

Prof. dr hab. Bożena WASZKIEWICZ-ROBAK

Dr hab. Arkadiusz SZTERK

Mgr inż. Paulina KACZMARCZUK

Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Zakład Żywności Funkcjonalnej i Towaroznawstwa
SGGW w Warszawie

BEZPIECZEŃSTWO ZDROWOTNE MIĘSA WOŁOWEGO PODDANEGO OBRÓBCE TERMICZNEJ®

Safety aspects of beef subjected to heat treated meat®

INNOWACYJNA GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCIUNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO

Pracę zrealizowano w ramach Projektu współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka Optymalizacja produkcji wołowiny w Polsce, zgodnie ze strategią „od widelca do zagrody”

Słowa kluczowe: wołowina, dojrzewanie, obróbka wysokotemperaturowa, HAA, metody oznaczania.

W pracy zbadano wpływ stopnia dojrzałości mięsa wołowego na ilość heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) powstających podczas różnego rodzaju wysokotemperaturowej obróbki termicznej (pieczenia, smażenia i grillowania). Do badań wykorzystano mięśnie tuszy wołowej: lędźwiowy większy - pośladkowiec (psoas major) oraz pośladkowy średni - rostbef (gluteus medius), które dojrzewały w różnym czasie (5, 10 i 15 dni). Przeprowadzono analizę chromatograficzną próbek. Najwięcej HAA (10,01 ng/g mięsa) stwierdzono w mięśniu gluteus medius. Wydłużenie czasu dojrzewania mięsa wołowego powodowało zwiększenie ilości powstających HAA. Spośród badanych procesów termicznych najwięcej HAA (9,37 ng/g) powstawało podczas grillowania. Najczęściej występującą aminą w mięsie poddanym obróbce termicznej była PhIP (nawet ponad 400 ng/g mięsa). W mięsie grillowanym nie stwierdzono aminoimidazoarenów (IQ oraz IQx), które ze względu na wysoką wrażliwość na działanie wysokiej temperatury, rozkładały się podczas procesu termicznego.

Key words: beef, aging, high temperature processing, HAA, analytical methods.

The aim of the study was to investigate heterocyclic aromatic amines (HAA) content in heat-treated beef (frying and grilling) depending on the type of beef muscle and their aging. In the study, two different beef muscles were used: lumbar higher (psoas major) and middle gluteal (gluteus medius), aging process was carried out in different periods of time (5, 10 and 15 days). Chromatographic analysis of heat treated beef samples was performed. The most of HAA (10.01 ng/g) was found in the gluteus medius muscle. During aging process the amount of HAA in meat increased. Among the studied thermal processes the most HAA (9.37 ng/g) was formed during grilling process. The PhIP was formed in the largest quantities (more than 400 ng/g of) with comparison to other heterocyclic aromatic amines found in studied samples. Aminoimidazoarenes (IQ and IQx) were not found in grilled beef meats, probably there were thermally decomposition during heat treatment.

WSTĘP

Wysokotemperaturowa obróbka termiczna surowców spożywczych jest powodem powstawania w żywności związków wpływających niekorzystnie na zdrowie człowieka. Najbardziej znane są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) i heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA). O ile powstawanie WWA zostało szeroko zbadane, to HAA nie są dobrze poznane, pomimo, że zostały odkryte ponad 30 lat temu. Heterocykliczne aminy aromatyczne występują w żywności w bardzo małych ilościach, rzędu kilku-kilkunastu ng/g. Do tej pory opisywano ponad 20 różnych HAA. Wiele z nich wykazuje działanie mutagenne i karcinogenne.

Powstawanie heterocyklicznych amin aromatycznych zachodzi w mięsie, gdy działająca na nie temperatura osiągnie poziom co najmniej 150°C. Oznacza to, że większość lubianych przez konsumentów sposobów obróbki termicznej mięsa powoduje powstawanie tych związków, ponieważ zarówno smażenie, pieczenie, jak i grillowanie to procesy wymagające temperatury powyżej 150°C. Możliwe jest jednak takie przetwarzanie termiczne mięsa, które nie powoduje powstania większych ilości HAA, jednakże wiąże się to z obróbką w niższej temperaturze, np. gotowanie. Gotowane mięso wołowe, pomimo swoich walorów zdrowotnych, nie jest zbyt akceptowane przez konsumentów, gdyż uznawane jest za mało atrakcyjne sensorycznie, nie ma odpowiedniej, rumianej

barwy ani chrupiącej skórki. Fakt ten jest powodem kontynuacji systematycznych badań prowadzących do poznawania czynników warunkujących powstawanie związków HAA w mięsie podczas zróżnicowanej obróbki termicznej.

Celem artykułu jest przedstawienie wyników badań dotyczących wpływu stopnia dojrzwania mięsa wołowego na ilość heterocyklicznych amin aromatycznych (HAA) powstających podczas wysokotemperaturowej obróbki termicznej (smażenie i grillowanie na grillu elektrycznym).

HETEROCYKLICZNE AMINY AROMATYCZNE

W żywności poddanej obróbce cieplnej rozróżniane są dwie klasy heterocyklicznych amin aromatycznych, tj. aminoimidazoareny i aminy pirolityczne [22]. Heterocykliczne aminy aromatyczne zawierają od dwóch do pięciu (zwykle trzy) skondensowanych pierścieni aromatycznych z co najmniej jednym atomem azotu wbudowanym w pierścień oraz zwykle z jedną niecykliczną grupą aminową. Powstają podczas obróbki termicznej produktów organicznych, zawierających związki azotowe. Temperatura ma decydujący wpływ na powstawanie HAA stąd ich podział na grupy opiera się na zakresach temperatur w jakich dochodzi do ich formowania [3].

