

DIPLOMAMUNKA

Debreczeni Dorina

2020

Állatorvostudományi Egyetem

Élelmiszer-higiéniai Tanszék

A pácolás hatása a rákkeltő heterociklikus aminok keletkezésére és a mikroflórára
baromfi-húsban

TDK dolgozat

Készítette: Debreczeni Dorina

V. évfolyam

Témavezető: dr. Pleva Dániel

ÁTE, PhD hallgató

Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	2
2. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1 A heterociklikus aminok	3
2.1.1 A heterociklikus aminok mutagén hatásai.....	3
2.1.2 A heterociklikus aminok szerkezete és csoportosítása.....	4
2.1.3 A heterociklikus aminok metabolizmusa és a barnulás.....	5
2.2 A marinálás élelmiszer-kémiai hatásai.....	6
2.3 Antioxidáns tartalmú marinádok.....	6
2.4 A vitaminok hatásai.....	7
2.5 A marinálószer hatása az élelmiszerek baktériumflórájára	8
3. Célkitűzések	10
4. Anyag és módszer	11
4.1 Eszközök, vegyszerek, illetve húsminták.....	11
4.2 Előkísérletek, előmunkálatok	12
4.3 Élelmiszer-analitikai vizsgálatok	13
4.4 Mikrobiológiai vizsgálatok	14
4.5 Digitális színelemzés.....	14
4.6 Statisztikai elemzések	15
5. Eredmények.....	16
5.1 Élelmiszer-analitikai vizsgálatok eredményei.....	16
5.2 Mikrobiológiai vizsgálatok eredményei.....	18
5.3 Digitális színelemzés eredményei	18
6. Az eredmények megbeszélése.....	21
7. Összefoglaló.....	23
8. Summary	25
9. Irodalomjegyzék.....	27
10. Köszönetnyilvánítás	30

1. Rövidítések jegyzéke

HCA	heterociklikus amin
Harman	1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol
Norharman	9H-pirido[3,4-b]indol
PhIP	2-Amino-1-metil-6-fenilimiazol[4,5- <i>b</i>]piridin
MeIQx	2-amino-3,8-dimetil-imidazol[4,5- <i>f</i>]kinoxalin
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo(4,5- <i>f</i>)kinoxalin
IQ	2-amino-3metilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinolin
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
MS	tömegspektrometria (Mass Spectrometry)
IARC	Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (International Agency for Research on Cancer)
MRM	multiple reaction monitoring
ESI	electrospray ionization
TTD	time-to-detection
CFU	colony forming unit
SPE	szilárdfázisú extrakció

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A heterociklikus aminok

Napjainkban az egészséges táplálkozásra egyre nagyobb figyelmet fordítunk, emiatt élelmiszereink eredete, összetétele és elkészítési módja is egyre nagyobb hangsúlyt kap. Ételeink készítésekor számos káros vegyület keletkezhet, ami veszélyeztetheti az egészségünket. Húsételeink sem kivételek ez alól, esetükben kiemelt fontosságúak a karcinogén vegyületek, hiszen a rákos megbetegedések egyharmada az élelmiszerekkel és az étrenddel van összefüggésben (Kizil *et al.*,2011).

A húsételekben több hőkezelés hatására keletkező karcinogén vegyületet is leírtak, mint például a policiklusos aromás szénhidrogéneket, N-nitroso vegyületeket, lipid peroxidokat vagy a heterociklikus aminokat (Cross és Sinha, 2004).

Elsőként 1977-ben egy japán kutató, Sugimura írt a heterociklikus aminokról (HCA), mint potenciális karcinogén vegyületekről, amelyek 150°C feletti hőkezelés esetén keletkezhetnek a hús- és halételekben. Azóta már több mint 25 féle potenciálisan rákkeltő hatású heterociklikus amin került felfedezésre, és ezek az Ames teszt alapján mutagénebbek, mint a policiklusos aromás szénhidrogének vagy az N-nitroso vegyületek. Stavric (1994) kutatásaiban az aflatoxin B1-nél százszor, a benzo-a-pirénnél pedig 2000-szer erősebb mutagéneknek határozta meg a heterociklikus aminokat.

