

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Dejan DOŠLER

**VPLIV KAKOVOSTI, PROTEOLIZE IN STOPNJE PEČENOSTI NA  
NASTANEK HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV  
V DOLGI HRBTNI MIŠICI PRAŠIČA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**EFFECTS OF MEAT QUALITY, PROTEOLYSIS AND DEGREE OF DONENESS ON  
FORMATION OF HETEROCYCLIC AMINES IN PORK *LONGISSIMUS DORSI*  
MUSCLE**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2007

Popravki:

Doktorska disertacija je bila opravljena na Katedri za tehnologijo mesa in gotovih jedi, Katedri za tehnologije rastlinskih živil in Katedri za vrednotenje živil Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorico doktorske disertacije imenoval doc. dr. Leo GAŠPERLIN.

Mentorica: doc. dr. Lea GAŠPERLIN

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Veronika ABRAM

Član: doc. dr. Lea GAŠPERLIN

Član: doc. dr. Matevž POMPE

Član: prof. dr. Božidar ŽLENDER

Datum zagovora: 19. december 2007

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorand:  
Dejan DOŠLER

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 637.5'64: 641.526.3:543.61.062(043)=863
KG	meso / prašičje meso / <i>m. longissimus dorsi</i> / kakovost mišičnine / SpVV / barva prašičjega mesa / zorenje mesa / pečenje mesa / strižna sila / kemijska sestava / neproteinski dušik / kreatin / kreatinin / proste aminokisliline / reducirajoči sladkorji / HPLC-MS / heterociklični aromatski amini / karcinogene spojine / mutagene spojine
AV	DOŠLER, Dejan, univ. dipl. inž. živilske tehnologije
SA	GAŠPERLIN, Lea (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2007
IN	VPLIV KAKOVOSTI, PROTEOLIZE IN STOPNJE PEČENOSTI NA NASTANEK HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV V DOLGI HRBTNI MIŠICI PRAŠIČA
TD	Doktorska disertacija s področja živilstva
OP	XIII, 109 str., 29 pregl., 19 sl., 10 pril., 144 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv kakovosti, časa zorenja oz. proteolize in stopnje pečenosti do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ) na tvorbo mutagenih in karcinogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HCA) v dolgi hrbtni mišici (*m. longissimus dorsi*) prašiča. Poskus smo opravili na mišicah desetih slovenskih pasemskih križancev (Švedska landrace  $\times$  Large white  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire) dveh kakovosti, normalne in BMV; kakovost mišičnine smo določili z analizo vrednosti pH, sposobnosti za vezanje vode in barve ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Mišice smo razdelili na štiri dele, jih vakuumsko embalirali in zoreli 1 (nezoren), 3, 6 in 10 dni pri temperaturi 2 °C. Meso smo pekli na dvoploščnem žaru pri temperaturi 220 °C do dveh  $T_s$  (70 °C in 95 °C). Osnovno kemijsko sestavo, vsebnost prekursorjev HCA (kreatina, kreatinina, prostih aminokislilin in reducirajočih sladkorjev) in indikatorjev zorenja, kot so izceja, vrednost pH ter vsebnost neproteinskega dušika, smo določili na presnih, Warner-Bratzlerjevo strižno silo pa na pečenih vzorcih. HCA smo iz homogenata zgornje in spodnje skorje pečenega zrezka ekstrahirali in očistili s trdno fazo (SPE) ter jih določili z LC-MS. Zorenje mesa statistično značilno ( $p \leq 0,05$ ) vpliva na vse merjene pokazatelje zorenja in kakovosti mišičnine kot tudi vsebnost prekursorjev HCA. Vsebnost kreatina se z zorenjem zmanjša, kreatinina pa poveča. Vsebnost skupnih prostih aminokislilin v mišicah se v desetih dnevih zorenja poveča za približno 1,6-krat; v normalnih mišicah (zorenih do šest dni) je prostih aminokislilin več kot v BMV mišicah. Vsebnost glukoze značilno narašča z zorenjem le pri BMV kakovosti. Določili smo pet različnih HCA: PhIP, MeIQx, DiMeIQx, harman in norharman. Vsebnost HCA narašča z zorenjem (nezoreno meso normalne kakovosti vsebuje 1,35 ng/g, po treh 1,38 ng/g, po šestih 1,77 ng/g in po desetih dneh 3,49 ng/g) in je odvisna od  $T_s$ ; povprečno se v vzorcih pečenih do  $T_s = 95$  °C oblikuje do 4-krat več HCA kot v vzorcih pečenih do  $T_s = 70$  °C (8,34 ng/g vs. 2,36 ng/g). Pri  $T_s = 70$  °C v vsebnosti HCA nismo ugotovili značilnih razlik med kakovostma, izjema je le vsebnost MeIQx. Vzorci BMV kakovosti, pečeni do  $T_s = 95$  °C, vsebujejo povprečno 22 % več HCA kot vzorci normalne kakovosti. Z zdravstvenega vidika je najprimernejše uživanje do  $T_s = 70$  °C pečenega prašičjega mesa normalne kakovosti in zorenega do 3 dni ali nezorenega mesa BMV kakovosti, pri čemer se tvori do 1,94 ng/g HCA.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 637.5'64: 641.526.3:543.61.062(043)=863  
CX meat / pork / *m. Longissimus dorsi* / meat quality / water holding capacity of meat / colour of pork / ageing meat / grilling / Warner-Bratzler shear force / chemical composition / non-protein nitrogen / creatine / creatinine / free amino acids / reducing sugars / HPLC-MS / heterocyclic aromatic amines / carcinogens / mutagens  
AU DOŠLER, Dejan  
AA GAŠPERLIN, Lea (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2007  
TI EFFECTS OF MEAT QUALITY, PROTEOLYSIS AND DEGREE OF DONENESS ON FORMATION OF HETEROCYCLIC AMINES IN PORK *LONGISSIMUS DORSI* MUSCLE  
DT Dissertation thesis  
NO XIII, 109 p., 29 tab., 19 fig., 10 ann., 144 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The effects of meat quality, ageing time or proteolysis and internal temperature ( $T_i$ ) on the formation of mutagenic and carcinogenic heterocyclic aromatic amines (HCAs) in grilled pork muscles (*Longissimus dorsi*) were studied. Muscles of two qualities (normal and PSE) originated from ten commercially slaughtered crossbreed (Swedish Landrace  $\times$  Large White  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire) barrows. Meat quality was determined by a pH value, water holding capacity and colour ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  values). Muscles were cut to four pieces, vacuum packed and aged for 1 (nonaged), 3, 6 and 10 days at 2 °C. Meat was grilled (two plated grill, temperature of 220 °C) to two different  $T_i$  (70 °C and 95 °C). Basic chemical composition, content of HCAs precursors (creatine, creatinine, free amino acids and reducing sugars), ageing indicators, such as drip loss, instrumentally measured colour values, pH value, content of non-protein nitrogen on raw and Warner-Bratzler Shear Force on grilled pork muscles were analysed. HCAs was in a homogenate of upper and lower surface slices of grilled stakes extracted and purified by SPE procedure and determined by LC-MS. Generally, all measured ageing and meat quality indicators and precursors of HCAs were influenced by ageing time at the 5% level or less. Creatine content declined significantly and creatinine increased with days of ageing, dependent on meat quality. Approximately 1.6-times higher content of total free amino acids released in 10 day aged muscles than in nonaged pork muscles was found. Generally higher content of free amino acids was observed in normal (aged till 6 days) than in PSE muscles. The glucose content significantly increased with ageing in PSE muscles. Five HCAs were determined: PhIP, MeIQx, DiMeIQx, Harman and Norharman. Content of HCAs increases with ageing (in nonaged and normal pork HCAs content being 1.35 ng/g, after 3 days 1.38 ng/g, after 6 days 1.77 ng/g and after 10 days 3.49 ng/g) and is dependent on  $T_i$ ; on average to 4-times higher amount of HCAs formed in grilled samples to  $T_i = 95$  °C than in samples grilled to  $T_i = 70$  °C (8.34 ng/g vs. 2.36 ng/g). Generally speaking, no marked difference due to meat quality was found in the HCAs content at  $T_i = 70$  °C (with exception of MeIQx). On the average PSE samples grilled to  $T_i = 95$  °C contained 22 % HCAs more than normal samples. From health perspective it is the most suitable to grill pork meat (normal quality and to 3-day aged or PSE quality and nonaged) to the  $T_i = 70$  °C, in which case to 1.94 ng/g HCAs is formed.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>PRILOGE .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 BIOKEMIJSKE IN STRUKTURNE SPREMEMBE V MIŠIČNINI PO ZAKOLU .....	3
2.1.1 Konverzija mišice v meso.....	3
2.1.2 Tipi mišic in kakovost mišičnine .....	5
2.1.3 Zorenje mesa.....	8
2.1.3.1 Nепroteinski dušik .....	12
2.1.3.2 Ogljikovi hidrati.....	16
2.2 TOPLOTNA OBDELAVA MESA IN POJAV HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV .....	17
2.2.1 Fizikalno-kemijske spremembe mesa med toplotno obdelavo .....	17
2.2.1.1 Maillardova reakcija in porjavenje .....	18
2.2.2 Heterociklični aromatski amini.....	21
2.2.2.1 Vrste in strukture HCA .....	21
2.2.2.2 Tvorba HCA .....	24
2.2.2.3 Vpliv kakovosti mesa na prekurzorje HCA .....	29
2.2.2.4 Vpliv zorenja mesa na prekurzorje HCA.....	29
2.2.2.5 Vpliv toplotne obdelave mesa na prekurzorje in tvorbo HCA.....	30
2.2.2.6 Vpliv vrste mesa na vsebnost prekurzorjev in tvorbo HCA .....	31
2.2.3 Mutagenost in karcinogenost HCA.....	32
<b>3 MATERIAL IN METODE DELA .....</b>	<b>38</b>
3.1 MATERIAL ZA RAZISKAVO .....	38
3.2 NAČRT DELA.....	38
3.3 METODE DELA.....	39
3.3.1 Določanje osnovne kemijske sestave mesa .....	39
3.3.2 Merjenje vrednosti pH.....	40
3.3.3 Instrumentalno merjenje barve .....	40
3.3.4 Določanje sposobnosti za vezanje vode.....	41
3.3.5 Instrumentalno merjenje strižne sile .....	41
3.3.6 Določanje vsebnosti neproteinskega dušika .....	41
3.3.7 Določanje vsebnosti prostih aminokislin .....	41

3.3.7.1	Priprava vzorca .....	42
3.3.7.2	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije .....	42
3.3.7.3	Validacija metode .....	43
<b>3.3.8</b>	<b>Določanje vsebnosti kreatina .....</b>	<b>45</b>
3.3.8.1	Priprava vzorca .....	45
3.3.8.2	Validacija metode .....	45
<b>3.3.9</b>	<b>Določanje vsebnosti kreatinina .....</b>	<b>46</b>
3.3.9.1	Priprava vzorca .....	46
3.3.9.2	Validacija metode .....	46
<b>3.3.10</b>	<b>Določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev .....</b>	<b>47</b>
3.3.10.1	Priprava vzorca .....	47
3.3.10.2	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije .....	47
3.3.10.3	Validacija metode .....	50
<b>3.3.11</b>	<b>Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov .....</b>	<b>51</b>
3.3.11.1	Priprava vzorca .....	51
3.3.11.2	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije .....	52
3.3.11.3	Validacija metode .....	54
<b>3.3.12</b>	<b>Statistična analiza .....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>56</b>
4.1	OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MIŠIC .....	56
4.2	FIZIKALNI IN INSTRUMENTALNI PARAMETRI MIŠIC .....	56
4.3	VPLIV KAKOVOSTI MIŠIČNINE IN ZORENJA .....	57
4.4	PREKURZORJI HCA .....	60
4.5	HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI .....	66
4.6	PARAMETRI PEČENJA NA DVOPLOŠČNEM ŽARU .....	70
4.7	KORELACIJE.....	71
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>74</b>
5.1	RAZPRAVA .....	74
5.1.1	Vpliv kakovosti na vsebnost HCA.....	74
5.1.2	Vpliv zorenja na vsebnost HCA .....	77
5.1.3	Vpliv toplotne obdelave na vsebnost HCA .....	80
5.1.4	Vpliv prekurzorjev na vsebnost HCA .....	83
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>87</b>
7.1	SUMMARY .....	89
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>91</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Parametri kakovosti za devet različnih vzorcev LD prašiča (Joo in sod., 1999).....	8
Preglednica 2:	Najpomembnejše mišične proteaze vključene v proteolizo (Toldrá, 2004). .....	12
Preglednica 3:	Vsebnost prostih aminokislin in nekaterih dipeptidov v mišici LD prašiča. ....	14
Preglednica 4:	Povprečna vsebnost glikogena, laktata, glukoze in glukoza-6-fosfata v mišicah <i>longissimus dorsi</i> prašičev 4 min in 30 h <i>post mortem</i> (Maribo in sod., 1999). .....	16
Preglednica 5:	Aminoimidazo-azaareni določeni v modelnih sistemih ali v toplotno obdelani hrani (Pais in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky in sod., 2005; Turesky, 2007).....	22
Preglednica 6:	Karbolini in drugi HCA določeni v modelnih sistemih ali v toplotno obdelani hrani (Pais in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky in sod., 2005; Turesky, 2007).....	23
Preglednica 7:	Vsebnost HCA (ng/g) v toplotno obdelanem mesu in ribah (Pais in Knize, 2000).....	32
Preglednica 8:	Mutagenost HCA v <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 in TA100 (Nagao, 2000).....	35
Preglednica 9:	Priprava umeritvene krivulje za kvantitativno določanje prostih aminokislin po metodi standardnega dodatka in internega standarda. ....	44
Preglednica 10:	Priprava umeritvene krivulje za določanje kreatina s standardnim dodatkom. ....	45
Preglednica 11:	Priprava umeritvene krivulje za določanje kreatinina s standardnim dodatkom. ....	46
Preglednica 12:	Priprava umeritvene krivulje za kvantitativno določanje reducirajočih sladkorjev po metodi standardnega dodatka in internega standarda. ....	50
Preglednica 13:	Priprava umeritvenih krivulj za kvantitativno določanje različnih HCA po metodi standardnega dodatka in internega standarda. ....	54
Preglednica 14:	Rezultati osnovne kemijske analize presnih dolgih hrbtnih mišic prašičev dveh kakovosti (normalne in BMV) z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	56
Preglednica 15:	Rezultati meritev parametrov kakovosti mišičnine, izmerjenih na presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	57
Preglednica 16:	Razlike v vrednosti pH <sub>24</sub> , SpVV in instrumentalno izmerjenih parametrov barve med presnimi dolgimi hrbtnimi mišicami prašičev normalne in BMV kakovosti (model 1, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	57
Preglednica 17:	Rezultati meritev izceje med zorenjem, vrednosti pH ekstrakta, deleža neproteinskega dušika – NPN in Warner-Bratzlerjeve strižne sile – WBSF zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča. ....	58
Preglednica 18:	Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na izcejo v različnih časih zorenja, vrednost pH ekstrakta in delež neproteinskega dušika – NPN v presnih	



	mišicah ter na Warner-Bratzlerjevo strižno silo – WBSF v pečenih dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	59
Preglednica 19:	Rezultati meritev vsebnosti kreatina, kreatinina, prostih aminokislin in reducirajočih sladkorjev v zorenih dolгих hrbtnih mišicah prašiča z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	60
Preglednica 20:	Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na vsebnost kreatina in kreatinina v dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	61
Preglednica 21:	Vpliv kakovosti mišičnine in časa zorenja na vsebnost (mg/100 g) prostih aminokislin v dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	62
Preglednica 22:	Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na vsebnost (mg/100 g) skupnih prostih aminokislin in vsebnost (mg/100 g) vsote štirih aminokislin (ILE, LEU, PHE in TYR) v dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ). .....	63
Preglednica 23:	Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na vsebnost (mg/100 g) nekaterih drugih aminokislin in dipeptidov v dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, Model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ). .....	64
Preglednica 24:	Vpliv kakovosti mišičnine in časa zorenja na vsebnost reducirajočih sladkorjev v dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, Model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	65
Preglednica 25:	Vsebnosti nekaterih HCA v nezorenih in zorenih ter toplotno obdelanih dolгих hrbtnih mišic prašiča z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	66
Preglednica 26:	Vpliv kakovosti mišičnine in časa zorenja na vsebnost (ng/g) HCA v toplotno obdelanih dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, Model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ). .....	67
Preglednica 27:	Vpliv središčne temperature pečenja na vsebnost HCA v toplotno obdelanih dolгих hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 3, t-test v paru). .....	69
Preglednica 28:	Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na čas pečenja in izcejo med pečenjem dolгих hrbtnih mišic prašiča do določene $T_s$ (n = 10, Model 2, Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ). .....	70
Preglednica 29:	Pearsonovi korelacijski koeficienti med vsebnostjo prekurzorjev HCA v presnih mišicah in vsebnostjo HCA v zunanjem sloju pečenih dolгих hrbtnih mišic prašiča v odvisnosti od središčne temperature (n = 16). .....	73

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematičen prikaz zgodnjih sprememb v mišici <i>post mortem</i> in njihov vpliv na sposobnost vezanja vode (Toldrá, 2003: 3).....	3
Slika 2:	Mehkoba ovčje mišice <i>longissimus</i> , merjena v različnih obdobjih <i>post mortem</i> in izražena kot Warner-Bratzlerjeva strižna sila (Koochmarae in sod., 1996: 2936).....	9
Slika 3:	Metabolizem kreatina v mišični celici sesalcev (Spontaneous..., 2007). ....	15
Slika 4:	Shematski prikaz reakcij neencimskega porjavenja (Davies in Labuza, 2007: 3).....	20
Slika 5 :	Tvorba piridin in pirazin radikalov (Shahidi in sod., 2004: 591; Murkovic, 2004: 7; Vitaglione in Fogliano, 2004: 192). ....	20
Slika 6:	Tvorba imidazokinolinov in imidazokinoksalinov (Felton in sod., 2000: 37).....	25
Slika 7:	Tvorba PhIP iz fenilalanina in kreatinina (Murkovic, 2004: 8).....	26
Slika 8:	Metabolizem kemijskih prokarcinogenov in karcinogeneza (Čemažar, 2006: 25).....	33
Slika 9:	Metabolizem AIA in vivo (Dashwood, 2002: 93; Schut in Snyderwine, 1999: 355).....	34
Slika 10:	Shematski prikaz odvzema vzorcev iz levih in desnih dolgih hrbtnih mišic prašiča.....	38
Slika 11:	Odvzem vzorcev za fizikalne in kemijske analize.....	39
Slika 12:	Primer kromatograma prostih aminokislin glicina, lizina in tirozina v naključnem vzorcu mesa (normalna kakovost, 10 dni zoren) in standardni dodatek teh aminokislin.....	43
Slika 13:	Primer kromatograma (v ESI+ načinu) glukoze (GLK), manoze (MAN) in fruktoze (FRU) naključnega vzorca (normalna kakovost, 6 dni zoren) ter standardni dodatek teh monosaharidov. ....	49
Slika 14:	Primer kromatograma (v ESI- načinu) glukoze (GLK), galaktoze (GAL), manoze (MAN) in fruktoze (FRU) naključnega vzorca (normalna kakovost, 10 dni zoren). ....	49
Slika 15:	Primer kromatogramov HCA, pridobljenih v MRM načinu za kvantitativno določitev (A, B) in za identifikacijo (C, D) z masnimi ( $m/z$ ) ionskimi prehodi ( $[M+H]^+ \rightarrow$ fragment). A – mešanica standardov HCA (1,0 $\mu\text{g/g}$ ), B – vzorec (normalna kakovost, 10 dni zoren, $T_s = 95^\circ\text{C}$ ), C – mešanica standardov HCA, D – vzorec (BMV kakovost, 10 dni zoren, $T_s = 95^\circ\text{C}$ ). ....	53
Slika 16:	Vpliv časa zorenja na vsebnost skupnih prostih aminokislin v presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča dveh kakovosti. ....	63
Slika 17:	Vsebnost vseh HCA (ng/g) v nezorenih (1 dan <i>post mortem</i> ) in zorenih dolgih hrbtnih mišicah prašiča, normalne in BMV kakovosti, pečenih na dvoploščnem žaru do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ).....	68

Slika 18:	Odvisnost med časom pečenja in izcejo pri pečenju različno zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča normalne (NORM) in BMV kakovosti na dvoploščnem žaru.....	71
Slika 19:	Odvisnost med vsebnostjo PhIP (ng/g) in vsoto levcina, izolevcina, fenilalanina in tirozina (ILLEPHTY, mg/100 g) v zorenih dolgih hrbtnih mišicah prašičev pri različnih središčnih temperaturah (70 °C in 95 °C).....	72

## PRILOGE

Priloga A:	Ponovljivost med paralelkami pri določanju vsebnosti vode, intramuskularne maščobe (IMF), beljakovin, skupnih mineralnih snovi, deleža neproteinskega dušika (NPN) in vrednosti pH, merjene v ekstraktu, v presni dolgi hrbtni mišici prašiča.....	102
Priloga B:	Lastnosti aminokislin in njihovih derivatov ter nekateri LC-MS parametri.....	103
Priloga C:	Ključni podatki izbranih reducirajočih sladkorjev in nekateri LC-MS parametri.....	104
Priloga D:	Nekateri MS parametri in masni prehodi HCA v MRM načinu.....	104
Priloga E:	Ponovljivost določanja vsebnosti prekurzorjev HCA znotraj paralelke naključnega vzorca (presna dolga hrbtna mišica prašiča). ....	105
Priloga F:	Ponovljivost določanja vsebnosti prekurzorjev HCA med paralelkami v naključni presni dolgi hrbtni mišici prašiča.....	106
Priloga G:	Ponovljivost določanja vsebnosti HCA znotraj paralelke naključnega vzorca. ....	107
Priloga H:	Ponovljivost določanja vsebnosti HCA med paralelkami naključnega vzorca. ....	107
Priloga I:	Validacijski parametri določanja vsebnosti prekurzorjev HCA. ....	108
Priloga J:	Validacijski parametri določanja vsebnosti HCA. ....	109

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADP	adenozindifosfat
AIA	aminoimidazo-azaareni
ALA	alanin
ANS	anserin
ARA	arabinoza
ARG	arginin
ASN	asparagin
ASP	asparaginska kislina
ATP	adenozintrifosfat
A $\alpha$ C	2-amino-9H-pirido[2,3- <i>b</i> ]indol
BMV	bleda, mehka in vodena kakovost mišičnine
CAR	karnozin
C-C	cistin
CID	fragmentacijska celica, angl. (Collisonally Induced Dissociation)
CIT	citruilin
Cr	kreatin
Crn	kreatinin
CTH	cistationin
CYS	cistein
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ESI	ionizacija z elektrorazprševanjem
FRU	fruktoza
GLK	glukoza
GLN	glutamin
GLU	glutaminska kislina
Glu-P-1	2-amino-6- metil-dipirido[1,2-a:3',2'- <i>d</i> ]imidazol
Glu-P-2	2-amino-dipirido[1,2-a:3',2'- <i>d</i> ]imidazol
GLY	glicin
harman	9-metil-9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido[3,4- <i>b</i> ]indol oziroma 9-metil- $\beta$ -karbolin
HCA	heterociklični aromatski amini
HC-CH	homocistin
HIS	histidin
HPLC-MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masnim spektrometrom
HYP	4-hidroksiprolin
ILE	izolevcin
ILLEPTY	izolevcin, levcin, fenilalanin in tirozin
IQ	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinolin
IQx	2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
KSI	ksiloza
LD	dolga hrbtna mišica ( <i>longissimus dorsi</i> )
LEU	levcin
LYS	lizin
MAL	maltoza
MALTRI	maltotrioza
MAN	manoza
MCX	mešan kationski in hidrofobni izmenjevalec

MeA $\alpha$ C	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3- <i>b</i> ]indol
MeIQ	2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinolin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
MET	metionin
Milli-Q	prečiščena Milli-Q voda (RIOs 5 + Milli-Q Gradient System, Millipore S.A., France)
MRM	angl. Multiple Reaction Monitoring
MS	masni spektrometer
N	strižna sila mišičnine izražena v Newtonih
norharman	9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido[3,4- <i>b</i> ]indol oziroma $\beta$ -karbolin
NPN	neproteinski dušik
ORN	ornitin
<i>p.m.</i>	<i>post mortem</i> (obdobje po zakolu živali)
FAA	proste aminokisljine
pH <sub>24</sub>	vrednost pH merjena 24 ur <i>post mortem</i>
pH <sub>45</sub>	vrednost pH merjena 45 minut <i>post mortem</i>
PHE	fenilalanin
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i> ]piridin
PCr	kreatin fosfat
PRO	prolin
PROC CORR	korelacije (angl. Correlations)
PROC GLM	splošni linearni model (angl. General Linear Model)
PROC TTEST	t-test v paru (angl. T-test Paired)
PSE	BMV kakovost mišičnine, angl. (Pale, Soft and Exudative)
r	Pearsonov korelacijski koeficient
r <sup>2</sup>	koeficient determinacije
RAM	ramnoza
RČN	rdeča, čvrsta, normalna kakovost mišičnine
RIB	riboza
RMV	rdeča, mehka in vodena kakovost mišičnine
RP-LC	tekočinska kromatografija z obrnjeno fazo
SER	serin
SIR	angl. Selected Ion Recording
SPE	ekstrakcija s trdno fazo, angl. (Solid Phase Extraction)
SpVV	sposobnost za vezanje vode
TAU	tavrin
TCA	trikloroocetna kislina
TČS	temna, čvrsta in suha kakovost mišičnine
THR	treonin
TN	skupen dušik
TriMeIQx	2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5- <i>f</i> ]kinoksalin
TRP	triptofan
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3- <i>b</i> ]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3- <i>b</i> ]indol
T <sub>s</sub>	središčna temperatura
TYR	tirozin
VAL	valin
WBSF	Warner-Bratzlerjeva strižna sila
z	naboj iona

## 1 UVOD

Meso je zaradi svoje zelo kompleksne sestave, visoke biološke in hranilne vrednosti pomembno živilo naših vsakdanjih jedilnikov. Večji del mesa se toplotno obdelava in nato zaužije. Med suhimi postopki (pečenje, praženje in cvrenje) toplotne obdelave mesa, rib in njihovih izdelkov se v večji ali manjši meri tvorijo zdravju škodljive spojine, kot so heterociklični aromatski amini (HCA).

V razvitih deželah se povečuje število civilizacijskih bolezni, med njimi tudi rak. Iz raziskav ugotavljamo, da je dolgoročno uživanje hrane, ki vsebuje prokarcinogene spojine lahko nevarno, saj je tretjina vseh onkoloških obolenj neposredno povezanih z načinom prehranjevanja. Skupna lastnost vseh karcinogenih dejavnikov je, da spremenijo celično DNA. HCA so spojine z visokim mutagenim in karcinogenim potencialom, zato lahko poškodujejo DNA in povzročijo nastanek raka na različnih organih. Raziskave na podganah in primatih kažejo, da HCA-DNA povezave nastajajo skoraj v vseh tkivih. Četudi se samo nekaj metabolitov HCA veže na DNA, je to lahko dovolj za nastanek tumorjev in drugih toksičnih učinkov. Te ugotovitve so močno povečale zanimanje za izvedenost vpliva HCA na karcinogenezo pri človeku. Zato raziskave potekajo na področjih nastanka in vsebnosti HCA v hrani, vnosa HCA v telo, biološke razpoložljivosti HCA, biotransformacije HCA v organizmu in učinkov HCA v bioloških sistemih.

Ocene tveganja zauživanja HCA večinoma še vedno temeljijo na ekstrapolaciji rezultatov, dobljenih v raziskavah na živalih. Glede na že znane ugotovitve se ocenjuje, da je obseg vnosa HCA v telo zelo spremenljiv (tudi za faktor 1000), saj je vnos HCA v organizem odvisen od številnih dejavnikov (npr. od vrste živila itd.). Določanje in izvedenost HCA v hrani je zahtevno delo, ker HCA nastajajo v majhnih količinah (ppb) v kompleksnih živilih (meso, ribe).

Tvorba HCA je odvisna od vrste hrane (vsebnosti prekurzorjev, prisotnosti inhibitorjev ali stimulatorjev, vsebnosti maščob in vode ter vrednosti pH medija), načina in pogojev toplotne obdelave (temperatura in čas). HCA nastanejo predvsem z neencimskim porjavenjem oziroma Maillardovo reakcijo. Ugotovljeno je, da so prekurzorji HCA proste aminokisliline in monosaharidi, in da je za tvorbo polarnih HCA obvezna prisotnost kreatina oz. kreatinina. Ker natančni mehanizmi nastanka HCA še vedno niso povsem znani, ostajajo predmet nadaljnjih raziskav.

HCA se večji del raziskujejo v različnih modelnih sistemih. Ker ti rezultati povedo premalo za izvedenost vsebnosti HCA v vsakodnevni prehrani, se trend raziskav usmerja na bolj kompleksne sisteme kot so živila. V preteklosti so določali HCA predvsem v mesu in mesnih izdelkih, obdelanih do visokih središčnih temperatur, ki pa se v praksi pri pripravi hrane ne uporabljajo. Zato smo v naši raziskavi prašičje meso toplotno obdelali le do običajnih središčnih temperatur.

## 1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

V raziskavi smo želeli ugotoviti vpliv kakovosti (normalne in BMV), vpliv stopnje proteolize oz. časa zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) in vpliv stopnje pečenosti do dveh središčnih temperatur (70 °C in 95 °C) oz. časa pečenja, na nastanek mutagenih in karcinogenih HCA v dolgi hrbtni mišici prašiča. Primerjalnih raziskav, ki bi proučevale vpliv kakovosti mišičnine v povezavi s proteolizo in stopnjo pečenosti mesa prašičev, v dostopni literaturi nismo zasledili.

Z rezultati raziskave smo želeli prispevati k večjemu poznavanju problematike HCA, še zlasti k realnim ocenam vnosa HCA v organizem. Pokazati smo želeli, da lahko tako v gospodinjstvu kot tudi v gostinstvu, s preudarno izbiro surovine (svežega mesa) in premišljeno pripravo le te, naredimo okusne in gastronomsko privlačne mesne jedi z manj ali pa skoraj brez zdravju nevarnih HCA.

Naše raziskovalno delo je temeljilo na naslednjih hipotezah:

- da bo vsebnost HCA v toplotno obdelanem prašičjem mesu BMV kakovosti drugačna kot pri mesu normalne kakovosti,
- da se bo z zorenjem mesa prašičev povečala vsebnost vseh posameznih prostih aminokislin, in, da bo posledično nastalo med toplotno obdelavo več HCA,
- da bodo v večji količini nastali HCA pri pečenju do višje središčne temperature kot pri pečenju do nižje središčne temperature.

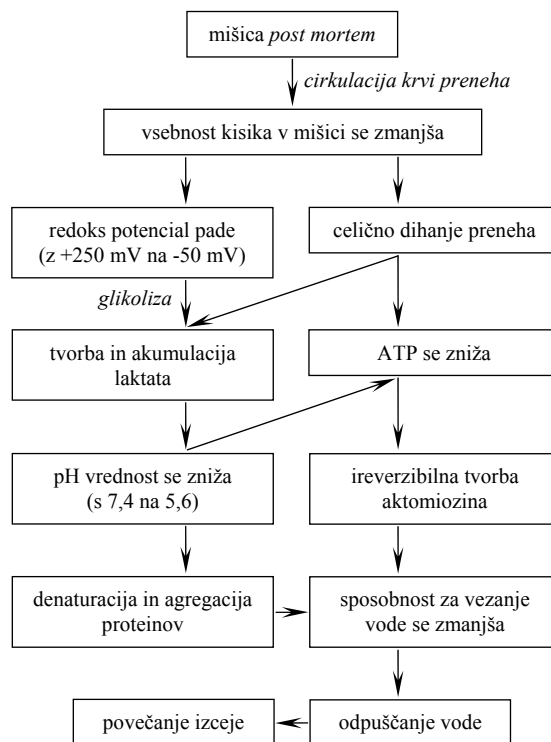


## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIOKEMIJSKE IN STRUKTURNE SPREMEMBE V MIŠIČNINI PO ZAKOLU

#### 2.1.1 Konverzija mišice v meso

Pretvorba skeletne mišice v meso je kompleksen proces, v katerem so vsi odgovorni mehanizmi za oblikovanje kakovosti mesa zelo verjetno medsebojno odvisni. Po izkrvavitvi nastane v mišici neobičajno stanje brez kisika in dotoka hranil. Takšno stanje povzroči programirano celično smrt, t.j. apoptozo (program 'samomor'), ki je vodena preko centralnega živčnega sistema ali preko celice same. V celičnih mitohondrijih se tvorijo kisikovi radikali, ki iniciirajo avtokatalitični proces. Apoptoza se začne neposredno po izkrvavitvi in se nadaljuje tako dolgo, dokler so za apoptozo odgovorni encimi aktivni. Apoptoza v umirajoči celici inducira številne biokemijske in strukturne spremembe, ki se kažejo v mišici *post mortem* (*p.m.*). Pretvorba mišice v meso se odvija v treh zaporednih stopnjah: stopnja pred *rigor*, stopnja *rigor* in stopnja mehčanja mesa (Ouali in sod., 2006).



Slika 1: Shematičen prikaz zgodnjih sprememb v mišici *post mortem* in njihov vpliv na sposobnost vezanja vode (Toldrá, 2003: 3)

Figure 1: Scheme summarising early *post mortem* changes in muscle and its influence on water binding (Toldrá, 2003: 3).

Energijsko bogate rezervne spojine (glikogen, kreatin fosfat in triacilgliceroli) so v aktivni mišici vključene v vzdrževanje homeostaze celične energije ATP. Ohranjanje homeostaze v živi mišici je po izkrvavitvi onemogočeno, ker se prekine dotok kisika, energijsko bogatih spojin (npr. glukoze) in odtok razgradnjih produktov (npr. laktata). Živčni sistem

preneha delovati v 15-ih do 30-ih minutah *post mortem* in tako onemogoči delovanje številnih fizioloških uravnalnih mehanizmov, ki krmilijo presnovne procese po nevrolni in/ali hormonski poti. Odsotnost kisika onemogoči celici oksidativno porabo energijskih rezerv v mitohondrijih. Zato se celični metabolizem preusmeri v energijsko manj donosno anaerobno tvorbo ATP. Po zakolu se ATP v mišici takoj porablja za: (1) nehoteno počasno kontrakcijo mišic, (2) zagotavljanje membranskega potenciala in (3) vzdrževanje  $\text{Ca}^{2+}$  ionov znotraj sarkoplazemskega retikuluma (Pösö in Puolanne, 2005). Poraba energije ATP iniciira verigo biokemijskih reakcij, ki omogočijo razgradnjo energijskih rezerv. Maščobne rezerve energijsko bogatih triacilglicerolov ostanejo *post mortem* skoraj nespremenjene, saj se razgradnja do maščobnih kislin zaradi pomanjkanja kisika upočasni in ustavi. Kreatin fosfat omogoča relativno hitro resintezo ATP s pomočjo encima kreatinkinaza do 30 min *post mortem*. Adenilat-kinaza omogoča tvorbo ATP in AMP (adenozinmonofosfat) iz dveh molekul ADP (adenozindifosfat). Mišični celici je *post mortem* omogočeno, da porablja energijske rezerve mišičnega glikogena, ki je sestavljen iz tisočih enot glukoze (Honikel, 2004; Lehninger, 2005). Glikogen omogoča homeostazo ATP (8-10  $\mu\text{mol/g}$ ), dokler vsebnost laktata ne doseže polovice končne. Nato se vsebnost ATP zmanjša (Pösö in Puolanne, 2005). Fosforilirane glukozne enote, encimsko odcepljene z glikogena, se kot energijski prekursor vključijo v anaerobno tvorbo laktata. Nastali prosti vodikovi ioni znižajo pH mišice z ca. 7,2 na okrog 5,6. Tvorba laktata ter ATP se zaključi po eni uri do trideset ur *post mortem*. To se zgodi zaradi znižanja vrednosti pH in posledično inaktivacije glikolitičnih encimov (Honikel, 2004; Lehninger, 2005). Glikoliza se zaključi hitreje v mišičnini perutnine in prašičev kot v mišičnini jagnjetine in govedine. V mišičnini prašičev, iz katere nastane BMV kakovost mesa, se lahko glikoliza zaključi v eni uri ali manj (Honikel, 2004).

*Rigor mortis* se pojavi, ko se vsebnost ATP zmanjša na 1  $\mu\text{mol/g}$  (Pösö in Puolanne, 2005). Mišice se zaradi manjše vsebnosti ATP postopno krčijo (normalno 10-15 %), postajajo rigidne in izgubijo elastičnost (Honikel, 2004). Aktin in miozin se v odsotnosti ATP postopno trdno povežeta v ireverzibilen aktomiozinski kompleks. Ugotovljeno je bilo, da se skrajšanje *rigor mortis* zgodi v večjem ali manjšem obsegu v vsaki mišici med glikolizo *post mortem* in da se minimalno skrajšanje razvije pri 15-20 °C. Skrajšanje mišice v rigorju poveča tudi količino izceje. Sposobnost za vezanje vode (SpVV) se zmanjša zaradi izčrpanih zalog ATP in posledično tvorbe aktomiozinskega kompleksa, četudi se *rigor mortis* zgodi pri visoki vrednosti pH. Ko se faza *rigor mortis* zaključi, ostanejo mišice rigidne in neelastične (Lawrie in Ledward, 2006).

### **Sposobnost za vezanje vode**

SpVV je sposobnost mesa, da zadrži lastno ali dodano vodo, ko ga izpostavimo toploti ali tlaku (Brewer, 2004). V mišici je večji del (okrog 95 %) vode proste. Le ta se zadržuje s kapilarnostjo med celicami in med miofibrilami ter elektrostatično v miofibrilah med tankimi in debelimi filamenti. Ostali del (4-5 %) vode je z vodikovimi vezmi vezan na polarne in nabite skupine proteinov, predvsem na miozin in aktin. Gibanje proste vode je zaradi različnih sil bolj ali manj omejeno. Velikost prostora med filamenti (med tankimi ca. 320 Å) se spreminja, saj je odvisna od tipa vlaken, dolžine sarkomere, stanja kontrakcije, vrednosti pH, ionske moči, osmotskega tlaka, prisotnosti dvovalentnih kationov in drugih faktorjev (Xiong, 2004). Šibko bazičen pH (7,2-7,4) ustvari v živi mišici prevladujoč negativen površinski naboj mišičnih beljakovin, kar omogoča večjo

sposobnost vezanja proste vode. Sposobnost beljakovin za vezanje vode se *post mortem* zmanjša, ker se vrednost pH znižuje in približuje izoelektrični točki mišičnih beljakovin ( $\text{pH} \approx 5$ ), pri kateri je površinski naboj beljakovin nevtralen (enako število pozitivnih in negativnih nabojev) (Toldrá, 2003). Ker privlak pozitivnih in negativnih nabojev zmanjša prostor med miofilamenti, se imobilizirana (nemobilna) prosta voda iztisne v sarkoplazmo (Honikel, 2004). Sproščanje  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$  ionov v sarkoplazmo zmanjša elektrostatičen odboj med filamenti, kar povzroči zmanjšanje miofibrilarne strukture in posledično iztiskanje vode. Povečana vsebnost vodikovih ionov povzroči delno denaturacijo miofibrilarnih proteinov in še dodatno odpuščanje vode (Toldrá, 2003). Denaturacija proteinov se pojavi kot rezultat zmanjšane topnosti proteinov, ko se vrednost pH zniža s 6,0 na 5,6 (Brewer, 2004). Denaturacija miozina povzroči krčenje miofibril, kar vpliva na razpršenost (odboj) svetlobe, povečanje izceje in zmanjšanje intenzitete barve (Monin, 2004).

V živi mišici (pH okrog 7) miofilamenti zavzemajo večji del znotraj celičnega prostora in okrog 95 % vode je znotraj celice. Nekaj dni *post mortem* je že 15 % vode zunaj celice. Ta prosta voda je sorazmerno mobilna, zato prehaja po kapilarnem sistemu na površino mesa kot izceja (Honikel, 2004). Povečano odpuščanje vode omogoči povečano izgubo v vodi topnih za kakovost pomembnih spojin, kot so: mioglobin, lizosomalni encimi, nukleotidi, nukleozidi, proste aminokisliline, vitamini in minerali (Toldrá, 2003).

### 2.1.2 Tipi mišic in kakovost mišičnine

Mišica je mozaik različnih tipov mišičnih vlaken, čeprav pri nekaterih prevladuje en tip. Vsako mišično vlakno je edinstveno in ima različne lastnosti. Število vlaken ostaja enako od rojstva naprej, spreminja se le velikost in tip vlakna. Na splošno poznamo tri tipe mišičnih vlaken (Taylor, 2004):

Tip I: počasi krčljiva, rdeča, oksidativna vlakna s prevladujočim oksidativnim metabolizmom, ki vsebujejo več mitohondrijev, več mioglobina, več maščob in manjšo miozin ATP-azno aktivnost.

Tip IIA: hitro krčljiva, intermediarna vlakna z oksidativno-glikolitičnim metabolizmom, ki vsebujejo več mitohondrijev, več mioglobina in večjo miozin ATP-azno aktivnost.

Tip IIB: hitro krčljiva, bela, glikolitična vlakna s prevladujočim glikolitičnim metabolizmom, ki vsebujejo manj mitohondrijev, manj mioglobina in večjo miozin ATP-azno aktivnost. Vlakna tipa IIB so največja.

Vsaka skeletna mišica je edinstvena v svoji različnosti, saj ima svojstveno obliko, sestavo, heterogenost posameznega vlakna in svojstven tip prevladujočega vlakna (Karlssoon in sod., 1999). Tipi mišičnih vlaken se značilno razlikujejo med pasmami, lokacijo mišice in področjem v isti mišici. Poznamo delitev mišic glede na tip mišičnega vlakna, vendar je to napačno in zavajajoče, saj ima večina mišic vse tri tipe vlaken. Znano je, da tip vlakna skupaj z drugimi številnimi dejavniki vpliva na kakovost mesa. Izceja mesa je lahko

povezana z deležem prevladujočega tipa vlakna. Mišice z več hitro-krčljivih vlaken imajo aktivnejši anaerobni metabolizem *post mortem* in zato hitrejše znižanje vrednosti pH ter več izceje (Taylor, 2004).

Prašiči imajo v notranjih mišicah večji delež oksidativnih vlaken tipa I, medtem ko imajo površinske mišice večji delež glikolitičnih vlaken tipa IIB (Klont in sod., 1998). Mišica *longissimus dorsi* prašiča vsebuje okrog 13 % vlaken tipa I, 17 % vlaken tipa IIA in okrog 70 % vlaken tipa IIB (Lengerken in sod., 2002). Na splošno imajo mišice, kot so *longissimus*, *gluteus medius* in *biceps femoris* več glikolitičnih vlaken, ki omogočajo aktivnejšo anaerobno glikolizo *post mortem* in nastanek BMV kakovosti. Mišice z več oksidativnih vlaken pa imajo manj aktivno anaerobno glikolizo *post mortem* in zato manjšo verjetnost za nastanek BMV kakovosti. Glikolitična vlakna tipa IIB imajo večjo vsebnost glikogena kot oksidativna vlakna tipa I in IIA. Bela, glikolitična vlakna imajo več sarkoplazemskega retikuluma kot rdeča, oksidativna vlakna (Bowker in sod., 2000). *Longissimus dorsi* in *semimembranosus* sta glede na vsebnost mioglobina in aktivnost laktat-dehidrogenaze glikolitični mišici, medtem ko sta *masseter* in *trapezius* oksidativni mišici. Vsebnost dipeptidov (karnozin, anserin...) je v glikolitičnih mišicah značilno višja kot v oksidativnih, medtem ko je vsebnost glutamina, tavrina in prostih aminokislin nižja. Zato je količina glutamina, tavrina in prostih aminokislin pokazatelj oksidativne aktivnosti v mišici, medtem ko je količina karnozina in anserina pokazatelj glikolitične aktivnosti (Aristoy in Toldrá, 1998).

Na kakovost mesa vplivajo številni intrinzični – notranji (mišična predispozicija, stresna občutljivost) in ekstrinzični – zunanji (ravnanje z živaljo pred zakolom, tehnologija zakola in pogoji obdelave trupov) dejavniki (Monin, 2004).

Kakovostne lastnosti, kot so kemijska sestava, vsebnost maščob in oksidativna stabilnost, so odvisne predvsem od pasme, genotipa in od strategije pitanja živali, medtem ko sta SpVV in barva odvisni predvsem od naslednjih dejavnikov: ravnanja z živaljo pred zakolom, omamljanja, metode zakola, hlajenja in pogojev skladiščenja (Rosenvold in Andersen, 2003).

Pri normalnem poteku pretvorbe mišice v meso se razvije normalna (RČN – rdeča, čvrsta, normalna) kakovost mesa. Vsakršno odstopanje od normalne kakovosti oblikuje slabšo kakovost mesa (Lengerken in sod., 2002). Poznamo več oblik nenormalne kakovosti mesa: BMV (bleda, mehka, vodena), TČS (temna, čvrsta, suha), TČV (temna, čvrsta, vlažna), kislo meso oz. meso 'tipa Hampshire' (Monin, 2004), RMV (svetlo-rdečkasta, mehka, vodena) in BČN (bleda, čvrsta, normalna) (Cheah in sod., 1998).

Hitrost anaerobne razgradnje glukoze do laktata zelo vpliva na SpVV in barvo mišičnine. Če je vrednost pH po 60 min *post mortem* nižja od 6,0, pomeni, da je vrednost pH prekomerno (nenormalno) znižana. Denaturacija mioglobina poslabša odtenek barve, v skrajnih primerih se lahko razvije celo sivkasta ali rumenkasta barva mesa (Monin, 2004).

### **BMV (bleda, mehka, vodena) kakovost**

Poznamo več oblik BMV kakovosti mesa, ki jim je skupna bleda barva in povečana količina izceje. Različne oblike BMV kakovosti se razvijejo po različnih fizioloških ali biokemijskih mehanizmih.

**Praščji stresni sindrom** (PSS) zelo vpliva na nastanek BMV kakovosti mesa. PSS se pojavi zaradi mutacije halotan (*Hal*) gena RYR1, ki kodira protein (riandin receptor), odgovoren za sproščanje kalcijevih ionov skozi kanale sarkoplazemskega retikuluma (Bowker in sod., 2000; Lengerken in sod., 2002). Pri nekaterih prašičih se razvije **sindrom maligne hipertermije** (MHS), če vdihavajo halotan ali druge halogenirane anestetike, in tudi, če so pred zakolom izpostavljeni stresu (Monin, 2004). Nekontrolirano povečanje kalcijevih ionov v sarkoplazmi *post mortem* zaradi mutacije *Hal* gena in posledično deformacije kalcijevih kanalov, pospeši glikolizo in kopičenje laktata ter tako poveča obseg poškodb. Prašiči podvrženi MHS (*nn*, halotan pozitivni, *Hal*+), imajo takoj po zakolu povišano telesno temperaturo, hkrati pa se jim zelo hitro zniža vrednost pH (Brewer, 2004). Ob tem se pogosto oblikuje BMV kakovost mesa. Intenzivna selekcija za povečanje mesnatosti prašičev pasme Péitrain in Landrace favorizira *n* alel. BMV kakovost mesa se prav tako lahko razvije pri prašičih, ki nimajo *Hal* gena oziroma so halotan negativni (*Hal*-) (Bowker in sod., 2000).

**Kislo meso 'tipa Hampshire'**, ki ima sicer normalno hitrost znižanja vrednosti pH, je tudi blede, nekoliko mehko in vodeno, vendar manj kot BMV kakovost iz *nn* prašičev. Če je vrednost pH mesa nižja od 5,5, pomeni, da je meso kislo. Nižja končna vrednost pH je posledica mutacije gena  $RN^-$ , ki inducira povečano (tudi do 70 %) kopičenje glikogena v sarkoplazmi belih mišičnih vlaken (Monin, 2004; Rosenvold in Andersen, 2003). Nekateri prašiči pasme Hampshire imajo povečano količino mišičnega glikogena in zato povečan obseg anaerobne razgradnje glukoze *post mortem* (Bowker in sod., 2000).

**Stresno inducirana BMV kakovost** mesa je že dolgo znana in se lahko razvije tudi pri stresno neobčutljivih prašičih. Stresno inducirana BMV poškodba je običajno manj obsežna kot pri MHS. Omejena je predvsem na globlje dele stegna in lahko tudi dolge hrbtne mišice (LD). Stres živali pred zakolom ni nujno vir poškodbe pri mesu BMV kakovosti, saj so BMV diskoloracije pogosto opazne tudi pri prašičih z minimalnim stresom pred zakolom, zagotovo pa stres poveča obseg poškodb (Monin, 2004). Stresno občutljive živali vsebujejo mišična vlakna večjega premera (Lengerken in sod., 2002).

Prenehanje cirkulacije krvi po zakolu povzroči kopičenje toplote znotraj mišice in zvišanje temperature tudi preko 42 °C (Brewer, 2004). BMV kakovost mesa se oblikuje zaradi pospešene anaerobne razgradnje glukoze in tvorbe laktata (acidoze), katero spremlja visoka mišična temperatura. Pogosto je opaziti, da imajo mišice prašičev po zakolu temperaturo nad 41 °C ter vrednost pH nižjo od 6,5 (Monin, 2004). Hiter (45-60 min *post mortem*) in nenormalen padec vrednosti pH na okrog 5,5 ob sočasni visoki telesni temperaturi povzroči povečano denaturacijo mišičnih proteinov in posledično slabšo kakovost mesa. Ker je laktat pri visoki temperaturi bolj agresiven, je temperatura mišice kritična za denaturacijo mišičnih proteinov. Zato lahko v teh primerih počasno hlajenje trupov po zakolu poveča obseg BMV kakovosti mesa. Mišica BMV kakovosti ima: slabo SpVV, blede barvo, mehko teksturo, povečano izgubo mase med toplotno obdelavo

(z manjšimi proizvodnimi izkoristki) in suh – 'moknat' občutek v ustih (Keeton in Eddy, 2004).

Pri mišicah BMV kakovosti se propustnost celičnih membran poveča bolj kot pri mišicah normalne kakovosti, kar posledično izcejo še poveča (Honikel, 2004). Sarkoplazemski, miofibrilarni in skupni mišični proteini so pri BMV kakovosti manj topni kot pri drugih kakovostih (RMV, RČN, TČS) mesa (Joo in sod., 1999). Topnost proteinov je mera njihove denaturacije. Pri RMV in RČN kakovosti mesa je denaturacija proteinov majhna, medtem ko je pri BMV kakovosti precejšnja (Laack in Kauffman, 1999).