HAA zawierające grupę N-metylo-2-aminoimidazolową powstają na skutek reakcji pirydyny lub pirazyń, będących produktami cieplnej degradacji aminokwasów z cukrami i kreatyną. Powstające aminy nazywane są aminami typu IQ- oraz IQx-. Związki te powstają w mięsie podgrzewanym do temperatury powyżej 150°C [22]. Uważa się, że do powstawania tej klasy heterocyklicznych amin aromatycznych przyczynia się reakcja Maillarda. Obecne w surowym mięsie kreatyna, aminokwasy i heksozy są prawdopodobnymi prekursorami HAA. Zakłada się, że kreatyna w wyniku dehydratacji i cyklizacji formuje aminoimidazolową część cząsteczek HAA. Pozostała część związku pochodzi z produktów degradacji Streckera, takich jak pirydyny i pirazyń, powstałych z heksoz i aminokwasów w wyniku reakcji Maillarda. Obie części łączą się ze sobą poprzez aldehydy Streckera (lub odpowiednie zasady Schiff'a) w wyniku kondensacji aldolowej. Hipotezę tę potwierdzono w badaniach laboratoryjnych, w których mieszaninę kreatyny, glicyny i glukozy ogrzewano w temperaturze 130°C przez dwie godziny i analiza jakościowa preparatu wykazała obecność MeIQx i 7,8-DiMeIQx. Gdy zamiast glicyny użyto treoniny w roztworze wykryto MeIQx i 4,8-DiMeIQx [19]. Druga klasa HAA – aminy pirolityczne – powstają bezpośrednio w wyniku pirolizy aminokwasów (tryptofanu i kwasu glutaminowego) w wysokiej temperaturze (> 250°C).

Polarne HAA powstają z aminokwasów i kreatyniny w obecności lub przy braku węglowodanów. Kreatynina dostarcza skondensowanym aminom aromatycznym pierścień imidazolowy. Jej brak uniemożliwia powstawanie obu typów HAA (IQ i IQx). Temperatura niezbędna do takiej syntezy mieści się w przedziale 150-250°C. Do powstania amin niepolarnych potrzebna jest wyższa temperatura. Aminy takie są produktami pirolizy aminokwasów [4].

TOKSYCZNOŚĆ HETEROCYKLICZNYCH AMIN AROMATYCZNYCH

Heterocykliczne aminy aromatyczne to związki potencjalnie mutagenne. Potwierdzono to w teście Ames dla ponad 20 z nich. HAA wykazują działanie mutagenne dla bakterii oraz niektórych tkanek ssaków, powodując aberracje chromosomowe oraz wymiany siostrzanych chromatyd w koloniach komórkowych [3]. Niektóre z heterocyklicznych amin aromatycznych są bardziej mutagenne w stosunku do niektórych zwierząt niż typowe mutageny i karcinogeny, takie jak benzo[a]piren czy aflatoksyna B₁. HAA są ponad 100 razy bardziej mutagenne niż aflatoksyna B₁ i ponad 2000 razy bardziej mutagenne niż benzo[a]piren [15]. W stosunku do *Sallmonella typhimurium* HAA wykazują działanie wysoce mutagenne powodując mutacje genowe: delecję i addycję prowadzące do przesunięcia ramki odczytu (*S.typhimurium* TA98) i substytucję (*S.typhimurium* TA100). Tego samego typu mutacje występują również w komórkach ssaków narażonych na działanie HAA, co potwierdzono w badaniach *in vitro* i *in vivo*. HAA wykazują karcinogenne działanie w stosunku do gryzoni, zwiększając ryzyko nowotworów różnych narządów, tj.: jama ustna, wątroba, żołądek, płuca, jelito grube, prostata czy gruczoły mlekowe. Potwierdzono to w długofalowych badaniach opartych na karmieniu paszą z dodatkiem HAA [20].

Pod uwagę brana jest konsumpcja czerwonego mięsa, a także rodzaj i stopień obróbki termicznej. Rolę HAA w karcinogenezie przypisuje się dwóm czynnikom: wysokiemu spożyciu czerwonego mięsa oraz znacznej konsumpcji mięsa bardzo mocno wysmażonego. Niemniej nie ma wystarczających dowodów potwierdzających bezpośrednią korelację pomiędzy wzrostem ryzyka zachorowań na raka a konsumpcją HAA. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań laboratoryjnych i epidemiologicznych [3].

Międzynarodowa Agencja ds. Badań Nad Rakiem po przeanalizowaniu szeregu badań nad karcinogennością HAA zakwalifikowała IQ do grupy substancji prawdopodobnie karcinogennych dla ludzi (grupa 2A), a MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1 oraz Trp-P-2 do substancji prawdopodobnie mających działanie karcinogenne dla ludzi (grupa 2B) [14].

WPŁYW RÓŻNYCH CZYNNIKÓW NA FORMOWANIE HAA W MIĘSIE

Temperatura i czas obróbki. Powstawanie heterocyklicznych amin aromatycznych jest zależne od temperatury oraz czasu obróbki. Krótki czas ogrzewania (<15 min) w połączeniu ze stosunkowo niską temperaturą (150°C) nie powoduje formowania HAA w próbkach mięsa, jednakże wraz ze wzrostem temperatury oraz czasu obróbki zawartość HAA również rośnie. Zależność tę potwierdzają różne badania wpływu czasu ogrzewania w danej temperaturze, w których wykazano, że wydłużenie czasu ogrzewania próbki w zadanej temperaturze powoduje wzrost zawartości HAA [1]. Zbliżone wyniki uzyskano w badaniu polegającym na ogrzewaniu próbek mięsa wołowego w temperaturze 150-180°C, gdzie początkowo zawartość HAA była

niewielka, lecz w miarę upływu czasu proporcjonalnie rośła. W zależności od rodzaju HAA przyrost ten był bardzo duży (8-MeIQx, Izo-MeIQx) lub stosunkowo spokojny (IQx, PhIP, 4,8-DiMeIQx, 7,9-DiMeIQx) [22]. Zawartość heterocyklicznych amin aromatycznych zależy w dużej mierze od temperatury obróbki i czasu w jakim próbka jest poddawana jej działaniu, co można określić jako stopień wysmażenia mięsa. Potwierdza to badanie zawartości HAA na poszczególnych głębokościach próbki. W zewnętrznej, najbardziej wysmażonej części próbki mięsa znajduje się ponad połowa całkowitej zawartości HAA w badanej próbce. Im głębiej w stronę geometrycznego środka próbki, tym mniejsza zawartość HAA [21].