2.1.1 A heterociklikus aminok mutagén hatásai

Sugimura és munkatársai (2004) összefüggést találtak a vastagbél, hasnyálmirigy, gasztrointesztinális traktus, a tüdő, a máj, a prosztata, a bőr és mell daganatainak kialakulása és az elfogyasztott húsok heterociklikus amin tartalma között. Rohrmann és munkatársai (2009) vizsgálatai szerint a napi HCA bevitel emelkedésével a végbélrák kockázata is emelkedik. Az egyes heterociklikus aminok napi átlagos bevitele PhIP esetén 6 ng, míg MeIQx-ből 1,1 ng, DiMeIQx-ből 0,20 ng (Bogen és Keating, 2001). A vastagbélben leginkább a PhIP, IQ és MeIQx, az emlőmirigybe PhIP és az IQ, míg a prosztatában a PhIP felelős a rákos elváltozásokért. Ezek a fejlett országokban a legelterjedtebb ráktípusok, ami a nyugati életstílusnak tudható be, például magas zsír/hús

arányú élelmiszerek fogyasztása (Ohgaki, 2000). Stavric (1994) arra próbált összefüggéseket találni, hogy melyik hústípusban milyen HCA típusok fordulnak elő leginkább. Roston sült húsban IQ, MeIQ és PhIP, viszont sült marhahúsban MeIQx és DiMeIQx fordul elő nagyobb arányban. Puangsombat és munkatársai (2012) szerint mind a csirke, sertés, marha és hal elkészítése során több PhIP keletkezett, mint MeIQx és DiMeIQx, valamint csirkehúsban a különböző testtájakon különböző mennyiségeket mért az egyes anyagokból, de ebben az esetben is a PhIP értéke volt a legmagasabb.

A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (International Agency for Research on Cancer, IARC) különféle besorolásokkal látta el a heterociklikus aminokat. A 2B kategóriába azokat sorolta, amelyek lehetséges humán karcinogének, így a MeIQx-et, DiMeIQx-et és a PhIP-et, a 2A-ba pedig a nagy valószínűséggel karcinogén vegyületek, heterociklikus aminok közül az IQ sorolhatók (IARC, 1993).

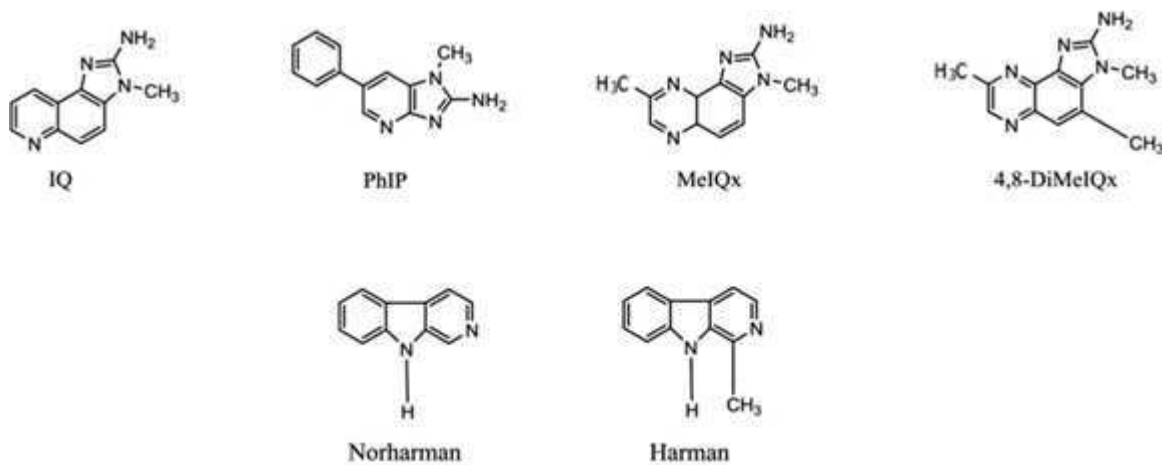
A harman és norharman az Ames teszt alapján nem tekinthetők mutagéneknek, de ko-mutagének, mert a mutagén HCA-k genotoxicitását növelik (Sugimura *et al.*, 1977).

2.1.2 A heterociklikus aminok szerkezete és csoportosítása

Szerkezetüket tekintve a HCA-k egy része imidazolgyűrűt és a gyűrűn kívüli aminocsoportot tartalmazó genotoxikus karcinogén (Abdulkarim és Smith, 1998). Nem a sütési hőmérséklet az egyetlen befolyásoló tényező, hiszen alacsonyabb hőmérsékleten is keletkezhetnek, ha a sütési idő túl hosszúvá nyúlik. A nedvesség, a pH, a zsírtartalom, a hús kreatin/kreatinin tartalma, illetve az elkészítési módja szintén nagy jelentőséggel bír a heterociklikus aminok kialakulásában (Skog *et al.*, 1998). A sült húsok mutagén koncentrációja tízszerese a főtt húsokénak (Emamgholizadeh, 2008). Kondjoyan és munkatársai (2016) kutatásaik révén rávilágítottak arra, hogy a hús kérgének vastagsága összefüggésben áll a benne található heterociklikus aminok mennyiségével, ugyanis a hússütés során azok a felszínen koncentrálnak.