Kakovost mesa se najpogosteje določa s pomočjo naslednjih meritev: vrednosti pH, barve, in SpVV. Njihova povezanost je kompleksna in nelinearna (Warriss in sod., 2006). Znižanje vrednosti pH je pri BMV in RMV kakovosti zaradi bolj aktivnega anaerobnega metabolizma hitrejše kot pri normalni kakovosti. Razgradnja ATP je pri BMV kakovosti mišičnine zelo hitra, saj se zaloge ATP porabijo v samo dveh urah (Battle in sod., 2001). Meso je vodeno, če je vrednost pH dve uri *post mortem* nižja od 5,8 in izceja večja od 6 %. Meso je blede, če je instrumentalni barvni parameter  $L^*$  višji od 50. Meso je normalne kakovosti, če je vrednost pH dve uri *post mortem* višja od 5,8 ter izceja manjša od 6 %, in če je vrednost  $L^*$  med 44 in 50 (Joo in sod., 1999; Flores in sod., 2000; Toldrá, 2003). Joo in sod. (1999) navajajo, da obarjanje sarkoplazemskih proteinov zelo vpliva na barvo mesa. Na SpVV pa vpliva denaturacija miofibrilarnih proteinov in nizka končna vrednost pH.

Preglednica 1: Parametri kakovosti za devet različnih vzorcev LD prašiča (Joo in sod., 1999).  
Table 1: Quality characteristics of nine different pork LD samples (Joo in sod., 1999).

Kakovost mesa	$L^*$ vrednost (svetlost)	odstotek izceje (%)	končna vrednost pH
ekstremno BMV	57,1	11,6	5,23
BMV	54,0	10,9	5,38
delno BMV	51,8	8,6	5,54
ekstremno RMV	48,4	12,3	5,43
RMV	46,1	8,3	5,49
RČN	46,5	4,0	5,62
RČN	44,0	2,1	5,82
TČS	41,7	0,9	6,14
ekstremno TČS	35,1	0,4	6,5

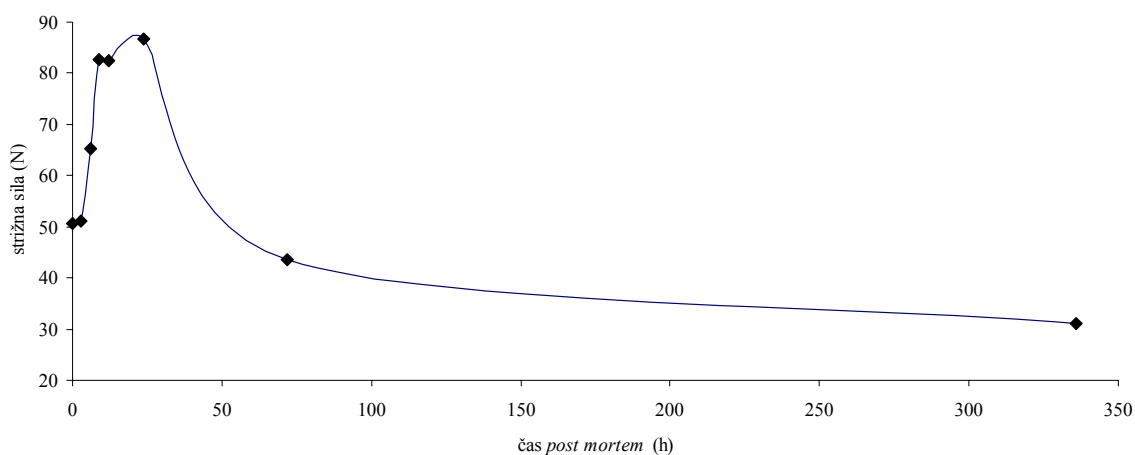
BMV – blede, mehka, vodena; RMV – rdeča, mehka, vodena; RČN – rdeča, čvrsta, normalna; TČS – temna, čvrsta, suha.

### 2.1.3 Zorenje mesa

Tretja stopnja pretvorbe mišice v meso po zaključeni drugi stopnji *rigor mortis* je mehčanje mesa (Herrera-Mendez in sod., 2006; Ouali in sod., 2006). Zorenje je terminološki izraz za proces mehčanja mesa zaradi razgradnje miofibrilarne strukture s pomočjo endogenih proteolitičnih mišičnih encimov (Devine, 2004; Koohmaraie in Geesink, 2006; Ouali in sod., 2006; Sentandreu in sod., 2002). Mehkoba je najpomembnejša lastnost kakovosti mesa (Koohmaraie in Geesink, 2006; Ouali in sod., 2006), ki je odvisna od količine in topnosti vezivnega tkiva, skrajšanja sarkomer med

stopnjo *rigor mortis* in proteolize proteinov po zakolu. Fragmentacija miofibril je ključnega pomena za mehčanje mesa. Verjetno je razgradnja titina in dezmina glavna ultrastrukturalna sprememba, ki določa mehkoobo mesa (Koochmaraie in Geesink, 2006).

Čeprav nekateri raziskovalci menijo, da se zorenje mesa začne takoj po zakolu, lahko razumemo zorenje kot mehčanje mesa po zaključeni fazi *rigor mortis*, ko so mišice najbolj rigidne in neelastične (Devine, 2004). Hitrost mehčanja mesa je odvisna od vrste živali. Da se doseže 80 % maksimalne mehkoobe, je potrebno v hladilniku hraniti meso piščanca 2 dni, prašičje meso 5 dni, jagnječje meso 8 dni, goveje meso in kunčje meso 10 dni. Mehčanje mesa je kompleksen proces, ki vključuje delovanje fizikalno-kemijskih dejavnikov ( $\text{Ca}^{2+}$  ioni, osmozni tlak, oksidativni procesi) in endogenih encimov endopeptidaz (EC 3.4.21-24,99) (Mestre-Prates, 2002).



Slika 2: Mehkooba ovčje mišice *longissimus*, merjena v različnih obdobjih *post mortem* in izražena kot Warner-Bratzlerjeva strižna sila (Koochmaraie in sod., 1996: 2936).

Figure 2: Tenderness of ovine *longissimus*, measured by Warner-Bratzler shear force, at various times *post mortem* (Koochmaraie in sod., 1996: 2936).

Obstaja domneva, da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vplivajo na neencimsko razgradnjo miofibrilarnih struktur in posledično na mehkoobo mesa (Devine, 2004). Sproščanje fosfolipidov se povezuje s povečano vsebnostjo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v fazi *rigor mortis*, kar domnevno vpliva na hidrolizo proteinov, kot so nebulin, dezmin in titin (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Vsebnost prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov je v sarkoplazmi žive (aktivne) mišice pri relaksaciji  $0,1 \mu\text{M}$ , pri kontrakciji pa  $5,0 \mu\text{M}$ . V mišici *post mortem* se vsebnost  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v sarkoplazmi poveča in vpliva na mehčanje mesa neposredno ali posredno z aktivacijo kalpainov, za katere domnevajo, da je njihov vpliv na mehčanje mesa vprašljiv (Ji in Takahashi, 2006). Ouali in Talmant (1990) navajata celo, da med vsebnostjo kalpainov in mehčanjem mesa ni povezave.  $\mu$ -kalpain je pri pogojih, kot so v mesu *post mortem* ( $\text{pH} < 5,89$  in  $T < 15 \text{ }^\circ\text{C}$ ) neaktiven (Ouali in Talmant, 1990). Obstaja možnost, da je  $\mu$ -kalpain aktiven v začetnem obdobju, ko je vrednost  $\text{pH}$  nad  $5,89$  in temperatura nad  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prav tako je v začetni fazi *post mortem* izključen vpliv lizosomalnih katepsinov na mehčanje mesa. Hkrati pa obstajajo zanesljivi dokazi (Ji in Takahashi, 2006):

- da vsebnost  $\text{Ca}^{2+}$  ionov nad  $100 \mu\text{M}$  iniciira razgradnjo dezmina,

- da se  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vežejo na fosfolipide v črti Z, in da sproščanje fosfolipidov vpliva na fragmentacijo miofibril,
- da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni vplivajo na cepitev paratropomiozina s konektina ali titina ter
- da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni iniciirajo razgradnjo konektina, titina in nebulina.

Raziskovalci domnevajo, da se elektrostatične interakcije med fosfolipidi in proteini prekinejo, ko se vrednost pH zniža na 5,5-5,7, in da  $\text{Ca}^{2+}$  ioni počasi difundirajo v sarkoplazmo skozi luknje sarkoplazemskega retikuluma, nastale zaradi sproščanja fosfolipidov, in da se razgradnja miofibrilarne strukture začne, ko vsebnost prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v sarkoplazmi naraste nad 100  $\mu\text{M}$ . Maksimalna vsebnost  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v skeletni mišici *post mortem* se ne spreminja in je zelo verjetno pri vseh sesalcih in perutnini med 210  $\mu\text{M}$  in 230  $\mu\text{M}$ . Pri prašičih je vsebnost  $\text{Ca}^{2+}$  ionov po 40-ih minutah 28  $\mu\text{M}$  in po treh dneh zorenja doseže maksimalno 210  $\mu\text{M}$ , kar je premalo za aktivacijo m-kalpaina, ki zahteva 740  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ionov za polovico maksimalne aktivnosti pri vrednosti pH 7,5 °C in 25 °C. m-kalpain je zaradi premajhne vsebnosti  $\text{Ca}^{2+}$  ionov neaktiven ves čas mehčanja mesa *post mortem*. Zdi se, da imata  $\mu$ -kalpain in m-kalpain zelo malo vpliva na mehčanje mesa (Ji in Takahashi, 2006).

Obstajata pa dve trditvi, ki nasprotujeta neencimski teoriji kalcijevih ionov pri mehčanju mesa, in sicer (Geesink in sod., 2001):

- ni dokazov, da se dolžina sarkomere v fazi *post rigor* poveča, in
- da vsebnost prostih  $\text{Ca}^{2+}$  ionov verjetno vpliva na razgradnjo strukture mesa posredno preko aktivacije kalpainskega sistema in ne neposredno.

Kot smo že omenili je prva stopnja zorenja mesa zagotovo apoptoza. V program celične smrti so kot prve aktivne peptidaze vključene kaspaze, ki imajo primarno vlogo pri razgradnji ključnih proteinov, vključenih v kompleks specializirane miofibrilarne strukture znotraj celice (Ouali in sod., 2006). V začetku *post mortem* je opaziti razgradnjo veznih proteinov med miofibrilami in sarkolemo. Miofibrile zavzemajo skoraj 80 % volumna mišične celice, zato ima njihova razgradnja velik vpliv na mehčanje mesa (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Razgradnja miofibrilarnih proteinov, predvsem znotraj segmenta I in črte Z, poveča lomljivost in fragmentacijo miofibril (Koochmaraie in Geesink, 2006). Hidrolizo celičnih struktur in organel omogoča sinergistično delovanje endogenih proteolitičnih sistemov (peptidaz), ki vključujejo katepsine, kalpaine, proteasome in še druge encime (Sentandreu in sod., 2002; Ouali in sod., 2006).

Proteoliza so vse biokemijske reakcije odgovorne za razgradnjo sarkoplazemskih in miofibrilarnih proteinov, ter nadaljnjo hidrolizo polipeptidov in peptidov do krajših peptidov ter prostih aminokislin. Skeletne mišice vsebujejo številne encime, ki katalizirajo hidrolizo, bodisi notranjih peptidnih vezi (katepsini, kalpainsi) ali peptidov z njihovih terminalnih koncev (tri- in di-peptidilpeptidaze ter amino- in karboksipeptidaze) (Toldrá, 2004). Drugi encimski sistemi, kot so serinske proteaze, proteasomske endopeptidaze in matriksne metalopeptidaze, so prav tako lahko vključeni v proteolizo *post mortem* (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). V razgradnjo strukturnih proteinov se vključijo kot prvi kalpainsi in nato od ATP-odvisni ubikvitin ali proteasom (Devine, 2004). Proteasom (EC 3.4.22.17) je multikatalitičen endopeptidazni kompleks.



Kaspaze so nevtralne cisteinske peptidaze s specifičnim delovanjem. Sposobne so cepiti peptidne vezi za asparaginsko kislino. Njihova aktivnost se z znižanjem vrednosti pH zmanjša podobno kot pri kalpainih in proteasomih (Sentandreu in sod., 2002; Ouali in sod., 2006).

Kalpainski sistem je glavni proteolitični sistem, odgovoren za večji del strukturnih sprememb v začetnem obdobju *post mortem* (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004; Koohmaraie in Geesink, 2006; Ouali in sod., 2006). Kalpaini so nevtralne proteaze z največjo aktivnostjo pri pH 7,5 in temperaturi 25 °C. Za svoje delovanje potrebujejo kalcijeve ione. Kalpainski proteolitični sistem vsebuje v skeletni mišici najmanj tri vrste proteaz ( $\mu$ -kalpain, m-kalpain, kalpain-3) in inhibitor kalpastatin. Pomembna lastnost večine kalpainov je, da so sposobni avtolize, kar zmanjša njihovo aktivnost. m-kalpain v *post mortem* ni sposoben avtolize. Kalpain-3 in m-kalpain nista vključena v mehčanje mesa *post mortem*, medtem ko je za to verjetno edini odgovoren  $\mu$ -kalpain (Koohmaraie in Geesink, 2006). Na aktivnost encima  $\mu$ -kalpaina vplivajo številni dejavniki, kot so: hitrost znižanja vrednosti pH *post mortem*, končna vrednost pH, vsebnost kalpastatina, znižanje temperature ter inaktivacija  $\mu$ -kalpaina zaradi avtolize ali denaturacije (Toldrá in Flores, 2000). Kalpaini razgrajujejo proteine, ki so v črti Z ali blizu nje. Zato imajo glavno vlogo pri mehčanju mesa (Toldrá, 2003). Dokazano je, da kalpaini razgrajujejo naslednje mišične proteine: C-protein, M-protein, titin, nebulin, troponin T, dezmin, sinemin, distrofin, talin in vinkulin. Razgradnja teh proteinov je povezana z razgradnjo miofibrilarnih struktur in mehčanjem mesa. Kalpaini potrebujejo za aktivacijo ione kalcija. Za polovico maksimalne aktivnosti potrebujejo  $\mu$ -kalpaini 1-30  $\mu$ M in m-kalpaini 100-750  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  ionov (Devine, 2004). Njihova aktivnost se s časom zorenja spreminja zaradi znižanja vrednosti pH in visoke ionske moči. Dokazano je, da se  $\mu$ -kalpaini v govedini in mesu prašičev močno povežejo z miofibrilami. Domneva se, da ta povezava omogoči aktivno delovanje  $\mu$ -kalpainov (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Čeprav je nevtralen pH optimalen za aktivno delovanje, ostanejo kalpaini učinkoviti tudi pri nižji vrednosti pH v fazi *rigor mortis*. Meso se značilno mehča tudi po dveh dneh *post mortem*, ko se količina kalpainov zmanjša (Devine, 2004).

Katepsini so najbolj učinkoviti v kislem pH (*katepsin B* med 5,5 in 6,5; *katepsin H* med 6,5 in 6,8; *katepsin D* med 3,0 in 5,0; *katepsin L* med 5,5 in 6,5; *katepsin S* med 6,0 in 6,5; *katepsin K* med 6,0 in 6,5; *katepsin F* med 5,2 in 6,8). Odgovorni so za razgradnjo številnih proteinov v mišici, vključno z miozinom in aktinom (Sentandreu in sod., 2002). Glavna miofibrilarna proteina miozin in aktin se pri normalnih pogojih skladiščenja ne razgradita v prvem tednu po zakolu živali, ampak šele po daljšem času zorenja. Njunjo razgradnjo lahko pospešimo z relativno visoko temperaturo. V začetnem obdobju *post mortem*, ko se oblikuje mehka mesa, je delovanje katepsinov pri normalnih pogojih skladiščenja do določene mere omejeno (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). Katepsini verjetno ostajajo aktivni daljše obdobje zorenja mesa (Devine, 2004).

C-protein, M-protein, troponin T, titin, nebulin in dezmin so miofibrilarni in citoskeletni proteini, ki se razgradijo že v začetni fazi *post mortem*, medtem ko je razgradnja miozina in aktina v tej fazi neznatna (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004; Devine, 2004).

Preglednica 2: Najpomembnejše mišične proteaze vključene v proteolizo (Toldrá, 2004).

Table 2: Summary of the most important muscle proteases involved in proteolysis (Toldrá, 2004).

Ime encima	EC št. št.	lokacija	glavni substrati	glavni produkti	optimalen pH
katepsin B	3.4.22.1	lizosomi	miozin, aktin, kolagen	polipeptidi	5,5-6,0
katepsin H	3.4.22.16	lizosomi	miozin	peptidi, aminokislina	6,8
katepsin D	3.4.23.5	lizosomi	miofibrilarni proteini	polipeptidi	4,0
katepsin L	3.4.22.15	lizosomi	miofibrilarni proteini, kolagen	polipeptidi	5,5-6,0
μ-kalpain	3.4.22.17	Z-črta	proteini Z-črte, titin, nebulin, troponini, tropomiozin	polipeptidi, peptidi	7,5
m-kalpain	3.4.22.17	Z-črta	proteini Z-črte, titin, nebulin, troponini, tropomiozin	polipeptidi, peptidi	7,5
dipeptidilpeptidaze I	3.4.14.1	lizosomi	Ala-Arg-polipeptidi, Gly-Arg-polipeptidi	dipeptidi	5,5
dipeptidilpeptidaze II	3.4.14.2	lizosomi	Gly-Pro-polipeptidi	dipeptidi	5,5
dipeptidilpeptidaze III	3.4.14.4	citosol	Gly-Pro-polipeptidi	dipeptidi	8,0
dipeptidilpeptidaze IV	3.4.14.5	membrane	Arg-Arg-polipeptidi, Ala-Arg-polipeptidi	dipeptidi	7,5-8,0
tripeptidilpeptidaze I	3.4.14.9	lizosomi	Gly-Pro-X-polipeptidi	tripeptidi	4,0
tripeptidilpeptidaze II	3.4.14.10	citosol	Ala-Ala-Phe-polipeptidi	tripeptidi	6,5- 7,5
alanil-aminopeptidaze	3.4.11.14	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	vse aminokislina	6,5
aminopeptidaze B	3.4.11.6	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	Arg, Lys	6,5
metionil aminopeptidaze	3.4.11.18	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	Met, Ala, Lys, Leu	7,5
levcil-aminopeptidaze	3.4.11.1	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	Leu, Met	9,0
piroglutamil-aminopeptidaze	3.4.19.3	citosol	polipeptidi, peptidi (na amino terminalnem koncu)	piroglutaminska kislina	8,5
karboksipeptidaze A	3.4.16.1	lizosomi	polipeptidi, peptidi (na karboksi koncu)	hidrofobne aminokislina	5,2-5,5
karboksipeptidaze B	3.4.18.1	lizosomi	polipeptidi, peptidi (na karboksi koncu)	vse aminokislina	5,0

### 2.1.3.1 Nепroteinski dušik

Mišični proteini vsebujejo skupaj okrog 16 % celokupnega dušika (Keeton in Eddy, 2004). Okrog 95 % skupnega mišičnega dušika izvira iz proteinov, medtem ko je preostalih 5 % iz drugih dušikovih spojin, ki pa niso del proteinov. Nепroteinski dušik vsebujejo: proste aminokislina, kratki (di)peptidi (karnozin, anserin...), kreatin, kreatin fosfat, kreatinin, nekateri vitamini, nukleozidi, nukleotidi, urea ipd. (Olsson, 2004; Bruas-Reignier in

Brun-Bellut, 1996). Količina neproteinskega dušika se *post mortem* poveča, zaradi proteolitične aktivnosti encimov (Benito in sod., 2003).

### ***Proste aminokislina in dipeptidi***

Proste aminokislina (angl. *Free Amino Acids*, okr. FAA) in dipeptidi so manjše molekule, ki vsebujejo najmanj eno karboksilno in amino skupino ter različne stranske verige (Leth, 2004). Količina prostih aminokislin in dipeptidov je odvisna od: metabolizma mišice, fizične aktivnosti in prehrane živali, ter od zorenja mesa *post mortem* oz. proteolize z endogenimi ali eksogenimi encimi mikroorganizmov. Segrevanje in toplotna obdelava mesa prav tako lahko inducirata hidrolizo proteinov (Felton in sod., 2000; Cornet in Bousset, 1999; Armero in sod., 1999). Znano je, da se količina skoraj vseh prostih aminokislin *post mortem* poveča zaradi delovanja mišičnih proteaz v procesu proteolize, in tudi, da večja vsebnost prostih aminokislin izboljša (oplemeniti) okus mesa. Različna aktivnost različnih tipov endo- in eksopeptidaz vpliva na različno sestavo prostih aminokislin (Watanabe in sod., 2004). Hidroliza polipeptidov in peptidov z amino-, karboksi-, di-, tripeptidazami do aminokislin je zadnja stopnja proteolitične verige biokemijskih reakcij. Alanil-aminopeptidaze so glavne nespecifične eksopeptidaze, saj prevladujejo v tem procesu in katalizirajo reakcije z različnimi substrati. Bazične aminokislina (arginin in lizin) nastajajo predvsem zaradi aktivnosti aminopeptidaz B (Toldrá, 2004). Na splošno velja, da pri daljšem procesu proteolize nastane večja količina prostih aminokislin. Glutaminska kislina, alanin, levcin, lizin, valin in asparaginska kislina so aminokislina, ki se običajno pojavljajo v največjih količinah (Toldrá, 2004).

*Tavrin* (2-aminoetansulfonska kislina) je prosta, pogojno esencialna, neproteinska, žveplo vsebujoča  $\beta$ -aminokislina. Je eden končnih produktov metabolizma cisteina pri sesalcih in se izloča v urin. Tavrin ima različne fiziološke funkcije: je nevrottransmitter, antioksidant, osmolit in vpliva na uravnavanje znotrajceličnega kalcija (Mou in sod., 2002).

*Karnozin* ( $\beta$ -alanilhistidin) in *anserin* ( $\beta$ -alanil-1-metil-histidin) sta pomembna v vodi topna dipeptida, ki sta prisotna v številnih tkivih in tudi v skeletnih mišicah sesalcev. Kažeta antioksidativne lastnosti in prispevata k puferski kapaciteti (Bauchart in sod., 2006). Karnozin je kelator, donor vodika ter inaktivator katalizatorjev lipidne oksidacije in radikalov (Aristoy in Toldrá, 1998). Aminoacilhistidin-dipeptidaza (EC 3.4.13.3) katalizira razgradnjo karnozina in anserina v številnih tkivih (jetra, ledvica, krvna plazma), ne pa tudi v skeletnih mišicah. Zato ostajata količini karnozina in anserina med zorenjem mesa relativno konstantni (Bauchart in sod., 2006).

V glikolitičnih mišicah je vsebnost dipeptidov (karnozin, anserin...) značilno večja kot v oksidativnih, medtem ko je vsebnost glutamina, tavrina in prostih aminokislin manjša. Zato je vsebnost glutamina, tavrina in prostih aminokislin v mišici pokazatelj oksidativne aktivnosti, medtem ko je vsebnost karnozina in anserina pokazatelj glikolitične aktivnosti (Aristoy in Toldrá, 1998). Cornet in Bousset (1999) navajata, da vsebujejo oksidativne mišice več asparaginske kisline, glutamina in tavrina, medtem ko vsebujejo glikolitične več karnozina in  $\beta$ -alanina.

Preglednica 3: Vsebnost prostih aminokislin in nekaterih dipeptidov v mišici LD prašiča.  
 Table 3: Free amino acid and natural dipeptide content in the muscles LD from pigs.

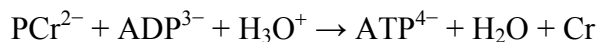
Ime FAA	okrajšava	vir 1	vir 2	vir 3	vir 3	vir 4
		30 min <i>p.m.</i> (mg/100g)	45 min <i>p.m.</i> (mg/100g)	NOR – 2 uri <i>p.m.</i> (mg/100g)	BMV – 2 uri <i>p.m.</i> (mg/100g)	4 ure <i>p.m.</i> (mg/100g)
<b>nepolarne FAA</b>						
<b>alifatske FAA</b>						
glicin	GLY	11,65	6,01	6,33	7,51	6,83
alanin	ALA	-	11,29	11,36	11,83	13,98
prolin	PRO	4,09	2,83	2,35	2,78	2,26
valin	VAL	5,53	2,78	2,63	2,64	3,40
levcin	LEU	2,51	2,43	2,78	2,87	4,07
izolevcin	ILE	3,54	1,52	1,57	1,49	2,43
metionin	MET	1,59	0,90	0,76	0,82	2,14
<b>aromatske FAA</b>						
fenilalanin	PHE	0,87	1,51	1,74	1,88	2,98
tirozin	TYR	1,81	2,11	1,60	1,57	2,52
triptofan	TRP	-	-	0,90	0,98	1,12
<b>polarne FAA</b>						
<b>nevtralne FAA</b>						
serin	SER	3,87	2,02	1,79	2,05	3,18
treonin	THR	2,34	2,86	1,75	1,72	8,40
asparagin	ASN	2,06	0,91	1,04	1,07	1,39
glutamin	GLN	65,38	38,88	28,19	29,31	11,34
<b>bazične FAA</b>						
lizin	LYS	2,66	-	2,98	2,59	4,04
histidin	HIS	-	2,9	1,66	1,71	3,02
arginin	ARG	5,58	5,19	4,85	3,04	3,26
<b>kisle FAA</b>						
asparaginska kislina	ASP	7,02	0,39	0,3	0,18	0,71
glutaminska kislina	GLU	12,17	2,03	2,09	3,05	16,94
<b>FAA skupaj</b>						
		132,67	86,56	76,67	79,09	94,01
<b>druge amino-spojine</b>						
4-hidroksiprolin	HYP	1,45	-	-	-	-
ornitin	ORN	-	0,83	0,53	0,41	0,78
tavrin	TAU	27,69	18,83	24,25	25,2	24,81
anserin	ANS	5,82	14,56	20,83	20,77	21,59
karnozin	CAR	266,54	313,02	479,75	492,02	429,16

Vir 1 – Cornet in Bousset (1999), vir 2 – Aristoy in Toldrá (1998), vir 3 – Flores in sod. (2000), vir 4 – Armero in sod. (1999)

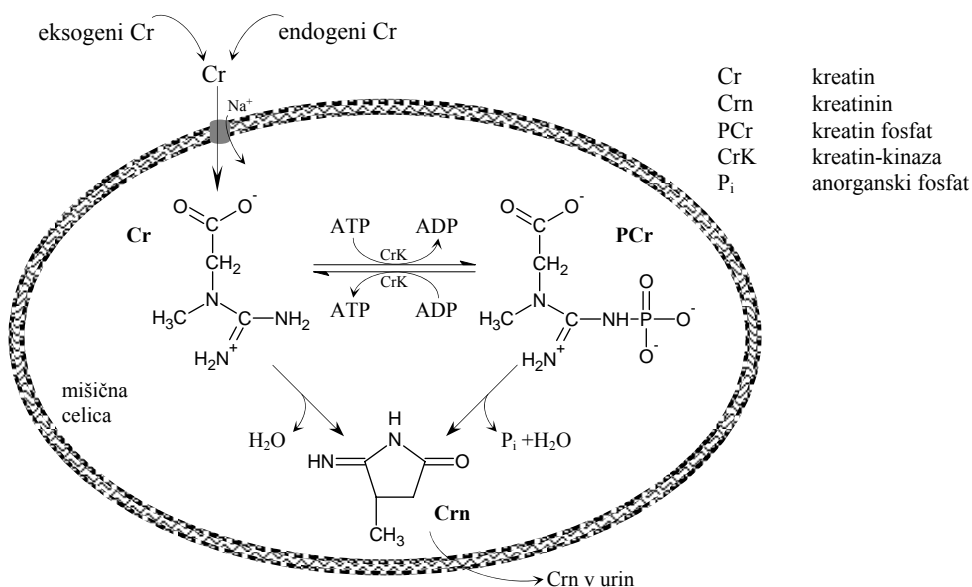
### **Kreatin in kreatinin**

Kreatin (Cr) (metilguanidin-očetna kislina) je neesencialna spojina, ker jo telo lahko tvori iz arginina in glicina (ledvica, trebušna slinavka) ter *S*-adenozilmertonina (jetra). Drugi vir kreatina in kreatinina so živila živalskega izvora (meso, ribe...). Okrog 95 % telesnega kreatina je v skeletnih mišicah, ostali del v srcu, možganih, modih in drugih organih. Endogeni in eksogeni kreatin se transportirata po krvi do tkiv, ki ju potrebujejo. Nad 90 % kreatina prehaja iz krvi v celice z gradientno difuzijo preko Na<sup>+</sup> in Cl<sup>-</sup> odvisnih transportnih proteinov (CreaT protein). Del (ca. 33 %) kreatina ostane v celici nefosforiliranega, drugi del (ca. 67 %) pa se encimsko (kreatin kinaza) fosforilira z ATP do kreatin fosfata (PCr), ki se uporablja pri povečani porabi energije za hitro resintezo ATP. Kreatin in kreatin fosfat se prav tako lahko vključita: (1) v aerobni metabolizem pri pomanjkanju ATP, (2) v tvorbo mišičnih proteinov (3) v uravnavanje kislinsko-baznega ravnotežja (Snow in Murphy, 2001). Vsebnost kreatin fosfata je v skeletni mišici takoj po omamljanju 12-26 mmol/kg in se že med prvo uro *post mortem* zniža na končno vsebnost

okrog 1 mmol/kg (Schäfer in sod., 2002). V mišici se ATP takoj po zakolu porablja za ohranjanje mišične homeostaze (Pösö in Puolanne, 2005). Najbolj direkten vir za nastanek novega ATP je ADP, ki se fosforilira s pomočjo kreatin fosfata (kreatin-kinaza) (Lawrie in Ledward, 2006). Kreatin fosfat se razcepi na kreatin in anorganski fosfat ( $P_i$ ), ki se porabi za ATP, pri čemer se veže en proton (Pösö in Puolanne, 2005):



Mišični kreatin in kreatin fosfat se počasi, ireverzibilno, neencimsko pretvarjata v ciklično obliko kreatinin (Crn), tako da se odcepi voda, pri kreatin fosfatu pa še anorganski fosfat. Kreatinin v neionski obliki ( $pK_b = 5,02$ ) konstantno difundira v kri in se nato izloči v urin. V telesu se dnevno pretvori okrog 1,1 % kreatina in 2,6 % kreatin fosfata v kreatinin (Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000). Manjši del kreatinina se lahko pretvori v druge spojine kot sta arginin in gvanidinobutirat (Snow in Murphy, 2001).



Slika 3: Metabolizem kreatina v mišični celici sesalcev (Spontaneous..., 2007).  
 Figure 3: Creatine metabolism in the mammalian muscle cell (Spontaneous..., 2007).

Kreatin se tudi uporablja kot prehranski dodatek, saj lahko izboljša atletske storilnosti športnikov. Kreatin in kreatinin sta skupaj s prostimi aminokislinami in monosaharidi prekurzorja za nastanek HCA (Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000). Kreatin se prav tako uporablja kot prehranski dodatek prašičem z namenom izboljšati kakovost mesa. Kreatin naj bi *post mortem* upočasnil tvorbo laktata in znižanje vrednosti pH. Domneva se, da lahko kreatin kot prehranski dodatek prašičem poveča SpVV mesa (Pfau in sod., 2006).

### 2.1.3.2 Ogljikovi hidrati

Glikogen (9-10 milijon Da) je razvejan polisaharid premera okrog 40 nm sestavljen iz  $\alpha$ -D-glukočnih (ca. 55000) enot, povezanih z  $\alpha$ -1,4- in  $\alpha$ -1,6-glukozidno vezjo. Aktivna skeletna mišica ga vsebuje 0,5-1,5 %. Deluje kot rezerva kemijske energije. Poraba ATP *post mortem* iniciira glikogenolizo (Pösö in Puolanne, 2005). Glikogen-fosforilaza odceplja z nereducirajočega konca glikogena glukoza-1-fosfat, medtem ko  $\alpha$ -1,6-glukozidaza odceplja prosto glukozo (Nelson in Cox, 2005). V 24-ih urah *post mortem* se vsebnost glikogena zmanjša, medtem ko se vsebnost laktata in glukoze poveča (Maribo in sod. 1999; Keeton in Eddy, 2004). Začetna vsebnost glikogena v prašičji mišici normalne kakovosti je 55-65 mmol/kg in  $\sim$  20 mmol/kg po 24-ih urah *post mortem*, medtem ko je pri BMV kakovosti  $<$  1 mmol/kg 24 ur *post mortem*. Začetna količina glikogena v času zakola živali vpliva na kakovost mesa: barvo, teksturo, SpVV, kapaciteto emulgiranja in mikrobiološko stabilnost (Keeton in Eddy, 2004). Po končani glikolizi ostane vedno nekaj rezidualnega glikogena (10-20 mmol/kg). Pri dobro hranjenih in stresno neobčutljivih živalih ga lahko ostane celo nad 80 mmol/kg, četudi je končni pH 5,5 (Immonen in Puolanne, 2000).

Preglednica 4: Povprečna vsebnost glikogena, laktata, glukoze in glukoza-6-fosfata v mišicah *longissimus dorsi* prašičev 4 min in 30 h *post mortem* (Maribo in sod., 1999).

Table 4: Glycogen, lactate, glucose and glucose-6-phosphate average content in *Longissimus dorsi* muscles from pigs at two times *post mortem* (Maribo in sod., 1999).

parameter <i>post morem</i>	glikogen (mmol/kg)	laktat (mmol/kg)	glukoza (mmol/kg)	glukoza-6-fosfat (mmol/kg)
4 min.	43,1	26,4	1,6	7,6
30 h	8,0	94,5	5,1	6,7

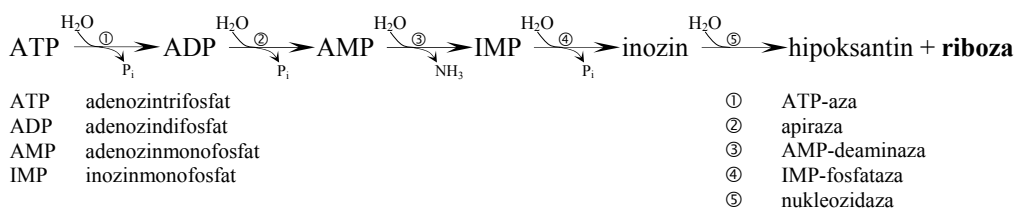
Glikogenolitični in glikolitični encimi ohranijo nekaj aktivnosti tudi pri temperaturah nižjih od 15 °C. Temperatura ima večji vpliv na glikogenolitične encime kot vrednost pH. Znižanje temperature *post mortem* močno zmanjša aktivnost glikogenolitičnih encimov, celo tako, da glikogenoliza kontrolira glikolizo. Pri višjih temperaturah je ta fenomen izključen, saj so glikogenolitični encimi aktivni tudi nad 45 °C. Manjša vsebnost rezidualnega glikogena pri BMV kakovosti mesa je lahko posledica višje temperature, pri kateri poteka glikogenoliza relativno kratek čas (Kylä in sod., 2005).

V modelnih sistemih je bilo potrjeno, da je Maillardova reakcija med reducirajočimi sladkorji (v ta zelo razširjen izraz spadajo vsi mono-, di- ali trisaharidi) in prostimi aminokislinami glavna pot nastanka številnih spojin, ki so: (1) nosilci arome v toplotno obdelanem mesu (Tikk in sod., 2006) in (2) intermediati pri tvorbi karcinogenih spojin – HCA (Knize and Felton, 2004; Murkovic, 2004).

D-glukoza, D-fruktoza, D-riboza in D-manoza v manjši meri ( $<$  100  $\mu$ mol/L) so monosaharidi, ki se običajno pojavljajo v mesu kot rezultat glikolize ali razgradnje nukleotidov (Cambero in sod., 2000).

Prosta glukoza v mišični celici *post mortem* ni prekurzor za tvorbo ATP, ker se glukoza-1-fosfat (produkt razgradnje glikogena) raje vključi v glikolizo (Honikel, 2004).

Eden izmed pomembnih reducirajočih monosaharidov v mesu je tudi riboza (pentoza), ki nastaja med zorenjem mesa z razgradnjo ribonukleotidov. ATP se encimsko razcepi v anorganski fosfat ( $P_i$ ) in ADP, ki se kasneje po defosforilaciji in deaminaciji pretvori v inozinmonofosfat (IMP),  $P_i$  in amoniak. IMP se nadalje razgradi v hipoksantin in ribozo. Encimsko katalizirana razgradnja ATP do riboze (Tikk in sod., 2006) je prikazana spodaj:



Hipoksantin poudari skupaj z določenimi prostimi aminokislinami, anserinom, karnozinom in drugimi dipeptidi grenak priokus zorenega mesa (Tikk in sod., 2006). Stabilnost IMP je odvisna od temperature in vrednosti pH. Dokazano je, da toplotna obdelava mesa poveča količino metabolitov ATP. Višja temperatura toplotne obdelave poveča vsebnost kreatinina, AMP, IMP, inozina in hipoksantina (Cambero in sod., 2000; Tikk in sod., 2006).

## 2.2 TOPLOTNA OBDELAVA MESA IN POJAV HETEROCIKLIČNIH AROMATSKIH AMINOV

### 2.2.1 Fizikalno-kemijske spremembe mesa med toplotno obdelavo

Meso toplotno obdelujemo zato, da: (1) zagotovimo mikrobiološko varnost in (2) oblikujemo želeno senzorično kakovost (Jägerstad in Skog, 2005). Fizikalno-kemijski procesi med toplotno obdelavo mesa vplivajo na spremembe osnovnih komponent mesa, na teksturo, SpVV, barvo, aromo in druge lastnosti toplotno obdelanega mesa. Segrevanje inducira kemijske in encimske reakcije mesa, ki vplivajo: (1) na konformacijo mišičnih proteinov, (2) na encimsko aktivnost, topnost in hidratacijo, (3) na toplotno in hidrolitsko cepitev peptidnih vezi, (4) na toplotno razgradnjo in derivatizacijo prostih aminokislin, (5) na tvorbo novih vezi, (6) na oksidacijo in tvorbo senzorično pomembnih spojin. Na te procese vplivajo: temperatura in čas toplotne obdelave, vrednost pH mesa, oksidacija spojin, antioksidanti, radikali in druge reaktivne spojine (npr. reducirajoči sladkorji) (Palka, 2004). Med toplotno obdelavo se spremeni konformacija mišičnih proteinov, kar se imenuje denaturacija. Interakcije proteinov in nastanki skupkov zmanjšajo topnost proteinov. S toploto inducirana agregacija mišičnih proteinov poteče med 36 °C in 60 °C, lahko pa šele pri temperaturi 90 °C. Denaturirani proteini vplivajo na strukturne spremembe mesa, kot so: porušitev celične membrane, vzdolžno in prečno krčenje mišičnih vlaken, agregacija in tvorba gela sarkoplazemskih proteinov, krčenje in raztapljanje vezivnega tkiva (Tornberg, 2005).

Meso vsebuje 69-75 % vode. Med toplotno obdelavo se, odvisno od metode segrevanja in od končne središčne temperature (70 °C ali 90 °C), vsebnost vode zaradi evaporacije in izceje v mesu zmanjša na 65 % ali 60 %. Ko se središčna temperatura mesa povečuje, se zaradi denaturacije mišičnih proteinov (predvsem miozina) SpVV zmanjša in s tem izceja poveča. Meso z višjo vrednostjo pH izgubi med toplotno obdelavo manj vode in je končno bolj mehko (Palka, 2004), medtem ko jo meso z nižjo vrednostjo pH izgubi več (Rosenvold in sod., 2004).

Matriks mesa je zelo kompleksen in vsebuje številne nehlapne spojine, ki se med toplotno obdelavo vključijo v kompleksno mrežo kemijskih reakcij, v katerih se tvori heterogen sistem vsebujoč številne hlapne in nehlapne spojine (ki sooblikujejo vonj in okus), ojačevalce in sinergiste arome. Tvorijo se različne skupine spojin, in sicer: ogljikovodiki, aldehidi, alkoholi, ketoni, karboksilne kisline, etri, estri, laktoni, S-, N- in O- vsebujoče heterociklične spojine. Spojine, ki se tvorijo iz lipidnih prekurzorjev so: alkanali, alkanoni, alkanoidske kisline, alkanoli,  $\gamma$ -laktoni,  $\delta$ -laktoni in alkilfurani. Spojine, ki se tvorijo iz vodotopnih prekurzorjev pa so: furanoni, pirazini, piridini, pirololi, oksazoli, tiazoli, tiofeni, tritiolani, tritiani, 2-metil-3-furantiol, alkil tioli, alkil sulfidi in alkil disulfidi. Med toplotno obdelavo se mono- in oligosaharidi delno razgradijo do hlapnih furanonov in furfuralov. Proste aminokisline so bolj termostabilne in je zato malo verjetno, da se razgradijo. Piroliza prostih aminokislin lahko poteka pri pečenju na žaru in ražnju, saj lokalna dehidracija na površini mesa omogoči, da se temperatura zviša preko 100 °C, kar posledično sproži karboksilacije in deaminacije. Razgradnja teh spojin poteka v večjem obsegu pri višjih temperaturah, kot se uporabljajo pri običajni pripravi mesa. Proste amino skupine aminokislin in peptidov lahko z reducirajočimi sladkorji reagirajo v kompleksu neencimskih reakcij porjavenja. Produkti Maillardove reakcije se tvorijo v večjem obsegu na površini pečenega mesa, kjer je manjša vsebnost vode, čeprav se lahko v manjšem obsegu tvorijo tudi v vodnih raztopinah (Pegg in Shahidi, 2004).

#### 2.2.1.1 Maillardova reakcija in porjavenje

Maillardova reakcija je skupek kemijskih reakcij, ki se začnejo med karbonilnimi spojinami (reducirajoči sladkorji) in primarnimi ali sekundarnimi amino spojinami. Toplotna obdelava (toplota) inducira Maillardovo reakcijo med vodotopnimi spojinami, ki vsebujejo proste amino skupine (npr. aminokisline, amini, peptidi) in karbonilne skupine (npr. ketoni, aldehidi, reducirajoči sladkorji itd.). Ta reakcija zelo vpliva na oblikovanje arome toplotno obdelanega mesa. Množica reakcij vključuje številne interakcije spojin in njihove razgradnje, kar omogoči nastanek številnih produktov, ki so nosilci arome (Cambero in sod., 2000; Shahidi in sod., 2004).

Maillardova reakcija poteka že pri temperaturah nad 80 °C. Produkti teh reakcij so barvne spojine, ki oblikujejo rjavo barvo (melanoidini) pečene površine in hlapne spojine, ki sooblikujejo aromo pečenega mesa. V prvem koraku Maillardove reakcije se tvorijo  $\alpha$ -dikarbonili, kot so: 1-deoksiozoni, 3-deoksiozoni in 1-deoksireduktoni, preko N-substituiranega glikozilamina in Amadorijevih spojin. Pri razgradnji teh spojin nastanejo furfurali, furanoni in dikarbonili. Te spojine sooblikujejo aromo mesa, in so hkrati glavni intermediati, saj lahko naprej reagirajo z amini, aminokislinami, vodikovim sulfidom, tioli, amoniakom, acetaldehidom in drugimi aldehidi, in tako tvorijo N-, S- in O-heterociklične

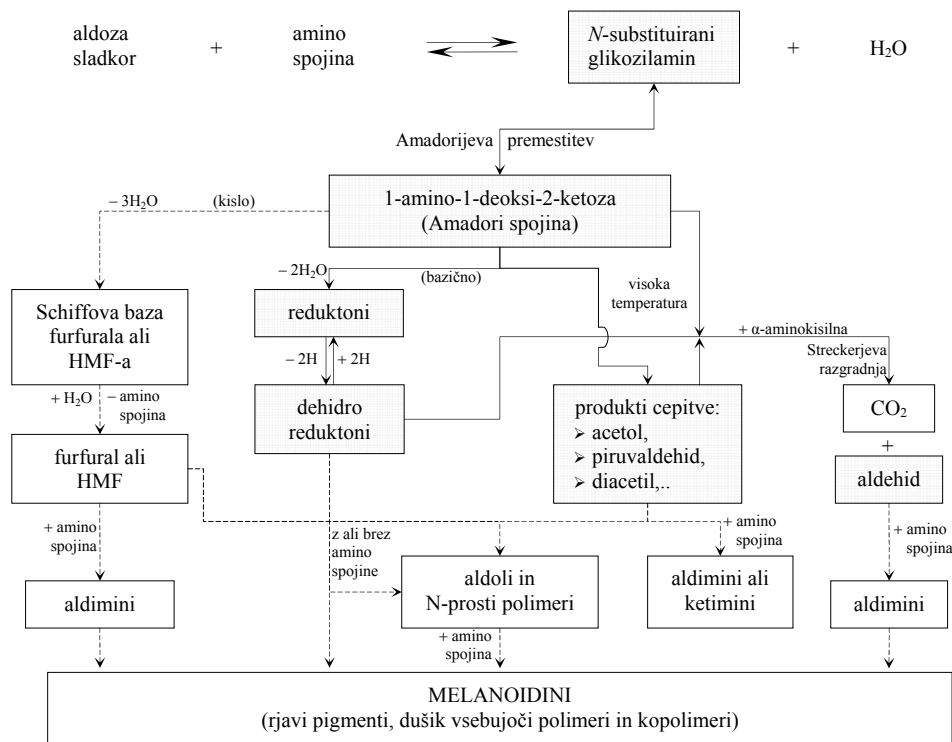


produkte, kot so: furani in njihovi derivati, furanoni, ketoni, alkoholi, ciklični etri, pirol, piridini, pirazini, imidazoli, oksazoli, oksazolini, ciklični etilen sulfidi, alkil sulfidi, disulfidi, tioli, tiofeni, tiazoli, tiazolini in druge heterociklične spojine (Pegg in Shahidi, 2004).

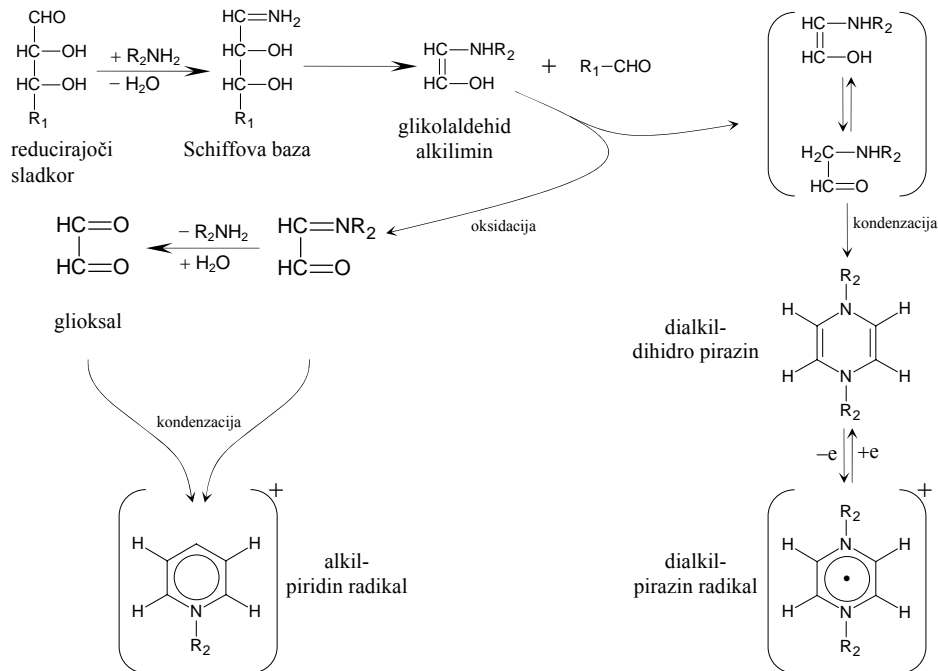
Na produkte Maillardove reakcije vpliva temperatura in čas toplotne obdelave, vodna aktivnost, vsebnost vode, vrednost pH in vsebnost prekurzorjev. Vsebnost barvnih pigmentov melanoidinov in aromatičnih spojin manjše molekulske mase se značilno poveča pri višji temperaturi toplotne obdelave. Maillardova reakcija poteka optimalno pri vodni aktivnosti 0,65-0,75. Zato se produkti Maillardove reakcije tvorijo v zunanjih delih (v skorji) toplotno obdelanega mesa, kjer je zaradi toplotne dehidracije manjša vsebnost vode (Shahidi in sod., 2004).

Streckerjeva razgradnja aminokislin je pomembna reakcija med aminokislinami in  $\alpha$ -dikarbonilnimi spojinami (deoksiozoni, reduktoni, diacetil, piruvaldehid in hidroksiaceton). Razgradnji produkt aminokislina je Streckerjev aldehid in ogljikov dioksid, medtem ko se dikarbonil pretvori v  $\alpha$ -aminoketon oziroma aminoalkohol. Če se vključi v Streckerjevo reakcijo aminokislina cistein, se tvorijo za aromo pomembni intermediati: acetaldehid, amonijak in vodikov sulfid. Aminoketoni so pomembni intermediati pri tvorbi številnih za aromo pomembnih heterocikličnih spojin, kot so: pirazini, oksazoli in tiazoli. 3-deoksiglukozon (preurejena Amadorijeva spojina) je glavni prekurzor za tvorbo piruvaldehida, kateri se v Streckerjevi razgradnji pretvori v dimetilpirazin. V toplotno obdelani govedini je dokazanih 48 pirazinov, v prašičjem mesu 36 in v jagnjetini 16. Pirazini so najpomembnejša skupina, saj predstavljajo 77 % vseh spojin odgovornih za aromo na žaru pečenega mesa prašičev (Shahidi in sod., 2004).

V modelnem sistemu je dokazano, da se produkti porjavenja (melanoidini) tvorijo tudi po drugi poti, in sicer se v začetni fazi pred Amadorijevo preureditvijo tvori glikolaldehid imin. Dimer glikolaldehid imina kondenzira, oksidira in tako tvori 1,4-dialkilpirazin kationski radikal, ki je pomemben intermediat za tvorbo melanoidinov (Shahidi in sod., 2004). Dokazano je, da se v Maillardovi reakciji med reducirajočimi sladkorji in prostimi aminokislinami tvorijo radikali (npr. pirazin kation radikali) (Kikugawa in sod., 1999).