Wiele badań dotyczących zawartości HAA w żywności wskazuje, że w mięsie poddanym obróbce termicznej najczęściej występuje PhIP, której poziom w niektórych produktach może wynosić ponad 400 ng/g. Pozostałe HAA występują w żywności w mniejszych ilościach wahających się między granicą wykrywalności a 15 ng/g (IQ, MeIQx i 4,8-DiMeIQx) i 50 ng/g dla MeIQx. Zawartość HAA jest większa w próbkach mięsa w postaci dużego bloku, niż poddanego obróbce termicznej w kawałku. Wynika to z potrzeby dłuższego czasu ogrzewania próbek steków, aby osiągnąć identyczny, jak w przypadku mięsa mielonego poziom wysmażenia. [19]. Smażenie, jako rodzaj obróbki termicznej generuje powstawanie większych ilości HAA niż pieczenie, co ma związek z bezpośrednim kontaktem próbki z medium grzewczym [16].

Rodzaj obróbki termicznej. Zawartość heterocyklicznych amin aromatycznych w dużej mierze zależy od sposobu zastosowanej obróbki termicznej. Wykazano, że przygotowanie mięsa w kuchence mikrofalowej nie przyczynia się do powstawania ilości HAA przekraczających poziom wykrywalności. Podobnie dzieje się przy smażonym mięsie o słabym i średnim stopniu wysmażenia. Nawet w przypadku mięsa dobrze wysmażonego na patelni poziom wykrytych HAA (1,64 ng/g) jest niższy niż w przypadku mięsa słabo wysmażonego, ale poddanego obróbce na grillu węglowym (2,34 ng/g). W przypadku obróbki z zastosowaniem grilla węglowego ilość zawartych w próbce HAA wynosi prawie 10 ng/g [15].

Na zawartość heterocyklicznych amin aromatycznych w mięsie ma wpływ czas w jakim wysoka temperatura działa na próbkę w sposób ciągły. Badania potwierdzają, że odwracanie mięsa podczas obróbki termicznej, np. smażenia, znacznie ogranicza powstawanie HAA. W temperaturze w zakresie 150-180°C częste obracanie próbki pozwala na ograniczenie ilości powstających HAA do poziomu poniżej granicy detekcji. Dodatkowo takie działanie pozwala na ograniczenie czasu działania wysokiej temperatury na mięso, gdyż szybciej osiąga ono zadaną temperaturę w geometrycznym środku [6].

Stopień dojrzałości mięsa. Innym czynnikiem w znacznym stopniu wpływającym na zawartość i profil heterocyklicznych amin aromatycznych powstających w żywności poddanej działaniu wysokiej temperatury podczas obróbki jest stopień dojrzałości mięsa. Mianem dojrzewania nazywane są procesy zachodzące w mięsie przechowywanym po uboju w temperaturze chłodniczej. W trakcie dojrzewania

mięso staje się bardziej kruche i znacznie wzrasta jego smakowitość. Powodują to zmiany zachodzące w strukturze i właściwościach włókien mięśniowych oraz śródmięśniowej tkanki łącznej, wynikające z proteolizy endogennej, prowadzące do zwiększenia zawartości wolnych aminokwasów i innych związków. Ilość występujących w mięsie wolnych aminokwasów w znacznym stopniu wpływa na powstawanie HAA w trakcie poddawania mięsa działaniu obróbki wysokotemperaturowej [9, 10].

Obecność inhibitorów. Poznanie roli wolnych rodników w mechanizmie formowania HAA przyczyniło się do badań nad rolą antyoksydantów w ich syntezie. Tworzenie HAA podczas termicznej obróbki żywności wysokobiałkowej można ograniczyć poprzez dodatek antyoksydantów, naturalnych bądź sztucznych, a także roślin charakteryzujących się wysoką zawartością tychże substancji. Badania potwierdzają pozytywną rolę czosnku i cebuli dodanych do mięsa przed obróbką termiczną. Zawartość HAA w próbkach przygotowanych z dodatkiem cebuli (30 g/100g mięsa) jest mniejsza o 31% w kotletach, 49% w smażonych kawałkach mięsa oraz o 43% w mięsie mielonym w porównaniu z mięsem bez dodatków. W przypadku czosnku (15 g/100g mięsa) odpowiednio o 36%, 26% i 26% [8]. Badanie wpływu marynowania mięsa w zielonej herbacie bogatej w katechiny przed jego wysokotemperaturową obróbką pokazuje jej pozytywny efekt na ilości powstających HAA. Jest on najbardziej widoczny w przypadku PhIP oraz AαC. Powstawanie AαC można ograniczyć również poprzez dodatek 0,5% i 1% ekstraktu rozmarynu). W znaczący sposób można również ograniczyć powstawanie amin pirolitycznych oraz aminoimidazoarenów poprzez marynowanie mięsa w napojach alkoholowych, np. piwie czy czerwonym winie [17].

Wiele badań potwierdza możliwość zredukowania ilości powstających podczas obróbki cieplnej heterocyklicznych amin aromatycznych poprzez dodatek antyoksydantów takich jak: witamina E czy ekstrakty rozmarynu, czosnku, szałwii oraz tymianku. **Czerwone wino, piwo, ekstrakty roślinne oraz mieszanki przypraw zawierających antyoksydanty dodane do marynaty zastosowanej przed smażeniem mięsa inhibują powstawanie heterocyklicznych amin. Ekstrakt z hibiskusa dodany do marynaty zmniejsza powstawanie PhIP oraz MeIQx podczas grillowania mięsa bez negatywnych zmian sensorycznych mięsa [7].**