A heterociklikus aminok két fő csoportra oszthatók, az IQ típusú és a nem IQ típusú heterociklikus aminokra. Az IQ típusúak, más néven aminoimidazoarének az ún. Maillard-reakció során keletkeznek az aminosavak, kreatin/kreatinin és redukáló cukrok reakciójából 150 °C felett, míg a nem IQ típusúak (aminokarbolinok) fehérjék pirolízise útján általában 300 °C felett jönnek létre. A Maillard-reakció, mely redukáló cukrok és

aminosavak között játszódik le, járul hozzá leginkább a hús felszínének sötétedéséhez, mint egy nem enzimatis barnulási reakció. Egyes tanulmányok szerint fruktóz jelenlétében a heterociklikus aminok keletkezésének mennyisége jelentősebb, mint glükóz esetében (Skog és Jägerstad, 1990). Skog és Jägerstad további kutatásai szerint a heterociklikus aminok keletkezése akkor a legmagasabb, ha a redukáló cukrok, az aminosavak és a kreatin mennyiségének aránya 1:2:2, ugyanis a cukrok képesek gátlómechanizmust aktiválni, ha egyenlő vagy magasabb mennyiségben vannak jelen, mint az aminosavak vagy a kreatin. Kutatásaink során az első csoportból a PhIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx vegyületeket vizsgáltuk, a nem IQ típusúak közül pedig a harmant és a noharmant (1. ábra).



1. ábra - Az általunk vizsgált öt HCA és az IQ szerkezeti képlete. Első helyen az IQ, mint a csoport névadó vegyülete, amelybe a PhIP, a MeIQx és a DiMeIQx is tartozik; a második sorban a nem IQ típusú HCA-k.
A kép forrása: Khan *et al.*, 2019

2.1.3 A heterociklikus aminok metabolizmusa és a barnulás

A heterociklikus aminok metabolizmusa az emberi szervezetben a CYP 450 enzimrendszer általi oxidációval kezdődik hidroxiamin származékokká. Erre példa a CYP1A2 általi N-hidroxiláció, amit követ egy 2-es típusú N-acetiltransferáz általi acetiláció. Az imidazó-rész gyűrűn kívüli aminocsoportjából létrejövő nitrénium-ion a végső karcinogén anyag ebben a bioaktivációs útvonalban. Kötődve a DNS bázisokhoz N-C kötések kialakításán keresztül DNS adduktokat hoz létre. A CYP1A2 általi metabolikus aktiváció kiváltható olyan fogyasztók esetében, akik étrendjében a heterociklikus aminok túl nagy mennyiségben fordulnak elő (Jägerstad és Skog, 2005).

A Maillard-reakció és a lipid oxidáció nem két egymástól független folyamat, ugyanis a lipid oxidációs termékek képesek befolyásolni a Maillard-reakciós utat és fordítva. Mindkét folyamat közti termékei és az analóg polimerizációs mechanizmusok az élelmiszerek megbarnulásához vezethetnek (Zamora és Hidalgo, 2005). Aaslyng és munkatársai kísérletében megállapította, hogy a csirkénél minden esetben találtak összefüggést a hús felszínének színe és a benne keletkező HCA koncentráció között, viszont nem feltétlenül minden sötét árnyalatú minta tartalmazott magasabb HCA koncentrációt, ami a heterociklikus aminok kémiaiailag összetett szerkezetére utalhat. A kutatásom színmérése annyiban tér el az Aaslyng-féle módszerektől, hogy az otthoni sütési eljárást standard körülmények között rekonstruáltam.

2.2 A marinálás élelmiszer-kémiai hatásai

A húsok elkészítési módjai (grillezés, barbecue, roston sütés, serpenyőben bő olajban sütés, főzés) mellett hasonló fontosságú, hogy hogyan készítjük elő az ételt. Az elmúlt években különböző módszereket vizsgáltak azzal kapcsolatban, hogy hogyan csökkenthető a rákkeltő aminok keletkezése, mint például a mikrohullámú előkezelés (Taylor *et al.*, 1986), vagy a különféle „pácolási” eljárások (Nerurkar *et al.*, 1999).

A köznapi értelemben vett pácolás, valójában marinálást jelent, ugyanis a pácoláskor a kívánt érzékszervi tulajdonságokat és a tartósságot a konyhasó mellett olyan páccanyagokkal alakítják ki, melyek nitritet vagy nitrátot tartalmaznak. Döntő részben a nitritek felelnek a mikrobaellenes hatásért is. Ezek hatására alakul ki enyhén savas közegben nitrogén-monoxid és mioglobin reakciójából a nitrozo-mioglobin, amelynek a húskészítmények jellegzetes vörös színe köszönhető (Laczay, 2018). A marinálás a köznapi értelemben vett előkészítési eljárás, melynek során a húsokat különféle összetevőkből álló vizes oldatokba forgatják, beinjektálják, áztatják (Latif, 2010; Vlahova-Vangelova és Dragoev, 2014). Míg a lúgos marinád oldatok foszfátokat tartalmaznak, addig a savasak szerves savakkal, vagy sóikkal készülnek. A harmadik típusú marinád oldat a víz-olaj emulzió.