Slika 4: Shematski prikaz reakcij neencimskega porjavenja (Davies in Labuza, 2007: 3).  
 Figure 4: Scheme for nonenzymatic browning (Davies in Labuza, 2007: 3).



Error! Bookmark not defined. Slika 5: Tvorba piridin in pirazin radikalov (Shahidi in sod., 2004: 591; Murkovic, 2004: 7; Vitaglione in Fogliano, 2004: 192).  
 Figure 5: A possible pathway for formation pyridine and pyrazine radicals (Shahidi in sod., 2004: 591; Murkovic, 2004: 7; Vitaglione in Fogliano, 2004: 192).

## 2.2.2 Heterociklični aromatski amini

Švedski znanstvenik Widmark je že leta 1939 poročal, da ima zapečeno konjsko meso karcinogen učinek na kožo miši. Heterociklične aromatske amine so leta 1970 odkrili Sugimura in sodelavci (Knasmüller in sod., 2004). Ames in sod. so leta 1975 razvili hitri test mutagenosti, ki so ga Sugimura in njegovi sodelavci koristno uporabili za določitev mutagene aktivnosti zapečene (zažgane) površinske skorje mesa in rib, pečenih nad ogljem. Od takrat naprej so bile iz toplotno obdelanega mesa, rib in njihovih izdelkov izolirane in identificirane številne zelo mutagene spojine (Wakabayashi in sod., 1993; Sugimura in Adamson, 2000).

Heterociklični aromatski amini so spojine, ki nastajajo med toplotno obdelavo mesa in rib. Nekateri HCA se prav tako nahajajo v cigaretnem dimu in v dieselskih izpušnih plinih. Številne epidemiološke raziskave kažejo, da lahko pogosto zauživanje mesa, ki vsebuje HCA, poveča nevarnost za rakasta obolenja na debelem črevesju, prostati in prsih. Dokazano je, da so HCA in njihovi metaboliti prisotni v telesnih tekočinah in tkivih človeka. HCA-DNA povezave so dokazali v tkivih človeka, kar kaže na to, da lahko HCA poškodujejo DNA tudi pri tako majhnih količinah (ppb), ki so v mesu toplotno obdelanem do običajnih središčnih temperatur (Turesky, 2007). Če se meso ali ribe toplotno obdelujejo pri običajnih pogojih, je vsebnost HCA zelo nizka (ppb). Vsebnost HCA se v mesu in ribah poveča, če se toplotno obdelujejo daljši čas in se uporabljajo bolj 'agresivne' metode (npr. pečenje nad ogljem, na žaru...), pri katerih se dosežajo višje temperature (Knasmüller in sod., 2004).

### 2.2.2.1 Vrste in strukture HCA

V toplotno obdelanem mesu je bilo do danes identificiranih že več kot 20 različnih HCA (Turesky, 2007). HCA se delijo glede na polarnost v dve skupini: polarne in nepolarne. Polarni HCA (aminoimidazo-azaareni (AIA) ali IQ tip) imajo imidazokinolinsko ali imidazokinoksalinsko ali imidazopiridinsko strukturo. Nepolarni HCA (ne-IQ tip) imajo piridoindolno ali dipiridoimidazolno strukturo (Pais in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky in sod., 2005; Turesky, 2007; Schut in Snyderwine, 1999).

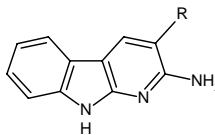
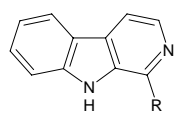
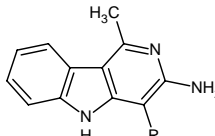
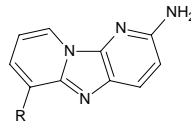
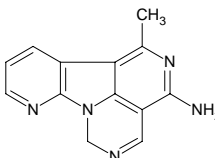
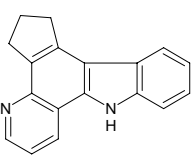
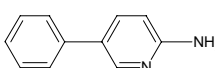
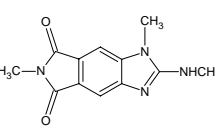
Preglednica 5: Aminoimidazo-azaareni določeni v modelnih sistemih ali v toplotno obdelani hrani (Pais in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky in sod., 2005; Turesky, 2007).

Table 5: Aminoimidazo-azaarenes found in model systems or in cooked foods (Pais in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky in sod., 2005; Turesky, 2007).

Ime HCA	okrajšava	formula	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>kinolini</b>					
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin	IQ		H		
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin	MeIQ		CH <sub>3</sub>		
2-amino-1-metilimidazo[4,5-b]kinolin	IQ[4,5-b]				
<b>kinoksalini</b>					
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinoksalin	IQx		H	H	H
2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	8-MeIQx		H	H	CH <sub>3</sub>
2-amino-4-hidroksimetil-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx		CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>3</sub>
2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	4,8-DiMeIQx		CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinoksalin	7,8-DiMeIQx		H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-f]kinoksalin	4,7,8-TriMeIQx		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2-amino-1,7-dimetilimidazo[4,5-g]kinoksalin	7-DiMeIgx		H		
2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-g]kinoksalin	7,9-DiMeIgx		CH <sub>3</sub>		
<b>piridini</b>					
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin	PhIP		H		
2-amino-6-(4-hidroksifenil)-1-metilimidazo[4,5-b]piridin	4'-OH-PhIP		OH		
2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5-b]piridin	1,6-DMIP		H		
2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5-b]piridin	1,5,6-TMIP		CH <sub>3</sub>		
2-amino-3,5,6-trimetilimidazo[4,5-b]piridin	3,5,6-TMIP				
<b>fupiridini</b>					
2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]piridin	IFP				

Preglednica 6: Karbolini in drugi HCA določeni v modelnih sistemih ali v toplotno obdelani hrani (Pais in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky in sod., 2005; Turesky, 2007).

Table 6: : Carbolines and other HCA found in model systems or in cooked foods (Pais in Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky in sod., 2005; Turesky, 2007).

Ime HCA	okrajšava	formula	R
<b>piridoindoli</b>			
<b><math>\alpha</math>-karbolini</b>			
2-amino-9H-pirido[2,3- <i>b</i> ]indol	A $\alpha$ C		H
2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3- <i>b</i> ]indol	MeA $\alpha$ C		CH <sub>3</sub>
<b><math>\beta</math>-karbolini</b>			
9-metil- $\beta$ -karbolin	harman		CH <sub>3</sub>
9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido[3,4- <i>b</i> ]indol	norharman		H
<b><math>\gamma</math>-karbolini</b>			
3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3- <i>b</i> ]indol	Trp-P-1		CH <sub>3</sub>
3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3- <i>b</i> ]indol	Trp-P-2		H
<b>piridoimidazoli</b>			
<b><math>\delta</math>-karbolini</b>			
2-amino-6- metil-dipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol	Glu-P-1		CH <sub>3</sub>
2-amino-dipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol	Glu-P-2		H
<b>drugi HCA</b>			
4-amino-6-metil-1H-2,5,10,10 <i>b</i> -tetraaza-fluoranten	Orn-P-1		
3,4-ciklopentenopirido[3,2- <i>a</i> ]kרבazol	Liz-P-1		
2-amino-5-fenilpiridin	Phe-P-1		
4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1H,6H-pirololo[3,4- <i>f</i> ]benzimidazole-5,7-dione	Cre-P-1		
2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i> ]-4H-1,4-benzoksazin			
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]-4H-1,4-benzoksazin			

#### 2.2.2.2 Tvorba HCA

HCA so policiklične aromatske spojine z vsaj enim ali večimi dušikovimi atomi in eno amino skupino. Največkrat imajo planarno strukturo in so iz treh aromatskih obročev. Izjeme so: (1) PhIP, DMIP in TMIP, ki imajo samo dva aromatska obroča, (2) harman, norharman in Lys-P-1, ki nimajo amino skupine in (3) IFP, ki ima kisikov atom kot hetero atom. Tvorbo HCA običajno raziskujejo v kemijskih modelnih sistemih, v katerih je: (1) manjša kompleksnost kemijskih reakcij in (2) izključeno delovanje drugih spojin, ki so sicer prisotne v kompleksnem živilu kot je meso (Toribio in sod., 2000; Skog, 2004; Murkovic, 2004).

Nastanek HCA je odvisen od (Oz in sod., 2006; Vitaglione in Fogliano, 2004; Skog in sod., 2003; Felton in sod., 2000):

- fizikalnih dejavnikov, kot so vrsta in količina živila, način in pogoji toplotne obdelave (temperature, časa), toplotni vir, snovni in toplotni prenos, vrednost pH medija, ter
- kemijskih dejavnikov, kot so vrsta, vsebnost in razmerja prekurzorjev, prisotnost inhibitorjev ali stimulatorjev, vsebnost maščob in vode oziroma vodna aktivnost.

Količina HCA je odvisna predvsem od načina in pogojev med toplotno obdelavo. Najpomembnejša parametra sta temperatura in čas (Lan in sod., 2004), le da ima temperatura večji vpliv na tvorbo HCA kot čas toplotne obdelave (Skog in sod., 1998a).

##### 2.2.2.2.1 Tvorba aminoimidazo-azaarenov (AIA)

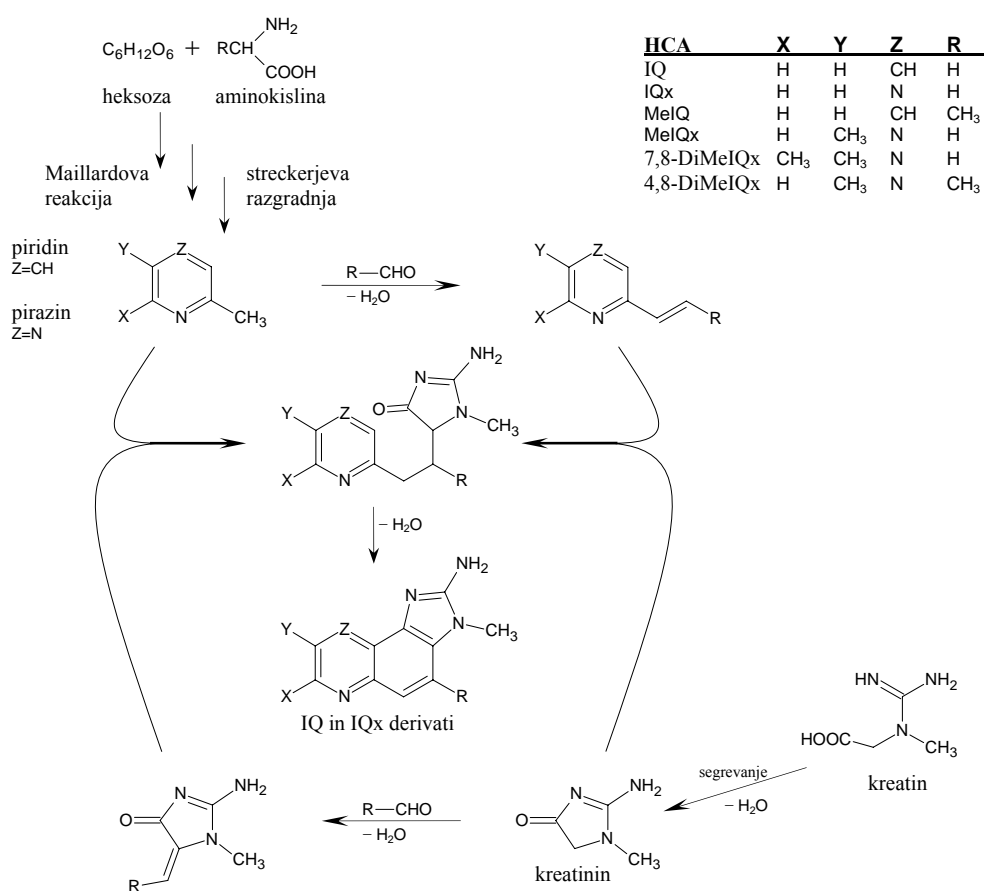
Maillardova reakcija predstavlja osrednjo pot in ima pomembno vlogo pri tvorbi aminoimidazo-azaarenov (preglednica 5) (Toribio in sod., 2000). Prekurzorji za tvorbo HCA so: metilirani piridini in pirazini, derivati acetaldehida in kreatinin, ki tvori imidazo strukturo vseh polarnih HCA. Derivati acetaldehida so intermediati Maillardove reakcije (Murkovic, 2004). Piridini in pirazini, nastali iz reducirajočih sladkorjev in prostih aminokislin v Maillardovi reakciji, so intermediati pri tvorbi AIA. Obstajata dve hipotezi za tvorbo AIA: (1) piridin ali pirazin najprej reagira z aldehydom in šele nato s kreatininom, (2) kreatinin najprej reagira z aldehydom (aldolna kondenzacija) in tvori intermediat kreatinin-aldehyd, ki skupaj s piridinom in pirazinom tvori imidazo-kino(ksa)lin spojine. Wyss in Kaddurah-Daouk (2000) ugotavljata, da se AIA tvorijo po različnih poteh, in da so reducirajoči sladkorji lahko vključeni v njihovo tvorbo, vendar njihova prisotnost ni nujna. Kreatinin je nujen za tvorbo imidazo strukture, saj se HCA tipa IQ in IQx brez kreatinina ne tvorijo (Murkovic, 2004).

V modelnih sistemih in vzorcih mesa je dokazano, da se AIA tvorijo iz prostih aminokislin, reducirajočih sladkorjev in kreatinina oz. kreatina (Knize and Felton, 2004; Toribio in sod., 2000). Največ aminoimidazo-azaarenov nastane, če so monosaharidi, proste aminokisliline in kreati(ni)n v molskem razmerju 1:1:1, kakršno je približno v govejem mesu (Skog in sod., 1998). Največjo mutagenost se doseže v mešanem sistemu (kreatin/kreatinin, proste aminokisliline, monosaharidi) z molskim razmerjem 1 : 1 : 0,5 (Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000; Skog in Jägerstad, 1990). IQx derivati se lahko tvorijo

tudi iz tavrina ali dipeptida karnozina (alanil-histidin), glukoze in kreatinina (Arvidsson in sod., 1997).

Za nastanek polarnih HCA niso potrebne tako visoke temperature kot za tvorbo nepolarnih HCA, čeprav se pri povišani temperaturi tvorijo hitreje in v večjih količinah. Temperatura toplotne obdelave, ki je potrebna za tvorbo polarnih HCA, je med 150 °C in 250 °C (Sugimura in Adamson, 2000; Murkovic, 2004).

Reakcije, ki vodijo preko glikolaldehid alkilimina do pirazinskih radikalov dajo več radikalov kot tiste reakcije, ki tečejo preko glioksala do piridinskih radikalov (slika 5). Zaradi večje količine pirazin radikalov, se IQx tip HCA pojavlja v toplotno obdelanem mesu v večjih količinah kot IQ tip (Murkovic, 2004).



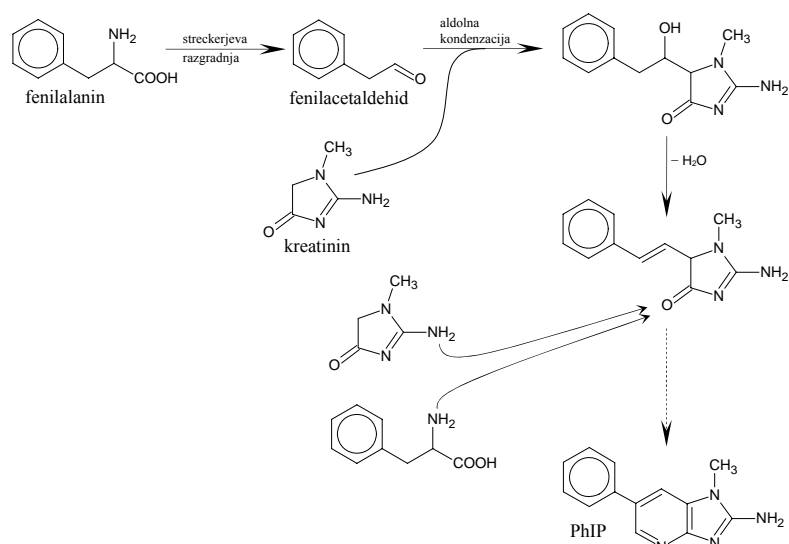
Slika 6: Tvorba imidazokinolinov in imidazokinoksalinov (Felton in sod., 2000: 37).**Error! Bookmark not defined.**

Figure 6: Tvorba imidazokinolinov in imidazokinoksalinov (Felton in sod., 2000: 37).

S pomočjo modelnega sistema (proste aminokislina + monosaharidi + kreatin/kreatinin) je bilo ugotovljeno, da posamezna prosta aminokislina določa tako količino kot vrsto aminoimidazo-azaarenov. Cistein in treonin kažeta v modelnem sistemu z glukozo in kreatinom največjo mutagenost, sledijo lizin, alanin, serin in glicin. Ti modelni sistemi

omogočajo tvorbo 8-MeIQx in 4,8-DiMeIQx, medtem ko se PhIP tvori ob prisotnosti fenilalanina, levcina, izolevcina ali tirozina (Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000).

Wyss in Kaddurah-Daouk (2000) navajata, da sta kreatin in/ali kreatinin prekursorja aminoimidazo-azaarenov, in sicer: (1) dokazana je povezava med mutagenostjo in vsebnostjo kreatina in/ali kreatinina, (2) dodatek kreatina ali kreatin fosfata vzorcu mesa pred toplotno obdelavo poveča mutagenost do 40-krat in količino aminoimidazo-azaarenov do 9-krat, (3) vsi AIA imajo 2-aminoimidazo strukturo, ki je zelo podobna strukturi kreatina, (4) AIA se lahko tvorijo v preprostem modelnem sistemu, ki vsebuje kreatin ali kreatinin, proste aminokisliline in monosaharide. Wyss in Kaddurah-Daouk (2000) ugotavljata, da je dejansko kreatinin potencialni prekursor za tvorbo AIA in ne kreatin. Kreatinin kaže v modelnem sistemu večjo mutageno aktivnost kot kreatin (Skog in Jägerstad, 1990). Pfau in sod. (2006) navajajo, da je večja mutagenost določena v pečenem mesu z večjo vsebnostjo kreatina, ter da dodatek kreatina ne vpliva na vrsto nastalega HCA.



Slika 7: Tvorba PhIP iz fenilalanina in kreatinina (Murkovic, 2004: 8).  
Figure 7: Formation of PhIP from phenylalanine and creatinine (Murkovic, 2004: 8).

V modelnem sistemu (180 °C, 10 min) je bilo dokazano, da dodatek glukoze do polovice molarne koncentracije glicina in kreatina poveča mutagenost. Maksimalna mutagenost je določena pri razmerju 1:1:0,5 (glicin:kreatin:glukoza). Če se koncentracija glukoze še poveča, se mutagenost zelo zmanjša. Prevelika koncentracija reducirajočih sladkorjev ima inhibitorjen učinek na tvorbo HCA, in sicer imajo monosaharidi večji inhibitorni učinek kot disaharidi (Skog in Jägerstad, 1990). Fruktosa se raje vključi v nastanek HCA kot glukoza (Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000). Nasploh so ketoze (npr. fruktoza, tagatoza) zaradi različnih reakcijskih mehanizmov bolj reaktivne v Maillardovi reakciji in kažejo večjo mutagenost kot njihove izomere aldoze (npr. glukoza, galaktoza) (Brands in sod., 2000; Skog in Jägerstad, 1990).



PhIP se tvori pri segrevanju (200 °C) kreatina in fenilalanina ali kreatinina in fenilalanina ali kreatina in levcina v suhem modelnem sistemu (Skog, 1993). Fenilalanin in kreatin/kreatinin so prekursorji za tvorbo PhIP. Aminokislina levcin, izolevcin in tirozin se prav tako lahko vključijo v tvorbo PhIP namesto fenilalanina. Glukoza ni nujna za tvorbo PhIP, saj lahko odvisno od koncentracije zavira ali pa pospešuje tvorbo PhIP. PhIP nastaja tako v mešanici kreatinina, fenilalanina in aldehydov, kot v mešanici fenilalanina, kreatinina in nukleinskih kislin. Če namesto fenilalanina uporabimo tirozin, nastane 4'-hidroksi derivat PhIP (Murkovic, 2004).

#### 2.2.2.2.2 *Nepolarni HCA*

V splošnem se produkti pirolize označujejo kot nepolarni HCA (preglednica 6). Nepolarni HCA se tvorijo tudi pri segrevanju samo ene aminokislina (Murkovic, 2004) ali s pirolizo več aminokislin in proteinov pri visokih temperaturah (Sugimura in Adamson, 2000). V modelnih sistemih je dokazano, da nastajajo aminokarbolini iz reakcij nekaterih radikalov pri temperaturi nad 300 °C (Toribio in sod., 2000). V nasprotju z njimi, se tvorita harman in norharman že pri nižjih temperaturah (Murkovic, 2004).

Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 in Glu-P-2 se tvorijo pri pirolizi triptofana in glutaminske kisline (Bordas in sod., 2004).  $\alpha$ - in  $\gamma$ -karbolini (A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2) lahko nastanejo s pirolizo triptofana in proteinov živalskega ali rastlinskega izvora (npr. albumina, kazeina ali sojinih glubulinov). Indolov obroč, ki je sestavni del molekul  $\alpha$ - in  $\gamma$ -karbolinov izhaja iz triptofana, ni pa izključeno, da ne nastane tudi iz drugih aminokislin. Npr. Trp-P-1 in Trp-P-2 so izolirali po segrevanju (180 °C, 10 min) v vodnem modelnem sistemu, ki je vseboval kreatinin, glukozo in TRP, in tudi v modelnem sistemu, ki je vseboval namesto triptofana ILE (Johansson in sod., 1995). To dokazuje, da TRP ni edini prekursor, in da piroliza ni edina pot za oblikovanje indolovega obroča v karbolinih.

$\beta$ -karbolini (harman in norharman) se tvorijo endogeno v organizmu tako pri poskusnih živalih kot tudi pri človeku. Prav tako jih zaužijemo s toplotno obdelanimi proteinsko bogatimi živili in tudi kot alkaloidne rastlin (Knasmüller in sod., 2004; Pfau in Skog, 2004). Harman in norharman se tvorita tudi pri temperaturah nižjih od 100 °C. Določena sta bila v suhem modelnem sistemu s triptofanom in glukozo (Bordas in sod., 2004).  $\beta$ -karbolini se tvorijo iz triptofana preko Amadorijeve spojine (intermediata Maillardove reakcije) (Murkovic, 2004). Aminokarbolini se lahko tvorijo iz aminokislina brez kreatin(in)a, čeprav je bilo v modelnem sistemu dokazano, da dodatek kreatinina poveča količino  $\beta$ -karbolinov (Jägerstad in sod., 1998). Harman in norharman se tvorita v mešanem vodnem modelnem sistemu, ki vsebuje kreatin, glukozo in posamezno aminokislino (izolevcin, arginin, fenilalanin, triptofan). Norharman se prav tako lahko tvori v enakem modelnem sistemu z aminokislino tirozin, če ga segrevamo nad 180 °C za 10 min (Johansson in sod., 1995).

#### 2.2.2.2.3 *Metode za zmanjšanje tvorbe HCA*

Tvorbo HCA v toplotno obdelanem mesu zmanjšamo, tako da:

- optimalno skrajšamo čas zorenja mesa in tako omejimo količino aminokislin,

- optimalno povečamo količino sladkorjev (Skog in Jägerstad, 1990; Skog, 2002; Murkovic, 2004; Bordas in sod., 2004;),
- meso in mesne izdelke pred toplotno obdelavo mariniramo ali paniramo (Skog in sod., 2003; Messner in Murkovic, 2004),
- pred toplotno obdelavo dodamo antioksidante, začimbe in mesnim izdelkom še: škrob, sojine proteine, polisaharide (Murkovic in sod., 1998; Skog in sod., 1998a; Vitaglione in Fogliano, 2004; Messner in Murkovic, 2004; Lan in sod., 2004),
- med toplotno obdelavo mesa in mesnih izdelkov povečamo relativno vlažnost (npr. dodatek vode – pare) (Skog in sod., 2003),
- meso in mesne izdelke obdelujemo samo z mikrovalovi ali v kombinaciji z drugimi načini toplotne obdelave (Felton in sod., 1995; Sinha in sod., 1998),
- meso in mesne izdelke toplotno obdelujemo krajši čas pri nižji temperaturi in do središčnih temperatur, ki nam še zagotavljajo mikrobiološko varnost in hkrati senzorično sprejemljivost (Skog in sod., 1998a; Olsson in sod., 2005; Oz in sod., 2006).

Dodatek škroba izdelkom iz mesa nekoliko zmanjša količino mutagenih snovi. Vpliv maščob na tvorbo mutagenih spojin še ni povsem raziskan. Ugotovljeno je, da povečana vsebnost maščob (nad 15 %) poveča tudi mutagenost vzorca. Nekateri vzorci s 30 % maščobe pa kažejo celo manjšo mutageno aktivnost (Skog in sod., 2003). Prekomerna količina reducirajočih sladkorjev zmanjša tvorbo mutagenov. Ta inhibitorni učinek ni bil opazen samo v modelnem sistemu, ampak tudi pri toplotni obdelavi mesa s prekomerno vsebnostjo reducirajočih sladkorjev. Zato je lahko vsebnost reducirajočih sladkorjev pomemben dejavnik pri zmanjšanju tvorbe mutagenih snovi (Murkovic, 2004; Bordas in sod., 2004). Meso z več glukoze ima bolj rjavo zaskorjeno površino in manjšo vsebnost HCA kot meso z normalno vsebnostjo glukoze (Skog, 2002).

Antioksidanti se vključujejo v kemijske reakcije tvorbe HCA in tudi toksičnega delovanja HCA v organizmu. Lahko imajo glede na njihovo koncentracijo anti- ali prooksidativen učinek. Antioksidanti preprečujejo tvorbo HCA tako, da reagirajo z radikali, ki se tvorijo med toplotno obdelavo in jih inaktivirajo. V organizmu antioksidanti blokirajo biotransformacijo premutagenov v reaktivne metabolite, stimulirajo detoksifikacijske encime, reagirajo z reaktivnimi metaboliti in jih tako inaktivirajo (Vitaglione in Fogliano, 2004).

V literaturi zasledimo, da so sintetični (npr. *terc.*-butilhidroksikinon – TBHQ, butilhidroksitoluen – BHT, butilhidroksianizol – BHA, 1-*O*-heksil-2,3,5-trimetilhidrokinon in propil galat – PG) in naravni (npr. vitamin C,  $\alpha$ - in  $\gamma$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, retinal in retinojska kislina) antioksidanti v primerni koncentraciji zmanjšali tvorbo HCA. Če meso in ribe toplotno obdelujemo skupaj z drugimi živili, ki vsebujejo različne antioksidante, lahko zmanjšamo vsebnost HCA. Živila, ki kažejo antimutageno aktivnost zaradi antioksidativnih lastnosti, so sadje, zelenjava, soja (fenolni antioksidanti), čaji (črni, zeleni idr.), oljčno olje, živila bogata s karotenoidi in antocianini (Murkovic in sod., 1998; Murkovic, 2004; Messner in Murkovic, 2004; Vitaglione in Fogliano, 2004).

Murkovic in sod. (1998) ugotavljajo, da dodatek začimb (rožmarina, timijana, žajblja in česna) zmanjša vsebnost HCA v pečeni govedini. Vzrok temu bi lahko bila nižja

temperatura med pečenjem na površini mesa zaradi prisotnosti začimb. Nasprotno pa so opazili, da dodatek ekstrakta timijana, majarona in rožmarina v modelnem sistemu s fenilalaninom in kreatininom poveča nastanek PhIP. Tvorbo HCA lahko prav tako zmanjšamo, če meso pred toplotno obdelavo mariniramo z različnimi marinadami: repično olje, oljčno olje, začimbe, sojin sok, sladkor, kis, gorčica in natrijev benzoat (Messner in Murkovic, 2004).

#### 2.2.2.3 Vpliv kakovosti mesa na prekursorje HCA

Nekoliko hitrejšo znižanje vrednosti pH *post mortem* vpliva na hitrejšo mehčanje mesa in tudi pospešeno proteolizo, medtem ko zelo hitro znižanje vrednosti pH (pri BMV kakovosti) omeji obseg zorenja. Zato ima lahko hitrost znižanja vrednosti pH ključno vlogo pri mehčanju mesa (Hopkins in Huff-Lonergan, 2004). V hitro krčljivih belih mišicah poteka zorenje hitreje kot v počasi krčljivih rdečih mišicah (Klont in sod., 1998). Kakovost mesa lahko *post mortem* vpliva na proteolitične sisteme odgovorne za proteolizo in s tem na tvorbo značilne količine in vrste polipeptidov, peptidov ter aminokislin (Flores in sod., 2000). Titin se razgrajuje počasneje v mišici BMV kakovosti kot v mišici normalne kakovosti (Boles in sod., 1992; Warner in sod., 1997). Nebulin se razgrajuje hitreje v mišici BMV kakovosti kot v mišici normalne kakovosti (Warner in sod., 1997).

Vsebnost  $\mu$ -kalpaina in tudi kalpastatina je pri RČN in BMV kakovosti mesa enaka (Toldrá in Flores, 2000). Ko se vrednost pH *post mortem* zniža z okrog 7 na 5,8, se avtoliza  $\mu$ -kalpaina poveča in s tem njegova aktivnost zmanjša (Koohmaraie, 1992). Dipeptidilpeptidaze I in II kažejo 24 ur *post mortem* enako aktivnost pri RČN in BMV kakovosti, medtem ko kažejo dipeptidilpeptidaze IV večjo aktivnost pri RČN kot pri BMV kakovosti. Aktivnost piroglutamil-aminopeptidaze je 24 ur *post mortem* značilno ( $p < 0,05$ ) manjša pri BMV kot pri RČN kakovosti. Aktivnost aminopeptidaz je manjša v vodenem mesu (BMV in RMV), tako da se več prostih aminokislin sprosti v mesu RČN in TČS kakovosti (Toldrá in Flores, 2000).

Flores in sod. (2000) navajajo, da med BMV kakovostjo in RČN kakovostjo prašičjega mesa ni značilnih razlik v vsebnosti prostih aminokislin dve uri *post mortem*, razen pri asparaginski in glutaminski kislini. Vsebnost alanina je prvi in tudi sedmi dan *post mortem* značilno ( $p < 0,05$ ) večja pri BMV kot pri RČN kakovosti prašičjega mesa. Podobno je vsebnost glutaminske kisline in serina prve štiri dni značilno večja pri BMV kot pri RČN kakovosti mesa. Vsebnost metionina, lizina in asparaginske kisline je sedmi dan *post mortem* večja pri RČN kot pri BMV kakovosti (Moya in sod., 2001).

Olsson in sod. (2005) ugotavljajo, da imajo pečeni zrezki iz prašičjega mesa z večjo vsebnostjo glikogena (vsebujejo RN<sup>-</sup> alel) glede na zrezke z manjšo vsebnostjo glikogena (ne vsebujejo RN<sup>-</sup> alel), temnejšo skorjo in manjšo vsebnost mutagenih HCA.

#### 2.2.2.4 Vpliv zorenja mesa na prekursorje HCA

Moya in sod. (2001) ugotavljajo, da se med procesom proteolize v mišicah prašiča poveča vsebnost skoraj vseh aminokislin razen glutamina,  $\beta$ -alanina, tavrina, ornitina in dipeptidov karnozina ter anserina, katerih vsebnost ostaja skoraj nespremenjena. Vsebnost nekaterih

prostih aminokislin, kot so glutaminska kislina, treonin, serin, tirozin, metionin, izolevcin in fenilalanin, se značilno poveča že prvih 24 ur *post mortem*. Vsebnost prostih aminokislin se pri prašičjem mesu statistično značilno poveča po šestih dneh zorenja.

Polak (2003) je ugotovil, da čas zorenja značilno vpliva na kemijsko sestavo presnega govejega mesa. Čas zorenja vpliva na vrednost pH, vsebnost kreatina, kreatinina, vseh prostih aminokislin, razen glutamina in dipeptida karnozina. Vsebnost kreatina se s časom zorenja konstantno znižuje, razlike med posameznimi stopnjami zorenja so značilne. Nasprotno pa se vsebnost kreatinina s časom zorenja povečuje. Skupni kreatin (kreatin +  $1,16 \times$  kreatinin; AOAC, 1980) ostaja nespremenjen. Vsebnost vseh prostih aminokislin razen glutamina se s časom zorenja statistično značilno povečuje ( $r^2 = 0,997$ ). Količina prostih aminokislin in njihova sestava sta odvisni od pogojev, pri katerih meso zori. Polak (2003) smatra, da je vzrok za večjo tvorbo HCA v toplotno obdelanih vzorcih, večja vsebnost prostih aminokislin. Ugotavlja tudi visoko odvisnost ( $r^2 = 0,979$ ) med vsebnostjo PhIP in vsebnostjo nekaterih prostih aminokislin (tirozina, izolevcina, fenilalanina in levcina). Najmanjšo vsebnost (0,19 ng/g) HCA je določil v nezorenih vzorcih govejega mesa, medtem ko je največjo vsebnost (0,38 ng/g) HCA določil v štiri tedne zorenih vzorcih govejega mesa.

Tikk in sod. (2006) so ugotovili, da se med zorenjem prašičjega mesa vsebnost inozinmonofosfata (IMP) zmanjša, medtem ko se vsebnost inozina, hipoksantina in riboze poveča. Vsebnost riboze, glukoze in glukoza-6-fosfata se med zorenjem (14 in 21 dni) govedine značilno poveča (Koutsidis in sod., 2003).

#### 2.2.2.5 Vpliv toplotne obdelave mesa na prekurzorje in tvorbo HCA

*In vitro* reverzibilna, neencimska pretvorba kreatina v kreatinin je odvisna od vrednosti pH in temperature. Pri višji vrednosti pH in nižji temperaturi se tvori več kreatina, medtem ko se pri nižji vrednosti pH in višji temperaturi tvori več kreatinina. Kreatin fosfat je v kislem okolju nestabilen, zato hidrolizira v kreatin ali kreatinin in anorganski fosfat (Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000). Med toplotno obdelavo se pretvori okrog 20 % do 65 % kreatina v kreatinin (Harris in sod., 1997). Količina kreatina se v kislem mediju med toplotno obdelavo zmanjša, medtem ko se vsebnost kreatinina poveča (Campo in sod., 1998). Med toplotno obdelavo (120 °C) se po Lobrey de Bruyn Alberda van Ekenstein preureditvi znatna količina glukoze (aldoza) pretvori v keto obliko (fruktozo) (Brands in sod., 2000).

Višje temperature in daljši čas toplotne obdelave zelo vplivajo na večjo vsebnost HCA. Če se temperatura na površini mesa ne segreje nad 140 °C, je tvorba HCA sorazmerno majhna. Pri temperaturi nad 140 °C se tvori več HCA, in sicer se mutagena aktivnost mesa poveča, če se meso na površini segreje na 200-250 °C. Še večje povečanje pa je opaziti, če se meso na površini segreje na 300 °C. Pri višjih temperaturah (220 °C) je vidno izstopajoče povečanje vsebnosti MeIQx. Vsebnost PhIP se pri višjih temperaturah zaradi manjše termostabilnosti, celo nekoliko zmanjša (Murkovic in sod., 1998). Če temperaturo pečenja povečamo z 200 °C na 250 °C, se mutagena aktivnost poveča za trikrat (Felton in sod., 1995). Tudi pri nižji temperaturi (~100 °C) se količina HCA prav tako poveča, če meso obdelujemo dlje časa (Jägerstad in sod., 1998).

Način toplotne obdelave ima velik vpliv na tvorbo HCA. Pri cvrenju ali pečenju na žaru se tvori več HCA kot pri pečenju v pečici, dušenju ali parjenju. Pri cvrenju nepaniranega mesa se tvori več mutagenih spojin kot pri paniranih izdelkih, ki ne kažejo mutagene aktivnosti, saj panada zmanjša prenos v vodi topnih prekurzorjev na površino mesa, kjer se tvorijo HCA. Večja kot je izguba mase med toplotno obdelavo, večja je mutagena aktivnost vzorca. Večja mutagena aktivnost pri večji izgubi mase (izceje) je lahko posledica večjega prenosa v vodi topnih prekurzorjev na površino mesa, kjer se tvorijo HCA. Če se med toplotno obdelavo mesa relativna vlažnost (dodatek pare) poveča, se izguba mase in s tem mutagena aktivnost zmanjša (Skog in sod., 2003).

Nastanek skorje na površini mesa je odvisen od temperature in količine izceje med toplotno obdelavo. Pri suhih postopkih toplotne obdelave mesa voda neprestano izpareva, zato se vsebnost vode v zunanjih delih mesa zmanjšuje. Dokler voda na površini mesa izpareva, lokalno preprečuje dvig temperature površine nad 100 °C (Messner in Murkovic, 2004). Ko se na površini mesa izparevanje vode zmanjša, se oblikovanje skorje in tvorba mutagenih spojin poveča (Skog in sod., 2003).

Med segrevanjem se nastali HCA tudi razgrajujejo. Pri visokih temperaturah je PhIP najmanj stabilen, medtem ko je IQx najbolj stabilen (Messner in Murkovic, 2004). V modelnih sistemih je dokazano, da je med toplotno obdelavo najbolj stabilen IQx, nato mu sledijo Glu-p-2, norharman, IQ, 4,8-DiMeIQx, Trp-p-2, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, harman, Glu-p-1, Trp-p-1, MeIQ, AαC, MeAαC in kot zadnji PhIP. Razgradnja HCA se povečuje, če temperaturo zvišujemo (npr. 100 °C, 150 °C, 200 °C) in čas toplotne obdelave podaljšujemo (Chiu in Chen, 2000).

#### 2.2.2.6 Vpliv vrste mesa na vsebnost prekurzorjev in tvorbo HCA

Po literaturnih podatkih je vsebnost HCA v mesu in ribah zelo variabilna in včasih nenormalno visoka. Raziskovalci običajno: (1) pomanjkljivo opisujejo metode toplotne obdelave, (2) uporabljajo različne metode določanja HCA, ki pogosto niso med seboj primerljive in (3) namerno toplotno obdelujejo vzorce mesa pri višjih temperaturah in daljši čas, z namenom večje tvorbe HCA. Velika variabilnost v vsebnosti HCA je odvisna od metode toplotne obdelave, stopnje pečenosti in drugih dejavnikov, kot so kakovost, sestava in geometrija mesa. Zatorej se lahko vsebnost razlikuje tudi za več kot 100-krat. V literaturi je mogoče zaslediti, da sta PhIP in MeIQx najpogosteje določena, in da se tvorita v največjem obsegu (Pais in Knize, 2000; Turesky, 2007). Tako so Murkovic in sod. (1998) v pečeni (20 min, 180 °C) govedini na plošči določili naslednje HCA: MeIQx (13,2 ng/g), IQ (10,2 ng/g), 4,8-DiMeIQx (2,26 ng/g), MeIQ (2,46 ng/g) in PhIP (5,28 ng/g).

Warzecha in sod. (2004) navajajo, da se med pečenjem prašičjega, govejega, puranjega in piščančjega mesa v relativno največji količini tvorijo MeIQx, 4,8-DiMeIQx in PhIP. Busquets in sod. (2004) navajajo, da se DMIP, PhIP in norharman tvorijo v relativno največji količini (predvsem v piščančjih prsih), in da so DMIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, norharman, harman, PhIP, Trp-P-1, AαC in MeAαC najbolj pogosto določeni HCA v pečenem govejem, prašičjem, jagnječjem in piščančjem mesu.

Vsebnost aminoimidazo-azaarenov je primerljiva v rdečem mesu in perutnini (preglednica 7). Zato nastanek aminoimidazo-azaarenov ni odvisen od vrste mesa, ampak od načina in pogojev toplotne obdelave (Warzecha in sod., 2004).

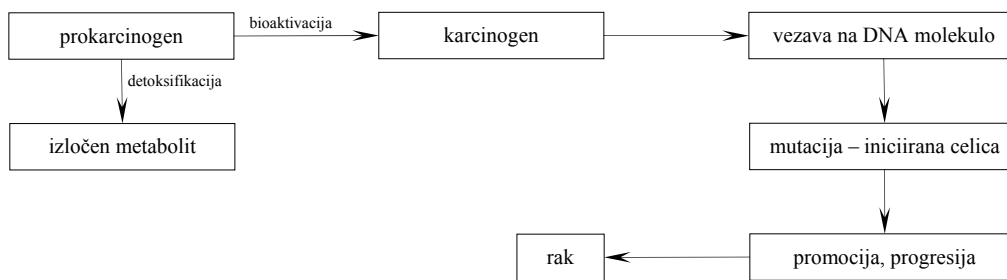
Preglednica 7: Vsebnost HCA (ng/g) v toplotno obdelanem mesu in ribah (Pais in Knize, 2000).  
 Table 7: Occurrence of HCAs (ng/g) in cooked meats and fish (Pais in Knize, 2000).

HCA	govodina	goveji ekstrakt	svinina	jagnjetina	perutnina	ribe
IQ	nd – 21	nd – 15 (max 70)	nd – 10,5	–	nd – 5	nd – 4,9
IQx	nd	nd – 0,7	nd	–	nd – 0,17	nd
MeIQ	nd – 0,6	nd – 5,8	nd – 1,7	–	nd – 0,9	nd – 16,6
MeIQx	nd – 16,4 (max 80)	nd – 69	nd – 3,5 (max 45)	nd – 1,6	nd – 3,2 (max 270)	nd – 8,3
4,8-DiMeIQx	nd – 15	nd – 11,2	nd – 12	nd – 0,6	nd – 4	nd – 7,0
7,8-DiMeIQx	nd – 0,7	nd – 0,7	nd – 0,3	–	nd – 0,16	nd – 5,3
TriMeIQx	nd	nd	nd	–	nd	nd
PhIP	nd – 18,4 (max 182)	nd – 49	nd – 7,4 (max 106)	nd – 11	nd – 37,5 (max 480)	nd – 3 (max 69)
DMIP	nd – 7,2	–	nd – 37	–	nd – 5,9	–
1,5,6-TMIP	nd – 1,5	–	nd	–	nd – 2,9	–
IFP	nd – 7,6	–	nd – 2,5	–	0,9 – 7	–
A $\alpha$ C	nd – 21	nd – 8,1	nd – sledovi	–	nd – 2 (max >100)	nd – 2,3 (max 109)
MeA $\alpha$ C	nd	nd – 20,3	nd – 3,2	–	nd	nd
Trp-P-1	nd – 0,5	nd – 13	nd – 5,3	–	nd – 1,6	nd – 13,3
Trp-P-2	nd – 1,7	nd – 14	nd – 7,4	nd	nd – 0,14	nd – 13,1
Glu-P-1	nd	15,5	nd	–	nd	nd
Glu-P-2	nd	–	nd	–	nd	nd
harman	0,31 – 28,6	3,3 – 135 (max 755)	nd – 2,5 (max 200)	–	–	2 – 130
norharman	0,96 – 30	8,3 – 74 (max 200)	nd – 10,6	–	–	2 – 184

nd – vsebnost pod mejo detekcije, max – maksimalna vsebnost določena v ekstremnih pogojih

### 2.2.3 Mutagenost in karcinogenost HCA

Karcinogeneza je večstopenjski proces razvoja raka, ki ga razdelimo v tri faze, in sicer fazo iniciacije, promocije in progresije. V fazi iniciacije pride do mutacije v ključnih genih (onkogenih in tumorskih supresorskih genih) odgovornih za razvoj raka (Čemažar, 2006). Mutacije so spremembe v strukturi DNA, ki trajno spremenijo genetsko informacijo. Število mutacij je povezano s procesom karcinogeneze in staranja (Nelson in Cox, 2005). Spremembe na DNA lahko povzročijo tako fizikalni kot kemijski oz. tako endogeni kot eksogeni dejavniki. Kemijski prokarcinogeni so endogene (avtobiotiki) in eksogene (ksenobiotiki) spojine (Takashi in sod., 2002).



Slika 8: Metabolizem kemijskih prokarcinogenov in karcinogeneza (Čemažar, 2006: 25).  
Figure 8: Metabolism of chemical procarcinogens and carcinogenesis (Čemažar, 2006: 25).

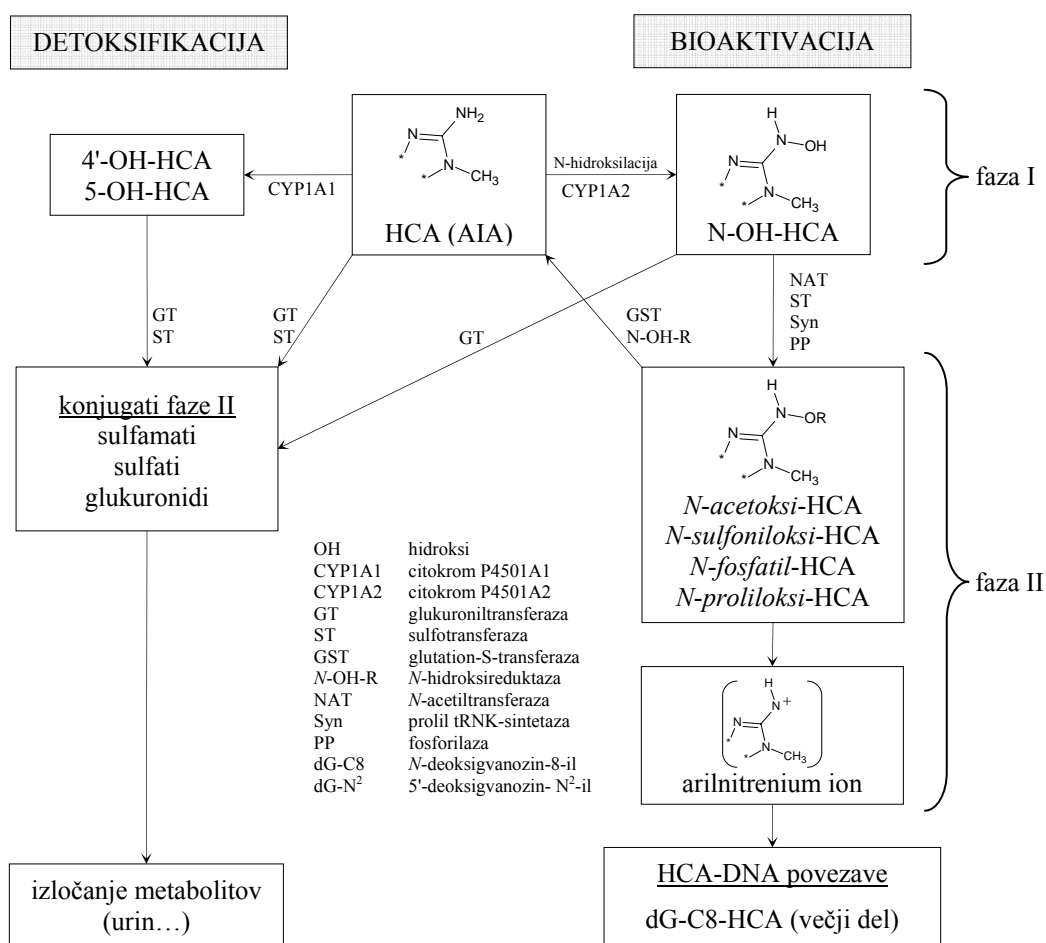
Ker človek v svojem življenju zaužije povprečno okrog 15 ton hrane (na suho snov), je hrana ena od glavnih virov biološko aktivnih eksogenih snovi (Nagao, 1999; Warzecha in sod., 2004). V številnih epidemioloških raziskavah je bilo ugotovljeno, da je prehrana zelo pomemben dejavnik pri nastanku rakastega obolenja. Hrana, ki jo zaužijemo lahko vpliva na karcinogenezo, zaradi prisotnosti genotoksičnih spojin (kontaminanti hrane), ki se lahko vežejo na DNA in tudi zaradi prisotnih drugih sestavin hrane (npr. maščobe), ki lahko indirektno vplivajo na tvorbo mutagenih spojin med toplotno obdelavo hrane (Toribio in sod., 2000).

HCA so promutageni ali prokarcinogeni, ki lahko v aktivni obliki tvorijo DNA povezave. Metabolična aktivacija HCA se deli na:

- fazo I: *N*-hidroksilacija inducirana s citokrom P450 in
- fazo II: esterifikacija *N*-hidroksilamina do reaktivnih estrov, ki se kovalentno vežejo na DNA.

Največjo katalitično aktivnost *N*-hidroksilacije ima citokrom CYP1A2. V aktivacijo so vključeni še drugi citokromi P450 (CYP), kot so CYP1A1, CYP3A4, CYP2C9/10, CYP2A3 in CYP1B1, a imajo manjšo katalitično sposobnost. V fazi II encimi citosola (*N*-acetiltransferaze, sulfotransferaze, prolilRNA-sintetaze in fosforilaze) katalizirajo nastanek reaktivnih estrov, kot so *N*-acetoksi, *N*-sulfoniloksi, *N*-proliloksi in *N*-fosfatil estri. Ti reaktivni metaboliti nastajajo predvsem v jetrih (slika 9) metabolizmu in se nato prenesejo preko krvnega sistema do drugih tkiv, kjer se vežejo na DNA, RNA in proteine s kovalentnimi vezmi (Schut in Snyderwine, 1999; Marchand in sod., 2002; Dashwood, 2002; Turesky in Vouros, 2004; Turesky, 2007). Takšne povezave so našli v skoraj vseh tkivih testiranih glodalcev (miši, podgane) in nečloveških primatov (opice). Že samo nekaj takšnih povezav lahko inducira tumorje in tudi druge toksične anomalije (Skog, 2004).

Glavni metaboliti detoksifikacije, ki so bili določeni v urinu človeka, so: MeIQx sulfamati, 8-MeIQx *N*2-glukuronidi, PhIP *N*2- in *N*3-glukuronidi ter *N*-glukuronid konjugati posameznih *N*-hidroksi-HCA. IQx-8-COOH je glavni metabolit detoksifikacije 8-MeIQx. V urinu pa so določeni tudi nemetabolizirani HCA (Turesky, 2007).



Slika 9: Metabolizem AIA *in vivo* (Dashwood, 2002: 93; Schut in Snyderwine, 1999: 355).  
 Figure 9: Metabolism of AIAs *in vivo* (Dashwood, 2002: 93; Schut in Snyderwine, 1999: 355).

