in pomoč.