2.3 Antioxidáns tartalmú marinádok

Az 1980-as évektől kezdődően fordítottak egyre nagyobb figyelmet azokra a mechanizmusokra, melyek során bizonyos kémiai ágensek képesek gátolni a mutagén HCA-kat, viszont a szakirodalom ellentmondásos annak tekintetében, hogy ez a gátló hatás

az antioxidáns kapacitásnak tudható-e be, avagy sem. Verdin (2002) kutatásai azt igazolták, hogy a heterociklikus amin képződés csökkenése az antioxidánsok hozzáadásával magyarázható, hiszen ezek képesek gátolni Maillard-reakció metabolitjainak képződését és a kreatinin oxidációját. Edenharder és munkatársai (1995) szerint a zöldbabban, brokkoliban és a spenótban lévő klorofill szignifikánsan csökkenti az IQ és MeIQx mutagén hatását. A zöld teában lévő katekinek, epigallokatekin-gallátnak, luteolinnek, quercetinnek és a koffeinsavnak a MeIQx és a PhIP keletkezésére nézve jelentős a gátló hatása (Guo *et al.*, 1995). A norharman mennyiségének redukálásában Dashwood (2002) vizsgálatai a szőlőmag kivonatnak és a fenyőkéregnek tulajdonítottak jelentős szerepet.

Egyes kutatások arra irányultak, hogy melyek azok a marinálószerke, amelyekkel hatékonyan lehet csökkenteni a rákkeltő aminok mennyiségét, mivel a heterociklikus aminok olyan összetevőkből keletkeznek (kreatin/in, szabad aminosavak, cukrok), melyek a marinád keverékekben is előfordulhatnak (Emamgholizadeh, 2008). Ezek a hőkezelés során egymással reakcióba lépve szabad gyököket képezhetnek. A vörösboros, sörös, különféle növényi kivonatokkal vagy kombinált fűszerkeverékekkel történő előkezelések effektív gátlói lehetnek a heterociklikus aminok képződésének antioxidáns tulajdonságaik révén. A fűszerek és növényi kivonatok hozzáadásával kontrollálható, vagy minimalizálható a lipid oxidáció is (Gutierrez *et al.*, 2009). Gibis és Weiss (2010) vizsgálatai alapján a hibiszkusz-, a rozmaring- és a szőlőmagkivonat a MeIQx, PhIP, norharman és a harman csökkentésében eredményesek. Az articsóka kivonat képes gátolni a HCA képződést különösen túlsütött marhahúsban és csirkemellben (Tengilimoglu-Metin, Kizil, 2017), valamint Quelhas és munkatársai vizsgálatai szerint a zöldtea kivonat is hatásos lehet, különösen a gyerekek esetében, akik alkoholos marinádokat nem fogyaszthatnak.

2.4 A vitaminok hatásai

Bizonyos vitaminok képesek interakcióba lépni a Maillard-reakció szubsztrátjaival, így hatással lehetnek a képződött termékek típusára és koncentrációjára. Kutatások igazolták, hogy a B6 vitamin képes mérsékelni a Maillard-reakció során keletkező termékek mennyiségét (Khalifah, Baynes, Hudson, 1999). Wong és munkatársai 11 vízben oldódó vitamin közül 6-nak – köztük az aszkorbinsavnak - hatását vizsgálta a PhIP-re, a MeIQx-re és a DiMeIQx-re nézve. A B-vitaminok – amelyek a leggyengébb antioxidánsoknak

bizonyultak – potenciális HCA-gátló hatást mutattak a kísérletek során. Az aszkorbinsav heterociklikus amin gátló hatását sült halon is vizsgálták, ahol nem mutatott jelentős szerepet. (Tai *et al.*, 2001), azonban sült marhahúsban kimagaslónak bizonyult, hasonlóan, mint a niacin és a piridoxamin (Wong *et al.*, 2012). Aszkorbinsav, B-vitaminok, butil-hidroxi-anizol és trolox marinádkhoz való hozzáadásuk után végeztek vizsgálatokat, melyek alapján megállapították, hogy a marinádkban való koncentrációjuk növelésével effektívebben csökkentették a koleszterin oxidációs termékeinek előfordulását (Lee *et al.*, 2007). Ezzel szemben az aszkorbinsav és az E-vitamin voltak a leghatékonyabbak alacsony koncentrációban is, ami valószínűleg az antioxidáns hatásukkal van összefüggésben.