HCA postanejo po bioaktivaciji zelo mutagene spojine, kar je bilo dokazano *in vitro* ter *in vivo* (Toribio in sod., 2000). Mutagenost HCA je odvisna od kemijske strukture in njihove zmožnosti tvorbe hipotetičnega reaktivnega nitrenium ( $R_2N^+$ ) iona (Turesky, 2007). Skog in sod. (1998b) ugotavljajo, da je predvsem imido skupina skupaj z 2-amino skupino odgovorna za mutagenost spojin skupine IQ in IQx HCA. IQ in MeIQ pripadata skupini t.i. supermutagenov, medtem ko večji del ostalih HCA pripada skupini z nižjo mutagenostjo. Komutagena harman in norharman nista mutagena, a postaneta mutagena ob prisotnosti drugih aromatskih aminov kot sta anilin in *o*-toluidin.

Amesov test se uporablja za iz vrednotenje mutagene aktivnosti spojin, in je primeren za določanje mutagene aktivnosti hrane, toplotno obdelane na različne načine. MeIQx se uporablja kot pozitivna kontrola (Skog in sod., 2003). Testna mikroorganizma sta bakteriji *Salmonella typhimurium* TA98 in TA100. *Salmonella* TA98 je bolj občutljiva za določanje mutacij tipa strukturnih sprememb, medtem ko je *Salmonella* TA100 bolj občutljiva za določanje mutacij tipa sprememb baznih parov (Wakabayashi in Sugimura, 1998). HCA-DNA povezave so kot biomarkerji možnih mutagenih sprememb, ki kažejo tveganje karcinogeneze. Vsi AIA z izjemo PhIP, so v Amesovem testu s *Salmonello* TA98 zelo



mutageni. Raziskave kažejo, da je za eno mutacijsko spremembo pri bakteriji *Salmonella* TA98 potrebnih okrog 25 PhIP-DNA povezav. Številni AIA kažejo linearno korelacijo med DNA povezavami in mutagenostjo. Stopnja mutagenosti se določa glede na število HCA-DNA povezav. Več povezav med HCA in bakterijsko DNA nastane, večja je mutagenost HCA (Schut in Snyderwine, 1999). Dodatek vitaminov (A, C, E, folne kisline, riboflavina, riboflavin 5'-fosfata, menadiona in cianokobalamina) zmanjša mutagenost HCA tako pri *S. typhimurium* TA98 kot pri TA100 (Edenharder in sod., 1999).

Preglednica 8: Mutagenost HCA v *Salmonella typhimurium* TA98 in TA100 (Nagao, 2000).  
 Table 8: Mutagenicities of HCA in *Salmonella typhimurium* TA98 in TA100 (Nagao, 2000).

HCA	št. sprememb/ $\mu$ g HCA	
	TA98	TA100
MeIQ	661000	30000
IQ	433000	7000
4,8-DiMeIQx	183000	8000
7,8-DiMeIQx	163000	9900
MeIQx	145000	14000
Trp-P-2	104200	1800
4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx	99000	3000
IQx	75000	1500
Orn-P-1	56800	-
Glu-P-1	49000	3200
Trp-P-1	39000	1700
Cre-P-1	19000	400
Glu-P-2	1900	1200
PhIP	1800	120
7,9-DiMeIQx	540	-
A $\alpha$ C	300	20
MeA $\alpha$ C	200	120
Phe-P-1	41	23
4'-OH-PhIP	2	-

Vsi HCA, ki so mutageni v bakterijskih celicah, so mutageni tudi v celicah živali in človeka. Spremeni se lahko le njihova stopnja mutagenosti (Nagao, 2000). Posamezni HCA imajo pri različnih sevih zelo različno stopnjo mutagenosti, saj imajo različni sevi različno vsebnost encimov, ki vplivajo na mutacijo posameznega seva. Vpliv posameznih HCA na mutacije pri človeku in testnih živalih je zelo različen. Tudi vpliv posameznika (živali ali človeka) ni zanemarljiv. Na izražanje mutagenosti in posledično na razvoj raka pri ljudeh zelo močno vpliva posameznik in njegova metabolična sposobnost tvorbe aktivnih karcinogenih spojin ter detoksifikacije mutagenih spojin (Nagao, 2000).

Več kot deset kemijsko sintetiziranih HCA je bilo testiranih *in vivo*, z dodajanjem v hrano podgan in miši. Vsi do sedaj testirani HCA so bili dokazano karcinogeni (Sugimura, 1997; Toribio in sod., 2000). Mednarodna agencija za raziskovanje raka (IARC) je presodila, da je IQ verjetno (skupina 2A) karcinogena spojina za človeka, in da so MeIQ, MeIQx, PhIP, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2 in Glu-P-2 (preglednica 5 in 6) možni karcinogeni (skupina 2B). Od teh so MeIQ, IQ in 8-MeIQx med najbolj mutagenimi HCA (Busquets in sod., 2004; Sugimura in sod., 2004; Totsuka in sod., 2004; Cheng in sod., 2006).

Dodatek HCA (običajno med 0,01 % in 0,06 %, v obdobju 48-112 tednov) v prehrano živali inducira rast tumorjev na različnih organih, in sicer pri (1) miših na: jetrih, pljučih, želodcu, žilah, ter pri (2) podganah na: debelem in tankem črevesju, prostati, mlečnih žlezah, jetrih, koži, mehuru, v ustni votlini (Jägerstad in Skog, 2005).

Količine HCA, ki so potrebne za razvoj raka pri poskusnih živalih, so za razvoj raka pri človeku lahko zadostne ni pa nujno. Rakasto obolenje se začne z delitvijo izvorne celice. Za razvoj molekularnih mehanizmov karcinogeneze so potrebne številne genetske spremembe. Da pride do popolne malignosti, je običajno potrebno več kot deset genetskih sprememb. Večje tveganje za rakasto obolenje predstavlja prisotnost predmalignih celic, ki že vsebujejo določeno število genetskih sprememb (Sugimura, 1997). Dokazano je, da so HCA-DNA povezave, ki povzročajo genetske spremembe, prisotne tudi v tkivih človeka (kolon, prsi, ledvica) (Turesky, 2007).

Karcinogeni potencial pečenega mesa ni odvisen samo od vsebnosti HCA, ampak tudi od drugih karcinogenih spojin (policiklični aromatski ogljikovodiki, *N*-nitrozo spojine, maščobni peroksidi, prooksidativne spojine), ki jih lahko vsebuje meso (Cross in Sinha, 2004). Količina dnevno zaužitih HCA je odvisna od vsebnosti HCA v zaužiti hrani, od količine zaužite porcije in od pogostnosti zauživanja te hrane. Ocena dnevno zaužitih HCA je za posamezne osebe zelo različna in se giblje od 0 do 15 µg na osebo na dan (Skog, 2002). Raziskovalci ugotavljajo, da pogosto zauživanje večjih količin toplotno obdelanih mesnih jedi, ki vsebujejo HCA in večje količine maščob predstavlja večje tveganje za razvoj raka v človeškem organizmu. Nekatere epidemiološke raziskave kažejo, da obstaja povezava med količino dnevno zaužitih HCA in obolevnostjo za rakom na: debelem črevesju, želodcu, prostati, mehuru, ledvicah, pljučih, prsih, pankreasu. Medtem ko druge raziskave ne potrjujejo teh povezav. Zato je na tem področju zaradi kompleksnosti vplivov nekakšna zmeda (Sugimura, 1997; Wakabayashi in Sugimura, 1998; Marchand in sod., 2002; Cross in Sinha, 2004; Turesky in Vouros, 2004; Keating in Bogen, 2004; Warzecha in sod., 2004). Iz tega sklepamo, da HCA lahko iniciirajo proces karcinogeneze pri človeku (Toribio in sod., 2000). Za kompleksno izrednotenje vpliva HCA na karcinogenezo pri človeku so potrebne številne raziskave: o tvorbi in vsebnosti HCA v hrani, o vnosu HCA v telo, o biološki razpoložljivosti HCA, o biotransformaciji HCA v organizmu in o učinkih HCA v bioloških sistemih (Toribio in sod., 2000).

Dashwood (2002) navaja zaščitne mehanizme pred negativnimi vplivi HCA.

**Zaščitni mehanizmi, ki učinkujejo pred zauživanjem hrane, ki vsebuje HCA:**

- manjše zauživanje hrane, ki vsebuje HCA,
- odstranjevanje zapečenih (zažganih) delov mesa in rib,
- uporaba načinov in pogojev toplotne obdelave mesa, ki zmanjšajo tvorbo HCA,
- zmanjšanje tvorbe HCA z antioksidanti (npr. katehini, flavonoidi, kavna kislina...), z nekaterimi žveplo vsebujočimi spojinami (npr. dialil sulfid, dipropil disulfid, dialil disulfid), z nekaterimi produkti Maillardove reakcije in olivnim oljem (dihidroksifeniletanol derivati).

**Zaščitni mehanizmi, ki učinkujejo *in vivo*:**

- uporaba antikarcinogenih spojin (prehranske vlaknine, klorofilin – polisintetičen derivat klorofila), ki tvorijo komplekse s prokarcinogeni ali aktivnimi spojinami HCA,
- inhibicija aktivacije HCA preko inhibicije citokroma P450 z indol-3-karbinolom, polifenoli, klorofilinom, konjugirano linolno kislino,
- povečanje aktivnosti citokroma CYP1A1 (glede na CYP1A2), ki preferira pot detoksifikacije,
- uporaba modulatorjev faze II, ki inducirajo encime detoksifikacije (kahveol, kafestol, čaj (zeleni, črni, beli)),
- uporaba spojin, ki tvorijo komplekse s HCA metaboliti, in tako v tkivih preprečijo tvorbo aktivnih (karcinogenih) HCA,
- uporaba reaktivnih spojin (npr. polifenolov kot je epigalokatehin-galat), ki tvorijo kompleks z arilnitrenium ionom,
- uporaba bioantimutagenov (vanilin, koumarin, kafein), ki vplivajo na podvojevanje DNA ali popravilne procese DNA in tako zmanjšajo število mutacij,
- uporaba celičnih supresorjev (polifenoli, retinoidi, karotenoidi, vitamini), kateri spremenijo poti signaliziranja, ki vodijo apoptozo ali proliferacijo celice.

Paziti moramo na količino in pogostnost zauživanja te hrane ter upoštevati individualno sposobnost biotransformacije HCA v organizmu (Busquets in sod., 2004), katero raziskovalci določajo glede na manjšo ali večjo aktivnost encimov (CYP1A2 in N-acetiltransferaza-2 oz. NAT2) vključenih v metabolično aktivacijo HCA (Marchand in sod., 2002).

### 3 MATERIAL IN METODE DE LA

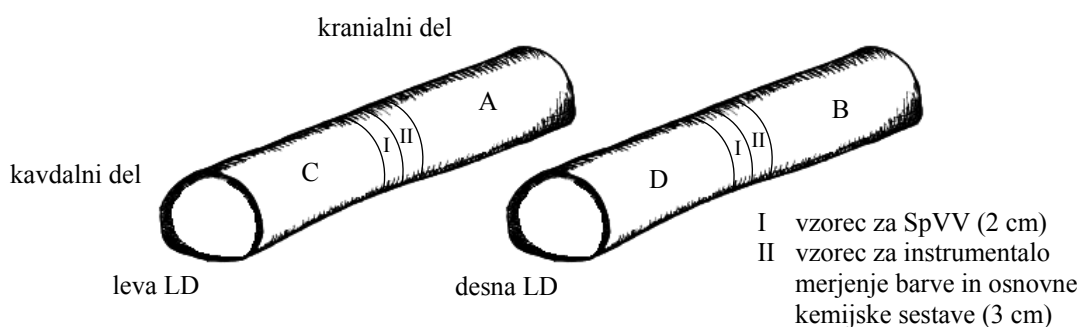
#### 3.1 MATERIAL ZA RAZISKAVO

V raziskavo je bilo vključenih 10 garanih prašičev starih ( $180 \pm 3$ ) dni. Slovenski pasemski križanci (Švedska landrace  $\times$  Large white  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire), vzrejeni pod enakimi pogoji na farmi Ihan, so bili tržnega razreda E. Zaklani in obdelani trupi so imeli povprečno toplo maso 88 kg in povprečno 58,1 % mesa. Glede na videz (barva in vlažnost površine), otip in vrednost  $\text{pH}_{24}$  (merjena 24 h *post mortem*) smo izrezali 10 levih in 10 desnih dolgih hrbtnih mišic (*m. longissimus dorsi*, LD) normalne in BMV kakovosti med 8. prsnim in 6. ledvenim vretencem, dolžine ca. 45 cm.

#### 3.2 NAČRT DELA

Na kranialnih in kavdalnih delih (slika 10) mišic smo 24 ur *post mortem* z direktno metodo (poglavje 3.3.2) izmerili vrednosti  $\text{pH}_{24}$ . Srednje dele levih in desnih mišic smo uporabili za določanje sposobnosti vezanja vode (zrezki debeline 2 cm, oznaka I) in instrumentalno analizo barve (oznaka II). Instrumentalne parametre barve smo izmerili na površini zrezkov debeline 3 cm šele po 10-minutnem izpostavljanju zrezkov zraku (pri sobni temperaturi) ter jih po merjenju uporabili še za določanje osnovne kemijske sestave (voda, beljakovine, maščobe in skupne mineralne snovi). Omenjene zrezke smo homogenizirali s kuhinjskim sekljalnikom, jih vakuumsko embalirali in do analize zamrznili pri ( $-30 \pm 1$ ) °C.

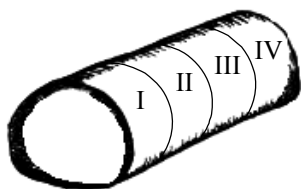
Preostale kranialne in kavdalne dele levih in desnih mišic smo razdelili na štiri enake kose (slika 10, oznake A, B, C in D) ter jih vakuumsko embalirali v polietilenske vrečke. Z naključnim izborom smo kosom določili čas zorenja 1, 3, 6 ali 10 dni in s tem eliminirali vpliv lokacije vzorca v mišici. Zorenje je potekalo v hladilniku pri temperaturi ( $2 \pm 1$ ) °C.



Slika 10: Shematski prikaz odvzema vzorcev iz levih in desnih dolgih hrbtnih mišic prašiča.  
Figure 10: Scheme of sampling left and right muscles LD.

Po določenem času zorenja smo vsak kos (A, B, C in D) razdelili na štiri zrezke debeline 3 cm (slika 11) in pripravili vzorce za posamezne analize. Vzorce (slika 11, oznaki I in II) za analizo vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov in instrumentalno merjenje strižne sile (WBSF) smo toplotno obdelali (poglavje 3.2.1), medtem ko smo vzorce za določanje

vrednosti pH v ekstraktu ( $pH_{\text{ekstrakt}}$ ), deleža neproteinskega dušika (NPN), prostih aminokislin (FAA) (slika 11, oznaka III), kreatina (Cr), kreatinina (Crn) in reducirajočih sladkorjev (oznaka IV) presne homogenizirali skupaj z izcejenim mesnim sokom, jih vakuumsko embalirali v polietilenske vrečke ter jih do analize zamrznili pri temperaturi  $(-30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Tako pripravljene vzorce smo v zamrzovalniku hranili do posameznih analiz.



- I HCA  $70 ^\circ\text{C}$  + WBSF  $70 ^\circ\text{C}$  (3 cm)
- II HCA  $95 ^\circ\text{C}$  + WBSF  $95 ^\circ\text{C}$  (3 cm)
- III  $pH_{\text{ekstrakt}}$  + NPN + FAA (3 cm)
- IV Cr + Crn + sladkorji (3 cm)

Slika 11: Odvzem vzorcev za fizikalne in kemijske analize.  
Figure 11: Sampling for physical and chemical analysis.

### 3.2.1 Toplotna obdelava vzorcev

Zrezke za toplotno obdelavo smo stehali, kondicionirali v hladilniku pri temperaturi  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$  in jih brez dodatka maščobe toplotno obdelali na dvoploščnem žaru (Silex, Nemčija) s teflonsko prevleko in s temperaturo plošč  $220 ^\circ\text{C}$ . Temperaturo plošč žara in središčno temperaturo zrezkov smo merili s termometrom Ellab ctd 85 (Ellab, Danska). Zrezke pečene do središčne temperature  $T_s = 70 ^\circ\text{C}$  ali  $T_s = 95 ^\circ\text{C}$  smo ponovno tehtali in jim na spodnji in zgornji strani odrezali skorji debeline 2 mm s preciznim kuhinjskim rezalnikom. Obe skorji zrezka smo združili, stehali, embalirali v polietilenske vrečke in do analize vsebnosti HCA zamrznili pri  $(-30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Zamrznjene vzorce smo na dan analize homogenizirali s kuhinjskim sekljalnikom pri maksimalni hitrosti do homogene strukture. Izceje pečenja smo določili kot odstotek izceje glede na začetno maso vzorca.

Jedra pečenih zrezkov brez skorje smo zavili v alu-folijo in ohladili ter hranili v hladilniku pri temperaturi  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$  do naslednjega dne, ko smo na njih instrumentalno izvednotili teksturo, t.j. WBSF.

## 3.3 METODE DELA

### 3.3.1 Določanje osnovne kemijske sestave mesa

Vsebnost vode v mesu smo določili s sušenjem po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 950.46 Moisture in Meat (1997), vsebnost beljakovin (skupni dušik  $\times 6,25$ ) po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 928.08 Nitrogen in Meat Kjeldahl Method (1997), vsebnost intramuskularne maščobe po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 991.36 Fat (Crude) in Meat and Meat Product (1997) in vsebnost skupnih mineralnih snovi po uradnem postopku, opisanem v AOAC Official Method 920.153 Ash of Meat (1997).

Ponovljivost metod smo določili tako, da smo v poskusu merjene fizikalne, fizikalno-kemijske in kemijske parametre na naključno izbranem vzorcu analizirali v šestih

ponovitvah (priloge A, F in H). Ponovljivost smo ovrednotili z določitvijo koeficienta variabilnosti (KV), ki smo ga izračunali po naslednji enačbi:

$$KV(\%) = \frac{SO}{\bar{x}} \times 100$$

so ... standardni odklon

$\bar{x}$  ... povprečna vrednost šestih meritev

Koeficienti variabilnosti določanja vsebnosti vode, beljakovin, intramuskularne maščobe in skupnih mineralnih snovi (priloga A) niso presegali 4 %, kar kaže na zelo dobro ponovljivost teh metod. Na osnovi teh ugotovitev smo se tudi odločili, da je za nadaljnje analize dovolj delo v dveh paralelkah.

### 3.3.2 Merjenje vrednosti pH

Direktno merjenje vrednosti pH<sub>24</sub> smo izvedli z vbodno kombinirano stekleno gelsko elektrodo tipa 03 (Testo pH elektroda) priključeno na pH meter (Testo 230, Testo, Italija) opremljen s temperaturnim tipalom (Testo, 0613 2211). Natančnost merjenja je bila ± 0,01 enote. pH meter je bil umerjen na pH 4,00 in pH 7,00.

#### Merjenje vrednosti pH v ekstraktu

5,000 g vzorca smo 60 s homogenizirali pri sobni temperaturi v 50 mL destilirane vode s homogenizatorjem Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G (IKA, Nemčija) pri 10000 obr/min. Homogeno suspenzijo smo filtrirali skozi filter papir (Sartorius 388, FT-3-101-150) in vrednost pH izmerili v filtratu s Sartorius pH elektrodo tipa PY-P10, priključeno na Sartorius Basic pH meter PB-20. Natančnost umerjenega pH metra na pH 4,00, pH 7,00 in pH 10,00 je bila ± 0,005 enote.

Ponovljivost metode je bila zelo dobra, saj je bil koeficient variabilnosti merjenja vrednosti pH<sub>ekstrakt</sub> v šestih paralelkah zelo majhen (0,23 %) (priloga A).

### 3.3.3 Instrumentalno merjenje barve

Barvo mišic smo določili s kromometrom Minolta CR 200b (Minolta, Japonska). Pred merjenjem smo kromometer (vir svetlobe (angl. illuminant) C, osvetljevanje pod kotom 45°) umerili na bel standard ( $L^* = 92,8$ ;  $a^* = 0,3136$ ;  $b^* = 0,3196$ ) ter meritve izvedli v šestih paralelkah. Aparat poda barvo v treh koordinatah, kot so v  $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$ . Vrednost  $L^*$  opisuje svetlost barve, pri čemer višje vrednosti pomenijo svetlejšo barvo vzorca in obratno. Vrednost  $a^*$  določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju (rdeča barva je odvisna od prisotnosti barvila mioglobina) in zelene barve v negativnem območju (samo v primeru diskoloracij na površini mesa). Vrednost  $b^*$  pa predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju (rumena barva je povezana s stopnjo oksigenacije mesnega barvila) in modre v negativnem območju (samo v primeru diskoloracij na površini mesa).

### 3.3.4 Določanje sposobnosti za vezanje vode

Sposobnost za vezanje vode – SpVV) mišic smo določili po metodi, ki jo opisujeta Honikel (1998) in Micklander in sod. (2005). Zrezke debeline 2 cm (slika 10, oznaka I) smo oblikovali v vzorce dimenzij  $6 \times 3 \times 2 \text{ cm}^3$ , jih stehtali (ca. 40 g) in ovili v mrežico. S pomočjo nitke smo vzorce obesili v napihnjene in zavarjene vrečke. Nadtlak dušika v vrečki je preprečeval kontakt vzorca z vrečko. Tako pripravljeni vzorci so prosto viseli 48 ur pri temperaturi 4 °C. Vzorce smo po hranjenju ponovno tehtali in jim določili količino izceje. SpVV smo izrazili kot odstotek izceje glede na začetno maso vzorca.

### 3.3.5 Instrumentalno merjenje strižne sile

Za določanje strižne sile mišic smo uporabili modificirano metodo, ki jo opisuje Fortin in sod. (2005). Strižno silo mišic smo določili z univerzalnim instrumentom za mehanično testiranje TA.XT plus texture analyser (Stable Micro Systems, VB). Iz toplotno obdelanih in ohlajenih zrezkov smo izrezali šest valjev premera 1,27 cm vzdolž mišičnih vlaken. Strižno silo smo določili na sredini vsakega valja, pravokotno na mišična vlakna. Uporabili smo strižno Warner-Bratzler "V" giljotino debeline 3 mm, ki vsebuje trikotno odprtino (60°). Hitrost giljotine je bila  $2,0 \times 10^{-3} \text{ m/s}$ . Silo, ki je bila potrebna za strig valja, smo izrazili v N (Newton).

### 3.3.6 Določanje vsebnosti neproteinskega dušika

Vsebnost neproteinskega dušika v mišicah smo določili po modificirani metodi, ki jo opisujejo Paulsen in sod. (2006) in Soriano in sod. (2006). Zatehtali smo 5,000 g homogeniziranega vzorca, dodali 40 mL ohlajene 3 % triklorocente kisline (Merck, 1.00807) in 120 s homogenizirali v ledeni vodni kopeli s homogenizatorjem (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija) pri 20000 obr/min. Suspenzijo smo filtrirali skozi filter papir (Sartorius 388, FT-3-101-150) direktno v Büchi razklopne kivete in nato spirali filtrirno pogačo z 10 mL 3 % raztopine triklorocetne kisline. Vsebnost NPN smo določili v skupnem bistrem filtratu z Büchi Kjeldahl linijo (Büchi Kjeldahl Line: K-424, B-324, B-414) za določanje dušika po uradni Kjeldahl metodi (AOAC 928.08, 1997). Delež neproteinskega dušika smo izrazili kot odstotek neproteinskega dušika glede na skupni dušik. Vsak vzorec smo analizirali v dveh ponovitvah.

Ponovljivost metode je bila zelo dobra, saj je bil koeficient variabilnosti določanja vsebnosti neproteinskega dušika v šestih paralelkah naključnega vzorca 1,21 % (priloga A).

### 3.3.7 Določanje vsebnosti prostih aminokislin

Proste aminokisline smo iz vzorcev ločili z ekstrakcijo s trdno fazo (*Solid Phase Extraction*, SPE), jih derivatizirali in določili z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo z obrnjeno fazo (RP-HPLC) v kombinaciji z masnim detektorjem in kromatograme obdelali z računalniškim programom MassLynx™ V4,0 (Micromass, 2004).

Vzorci in standarde smo pred analizo s HPLC pripravili s kompletom 'EZ:faast for Free Physiological Acid Analysis by LC-MS' (Phenomenex, ZDA).

### 3.3.7.1 Priprava vzorca

V 60 mL epruveto smo odtehtali 3,000 g homogeniziranega vzorca, dodali 30 mL destilirane vode in 50 µL raztopine (5,0 mg/L) internega standarda L-norlevcina (Merck, 1.24560). Vse skupaj smo nato 120 s homogenizirali v ledeni vodni kopeli s homogenizatorjem (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija) pri 10000 obr/min. Suspenzijo smo filtrirali skozi filter papir (Sartorius 388, FT-3-101-150). Vzorci so tako bili pripravljeni za postopek z EZ:faast™ kompletom (LC/MS Free 'Physiological' Amino Acid Analysis Kit with 250 × 2,0 mm column; Phenomenex, ZDA, KHO-7337). Za ekstrakcijo na trdnem nosilcu smo uporabili 100 µL filtrata. Derivatizacijo smo izvedli s patentiranim reagentom, ki je del EZ:faast™ kompleta (Phenomenex, ZDA).

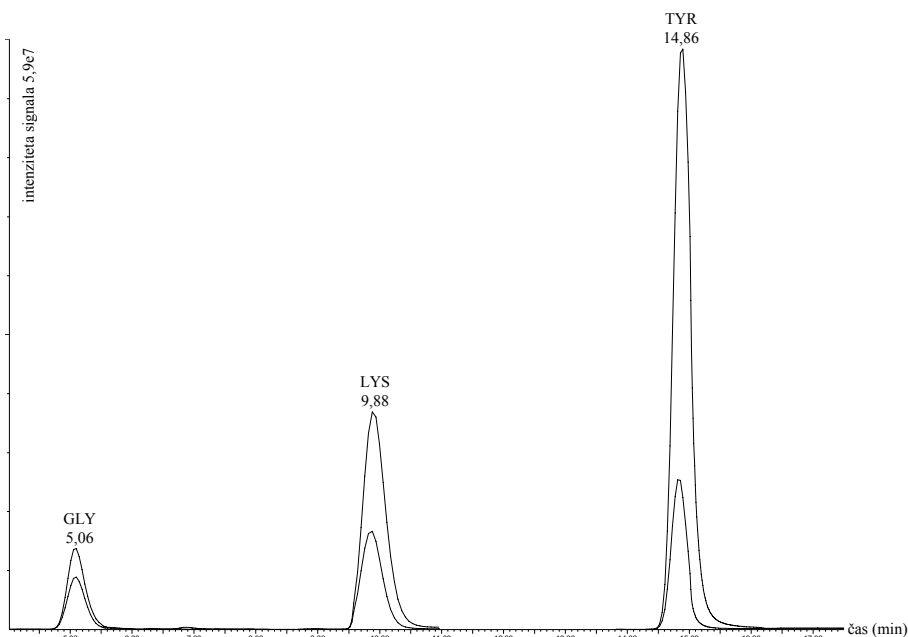
### 3.3.7.2 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

HPLC analiza je bila opravljena na sistemu Agilent 1100, sestavljenem iz binarne gradientne črpalke (Agilent 1100, G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (Agilent 1100, G1379A), avtomatskega podajalnika (Agilent 1100, G1330B) in termostata za kolono (Agilent 1100, G1316A). Uporabili smo kolono EZ:faast AAA-MS HPLC (4 µm, 250 mm × 2 mm i.d.) firme Phenomenex (Torrance, CA, ZDA, 00G-4402-B0). Proste aminokisljine smo določili s primerjavo retencijskih časov in m/z standardov prostih aminokisljin, ki jih vključuje EZ:faast komplet. Kromatografija je potekala z gradientom mobilne faze in pretokom 0,25 mL/min, pri čemer je bila mobilna faza A 10 mM amonijev formiat (Fluka, 09739) v Milli-Q vodi (Millipore S.A., Francija) in mobilna faza B 10 mM amonijev formiat (Fluka, 09739) v metanolu (Merck, 1.06007). Gradient je bil naslednji: 0-0,1 min 32 % A; 0,1-13 min 32-14 % A; 13-13,1 min 14-32 % A; 13,1-22 min 32 % A, volumen injiciranja 5 µL in temperatura kolone 35 °C. Vsi kromatografski pogoji so enaki kot jih navaja proizvajalec EZ:faast kompleta (Phenomenex), modificirali smo le gradient mobilne faze.

Uporabljen masni detektor (Micromass Quattro micro® API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (electrospray ionization – ESI) je deloval pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 23 V, temperaturo izvora 100 °C in napetost kapilare 4,0 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+). Razpršilni plin dušik je imel temperaturo 350 °C in pretok 500 L/h. Plin vhodne leče dušik je imel pretok 50 L/h. Detekcija na masnem detektorju je potekala v SIR (Selected Ion Recording) načinu. Podrobnejši opis je podan v prilogi B.

Rezultati so bili obdelani s funkcijo Quantify v računalniškem programu MassLynx™ V4,0 (Micromass, 2004).





Slika 12: Primer kromatograma prostih aminokislin glicina, lizina in tirozina v naključnem vzorcu mesa (normalna kakovost, 10 dni zoren) in standardni dodatek teh aminokislin.

Figure 12: Sample of chromatogram of free glycine, lysine and tyrosine in a random sample of meat (normal quality, 10 days aged) and amino acids standard addition.

### 3.3.7.3 Validacija metode

#### 3.3.7.3.1 Meja detekcije in kvantifikacije

Z računalniškim programom (MassLynx™ V4,0) smo po metodi 'Peak-to-Peak' določili razmerje ('signal to noise' – S/N) med signalom opazovane proste aminokislina in šumom. Mejo detekcije in kvantifikacije smo določili kot vsebnost opazovane proste aminokislina v vzorcu, pri kateri je razmerje  $S/N = 3$  oz.  $S/N = 10$ . Rezultati so predstavljeni v prilogi I.

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

Za HPLC-MS metodo smo poiskali povezavo med analitičnim signalom in vsebnostjo prostih aminokislin s pomočjo standardnega dodatka aminokislin in internim standardom. Kot standardni dodatek smo uporabili mešan standard aminokislin (Sigma, A9906; Merck, 1.00289; Fluka, 11150; Merck, 1.02838) v petih dodatkih (v dveh ponovitvah) in tako metodo umerili za območje med 0,2 in 4,0  $\mu\text{mol FAA/g}$  vzorca. V 60 mL epruveto smo odtehtali 1,500 g vzorca, dodali naraščajočo količino mešanega standarda aminokislin in konstantno količino (50  $\mu\text{L}$ ) raztopine (5 mg/mL) internega standarda L-norlevcina v 0,1 M Na-citratu ter postopali enako kot z vzorci.

Preglednica 9: Priprava umeritvene krivulje za kvantitativno določanje prostih aminokislin po metodi standardnega dodatka in internega standarda.

Table 9: Preparation of a calibration curve for free aminoacids quantification by the standard addition method and internal standard method.

Točke	masa vzorca (g)	množina NLEU na SPE (nmol)	volumen destilirane vode (mL)	množina dodane FAA* na SPE (nmol)
slepa	1,5	6,5	30,0	0,0
1	1,5	6,5	30,0	2,0
2	1,5	6,5	30,0	10,0
3	1,5	6,5	30,0	20,0
4	1,5	6,5	30,0	30,0
5	1,5	6,5	30,0	40,0

NLEU – L-norlevcin, \* mešan standard 29-ih prostih aminokislin

Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti posamezne proste aminokislina kaže na linearno zvezo med analitičnim signalom in vsebnostjo analita (priloga I). Koeficient determinacije ( $r^2$ ) je pri aminokislinah večji od 0,99, razen pri: alaninu ( $r^2 = 0,9808$ ), glicinu ( $r^2 = 0,9862$ ), tavrinu ( $r^2 = 0,9827$ ) in anserinu ( $r^2 = 0,9761$ ).

Enačba premice:

$$\frac{S_{AK_i}}{S_{IS}} = k_i \times \frac{n_{AK_i}}{n_{IS}}$$

Izračun vsebnosti FAA:

$$FAA_i (mg / 100g) = \frac{S_{AK_i} \times n_{IS} \times M}{S_{IS} \times k_i \times m_{vz}} \times 0,03$$

- $FAA_i$  vsebnost posamezne FAA (mg/100g vzorca),
- $S_{AK_i}$  površina pod vrhom opazovane FAA,
- $S_{IS}$  površina pod vrhom internega standarda,
- $k_i$  naklon premice za opazovano FAA,
- $n_{AK_i}$  množina standardnega dodatka opazovane FAA na SPE (nmol),
- $n_{IS}$  množina dodanega internega standarda na SPE (nmol),
- $m_{vz}$  masa vzorca (g),
- $M_i$  molska masa opazovane FAA (mg/mmol),
- 0,03 korekturni faktor.

### 3.3.7.3.3 Ponovljivost metode

Ponovljivost določanja vsebnosti prostih aminokislin smo določili znotraj paralelke naključnega vzorca. Vzorec smo pripravili enkrat in ga 6-krat zaporedoma injicirali (priloga E). Določili smo tudi ponovljivost med paralelkami in sicer tako, da smo vsebnost prostih aminokislin na naključno izbranem vzorcu analizirali v šestih paralelkah (priloga F). Koeficienti variabilnosti znotraj paralelke se gibali med 1,31 % in 5,8 %, koeficienti variabilnosti med paralelkami pa so bili v večini primerov pod 10 %, razen pri tavrinu in cistationinu. Nizke vrednosti koeficientov variabilnosti kažejo na zelo dobro ponovljivost uporabljene metode.

### 3.3.8 Določanje vsebnosti kreatina

#### 3.3.8.1 Priprava vzorca

Vsebnost kreatina v mišici smo določili po metodah Campo in sod. (1995), Campo in sod. (1998) ter Polak in sod. (2007). V demetrijevo stekleničko smo odtehtali 0,250 g homogeniziranega mesa, dodali 100 mL 3 % raztopine trikloroacetne kisline (Merck, 1.00807) in 5 min homogenizirali v ledeni vodni kopeli s homogenizatorjem (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija) pri 11000 obr/min. Sledila je filtracija skozi filter papir (Sartorius 391, FT-3-104-150). 20 mL bistrega filtrata smo v liju ločniku razmastili z 10 mL dietiletra (Merck, 1.00921). Vzeli smo 4 mL razmaščene vzorca in dodali 2 mL (0,2 g/L) raztopine diacetila (Merck, 8.03528) in 2 mL (25 g/L) raztopine 1-naftola (Merck, 8.22289) v raztopini natrijevega hidroksida (20 g/L) (Merck, 1.06498). Po dodatku reagentov smo počakali 10 min in nato reakcijsko zmes segrevali še 5 min pri 40 °C. Po 10-ih minutah smo izmerili absorpcijo pri  $\lambda = 520$  nm.

#### 3.3.8.2 Validacija metode

##### 3.3.8.2.1 Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom

Kreatin (Sigma, C-0780) raztopljen (10 mg/mL) v 3 % raztopini trikloroacetne kisline (Merck, 1.00807) smo dodali vzorcem mesa (0,130 g) v štirih dodatkih (0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL in 0,4 mL) v dveh ponovitvah ter z njimi enako postopali kot z vzorci brez dodanega kreatina. Metodo smo kalibrirali za območje med 4 mg/g in 16 mg/g vzorca.

Preglednica 10: Priprava umeritvene krivulje za določanje kreatina s standardnim dodatkom.

Table 10: Preparation of a calibration curve for creatine by the standard addition method.

Točke	masa vzorca (g)	raztopina kreatina (mL)	3 % trikloroacetna kislina <sup>A</sup> (mL)	raztopina diacetila (mL)	raztopina 1-naftola (mL)
slepa	0,130	0	4	2	2
1	0,130	0,1	3,9	2	2
2	0,130	0,2	3,8	2	2
3	0,130	0,3	3,7	2	2
4	0,130	0,4	3,6	2	2

A – raztopina razmaščena z dietiletrom (Merck, 1.00921).

Iz umeritvene krivulje smo ugotovili linearno zvezo med analitičnim signalom in vsebnostjo analita. Koeficient determinacije ( $r^2$ ) je večji od 0,99 (priloga I).

Izračun vsebnosti kreatina:

$$Cr(mg / g) = \frac{A_{520}}{k_{Cr} \times m_{vz}} \times 25$$

$Cr$  vsebnost kreatina (mg/g vzorca),  
 $A_{520}$  absorbanca  $\lambda = 520$  nm,  
 $k_{Cr}$  naklon premice za kreatin,  
 $m_{vz}$  masa vzorca (g),  
 25 faktor razredčenja

### 3.3.8.2.2 Ponovljivost metode

Koeficient variabilnosti znotraj paralelke pri določanju vsebnosti kreatina je bil 0,50 %, med paralelkami pa 2,09 %. Nizki vrednosti koeficientov variabilnosti kažejo na zelo dobro ponovljivost metode (prilogi E in F).

## 3.3.9 Določanje vsebnosti kreatinina

### 3.3.9.1 Priprava vzorca

Vsebnost kreatinina v mesu smo določili po metodah Campo in sod. (1995), Campo in sod. (1998) ter Polak in sod. (2007). V demetrijevo steklenico smo odtehtali 3,000 g homogeniziranega mesa, dodali 30 mL 3 % raztopine trikloroacetne kisline (Merck, 1.00807) in 5 min homogenizirali v ledeni vodni kopeli s homogenizatorjem (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija) pri 11000 obr/min. Sledila je filtracija skozi filter papir (Sartorius 391, FT-3-104-150). 10 mL bistrega filtrata smo v liju ločniku razmastili z 5 mL dietiletra (Merck, 1.00921). Vzeli smo 4 mL razmaščenega vzorca in dodali 1,5 mL (2 g/L) raztopine pikrinske kisline (Kemika, 1610109) v raztopini NaOH (20 g/L) (Merck, 1.06498). Po dodatku reagentov smo počakali 10 min in nato segrevali reakcijsko zmes 10 min pri 40 °C. Po 10-ih minutah smo izmerili absorpcijo pri  $\lambda = 500$  nm.

### 3.3.9.2 Validacija metode

#### 3.3.9.2.1 Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom

Kreatinin (Merck, 1.05208) raztopljen (2,5 mg/mL) v 3 % raztopini trikloroacetne kisline (Merck, 1.00807) smo dodali vzorcem mesa (1,500 g) v štirih dodatkih (0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL in 0,4 mL) v dveh ponovitvah in z njimi enako postopali kot z vzorci brez dodanega kreatinina. Metodo smo kalibrirali za območje med 0,08 mg/g in 0,33 mg/g vzorca.

Preglednica 11: Priprava umeritvene krivulje za določanje kreatinina s standardnim dodatkom.  
Table 11: Preparation of a calibration curve for creatinine by the standard addition method.

Točke	masa vzorca (g)	raztopina kreatinina (mL)	3 % trikloroacetna kislina <sup>A</sup> (mL)	raztopina pikrinske kisline (mL)
slepa	1,500	0	4	1,5
1	1,500	0,1	3,9	1,5
2	1,500	0,2	3,8	1,5
3	1,500	0,3	3,7	1,5
4	1,500	0,4	3,6	1,5

A – raztopina razmaščena z dietiletrom (Merck, 1.00921).

Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti kreatinina kaže na linearno povezavo med analitičnim signalom in vsebnostjo analita. Koeficient determinacije ( $r^2$ ) je večji od 0,99 (priloga I).

Izračun vsebnosti kreatinina:

$$Crn(mg / g) = \frac{A_{500}}{k_{Crn} \times m_{vz}} \times 7,5$$

$Crn$	vsebnost kreatinina (mg/g vzorca),
$A_{500}$	absorbanca pri $\lambda = 500$ nm,
$k_{Crn}$	naklon premice za kreatinin,
$m_{vz}$	masa vzorca (g),
7,5	faktor razredčenja

### 3.3.9.2.2 Ponovljivost metode

Koeficient variabilnosti znotraj paralelke pri določanju vsebnosti kreatinina je bil 0,71 %, med paralelkami pa 1,13 %. Nizki vrednosti koeficientov variabilnosti kažejo na zelo dobro ponovljivost metode (priloge E in F).

### 3.3.10 Določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev

Vsebnost prostih reducirajočih sladkorjev v prašičjem mesu smo določili po ekstrakciji na trdni fazi z ionsko izločitveno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Ion Exclusion Liquid Chromatography – IE-LC) v kombinaciji z masnim spektrometrom. Kromatograme smo obdelali z računalniškim programom MassLynx™ V4,0 (Micromass, 2004).

#### 3.3.10.1 Priprava vzorca

V stekleno epruveto smo odtehtali 1,000 g homogeniziranega vzorca, kot interni standard dodali 100  $\mu$ L raztopine (0,5 mg/ml) D(+)-ksiloze (Fluka, 95729) in 5,4 mL Milli-Q vode. Vse skupaj smo 90 s homogenizirali s homogenizatorjem (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija) pri 21000 obr/min v ledeni kopeli. Dodali smo 14,5 mL acetona (Merck, 1.00014) in ponovno homogenizirali (150 s pri 21000 obr/min). Nato smo vzorec filtrirali skozi filter papir (Sartorius 388, FT-3-101-150). Filtrat smo evaporirali z Büchi vakuumskim rotavaporjem (Büchi Rotavapor R-114 z Vac® V-500, Švica) pri 70 °C in 5 kPa do približno enega mL vzorca. Ostanek smo nato ponovno razredčili do 1,5 g z Milli-Q vodo in dodali 7 mL acetonitrila (Merck, 1.00030). Sledilo je čiščenje reducirajočih sladkorjev z modificiranim SPE postopkom, kot ga opisujejo Švob-Troje in sod. (1997). Uporabili smo strata NH<sub>2</sub> (Phenomenex, ZDA, 8B-S009-HCH), kondicioniran z 2 mL metanola (Merck, 1.06007) in uravnovežen z 2 mL mešanice acetonitrila:Milli-Q voda (4:1). Nato smo injicirali vzorec in ga očistili z 1 mL dietiletra (Merck, 1.00921). Sledilo je 3 minutno sušenje in eluiranje reducirajočih sladkorjev s 3,5 mL Milli-Q vode v vialo. Tako očiščen vzorec smo analizirali s HPLC-MS.

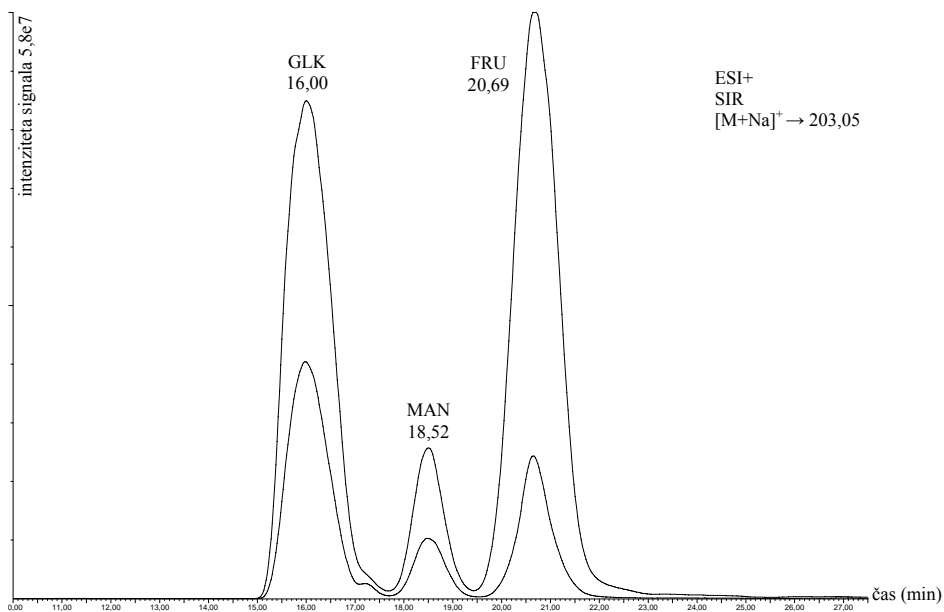
#### 3.3.10.2 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

HPLC analiza je bila opravljena na sistemu Agilent 1100, sestavljenem iz binarne gradientne črpalke (Agilent 1100, G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (Agilent

1100, G1379A), avtomatskega podajalnika (Agilent 1100, G1330B) in termostata kolone (Agilent 1100, G1316A). Temperatura avtomatskega podajalnika je bila vzdrževana pri temperaturi 20 °C, volumen injiciranja pa je bil 10 µL. Ločevanje je potekalo na ligand-izmenjevalni koloni CARBOsep CHO-820 CA (300 mm × 7,8 mm, velikost delcev 9 µm) firme Transgenomic™ (ZDA, CHO-99-9855), opremljeni s predkolono SecurityGuard C18 ODS (4 mm × 3 mm) firme Phenomenex (ZDA, AJO-4286). Pretok mobilne faze (Milli-Q voda) je bil 0,35 mL/min pri temperaturi 80 °C. Reducirajoče sladkorje smo določili s primerjavo retencijskih časov in m/z standardov sladkorjev. Analiza enega vzorca je trajala 80 min. Retencijski časi posameznih reducirajočih sladkorjev so prikazani v prilogi C.

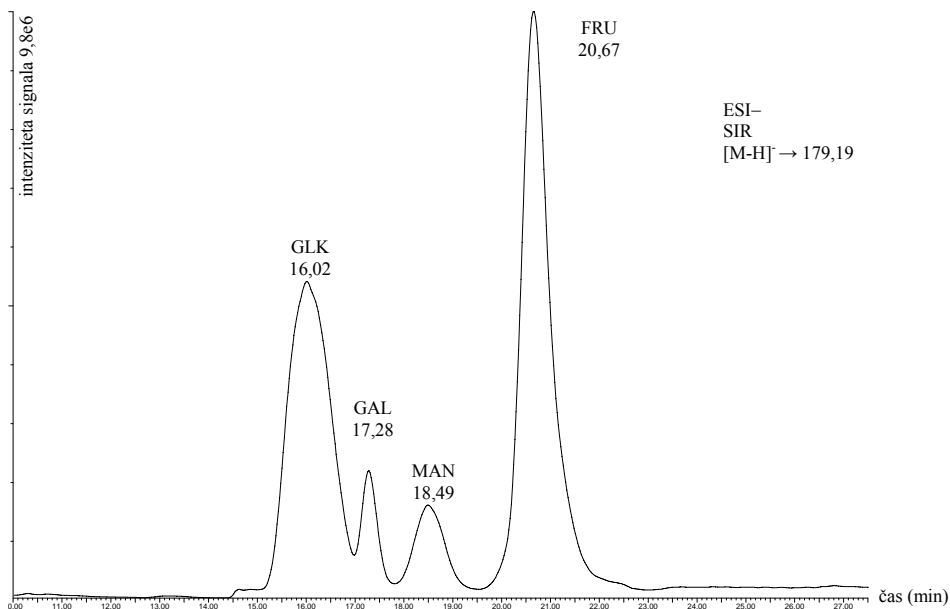
Uporabljen masni detektor (Micromass Quattro micro® API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo je deloval pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 25 V, temperaturo izvora 120 °C in napetost kapilare 3,0 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+). Za potrditev pa se uporablja napetost vhodne leče -15,0 V, napetost kapilare -3,0 kV v negativnem načinu ionizacije (ESI-). Razpršilni plin dušik je imel temperaturo 430 °C in pretok 500 L/h. Plin (dušik) vhodne leče je imel pretok 100 L/h. Detekcija (m/z) kationov z natrijem in anionov je potekala v SIR (Selected Ion Recording) načinu. Podrobnejši opis je podan v prilogi C.

Rezultati so bili obdelani s funkcijo Quantify v računalniškem programu MassLynx™ V4,0 (Micromass, 2004).



Slika 13: Primer kromatograma (v ESI+ načinu) glukoze (GLK), manoze (MAN) in fruktoze (FRU) naključnega vzorca (normalna kakovost, 6 dni zoren) ter standardni dodatek teh monosaharidov.

Figure 13: Sample of chromatogram (in ESI+ mode) of glucose (GLK), mannose (MAN) and fructose (FRU) from a random sample (normal quality, aged 6 days) and their standard addition.



Slika 14: Primer kromatograma (v ESI- načinu) glukoze (GLK), galaktoze (GAL), manoze (MAN) in fruktoze (FRU) naključnega vzorca (normalna kakovost, 10 dni zoren).

Figure 14: Sample of chromatogram (in ESI- mode) of glucose (GLK), galactose (GAL), mannose (MAN) and fructose (FRU) from a random sample (normal quality, aged 10 days).

### 3.3.10.3 Validacija metode

#### 3.3.10.3.1 Meja detekcije in kvantifikacije

Z računalniškim programom (MassLynx™ V4,0) smo po metodi 'Peak-to-Peak' določili razmerje ('signal to noise' – S/N) med signalom opazovanega reducirajočega sladkorja in šumom. Mejo detekcije in kvantifikacije smo določili kot vsebnost opazovanega reducirajočega sladkorja v vzorcu, pri kateri je razmerje S/N = 3 oz. S/N = 10. Rezultati so predstavljeni v prilogi I.

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

Pripravili smo dva mešana standarda, in sicer (1) glukozo in fruktozo ter (2) manozo, ribozo, arabinozo, ramnozo, maltozo in maltotriozo različnih koncentracij (0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1,0 mg/mL). Glukozo in fruktozo smo umerili za območje med 20,0 µg/g in 4,0 mg/g vzorca, medtem ko smo manozo, ribozo, arabinozo, ramnozo, maltozo in maltotriozo umerili za območje med 2,0 µg/g in 0,4 mg/g vzorca. Vzorcem smo dodali naraščajočo količino mešanega standarda reducirajočih sladkorjev in konstantno količino 50 µg internega standarda D(+)-ksiloze (Fluka, 95729) ter z njimi enako postopali kot z vzorci brez dodanega standarda.

Preglednica 12: Priprava umeritvene krivulje za kvantitativno določanje reducirajočih sladkorjev po metodi standardnega dodatka in internega standarda.

Table 12: Preparation of a calibration curve for sugars quantification by the standard addition method and internal standard method.

Točka	masa vzorca (g)	masa internega standarda (µg)	masa GLK in FRU v standardu (1) (µg)	masa MAN, RIB, ARA, RAM, MAL in MALTRI v standardu (2) (µg)
slepa	0,5	50,0	0,0	0,0
1	0,5	50,0	20,0	2,0
2	0,5	50,0	200,0	20,0
3	0,5	50,0	2000,0	200,0
4	0,5	50,0	4000,0	400,0

Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti posameznih reducirajočih sladkorjev kaže na linearno zvezo med analitičnim signalom in vsebnostjo analita. Koeficient determinacije ( $r^2$ ) je pri vseh reducirajočih sladkorjih večji od 0,99 (priloga I).