Zmniejszenie aktywności mutagennej mięsa wołowego poddanego obróbce wysokotemperaturowej, tj.: smażeniu można osiągnąć poprzez wstępną obróbkę mięsa w kuchni mikrofalowej. Zabieg ten redukuje ilość prekursorów HAA (kreatyna, kreatynina, aminokwasy, glukoza) w próbce mięsa, przy jednoczesnym braku powstawania HAA, ponieważ temperatura takiej obróbki jest niższa od temperatury syntezy amin heterocyklicznych. Dzięki temu przy docelowej metodzie przygotowania mięsa w wysokiej temperaturze powstających HAA jest mniej z powodu mniejszej ilości substratów ich syntezy. **Pozwala to na zmniejszenie mutagenności o 3 do 9 razy (test na *Salmonella* TA98) w stosunku do próbek nie poddanych wstępnej obróbce [5].**

CEL PRACY

Celem pracy przedstawionej w artykule było zbadanie zawartości heterocyklicznych amin aromatycznych w mięsie wołowym o różnym stopniu dojrzałości, poddanym obróbce cieplnej – grillowaniu na grillu elektrycznym i smażeniu.

MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

Materiałem badawczym były dwa rodzaje mięśni: mięsień lędźwiowy większy – polędwica (*psaos major*) – stosowany symbol P oraz mięsień pośladowy średni – rostbef (*gluteus medius*) – stosowany symbol R. Mięśnie te zostały pobrane od 10 różnych zwierząt doświadczalnych (walców) poddanych ubojowi w 20-23 miesiącu życia. Próbkę pobrano bezpośrednio z rzeźni trzeciego dnia od daty uboju. Mięśnie były przechowywane w warunkach chłodniczych (w temperaturze od -1 do 0°C) w próżniowo zamkniętych opakowaniach. Po 5, 10 i 15 dniach przechowywania mięśni, z każdej próbki pobierano po dwa steki o grubości 2,5 cm, które następnie poddawano:

- smażeniu na oleju rzepakowym w temperaturze 180°C ± 5 (S),
- grillowaniu z wykorzystaniem grilla elektrycznego, temperatura powierzchni grilla wynosiła 230°C (GA).

Wszystkie próbki poddawano obróbce termicznej do momentu osiągnięcia temperatury 70°C w geometrycznym środku. W tab. 1. przedstawiono charakterystykę parametrów smażenia i grillowania mięsa wołowego, podając czas stosowanej obróbki oraz jej wydajność.

Tabela 1. Charakterystyka parametrów smażenia i grillowania mięsa wołowego

Table 1. Characteristics of cooking parameters of frying and grilling beef

Czas dojrzewania [dni]	Nazwa i symbol mięsna	Smażenie 180°C/70°C (S)		Grillowanie 230°C/70°C (GA)	
		Wydajność [%]	Czas obróbki [min]	Wydajność [%]	Czas obróbki [min]
5	<i>psaos major</i> (P)	26,9 ± 2,5	9,3 ± 0,9	17,1 ± 0,6	2,3 ± 0,1
	<i>gluteus medius</i> (R)	31,6 ± 2,6	9,5 ± 1,0	26,1 ± 1,2	3,2 ± 0,8
10	<i>psaos major</i> (P)	28,6 ± 0,9	8,1 ± 0,2	19,8 ± 0,8	2,2 ± 0,1
	<i>gluteus medius</i> (R)	33,3 ± 1,3	9,2 ± 0,1	26,2 ± 0,2	1,6 ± 0,2
15	<i>psaos major</i> (P)	31,1 ± 2,0	10,6 ± 1,0	20,8 ± 1,1	2,1 ± 0,2
	<i>gluteus medius</i> (R)	35,3 ± 0,8	9,8 ± 1,0	28,7 ± 0,6	1,9 ± 0,1

Źródło: Badania własne

Oznaczanie zawartości HAA

Odczynniki chemiczne – wykorzystano standardy 15 heterocyklicznych amin aromatycznych: – 2-amino-3-metylo-3H-imidazo[4,5-f]chinolina (IQ), – 2-amino-3,4-dimetylo-3H-imidazo[4,5-f]chinolina (MeIQ), – 2-amino-3-metylo-3H-imidazo[4,5-f]chinoksalina (IQx), – 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina (8-Me-IQx), – 2-amino-3, 4, 8-trimetylo-3H-imidazo[4,5-f]chinoksalina (4,8-DiMeIQx), – 2-amino-3,7,8-trimetylo-3H-imidazo[4,5-f]chinoksalina (7,8-DiMeIQx), – 2-amino-3,4,7,8-tetrametylo-3H-imidazo[4,5-f]chinoksalina (4,7,8-TriMeIQx), – 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna (PhIP), – octan 3-amino-1,4-dimetylo-5H-pirydo[4,3-b]indolu (Trp-P-1), – octan 3-amino-1-metylo-5H-indolu (Trp-P-2), – 2-amino-5-fenylpirydyna (Phe-P-1), – 2-amino-9H-pirydo[2,3-b]indol (AαC), – 2-amino-3-metylo-9H-pirydo[2,3-b]indol (MeAαC), – 9H-pirydo[3,4-b]indol (norharman), – 1-metylo-9H-pirydo[3,4-b]indol (harman).

Standardy zakupiono w Toronto Research Chemicals (TRC). Kolumny do ekstrakcji oraz ziemię okrzemkową EXTrelut NT zakupiono w firmie Merck, ziemię okrzemkową Celite 512 w Sigma Aldrich, zaś odczynniki do ekstrakcji i chromatografii cieczowej w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne (POCH).