2.5 A marinálószerrek hatása az élelmiszerek baktériumflórájára

Számos kutatás irányult arra, hogy a marinálásnak van-e antimikrobiális hatása. A száraz vörösborral, kakukkfűvel, fokhagymával, majorannával készült marinádok képesek visszaszorítani a mezofil aerob baktériumok szaporodását (Istrati, 2011). A kakukkfű és az oregano (szurokfű) thimol aktivitása révén eredményesen gátolta az *Escherichia coli* és a *Salmonella* Typhimurium szaporodását (Zhou, 2007). Azt is megfigyelték, hogy a savak más antimikrobiális komponensekkel való kombinációja, mint például az aszkorbinsav és az allil-izotiocianát, a timol és a citromsav vagy a grapefruitmag kivonata és a citromsav szinergista hatást mutatnak a tejsavbaktériumok növekedésének befolyásolására (Schirmer, Langsrud, 2010). A mikroorganizmusok szaporodásának gátlása leginkább attól függ, milyen lesz a hús kémhatása a marinálást követően, az antimikrobiális hatás pedig a gyenge szerves savak jelenlététől. Ez utóbbiak a heterociklikus amin képződést akár 75-100 %-kal gátolják.

A humán szalmonellás megbetegedések többségét az élelmiszerekkel felvett zoonotikus szerotípusok okozzák, melyek közül a *Salmonella* Enteritidis a legjelentősebb. Szaporodásához a 3,8-9,5 pH tartomány a megfelelő. Fertőzési forrásai közül a legszámtöbbek a tojással készült ételek, illetve a nem kellő mértékben hőkezelt húsok (főleg baromfihús). A tünetek általában 6-24 órával a kontaminált élelmiszer elfogyasztása után jelentkeznek, amelyek általános rosszulléttel, lázzal, hányással, hasmenéssel járnak. Nagyon ritkán septikaemiás tünetek is előfordulhatnak, de nagymértékben befolyásolja a tünetek súlyosságát a felvett baktériumok mennyisége, illetve a fertőzött emberek életkora: a gyerekek és a 65 év feletti idősök jobban ki vannak téve a fertőzésnek (Laczay, 2018).

Az aszkorbinsav *Salmonella* Enteritidis-re kifejtett bakteriosztatikus vagy baktericid hatása még nem teljesen tisztázott. Néhány vizsgálatban megfigyelték az *Escherichia coli*-val, *Staphylococcus aureus*-szal és a *Pseudomonas aeruginosa*-val kapcsolatos viselkedését, de *Salmonellára* kifejtett hatásáról nem áll rendelkezésre olyan szakirodalom, amely egyértelműen leírná, hogy képes-e gátolni a szaporodását.

3. Célkitűzések

Kutatásom egyik célja, hogy felmérjük, hogy az aszkorbinsav, mint potenciális antioxidáns marinálószerként alkalmazva milyen mértékben képes befolyásolni a baromfihús sütése során keletkező rákkeltő heterociklikus aminok keletkezését. Ez az elsődleges cél a húskészítmények iránti magas keresletből fakad, ugyanis a hús a lakosság nagy része számára elengedhetetlen része a teljes értékű táplálkozásnak. Viszont a fogyasztók nincsenek tudatában annak, hogy milyen veszélyekkel járhatnak az egyes elkészítési eljárások, illetve miként lennének kiküszöbölhetők megfelelő előkezelési műveletekkel. A baromfihús a fogyasztói oldalról leginkább keresett húsként képes lehet a lakosság nagy részének egészségi állapotát befolyásolni. Az IARC 2015-ben kiadott közleményében a vörös húsok egészségkárosító hatására hívta fel a figyelmet, ugyanis a rákkeltő vegyületek prekursorait nagyobb arányban tartalmazzák, de mivel ezek a szubsztrátok nemcsak vörös húsokban fordulnak elő, kíváncsi voltam, hogy a baromfihús fogyasztása is hasonló kockázattal jár-e. A kémiai vizsgálatokat színelemzéssel egészítem ki, hogy felmérjem, van-e összefüggés a hús színe és HCA-tartalma között aszkorbinsav adagolása mellett.

Korábbi vizsgálatok ugyan foglalkoztak a marinálószerrel, mint heterociklikus amin gátló szerek alkalmazásával, de az aszkorbinsav hatásáról kevés szakirodalmi forrás áll rendelkezésünkre.