Enačba premice:

$$\frac{S_{SL_i}}{S_{IS}} = k_i \times \frac{m_{SL_i}}{m_{IS}}$$

Izračun vsebnosti reducirajočih sladkorjev:

$$SLAD_i (mg / g) = \frac{S_{SL_i} \times m_{IS}}{S_{IS} \times k_i \times m_{vz}} \times 0,001$$

$SLAD_i$  vsebnost posameznega opazovanega sladkorja (mg/g vzorca),  
 $S_{SL_i}$  površina pod vrhom opazovanega sladkorja,  
 $S_{IS}$  površina pod vrhom internega standarda,  
 $k_i$  naklon premice za opazovan sladkor,  
 $m_{SL_i}$  masa standardnega dodatka opazovanega sladkorja ( $\mu$ g),  
 $m_{IS}$  masa dodanega internega standarda ( $\mu$ g),  
 $m_{vz}$  masa vzorca (g),  
0,001 faktor pretvorbe.

### 3.3.10.3.3 Ponovljivost metode

Koeficienti variabilnosti znotraj paralelke pri določanju vsebnosti reducirajočih sladkorjev so se gibali med 1,27 % in 14,43 %, koeficienti variabilnosti med paralelkami so bili v večini primerov pod 10 %, razen maltozi in maltotriozi. Razmeroma nizke vrednosti koeficientov variabilnosti kažejo na dobro ponovljivost metode, izjema je le maltotrioza (priloge E in F).

### 3.3.11 Določanje vsebnosti heterocikličnih aromatskih aminov

Heterociklične aromatske amine smo ekstrahirali z ekstrakcijo s trdno fazo, jih določili z RP-HPLC v kombinaciji z masnim spektrometrom in dobljene kromatograme obdelali z računalniškim programom MassLynx<sup>TM</sup> V4,0 (Micromass, 2004).

#### 3.3.11.1 Priprava vzorca

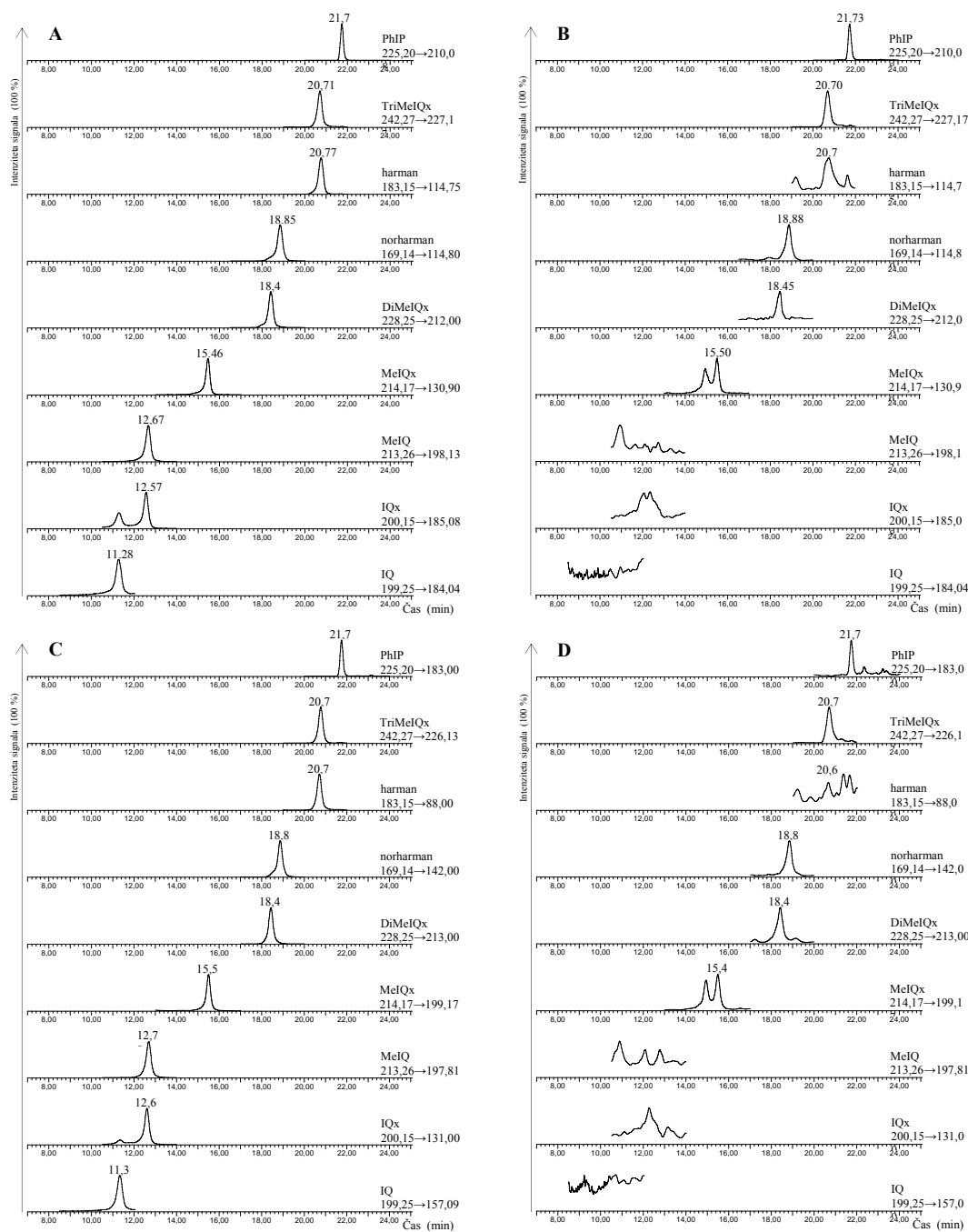
Za določanje vsebnosti HCA smo uporabili modificirano metodo, ki jo opisujejo Messner in Murkovic (2004) ter Sentellas in sod. (2004). V čašo smo odtehtali 3,000 g homogeniziranega vzorca, dodali 100  $\mu$ L raztopine internega standarda (0,5  $\mu$ g/g) TriMeIQx (TRC, A630000) v metanolu in 12 mL 1 M raztopine NaOH (Merck, 1.06498). Suspenzijo smo homogenizirali pri sobni temperaturi 12 h na magnetnem mešalniku (IKA, RCT basic) pri 500 obr./min. V alkalni homogenat smo vmešali 13 g diatomejske zemlje - EXtrelut NT (Merck, 1.15092) in z zmesjo napolnili stekleno kolono (Lenz, 5.4508.04). HCA smo ekstrahirali s 75 mL ekstrakcijskega topila etilacetata (Merck, 1.00868) in diklorometana (Merck, 1.06044) v razmerju 1 : 1. Sledilo je SPE čiščenje eluata na kolonicah (angl. Cartridge) Oasis MCX (angl. Mixed Mode Cation Exchanger) 60 mg (Waters, ZDA, 186000253). Ves eluat smo injicirali na MCX sorbent, kondicioniran z 2 mL metanola (Merck, 1.06007) in uravnovežen z 2 mL zmesi topil etilacetata in diklorometana (1:1), ter ga očistili z 2 mL 0,1 M raztopine HCl (Merck, 1.00317) in z 2 mL metanola (Merck, 1.06007). Na sorbent ujete polarne in nepolarne HCA smo eluirali z 2 mL zmesi topil metanol (Merck, 1.06007) : amoniak (Merck, 1.05432) v razmerju 9 : 1 (v/v) in vzorce do suhega evaporirali v zmernem toku dušika ter končni ekstrakt tik pred ločevanjem na LC-MS sistemu raztopili v 250 mg metanola (Merck, 1.06007).

### 3.3.11.2 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

Kromatografske pogoje in pogoje detekcije smo modificirali po Barceló-Barrachina in sod. (2006, 2004a, 2004b) in Bianchi in sod. (2005). HPLC analiza je bila opravljena na sistemu Agilent 1100 (opis v poglavju 3.3.7.2). Ločevanje je potekalo na koloni z obrnjeno fazo (Semi Micro TSKgel ODS-80Ts column, 5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  2 mm i.d.) podjetja Tosoh Bioscience LLC (Japonska, 18151) pri temperaturi 25 °C. Volumen injiciranja je bil 10  $\mu$ L. Kromatografija je potekala z gradientom mobilne faze in pretokom 0,3 mL/min, pri čemer je bila mobilna faza A 20 mM amonijev formiat (Fluka, 09739) z vrednostjo pH 3,2 in mobilna faza B acetonitril (Merck, 1.00030). Gradient je bil naslednji: 95 % A, 0-0,5 min; 95-80 % A, 0,5-15 min; 80-40 % A, 15-18 min; 40 % A, 18-24 min; 40-95 % A, 24-27 min; 95 % A, 27-40 min. Vrste HCA so bile določene na podlagi retencijskih časov in m/z HCA standardov (TRC: Harman, H105000; Norharman, N700000; IQ, A616500; MeIQ, A605200; IQx, A616900; MeIQx, A606600; 4,8-DiMeIQx, A631000; 4,7,8-TriMeIQx, A630000; PhIP, A617000).

Uporabljen masni detektor (Micromass Quattro micro<sup>®</sup> API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI) je deloval pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 40 V, temperaturo izvora 135 °C in napetost kapilare 3,6 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+). Razpršilni plin dušik je imel temperaturo 390 °C in pretok 600 L/h. Plin vhodne leče dušik je imel pretok 70 L/h. Detekcija na masnem spektrometru je potekala v SIR načinu (m/z 183,2 za Harman, 169,2 za Norharman, 199,2 za IQ, 213,2 za MeIQ, 200,2 za IQx, 214,2 za MeIQx, 228,2 za 4,8-DiMeIQx, 242,2 za 4,7,8-TriMeIQx in 225,2 za PhIP). Potrditev posameznih HCA smo naredili še v načinu MRM (angl. Multiple Reaction Monitoring). Podrobnejši opis je podan v prilogi D.

Rezultati so bili obdelani s funkcijo Quantify v računalniškem programu MassLynx<sup>™</sup> V4,0 (Micromass, 2004). Na sliki 15 je primer enega kromatograma.



Slika 15: Primer kromatogramov HCA, pridobljenih v MRM načinu za kvantitativno določitev (A, B) in za identifikacijo (C, D) z masnimi ( $m/z$ ) ionskimi prehodi ( $[M+H]^+ \rightarrow$  fragment). A – mešanica standardov HCA (1,0  $\mu\text{g/g}$ ), B – vzorec (normalna kakovost, 10 dni zoren,  $T_s = 95^\circ\text{C}$ ), C – mešanica standardov HCA, D – vzorec (BMV kakovost, 10 dni zoren,  $T_s = 95^\circ\text{C}$ ).

Figure 15: Sample of HCA chromatograms acquired in MRM mode for quantification (A, B) and for identification (C, D) with mass ( $m/z$ ) transitions ( $[M+H]^+ \rightarrow$  fragment). A – mix standard of HCAs (1,0  $\mu\text{g/g}$ ), B – sample (normal quality, 10 days aged,  $T_s = 95^\circ\text{C}$ ), C – mix standard of HCA, D – sample (PSE quality, 10 days aged,  $T_s = 95^\circ\text{C}$ ).

### 3.3.11.3 Validacija metode

#### 3.3.11.3.1 Meja detekcije in kvantifikacije

Z računalniškim programom (MassLynx™ V4,0) smo po metodi 'Peak-to-Peak' določili razmerje ('signal to noise' – S/N) med signalom opazovanega HCA in šumom. Mejo detekcije in kvantifikacije smo določili kot vsebnost opazovanega HCA v vzorcu, pri kateri je razmerje S/N = 3 oz. S/N = 10. Rezultati so predstavljeni v prilogi J.

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

Umeritveno krivuljo za določanje posameznega HCA smo določili tako, da smo poiskali linearno povezavo med analitičnim signalom in vsebnostjo tega HCA. Pripravili smo mešan standard HCA različnih koncentracij (0,01 µg/g, 0,1 µg/g, 0,5 µg/g, 1,0 µg/g metanola) in metodo kalibrirali v štirih točkah (v dveh ponovitvah) za območje med 0,5 ng/g in 60 ng/g vzorca pečene skorje. Vzorcju (1,5 g pečene skorje) smo dodali naraščajočo količino mešanega standarda HCA in konstantno količino (100 mg) raztopine internega standarda (0,5 µg/g metanola) TriMeIQx ter enako postopali kot z vzorci.

Preglednica 13: Priprava umeritvenih krivulj za kvantitativno določanje različnih HCA po metodi standardnega dodatka in internega standarda.

Table 13: Preparation of a calibration curve for different method of HCAs by the standard addition and internal standard method.

Točke	masa vzorca (skorje) (g)	masa posameznega HCA v mešanem standardu (ng)	masa internega standarda (ng)
slepa	1,5	0,0	50,0
1	1,5	1,5	50,0
2	1,5	15,0	50,0
3	1,5	80,0	50,0
4	1,5	180,0	50,0

Umeritvene krivulje za določanje vsebnosti HCA kažejo, da je povezava med analitičnim signalom in vsebnostjo analita linearna ( $r^2 > 0,99$ , priloga J).

Enačba premice:

$$\frac{S_{HCA_i}}{S_{IS}} = k_i \times \frac{m_{HCA_i}}{m_{IS}}$$

Izračun vsebnosti HCA:

$$HCA_i (ng / g) = \frac{S_{HCA_i} \times m_{IS} \times m_{sk}}{S_{IS} \times k_i \times m_{vz} \times m_{zr}}$$

- $HCA_i$  vsebnost posameznega HCA (ng/g toplotno obdelane mišice LD),
- $S_{HCA_i}$  površina pod vrhom opazovanega HCA,
- $S_{IS}$  površina pod vrhom internega standarda,
- $k_i$  naklon premice za opazovan HCA,
- $m_{HCA_i}$  masa standardnega dodatka opazovanega HCA (ng),
- $m_{IS}$  masa dodanega internega standarda (ng),
- $m_{vz}$  masa vzorca (g),
- $m_{sk}$  masa pečene skorje (g),
- $m_{zr}$  masa pečenega zrezka mišice LD (g).

### 3.3.11.3.3 Ponovljivost metode

Koeficienti variabilnosti znotraj paralelke pri določanju HCA so se gibali med 2,17 % in 3,16 %, koeficienti variabilnosti med paralelkami pa so bili v večini primerov pod 6 %. Nizke vrednosti kažejo na zelo dobro ponovljivost testirane metode (prilogi G in H).

### 3.3.12 Statistična analiza

Vrednosti, ki smo jih dobili za posamezne opazovane parametre, smo vnesli v računalnik s programom Microsoft Excel 2000. S programskim paketom SAS/STAT (SAS Software, 1999) smo izračunali osnovne statistične parametre, kot so povprečje, standardni odklon, najmanjša in največja vrednost ter statistično obdelali podatke za posamezno opazovano lastnost. Za obdelavo podatkov z normalno porazdelitvijo po spodaj navedenih statističnih modelih smo uporabili postopek PROC GLM (General linear models). Za vrednotenje vpliva končnih središčnih temperatur na vsebnosti HCA v zgornjem sloju na dvoploščnem žaru pečenih vzorcev pa smo uporabili postopek PROC TTEST (t-test v paru).

Za ugotavljanje vpliva kakovosti mišičnine (K) na kemijsko sestavo (voda, intramuskularna maščoba, beljakovine in skupne mineralne snovi) in kakovostne parametre mišičnine (vrednost pH<sub>24</sub>, sposobnost za vezanje vode, instrumentalne parametre barve L\*, a\* in b\*) smo uporabili statistični model 1.

$$y_{ijk} = \mu + K_i + \check{Z}_j + e_{ijk} \quad (\text{statistični model 1})$$

$y_{ijk}$  – ijk-to opazovanje;  $\mu$  – povprečna vrednost;  $K_i$  – vpliv kakovosti mišičnine (normalna, BMV);  $\check{Z}_j$  – vpliv živali (1-5);  $e_{ijk}$  – ostanek.

Statistični model 2 smo uporabili za obdelavo podatkov: izceje med zorenjem, vrednosti pH merjenih v mesnem ekstraktu, deleža neproteinskega dušika, Warner-Bratzler strižne sile, vsebnosti prekursorjev HCA (kreatina, kreatinina, prostih aminokislin, nekaterih dipeptidov, sladkorjev) in vsebnosti HCA (PhIP, harman, norharman, DiMeIQx, MeIQx in vsote vseh HCA pri dveh središčnih temperaturah pečenja 70 °C in 95 °C). V statističnem modelu 2 smo upoštevali vpliv kakovosti mišičnine (K), vpliv živali ( $\check{Z}$ ), vpliv časa zorenja mesa (Z) ter vpliv interakcije med kakovostjo mišičnine in časom zorenja (K\*Z).

$$y_{ijkl} = \mu + K_i + \check{Z}_j + Z_k + K*Z_{ik} + e_{ijkl} \quad (\text{statistični model 2})$$

$y_{ijkl}$  – ijkl-to opazovanje;  $\mu$  – povprečna vrednost;  $K_i$  – vpliv kakovosti mišičnine (normalna, BMV);  $\check{Z}_j$  – vpliv živali (1-5);  $Z_k$  – vpliv časa zorenja (1, 3, 6 in 10 dni *post mortem*);  $K*Z_{ik}$  – vpliv interakcije kakovosti mišičnine in časa zorenja;  $e_{ijkl}$  – ostanek.

Za ugotavljanje vpliva končne središčne temperature ( $T_i$ ) na vsebnost HCA smo uporabili spodnji statistični model 3.

$$y_{ijk} = \mu + T_i + \check{Z}_j + e_{ijk} \quad (\text{statistični model 3})$$

$y_{ijk}$  – ijk-to opazovanje;  $\mu$  – povprečna vrednost;  $T_i$  – vpliv središčne temperature pečenja na dvoploščnem žaru (70 °C and 95 °C);  $\check{Z}_j$  – vpliv živali (1-5);  $e_{ijk}$  – ostanek.

Povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri kakovosti mišičnine, obsega zorenja, vsebnosti prekursorjev HCA in vsebnostjo HCA so bili izračunani s postopkom PROC CORR (SAS Software, 1999).

## 4 REZULTATI

### 4.1 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MIŠIC

Rezultati analiz osnovne kemijske sestave (vode, intramuskularne maščobe, beljakovin in skupnih mineralnih snovi) so prikazani v preglednici 14. Iz rezultatov osnovne kemijske sestave je razvidno, da smo izbrali homogen vzorec, saj so koeficienti variabilnosti nižji od 5 %, le pri intramuskularnih maščobah je KV višji od 27 %. Tako je dolga hrbtna mišica prašiča v povprečju vsebovala 74,7 % vode, 1,61 % intramuskularne maščobe, 22,8 % beljakovin in 1,16 % skupnih mineralnih snovi.

Preglednica 14: Rezultati osnovne kemijske analize presnih dolgih hrbtnih mišic prašičev dveh kakovosti (normalne in BMV) z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.

Table 14: Basic statistical parameters for chemical composition of raw pork LD muscles both qualities, normal and PSE.

Parameter (g/100 g)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
voda	10	74,66	73,68	75,53	0,46	0,62
IMF	10	1,61	0,90	2,23	0,45	27,66
beljakovine	10	22,82	21,93	24,14	0,54	2,35
skupne mineralne snovi	10	1,16	1,05	1,25	0,05	4,52

IMF – intramuskularna maščoba, n – število mišic,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

Mišice desetih različnih živali so vsebovale podobno količino vode, beljakovin in skupnih mineralnih snovi ( $p > 0,05$ ) ter različno količino intramuskularne maščobe – IMF ( $p = 0,0046$ , rezultati niso prikazani). Interval vsebnosti intramuskularne maščobe je bil relativno širok, med 0,90 g/100 g in 2,23 g/100 g.

### 4.2 FIZIKALNI IN INSTRUMENTALNI PARAMETRI MIŠIC

V preglednici 15 so zbrani rezultati meritev fizikalnih parametrov in instrumentalnih parametrov barve presne prašičje mišice LD, na podlagi katerih lahko sklepamo o kakovosti mišičnine. Z izjemo vrednosti  $pH_{24}$  (KV = 1,4 %) in  $L^*$  (KV = 6,3 %) so vsi kakovostni parametri zelo variabilni, kar je posledica različne kakovosti vzorcev in različnih živali.

Preglednica 15: Rezultati meritev parametrov kakovosti mišičnine, izmerjenih na presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.

Table 15: Basic statistical parameters for meat quality parameters of raw pork LD muscles.

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
vrednost pH <sub>24</sub>	80	5,46	5,32	5,67	0,08	1,40
SpVV	20	10,58	4,89	15,27	3,40	32,17
vrednost L*	120	55,1	47,7	67,8	3,5	6,3
vrednost a*	120	6,8	3,8	9,5	1,2	17,8
vrednost b*	120	2,0	-0,1	6,0	1,2	57,7

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti, pH<sub>24</sub> – vrednost pH merjena 24 ur *post mortem*, SpVV – sposobnost za vezanje vode.

### 4.3 VPLIV KAKOVOSTI MIŠIČNINE IN ZORENJA

Kakovost mišičnine se običajno določa na podlagi fizikalno-kemijskih kriterijev, kot so vrednost pH 24 h *post mortem*, sposobnost za vezanje vode in barva. Iz preglednice 16 je razvidno, da smo mišice desetih živali pravilno razdelili v dve skupini, t.j. v skupino mišic normalne kakovosti in v skupino mišic BMV kakovosti. Mišice normalne kakovosti imajo za desetino enote višje vrednosti pH, skoraj dvakrat večjo sposobnost vezanja vode ter nižje barvne vrednosti L\*, a\* in b\* kot mišice BMV kakovosti; vse razlike med kakovostma so statistično značilne ( $p \leq 0,001$ ). V statistični model smo poleg vpliva kakovosti mišičnine vključili tudi vpliv živali, predvsem pri barvnih vrednostih ta vpliv ni zanemarljiv in je zato upravičeno v modelu.

Preglednica 16: Razlike v vrednosti pH<sub>24</sub>, SpVV in instrumentalno izmerjenih parametrov barve med presnimi dolgimi hrbtnimi mišicami prašičev normalne in BMV kakovosti (model 1, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 16: Difference in pH values, water holding capacity (SpVV) and instrumental measured colour values between raw pork LD muscles of normal and PSE quality (Model 1, Duncan test,  $\alpha = 0,05$ ).

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	kakovost		vpliv (p-vrednost)		rsd
	normalna	BMV	K	Ž	
vrednost pH <sub>24</sub> (n = 40)	5,51 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,41 ± 0,05 <sup>b</sup>	***	nz	0,05
SpVV (n = 10)	7,88 ± 2,50 <sup>a</sup>	13,2 ± 1,41 <sup>b</sup>	***	nz	2,02
vrednost L* (n = 60)	52,8 ± 2,10 <sup>a</sup>	57,3 ± 3,10 <sup>b</sup>	***	*	2,57
vrednost a* (n = 60)	6,30 ± 1,30 <sup>a</sup>	7,20 ± 1,00 <sup>b</sup>	***	*	1,10
vrednost b* (n = 60)	1,20 ± 0,60 <sup>a</sup>	2,80 ± 1,00 <sup>b</sup>	***	**	0,78

n – število obravnavanj v skupini,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, pH<sub>24</sub> – vrednost pH merjena (direktno) 24 ur *post mortem*, SpVV – sposobnost za vezanje vode, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, \*\*\*  $p \leq 0,001$  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, rsd – ostanek, <sup>a,b</sup> skupini z enako nadpisano črko se med seboj statistično značilno ne razlikujeta

Iz literature poznamo nekaj pokazateljev obsega zorenja, s katerimi se vrednoti mehčanje mesa. Metode, ki se uporabljajo za vrednotenje mehčanja govejih mišic, so: določanje dolžine sarkomer v miofibrilah (Strydom in sod., 2005), določanje rezne trdnosti (angl. Share Force Value), miofibrilarni fragmentacijski indeks (Olson in sod., 1976), določanje komponente 30 kDa (Koochmarai, 1994), določanje aktivnosti glikogen-fosforilaze b, kreatin-kinaze in gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (Okomura in sod., 2003). Okomura in sod. (2003) poleg običajnega indikatorja Warner-Bratzlerjeve strižne sile predlagajo za vrednotenje zorenja prašičjega mesa še naslednje uporabne pokazatelje: miofibrilarni fragmentacijski indeks, 32 kDa komponenta, peptida P1 in P2 ter aktivnost gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze. V naši študiji smo za vrednotenje procesov zorenja izbrali dva parametra, Warner-Bratzlerjevo strižno silo in delež neproteinskega dušika. Poleg tega še navajamo podatke za izcejo med zorenjem in vrednost pH. Prav tako smo uporabili kot kazalec zorenja prašičjega mesa še razmerje med kreatinom in kreatininom; ti podatki so prikazani v poglavju 4.4 (Prekurzorji HCA) (Polak in sod., 2007).

V preglednici 17 so zbrani vsi rezultati meritev izceje med zorenjem, vrednosti pH ekstrakta, deleža neproteinskega dušika in Warner-Bratzlerjeve strižne sile zorenih mišic prašiča. Izceja med zorenjem in WBSF sta v tem poskusu močno variabilna parametra.

Preglednica 17: Rezultati meritev izceje med zorenjem, vrednosti pH ekstrakta, deleža neproteinskega dušika – NPN in Warner-Bratzlerjeve strižne sile – WBSF zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča.

Table 17: Basic statistical parameters for dripping during ageing, pH value of extract, non-protein nitrogen content – NPN and Warner-Bratzler share force – WBSF of aged pork LD muscles.

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
Izcejaz (%)	30	3,06	0,84	6,93	1,63	53,46
vrednost pH <sub>ekstrakt</sub>	40	5,54	5,34	5,73	0,09	1,63
NPN (% od skupnega N)	80	12,11	11,09	13,29	0,55	4,51
WBSF (N)	480	45,8	24,9	98,9	10,2	22,4

Izcejaz – izceja med zorenjem, n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

Mišice BMV kakovosti med zorenjem izgubijo več mesnega soka kakor mišice normalne kakovosti, kar je razvidno iz preglednice 18, vendar razlike niso statistično značilne.

Čprav je znano, da se pH vrednost med zorenjem mesa poveča za nekaj desetink enote, tega v našem poskusu (preglednica 18) nismo dokazali. Na presnih vzorcih smo pred zorenjem z meritvami pH vrednosti z vbodno metodo ugotovili, da imajo mišice normalne kakovosti v primerjavi z mišicami BMV kakovosti statistično značilno višjo pH vrednost (preglednica 16), kar smo potrdili še z metodo določanja pH vrednosti v ekstraktu. Pri normalnih mišicah je v primerjavi z mišicami BMV vrednost pH značilno višja za okoli 0,1 enote (preglednica 18) skozi celotno obdobje zorenja.



Delež neproteinskega dušika se v primerjavi s prvim dnem *post mortem* (nezorene mišice) statistično značilno poveča pri mišicah normalne kakovosti po šestem dnevu zorenja, medtem ko se pri mišicah BMV kakovosti značilno poveča šele po desetem dnevu zorenja. Razlika med kakovostima (0,1 %) ni statistično značilna.

Preglednica 18: Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na izcejo v različnih časih zorenja, vrednost pH ekstrakta in delež neproteinskega dušika – NPN v presnih mišicah ter na Warner-Bratzlerjevo strižno silo – WBSF v pečenih dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 18: Effects of meat quality and ageing on drippings during ageing, pH values in extract, non-protein nitrogen – NPN content of raw and on Warner-Bratzler share force – WBSF) of grilled pork LD muscles (n = 10, Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	K	zorenje (dan)				vpliv (p-vred.)				rsd
		1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z	
izceja <sub>Z</sub> (%)	norm	0,0 ± 0,0 <sup>xb</sup>	1,8 ± 0,8 <sup>xa</sup>	2,0 ± 1,1 <sup>xa</sup>	3,2 ± 2,3 <sup>xa</sup>	**		*		1,34
	BMV	0,0 ± 0,0 <sup>xc</sup>	2,6 ± 0,8 <sup>xb</sup>	3,8 ± 1,2 <sup>xab</sup>	4,9 ± 1,4 <sup>xa</sup>		nz		nz	
vrednost pH <sub>ekstrakt</sub>	norm	5,61 ± 0,06 <sup>xa</sup>	5,60 ± 0,09 <sup>xa</sup>	5,62 ± 0,06 <sup>xa</sup>	5,57 ± 0,09 <sup>xa</sup>	***	*			0,06
	BMV	5,49 ± 0,04 <sup>ya</sup>	5,44 ± 0,06 <sup>ya</sup>	5,47 ± 0,08 <sup>ya</sup>	5,50 ± 0,05 <sup>ya</sup>			nz	nz	
NPN (% od TN)	norm	11,7 ± 0,5 <sup>xb</sup>	12,0 ± 0,6 <sup>xab</sup>	12,2 ± 0,6 <sup>xa</sup>	12,4 ± 0,7 <sup>xa</sup>		***	***		0,46
	BMV	11,8 ± 0,3 <sup>xb</sup>	12,1 ± 0,5 <sup>xab</sup>	12,3 ± 0,5 <sup>xab</sup>	12,3 ± 0,3 <sup>xa</sup>	nz			nz	
WBSF 70 °C (n = 30)	norm	50,4 ± 10,1 <sup>xa</sup>	42,7 ± 7,4 <sup>xb</sup>	42,7 ± 7,3 <sup>xb</sup>	39,3 ± 6,0 <sup>xb</sup>	**	*	***	***	8,22
	BMV	44,2 ± 4,4 <sup>ya</sup>	40,5 ± 4,6 <sup>xb</sup>	39,5 ± 9,2 <sup>xbc</sup>	37,4 ± 4,4 <sup>xc</sup>					
WBSF 95 °C (n = 30)	norm	63,1 ± 13,0 <sup>xa</sup>	48,5 ± 10,0 <sup>xb</sup>	44,9 ± 12,5 <sup>xb</sup>	43,1 ± 6,8 <sup>xb</sup>	**	*	***	***	8,22
	BMV	56,3 ± 7,8 <sup>ya</sup>	48,9 ± 7,1 <sup>xb</sup>	47,0 ± 6,5 <sup>xbc</sup>	43,8 ± 5,3 <sup>xc</sup>					

n – število obravnavanj v skupini,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, izceja<sub>Z</sub> – izceja med zorenjem, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, Z – zorenje, K\*Z – interakcija kakovosti mišičnine in zorenja, \*\*\*  $p \leq 0,001$  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, rsd – ostanek, <sup>x,y</sup> skupini z enako nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujeta, <sup>a,b,c</sup> skupine z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Preglednica 18 prikazuje tudi vpliv zorenja na teksturne lastnosti pečenega prašičjega mesa. S časom zorenja se WBSF pečenega mesa značilno ( $p < 0,001$ ) spreminja. Značilno najvišje vrednosti WBSF (50,4 N/44,2 N pri  $T_s = 70$  °C oz. 63,1 N/56,3 N pri  $T_s = 95$  °C), merjene prečno na mišična vlakna, smo določili v nezorenih mišicah. Mišice normalne kakovosti so postale bistveno mehkejše (42,7 N pri  $T_s = 70$  °C oz. 48,5 N pri  $T_s = 95$  °C) že po treh dneh zorenja, medtem ko mišice BMV kakovosti šele po šestih dneh (39,5 N pri  $T_s = 70$  °C oz. 47,0 N pri  $T_s = 95$  °C). Mišice BMV kakovosti so za 6,2 N (pri  $T_s = 70$  °C) oz. za 6,8 N (pri  $T_s = 95$  °C) mehkejše od normalnih, vendar so razlike značilne samo pri nezorenih (1. dan *post mortem*), nato razlike niso več statistično značilne. S t-testom v paru smo ugotovili, da so vrednosti WBSF, izmerjene na vzorcih pečenih do  $T_s = 70$  °C, za 7,4 N nižje od vrednosti, izmerjenih na vzorcih pečenih do  $T_s = 95$  °C ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4 PREKURZORJI HCA

Rezultati določanj vsebnosti prekurzorjev HCA kažejo, da so vsi prekurzorji z izjemo vsebnosti kreatina dokaj variabilni, kar je posledica različne kakovosti vzorcev mesa, različnih časovnih intervalov zorenja kot tudi razlik med živalmi (preglednica 19).

Preglednica 19: Rezultati meritev vsebnosti kreatina, kreatinina, prostih aminokislin in reducirajočih sladkorjev v zorenih dolgih hrbtnih mišicah prašiča z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.

Table 19: Basic statistical parameters for creatine, creatinine, free amino acids and sugars content in aged pork LD muscles.

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)	
kreatin (mg/g)	80	6,12	5,43	6,96	0,37	6,10	
kreatinin (mg/g)	80	0,11	0,08	0,13	0,01	11,66	
proste aminokisliline (mg/100 g)	ALA	80	12,52	7,99	20,11	2,66	21,28
	ARG	80	3,91	1,86	6,61	1,25	31,83
	ASN	80	3,01	1,43	5,43	0,98	32,64
	ASP	80	2,17	0,40	6,49	1,44	66,13
	CYS	80	0,56	0,25	1,34	0,24	42,27
	GLN	80	15,00	8,35	24,94	4,19	27,91
	GLU	80	11,60	5,04	21,09	4,42	38,08
	GLY	80	7,26	3,30	15,01	2,06	28,39
	HIS	80	6,51	4,24	11,17	1,52	23,34
	HYP	80	0,91	0,63	1,24	0,14	15,93
	ILE	80	3,13	1,29	7,18	1,35	43,30
	LEU	80	7,09	3,41	12,21	2,38	33,54
	LYS	80	7,77	3,29	12,23	1,92	24,66
	MET	80	3,60	1,33	7,80	1,57	43,73
	PHE	80	4,95	2,92	9,71	1,42	28,61
	PRO	80	4,42	1,47	7,23	1,14	25,79
	SER	80	5,72	1,69	10,42	2,44	42,70
	THR	80	4,08	1,49	9,54	1,70	41,70
	TRP	80	1,30	0,76	2,26	0,33	25,11
	TYR	80	4,44	2,36	7,41	1,23	27,79
VAL	80	5,84	2,72	8,92	1,45	24,84	
druge aminokisliline in dipeptidi (mg/100 g)	CTH	80	0,02	0,01	0,03	0,01	34,29
	ORN	80	0,94	0,38	2,21	0,39	40,90
	CIT	80	1,28	0,53	1,98	0,31	23,92
	TAU	80	7,29	2,84	12,32	2,20	30,24
	ANS	80	16,79	11,22	25,20	3,07	18,26
	CAR	80	288,5	214,3	443,4	46,97	16,28
	HC-CH	80	0,00	0,00	0,00	0,00	23,60
	C-C	80	0,64	0,19	1,53	0,32	50,45
reducirajoči sladkorji	glukoza (mg/g)	80	2,86	1,53	4,19	0,67	23,20
	fruktoza (mg/g)	80	0,74	0,32	1,09	0,17	23,20
	manoza (μg/g)	80	195,9	94,1	320,1	50,17	25,61
	riboza (μg/g)	80	50,99	5,12	262,80	52,44	102,83
	arabinoza (μg/g)	80	33,05	10,11	78,70	15,73	47,61
	ramnoza (μg/g)	80	1,85	0,98	3,32	0,53	28,73
	maltoza (μg/g)	80	118,1	4,57	448,6	105,6	89,39
	maltotrioza (μg/g)	80	21,42	0,82	134,0	30,78	143,69

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

Kot je razvidno iz preglednice 20 sta vsebnosti kreatina in kreatinina v mišicah prašiča odvisni od časa zorenja mišice. Vsebnost kreatina se s časom zorenja zmanjšuje (pri BMV mišicah zmanjšanje kreatina ni statistično značilno), medtem ko se vsebnost kreatinina statistično značilno povečuje. Vsebnost skupnega kreatina (kreatin + 1,159 × kreatinin; AOAC, 1980) ostaja v mišicah BMV kakovosti med zorenjem nespremenjena. Pri normalnih mišicah se po prvem dnevu *post mortem* vsebnost skupnega kreatina značilno zmanjša, nato se njegova vsebnost ne spreminja. Če vsebnost kreatina in kreatinina prikažemo v odstotkih od skupnega kreatina ali kot njuno razmerje, ugotovimo, da se parametri z zorenjem značilno spreminjajo. Razlik med BMV in normalno kakovostjo mišic v tem parametru nismo zasledili.

Preglednica 20: Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na vsebnost kreatina in kreatinina v dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 20: Effects of meat quality and ageing on creatine in creatinine content in pork LD muscles (n = 10, Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	K	zorenje (dan)				vpliv (p-vred.)				rsd	
		1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z		
kreatin (mg/g)	norm	6,23 ± 0,31 <sup>xa</sup>	5,71 ± 0,21 <sup>xc</sup>	5,88 ± 0,09 <sup>xb</sup>	5,88 ± 0,15 <sup>xb</sup>	***	*	**		nz	0,32
	BMV	6,40 ± 0,33 <sup>xa</sup>	6,23 ± 0,41 <sup>ya</sup>	6,33 ± 0,34 <sup>ya</sup>	6,35 ± 0,38 <sup>ya</sup>						
kreatinin (mg/g)	norm	0,093 ± 0,01 <sup>xa</sup>	0,097 ± 0,01 <sup>xa</sup>	0,099 ± 0,00 <sup>xa</sup>	0,113 ± 0,01 <sup>xb</sup>	***	*	**		nz	0,00
	BMV	0,099 ± 0,01 <sup>xa</sup>	0,104 ± 0,00 <sup>yb</sup>	0,111 ± 0,00 <sup>yc</sup>	0,127 ± 0,00 <sup>yd</sup>						
skupni kreatin <sup>1</sup> (mg/g)	norm	6,32 ± 0,31 <sup>xa</sup>	5,81 ± 0,21 <sup>xc</sup>	5,97 ± 0,09 <sup>xb</sup>	5,99 ± 0,15 <sup>xb</sup>	***	**	***		nz	0,32
	BMV	6,50 ± 0,33 <sup>xa</sup>	6,33 ± 0,41 <sup>ya</sup>	6,44 ± 0,34 <sup>ya</sup>	6,48 ± 0,38 <sup>ya</sup>						
kreatin (% od skupnega kreatina)	norm	98,5 ± 0,2 <sup>xa</sup>	98,3 ± 0,1 <sup>xb</sup>	98,3 ± 0,1 <sup>xb</sup>	98,1 ± 0,1 <sup>xc</sup>					nz	0,11
	BMV	98,5 ± 0,1 <sup>xa</sup>	98,3 ± 0,2 <sup>xb</sup>	98,3 ± 0,1 <sup>xb</sup>	98,1 ± 0,1 <sup>xc</sup>	nz	***	***		nz	0,11
kreatinin (% od skupnega kreatina)	norm	1,46 ± 0,15 <sup>xa</sup>	1,70 ± 0,13 <sup>xb</sup>	1,66 ± 0,09 <sup>xb</sup>	1,89 ± 0,10 <sup>xc</sup>					nz	0,11
	BMV	1,52 ± 0,09 <sup>xa</sup>	1,67 ± 0,15 <sup>xb</sup>	1,72 ± 0,13 <sup>xb</sup>	1,97 ± 0,12 <sup>xc</sup>	nz	***	***		nz	0,11
razmerje	norm	68,1 ± 6,6 <sup>xa</sup>	58,0 ± 4,6 <sup>xb</sup>	59,6 ± 3,2 <sup>xb</sup>	51,9 ± 2,6 <sup>xc</sup>					nz	3,93
kreatin:kreatinin	BMV	66,0 ± 4,1 <sup>xa</sup>	59,2 ± 5,3 <sup>xb</sup>	57,3 ± 4,3 <sup>xb</sup>	49,9 ± 2,6 <sup>xc</sup>	nz	***	***		nz	3,93

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, Z – zorenje, K\*Z – interakcija kakovosti mišičnine in zorenja, \*\*\* $p \leq 0,001$  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, rsd – ostanek, <sup>x,y</sup> skupini z enako nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujeta, <sup>a,b,c</sup> skupine z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo, <sup>1</sup> kreatin + 1,159 × kreatinin (AOAC, 1980).

V poskusu smo ugotovili, da se med 10-dnevnim zorenjem mišic prašiča v večjem obsegu sprostijo vse (razen alanina in prolina) aminokislina (preglednica 21). Po desetih dnevih zorenja je v mišicah približno 1,6-krat večja vsebnost skupnih prostih aminokislin v primerjavi z nezorenimi mišicami. Ugotovitve na splošno veljajo za obe kakovosti, normalno in BMV. Iz preglednice 21 je razvidno, da se med 10-dnevnim zorenjem vsebnost asparaginske kisline poveča celo za 5,2-krat (BMV kakovost) ter vsebnost glutaminske kisline za skoraj 3-krat (BMV kakovost). Vsota vsebnosti izolevcina, levcina, fenilalanina in tirozina (ILLEPHTY) se med 10-dnevnim zorenjem poveča skoraj za 2-krat.

Preglednica 21: Vpliv kakovosti mišičnine in časa zorenja na vsebnost (mg/100 g) prostih aminokislin v dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 21: Effects of meat quality and ageing on free amino acids content (mg/100 g) in pork LD muscles (n = 10, Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

AK ( $\bar{x} \pm so$ )	K	zorenje (dan)				vpliv (p-vred.)				rsd
		1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z	
ALA	norm	13,26 ± 1,75 <sup>xa</sup>	14,07 ± 2,18 <sup>xa</sup>	13,87 ± 3,39 <sup>xa</sup>	13,77 ± 3,48 <sup>xa</sup>	***	***	nz	nz	2,18
	BMV	11,16 ± 1,86 <sup>ya</sup>	11,07 ± 1,58 <sup>ya</sup>	10,99 ± 1,80 <sup>ya</sup>	11,93 ± 2,69 <sup>xa</sup>					
ARG	norm	2,71 ± 0,43 <sup>xd</sup>	3,55 ± 0,94 <sup>xc</sup>	4,69 ± 0,70 <sup>xb</sup>	5,59 ± 0,57 <sup>xa</sup>	**	nz	***	nz	0,63
	BMV	2,47 ± 0,44 <sup>xd</sup>	3,14 ± 0,51 <sup>xc</sup>	4,00 ± 0,55 <sup>yb</sup>	5,15 ± 0,87 <sup>xa</sup>					
ASN	norm	2,63 ± 0,74 <sup>xb</sup>	3,06 ± 0,66 <sup>xb</sup>	3,81 ± 0,70 <sup>xa</sup>	4,18 ± 1,00 <sup>xa</sup>	***	nz	***	nz	0,70
	BMV	2,04 ± 0,34 <sup>yb</sup>	2,28 ± 0,48 <sup>yb</sup>	2,63 ± 0,54 <sup>yb</sup>	3,48 ± 0,95 <sup>xa</sup>					
ASP	norm	1,16 ± 0,33 <sup>xc</sup>	1,83 ± 0,70 <sup>xc</sup>	2,95 ± 1,11 <sup>xb</sup>	4,22 ± 1,39 <sup>xa</sup>	***	nz	***	nz	0,89
	BMV	0,65 ± 0,13 <sup>yc</sup>	1,16 ± 0,39 <sup>yc</sup>	2,02 ± 0,82 <sup>yb</sup>	3,38 ± 1,25 <sup>xa</sup>					
CYS	norm	0,39 ± 0,09 <sup>xc</sup>	0,58 ± 0,15 <sup>xb</sup>	0,76 ± 0,24 <sup>xab</sup>	0,89 ± 0,25 <sup>xa</sup>	***	nz	***	nz	0,14
	BMV	0,28 ± 0,02 <sup>yc</sup>	0,43 ± 0,08 <sup>yb</sup>	0,49 ± 0,07 <sup>yb</sup>	0,68 ± 0,12 <sup>ya</sup>					
GLN	norm	14,56 ± 4,26 <sup>xa</sup>	16,66 ± 4,93 <sup>xa</sup>	17,35 ± 4,00 <sup>xa</sup>	17,58 ± 4,19 <sup>xa</sup>	***	*	*	nz	3,57
	BMV	11,32 ± 1,87 <sup>yb</sup>	12,88 ± 2,02 <sup>yab</sup>	14,18 ± 3,70 <sup>xab</sup>	15,48 ± 4,33 <sup>xa</sup>					
GLU	norm	7,84 ± 1,37 <sup>xc</sup>	10,28 ± 2,59 <sup>xbc</sup>	12,09 ± 3,32 <sup>xb</sup>	15,83 ± 3,50 <sup>xa</sup>	nz	nz	***	nz	2,37
	BMV	6,28 ± 0,84 <sup>yd</sup>	9,45 ± 2,11 <sup>xc</sup>	12,97 ± 1,57 <sup>xb</sup>	18,09 ± 2,95 <sup>xa</sup>					
GLY	norm	5,91 ± 1,26 <sup>xc</sup>	7,67 ± 1,93 <sup>xb</sup>	8,54 ± 1,45 <sup>xab</sup>	9,78 ± 2,59 <sup>xa</sup>	***	nz	***	nz	1,52
	BMV	5,30 ± 1,33 <sup>xc</sup>	6,10 ± 0,78 <sup>ybc</sup>	6,56 ± 0,99 <sup>yb</sup>	8,19 ± 1,15 <sup>xa</sup>					
HIS	norm	6,05 ± 1,02 <sup>xb</sup>	6,98 ± 1,34 <sup>xab</sup>	7,67 ± 1,69 <sup>xa</sup>	8,24 ± 2,09 <sup>xa</sup>	***	**	**	nz	1,14
	BMV	5,80 ± 0,84 <sup>xab</sup>	5,41 ± 0,69 <sup>yb</sup>	5,68 ± 0,76 <sup>yab</sup>	6,28 ± 0,66 <sup>ya</sup>					
HYP	norm	0,82 ± 0,08 <sup>xc</sup>	0,90 ± 0,11 <sup>bxc</sup>	0,99 ± 0,12 <sup>xab</sup>	1,05 ± 0,13 <sup>xa</sup>	nz	***	***	nz	0,11
	BMV	0,82 ± 0,15 <sup>xa</sup>	0,86 ± 0,12 <sup>xa</sup>	0,90 ± 0,18 <sup>xa</sup>	0,94 ± 0,13 <sup>xa</sup>					
ILE	norm	2,21 ± 0,32 <sup>xc</sup>	3,07 ± 0,71 <sup>xbc</sup>	4,06 ± 1,24 <sup>xab</sup>	4,85 ± 1,90 <sup>xa</sup>	***	**	***	nz	0,91
	BMV	1,82 ± 0,33 <sup>yc</sup>	2,32 ± 0,66 <sup>ybc</sup>	2,81 ± 0,57 <sup>yb</sup>	3,87 ± 0,93 <sup>xa</sup>					
LEU	norm	5,49 ± 0,88 <sup>xc</sup>	6,70 ± 1,60 <sup>xc</sup>	8,16 ± 1,85 <sup>xb</sup>	10,02 ± 1,69 <sup>xa</sup>	**	**	***	nz	1,44
	BMV	4,53 ± 0,82 <sup>yc</sup>	5,27 ± 1,15 <sup>yc</sup>	7,35 ± 1,75 <sup>xb</sup>	9,19 ± 2,28 <sup>xa</sup>					
LYS	norm	6,65 ± 1,67 <sup>xc</sup>	7,11 ± 1,35 <sup>xbc</sup>	8,38 ± 1,77 <sup>xab</sup>	8,90 ± 1,80 <sup>xa</sup>	nz	***	***	nz	1,49
	BMV	6,81 ± 1,63 <sup>xb</sup>	7,15 ± 1,31 <sup>xb</sup>	7,61 ± 1,38 <sup>xb</sup>	9,57 ± 2,49 <sup>xa</sup>					
MET	norm	2,21 ± 0,68 <sup>xc</sup>	3,42 ± 1,15 <sup>xb</sup>	4,15 ± 0,99 <sup>xb</sup>	5,29 ± 0,98 <sup>xa</sup>	nz	nz	***	nz	1,01
	BMV	1,75 ± 0,35 <sup>xc</sup>	2,57 ± 0,61 <sup>xc</sup>	4,21 ± 0,98 <sup>xb</sup>	5,18 ± 1,63 <sup>xa</sup>					
PHE	norm	3,77 ± 0,62 <sup>xc</sup>	4,91 ± 1,11 <sup>xb</sup>	5,59 ± 1,17 <sup>xab</sup>	6,57 ± 1,50 <sup>xa</sup>	*	*	***	nz	0,96
	BMV	3,53 ± 0,61 <sup>xc</sup>	4,17 ± 0,87 <sup>xbc</sup>	4,88 ± 0,74 <sup>xb</sup>	6,18 ± 1,09 <sup>xa</sup>					
PRO	norm	4,24 ± 1,59 <sup>xa</sup>	5,05 ± 1,45 <sup>xa</sup>	5,02 ± 1,25 <sup>xa</sup>	4,97 ± 0,78 <sup>xa</sup>	***	*	nz	nz	1,01
	BMV	3,56 ± 0,33 <sup>xb</sup>	3,90 ± 0,60 <sup>yab</sup>	4,12 ± 0,78 <sup>xab</sup>	4,52 ± 1,02 <sup>xa</sup>					
SER	norm	3,74 ± 1,17 <sup>xd</sup>	5,25 ± 1,47 <sup>xc</sup>	7,01 ± 0,97 <sup>xa</sup>	6,42 ± 1,71 <sup>xa</sup>	***	nz	***	nz	1,25
	BMV	2,98 ± 0,49 <sup>xc</sup>	3,86 ± 0,88 <sup>yc</sup>	5,63 ± 1,53 <sup>yb</sup>	7,87 ± 2,18 <sup>xa</sup>					
THR	norm	2,79 ± 0,88 <sup>xc</sup>	4,04 ± 0,90 <sup>xc</sup>	5,33 ± 1,27 <sup>xa</sup>	6,42 ± 1,17 <sup>xa</sup>	***	nz	***	nz	1,01
	BMV	2,10 ± 0,36 <sup>yc</sup>	3,04 ± 0,58 <sup>yb</sup>	3,63 ± 0,63 <sup>yb</sup>	5,29 ± 1,18 <sup>xa</sup>					
TRP	norm	1,18 ± 0,26 <sup>xc</sup>	1,19 ± 0,21 <sup>xc</sup>	1,46 ± 0,20 <sup>xb</sup>	1,67 ± 0,24 <sup>xa</sup>	*	nz	***	nz	0,26
	BMV	1,08 ± 0,18 <sup>xbc</sup>	1,01 ± 0,19 <sup>xc</sup>	1,30 ± 0,22 <sup>xab</sup>	1,49 ± 0,46 <sup>xa</sup>					
TYR	norm	3,50 ± 0,69 <sup>xc</sup>	4,20 ± 0,97 <sup>xbc</sup>	4,43 ± 0,86 <sup>xb</sup>	5,84 ± 1,26 <sup>xa</sup>	nz	nz	***	nz	0,88
	BMV	3,50 ± 0,32 <sup>xc</sup>	3,76 ± 0,86 <sup>yc</sup>	4,44 ± 0,71 <sup>xb</sup>	5,86 ± 1,15 <sup>xa</sup>					
VAL	norm	4,83 ± 1,13 <sup>xc</sup>	5,68 ± 1,11 <sup>xbc</sup>	6,36 ± 1,14 <sup>xb</sup>	7,31 ± 1,26 <sup>xa</sup>	nz	***	***	nz	1,01
	BMV	4,79 ± 1,22 <sup>xc</sup>	4,77 ± 0,73 <sup>yc</sup>	5,92 ± 0,99 <sup>yb</sup>	7,02 ± 1,69 <sup>xa</sup>					

Legenda: glej preglednico 22.