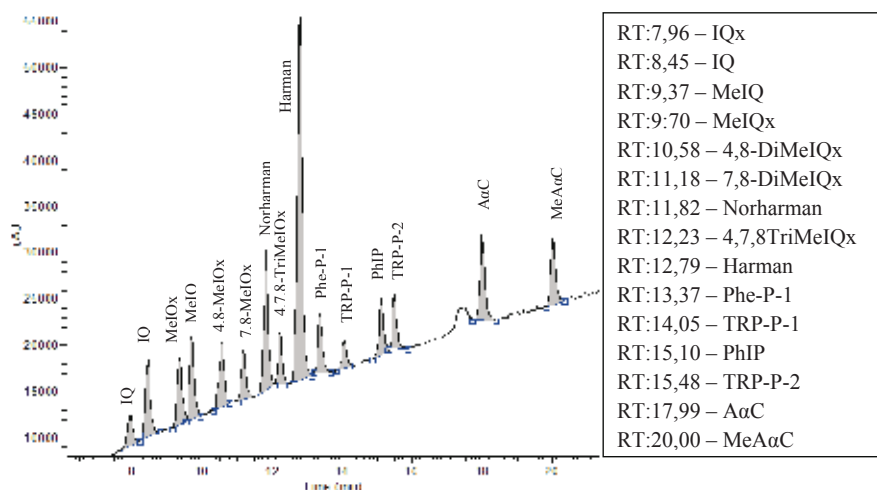
Rozdział chromatograficzny – heterocykliczne aminy aromatyczne były rozdzielane na wysokosprawnym chromatografie cieczowym. Na rys. 1. przedstawiono wyniki rozdzielania chromatograficznego 15 oznaczanych HAA. Analizy wykonywano przy użyciu standardów heterocyklicznych amin aromatycznych. Chromatogram stanowił podstawę do analiz zawartości HAA w próbkach badanego mięsa. Oznaczanie HAA przeprowadzano przy użyciu spektrometru mas LCQ Fleet/APCI oraz detektora PDA oraz UV. Zastosowano kolumnę Thermo GOLC phenyl 150 x 2,1 mm o średnicy ziaren równej 1,9 μm. Badania przeprowadzono na układzie gradientowym przy stałym przepływie fazy ruchomej (250 μl/min). Fazę A stanowił 40mM kwas mrówkowy, doprowadzony do pH 7 przy użyciu wody amoniakalnej. Natomiast fazą B był 1% lodowaty kwas octowy w acetonitrylu. Zastosowany program gradientowy: 0 min. – 5% B, 0-30 min. 60% B, 30-34 min. 60% B, od 34 min. 5% B.

Statystyczną analizę wyników – analizę wariancji dla założonego p = 0,05 przeprowadzono przy wykorzystaniu programu EXCEL v. 2010.

WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA

W tabeli 2. zestawiono ilość heterocyklicznych amin aromatycznych powstałych w próbkach mięśni *psaos major* (P) i *gluteus medius* (R). Ilości te charakteryzują zależność między zawartością HAA a rodzajem stosowanej obróbki cieplnej oraz czasem przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych (dojrzewania). Badania nie wykazały obecności dwóch amin: Trp-P-1 oraz 4,7,8-TriMeIQx w żadnej z próbek mięsa. Żaden z użytych w badaniu procesów obróbki termicznej nie powodował powstawania tych amin. Są one niezwykle rzadkie w żywności. Potwierdzają to badania m.in. Kondjoyana i wsp. [11] oraz Quelhas i wsp. [17].

Aminami występującymi w badanych próbkach mięsa



Rys. 1. Rozdziel chromatograficzny 15 standardów heterocyklicznych amin aromatycznych.

Fig. 1. Chromatographic separation of 15 heterocyclic aromatic amines.

Źródło: Badania własne

były najczęściej: Harman (1,87-6,58 ng/g), Norharman (0,54-2,50 ng/g), PhIP (0,18-2,03 ng/g) i 8-DiMeIQx - mieszanina izomerów 4,8- i 7,8-DiMeIQx (0,18-1,61 ng/g). Inne badane heterocykliczne aminy aromatyczne występowały w próbkach mięsa w mniejszych ilościach, ich zawartość wynosiła < 1 ng/g. Jedynym wyjątkiem była amina AαC, której ilość w próbkach mięśnia lędźwiowego większego (P) poddanego procesowi grillowania wynosiła 1,12-1,45 ng/g.

Na rys. 2. porównano sumaryczną zawartość HAA w mięsie wołowym poddanym grillowaniu i smażeniu. Z danych wynika, że najwięcej heterocyklicznych amin aromatycznych powstało w mięsie grillowanym (9,35 ng/g), a mniej

w mięsie smażonym (odpowiednio 6,75 ng/g) (ANOVA, $p < 0,05$).

Podczas grillowania mięso poddane było działaniu temperatury 230°C. Jest to najwyższa użyta w doświadczeniu temperatura obróbki (tabela 1), dla smażenia wynosiła ona 180°C. Porównując czas trwania grillowania oraz smażenia można stwierdzić, jak istotną rolę w procesie powstawania amin aromatycznych pełni ten czynnik. Grillowanie trwało od 1,6 do 2,3 min., kilka razy krócej od smażenia (od 8,1 do 10,6 min.). Pomimo tego w wołowinie grillowanej powstawało dużo więcej HAA.

Sinha i wsp. [18] wykazali, że najmniej HAA w wołowinie poddanej obróbce wysokotemperaturowej powstaje podczas pieczenia, a znacznie więcej podczas smażenia i grillowania. Dane literaturowe wskazują także,

że podczas pieczenia wołowiny nie powstaje bądź powstaje w znikomej ilości amina AαC oraz MeAαC [13], których obecność stwierdza się po smażeniu i grillowaniu wołowiny.