Az aszkorbinsav antioxidáns hatása tisztázott, azonban bakteriosztatikus és baktericid hatása még nem teljesen. A TDK kutatásom egy olyan kutatássorozat részét képezi, amelyben párhuzamosan vizsgálják a HCA-k keletkezését, és az azonos módon kezelt előzőleg *Salmonella* Enteritidis-szel kontaminált minták *Salmonella*-szennyezettségi szintjét. Emiatt kíváncsi voltam, hogy az aszkorbinsavas marinád hatással van-e a húskészítményekben fellelhető *Salmonella* szaporodására.

Az eredményeim hozzájárulhatnak ahhoz, hogy mélyebben megérthessük a marinálószerrel hatását az élelmiszer-biztonságra. Elősegíthetik azt is, hogy a jövőben az élelmiszer-higiéniái ismereteink bővülésének köszönhetően az élelmiszer-technológia olyan előkészítési eljárásokat tárjon a fogyasztók elé, melyek könnyedén elérhetőek mindenki számára és a lehető legkevesebb káros anyag keletkezésével járnak.

4. Anyag és módszer

4.1 Eszközök, vegyszerek, illetve húsminták

A csirkehúsok sütéséhez DeLonghi elektromos grillsütőt használtam, amelyet a Technológiai laboratórium állított rendelkezésemre. Az élelmiszer-kémiai vizsgálatokhoz a Toxikológiai laboratórium biztosította az ultra-nagy-hatékonyságú folyadékkromatográfhoz kapcsolt kvadrupol tandem tömegspektrométerét (UHPLC-MS/MS, Shimadzu LCMS-8030), hűthető asztali centrifugáját (Biofugeorimo R), bepárló rendszerét, homogenizáló és asztali rázógépet, botmixerét, Biotage VP mintabepárló rendszerét, szilárdfázisú extrakciós kádját, ultrahangos tisztítóját és vízfürdős rázógépet (Certomat WR).

A felhasznált standard heterociklikus amin vegyületek: MeIQ_x, DiMeIQ_x, PhIP (Toronto Research Chemicals), harman (Fluka), norharman, és a belső standard, koffein (Sigma-Aldrich). Továbbá felhasznált anyagok: az acetonitril, dimetil-formamid, metanol (VWR), NaOH (Merck) és aszkorbinsav (Molar Chemicals).

A mikrobiológiai részhez felhasznált eszközök: Schott-Blueline típusú a redoxpotenciál-mérő, valamint a pH-mérő berendezés. A *Salmonellával* történt kísérletekhez a Enteritidis törzset a tanszék gyűjteményéből használtam fel, a peptonvíz összetevőiből a húspeptont a Biolab, a NaCl-ot a Reanal cégtől szereztük be.

A digitális színelemzéshez Konica Minolta Chroma Meter CR-400 színmérő gépet használtam.

A kísérletekben felhasznált minden fogyó és elektronikai eszközt az Állatorvostudományi Egyetem Élelmiszer-higiéniai Tanszéke biztosította számomra.

Mivel a csirkehús elkészítésekor az elsődleges cél az otthoni körülmények modellezése volt, ezért a hús beszerzésekor kiskereskedelmi forgalomban kapható Ross 308-as húshibird fajtát vásároltam a feldolgozásra.

4.2 Előkísérletek, előmunkálatok

A kísérleteket megelőzően előkísérletet végeztünk a Mikrobiológiai Laboratóriumban, hogy felmérjük, mennyire képes gátolni a különböző mennyiségű aszkorbinsavval kezelt sós peptonvíz a *Salmonellák* növekedését. Ehhez a húsokat még nem használtuk. A kémhatástól függő bakteriosztatikus hatást pH semlegesítéssel próbáluk kiküszöbölni, és ezzel az aszkorbinsav specifikus hatását kimutatni. Az előkísérlet ígéretesnek bizonyult, így élesben, húsmintán is elvégeztük a vizsgálatot.

A sütési kísérletekhez 1,6 cm vastag és átlagosan 44 g tömegű bőr és csont nélküli csirkemell darabokat használtam fel, melyeket ezt megelőzően a különböző koncentrációjú aszkorbinsavat tartalmazó 90 ml-es fiziológiás sóoldatban áztattunk 4 órán át. Az összesen 6 mintánál, az első üvegbe a 0,04 mg/ml, a másodikba 0,4 mg/ml, a harmadikba 4 mg/ml, míg a negyedikbe 40 mg/ml töménységű aszkorbinsav oldat került. Egy ötödik üvegbe csak fiziológiás sóoldatot mértünk, illetve a hatodik mintánkat nem áztattuk marinádba, csak szárazan sütöttük. Az áztatást követően a hússzeleteket kontakt grillen hőkezeltük 230 °C-on 10 percig. A sütés előtti kiindulási tömeget lemértük minden egyes húsdarabnál, illetve a sütés után is, ezzel lehetőségünk volt a sütés okozta tömegvesztéséget is felmérni.