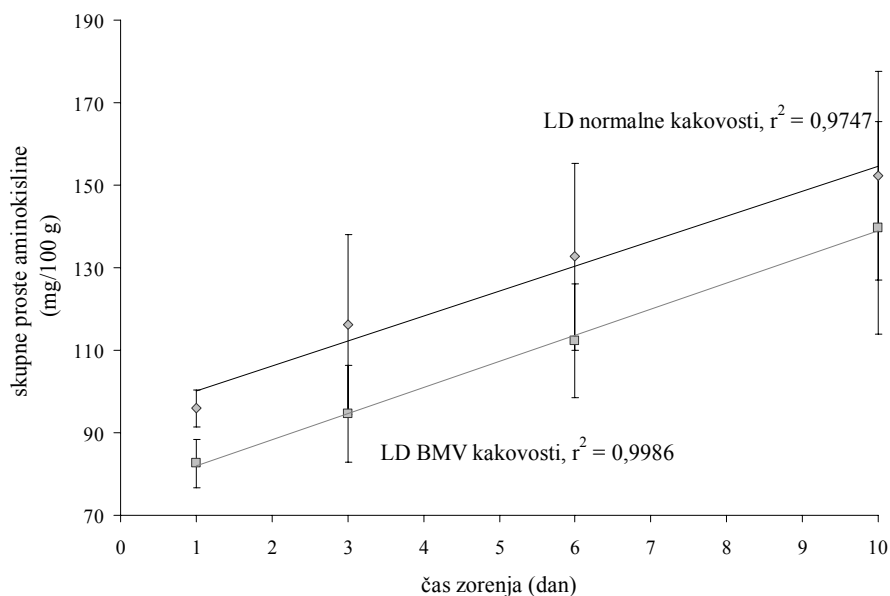
Iz preglednice 22 je razvidno, da imata kakovost mišičnine in čas zorenja statistično značilen vpliv na vsoto vsebnosti vseh prostih aminokislin, ki so predstavljene v preglednici 21, in tudi na vsoto vsebnosti štirih prostih aminokislin (izolevcina, levcina, fenilalanina in tirozina – ILLEPHTY), ki so prekurzorji za PhIP.

Preglednica 22: Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na vsebnost (mg/100 g) skupnih prostih aminokislin in vsebnost (mg/100 g) vsote štirih aminokislin (ILE, LEU, PHE in TYR) v dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 22: Effects of meat quality and ageing on total free amino acids content (mg/100 g) and the sum (mg/100 g) of four amino acids (ILE, LEU, PHE in TYR) in pork LD muscles (n = 10, Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	K	zorenje (dan)				vpliv (p-vred.)				rsd
		1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z	
skupne AK	norm	95,9 ± 14,5 <sup>xc</sup>	116,2 ± 21,9 <sup>xb</sup>	132,7 ± 22,6 <sup>xb</sup>	152,4 ± 25,3 <sup>xa</sup>	***	*	***		17,9
	BMV	82,6 ± 5,9 <sup>yc</sup>	94,6 ± 11,7 <sup>yc</sup>	112,3 ± 13,8 <sup>yb</sup>	139,6 ± 25,7 <sup>xa</sup>				nz	
ILLEPHTY	norm	14,97 ± 2,14 <sup>xc</sup>	18,88 ± 3,87 <sup>xbc</sup>	22,24 ± 4,57 <sup>xb</sup>	27,28 ± 5,93 <sup>xa</sup>	**	**	***		3,68
	BMV	13,38 ± 1,56 <sup>xc</sup>	15,52 ± 2,80 <sup>yc</sup>	19,48 ± 3,58 <sup>xb</sup>	25,10 ± 5,23 <sup>xa</sup>				nz	

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, Z – zorenje, K\*Z – interakcija kakovosti mišičnine in zorenja, \*\*\*  $p \leq 0,001$  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, rsd – ostanek, <sup>x,y</sup> skupini z enako nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujeta, <sup>a,b,c</sup> skupine z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo, ILLEPHTY – vsota štirih aminokislin (ILE + LEU + PHE + TYR).



Slika 16: Vpliv časa zorenja na vsebnost skupnih prostih aminokislin v presnih dolgih hrbtnih mišicah prašiča dveh kakovosti.

Figure 16: Influence of ageing time on free amino acids content in the raw pork LD muscles both qualities, normal and PSE.

Vsebnost vseh prostih aminokislin skupaj se s časom zorenja v obdobju desetih dni linearno povečuje, in sicer je determinacijski koeficient  $r^2$  povprečnih vrednosti pri mišicah normalne kakovosti 0,9747 in pri mišicah BMV kakovosti 0,9986 (slika 21).

Ugotovili smo značilne razlike v sestavi posameznih prostih aminokislin med mišicami normalne in BMV kakovosti. Zelo posplošeno lahko trdimo, da mišice normalne kakovosti vsebujejo več prostih aminokislin kot mišice BMV kakovosti, z izjemo glutaminske kisline (GLU), 4-hidroksiprolina (HYP), lizina (LYS), metionina (MET), tirozina (TYR) in valina (VAL) (preglednica 21).

Skupaj s prostimi aminokislinami smo določili še nekatere druge aminokislone in dipeptide (preglednica 23). Izkazalo se je, da ima kakovost statistično značilen vpliv na vsebnost cistationina, tavrina, karnozina in cistina, medtem ko ima zorenje statistično značilen vpliv na vsebnost tavrina, homocistina in cistina.

Preglednica 23: Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na vsebnost (mg/100 g) nekaterih drugih aminokislin in dipeptidov v dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, Model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 23: Effects of meat quality and ageing on content (mg/100 g) of some other amino acids and dipeptides in pork LD muscles (n = 10, Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	K	zorenje (dan)				vpliv ( <i>p</i> -vred.)				rsd
		1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z	
cistationin	norm	0,02 ± 0,01 <sup>xa</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>xa</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>xa</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>xa</sup>	**	***	nz	nz	0,00
	BMV	0,02 ± 0,01 <sup>xb</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>xb</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>yab</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>xa</sup>					
ornitin	norm	0,81 ± 0,34 <sup>xa</sup>	0,93 ± 0,33 <sup>xa</sup>	0,96 ± 0,38 <sup>xa</sup>	0,80 ± 0,32 <sup>xa</sup>	nz	***	nz	nz	0,35
	BMV	0,86 ± 0,31 <sup>xa</sup>	1,02 ± 0,52 <sup>xa</sup>	1,10 ± 0,44 <sup>xa</sup>	1,06 ± 0,42 <sup>xa</sup>					
citrulin	norm	1,25 ± 0,49 <sup>xa</sup>	1,24 ± 0,35 <sup>xa</sup>	1,35 ± 0,18 <sup>xa</sup>	1,35 ± 0,29 <sup>xa</sup>	nz	***	nz	nz	0,27
	BMV	1,24 ± 0,33 <sup>xa</sup>	1,29 ± 0,20 <sup>xa</sup>	1,24 ± 0,25 <sup>xa</sup>	1,25 ± 0,32 <sup>xa</sup>					
tavrin	norm	5,79 ± 1,87 <sup>xb</sup>	7,26 ± 2,64 <sup>xb</sup>	9,11 ± 1,81 <sup>xa</sup>	9,47 ± 1,49 <sup>xa</sup>	**	**	***	nz	1,67
	BMV	5,91 ± 1,41 <sup>xb</sup>	6,58 ± 1,73 <sup>xab</sup>	6,37 ± 1,29 <sup>yab</sup>	7,85 ± 2,15 <sup>xa</sup>					
anserin	norm	17,93 ± 4,03 <sup>xa</sup>	18,07 ± 4,37 <sup>xa</sup>	16,51 ± 2,15 <sup>xa</sup>	16,10 ± 1,97 <sup>xa</sup>	nz	**	nz	nz	2,86
	BMV	16,98 ± 2,05 <sup>xa</sup>	16,47 ± 3,41 <sup>xa</sup>	16,75 ± 3,52 <sup>xa</sup>	15,50 ± 2,13 <sup>xa</sup>					
karnozin	norm	305 ± 42 <sup>xa</sup>	314 ± 53 <sup>xa</sup>	305 ± 57 <sup>xa</sup>	281 ± 45 <sup>xa</sup>	*	nz	nz	nz	45,5
	BMV	281 ± 24 <sup>xa</sup>	270 ± 69 <sup>xa</sup>	273 ± 34 <sup>xa</sup>	278 ± 28 <sup>xa</sup>					
homocistin	norm	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>	nz	*	*	nz	0,00
	BMV	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>xa</sup>					
cistin	norm	0,39 ± 0,06 <sup>xb</sup>	0,74 ± 0,24 <sup>xa</sup>	0,94 ± 0,27 <sup>xa</sup>	0,96 ± 0,36 <sup>xa</sup>	***	nz	***	nz	0,23
	BMV	0,26 ± 0,05 <sup>yc</sup>	0,49 ± 0,18 <sup>yb</sup>	0,55 ± 0,17 <sup>yb</sup>	0,77 ± 0,27 <sup>xa</sup>					

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, Z – zorenje, K\*Z – interakcija kakovosti mišičnine in zorenja, \*\*\*  $p \leq 0,001$  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, rsd – ostanek, <sup>x,y</sup> skupini z enako nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujeta, <sup>a,b,c</sup> skupine z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

V preglednici 24 so prikazani rezultati vsebnosti reducirajočih sladkorjev v mišicah normalne in BMV kakovosti ter vpliv časa zorenja na spreminjanje njihove vsebnosti. Ugotovili smo, da kakovost mišičnine in čas zorenja statistično značilno vplivata na vsebnost reducirajočih sladkorjev. Vsebnost monosaharidov s časom zorenja narašča in se statistično razlikuje med nezorenimi in zorenimi mišicami predvsem pri BMV kakovosti. S časom zorenja se vsebnost maltoze in maltotrioze zmanjšuje tako pri normalni kot BMV kakovosti. Na splošno večja vsebnost reducirajočih sladkorjev je v mišicah BMV kakovosti v primerjavi z mišicami normalne kakovosti.

Preglednica 24: Vpliv kakovosti mišičnine in časa zorenja na vsebnost reducirajočih sladkorjev v dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, Model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 24: Effects of meat quality and ageing on sugars content in the pork LD muscles (n = 10, Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	K	zorenje (dan)				vpliv (p-vred.)				Rsd
		1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z	
glukoza (mg/g)	norm	2,29 ± 0,31 <sup>ya</sup>	2,44 ± 0,53 <sup>ya</sup>	2,49 ± 0,46 <sup>ya</sup>	2,82 ± 0,93 <sup>ya</sup>	***	nz	**	nz	0,52
	BMV	2,76 ± 0,36 <sup>xb</sup>	3,21 ± 0,35 <sup>xa</sup>	3,52 ± 0,52 <sup>xa</sup>	3,50 ± 0,35 <sup>xa</sup>					
fruktoza (mg/g)	norm	0,62 ± 0,09 <sup>xb</sup>	0,65 ± 0,12 <sup>yab</sup>	0,80 ± 0,13 <sup>xa</sup>	0,71 ± 0,25 <sup>xab</sup>	**	**	***	nz	0,13
	BMV	0,60 ± 0,13 <sup>xb</sup>	0,84 ± 0,10 <sup>xa</sup>	0,90 ± 0,15 <sup>xa</sup>	0,82 ± 0,08 <sup>xa</sup>					
manoza (μg/g)	norm	151,7 ± 37,2 <sup>xa</sup>	166,1 ± 32,6 <sup>ya</sup>	186,1 ± 38,7 <sup>xa</sup>	195,6 ± 63,6 <sup>ya</sup>	***	nz	***	nz	40,4
	BMV	179,5 ± 36,7 <sup>xc</sup>	212,2 ± 17,8 <sup>xbc</sup>	218,2 ± 48,5 <sup>xb</sup>	257,4 ± 38,0 <sup>xa</sup>					
riboza (μg/g)	norm	15,7 ± 8,0 <sup>xb</sup>	30,1 ± 13,2 <sup>xb</sup>	54,2 ± 14,4 <sup>xb</sup>	129,9 ± 98,4 <sup>xa</sup>	nz	nz	***	**	39,1
	BMV	19,7 ± 6,6 <sup>xb</sup>	28,5 ± 13,1 <sup>xb</sup>	73,4 ± 37,8 <sup>xa</sup>	56,2 ± 36,4 <sup>ya</sup>					
arabinoza (μg/g)	norm	20,01 ± 2,66 <sup>xc</sup>	34,93 ± 3,09 <sup>xb</sup>	57,84 ± 16,01 <sup>xa</sup>	33,64 ± 3,44 <sup>xb</sup>	***	nz	***	nz	8,47
	BMV	15,11 ± 2,83 <sup>yd</sup>	22,76 ± 8,49 <sup>yc</sup>	48,53 ± 12,64 <sup>xa</sup>	31,57 ± 5,30 <sup>xb</sup>					
ramnoza (μg/g)	norm	1,46 ± 0,19 <sup>xb</sup>	1,57 ± 0,27 <sup>yb</sup>	2,12 ± 0,31 <sup>xa</sup>	1,82 ± 0,78 <sup>xab</sup>	*	**	***	*	0,41
	BMV	1,42 ± 0,54 <sup>xb</sup>	2,04 ± 0,18 <sup>xa</sup>	2,01 ± 0,44 <sup>xa</sup>	2,34 ± 0,50 <sup>xa</sup>					
maltoza (μg/g)	norm	111,6 ± 81,5 <sup>ya</sup>	69,4 ± 54,5 <sup>yab</sup>	28,2 ± 13,2 <sup>yb</sup>	42,7 ± 25,7 <sup>xb</sup>	***	nz	***	**	69,4
	BMV	279,2 ± 103,7 <sup>xa</sup>	166,3 ± 76,4 <sup>xb</sup>	178,4 ± 117,1 <sup>xb</sup>	68,7 ± 29,8 <sup>xc</sup>					
maltotrioza (μg/g)	norm	22,87 ± 24,50 <sup>ya</sup>	13,64 ± 9,59 <sup>xab</sup>	2,55 ± 1,13 <sup>yb</sup>	3,95 ± 2,57 <sup>yb</sup>	***	*	***	***	18,7
	BMV	81,14 ± 40,68 <sup>xa</sup>	13,48 ± 7,01 <sup>xb</sup>	27,68 ± 27,71 <sup>xb</sup>	6,06 ± 1,43 <sup>xb</sup>					

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, Z – zorenje, K\*Z – interakcija kakovosti mišičnine in zorenja, \*\*\*  $p \leq 0,001$  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, rsd – ostanek, <sup>x,y</sup> skupini z enako nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujeta, <sup>a,b,c,d</sup> skupine z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo

V mišicah prašiča je največ glukoze (2,29 mg/g), medtem ko je fruktoze (0,62 mg/g), manoze, riboze, arabinoze in ramnoze manj (pod 0,3 mg/g). Mišice BMV kakovosti vsebujejo za približno 0,7 mg/g glukoze več kot mišice normalne kakovosti. Med 10-dnevnim zorenjem se vsebnost glukoze statistično značilno poveča za 0,74 mg/g oz. 26,8 % pri mišicah BMV kakovosti, medtem ko se pri mišicah normalne kakovosti vsebnost glukoze neznačilno poveča za 0,53 mg/g oz. 23,1 %.

#### 4.5 HETEROCIKLIČNI AROMATSKI AMINI

V preglednici 25 so zbrani rezultati meritev vsebnosti HCA. Vsebnosti posameznih HCA se precej razlikujejo, kar je posledica različne kakovosti vzorcev, različnih časovnih intervalov zorenja kot tudi razlik med živalmi.

Preglednica 25: Vsebnosti nekaterih HCA v nezorenih in zorenih ter toplotno obdelanih dolgih hrbtnih mišic prašiča z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.

Table 25: Basic statistical parameters for HCAs content of aged and grilled pork LD muscles.

HCA (ng/g)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
PhIP	160	1,84	0,14	8,47	1,68	91,28
harman	160	0,13	0,05	0,25	0,05	42,45
norharman	160	0,34	0,07	0,95	0,22	65,15
DiMeIQx	160	0,58	0,04	2,26	0,50	85,65
MeIQx	160	2,45	0,26	9,10	1,99	81,12

n – število obravnavanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

V našem poskusu so količine HCA v območju med 0,04 (DiMeIQx) in 9,10 (MeIQx) ng/g toplotno obdelanega mesa. Toplotno obdelane mišice prašičev vsebujejo v povprečju največ MeIQx (2,45 ng/g) in PhIP (1,84 ng/g), v manjših količinah pa še DiMeIQx (0,58 ng/g), norharmana (0,34 ng/g) in harmana (0,13 ng/g).

V preglednici 26 so prikazane vsebnosti posameznih in skupnih HCA, ki so se tvorili med pečenjem nezorenih in zorenih mišic dveh kakovosti na dvoploščnem žaru pri temperaturi 220 °C do dveh središčnih temperatur (70 °C in 95 °C). Prav tako smo ovrednotili količino petih različnih HCA, in sicer PhIP, harmana, norharmana, DiMeIQx in MeIQx.

Na splošno vsebnosti vseh HCA naraščajo z zorenjem in končno središčno temperaturo pečenja, od kakovosti mišičnine pa je odvisna le vsebnost MeIQx. Mišice BMV kakovosti vsebujejo v primerjavi z mišicami normalne kakovosti večjo količino MeIQx, in to ne glede na čas zorenja.

V nezorenih vzorcih normalne in BMV kakovosti, pečenih do  $T_s = 70$  °C, smo določili 0,41 ng/g in 0,52 ng/g PhIP. Po treh dneh zorenja se vrednosti niso spremenile. Statistično značilno večji preskok pa smo zasledili po šestih dneh zorenja, ko se je vsebnost PhIP pri vzorcih normalne kakovosti povečala za 2-krat, po 10-ih dneh pa, ne glede na kakovost, za okoli 3-krat (1,41 ng/g vs. 1,43 ng/g). Enako lahko povzamemo tudi za vzorce, pečene do  $T_s = 95$  °C, pri katerih so bile že začetne vrednosti PhIP pri nezorenih vzorcih (2,05 ng/g vs. 1,63 ng/g) za 3- do 4-krat nižje kot pri zorenih (3,46 ng/g vs. 4,68 ng/g). Vsebnost PhIP v vzorcih, pečenih do  $T_s = 70$  °C, je statistično zelo visoko značilno manjša (preglednici 26 in 27) kot v vzorcih, pečenih do  $T_s = 95$  °C. Razlike med središčnima temperaturama so podobne pri normalni (nezoren: 1,64 ng/g, 3. dan: 1,29 ng/g, 6. dan: 2,79 ng/g in 10. dan: 2,05 ng/g) in pri BMV mišičnini (nezoren: 1,11 ng/g, 3. dan: 1,95 ng/g, 6. dan: 2,79 ng/g in 10. dan: 3,25 ng/g).



Preglednica 26: Vpliv kakovosti mišičnine in časa zorenja na vsebnost (ng/g) HCA v toplotno obdelanih dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, Model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

Table 26: Effects of meat quality and ageing on HCAs content (ng/g) in grilled pork LD muscles (n = 10, Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

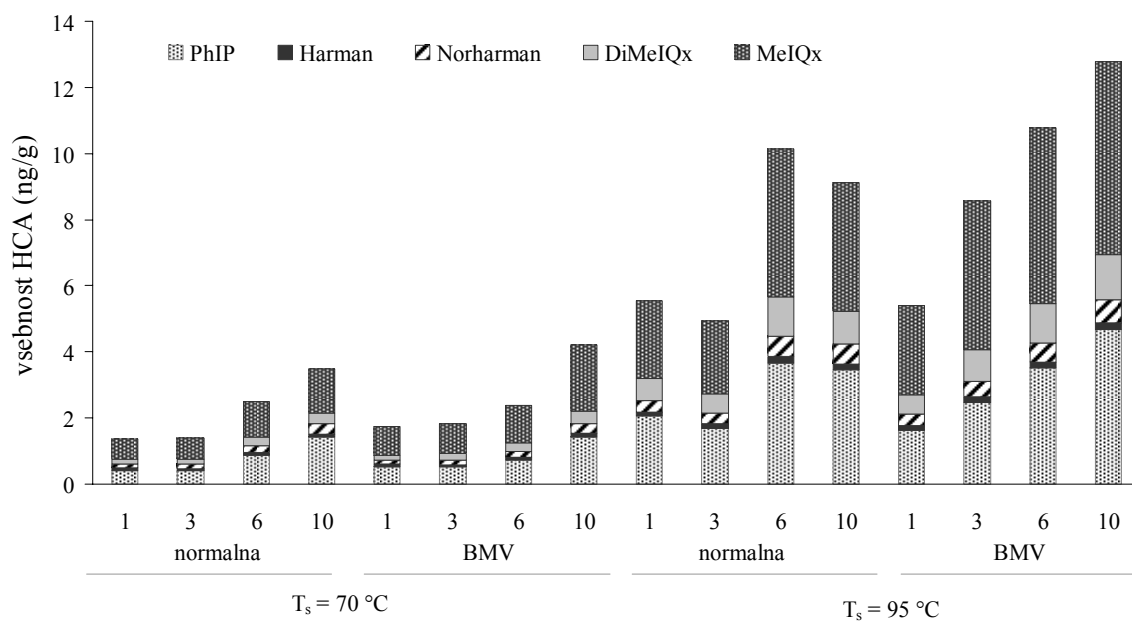
HCA ( $\bar{x} \pm so$ )	T <sub>s</sub> (°C)	K	zorenje (dan)				vpliv (p-vred.)				rsd
			1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z	
PhIP	70	norm	0,41 ± 0,44 <sup>xc</sup>	0,40 ± 0,19 <sup>yc</sup>	0,88 ± 0,67 <sup>xb</sup>	1,41 ± 0,62 <sup>xa</sup>	nz	**	***	nz	0,38
		BMV	0,52 ± 0,07 <sup>xbc</sup>	0,51 ± 0,14 <sup>xc</sup>	0,73 ± 0,44 <sup>xb</sup>	1,43 ± 0,31 <sup>xa</sup>					
	95	norm	2,05 ± 1,48 <sup>xb</sup>	1,69 ± 1,45 <sup>yb</sup>	3,67 ± 1,11 <sup>xa</sup>	3,46 ± 1,57 <sup>xa</sup>	nz	***	***	nz	
		BMV	1,63 ± 1,19 <sup>xc</sup>	2,46 ± 1,19 <sup>xc</sup>	3,52 ± 1,73 <sup>xb</sup>	4,68 ± 2,02 <sup>xa</sup>					
harman	70	norm	0,08 ± 0,03 <sup>xb</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>yb</sup>	0,09 ± 0,03 <sup>xab</sup>	0,11 ± 0,03 <sup>xa</sup>	nz	*	***	nz	0,02
		BMV	0,08 ± 0,02 <sup>xc</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>xbc</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>xb</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>xa</sup>					
	95	norm	0,14 ± 0,05 <sup>xb</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>yb</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>xa</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>yx</sup>	*	***	***	nz	
		BMV	0,14 ± 0,06 <sup>xc</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>xb</sup>	0,18 ± 0,03 <sup>xb</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>xa</sup>					
norharman	70	norm	0,12 ± 0,06 <sup>xc</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>xc</sup>	0,20 ± 0,10 <sup>xb</sup>	0,30 ± 0,10 <sup>xa</sup>	nz	**	***	nz	0,06
		BMV	0,13 ± 0,03 <sup>xc</sup>	0,15 ± 0,04 <sup>xbc</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>xb</sup>	0,29 ± 0,06 <sup>xa</sup>					
	95	norm	0,35 ± 0,17 <sup>xb</sup>	0,34 ± 0,13 <sup>yb</sup>	0,62 ± 0,18 <sup>xa</sup>	0,60 ± 0,11 <sup>ya</sup>	nz	***	***	nz	
		BMV	0,34 ± 0,17 <sup>xd</sup>	0,47 ± 0,22 <sup>xc</sup>	0,58 ± 0,17 <sup>xb</sup>	0,70 ± 0,15 <sup>xa</sup>					
DiMeIQx	70	norm	0,14 ± 0,12 <sup>xc</sup>	0,16 ± 0,06 <sup>xbc</sup>	0,25 ± 0,17 <sup>ab</sup>	0,33 ± 0,11 <sup>ya</sup>	nz	**	***	nz	0,09
		BMV	0,15 ± 0,04 <sup>xc</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>xc</sup>	0,24 ± 0,08 <sup>xb</sup>	0,39 ± 0,12 <sup>xb</sup>					
	95	norm	0,66 ± 0,46 <sup>xb</sup>	0,56 ± 0,27 <sup>yb</sup>	1,19 ± 0,45 <sup>xa</sup>	1,00 ± 0,24 <sup>ya</sup>	*	***	***	nz	
		BMV	0,59 ± 0,38 <sup>xc</sup>	0,97 ± 0,46 <sup>xb</sup>	1,18 ± 0,47 <sup>xa</sup>	1,37 ± 0,46 <sup>xa</sup>					
MeIQx	70	norm	0,61 ± 0,48 <sup>xb</sup>	0,62 ± 0,26 <sup>yb</sup>	1,07 ± 0,82 <sup>xa</sup>	1,34 ± 0,39 <sup>ya</sup>	**	***	***	nz	0,42
		BMV	0,86 ± 0,17 <sup>xb</sup>	0,91 ± 0,13 <sup>xb</sup>	1,13 ± 0,41 <sup>xb</sup>	1,98 ± 0,64 <sup>xa</sup>					
	95	norm	1,80 ± 0,83 <sup>xb</sup>	2,23 ± 0,79 <sup>yb</sup>	4,48 ± 1,26 <sup>xa</sup>	3,87 ± 1,20 <sup>ya</sup>	***	***	***	*	
		BMV	2,69 ± 1,54 <sup>xc</sup>	4,50 ± 1,73 <sup>xb</sup>	5,33 ± 1,74 <sup>xa</sup>	5,82 ± 1,71 <sup>xa</sup>					
vsota HCA	70	norm	1,35 ± 1,13 <sup>xb</sup>	1,38 ± 0,49 <sup>yb</sup>	2,48 ± 1,77 <sup>xa</sup>	3,49 ± 1,19 <sup>ya</sup>	nz	***	***	nz	0,91
		BMV	1,73 ± 0,21 <sup>xc</sup>	1,81 ± 0,31 <sup>xc</sup>	2,38 ± 0,96 <sup>xb</sup>	4,21 ± 1,05 <sup>xa</sup>					
	95	norm	5,00 ± 3,39 <sup>xb</sup>	4,95 ± 2,58 <sup>yb</sup>	10,1 ± 2,9 <sup>xa</sup>	9,11 ± 3,02 <sup>ya</sup>	**	***	***	nz	
		BMV	5,39 ± 3,30 <sup>xd</sup>	8,56 ± 3,50 <sup>xc</sup>	10,8 ± 3,9 <sup>xb</sup>	12,8 ± 4,3 <sup>xa</sup>					

$\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, T<sub>s</sub> – središnja temperatura, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, Z – zorenje, K\*Z – interakcija kakovosti mišičnine in zorenja, \*\*\* $p \leq 0,001$  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, rsd – ostanek, <sup>x,y</sup> skupini z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujejo, <sup>a,b,c,d</sup> skupine z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujejo

Harman je tisti HCA, ki ga je po vsebnosti v vzorcih najmanj, okoli 0,08 ng/g. Po zorenju se vsebnost harmana značilno poveča pri obeh kakovostih in obeh središnjih temperaturah. Po 10-ih dneh zorenja ga je pri nižji T<sub>s</sub> v povprečju 0,11 ng/g, pri višji pa med 0,18 ng/g in 0,20 ng/g, odvisno od kakovosti mišic.

Nekoliko višje vrednosti smo določili pri norharmanu, in sicer pri nižji T<sub>s</sub> v povprečju 0,12 ng/g in 0,13 ng/g, in pri višji T<sub>s</sub> 0,35 ng/g in 0,34 ng/g. Po 10-ih dneh zorenja se vsebnost norharmana značilno poveča približno za dvakrat, ne glede na kakovost.

V nezorenih vzorcih normalne in BMV kakovosti, pečenih do  $T_s = 70\text{ }^\circ\text{C}$  smo določili 0,14 ng/g oz. 0,15 ng/g DiMeIQx. Po treh dneh zorenja se vrednosti niso spremenile. Večji statistično značilni preskok smo zasledili po šestih dneh zorenja, ko se je vsebnost DiMeIQx pri mišicah normalne in BMV kakovosti povečala za približno 1,5-krat, po 10-ih dneh pa za 2,5-krat (0,33 ng/g oz. 0,39 ng/g). Enako velja tudi za vzorce pečene do  $T_s = 95\text{ }^\circ\text{C}$ , pri katerih so bile vrednosti pri nezorenih vzorcih (0,66 ng/g oz. 0,59 ng/g) za 1,5- do 2-krat nižje kot pri vzorcih zorenih 10 dni (1,00 ng/g oz. 1,37 ng/g). Vsebnost DiMeIQx v vzorcih, pečenih do  $T_s = 70\text{ }^\circ\text{C}$ , je statistično zelo visoko značilno manjša (preglednici 26 in 27) kot v vzorcih, pečenih do  $T_s = 95\text{ }^\circ\text{C}$ . Razlike v nastali količini DiMeIQx med središčnima temperaturama so podobne pri normalni (nezoren: 0,52 ng/g, 3. dan: 0,40 ng/g, 6. dan: 0,94 ng/g in 10. dan: 0,67 ng/g) in pri BMV mišičnini (nezoren: 0,44 ng/g, 3. dan: 0,79 ng/g, 6. dan: 0,94 ng/g in 10. dan: 0,98 ng/g). Pri  $T_s = 95\text{ }^\circ\text{C}$  se v BMV mišicah med pečenjem oblikuje praviloma značilno več DiMeIQx, predvsem v tri in 10 dni zorenih vzorcih.



Slika 17: Vsebnost vseh HCA (ng/g) v nezorenih (1 dan *post mortem*) in zorenih dolgih hrbtnih mišicah prašiča, normalne in BMV kakovosti, pečenih na dvoploščnem žaru do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ).

Figure 17: HCAs content in grilled pork LD muscle with respect to meat quality, ageing and internal temperature ( $T_s$ ).

Na splošno vsebnost MeIQx narašča z zorenjem in s končno središčno temperaturo pečenja ter je hkrati odvisna od kakovosti mišičnine (predvsem pri višji središčni temperaturi pečenja). V nezorenih vzorcih normalne kakovosti pečenih do  $T_s = 70\text{ }^\circ\text{C}$  smo določili 0,61 ng/g MeIQx. Po treh dneh zorenja se vrednosti niso spremenile. Značilno večjo vsebnost smo zasledili po šestih dneh zorenja, ko se je vsebnost MeIQx povečala za približno 1,5-krat, po 10-ih dneh pa za 2-krat (1,34 ng/g). Pri tri in 10 dni zorenih mišicah BMV kakovosti smo v primerjavi z mišicami normalne kakovosti ugotovili značilno višje

vsebnosti MeIQx. Vrednosti nezorenih vzorcev pečenih do  $T_s = 95\text{ }^\circ\text{C}$  (1,80 ng/g oz. 2,69 ng/g) so 3-krat višje od vrednosti nezorenih vzorcev pečenih do  $T_s = 70\text{ }^\circ\text{C}$ . Razlike v vsebnosti MeIQx med mišicami normalne in BMV kakovosti so pri višji središčni temperaturi večje in statistično zelo visoko značilne (preglednica 27).

Preglednica 27: Vpliv središčne temperature pečenja na vsebnost HCA v toplotno obdelanih dolgih hrbtnih mišicah prašiča (n = 10, model 3, t-test v paru).

Table 27: Effects of internal temperature of grilling on HCAs content in normal and PSE aged pork LD muscle (n = 10, Model 3, t-test paired).

HCA (ng/g)	Z (dan)		1		vpliv p-vr.	3		vpliv p-vr.
	K \ $T_s$ ( $^\circ\text{C}$ )	70	95	70		95		
PhIP	norm	0,41 ± 0,44 <sup>b</sup>	2,05 ± 1,48 <sup>a</sup>	**	0,40 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,69 ± 1,45 <sup>a</sup>	*	
	BMV	0,52 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,63 ± 1,19 <sup>a</sup>	*	0,51 ± 0,14 <sup>b</sup>	2,46 ± 1,19 <sup>a</sup>	***	
harman	norm	0,08 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,05 <sup>a</sup>	***	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,08 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,06 <sup>a</sup>	**	0,08 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>a</sup>	***	
norharman	norm	0,12 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,17 <sup>a</sup>	***	0,13 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,13 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,13 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,17 <sup>a</sup>	**	0,15 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,47 ± 0,22 <sup>a</sup>	***	
DiMeIQx	norm	0,14 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,46 <sup>a</sup>	**	0,16 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,27 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,15 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,38 <sup>a</sup>	**	0,18 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,46 <sup>a</sup>	***	
MeIQx	norm	0,61 ± 0,48 <sup>b</sup>	1,80 ± 0,83 <sup>a</sup>	***	0,62 ± 0,26 <sup>b</sup>	2,23 ± 0,79 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,86 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,69 ± 1,54 <sup>a</sup>	**	0,91 ± 0,13 <sup>b</sup>	4,50 ± 1,73 <sup>a</sup>	***	
vsota HCA	norm	1,35 ± 1,13 <sup>b</sup>	5,00 ± 3,39 <sup>a</sup>	**	1,38 ± 0,49 <sup>b</sup>	4,95 ± 52,13 <sup>a</sup>	***	
	BMV	1,73 ± 0,21 <sup>b</sup>	5,39 ± 3,30 <sup>a</sup>	**	1,81 ± 0,31 <sup>b</sup>	8,56 ± 3,50 <sup>a</sup>	***	
	Z (dan)		6			10		
PhIP	norm	0,88 ± 0,67 <sup>b</sup>	3,67 ± 1,11 <sup>a</sup>	***	1,41 ± 0,62 <sup>b</sup>	3,46 ± 1,57 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,73 ± 0,44 <sup>b</sup>	3,52 ± 1,73 <sup>a</sup>	***	1,43 ± 0,31 <sup>b</sup>	4,68 ± 2,02 <sup>a</sup>	***	
harman	norm	0,09 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>a</sup>	***	0,11 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	***	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>a</sup>	***	
norharman	norm	0,20 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,18 <sup>a</sup>	***	0,30 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,11 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,18 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,17 <sup>a</sup>	***	0,29 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,15 <sup>a</sup>	***	
DiMeIQx	norm	0,25 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,19 ± 0,45 <sup>a</sup>	***	0,33 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,24 <sup>a</sup>	***	
	BMV	0,24 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,18 ± 0,47 <sup>a</sup>	***	0,39 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,37 ± 0,46 <sup>a</sup>	***	
MeIQx	norm	1,07 ± 0,82 <sup>b</sup>	4,48 ± 1,26 <sup>a</sup>	***	1,34 ± 0,39 <sup>b</sup>	3,87 ± 1,20 <sup>a</sup>	***	
	BMV	1,13 ± 0,41 <sup>b</sup>	5,33 ± 1,74 <sup>a</sup>	***	1,98 ± 0,64 <sup>b</sup>	5,82 ± 1,71 <sup>a</sup>	***	
vsota HCA	norm	2,48 ± 1,77 <sup>b</sup>	10,14 ± 2,94 <sup>a</sup>	***	3,49 ± 1,19 <sup>b</sup>	9,11 ± 3,02 <sup>a</sup>	***	
	BMV	2,38 ± 0,96 <sup>b</sup>	10,78 ± 3,91 <sup>a</sup>	***	4,21 ± 1,05 <sup>b</sup>	12,77 ± 4,27 <sup>a</sup>	***	

Z – zorenje, K – kakovost mišičnine,  $T_s$  – središčna temperatura, \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv, \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv, \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv, <sup>a,b</sup> skupini z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujeta.

Iz preglednice 27 je razvidno, da ima končna središčna temperatura v vseh obdobjih zorenja statistično značilen vpliv na količino vseh HCA, saj se pri višji središčni temperaturi (95  $^\circ\text{C}$ ) tvori večja količina HCA. Ta fenomen se kaže pri obeh kakovostih in to ne glede na čas zorenja.

Najmanjšo skupno vsebnost HCA (1,35 ng/g) smo določili v nezorenih mišicah normalne kakovosti pripravljenih do  $T_s = 70\text{ }^\circ\text{C}$ , največjo (12,8 ng/g) pa v 10 dni zorenih mišicah BMV kakovosti pečenih do  $T_s = 95\text{ }^\circ\text{C}$  (preglednica 27). V pečenih vzorcih do  $T_s = 95\text{ }^\circ\text{C}$  se oblikuje 3- do 4-krat več HCA kot pri vzorcih pečenih do  $T_s = 70\text{ }^\circ\text{C}$ . Na splošno je bila

vsebnost vseh HCA pri mišicah BMV kakovosti večja kot pri mišicah normalne kakovosti. Razlike so pri višji središčni temperaturi za vse HCA statistično značilne, razen za PhIP in norharmana. Pri nižji temperaturi pa so razlike statistično značilne samo za MeIQx.

#### 4.6 PARAMETRI PEČENJA NA DVOPLOŠČNEM ŽARU

Pomembni dejavniki pri oblikovanju HCA so ne le način toplotne obdelave temveč tudi pogoji priprave. Zato sta v preglednici 28 predstavljena čas pečenja na dvoploščnem žaru in izceja med pečenjem. Iz preglednice je razvidno, da so razlike v času pečenja med vzorci zgolj naključne in niso posledica ne kakovosti mesa, ne razlik med živalmi in ne časa zorenja. Vzorce pečene do  $T_s = 95\text{ °C}$  smo pekli dlje od vzorcev pečenih do nižje središčne temperature ( $70\text{ °C}$ ).

Preglednica 28: Vpliv kakovosti mišičnine in zorenja na čas pečenja in izcejo med pečenjem dolgih hrbtnih mišic prašiča do določene  $T_s$  ( $n = 10$ , Model 2, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).

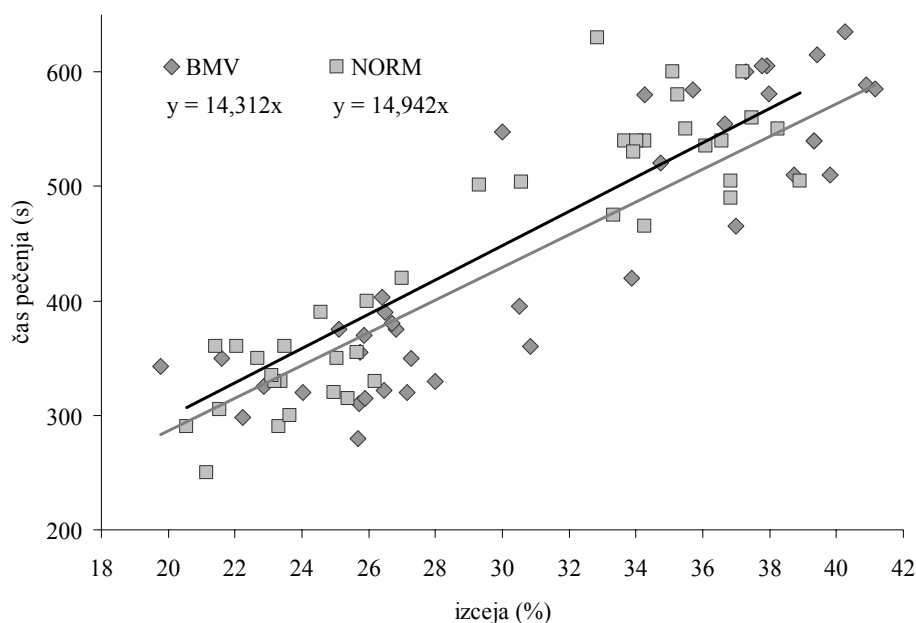
Table 28: Effects of meat quality and ageing on time of roasting and on drip loss during roasting of pork LD muscle ( $n = 10$ , Model 2, Duncan test,  $\alpha = 0.05$ ).

Parameter ( $\bar{x} \pm so$ )	$T_s$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	K	zorenje (dan)				vpliv ( $p$ -vred.)				rsd
			1	3	6	10	K	Ž	Z	K*Z	
čas pečenja (s)	70	norm	321 ± 46 <sup>xa</sup>	326 ± 41 <sup>xa</sup>	346 ± 46 <sup>xa</sup>	355 ± 30 <sup>xa</sup>	nz	nz	nz	nz	34,24
		BMV	336 ± 37 <sup>xa</sup>	347 ± 20 <sup>xa</sup>	330 ± 37 <sup>xa</sup>	360 ± 33 <sup>xa</sup>					
	95	norm	537 ± 59 <sup>xab</sup>	512 ± 39 <sup>xb</sup>	567 ± 31 <sup>xa</sup>	532 ± 31 <sup>xab</sup>	nz	nz	nz	nz	57,33
		BMV	544 ± 81 <sup>xa</sup>	561 ± 85 <sup>xa</sup>	560 ± 59 <sup>xa</sup>	533 ± 32 <sup>xa</sup>					
izceja med pečenjem (%)	70	norm	22,2 ± 1,1 <sup>xa</sup>	23,6 ± 2,1 <sup>xa</sup>	24,2 ± 1,7 <sup>xa</sup>	24,9 ± 1,6 <sup>xa</sup>	nz	nz	nz	nz	2,16
		BMV	25,3 ± 1,8 <sup>xb</sup>	24,9 ± 2,9 <sup>xb</sup>	25,0 ± 2,3 <sup>xb</sup>	27,7 ± 3,3 <sup>xa</sup>					
	95	norm	33,4 ± 3,7 <sup>xa</sup>	33,9 ± 0,4 <sup>xa</sup>	36,4 ± 1,3 <sup>xa</sup>	36,3 ± 1,9 <sup>ya</sup>	*	nz	**	nz	2,55
		BMV	32,9 ± 4,6 <sup>xb</sup>	37,6 ± 2,5 <sup>xa</sup>	38,5 ± 1,6 <sup>xa</sup>	38,7 ± 2,4 <sup>xa</sup>					

$\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon,  $T_s$  – središčna temperatura, K – kakovost mišičnine, Ž – žival, Z – zorenje, K\*Z – interakcija kakovosti mišičnine in zorenja, \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv, \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv, nz  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv, rsd – ostanek, <sup>x,y</sup> skupini z različno nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno razlikujeta, <sup>a,b</sup> skupini z različno nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno razlikujeta.

Med pečenjem je količina izcejenega mesnega soka odvisna od časa pečenja (središčne temperature), od kakovosti mišičnine (pri mišicah BMV kakovosti je izguba v povprečju večja kot pri mišicah normalne kakovosti) in pogojno tudi od časa zorenja (pri mišicah BMV kakovosti, pečenih do  $T_s = 95\text{ °C}$ ).

S slike 23 je razvidna splošna tendenca povezanosti med časom in izcejo pečenja. Vzorci normalne kakovosti pri enakem času pečenja izgubijo manj mesnega soka kot vzorci BMV kakovosti, vendar razlike niso značilne.



Slika 18: Odvisnost med časom pečenja in izcejo pri pečenju različno zorenih dolgih hrbtnih mišic prašiča normalne (NORM) in BMV kakovosti na dvoploščnem žaru.

Figure 18: Dependence between time of roasting and drip loss during roasting of to different day-aged pork LD muscles with respect to meat quality (NORM – normal, BMV – PSE quality).

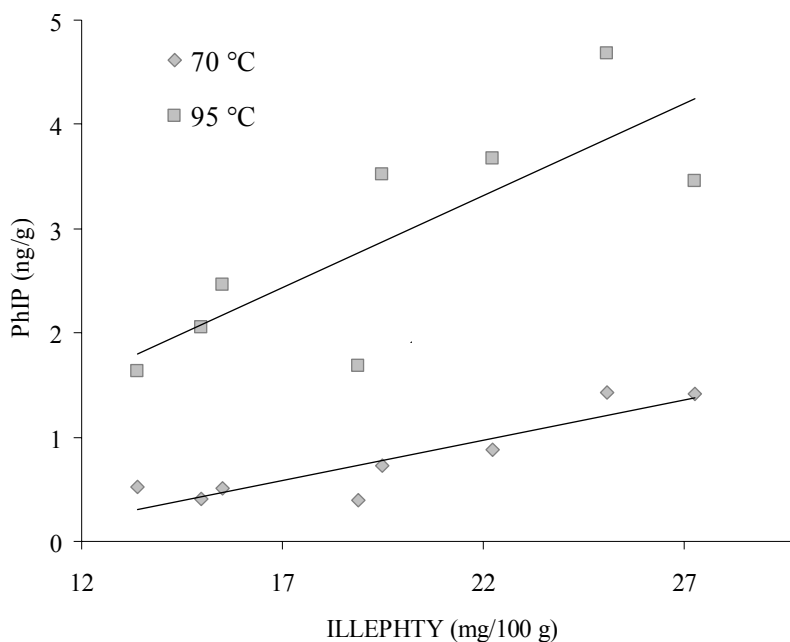
Iz rezultatov (preglednica 29) je prav tako razvidno, da je med izcejo pri pečenju in vsebnostjo vseh oblikovanih HCA zelo močna povezava; in sicer je pri  $T_s = 70\text{ °C}$  vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta 0,79 ter 0,93 pri  $T_s = 95\text{ °C}$ .

#### 4.7 KORELACIJE

Predpostavljali smo, da bo večja vsebnost kreatinina in prostih aminokislin, kot posledica zorenja in kakovosti mišičnine, povezana z večjo tvorbo HCA med pečenjem. Med omenjenimi parametri smo ugotovili močne in statistično značilne povezave (preglednica 29). Na splošno lahko rečemo, da je vsebnost omenjenih prekurzorjev močneje povezana z vsebnostjo HCA ( $r > 0,80$ ) oblikovanih pri  $T_s = 70\text{ °C}$  kot pri  $T_s = 95\text{ °C}$  ( $0,65 < r < 0,90$ ).

Kljub dejstvu, da se MeIQx tvori iz praktično vseh prostih aminokislin, kreatinina in reducirajočih sladkorjev, so povezave med omenjenimi parametri tesne in značilne ( $r > 0,90$ ) predvsem pri nižji središnji temperaturi in odvisne od kakovosti mišic.

Murkovic (2004) je v modelnem sistemu ugotovil, da je PhIP linearno odvisen od vsebnosti prostih aminokislin, še posebej od levcina, izolevcina, fenilalanina in tirozina (ILLEPHTY), ki so prekurzorji nastanka PhIP. Tudi v naši raziskavi smo ugotovili tesno korelacijo med ILLEPHTY in PhIP (slika 24), korelacijska koeficienta sta podobna pri obeh središčnih temperaturah 70 °C ( $r = 0,91$ ,  $p = 0,002$ ) in 95 °C ( $r = 0,86$ ,  $p = 0,006$ ) (preglednica 29).



Slika 19: Odvisnost med vsebnostjo PhIP (ng/g) in vsoto levcina, izolevcina, fenilalanina in tirozina (ILLEPHTY, mg/100 g) v zorenih dolgih hrbtnih mišicah prašičev pri različnih središčnih temperaturah (70 °C in 95 °C).

Figure 19: Content of PhIP (ng/g) versus the sum of leucine, isoleucine, phenylalanine and tyrosine (ILLEPHTY, mg/100 g) in the aged pork LD muscles with respect to the internal temperature (70 °C in 95 °C).

Vrednosti korelacijskih koeficientov v preglednici 29 kažejo, da ima količina prekurzorjev kreatinina in prostih aminokislin večji vpliv na tvorbo HCA pri nižji središčni temperaturi (70 °C), medtem ko ima količina glukoze večji vpliv na tvorbo HCA pri višji središčni temperaturi (95 °C), kar nam pojasnjujejo.

Preglednica 29: Pearsonovi korelacijski koeficienti med vsebnostjo prekursorjev HCA v presnih mišicah in vsebnostjo HCA v zunanem sloju pečenih dolgih hrbtnih mišic prašiča v odvisnosti od središčne temperature (n = 16).

Table 29: Pearson correlation coefficients between content of HCAs precursors in raw and content of HCAs in external surface layer of roasted pork LD muscle with respect to internal temperature (n = 16).

Parameter	T <sub>s</sub>	PhIP	harman	norharman	DiMeIQx	MeIQx norm	MeIQx BMV	vsota HCA
70 °C								
izceja zorenja		0,73*	0,72*	0,77*	0,85**	0,83	0,79	0,80*
izceja pečenja		0,68	0,62	0,64	0,73*	0,88	0,96*	0,79*
NPN		0,84**	0,84**	0,87**	0,87***	0,95*	0,84	0,88**
kreatinin		0,85**	0,84**	0,84**	0,91**	0,90	0,98*	0,92**
skupne FAA		0,86**	0,84**	0,90**	0,86**	0,94*	0,96*	0,80*
ILLEPHTY		0,91**	0,89**	0,94***	0,91**	0,95*	0,96*	0,86**
glukoza		0,41	0,41	0,40	0,52	0,90	0,63	0,54
95 °C								
izceja zorenja		0,84**	0,86**	0,85**	0,84**	0,62	0,99**	0,88**
izceja pečenja		0,84**	0,90**	0,86**	0,92**	0,97*	0,97*	0,93***
NPN		0,40	0,44	0,47	0,27	0,46	0,99*	0,30
kreatinin		0,74*	0,80*	0,76*	0,65	0,90*	0,86	0,70*
skupne FAA		0,80*	0,69	0,81*	0,68	0,83	0,90	0,68***
ILLEPHTY		0,86**	0,76*	0,87**	0,74*	0,82	0,89	0,75***
glukoza		0,54	0,67	0,53	0,65	0,63	0,98*	0,70

n – število primerjav, T<sub>s</sub> – središčna temperatura, NPN – delež neproteinskega dušika, FAA – proste aminokisljine, ILLEPHTY – vsota štirih prostih aminokisljin (ILE + LEU + PHE + TYR), \*\*\*p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilno, \*\*p ≤ 0,01 statistično visoko značilno, \*p ≤ 0,05 statistično značilno.