W mięsie grillowanym obecność IQ i IQx nie została stwierdzona. Podobnie jest w przypadku MeIQx. Niewielkie ilości tych amin wykryto natomiast w mięsie smażonym. W przypadku PhIP najwyższą zawartość stwierdzono w grillowanym mięśni lędźwiowym większym (P) – od 1,43 do 2,03 ng/g. Dla mięśnia pośladowego średniego (R) wartości te są niższe i wynoszą od 0,1 do 1,27 ng/g. Podobną zależność można zauważyć dla AαC, która w większych

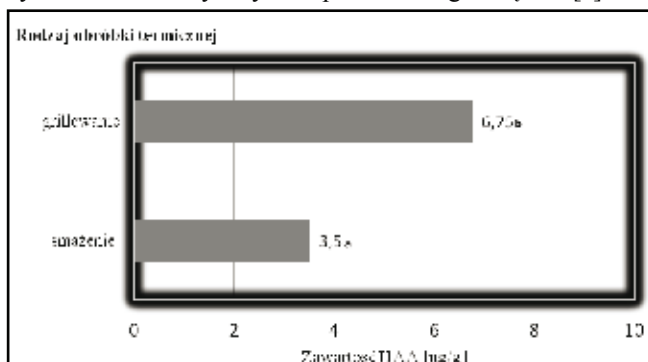
Tabela 2. Zawartość heterocyklicznych amin aromatycznych [ng/g] w badanych próbkach mięsa wołowego [P – polędwica (*psaos major*), R – rostbef (*gluteus medius*); 5-10-15 – czas dojrzewania (dni); nw. – nie wykryto]

Table 2. Heterocyclic aromatic amines content [ng / g] of the test samples of beef [P – tenderloin (*psaos major*), R – roast beef (*gluteus medius*); 5-10-15 – ripening time (days); nw. - not detected]

Rodzaj obróbki termicznej	Rodzaj mięśnia i czas dojrzewania	IQx	IQ	MeIQx	MeIQ	4,8Di MeIQx	7,8Di MeIQx	Norharman	Harman	Phe-P-1	TRP-P-2	PhIP	AαC	MeAαC
S – smażenie	P5	nw.	nw.	nw.	nw.	0,49±0,01	0,62±0,10	0,54±0,05	1,87±0,22	0,09±0,01	nw.	0,18±0,13	0,1±0,02	0,03±0,01
	P10	nw.	nw.	0,23±0,08	nw.	1,22±0,02	1,11±0,11	2,28±0,12	2,33±0,53	0,08±0,01	nw.	0,42±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01
	P15	nw.	nw.	0,54±0,12	nw.	1,40±0,11	1,61±0,01	2,50±0,01	3,37±0,67	0,12±0,01	nw.	0,68±0,01	0,16±0,01	0,14±0,02
	R5	nw.	nw.	0,38±0,01	nw.	0,18±0,01	0,54±0,04	0,43±0,06	2,50±1,40	0,06±0,01	nw.	0,51±0,02	0,04±0,01	0,12±0,01
	R10	0,02±0,01	0,12±0,01	0,41±0,01	nw.	0,33±0,02	0,74±0,03	1,11±0,03	2,13±0,38	0,09±0,01	nw.	0,49±0,01	0,07±0,01	0,21±0,01
	R15	0,03±0,01	0,21±0,01	0,47±0,02	nw.	0,39±0,04	0,70±0,01	1,42±0,07	2,73±0,63	0,08±0,01	nw.	1,29±0,18	0,1±0,01	0,29±0,02
GA – grillowanie na grillu elektrycznym	P5	nw.	nw.	nw.	0,09±0,01	0,89±0,06	0,48±0,03	0,77±0,05	4,57±0,70	0,60±0,04	0,07±0,02	1,61±0,06	1,12±0,01	0,26±0,02
	P10	nw.	nw.	nw.	0,19±0,01	1,00±0,01	0,63±0,03	0,99±0,04	6,58±0,54	0,51±0,02	0,13±0,01	1,43±0,21	1,21±0,01	0,3±0,02
	P15	nw.	nw.	nw.	0,29±0,01	1,14±0,005	0,73±0,07	1,24±0,02	6,45±0,34	0,53±0,09	0,15±0,01	2,03±0,13	1,45±0,07	0,35±0,02
	R5	nw.	nw.	nw.	nw.	0,23±0,05	0,25±0,04	0,57±0,20	3,22±0,91	0,07±0,02	nw.	0,09±0,1	0,39±0,01	0,11±0,01
	R10	nw.	nw.	nw.	nw.	0,37±0,02	0,34±0,02	0,63±0,07	2,06±0,37	0,20±0,01	nw.	1,27±0,073	0,63±0,04	0,1±0,01
	R15	nw.	nw.	nw.	nw.	0,55±0,06	0,41±0,01	0,73±0,03	3,71±0,03	0,28±0,01	nw.	1,16±0,03	0,83±0,03	0,11±0,01

Źródło: Badania własne

ilościach występowała w mięśni *psaos major* (P) (1,12-1,45 ng/g). Proces smażenia natomiast powodował powstawanie niewielkich ilości AαC. Poziom tej aminy niezależnie od rodzaju mięśnia nie przekraczał 0,16 ng/g. Poziom 4,8-DiMe-IQx w mięśni *psaos major* (P) był wyższy niż w *gluteus medius* (R) zarówno w mięsie poddanym procesowi smażenia, jak i grillowania. W grillowanym mięśni lędźwiowym większym (P) zawartość tej aminy wynosiła 0,89-1,14 ng/g, w mięśni pośladkowym średnim (R) 0,23-0,55 ng/g. W mięsie smażonym ilości te wynosiły odpowiednio 0,49-1,4 ng/g oraz 0,18-0,39 ng/g. Porównanie zawartości heterocyklicznych amin aromatycznych w próbkach mięsa grillowanego oraz smażonego potwierdziło istniejący wpływ rodzaju mięśnia na syntezę HAA, opisywany w literaturze. W próbkach mięśnia lędźwiowego większego powstało więcej HAA niż w mięśni pośladkowym średnim. Różnice te wynikają ze składu chemicznego mięśnia. Na ilość powstających HAA ma wpływ zawartość prekursorów w próbce. Mięsień lędźwiowy większy charakteryzuje się bardzo wysoką zawartością kreatyniny oraz wolnych aminokwasów, co przyczynia się do zwiększonej syntezy heterocyklicznych amin aromatycznych w próbkach tego mięśnia [2].