2. ábra – A 2-es, 3-as és 4-es kezelés sütés után, a színmérés előtt

4.3 Élelmiszer-analitikai vizsgálatok

Az előzőleg megsütött csirkemell szeleteknél a hús kérgi, illetve belső részét különválasztottuk (kéreg- és átlagminták), majd felaprításuk és homogenizálásuk után 2 gramm kiindulási mintát használtunk fel mindegyikből, melyeket főzőpohárba mértünk ki. Az apróra vágott húshoz összesen 15 ml 1 M-os NaOH-oldatot adtunk. A mintához 12 µl 50000 ng/ml töménységű belső standard koffeint használtunk. Ezt a rázógépes inkubáció követte 90 percig, 60 °C-on 190/perc intenzitással, majd az így készült elegyet centrifugáltuk 10 percig, 10 °C hőmérsékleten, 8.000/perc fordulatszámmal.

A felülúszóból a számunkra fontos ágenseket kétlépéses szilárdfázisú extrakcióval (SPE) nyertük ki, melynek során elsőként Phenomenex Strata SI-1 Silica SPE oszlopokon az apoláris, majd Phenomenex C18 SPE oszlopokon a poláros szennyezőanyagok kerültek eltávolításra. A vizsgálandó célvegyületek leoldása a Silica SPE-ről etil-acetáttal, a C18 SPE-ről acetonitrillel történt. Ezt követte a szárazra párlás, melyet 50 °C hőmérsékleten és N₂ áramban végeztünk. A visszaoldás 500 µl acetonitrilben történt.

Az LC/MS analitikai módszer során Shimadzu LCMS-8030 HPLC-MS/MS rendszert használtuk. A fooyadékkromatográfia során elválasztott komponensek egy interface által kerülnek továbbításra az LC oszlopról az MS ionforrásba. A mozgó fázis egy LC rendszerben nyomás alatt lévő folyadék, illetve az MS analizátorok vákuum alatt működnek. Az elválasztási folyamatokhoz használt kromatográfias oszlop egy Phenomenex Kinetex C18 EVO 100 x 4.6 mm ID (2,6 µm részecskeméret) kolonna volt; 4 x 2 mm C18 védőkolonnával. Vizsgálataim során gradiens elúciót alkalmaztunk, az „A” eluens: 50 mM ammónium-acetát vízben (pH=5 ecetsavval), a „B” eluens: 0,1 % (v/v%) hangyasav acetonitrilben. Az áramlási sebesség: 0,4 ml/min; egy kromatográfias mérés ideje: 6 perc volt. Kolonna térhőmérséklete 30 °C, a mintaadagoló hőmérséklete 7 °C. Injektált térfogat 10 µl.

Az MS rendszerben történt mérések során az electrospray ionforrás (ESI) pozitív ionizációs módban volt. Méréseink során a multiple reaction monitoring (MRM) átmenetek vizsgálatát alkalmaztuk. A tömegspektrometriás detektálás a következő paraméterek mellett zajlott: interface: 4,5 kV, interface temperature 250 °C, desolvation line: 300 °C, heatblock: 350 °C, detektor: 1,78 kV, nebulising gas (N₂): 3 l/perc, drying gas (N₂): 15 l/perc. Ütközési gáz (Ar): 230 kPa.

4.4 Mikrobiológiai vizsgálatok

Ennek során az egyenként 44 grammos hússzeleteket beáztattuk 90 ml *Salmonella* Enteritidis-t és különböző dózisu aszkorbinsavat tartalmazó peptonvízbe, melyben 4 órát áztak. A *Salmonella* mennyisége megegyezett a kiindulási oldatokban, így a későbbi eltéréseket kizárólag az aszkorbinsav jelenléte, illetve mennyisége befolyásolhatta. Az aszkorbinsav-koncentráció az 1-es üvegben 0,04 mg/ml, a 2-esben 0,4 mg/ml, a 3-asban 4 mg/ml és a 4-esben 40 mg/ml volt, valamint az egyik üvegbe fiziológiás sóoldatot töltöttünk (0-ás üveg), ugyanúgy, mint az élelmiszer-analitikai vizsgálatoknál. A húsokat szándékosan nem sütöttük meg a vizsgálatok után, hiszen korábbi kísérleti tapasztalatok alapján a heterociklikus aminok képződéséhez alkalmazott hőhatás elpusztítja a *Salmonellát*, így nem derült volna ki, hogy az aszkorbinsavnak mekkora szerepe van.