Vsebnost glukoze in vsebnost HCA sta v srednje močni povezavi pri vzorcih, pečenih do 70 °C (r = 0,54, p = 0,17) oziroma do 95 °C (r = 0,70, p = 0,05). Pri tem pa je potrebno poudariti, da je vsebnost glukoze močno povezana z vsebnostjo MeIQx pri vzorcih normalne kakovosti, pečenih do središčne temperature 70 °C (r = 0,90, p = 0,10) in vzorcih BMV kakovosti, pečenih do središčne temperature 95 °C (r = 0,98, p = 0,02).

Vrednosti korelacijskih koeficientov (r < 0,23) med vsebnostjo kreatina in vsebnostjo HCA kažejo, da količina kreatina nima posebnega vpliva na tvorbo HCA, zato v preglednici niso prikazani. Iz preglednice 29 so razvidne tudi srednje močne povezave med vsebnostjo HCA ter izcejo med zorenjem in pečenjem pri obeh središčnih temperaturah, povezava je močnejša pri višji središčni temperaturi.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V raziskavi smo želeli ugotoviti vpliv normalne in BMV kakovosti, vpliv stopnje proteolize oz. časa zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) in vpliv stopnje pečenosti (središčnih temperatur 70 °C in 95 °C) na nastanek HCA v dolgi hrbtni mišici prašiča.

Naša raziskava je bila zasnovana na predvidevanju:

- da bo vsebnost HCA v toplotno obdelanem prašičjem mesu BMV kakovosti drugačna kot pri mesu normalne kakovosti,
- da se bo z zorenjem prašičjega mesa povečala vsebnost vseh posameznih prostih aminokislin, in, da bo posledično med toplotno obdelavo nastalo več HCA,
- da bodo v večji količini nastali HCA pri pečenju do višje središčne temperature kot pri pečenju do nižje središčne temperature.

Eden od naših ciljev je bil tudi razviti in validirati analitično metodo za določanje glukoze oz. monosaharidov v mesu. V literaturi namreč nismo našli nobene primerne metode, ki bi omogočala kvantitativno določanje monosaharidov v tako majhnih količinah (mg oz. µg/g) kot so v mesu. Značilnosti naše metode so inovativna priprava vzorca z uporabo klasičnih in novejših metod ekstrakcije s trdno fazo – SPE ter LC-MS kvantitativna določitev v ESI+ in potrditev v ESI- načinu. Metodo smo tudi uspešno validirali in dobili dobro ponovljivost med paralelkami (za glukozo KV = 5,9 %) ter znotraj paralelke (KV = 1,4 %). Metoda je bila linearna v uporabljenem območju.

#### 5.1.1 Vpliv kakovosti na vsebnost HCA

Na podlagi delovnih hipotez, ki so bile naše raziskovalne smernice, smo najprej izbrali pet dolgih hrbtnih mišic normalne kakovosti in pet dolgih hrbtnih mišic BMV kakovosti. Kakovost mišičnine smo v mesno predelovalni industriji določili z merjenjem vrednosti pH<sub>45</sub> (merjena 45 min *post mortem*) ter s senzorično oceno barve in teksture. Pravilno izbiro dolgih hrbtnih mišic smo potrdili tako, da smo določili vrednost pH<sub>24</sub> (merjeno 24 h *post mortem*), instrumentalno izmerili barvne vrednosti L\*, a\*, b\* ter določili sposobnost za vezanje vode SpVV.

Odbrane mišice normalne kakovosti imajo v primerjavi z mišicami BMV kakovosti povprečno za desetino enote višje vrednosti pH, skoraj dvakrat večjo sposobnost vezanja vode ter nižje barvne vrednosti L\*, a\* in b\*. Vse razlike med mišicami BMV in normalne kakovosti so statistično značilne ( $p < 0,001$ ) (preglednica 16).

Mišice normalne kakovosti so imele v povprečju vrednost pH<sub>24</sub> 5,51, SpVV 7,88 %, in vrednost L\* 52,8, medtem ko so imele mišice BMV kakovosti vrednost pH<sub>24</sub> 5,41, SpVV 13,2 % in vrednost L\* 57,3. Vrednosti glavnih parametrov, ki se uporabljajo za



določanje kakovosti mesa, so primerljive z navedbami drugih avtorjev. Joo in sod. (1999) navajajo, da imajo mišice normalne kakovosti povprečno vrednost  $pH_{24}$  med 5,6 in 5,8, SpVV med 2,1 % in 4 % ter vrednost  $L^*$  med 44 in 46,5, medtem ko imajo mišice BMV kakovosti povprečno vrednost  $pH_{24}$  med 5,2 in 5,5, SpVV med 8,6 % in 11,6 % ter vrednost  $L^*$  med 51,8 in 57,1. Warriss in sod. (2006) so prav tako izbrali mišice normalne kakovosti, ki so imele v povprečju vrednost  $pH_{24}$  5,45, SpVV 10,3 %, vrednost  $L^*$  54,3 in mišice BMV kakovosti, ki so imele vrednost  $pH_{24}$  5,37, SpVV 13,0 % ter vrednost  $L^*$  61,0. Podatki, ki jih avtorji navajajo, se lahko med seboj nekoliko razlikujejo, zaradi razlike v vrsti mesa, kakovosti mesa in metodah določanja kakovosti mesa.

Nekoliko splošno lahko rečemo, da se je pri mišicah BMV kakovosti med pečenjem do središčne temperature 70 °C tvorilo v povprečju za 1,2-krat več HCA (zaradi značilno večje vsebnosti MeIQx) kot pri mišicah normalne kakovosti, medtem ko se je pri mišicah BMV kakovosti, pečenih do središčne temperature 95 °C, tvorilo v povprečju za 1,3-krat več HCA, predvsem zaradi značilno višje vsebnosti MeIQx, DiMeIQx in harmana (preglednica 26). Sklep je:

Če združimo rezultate določanja HCA in njihovih prekurzorjev, lahko zaključimo, da je verjetno večja količina nastalih HCA (predvsem MeIQx) v BMV mišicah posledica večje vsebnosti kreatinina in reducirajočih sladkorjev ne pa prostih aminokislin, saj se le-te v tej mišičnini tvorijo v manjšem obsegu kot v normalnih mišicah.

### **Vpliv kakovosti na vsebnost prostih aminokislin**

Vsebnost vseh prostih aminokislin skupaj je skozi celotno obdobje zorenja pri mišicah normalne kakovosti v primerjavi z mišicami BMV kakovosti v povprečju večja za 17 mg/100 g. Največjo razliko (21,6 mg/100 g) med kakovostma smo opazili tretji dan, najmanjšo (12,8 mg/100g) pa deseti dan. Iz rezultatov lahko sklepamo, da je pri mišicah normalne kakovosti proces proteolize obsežnejši kot pri mišicah BMV kakovosti. Hopkins in Huff-Lonergan (2004) navajata, da se v mišicah BMV kakovosti proces zorenja razvije v manjšem obsegu, saj se pri zelo hitrem znižanju vrednosti pH zorenje omeji. Naše ugotovitve še dodatno potrjujeta Toldrá in Flores (2000), ki navajata, da je aktivnost aminopeptidaz manjša v mišicah BMV in RMV kakovosti (oz. v 'vodeni' mišičnini) kot pa v mišicah normalne in TČS kakovosti, in, da se posledično v 'vodeni' mišičnini med zorenjem sproščajo proste aminokislina v manjšem obsegu.

Iz rezultatov (preglednica 21) lahko vidimo, da so v mišicah normalne kakovosti v primerjavi z BMV kakovostjo vsebnosti vseh posameznih prostih aminokislinah značilno večje (razen pri glutaminski kislini, 4-hidroksiprolinu, lizinu, metioninu, tirozinu in valinu). Podobne rezultate navajajo tudi Moya in sod. (2001), in sicer, da imajo mišice BMV kakovosti večjo vsebnost glutaminske kisline, serina (4. dan *post mortem*) in alanina (7. dan *post mortem*).

Kakovost ima prav tako statistično značilen vpliv na vsebnost nekaterih drugih aminokislin. Posplošeno lahko rečemo, da imajo mišice normalne kakovosti v primerjavi z mišicami BMV kakovosti večjo vsebnost cistationina, tavrina, anserina, karnozina in cistina (preglednica 23). Aristoy in Toldrá (1998) ter Cornet in Bousset (1999) navajajo, da vsebujejo oksidativne mišice več prostih aminokislin (še posebej glutamina, asparaginske kisline) in tavrina.

### **Vpliv kakovosti na vsebnost kreatina in kreatinina**

Vsebnost skupnega kreatina (kreatin +  $1,159 \times$  kreatinin; AOAC, 1980) ostaja pri BMV kakovosti mesa v primerjavi z normalno kakovostjo nekoliko večja (preglednica 20) skozi celotno obdobje zorenja mesa, in sicer, 1 dan *post mortem* za 1,03-krat (0,18 mg/g), 3., 6. in 10. dan pa povprečno za 1,08-krat (0,50 mg/g). Mišice BMV kakovosti vsebujejo v primerjavi z mišicami normalne kakovosti značilno več kreatina kot tudi kreatinina. Razlika v vsebnosti kreatinina se med kakovostima povečuje skozi celotno obdobje zorenja, in sicer je 1. dan: 6  $\mu$ g/g, 3. dan: 7  $\mu$ g/g, 6. dan: 12  $\mu$ g/g in 10. dan: 14  $\mu$ g/g.

Večja vsebnost tako kreatina kot kreatinina v mišicah BMV kakovosti je lahko eden od vzrokov za nekoliko večjo tvorbo HCA med toplotno obdelavo v mišicah BMV kakovosti.

### **Vpliv kakovosti na vsebnost reducirajočih sladkorjev**

Cambero in sod. (2000) navajajo, da so D-glukoza, D-fruktoza, D-riboza in v manjši količini D-manoza tisti monosaharidi, ki se običajno pojavljajo v mesu kot rezultat glikolize ali razgradnje nukleotidov. Tikk in sod. (2006) opisujejo razgradnjo ribonukleotidov med zorenjem mesa *post mortem* in navajajo, da je monosaharid riboza produkt razgradnje ribonukleotidov, in da je riboza eden izmed pomembnih reducirajočih sladkorjev v mesu. V poskusu smo potrdili, da so v prašičjih mišicah LD prisotni monosaharidi glukoza, fruktoza, manoz, riboza, arabinoza, ramnoza in disaharid maltoza ter trisaharid maltotrioza.

Na splošno lahko rečemo, da smo določili v mišicah BMV kakovosti večjo vsebnost glukoze, fruktoze, manoze, ramnoze, maltoze in maltotrioze (preglednica 24), medtem ko smo določili v mišicah normalne kakovosti nekoliko večjo vsebnost samo arabinoze in po desetih dneh zorenja tudi riboze. Glede na to, da je vsebnost riboze v mišicah normalne kakovosti povprečno za 2,3-krat večja kot v mišicah BMV kakovosti, lahko zaključimo, da je encimska razgradnja ribonukleotidov v mišicah normalne kakovosti hitrejša.

Vsebnost vseh reducirajočih sladkorjev skupaj je v mišicah BMV kakovosti v primerjavi z mišicami normalne kakovosti v povprečju večja za 1,3-krat in to ne glede na čas zorenja, in sicer je v mišicah BMV kakovosti 1. dan: 3,94 mg/g in 10. dan: 4,74 mg/g, medtem ko je v mišicah normalne kakovosti 1. dan: 3,23 mg/g in 10. dan: 3,94 mg/g.

### 5.1.2 Vpliv zorenja na vsebnost HCA

Proces zorenja smo spremljali tako, da smo po določenem obdobju zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) določili delež neproteinskega dušika (NPN) v svežem mesu, in hkrati mehčanje mesa potrdili s splošno uporabno metodo določanja strižne sile toplotno obdelanega mesa – WBSF.

Koohmaraie in Geesink (2006) navajata, da je mehkooba mesa odvisna od proteolize *post mortem* miofibrilarnih ter z njimi povezanih proteinov, in da se mehkooba mesa med procesom zorenja povečuje. To smo v naši raziskavi potrdili z merjenjem strižne sile pečenega mesa. Sila, ki je bila potrebna za strig pečenega mesa se je skozi celotno obdobje zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) zmanjševala, in to ne glede na kakovost mesa in ne glede na stopnjo pečenosti mesa (preglednica 18).

Mišice BMV kakovosti so bile v primerjavi z mišicami normalne kakovosti po pečenju do središčne temperature 70 °C za povprečno 3,4 N mehkejše. Pri pečenju do središčne temperature 95 °C pa razlike v mehkoobi niso opazne, izjema je le 1. dan *post mortem*, ko so mišice BMV kakovosti statistično značilno mehkejše v povprečju za 6,8 N. Razlike v mehkoobi so statistično značilne samo prvi dan, ne glede na središčno temperaturo pečenja. Palka (2004) navaja, da ima meso z višjo vrednostjo pH med toplotno obdelavo manjšo izgubo mase, in da je končno bolj mehko. Glede na to, da so bile mišice BMV kakovosti statistično značilno mehkejše samo 1. dan *post mortem*, sklepamo, da je bila pri mišicah BMV kakovosti fragmentacija miofibril v tem obdobju večja kot pri mišicah normalne kakovosti.

Mehkooba mesa se med toplotno obdelavo zmanjšuje. Iz rezultatov je razvidno (preglednica 18), da so mišice pečene do  $T_s = 70\text{ °C}$  v primerjavi z mišicami pečenimi do  $T_s = 95\text{ °C}$  mehkejše; in sicer, so mišice pečene do  $T_s = 70\text{ °C}$  1. dan *post mortem* mehkejše za 12,4 N, 3. dan za 8,2 N in 6. oz. 10. dan za povprečno 5,0 N. Razlika v mehkoobi se med mišicami pečenimi do  $T_s = 70\text{ °C}$  in do  $T_s = 95\text{ °C}$  s časom zorenja zmanjšuje. Devine (2004) navaja rezultate, ki naše ugotovitve potrjujejo; in sicer, da se strižna sila z višjo temperaturo toplotne obdelave mesa nelinearno povečuje zaradi neenakomerne denaturacije miofibrilarnih in vezivno-tkivnih proteinov. Med 45 °C in 60 °C se mehkooba mesa zmanjšuje zaradi agregacije denaturiranih miofibrilarnih proteinov, katero spremlja izguba tekočine in krčenje mišičnih vlaken znotraj endomizija. Mehkooba mesa se še dodatno zmanjša med 65 °C in 80 °C, zaradi denaturacije kolagena v endomiziju in perimiziju. Pri višjih temperaturah nad 80 °C in daljšem času toplotne obdelave, se zaradi večje topnosti kolagena mehkooba mesa nekoliko poveča (Devine, 2004).

Delež neproteinskega dušika izračunan glede na skupni dušik se s časom zorenja povečuje (preglednica 18). Pri mišicah normalne kakovosti smo statistično značilno povečanje s povprečno 11,7 % na 12,2 % opazili šele po šestih dneh zorenja, medtem ko smo pri mišicah BMV kakovosti statistično značilno povečanje z 11,8 % na 12,3 % opazili šele po desetih dneh zorenja. Na splošno razlika med kakovostima (0,1 %) ni statistično značilna. Povečanje neproteinskega dušika je bilo med zorenjem pričakovano, saj je splošno znano, da se med procesom proteolize sproščajo številne aminokisliline in kratki (di)peptidi, ki so med drugimi številnimi spojinami vir neproteinskega dušika. Naše ugotovitve potrjujejo

Benito in sod. (2003), ki navajajo, da se količina neproteinskega dušika *post mortem* zaradi proteolitične aktivnosti encimov poveča. Soriano-Pérez in García-Ruiz (2003) ugotavljata, da se vsebnost NPN pri daljšem času zorenja pršutov poveča na ca. 30 %. Bruas-Reignierja in Brun-Belluta (1996) trdita, da je NPN primeren indikator za proteolizo govejega mesa.

Čas zorenja ima statistično zelo visoko značilen ( $p \leq 0,001$ ) vpliv na vsebnost vseh HCA (preglednica 26). V povprečju se je v 10 dni zorenih vzorcih tvorilo 1,8- do 2,5-krat več HCA kot v nezorenih vzorcih; in sicer je v 10 dni zorenih vzorcih vsebnost PhIP in MeIQx v povprečju 2,3-krat več, vsebnost DiMeIQx 2,2-krat več, vsebnost norharmana 2,1-krat več in vsebnost harmana 1,4-krat več. Tako lahko sklenemo:

Če združimo rezultate določanja HCA in njihovih prekurzorjev, lahko zaključimo, da je večja količina HCA v zorenih mišicah v primerjavi z nezorenimi, posledica večje vsebnosti prostih aminokislin in kreatinina, ne pa reducirajočih sladkorjev, kajti glukoza je verjetno prekurzor le za tvorbo MeIQx, ne pa ostalih v raziskavi določenih HCA (preglednica 29).

Med procesom zorenja dolgih hrbtnih mišic prašičev smo prav tako spremljali, kako se spreminja vsebnost prekurzorjev HCA; in sicer smo po določenem obdobju zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) s kemijskimi in instrumentalnimi metodami določili vsebnost: kreatina, kreatinina, 21-ih prostih aminokislin, cistationina, citrulina, ornitina, tavrina, nekaterih dipeptidov (anserina, karnozina, cistina, homocistina), nekaterih prostih monosaharidov (glukoze, fruktoze, manoze, riboze, arabinoze, ramnoze), disaharida maltoze in trisaharida maltotrioze.

### **Vpliv zorenja na vsebnost prostih aminokislin**

Rezultati raziskave so potrdili pred poskusom zastavljeno hipotezo, da se bo z zorenjem prašičjega mesa povečala vsebnost posameznih aminokislin, in, da bo tako zaradi daljšega zorenja oz. večje vsebnosti prostih aminokislin, nastalo med toplotno obdelavo več HCA. Opazili smo, da je vsebnost skupnih prostih aminokislin s časom zorenja linearno naraščala (slika 21), kar nam kaže vrednost determinacijskega koeficienta ( $r^2$ ) povprečnih vrednosti, ki je med omenjenima parametroma večja od 0,97. V poskusu smo ugotovili, da se med 10-dnevnim zorenjem mišic statistično zelo visoko značilno poveča vsebnost vseh prostih aminokislin razen alanina, prolina, cistationina, ornitina, citrulina, karnozina in anserina (preglednici 21 in 23). Povečanje vsebnosti glutamina je statistično značilno ( $p < 0,05$ ). Podobno so ugotovili tudi Moya in sod. (2001), ki ugotavljajo, da se med procesom proteolize poveča vsebnost skoraj vseh aminokislin razen glutamina,  $\beta$ -alanina, tavrina, ornitina, dipeptidov karnozina in anserina, katerih vsebnost ostaja skoraj nespremenjena.

Po desetih dnevih zorenja je v mišicah približno 1,6-krat večja vsebnost skupnih prostih aminokislin (preglednica 22) v primerjavi z nezorenimi mišicami. Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami drugih avtorjev. Tako Watanabe in sod. (2004) navajajo, da se vsebnost skoraj vseh prostih aminokislin *post mortem* poveča zaradi aktivnosti mišičnih proteaz v procesu proteolize. Prav tako navaja Toldrá (2004), da se pri daljšem procesu proteolize

sprosti večja količina prostih aminokislin. Moya in sod. (2001) ugotavljajo, da je pri prašičjem mesu značilno povečanje prostih aminokislin po šestih dneh zorenja. V naši raziskavi smo prav tako statistično značilno povečanje prostih aminokislin opazili po šestem dnevu zorenja (pri mišicah BMV kakovosti) oz. že po tretjem dnevu zorenja (pri mišicah normalne kakovosti).

Iz podatkov (preglednica 21) lahko vidimo, da se v mišicah v največjem obsegu pojavljajo aminokislina, kot so glutamin, alanin, glutaminska kislina, lizin, glicin, levcin, histidin, valin in serin. Povprečna vsebnost teh prostih aminokislin je od 5 mg/100 g do 15 mg/100 g, medtem ko je vsebnost ostalih prostih aminokislin pod 5 mg/100 g. Naše ugotovitve se ujemajo z rezultati drugih avtorjev, in sicer Toldrá (2004) navaja, da so glutaminska kislina, alanin, levcin, lizin, valin in asparaginska kislina tiste proste aminokislina, ki se običajno pojavljajo v največjih količinah.

Štiri proste aminokislina (znani prekursorji za PhIP), to so ILE, LEU, PHE in TYR, se med 10-dnevnim zorenjem sproščajo v še večjem obsegu kot proste aminokislina (preglednica 22), in sicer je njihova vsota (ILLEPHTY) skoraj 2-krat večja v zorenih mišicah v primerjavi z nezorenimi.

Ugotovili smo tudi, da se vsebnost tavrina in dipeptida cistina med 10-dnevnim zorenjem statistično značilno ( $p \leq 0,0001$ ) poveča, medtem ko na vsebnost dipeptida karnozina in anserina zorenje nima statistično značilnega vpliva. Naše ugotovitve potrjujejo Bauchart in sod. (2006), ki navajajo, da ostaja količina karnozina in anserina med zorenjem mesa relativno konstantna, ker v skeletnih mišicah ni encima (aminoacilhistidin-dipeptidaze, EC 3.4.13.3), ki bi kataliziral razgradnjo CAR in ANS.

### **Vpliv zorenja na vsebnost kreatina in kreatinina**

Vsebnost kreatina in kreatinina je v presnih mišicah statistično značilno odvisna od časa zorenja. Vsebnost kreatina se s časom zorenja značilno zmanjša, medtem ko se vsebnost kreatinina značilno poveča (preglednica 20). V nezorenih mišicah normalne kakovosti je vsebnost kreatina 6,23 mg/g in vsebnost kreatinina 0,093 mg/g, po desetih dneh zorenja pa je vsebnost kreatina 5,88 mg/g in vsebnost kreatinina 0,113 mg/g. Snow in Murphy (2001) pojasnjujeta ta pojav z dejstvom, da se mišični kreatin in kreatin fosfat počasi, ireverzibilno, neencimsko pretvarjata v ciklično obliko kreatinin, tako da se odcepi voda, pri kreatin fosfatu pa še anorganski fosfat. Ta fenomen pretvorbe kreatina z neencimsko ciklizacijo v kreatinin, je opazil že Dvorak (1981).

Skupni kreatin (kreatin +  $1,159 \times$  kreatinin; AOAC, 1980) se med zorenjem le malo spremeni. Trend zmernega zmanjšanja vsebnosti skupnega kreatina bi lahko povezali s trditvami, ki jih navajata Snow in Murphy (2001), da se manjši del kreatinina lahko pretvori v druge spojine, kot sta arginin in gvanidinobutirat.

Med razmerjem kreatin/kreatinin in časom zorenja smo izračunali Pearsonov korelacijski koeficient ( $r = -0,90$ ,  $p < 0,001$ ), ki je pokazal močno povezanost (preglednica 29). Iz

navedenega lahko zaključimo, da se razmerje med kreatinom in kreatininom lahko uporabi za določanje stopnje zorenja mesa prašičev. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Polak in sod. (2007), ki so prav tako določili srednje močno povezanost ( $r = -0,61$ ) med razmerjem kreatin/kreatinin in časom zorenja govejega mesa.

### **Vpliv zorenja na vsebnost reducirajočih sladkorjev**

Čas zorenja ima statistično značilen vpliv na vse v raziskavi določene reducirajoče sladkorje, in sicer se med 10-dnevnim zorenjem vsebnost vseh monosaharidov poveča, medtem ko se vsebnost disaharida maltoze in trisaharida maltotrioze zmanjša (preglednica 24). Povprečna vsebnost vseh monosaharidov skupaj (glukoze, fruktoze, manoze, riboze, arabinoze in ramnoze) je v mišicah normalne kakovosti 1. dan 3,1 mg/g in 10. dan 3,89 mg/g, medtem ko je v mišicah BMV kakovosti 1. dan 3,58 mg/g in 10. dan 4,67 mg/g. Povprečna vrednost vsote disaharida maltoze in trisaharida maltotrioze je v mišicah normalne kakovosti 1. dan 0,134 mg/g in 10. dan 0,047 mg/g, medtem ko je v mišicah BMV kakovosti 1. dan 0,360 mg/g in 10. dan 0,075 mg/g. Naše ugotovitve potrjujejo Maribo in sod. (1999), ki navajajo, da se vsebnosti monosaharida glukoze in laktata *post mortem* povečata, medtem ko se vsebnost polisaharida glikogena zmanjša.

Prosta glukoza je tisti monosaharid, ki se pojavlja v mišicah prašiča v največjem obsegu, in sicer se med 10-dnevnim zorenjem njena vsebnost pri mišicah BMV kakovosti statistično značilno poveča za 0,74 mg/g, medtem ko se pri mišicah normalne kakovosti statistično neznačilno poveča za 0,53 mg/g. Tudi drugi avtorji (Koutsidis in sod, 2003; Tikik in sod., 2006) opažajo, da se vsebnost nekaterih monosaharidov (glukoza, riboza) med zorenjem mesa povečuje.

### **5.1.3 Vpliv toplotne obdelave na vsebnost HCA**

Po določenem obdobju zorenja (1, 3, 6 in 10 dni) smo zrezke dolge hrbtne mišice toplotno obdelali do dveh središčnih temperatur (70 °C in 95 °C) in nato v zapečeni skorji določili PhIP, harman, norharman, DiMeIQx in MeIQx. Olsson in sod. (2005) so prav tako kot mi v toplotno obdelanih mišicah določili PhIP, harman, norharman in MeIQx, medtem ko so IQx določili samo v vzorcih prašičev, ki so vsebovali mutiran gen RN<sup>-</sup>. V naših vzorcih je bila vsebnost HCA v območju med 0,04 ng/g (DiMeIQx) in 9,1 ng/g (MeIQx). V povprečju se je tvorilo največ MeIQx (2,45 ng/g) in PhIP (1,84 ng/g), manj pa DiMeIQx (0,58 ng/g), norharmana (0,34 ng/g) in harmana (0,13 ng/g). Warzecha in sod. (2004) prav tako navajajo, da se med toplotno obdelavo mesa tvorijo PhIP, MeIQx in 4,8-DiMeIQx v relativno največji količini. Busquets in sod. (2004) še dodatno potrjujejo, da so MeIQx, PhIP, 4,8-DiMeIQx, norharman, harman, DMIP, Trp-P-1, AαC in MeAαC najbolj pogosto določeni HCA v toplotno obdelanem mesu.

V prašičjih mišicah, ki smo jih pekli pri temperaturi 220 °C do  $T_s = 70$  °C in  $T_s = 95$  °C, nismo dokazali nepolarnih HCA, razen β-karbolinov (harman in norharman); kar smo

pričakovali, saj se po navedbah drugih avtorjev (Sugimura in Adamson, 2000; Toribio in sod., 2000; Murkovic, 2004) nepolarni HCA tvorijo v reakcijah radikalov s pirolizo aminokislin in proteinov pri temperaturah nad 300 °C, nasprotno pa se harman in norharman tvorita že pri nižjih temperaturah.

Številni avtorji (Felton in sod., 2000; Skog in sod., 2003; Vitaglione in Fogliano, 2004; Oz in sod., 2006) navajajo, da so za tvorbo HCA poleg kemijske sestave mesa (prisotnost prekursorjev itd.) najbolj pomembni način in pogoji toplotne obdelave mesa, in sicer sta temperatura in čas toplotne obdelave tista parametra, ki vodita tvorbo HCA med postopkom toplotne obdelave. Murkovic in sod. (1998) navajajo, da je tvorba HCA pri temperaturi pod 140 °C sorazmerno majhna in da se mutagena aktivnost mesa zelo poveča, če meso pečemo pri temperaturi 200 °C do 250 °C oz. nad 300 °C. Avtorji (Augustsson in sod., 1997; Olsson in sod., 2005) navajajo, da se vsebnosti MeIQ<sub>x</sub> in PhIP povečata za okrog 20-krat, če temperaturo pečenja povečamo s 160 °C na 225 °C, in sicer se vsebnost HCA poveča s povprečno 0,18 ng/g na 4,13 ng/g.

Zaradi že temeljito preučenega vpliva temperature toplotne obdelave na tvorbo HCA, smo v našem poskusu z vidika toplotne obdelave preučili samo vpliv časa pečenja oz. vpliv dveh središčnih temperatur, ki se v gastronomiji običajno uporabljata, na tvorbo (vsebnost) HCA. Glede na rezultate in navedbe številnih avtorjev smo pričakovali, da bodo vzorci, ki smo jih pekli dlje časa vsebovali tudi več HCA.

Središčna temperatura pečenja ima v vseh obdobjih zorenja statistično značilen vpliv na vsebnost vseh v raziskavi določenih HCA. Vsebnost HCA je v vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C statistično značilno večja (preglednici 26 in 27) kot v vzorcih pečenih do središčne temperature 70 °C; in sicer se v vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C v povprečju tvori za 2,8- do 4,3-krat več HCA. Ugotovitev velja za obe kakovosti, ne glede na čas zorenja. Večja vsebnost HCA v vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C je posledica daljšega časa pečenja in večje izceje mesnega soka. Daljši čas pečenja omogoča večjo izcejo iz mesa na površino mesa in s tem tudi večji obseg prenosa v vodi topnih prekursorjev (prostih aminokislin, reducirajočih sladkorjev in kreatina/kreatinina) HCA na površino mesa. Skog in sod. (2003) prav tako navajajo, da je pri večji izgubi mase med toplotno obdelavo, večja tudi mutagena aktivnost vzorca.

Pri daljšem kontaktu mesa z grelno površino (220 °C) se v zunanjem delu mesa vsebnost vode zmanjša in posledično površina mesa (skorja) segreje na višjo temperaturo (do 220 °C). Znano je, da se pri višji temperaturi in daljšem času pečenja tvori tudi več HCA. Pegg in Shahidi (2004) navajata, da se več produktov Maillardove reakcije lahko tvori na površini pečenega mesa, kjer je manjša vsebnost vode, čeprav se lahko v manjšem obsegu tvorijo tudi v vodnih raztopinah. Skog in sod. (2003) prav tako menijo, da se med pečenjem na površini mesa izparevanje vode s časom pečenja zmanjša, ter da se zaradi manjše vsebnosti vode poveča nastanek skorje in tvorba mutagenih spojin.

Prav tako se lahko pri višji temperaturi tvori več HCA zaradi večje pretvorbe kreatina v kreatinin, saj Cambero in sod. (2000) in Tikik in sod. (2006) navajajo dejstva, da toplotna obdelava mesa poveča količino ATP metabolitov, in sicer višja temperatura toplotne obdelave poveča vsebnost kreatinina, AMP, IMP, inozina, hipoksantina in riboze. Ta pojav

še dodatno pojasnjujejo Braun in sod. (2003) in Campo in sod. (1998), ki navajajo, da se vsebnost kreatina v kislem mediju med toplotno obdelavo zmanjša, medtem ko se vsebnost kreatinina poveča, in sicer se pretvori okrog 20 do 65 % kreatina v kreatinin.

Brands in sod. (2000) navajajo, da se med toplotno obdelavo (120 °C) značilna količina glukoze (aldoza) preoblikuje po Lobrey de Bruyn Alberda van Ekenstein preureditvi v njeno keto obliko (fruktozo). To kaže, da se glukoza vključuje v Maillardovo reakcijo tudi preko fruktoze, ki pa po navedbah nekaterih avtorjev (Skog in Jägerstad, 1990; Brands in sod., 2000; Wyss in Kaddurah-Daouk, 2000) kaže večji potencial za tvorbo HCA, saj so ketoze bolj reaktivne v Maillardovi reakciji kot aldoze.

Zorenje in središčna temperatura toplotne obdelave mesa prašičev soodvisno vplivata na vsebnost HCA (preglednica 26). Pri višji središčni temperaturi (95 °C) in daljšem času zorenja (10 dni) se tvori največ HCA (povprečno 10,96 ng/g), medtem ko se pri nižji središčni temperaturi (70 °C) in v nezorenih vzorcih tvori najmanj HCA (povprečno 1,54 ng/g).

V vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C se glede na vzorce pečene do središčne temperature 70 °C v povprečju tvori 1. dan 3,4-krat več HCA, 3. dan 4,2-krat več, 6. dan 4,3-krat več in 10. dan 2,8-krat več HCA (preglednica 26). Iz rezultatov lahko vidimo, da je pri višji središčni temperaturi (95 °C) v povprečju 4,2-krat večja vsebnost DiMeIQx, 4,1-krat večja vsebnost PhIP, 3,9-krat večja vsebnost MeIQx, 2,7-krat večja vsebnost norharmana in 1,9-krat večja vsebnost harmana. Podatki nam kažejo, da ima daljši čas pečenja večji vpliv na tvorbo DiMeIQx, PhIP in MeIQx kot na tvorbo norharmana in harmana. Da ima temperatura toplotne obdelave manjši vpliv na tvorbo harmana in norharmana kot pa na tvorbo drugih mutagenih HCA, ugotavljajo tudi Olsson in sod. (2005).

### **Vpliv časa pečenja in izceje med pečenjem na tvorbo HCA**

Vzorce pečene do središčne temperature 95 °C smo pekli (povprečno 543 s) dalj časa od vzorcev pečenih do nižje središčne temperature 70 °C (povprečno 340 s) (preglednica 28). Daljši čas pečenja posledično pomeni, da meso odda več mesnega soka. Zato je pri vzorcih pečenih do središčne temperature 95 °C tudi za 11,2 % večja izceja; in sicer je izceja pri teh vzorcih v povprečju 36-odstotna ter pri vzorcih pečenih krajši čas (središčna temperatura 70 °C) v povprečju 24,7-odstotna. Vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $r = 0,90$ ,  $p < 0,001$ ) nam kaže, da je med časom pečenja in izcejo pečenja močna povezanost. Palka (2004) pojasnjuje ta pojav tako, da se vsebnost vode med toplotno obdelavo zniža zaradi evaporacije in izceje. Ko se središčna temperatura mesa povečuje, se zaradi denaturacije mišičnih proteinov (predvsem miozina) SpVV zmanjšuje in s tem izceja povečuje.

Vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $r = 0,79$ ,  $p = 0,02$ ) med izcejo pečenja in vsebnostjo HCA kaže pri nižji stopnji pečenosti (70 °C) srednje močno in pozitivno povezanost, medtem ko kaže pri višji stopnji pečenosti (95 °C) močno in pozitivno



povezanost ( $r = 0,93$ ,  $p = 0,0008$ ). Iz navedenega lahko sklepamo, da večja količina izceje poveča količino prekursorjev HCA na površini mesa, in tako omogoči večji obseg tvorbe izvrednotenih HCA (preglednica 29).

V raziskavi smo ugotovili, da imajo mišice BMV kakovosti v primerjavi z mišicami normalne kakovosti večjo izcejo že pri odvzemu vzorcev, hlajenju, zorenju ter tudi med toplotno obdelavo. In sicer imajo mišice BMV kakovosti med zorenjem v povprečju 3,8 % izceje, med toplotno obdelavo do središčnih temperatur 70 °C in 95 °C pa 25,7 % oz. 36,9 %, medtem ko imajo mišice normalne kakovosti med zorenjem v povprečju samo 2,3 % izceje, med toplotno obdelavo pa 23,7 % oz. 35,0 % (preglednici 18 in 28). Vrednosti korelacijskih koeficientov med izcejo zorenja in pečenja ter vsebnostjo HCA kažejo srednje močno oz. močno povezanost ( $0,79 \leq r \leq 0,93$ ), zato izceja med zorenjem ni zanemarljiva. Mišice BMV kakovosti kažejo v primerjavi z mišicami normalne kakovosti pri središčni temperaturi 70 °C oz. 95 °C v povprečju za 3,4 % oz. 4,1 % večjo izcejo.

Naši rezultati se ujemajo z navedbami drugih avtorjev (Honikel, 2004; Keeton in Eddy, 2004), ki navajajo, da imajo mišice BMV kakovosti slabšo SpVV, in da *post mortem* izgubijo več mesnega soka kot mišice normalne kakovosti, zato ker se pri mišicah BMV kakovosti propustnost celičnih membran bolj poveča kot pri mišicah normalne kakovosti. Palka (2004) in Rosenvold in sod. (2004) navajata, da ima meso z višjo vrednostjo pH med toplotno obdelavo manjšo izgubo mase, medtem ko ima meso z nižjo vrednostjo pH, večjo izgubo mase. Skog in sod. (2003) pa navajajo, da izguba mase med toplotno obdelavo mesa vpliva na mutageno aktivnost, in sicer večja kot je izguba mase, večja je mutagena aktivnost.

Povzamemo lahko, da središčna temperatura pečenja vpliva na vsebnost HCA. V vzorcih pečenih do  $T_s = 95$  °C se oblikuje 3- do 4-krat več HCA kot pri pečenih do  $T_s = 70$  °C. Menimo, da je to posledica večje izceje med pečenjem oz. prenosa prekursorjev HCA iz notranjosti na površino zrezka ter večje pretvorbe kreatina v kreatinin pri višjih temperaturah, s čemer se omogoči večji obseg tvorbe HCA.

#### 5.1.4 Vpliv prekursorjev na vsebnost HCA

Vrednosti korelacijskih koeficientov v preglednici 29 kažejo, da ima količina prekursorjev kreatinina in prostih aminokislin večji vpliv na tvorbo HCA pri nižji središčni temperaturi (70 °C), medtem ko ima količina glukoze večji vpliv na tvorbo HCA pri višji središčni temperaturi (95 °C).

Vrednosti korelacijskih koeficientov ( $r < 0,23$ ) med vsebnostjo kreatina in vsebnostjo HCA kažejo, da količina kreatina nima posebnega vpliva na tvorbo HCA, medtem ko ima kreatinin pomemben vpliv, saj so vrednosti korelacijskih koeficientov med vsebnostjo kreatinina in vsebnostjo HCA med 0,65 in 0,98. Wyss in Kaddurah-Daouk (2000) potrjujeta naše ugotovitve, da je kreatinin in ne kreatin potencialni prekursor za tvorbo aminoimidazo-azaarenov. Skog in Jägerstad (1990) ta fenomen še dodatno pojasnjujeta, in sicer, da kreatinin v modelnem sistemu kaže večjo mutagenost kot kreatin.

Ugotovili smo, da ima glukoza manjši vpliv na tvorbo PhIP, saj je vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta med vsebnostjo glukoze in vsebnostjo PhIP 0,41 (pri  $T_s = 70\text{ °C}$ ) oz. 0,54 (pri  $T_s = 95\text{ °C}$ ). Murkovic (2004) navaja, da glukoza ni potrebna za tvorbo PhIP, saj lahko odvisno od vsebnosti zavira ali pa pospešuje nastanek PhIP.

### **Zaključne ugotovitve**

Rezultati naše raziskave so potrdili domneve o vplivu kakovosti mesa, zorenja mesa in stopnje pečenosti na tvorbo HCA med pečenjem mesa prašičev. Ugotovili smo, da je vsebnost HCA odvisna od časa zorenja in od središčne temperature toplotne obdelave (pečenja). Vpliv kakovosti mišičnine pa je prepoznaven le pri mišicah LD, pečenih do višje središčne temperature ( $T_s = 95\text{ °C}$ ). Na splošno lahko rečemo, da se v mišicah, ki so zorene daljši čas in pečene do višje središčne temperature tvori več HCA, in tudi, da se pri BMV kakovosti mesa v primerjavi z normalno kakovostjo mesa predvsem pri višjih stopnjah pečenosti tvori večja količina HCA.

Mišice BMV kakovosti imajo: (1) v povprečju za 1,4 % večjo izcejo med zorenjem in 0,9 % manjšo izcejo med toplotno obdelavo, (2) v povprečju za 1,3-krat večjo vsebnost glukoze in (3) v povprečju za 1,1-krat večjo vsebnost tako kreatinina kot kreatina. Te ugotovitve so lahko vzrok za to, da se pri vzorcih BMV kakovosti (ne glede na zorenje in stopnjo pečenosti) tvori v povprečju za 1,3-krat več HCA kot pri vzorcih normalne kakovosti.

Ugotovili smo, da se največja vsebnost skupnih HCA (povprečno 12,8 ng/g) tvori v mišicah BMV kakovosti, zorenih 10 dni in pečenih do središčne temperature 95 °C. Najmanjša vsebnost skupnih HCA (povprečno 1,35 ng/g) pa se tvori v nezorenih mišicah normalne, pečenih do središčne temperature 70 °C.

Iz naših ugotovitev lahko zaključimo, da je z zdravstvenega vidika oz. vidika vsebnosti mutagenih in karcinogenih HCA, najprimernejša toplotna obdelava prašičjega mesa normalne kakovosti zorenega do tri dni ali nezorenega mesa BMV kakovosti, in sicer do nižje središčne temperature 70 °C, pri kateri se skupaj tvori do 1,94 ng/g HCA.

Ugotovili smo, da ima 10-dnevno zorenje mesa manjši vpliv na vsebnost HCA po pečenju kot pa stopnja pečenosti. Porabnikom, ki želijo povečati okusnost in mehkobo pečenega prašičjega mesa svetujemo, da za pečenje uporabijo temperaturo žara, ki ni višja od 220 °C (med 150 °C in 200 °C), da meso ne pečejo do središčne temperature 95 °C, ampak da pustijo mišice prašiča zoreti tri do največ pet dni pri temperaturi 2 °C in nato meso pečejo do središčne temperature 70 °C, t.j. temperature pri kateri nastane manj HCA, in ki še zagotavlja mikrobiološko varnost.

Dobljeni rezultati pomenijo originalen in pomemben prispevek k znanosti o mesu, še posebej z vidika varne prehrane.

## 6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo:

- Osnovna kemijska sestava nezrele dolge hrbtne mišice prašiča (1. dan *post mortem*) je naslednja: 74,7 % vode, 1,61 % intramuskularne maščobe, 22,8 % beljakovin in 1,16 % skupnih mineralnih snovi.
- Mišice normalne kakovosti imajo v primerjavi z mišicami BMV kakovosti za desetino enote višje vrednosti pH, skoraj dvakrat večjo sposobnost vezanja vode ter nižje barvne vrednosti  $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$ ; vse razlike so statistično značilne ( $p \leq 0,001$ ).
- Delež neproteinskega dušika se v primerjavi s prvim dnevom *post mortem* statistično značilno poveča pri mišicah normalne kakovosti po šestem dnevu, medtem ko se pri mišicah BMV kakovosti šele po desetih dneh zorenja.
- Strižna sila pečenega mesa (WBSF) se s časom zorenja značilno ( $p < 0,001$ ) zmanjšuje. Mišice pečene do  $T_s = 70 \text{ }^\circ\text{C}$  so mehkejše (nižje vrednosti WBSF) v primerjavi z mišicami pečenimi do  $T_s = 95 \text{ }^\circ\text{C}$ ; razlike med stopnjama pečenosti se s časom zorenja zmanjšujejo.
- Vsebnosti kreatina in kreatinina v presnih mišicah prašiča sta odvisni od časa zorenja mišice; vsebnost kreatina se s časom zorenja značilno zmanjša, kreatinina pa značilno poveča; pri BMV mišicah zmanjšanje kreatina ni statistično značilno.
- Prvi smo določili, da je vsebnost kreatina in kreatinina na splošno večja v mišicah BMV kakovosti v primerjavi z mišicami normalne kakovosti.
- Vsebnost skupnih prostih aminokislin se med 10-dnevnim zorenjem mišic normalne in BMV kakovosti linearno povečuje.
- Vsebnost posameznih prostih aminokislin v prašičjih mišicah se v desetih dnevih zorenja poveča za približno 1,6-krat, izjema so aminokislina alanin in prolin, ornitin, citrulin in cistationin ter dipeptida karnozin in anserin.
- V mišicah normalne kakovosti je v primerjavi z mišicami BMV kakovosti vsebnost vseh posameznih prostih aminokislin večja, izjema so glutaminska kislina, 4-hidroksiprolin, lizin, metionin, tirozin in valin.
- Med 10-dnevnim zorenjem mišic dveh kakovosti se vsebnost monosaharidov (glukoze, fruktoze, manoze, riboze, arabinoze in ramnoze) poveča, medtem ko se vsebnost disaharida maltoze in trisaharida maltotrioze zmanjša. Vsebnost glukoze se v mišicah normalne kakovosti s časom zorenja neznačilno poveča, medtem ko je v mišicah BMV kakovosti povečanje značilno. LC/MS metodo za določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev v mesu smo sami razvili in validirali.

- Prvi smo določili, da je vsebnost reducirajočih sladkorjev na splošno večja v mišicah BMV kakovosti v primerjavi z mišicami normalne kakovosti.
- V skorji pečenih dolgih hrbtnih mišic prašiča smo določili naslednje HCA: MeIQx, PhIP, DiMeIQx, norharman in harman.
- Prvi smo določili, da se je pri mišicah BMV kakovosti oblikovalo povprečno za 22 % več HCA kot pri mišicah normalne kakovosti. Razlike so za vse HCA statistično značilne pri višji središčni temperaturi, pri nižji pa samo za MeIQx.
- Povprečno se je v 10 dni zorenih vzorcih tvorilo 1,8- do 2,5-krat več HCA kot v nezorenih vzorcih.
- Končna središčna temperatura pečenja vpliva na vsebnost HCA: v pečenih vzorcih do  $T_s = 95\text{ °C}$  se oblikuje 3- do 4-krat več HCA kot pri pečenih do  $T_s = 70\text{ °C}$ .
- Vsebnosti prekurzorjev, kreatinina in prostih aminokislin, so v močni povezavi z vsebnostjo skupnih HCA pri obeh središčnih temperaturah, medtem ko je vsebnost glukoze v srednje močni povezavi s tvorbo HCA pri višji središčni temperaturi, močnejša je le povezava med vsebnostjo glukoze in MeIQx.
- Z zdravstvenega vidika je najprimernejša toplotna obdelava prašičjega mesa normalne kakovosti do tretjega dne po zakolu ali mesa BMV kakovosti prvi dan po zakolu, obdelanega do središčne temperature  $70\text{ °C}$ , pri kateri se skupaj tvori najmanj HCA. Največ HCA se oblikuje pri pečenju prašičjih mišic BMV kakovosti, zorenih 10 dni in termično obdelanih do  $T_s = 95\text{ °C}$ .

Ugotovitev, da kakovost mišičnine v povezavi s proteolizo in stopnjo pečenosti mesa prašičev vpliva na nastanek HCA, je na področju raziskav karcinogenih komponent v živilih originalna. Delo je tudi pomemben prispevek na področju analitike določanja vsebnosti reducirajočih sladkorjev v mesu.

## 7 POVZETEK

Raziskovalci so ugotovili, da se prokarcinogene spojine heterociklični aromatski amini (HCA) tvorijo med suhimi postopki (pečenje, praženje in cvrenje) toplotne obdelave mesa, rib in njihovih izdelkov iz aminokislin, reducirajočih sladkorjev in kreatinina oz. kreatina. HCA so spojine z visokim mutagenim in karcinogenim potencialom, saj lahko poškodujejo DNA in povzročijo nastanek raka na različnih organih tako pri živalih kot pri ljudeh, zato je raziskovanje in poznavanje tovrstne problematike HCA nujno.

V raziskavi smo želeli ugotoviti vpliv kakovosti, časa zorenja prašičjega mesa in stopnje pečenosti do dveh središčnih temperatur ( $T_s$ ) na tvorbo mutagenih in karcinogenih heterocikličnih aromatskih aminov (HCA) v dolgi hrbtni mišici (*m. longissimus dorsi*) prašiča. Z nalogo smo želeli proučiti del še neraziskanega področja HCA, in sicer vpliv kakovosti mišičnine in proteolize prašičjega mesa, ter tako prispevati k večjemu poznavanju problematike HCA. Raziskovalno delo je temeljilo na treh glavnih hipotezah, in sicer: (1) da bo vsebnost HCA različna pri mišicah normalne in BMV kakovosti, (2) da se bo med zorenjem v mišicah povečala vsebnost posameznih prostih aminokislin, in da bo posledično med pečenjem nastalo več HCA, ter (3) da se bo pri mišicah pečenih do  $T_s = 95\text{ °C}$  tvorilo več HCA kot pri mišicah pečenih do  $T_s = 70\text{ °C}$ .

Poskus smo opravili na mišicah desetih slovenskih pasemskih križancev (Švedska landrace  $\times$  Large white  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire) dveh kakovosti, normalne in BMV; kakovost mišičnine smo določili z analizo vrednosti pH, sposobnosti za vezanje vode in barve ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Mišice smo razdelili na štiri dele, jih vakuumsko embalirali in zoreli 1 (nezoren), 3, 6 in 10 dni pri temperaturi ( $2 \pm 1$ ) °C. Meso smo pekli v dvoploščnem žaru pri temperaturi 220 °C do dveh  $T_s$  (nižje 70 °C in višje 95 °C). Osnovno kemijsko sestavo, vsebnost prekurzorjev HCA (kreatina, kreatinina, prostih aminokislin in reducirajočih sladkorjev) in indikatorjev zorenja, kot so izceja, vrednost pH in vsebnost neproteinskega dušika, smo določili na presnih, Warner-Bratzlerjevo strižno silo pa na pečenih vzorcih. HCA smo iz homogenata zgornje in spodnje skorje (debeline 2 mm) pečenega zrezka ekstrahirali in očistili s trdno fazo (SPE) ter jih določili z LC-MS. Osnovno kemijsko sestavo (vsebnost vode, beljakovin, skupnih mineralnih snovi in intramuskularnih maščob) smo določili z metodami, ki jih predpisuje AOAC. Vsebnost neproteinskega dušika smo določili po Kjeldahlovi metodi, ki jo opisujejo Paulsen in sod. (2006) ter Soriano in sod. (2006), kreatin in kreatinin s spektrofotometrično metodo po Campo in sod. (1995), Campo in sod. (1998) in Polaku in sod. (2007), proste aminokislino, reducirajoče sladkorje in HCA pa smo ekstrahirali in očistili s trdno fazo (SPE), jih ločili in njihovo vsebnost določili z LC-MS. Razvili in validirali smo analitično metodo za določanje glukoze oz. reducirajočih sladkorjev v mesu. Značilnosti te metode so inovativna priprava vzorca z uporabo klasičnih in novejših ekstrakcij s trdno fazo ter LC-MS kvantifikacija v ESI+ in potrditev v ESI- načinu. Rezultate analiz smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS.

Odbrane dolge hrbtne mišice normalne kakovosti so imele 24 ur *post mortem* v primerjavi z mišicami BMV kakovosti v povprečju za desetino enote višje vrednosti pH (5,51 vs. 5,41), skoraj dvakrat večjo sposobnost vezanja vode (7,88 % vs. 13,2 %) ter nižje barvne vrednosti  $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$  ( $L^*$ : 52,8 vs. 57,3), razlike so statistično značilne ( $p < 0,001$ ).