^{a, b/} różne oznaczenia literowe świadczą o istotnych statystycznie różnicach dla porównywanych wartości średnich

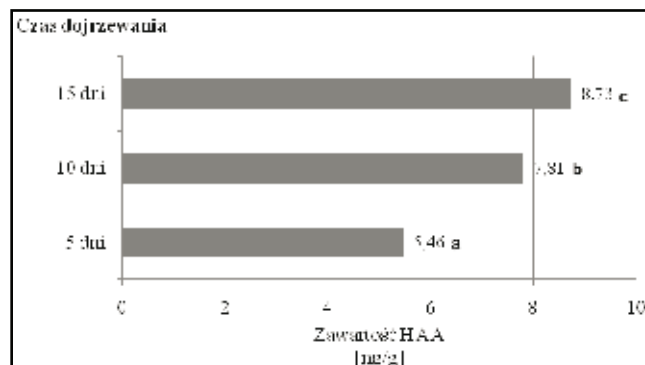
Rys. 2. Przeciętna, sumaryczna zawartość HAA w mięsie wołowym w zależności od rodzaju zastosowanej obróbki termicznej.

Fig. 2. Total content of HAA in beef meat depending on the type of thermal treatment.

Źródło: Badania własne

Na rys. 3. przedstawiono sumaryczną zawartość heterocyklicznych amin aromatycznych w próbkach mięsa poddanych działaniu obróbki termicznej w zależności od czasu dojrzewania mięsa. Mięso dojrzewające 5 dni zawierało 5,46 ng/g HAA, 10 dni – 7,81 ng/g, natomiast w mięso po 15 dniach dojrzewania – 8,73 ng/g. Z danych wynika, że **im dłuższy jest czas dojrzewania mięsa, tym więcej HAA powstaje podczas obróbki termicznej**. Aminy aromatyczne powstają na skutek działania wysokiej temperatury z substancji obecnych w mięsie. Ilość prekursorów HAA zawartych w mięsie zależy od stopnia jego dojrzałości. Wynika to faktu, iż reakcje chemiczne zachodzące w mięsie w trakcie kruszenia (dojrzewania) przyczyniają się do powstawania substratów niezbędnych do syntezy HAA. Dojrzewanie mięsa podczas jego przechowywania po uboju w temperaturze chłodniczej powoduje endogenną proteolizę skutkującą zmianami we właściwościach oraz strukturze tkanki mięśniowej oraz śródmięśniowej tkanki łącznej. Efektem

tego procesu jest zwiększenie ilości wolnych aminokwasów, w tym kreatyniny, będących substratami syntezy chemicznej HAA, zachodzącej pod wpływem obróbki termicznej [9, 12].



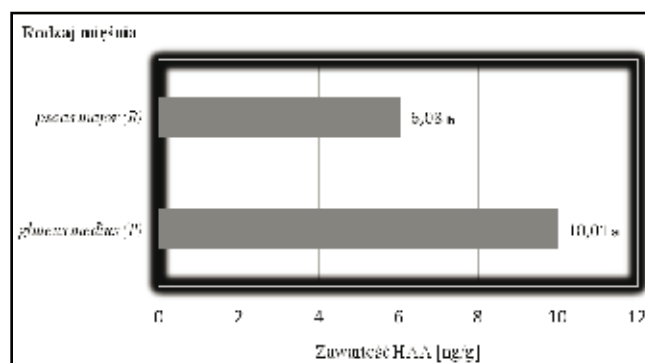
^{a, b, c/} różne oznaczenia literowe świadczą o istotnych statystycznie różnicach dla porównywanych wartości średnich

Rys. 3. Przeciętna, sumaryczna zawartość HAA w mięśniach wołowych w zależności od czasu dojrzewania mięsa.

Fig. 3. Total HAA content in beef muscle dependent of aging time.

Źródło: Badania własne

W przypadku smażenia i grillowania, zarówno w przypadku *gluteus medius* (R), jak i *psaos major* (P), zawartość amin była tym większa, im dłuższy był czas dojrzewania mięsa. Inna zależność zachodziła w czasie pieczenia, w którym wartości uzyskane dla próbek 10-dniowych były wyższe niż 5-dniowych, natomiast mięso dojrzewające 15 dni zawierało mniej HAA niż mięso 10-dniowe. Różnica ta nie jest bardzo duża, ale nadal jest to wartość większa niż w przypadku mięsa dojrzewającego 5 dni.



^{a, b/} różne oznaczenia literowe świadczą o istotnych statystycznie różnicach dla porównywanych wartości średnich

Rys. 4. Przeciętna, sumaryczna zawartość HAA w mięsie wołowym w zależności od rodzaju mięśnia: psaos major (P) oraz gluteus medius (R).

Fig. 4. The total HAA content in beef meat depending on the type of muscle: psaos major (P) and the gluteus medius (R).

Źródło: Badania własne

Na rys. 4. przedstawiono średnią zawartość HAA powstałych w wyniku obróbki termicznej dwóch różnych mięśni: *gluteus medius* i *psaos major*. W mięśni *gluteus medius* (R) stwierdzono prawie dwa razy więcej (10,01 ng/g) HAA niż w mięśni (P) (6,08 ng/g). Porównując wyniki uzyskane

dla polędwicy (*psaos major*) oraz rostbefu (*gluteus medius*), można stwierdzić, że różnica jest dobrze widoczna. Mięśnie te zostały poddane obróbce termicznej w takich samych warunkach (tabela 1). Potwierdza to hipotezę, że wpływ na powstawanie HAA ma zawartość prekursorów w badanej próbce mięśnia.

PODSUMOWANIE

Poddane analizie dane naukowe oraz wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają wpływ różnych zmiennych na formowanie HAA w mięsie podczas obróbki wysokotemperaturowej. Stwierdzono na przykład, że wyższa stosowana temperatura obróbki termicznej powoduje powstawanie większej ilości HAA. Podobnie w przypadku czasu dojrzewania mięsa - im był on dłuższy, tym w mięsie powstawało więcej HAA. Z badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wynika także, że najczęściej występującą aminą w mięsie wołowym poddanym obróbce termicznej jest PhIP, której poziom w niektórych produktach wynosił ponad 400 ng/g. Z uzyskanych badań wynika jednoznacznie, że czas obróbki termicznej wpływa wprost proporcjonalnie na zawartość HAA. Im dłuższy jest czas ogrzewania, tym więcej HAA powstaje w mięsie. Podczas grillowania wołowiny powstawało w mięsie więcej HAA niż podczas smażenia.

WNIOSKI

1. W mięsie wołowym poddanym obróbce termicznej, niezależnie od rodzaju mięśnia, zastosowanej obróbki termicznej oraz czasu dojrzewania, dominującymi aminami heterocyklicznymi są: Harman, Norharman, PhIP oraz mieszanina izomerów 4,8- i 7,8-DiMeIQx. W mięsie grillowanym nie stwierdza się aminoimidazoarenow (IQ oraz IQx), które są bardzo wrażliwe na działanie wysokiej temperatury i rozkładają się podczas procesu termicznego.
2. Poddawanie mięsa o wydłużonym czasie dojrzewania obróbce wysokotemperaturowej powoduje powstawanie zwiększonych ilości HAA z uwagi na fakt, że dojrzałe mięso zawiera więcej prekursorów HAA.
3. Procesem generującym syntezę największych ilości HAA w mięsie wołowym jest grillowanie, dlatego też w celu zapewnienia minimalnego powstawania HAA, mięso wołowe o dłuższym czasie dojrzewania, nie powinno być poddawane takiej obróbce.

LITERATURA

- [1] **AHN J., GRÜN I.U. 2005.** *Heterocyclic amines: 1. Kinetics of formation of polar and non polar heterocyclic amines as function of time and temperature.* Journal of Food Science, 70 (2), 173-179.
- [2] **ALAEJOS M.S., AFONSO A.M. 2011.** *Factors That Affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10, 52-108.
- [3] **ALAEJOS M.S., PINO V., AFONSO A.M. 2008.** *Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. A review.* Food Research International, 41, 327-340.
- [4] **COSTA M., VIEGAS O., MELO A., PETISA C., PINHO O., FERREIRA I.M.P.L.V.O. 2009.** *Heterocyclic aromatic amine formation in barbecued sardines (*Sardina pilchardus*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*).* J. Agric. Food Chem., 57, 3173-3179.
- [5] **FELTON J.S., FULTZ E., DOLBEARE F.A., KNIZE M.G. 1994.** *Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment.* Food Chem. Toxicol., 32, 897-903.
- [6] **FELTON J.S., SALMON C.P., KNIZE M.G. 2003.** *Carcinogens formed when meat is cooked,* Reciprocal Meat Conference.
- [7] **GIBIS M., WEISS J. 2010.** *Inhibitory effects of marinades with hibiscus extract on formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality fried beef patties.* Meat Science, 85, 735-742.
- [8] **JANOSZKA B. 2010.** *Heterocyclic aromatic amines in pan-fried meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic.* Food Chemistry, 120, 463-473.
- [9] **KOŁCZAK T., POSPIECH E., PALKA K., ŁĄCKI J. 2003.** *Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of psoas major and minor and semitendinosus muscles from calves, heifers and cows during post-mortem ageing.* Meat Science, 64, 69-75.
- [10] **KOŁCZAK T., POSPIECH E., PALKA K., ŁĄCKI J. 2003.** *Changes in structure of psoas major and minor and semitendinosus muscles of calves, heifers and cows during post-mortem ageing.* Meat Science, 64, 77-83.
- [11] **KONDJOYAN A., CHEVOLLEAU S., GREVE E., GATELLIER P., SANTE-LHOUELLIER V., BRUEL S., TOUZET C., PORTANGUEN S., DEBRAUWER L. 2010.** *Modelling the formation of heterocyclic amines in slices of longissimus thoracis and semimembranosus beef muscles subjected to jets of hot air.* Food Chemistry, 123, 659-668.
- [12] **KRISTENSEN L., PURSLOW P.P. 2001.** *The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins.* Meat Science, 58, 17-23.
- [13] **MESSNER C., MURKOVIC M. 2004.** *Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines.* Journal of Chromatography B, 802, 19-26.
- [14] **MURKOVIC M. 2007.** *Analysis of heterocyclic aromatic amines.* Anal. Bioanal. Chem., 389, 139-146.
- [15] **OZ F., KABAN G., KAYA M. 2010.** *Heterocyclic aromatic amine contents of beef and lamb chops cooked by different methods to varying levels.* Journal of Animal and Veterinary, 9, 1436-1440.
- [16] **PAIS P., SALMON C.P., KNIZE M.G., FELTON J.S. 1999.** *Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats and meat drippings.* J. Agric. Food Chem., 47, 1098-1108.

- [17] **QUELHAS I., PETISCA C., VIEGAS O., MELO A., PINHO O., FERREIRA I.M.P.L.V.O. 2010.** *Effects of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality pan-fried beef.* Food Chemistry, 122, 98-104.
- [18] **SINHA R., ROTHMAN N., BROWN E.D., SALMON C.P., KNIZE M.G., SWANSON C.A., ROSSI S.C., MARK S.D., LEVANDER O.A., FELTON J.S. 1995.** *High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method.* Cancer Res., 55(20), 4516-4519.
- [19] **SKOG K.I., JOHANSSON M.A.E., JÄGERSTAD M.I. 1998.** *Carcinogenic heterocyclic amines in model system and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake.* Food and Chemical Technology, 36, 879-896.
- [20] **SUGIMURA T., WAKABAYASHI K., NAKAGAMA H., NAGAO M. 2004.** *Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish.* Cancer Sci., 95, 290-299.
- [21] **TRAN N.I., SALMON C.P., KNIZE M.G., COLVIN M.E. 2002.** *Experimental and simulation studies of heat flow and heterocyclic amine mutagen/carcinogen formation in pan-fried meat patties.* Food and Chemical Toxicology, 40, 673-684.
- [22] **TURESKY R.J., GOODENOUGH A.K., NI W., MCNAUGHTON L., LEMASTER D.M., HOLLAND R.D., WU R.W., FELTON J.S. 2007.** *Identification of 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline: an abundant mutagenic heterocyclic aromatic amine formed in cooked beef.* Chem. Res. Toxicol., 20, 520-530.