Osnovna kemijska sestava nezorene (1. dan *post mortem*) dolge hrbtne mišice je bila naslednja: 74,7 % vode, 1,61 % intramuskularne maščobe, 22,8 % beljakovin in 1,16 % skupnih mineralnih snovi. Zorenje mesa statistično značilno ( $p \leq 0,05$ ) vpliva na vse merjene pokazatelje zorenja in kakovosti mišičnine kot tudi vsebnost prekurzorjev HCA. Delež neproteinskega dušika se v primerjavi s prvim dnem *post mortem* statistično značilno poveča pri mišicah normalne kakovosti po šestem dnevu, medtem ko se pri mišicah BMV kakovosti šele po desetih dneh zorenja. Strižna sila pečenega mesa (WBSF) se s časom zorenja zmanjšuje. Mišice pečene do  $T_s = 70$  °C so mehkejše (nižje vrednosti WBSF) v primerjavi z mišicami pečenimi do  $T_s = 95$  °C; razlike med stopnjama pečenosti se s časom zorenja zmanjšujejo. Vsebnosti kreatina in kreatinina v presnih mišicah prašiča sta odvisni od časa zorenja mišice; vsebnost kreatina se s časom zorenja značilno zmanjša, kreatinina pa značilno poveča (1. dan: 6,23/0,07 mg/g vs. 10. dan: 5,88/0,11 mg/g); pri BMV mišicah zmanjšanje kreatina ni statistično značilno. Vsebnost skupnih prostih aminokislin se med 10-dnevnim zorenjem mišic normalne in BMV kakovosti linearno poveča ( $r^2 = 0,975$  vs.  $r^2 = 0,999$ ) za približno 1,6-krat, izjema so aminokislina alanin in prolin, ornitin, citrulin in cistationin ter dipeptida karnozin in anserin. V mišicah normalne kakovosti je v primerjavi z mišicami BMV kakovosti vsebnost vseh posameznih prostih aminokislin večja, izjema so glutaminska kislina, 4-hidroksiprolin, lizin, metionin, tirozin in valin. Vsebnost vseh monosaharidov (vključno z glukozo) se s časom zorenja povečuje, in sicer je povečanje v mišicah normalne kakovosti neznačilno (1. dan: 3,10 mg/g vs. 10. dan: 3,89 mg/g), pri mišicah BMV kakovosti pa značilno (1. dan: 3,58 mg/g vs. 10. dan: 4,67 mg/g). Vsebnost proste glukoze je na splošno večja v mišicah BMV kakovosti v primerjavi z mišicami normalne kakovosti (2,76 mg/g vs. 2,29 mg/g).

V skorji pečenih zrezkov smo določili naslednje HCA: MeIQx, PhIP, DiMeIQx, harman in norharman. Rezultati raziskave so potrdili vse tri pred poskusom postavljene hipoteze. Vsebnost HCA se z zorenjem poveča za 2- do 2,5-krat (nezoreno meso normalne kakovosti vsebuje 1,35 ng/g, po treh 1,38 ng/g, po šestih 1,77 ng/g in po desetih dneh 3,49 ng/g), hkrati pa je soodvisna od središčne temperature. Povprečno se v vzorcih pečenih do  $T_s = 95$  °C tvori do 4-krat več HCA kot v vzorcih pečenih do  $T_s = 70$  °C (8,34 ng/g vs. 2,36 ng/g). Pri  $T_s = 70$  °C v vsebnosti HCA nismo ugotovili značilnih razlik med kakovostima, izjema je le vsebnost MeIQx. Mišice BMV kakovosti, pečene do  $T_s = 95$  °C, vsebujejo povprečno 22 % več HCA v primerjavi z mišicami normalne kakovosti.

Vsebnost prekurzorjev, kreatinina in prostih aminokislin je v močni povezavi s količino vseh določenih HCA pri obeh središčnih temperaturah ( $0,68 < r < 0,98$ ), medtem ko je vsebnost glukoze v srednje močni povezavi s tvorbo HCA pri višji središčni temperaturi ( $r < 0,70$ ), močnejša je le povezava med vsebnostjo glukoze in MeIQx ( $r = 0,98^*$ ).

Z zdravstvenega vidika je najprimernejše uživanje mesa prašičev normalne kakovosti do tretjega dne po zakolu ali nezorenega mesa BMV kakovosti, pečenega do središčne temperature 70 °C, pri kateri se tvori do 1,94 ng/g HCA.

## 7.1 SUMMARY

Researchers have found that during dry heat cooking methods (grilling, roasting and frying) of meat, fish and their products, carcinogenic compounds heterocyclic aromatic amines (HCAs) are formed from creatine, creatinine, certain free amino acids and sugars. Thorough understanding and research of the problem is necessary since HCAs are highly mutagenic and carcinogenic compounds which can cause DNA damage and induce development of various types of cancer in human and animal species.

The purpose of this research was to study the influence of meat quality, ageing time and internal temperature ( $T_i$ ) on HCAs formation in grilled pork *Longissimus dorsi* (LD) muscles. The aim of this work was to study a part of yet uninvestigated area of HCAs (i.e. muscle quality and proteolysis of pork) and contribute to a greater understanding of it. Basic hypothesis of this study was: (1) that the content of HCAs in muscles of normal quality would be different from muscles of PSE quality, (2) that during prolonged ageing the content of all free amino acids would increase except glutamine, alanine, ornithine, carnosine and anserine, and that due to increased content of free amino acids more HCAs would form during grilling, (3) that the contents of HCAs would be elevated in samples grilled to a higher internal temperature ( $95^\circ\text{C}$ ) than in samples grilled to a lower internal temperature ( $70^\circ\text{C}$ ).

Muscles of two qualities (normal and PSE) originated from ten commercially slaughtered crossbreed (Swedish Landrace  $\times$  Large White  $\times$  Duroc  $\times$  Hampshire) barrows; meat quality was determined by pH values, water holding capacity and colour ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  values). The muscles were cut to four pieces, vacuum packed and aged for 1 (nonaged), 3, 6 and 10 days at temperature of  $(2 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Meat was grilled (two plated grill, temperature of  $220^\circ\text{C}$ ) to two different  $T_i$  ( $70^\circ\text{C}$  and  $95^\circ\text{C}$ ). Basic chemical composition, content of HCAs precursors (creatine, creatinine, free amino acids and sugars), ageing indicators, such as drip loss, instrumentally measured colour values, pH values, non-protein nitrogen (NPN) on raw and Warner-Bratzler Shear Force on grilled pork muscles were analysed. Content of HCAs was from a homogenate of upper and lower surface slices (thickness of 2 mm) of steaks extracted and purified by SPE procedure and determined by LC-MS. Basic chemical composition was determined by AOAC analytical methods (water, proteins, ash and intramuscular fat). Content of non-protein nitrogen was determined by the Kjeldahl method described by Paulsen *et al.* (2006) and Soriano *et al.* (2006). The content of creatine and creatinine was determined by a spectrophotometric method described by Campo *et al.* (1995), Campo *et al.* (1998) and Polak *et al.* (2007). Free amino acids, sugars and HCAs were extracted and purified by SPE procedure, then separated and determined by liquid chromatography and mass spectrometry. Analytical method for sugar determination in meat samples was developed and validated. Method's characteristics are innovative sample preparation (by using of classical extraction and novel solid phase extraction methods) and LC-MS quantification in ESI+ mode and confirmation in ESI-mode. Results were statistically analyzed with SAS program.

Non-aged muscles of normal quality have compared to muscles of PSE quality for a tenth of unit higher average pH values (5.51 vs. 5.41), almost two times lower drip loss (7.88 % vs. 13.2 %) and lower colour values  $L^*$ ,  $a^*$  in  $b^*$  ( $L^*$ : 52.8 vs. 57.3), differences were

statistically significant ( $p \leq 0.001$ ). Basic chemical composition of non-aged (1 day *post mortem*) LD muscle was: 74.7 % water, 1.61 % intramuscular fat, 22.8 % protein, and 1.16 % ash. Generally, all measured ageing and meat quality indicators and precursors of HCAs were influenced by ageing time at the 5 % level or less. Significant increase of NPN content in normal muscles after six<sup>th</sup> day of ageing and in PSE muscles after ten<sup>th</sup> day was found in comparison to nonaged sample; 0.1% difference between muscle qualities was not significant. The WBSF values decreased with ageing time. Muscles roasted to  $T_i = 70$  °C were tenderer (lower WBSF) than muscles roasted to  $T_i = 95$  °C, differences between degrees of doneness decreased with days of ageing. The creatine and creatinine content of raw pork LD muscles, normal quality, were markedly affected by ageing, where creatine content declined and creatinine increased with days of ageing (1<sup>st</sup> day: 6.23/0.07 mg/g vs. 10<sup>th</sup> day: 5.88/0.11 mg/g), in PSE muscles decrease was not significant. The content of free amino acids in muscles of normal and PSE qualities linearly ( $r^2 = 0.975$  vs.  $r^2 = 0.999$ ) increased with ageing time. Approximately 1.6-times higher content of total free amino acids released in 10 day aged muscles than in nonaged pork muscles was found, with exceptions of alanine, proline, ornithine, citrulline, cystationin and dipeptides carnosine and anserine. Generally higher content of free amino acids was observed in normal (aged till 6 days) than in PSE muscles (exceptions glutamic acid, 4-hydroxyproline, lysine, methionine, tyrosine and valine). The monosaccharide content of raw muscles was markedly affected by meat quality and ageing time. The monosaccharides content in PSE muscles increased significantly with ageing (1<sup>st</sup> day: 3.58 mg/g vs. 10<sup>th</sup> day: 4.67 mg/g), in normal muscles increase was not significant (1<sup>st</sup> day: 3.10 mg/g vs. 10<sup>th</sup> day: 3.89 mg/g). Higher glucose content in PSE compared to normal muscles was statistically significant (2.76 mg/g vs. 2.29 mg/g).

Five HCAs were in a homogenate of upper and lower surface slices of grilled steaks determined: MeIQx, PhIP, DiMeIQx, Harman and Norharman. All three basic hypotheses were confirmed by the results of this research. Content of HCAs increases with ageing approximately 2- to 2.5-times (in nonaged muscles of normal quality HCAs content being 1.35 ng/g, after 3 days 1.38 ng/g, after 6 days 1.77 ng/g and after 10 days 3.49 ng/g) and is dependent on  $T_i$ . On average 4-times higher amount of HCAs was formed in grilled samples to  $T_i = 95$  °C than in samples grilled to  $T_i = 70$  °C (8.34 ng/g vs. 2.36 ng/g). Generally speaking, no marked difference due to meat quality was found in the HCAs content at  $T_i = 70$  °C (with exception of MeIQx). On the average PSE samples grilled to  $T_i = 95$  °C contained 22 % HCAs more than normal samples.

It was supposed that the higher content of creatinine and free amino acids (as consequence of meat quality and ageing time) is mostly associated with the higher HCAs content formed on grilled pork, and we did find strong correlation between the mentioned parameters at both  $T_i$  ( $0.68 < r < 0.92$ ). The glucose content was slightly related to the HCAs content in pork grilled to 95 °C ( $r < 0.70$ ), but it was related to the MeIQx content ( $r = 0.98^*$ ).

The results of this research have demonstrated that from health perspective it is the most suitable to grill pork meat (normal quality and aged to 3-day or PSE quality and nonaged), to the  $T_i = 70$  °C, in which case to 1.94 ng/g HCAs is formed.



## 8 VIRI

- AOAC 24.043 Creatin – Official final action. 1980. V: Official methods of analysis of AOAC International. 13<sup>rd</sup> ed. Horwitz W. (ed.). Washington, AOAC International: 381-381.
- AOAC Official Method 920.153 Ash of Meat. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 4-4.
- AOAC Official Method 928.08 Nitrogen in meat Kjeldahl method. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 5-6.
- AOAC Official Method 950.46 Moisture in Meat. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 1-2.
- AOAC Official Method 991.36 Fat (Crude) in meat and meat product. 1997. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16<sup>th</sup> ed. Cunnif P. (ed.). Washington, AOAC International: chapter 39: 3-4.
- Aristoy, M.C., Toldrá, F. 1998. Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, 50: 327-332.
- Armero E., Baselga M., Aristoy M.C., Toldrá F. 1999. Effects of sire type and sex on pork muscle exopeptidase activity, natural dipeptides and free amino acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1280-1284.
- Arvidsson P., Boekel M.A.J.S., Skog K., Jägerstad M. 1997. Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *Journal of Food Science*, 62, 5: 911-916.
- Augustsson K., Skog K., Jägerstad M., Steineck G. 1997. Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis*, 18, 10: 1931-1935.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T. 2004a. Determination of heterocyclic amines by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054, 1-2: 409-418.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004b. Evaluation of reversed-phase columns for the analysis of heterocyclic aromatic amines by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 45-59.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T., Lliberia J.L., Bagó B., Cortes M.A. 2006. Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography A*, 1125: 195-203.
- Batlle N., Aristoy M.C., Toldrá F. 2001. ATP metabolites during aging of exudative and nonexudative pork meats. *Journal of Food Science* 66: 68-71.

- Bauchart C., Rémond D., Chambon C., Patureau-Mirand P., Savary-Auzeloux I., Reynès C., Morzel M. 2006. Small peptides (<5 kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Science*, 74: 658-666.
- Benito M.J., Rodríguez M., Acosta R., Córdoba J.J. 2003. Effect of the fungal extracellular protease EPg222 on texture of whole pieces of pork loin. *Meat Science*, 65: 877-884.
- Bianchi F., Careri M., Corradini C., Elviri L., Mangia A., Zagnoni I. 2005. Investigation of the separation of heterocyclic aromatic amines by reversed phase ion-pair liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry: The role of ion pair reagents on LC-MS/MS sensitivity. *Journal of Chromatography B*, 825, 2, 25: 193-200.
- Boles J.A., Parriah F.C., Huiatt T.W., Robson R.M. 1992. Effect of porcine stress syndrome on the solubility and degradation of myofibrillar/cytoskeletal proteins. *Journal of Animal Science*, 70: 454-464.
- Bordas M., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Formation and stability of heterocyclic amines in a meat flavour model system: Effect of temperature, time and precursors. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 11-17.
- Bowker B.C., Grant A.L., Forrest J.C., Gerrard D.E. 2000. Muscle metabolism and PSE pork. *Journal of Animal Science*, 79: 1-8.
- Brands C.M.J., Alink G.M., van Boekel M.A.J.S., Jongen W.M.F. 2000. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2271-2275.
- Braun J.P., Lefebvre H.P., Watson A.D.J. 2003. Creatinine in the dog: A review. *Veterinary Clinical Pathology*, 32, 4: 162-179.
- Brewer M.S. 2004. Water-holding capacity. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 242-249.
- Bruas-Reignier F., Brun-Bellut J. 1996. Changes affecting the *longissimus dorsi*, *triceps brachii caput longum* and *rectus femoris* muscles of young friesian bulls during meat ageing. *Meat Science*, 43: 335-344.
- Busquets R., Bordas M., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 79-86.
- Cambero M.I., Pereira-Lima C.I., Ordonez J.A., Garcia de Fernando G.D. 2000. Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1519-1528.
- Campo G., Berregi I., Casado J.A. 1995. Spectrophotometric simultaneous determination of creatinine and creatine by flow injection with reagent injection. *Journal of Analytical Chemistry*, 352: 557-561.
- Campo G., Gallego B., Berregi I., Casado J.A. 1998. Creatinine, creatine and protein in cooked meat products. *Food Chemistry*, 63, 2: 187-190.

- Cheah K.S., Cheah A.M., Just A. 1998. Identification and characterization of pigs prone to producing RSE (Reddish-pink, soft and exudative) meat in normal pigs. *Meat Science*, 48: 249-255.
- Cheng K.W., Chen F., Wang M. 2006. Heterocyclic amines: Chemistry and health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50: 1150-1170.
- Chiu C.P., Chen B.H. 2000. Stability of heterocyclic amines during heating. *Food Chemistry*, 68: 267-272.
- Cornet M., Bousset J. 1999. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Science*, 51, 3: 215-219.
- Cross A.J., Sinha R. 2004. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44: 44-55.
- Čemažar M. 2006. Kemijski karcinogeni. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9-10 nov. 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-31.
- Dashwood R.H. 2002. Review Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutation Research*, 511: 89-112.
- Davies C.G.A., Labuza T.P. The Maillard reaction application to confectionery products. Minnesota, University of Minnesota, Department of Food Science and Nutrition. <http://citeseer.ist.psu.edu/469420.html> (21. sep 2007): 33 str.
- Devine C.E. 2004. Conversion of muscle to meat: Ageing. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 330-338.
- Dvorak Z. 1981. Creatine as an indicator of net muscle proteins. *Journal of the science of food and agriculture*, 32: 1033-103.
- Edenharder R., Worf-Wandelburg A., Decker M., Platt K.L. 1999. Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. *Mutation Research*, 444: 235-248.
- Felton J.S., Fultz E., Dolbeare F.A., Knize M.G. 1995. Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens / carcinogens in fried beef patties by microwave pre-treatment. Livermore, University of California, Lawrence Livermore National Laboratory. <http://www.llnl.gov/str/pdfs/UCRL-JC-116450.pdf> (21. sep 2007): 7 str.
- Felton J.S., Jägerstad M., Knize M.G., Skog K., Wakabayashi K. 2000. Contents in food, beverages and tobacco. V: Food borne carcinogens. Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.). New York, John Wiley & Sons, LTD: 31-72.
- Flores M., Moya V.J., Aristoy M.C., Toldrá F. 2000. Nitrogen compounds as potential biochemical markers of pork meat quality. *Food Chemistry*, 69, 4: 371-377.
- Fortin A., Robertson W.M., Tong A.K.W. 2005. The eating quality of Canadian pork and its relationship with intramuscular fat. *Meat Science*, 69: 297-305.
- Geesink G.H., Taylor R.G., Bekhit A.E.D., Bickerstaffe R. 2001. Evidence against the non-enzymatic calcium theory of tenderization. *Meat Science*, 59, 4: 417-422.

- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Boudjellal A., Ouali A. 2006. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 8: 394-405.
- Honikel K.O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 4: 447-457.
- Honikel K.O. 2004. Conversion of muscle to meat. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 314-322.
- Hopkins D.L., Huff-Lonergan E. 2004. Tenderizing mechanisms: Chemical and enzymatic. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 3. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (ur.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 1363-1369.
- Immonen K., Puolanne E. 2000. Variation of residual glycogen – glucose concentration at ultimate pH values below 5.75. *Meat Science*, 55: 279-283.
- Jägerstad M., Skog K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*, 574: 156-172.
- Jägerstad M., Skog K., Arvidsson P., Solyakov A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Food Research and Technology*, 207, 6: 419-427.
- Ji J.R., Takahashi K. 2006. Changes in concentration of sarcoplasmic free calcium during *post-mortem* ageing of meat. *Meat Science*, 73: 395-403.
- Johansson M.A.E., Fay L.B., Gross G.A., Olsson K., Jägerstad M. 1995. Influence of amino acids on the formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in a model system. *Carcinogenesis*, 16: 2553-2560.
- Joo S.T., Kauffman R.G., Kim B.C., Park G.B. 1999. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine *longissimus* muscle. *Meat Science*, 52, 3: 291-297.
- Karlsson A.H., Klont R.E., Fernandez X. 1999. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science*, 60, 2-3: 255-269.
- Keating G.A., Bogen K.T. 2004. Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. *Journal of Chromatography B*, 802: 127-133.
- Keeton J.T., Eddy S. 2004. Chemical and physical characteristics of meat. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 210-264.
- Kikugawa K., Kato T., Hiramoto K., Takada C., Tanaka M., Maeda Y., Ishihara T. 1999. Participation of the pyrazine cation radical in the formation of mutagens in the reaction of glucose / glycine / creatinine. *Mutation Research*, 444: 133-144.
- Klont R.E., Brocks L., Eikelenboom G. 1998. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, 49, 1: S219-S229.
- Knasmüller S., Murkovic M., Pfau W., Sontag G. 2004. Heterocyclic aromatic amines-still a challenge for scientists. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 1-2.

- Knize M.G., Felton J.S. 2004. Formation and Human Risk of Carcinogenic Heterocyclic Amines Formed from Natural Precursors in Meat. *Nutrition Reviews* (november 2004). <http://www.llnl.gov/tid/lof/documents/pdf/314198.pdf> (november 2007): 25 str.
- Koohmaraie M. 1992. Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle m-calpain. *Journal of Animal Science*, 70: 3071-3080.
- Koohmaraie M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*, 36: 93-104.
- Koohmaraie M., Doumit M.E., Wheeler T.L. 1996. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. *Journal of Animal Science*, 74: 2935-2942.
- Koohmaraie M., Geesink G.H. 2006. Contribution of *postmortem* muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 74: 34-43.
- Koutsidis G., Mottram D.S., Elmore J.S., Oruna-Concha M.J. 2003. Sugars and related compounds as flavour precursors in meat. V: *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century: Proceedings of the 10<sup>th</sup> Weurman Flavour Research Symposium*. Dijon, 24–28 June 2002. Quéré J.L., Etiévant P. (eds.). Beaune, France: 654-657.
- Kylä-Puhju M., Ruusunen M., Puolanne E. 2005. Activity of porcine muscle glycogen debranching enzyme in relation to pH and temperature. *Meat Science*, 69: 143-149.
- Laack R.L.J.M., Kauffman R.G. 1999. Glycolytic potential of red, soft, exudative pork *Longissimus muscle*. *Journal of Animal Science*, 77: 2971-2973.
- Lan C.M., Kao T.H., Chen B.H. 2004. Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods. *Journal of Chromatography B*, 802: 27-37.
- Lawrie R.A., Ledward D.A. 2006. *Lawrie's meat science*. 7<sup>th</sup> ed. Cambridge, Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition: 442 str.
- Lengerken G., Maak S., Wicke M. 2002. Muscle metabolism and meat quality of pigs and poultry. *Veterinarija ir zootechnika*, 20, 42: 82-86.
- Leth T. 2004. Chemical analysis for specific components. Major meat components. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 185-195.
- Marchand L.L., Hankin J.H., Pierce L.M., Sinha R., Nerurkar P.V., Franke A.A., Wilkens L.R., Kolonel L.N., Donlon T., Seifried A. 2002. Well-done red meat, metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506: 205-214.
- Maribo H., Stoier S., Jorgensen P.F. 1999. Procedure for determination of glycolytic potential in porcine *m. longissimus dorsi*. *Meat Science*, 51: 191-193.
- MassLynx<sup>TM</sup> Version 4,0 SP4. 2004. Micromass<sup>®</sup> Ltd. UK Limited (Reg. U.S. Pat. & Tm. Off.). Global mass – informatics. Micromass Part No – 6666661.
- Messner C., Murkovic M. 2004. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 19-26.

- Mestre-Prates J.A. 2002. Factors and mechanisms responsible for meat ageing. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153, 7: 499-506.  
[http://revmedvet.envt.fr/RevMedVet/2002/RMV153\\_499\\_506.pdf](http://revmedvet.envt.fr/RevMedVet/2002/RMV153_499_506.pdf) (20. sep 2007).
- Micklander E., Bertram H.C., Marnø H., Bak L.S., Andersen H.J., Engelsen S.B., Nørgaard L. 2005. Early *post-mortem* discrimination of water-holding capacity in pig *longissimus* muscle using new ultrasound method. *Food Science and Technology*, 38, 5: 437-445.
- Monin G. 2004. Colour and texture deviations. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 323-330.
- Mou S., Ding X., Liu Y. 2002. Separation methods for taurine analysis in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781: 251-267.
- Moya V.J., Flores M., Aristoy M.C., Toldrá F. 2001. Pork meat quality affects peptide and amino acid profiles during the ageing process. *Meat Science*, 58, 2: 197-206.
- Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Food Research Technology*, 207, 6: 477-480.
- Murkovic M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 3-10.
- Nagao M. 1999. A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens heterocyclic amines based on molecular information. *Mutation Research*, 431: 3-12.
- Nagao M. 2000. Mutagenicity. V: *Food borne carcinogens. Heterocyclic amines*. Nagao M., Sugimura T. (eds.). New York, John Wiley & Sons, LTD: 163-196.
- Nelson D.L., Cox M.M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. New York, Worth Publishers: 1119 str.
- Okumura T., Yamada R., Nishimura T. 2003. Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during *post mortem* conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Science*, 64: 467-473.
- Olson D.G., Parrish J.R., Stromer M.H. 1976. Myofibrillar fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during *post mortem* storage. *Journal of Food Science*, 41: 1036-1041.
- Olsson V. 2004. The effect of the RN<sup>-</sup> allele and production system on meat quality and the formation of heterocyclic amines in pork. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Food Science: 70 str.
- Olsson V., Skog K., Lundström K., Jägerstad M. 2005. Colour photographs for estimation of heterocyclic amine intake from fried pork chops of different RN genotypes indicate large variations. *Food Quality and Preference*, 16, 2: 91-101.
- Ouali A., Talmant A. 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28, 4: 331-348.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu M.A. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74: 44-58.

- Oz F., Kaban G., Kaya M. 2006. Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chemistry*, 104: 67-72.
- Pais P., Knize M.G. 2000. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 747, 1-2: 139-169.
- Palka K. 2004. Heat effects on meat. *Physics and chemistry*. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 2. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 567-570.
- Paulsen P., Hagen U., Bauer F. 2006. Changes in biogenic amine contents, non-protein nitrogen and crude protein during curing and thermal processing of *M. longissimus, pars lumborum* of pork. *European Food Research and Technology*, 223, 5: 603-608.
- Pegg R.B., Shahidi F. 2004. Heat effects on meat. *Flavour development*. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 2. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 570-578.
- Pfau W., Skog K. 2004. Exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman. *Journal of Chromatography B*, 802: 115-126.
- Pfau W., Rosenvold K., Young J.F. 2006. Formation of mutagenic heterocyclic aromatic amines in fried pork from Duroc and Landrace pigs upon feed supplementation with creatine monohydrate. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 12: 2086-2091.
- Polak T. 2003. Heterociklični aromatski amini v zoreni termično obdelani goveji dolgi hrbtni mišici. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93 str.
- Polak T., Gašperlin L., Žlender B. 2007. Various instrumental and biochemical parameters as ageing indicators of beef *Longissimus dorsi* muscle and their relation to creatine and creatinine content. *European Food Research and Technology*, 225, 5-6: 849-855.
- Pösö A.R., Puolanne E. 2005. Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, 70, 3: 423-434.
- Rosenvold K., Andersen H.J. 2003. Factors of significance, for pork quality – a review. *Meat Science*, 64: 219-237.
- Rosenvold K., Baltzer M., Aaslyng M.D., Støier S. 2004. Water loss from pork during cooking – does pH during cooking have an impact? V: 50th International Congress of Meat Science and Technology, august 8<sup>th</sup> – 13<sup>th</sup>, 2004, Helsinki, Finland: Proceedings. Helsinki, University of Helsinki, Department of Food Technology: CD-ROM: 7 str.
- SAS Softwear. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.
- Schäfer A., Rosenvold K., Purslow P.P., Andersen H.J., Henckel P. 2002. Physiological and structural events *post mortem* of importance for drip loss in pork. *Meat Science*, 61: 355-366.
- Schut H.A., Snyderwine E.G. 1999. Review of DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20: 353-368.

- Sentandreu M.A., Coulis G., Ouali A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science Technology*, 13: 400-421.
- Sentellas S., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T. 2004. Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1032, 1-2: 193-201.
- Shahidi F., Samaranyaka A.G.P., Pegg R.B. 2004. Heat effects on meat. Maillard reaction and browning. Vol. 2. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 578-592.
- Sinha R., Knize M.G., Salmon C.P., Brown E.D., Rhodes D., Felton J.S., Levander O.A., Rothman N. 1998. Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 4: 289-297.
- Skog K., Jägerstad M. 1990. Effect of monosaccharides and disaccharides on the formation of food mutagens in model systems. *Mutation Research*, 230: 263-272.
- Skog K. 1993. Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 31: 655-675.
- Skog K.I., Johansson M.A., Jagerstad M.I., 1998a. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 879-896.
- Skog K., Solyakov A., Arvidsson P., Jagerstad M. 1998b. Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 803, 1-2: 227-233.
- Skog K. 2002. Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1197-1203.
- Skog K., Eneroth A., Svanberg M. 2003. Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 3: 313-323.
- Skog K. 2004. Blue cotton, blue rayon and blue chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines – a review. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 39-44.
- Snow R.J., Murphy R.M. 2001. Creatine and the creatine transporter: A review. *Journal Molecular and Cellular Biochemistry*, 224, 1-2: 169-181.
- Soriano-Pérez A., García-Ruiz A. 2003. Influence of crossbreed on the degradation of myofibrillar proteins and on the cathepsin B+L activity in dry cured hams. *European Food Research and Technology*, 217: 93-99.
- Soriano A., Cruz B., Gómez L., Mariscal C., Ruiz A.G. 2006. Proteolysis, physicochemical characteristics and free fatty acid composition of dry sausages made with deer (*Cervus elaphus*) or wild boar (*Sus scrofa*) meat: A preliminary study. *Food Chemistry*, 96, 2: 173-184.



- Spontaneous one-way conversion of PCr and Creatine into Creatinine. 2007. Creatine Information Center (april 2007).  
<http://www.creatinemonohydrate.net/Illustrations/reactions.html> (oktober 2007): 1 str.
- Strydom P.E., Frylinck L., Smith M.F. 2005. Should electrical stimulation be applied when cold shortening is not a risk? *Meat Science*, 70: 733-742.
- Sugimura T., Adamson R.H. 2000. Introduction. V: Food borne carcinogens. Heterocyclic amines. Nagao M., Sugimura T. (eds.). New York, John Wiley & Sons, LTD: 1-4.
- Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M. 2004. Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95: 290-299.
- Švob-Troje Z., Fröbe Z., Perović Đ. 1997. Analysis of selected alkaloids and sugars in tobacco extract. *Journal of Chromatography A*, 775, 1-2: 101-107.
- Taylor R.G. 2004. Muscle fibre types and meat quality. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 2. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 876-882.
- Tikk M., Tikk K., Tørngren M.A., Meinert L., Aaslyng M.D., Karlsson A.H., Andersen H.J. 2006. Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7769-7777.
- Toldrá F., Flores M. 2000. The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality. *Food Chemistry*, 69, 4: 387-395.
- Toldrá F. 2003. Muscle foods: Water, structure and functionality. *Food Science and Technology International*, 9: 173-177.
- Toldrá F. 2004. Curing: Dry. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 360-365.
- Toribio F., Galceran M.T., Puignou L. 2000. Review: Separation of heteroaromatic amines in food products. *Journal of Chromatography B*, 747: 171-202.
- Tornberg E. 2005. Effects of heat on meat proteins – implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 3: 493-508.
- Totsuka Y., Takamura-Enya T., Nishigaki R., Sugimura T., Wakabayashi K. 2004. Mutagens formed from  $\beta$ -carbolines with aromatic amines. *Journal of Chromatography B*, 802: 135-141.
- Turesky R.J., Vouros P. 2004. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 155-166.
- Turesky R.J. 2007. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168: 219-227.
- Vitaglione P., Fogliano V. 2004. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 189-199.

- Wakabayashi K., Ushiyama H., Takahashi M., Nukaya H., Kim S.B., Hirose M., Ochiai M., Sugimura T., Nagao M. 1993. Exposure to Heterocyclic Amines. *Environmental Health Perspectives*, 99: 129-133.
- Wakabayashi K., Sugimura T. 1998. Heterocyclic amines formed in the diet: Carcinogenicity and its modulation by dietary factors. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9: 604-612.
- Warner R.D., Kauffman R.G., Greaser M.L. 1997. Muscle protein changes *post mortem* in relation to pork quality traits. *Meat Science*, 45, 3: 339-352.
- Warriss P.D., Brown S.N., Paściak P. 2006. The colour of the adductor muscle as a predictor of pork quality in the loin. *Meat Science*, 73: 565-569.
- Warzecha L., Janoszka B., Błaszczuk U., Strózyk M., Bodzek D., Dobosz C. 2004. Determination of heterocyclic aromatic amines content in samples of household-prepared meat dishes. *Journal of Chromatography B*, 802, 1: 95-106.
- Watanabe A., Ueda Y., Higuchi M. 2004. Effects of slaughter age on the levels of free amino acids and dipeptides in fattening cattle. *Animal Science Journal*, 75: 361-367.
- Wyss M., Kaddurah-Daouk R. 2000. Creatine and creatine metabolism. *Physiological Reviews*, 80, 3: 1107-1213.
- Xiong Y.L. 2004. Protein functionality. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. Jensen W.K., Devine C., Dikeman M. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier Ltd.: 218-238.

## ZAHVALA

## PRILOGE

- Priloga A: Ponovljivost med paralelkami pri določanju vsebnosti vode, intramuskularne maščobe (IMF), beljakovin, skupnih mineralnih snovi, deleža neproteinskega dušika (NPN) in vrednosti pH, merjene v ekstraktu, v presni dolgi hrbtmi mišica prašiča.
- Annex A: Repeatability of water, intramuscular fat – IMF, protein, ash, pH value in extract and non-protein nitrogen – NPN determination in parallel samples for random raw pork LD muscle.

parameter (g/100 g)	paralelka						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV (%)
voda	74,63	75,28	75,07	74,98	74,93	75,30	75,03	0,33
IMF	1,43	1,43	1,36	1,39	1,39	1,36	1,39	2,13
beljakovine	22,38	22,37	22,34	22,34	22,50	22,63	22,42	0,52
skupne mineralne snovi	1,15	1,11	1,09	1,18	1,13	1,19	1,14	3,59
vrednost pH <sub>ekstrakt</sub>	5,58	5,60	5,61	5,58	5,59	5,58	5,59	0,23
NPN (% od skupnega N)	12,11	12,25	11,84	12,19	12,19	12,16	12,12	1,21

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti.

Priloga B: Lastnosti aminokislin in njihovih derivatov ter nekateri LC-MS parametri.  
 Annex B: Properties of amino acids and theirs derivates and some LC-MS parameters.

Okrajšava	FAA	M <sub>FAA</sub> (g/mol)	masa izvornega kationa derivatizirane FAA (m/z)	Rt (min)	čas snemanja masnega spektra posameznega iona (min)
ARG	arginin	174,2	302,98	3,31	
GLN	glutamin	146,2	275,01	3,94	
CIT	citrulin	175,2	303,98	4,04	2,0-5,5
ANS	anserin	240,1	368,88	4,22	
SER	serin	105,1	233,99	4,45	
ASN	asparagin	132,1	243,00	4,54	
HYP	4-hidroksiprolin	131,1	260,00	4,78	
TAU	tavrin	125,1	210,05	4,78	
GLY	glicin	75,1	204,05	5,06	4,0-8,0
THR	treonin	119,1	248,00	5,15	
ALA	alanin	89,1	218,05	6,27	
ORN	ornitin	132,1	346,91	8,45	
CAR	karnozin	226,2	440,89	8,54	
PRO	prolin	115,1	244,00	8,84	
MET	metionin	149,2	277,95	8,78	7,3-11,0
LYS	lizin	146,1	360,93	9,88	
ASP	asparaginska k.	133,1	303,92	9,76	
HIS	histidin	155,1	369,88	9,94	
VAL	valin	117,1	246,06	10,27	
GLU	glutaminska k.	147,1	317,93	10,44	
TRP	triptofan	204,2	332,89	10,74	
LEU	levcin	131,2	260,07	12,16	
PHE	fenilalanin	165,2	293,97	12,25	9,6-15,0
ILE	izolevcin	131,2	260,07	12,67	
NLEU	norlevcin	131,2	260,07	12,96	
CYS	cistein	121,2	335,89	13,05	
CTH	cistationin	222,3	478,85	13,77	
C-C	cistin	240,3	496,84	14,27	
TYR	tirozin	181,2	395,86	14,86	13,8-17,5
HC-CH	homocistin	268,3	524,84	16,31	

M – molska masa, Rt – retencijski čas.

Priloga C: Ključni podatki izbranih reducirajočih sladkorjev in nekateri LC-MS parametri.  
 Annex C: Properties of sugars and some LC-MS parameters.

reducirajoči sladkor	Rt (min)	M sladkorja (g/mol)	masa kationa <sup>A</sup> [M+Na] <sup>+</sup> (m/z)	masa aniona <sup>B</sup> [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	čas snemanja masnega spektra posameznega iona (min)
maltotrioza	12,12	504,40	527,02	502,77	
maltoza	13,15	342,00	364,92	341,01	
glukoza	16,00	180,16	203,05	179,19	
manoza	18,52	180,16	203,05	179,19	5,0-27,5
fruktoza	20,69	180,16	203,05	179,19	
ksiloza	17,78	150,13	173,06	149,04	
arabinoza	21,09	150,13	173,06	149,04	
ramnoza	18,44	164,16	187,09	163,09	
riboza	35,38	150,13	173,06	149,04	30,0-50,0

Rt – retencijski čas, M – molska masa, A – ESI+ način za kvantifikacijo, B – ESI- način za identifikacijo.

Priloga D: Nekateri MS parametri in masni prehodi HCA v MRM načinu.  
 Annex D: MS parameters and MRM mass transitions of HCAs.

Okrajšava HCA	masa izvornega kationa [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	masa fragmenta_A MRM* (m/z)	energija fragmentacije v CID MRM* (eV)	masa fragmenta_B MRM** (m/z)	energija fragmentacije v CID MRM** (eV)	čas snemanja masnega spektra posameznega kationa (min)
IQ	199,25	184,04	30	157,09	35	8,5 – 12,0
IQx	200,15	185,08	30	131,00	35	10,5 – 14,0
MeIQ	213,26	198,13	25	197,81	35	
MeIQx	214,17	130,90	40	199,17	25	13,0 – 17,0
DiMeIQx	228,25	212,00	35	213,00	25	16,5 – 20,0
norharman	169,14	114,80	35	142,00	25	
harman	183,15	114,75	35	88,00	60	19,0 – 22,0
TriMeIQx	242,27	227,17	25	226,13	35	
PhIP	225,20	210,08	33	183,00	35	20,0 – 24,0

M – molska masa v g/mol, MRM\* – način detekcije za kvantifikacijo, MRM\*\* – način detekcije za identifikacijo.

Priloga E: Ponovljivost določanja vsebnosti prekursorjev HCA znotraj paralelke naključnega vzorca (presna dolga hrbtne mišica prašiča).

Annex E: Repeatability of HCAs precursor's determination in one parallel of random sample (raw pork LD muscle).

Parameter	injiciranje						statistična parametra		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV (%)	
kreatin (mg/g)	5,77	5,82	5,88	5,87	5,84	5,88	5,86	0,50	
kreatinin (mg/g)	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,71	
proste aminokisliline (mg/100 g)	ALA	12,26	12,62	12,07	12,23	12,66	12,46	12,38	1,89
	ARG	3,83	4,04	3,84	3,85	3,93	3,75	3,87	2,53
	ASN	3,05	3,00	3,01	3,14	3,01	2,99	3,04	1,85
	ASP	1,15	1,21	1,16	1,21	1,20	1,22	1,19	2,57
	CYS	0,58	0,60	0,59	0,61	0,59	0,58	0,59	2,01
	GLN	15,37	15,61	15,28	15,13	15,78	15,05	15,37	1,82
	GLU	13,41	13,78	13,28	13,97	13,73	14,59	13,79	3,38
	GLY	5,66	5,93	5,93	5,97	5,89	5,65	5,84	2,46
	HIS	5,63	5,86	5,69	5,76	5,71	5,51	5,69	2,10
	HYP	0,81	0,85	0,83	0,85	0,83	0,81	0,83	2,32
	ILE	2,46	2,50	2,71	2,75	2,64	2,53	2,60	4,53
	LEU	7,12	7,73	7,35	7,84	7,61	7,57	7,54	3,48
	LYS	7,94	8,23	8,02	8,10	8,17	7,99	8,08	1,39
	MET	2,71	2,83	2,68	2,88	2,74	2,71	2,76	2,83
	PHE	4,49	4,76	4,58	4,72	4,79	4,65	4,66	2,44
	PRO	4,68	4,99	4,72	4,85	4,86	4,63	4,79	2,84
	SER	5,74	5,76	5,74	5,66	5,89	5,77	5,76	1,31
	THR	3,44	3,65	3,62	3,52	3,61	3,45	3,55	2,51
	TRP	1,30	1,37	1,32	1,40	1,36	1,30	1,34	3,09
TYR	5,09	5,37	5,11	5,13	5,27	5,17	5,19	2,12	
VAL	6,22	6,30	5,99	6,22	6,07	6,11	6,15	1,86	
druge aminokisliline in dipeptidi (mg/100 g)	CTH	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	5,80
	ORN	0,64	0,66	0,63	0,67	0,65	0,64	0,65	2,61
	CIT	1,22	1,26	1,28	1,28	1,28	1,22	1,26	2,46
	TAU	7,15	7,19	6,90	6,44	7,18	6,31	6,86	5,75
	ANS	17,2	18,0	17,7	18,2	17,9	17,4	17,7	2,18
	CAR	258	273	259	265	271	261	264	2,34
	HC-CH	0,58	0,63	0,58	0,63	0,62	0,59	0,60	4,06
	C-C	0,47	0,52	0,50	0,53	0,51	0,48	0,50	4,74
sladkorji	glukoza (mg/g)	2,40	2,48	2,46	2,47	2,41	2,42	2,44	1,43
	fruktoza (mg/g)	0,59	0,60	0,60	0,61	0,60	0,61	0,60	1,27
	manoza (μg/g)	136	138	138	142	139	138	138	1,32
	riboza (μg/g)	26,8	27,4	27,9	28,9	28,8	28,5	28,1	2,91
reducirajoči	arabinoza (μg/g)	40,1	40,6	42,7	41,3	39,4	40,4	40,8	2,77
	ramnoza (μg/g)	1,00	1,01	1,09	0,99	0,96	1,13	1,03	6,47
	maltoza (μg/g)	32,10	29,98	31,96	31,78	29,82	30,11	30,96	3,53
	maltotrijoza (μg/g)	11,81	14,84	13,89	15,83	13,18	10,61	13,36	14,43

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti

Priloga F: Ponovljivost določanja vsebnosti prekurzorjev HCA med paralelkami v naključni presni dolgi hrbtni mišici prašiča.

Annex F: Repeatability of HCAs precursor's determination in parallel samples in random raw pork LD muscle.

Parameter	paralelka						statistična parametra		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV (%)	
kreatin (mg/g)	5,89	6,12	5,87	5,85	5,77	5,82	5,89	2,09	
kreatinin (mg/g)	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	1,13	
proste aminokisliline (mg/100 g)	ALA	13,11	13,32	16,90	15,72	14,62	15,45	14,85	9,86
	ARG	5,05	5,67	4,89	4,91	5,25	5,13	5,15	5,60
	ASN	4,57	4,48	5,34	5,22	4,75	5,04	4,90	7,19
	ASP	3,91	4,00	3,94	4,01	3,66	3,37	3,82	6,67
	CYS	0,98	1,05	1,01	0,91	0,92	1,09	0,99	7,05
	GLN	11,36	12,80	12,54	11,63	12,03	12,36	12,12	4,54
	GLU	14,16	14,11	13,17	13,37	13,53	11,58	13,32	7,06
	GLY	7,67	7,61	8,75	7,85	8,00	8,59	8,08	5,98
	HIS	8,41	8,27	10,24	9,45	8,74	8,18	8,88	9,11
	HYP	1,05	0,96	1,14	1,12	1,06	1,20	1,09	7,48
	ILE	5,93	5,85	6,99	7,18	6,55	6,24	6,46	8,49
	LEU	9,64	10,06	11,22	11,27	10,56	11,38	10,69	6,76
	LYS	7,89	8,71	8,50	8,71	8,25	8,45	8,42	3,71
	MET	4,66	4,48	4,51	4,62	4,44	5,08	4,63	5,10
	PHE	6,49	6,23	7,57	7,14	6,92	7,21	6,93	7,13
	PRO	4,87	4,77	5,14	5,19	4,84	4,78	4,93	3,78
	SER	9,38	9,28	10,15	10,33	9,83	10,65	9,94	5,44
	THR	7,08	6,66	7,92	6,81	6,90	7,51	7,15	6,69
TRP	1,81	1,70	1,96	1,75	1,93	2,07	1,87	7,61	
TYR	6,76	7,41	7,41	7,06	6,98	7,41	7,17	3,89	
VAL	6,44	7,06	7,43	7,20	7,47	7,06	7,11	5,25	
druge aminokisliline in dipeptidi (mg/100 g)	CTH	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	10,17
	ORN	0,68	0,66	0,67	0,76	0,63	0,65	0,68	6,75
	CIT	0,61	0,72	0,65	0,59	0,69	0,71	0,66	7,81
	TAU	1,79	1,63	1,84	2,11	2,19	1,99	1,93	11,02
	ANS	14,08	15,61	18,02	16,28	16,14	16,70	16,14	8,02
	CAR	359	356	447	372	367	396	383	9,00
	HC-CH	0,53	0,58	0,64	0,56	0,61	0,54	0,58	7,48
	C-C	1,31	1,26	1,22	1,39	1,33	1,53	1,34	8,18
reducirajoči sladkorji	glukoza (mg/g)	2,19	2,12	2,47	2,21	2,29	2,41	2,28	5,91
	fruktoza (mg/g)	0,79	0,83	0,81	0,90	0,87	0,93	0,86	6,44
	manosa (μg/g)	217	236	253	236	247	243	239	5,20
	riboza (μg/g)	272	268	263	263	265	293	271	4,30
	arabinoza (μg/g)	29,5	28,8	34,7	33,5	33,8	35,7	32,7	8,70
	ramnoza (μg/g)	1,41	1,66	1,27	1,35	1,41	1,47	1,43	9,29
	maltoza (μg/g)	53,8	52,5	66,2	53,6	66,3	66,3	59,8	11,90
	maltotrioza (μg/g)	2,42	2,53	3,62	3,93	3,78	4,08	3,39	21,47

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti



Priloga G: Ponovljivost določanja vsebnosti HCA znotraj paralelke naključnega vzorca.  
 Annex G: Repeatability of HCAs determination in one parallel of random sample.

HCA (ng/g)	injiciranje						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV ( % )
PhIP	0,22	0,22	0,21	0,23	0,22	0,21	0,22	2,42
MeIQx	0,34	0,34	0,33	0,33	0,35	0,34	0,34	2,17
DiMeIQx	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	3,16
harman	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	2,80
norharman	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	2,62

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti

Priloga H: Ponovljivost določanja vsebnosti HCA med paralelkami naključnega vzorca.  
 Annex H: Repeatability of HCAs determination in parallel samples of random sample.

HCA (ng/g)	paralelka						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV ( % )
PhIP	1,47	1,69	1,65	1,55	1,55	1,52	1,57	5,42
MeIQx	4,07	4,29	4,20	4,38	3,99	3,95	4,15	4,08
DiMeIQx	1,48	1,66	1,67	1,69	1,71	1,59	1,64	5,11
harman	0,12	0,12	0,13	0,13	0,12	0,12	0,13	3,52
norharman	0,76	0,85	0,76	0,77	0,80	0,76	0,78	4,64

$\bar{x}$  - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti

Priloga I: Validacijski parametri določanja vsebnosti prekurzorjev HCA.  
 Annex I: Validation parameters of HCAs precursor's determination.

Parameter	LOQ (µg/g)	UM SD IS	r <sup>2</sup>
kreatin	–	y <sup>*</sup> =12,611x	0,9994
kreatinin	–	y <sup>*</sup> =13,852x	0,9993
proste aminokisliline	ALA	y = 1,3274x	0,9808
	ARG	y = 0,4793x	0,9977
	ASN	y = 0,5144x	0,9921
	ASP	y = 0,5473x	0,9923
	CYS	y = 1,5531x	0,9928
	GLN	y = 0,4272x	0,9937
	GLU	y = 0,8554x	0,9918
	GLY	y = 0,5102x	0,9862
	HIS	y = 3,7904x	0,9933
	HYP	y = 0,5224x	0,9919
	ILE	y = 0,6523x	0,9911
	LEU	y = 0,9865x	0,9949
	LYS	y = 1,8864x	0,9912
	MET	y = 0,3036x	0,9949
	PHE	y = 1,2539x	0,9925
	PRO	y = 1,0483x	0,9923
	SER	y = 0,4967x	0,9915
THR	y = 0,5675x	0,9914	
TRP	y = 1,2630x	0,9980	
TYR	y = 3,8404x	0,9918	
VAL	y = 0,6474x	0,9955	
druge aminokisliline in dipeptidi	CTH	y = 3,3268x	0,9936
	ORN	y = 0,7374x	0,9901
	CIT	y = 0,5227x	0,9906
	TAU	y = 0,0085x	0,9827
	ANS	y = 0,2502x	0,9761
	CAR	y = 0,5382x	0,9902
	HC-CH	y = 4,8982x	0,9926
	C-C	y = 2,7798x	0,9998
reducirajoči sladkorji	glukoza	y = 0,5811x	0,9996
	fruktoza	y = 0,8856x	0,9998
	manoza	y = 1,2764x	0,9998
	riboza	y = 0,0446x	0,9993
	arabinoza	y = 0,1532x	0,9954
	ramnoza	y = 0,4629x	0,9990
	maltoza	y = 0,4559x	0,9990

LOQ – meja kvantifikacije, UM SD IS – umeritvena krivulja s standardnim dodatkom in internim standardom, y<sup>\*</sup> – umeritvena krivulja s standardnim dodatkom (brez internega standarda), r<sup>2</sup> – koeficient determinacije za UM SD IS.

Priloga J: Validacijski parametri določanja vsebnosti HCA.  
 Annex J: Validation parameters of HCAs determination.

HCA	IOD (pg)	LOQ (pg/g)	UM SD IS	r <sup>2</sup>
IQ	9,01	–	y = 0,9279x	0,9994
IQx	6,57	–	y = 0,5224x	0,9991
MeIQ	6,78	–	y = 0,8128x	0,9995
MeIQx	8,92	56,9	y = 1,4325x	0,9997
DiMeIQx	0,86	5,3	y = 1,3722x	0,9997
TriMeIQx	–	–	–	–
PhIP	0,22	25,5	y = 1,6255x	0,9998
norharman	0,76	10,7	y = 3,3773x	0,9999
harman	0,68	42,2	y = 4,3625x	0,9999

IOD – instrumentalno območje detekcije, LOQ – meja kvantifikacije, UM SD IS – umeritvena krivulja s standardnim dodatkom in internim standardom, r<sup>2</sup> – koeficient determinacije za UM SD IS.