A 4 órás inkubációt követően megvizsgáltuk, hogy a különböző aszkorbinsav-tartalmú léből a húsokba mennyi szívódott be. Minden hússzeletből 10 grammot vizsgáltunk redoxpotenciál-méréssel, hogy feltérképezzük a *Salmonella*-tartalmukat. Miután a húsok eltávolításra kerültek az üvegekből megmértük az aszkorbinsavas-peptonos folyadék kémhatását. Mivel a pH hatással van a *Salmonella* szerotípusok szaporodására (pH 3,8 alatt nem szaporodnak), ezért a kémhatások tudatában megállapíthatjuk, hogy az aszkorbinsav csak a savanyító képességével járul-e hozzá az esetleges antibakteriális hatáshoz, vagy tényleges specifikus hatással rendelkezik.

4.5 Digitális színelemzés

A csirkehúsok sütése után színmerést végeztünk, melynek során mindegyik hússzeleten 10 pontot mértünk meg a digitális mérőműszerünk segítségével. A mérési adatainkat három érték alapján elemeztük. Az „L” érték a világossági skálát jelöli, melynél a 0 érték a teljesen fehér színt, a 100 pedig a teljesen fekete színt jelenti. Az „a” érték a vörös szín tengely, amely minél inkább a negatívabb tartományban van, annál zöldebb, illetve minél inkább pozitív, annál vörösebb a hús színe. A „b” érték a sárga szín tengely, itt a negatív tartomány a kék színt jelenti, míg pozitív felé haladva a sárgát.

4.6 Statisztikai elemzések

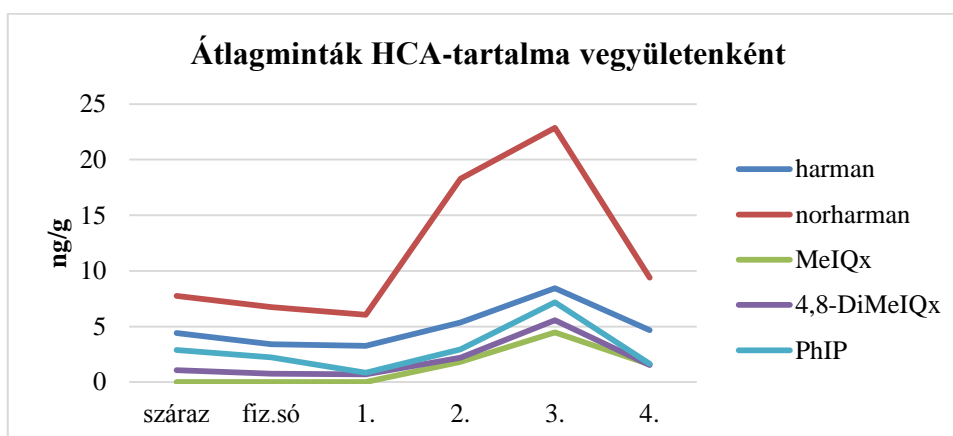
A statisztikai elemzések az R program 3.5.2-es verziójában készültek. A kísérlet során a kezelések között a színmérésben megjelenő különbséget varianciaanalízis (ANOVA) segítségével teszteltük. A szimultán szignifikanciaszint melletti páronkénti összehasonlításhoz Tukey-féle post-hoc tesztet a multcomp csomag (Torsten et al., 2008) segítségével használtuk.

5. Eredmények

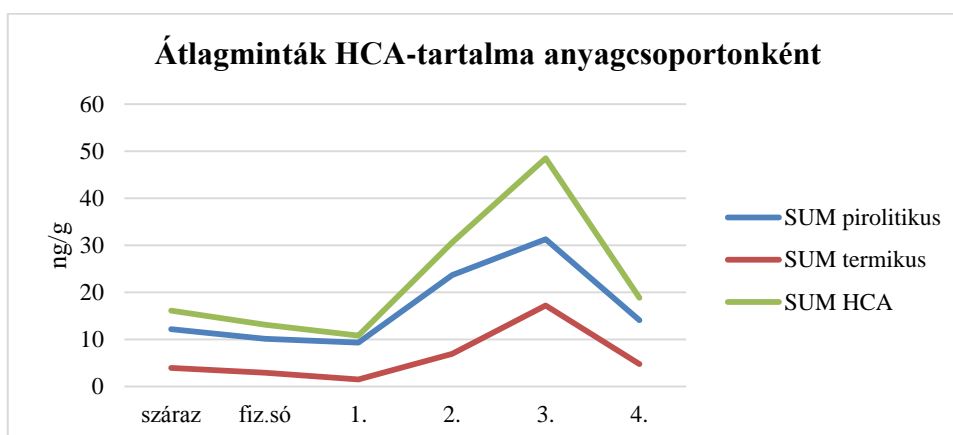
5.1 Élelmiszer-analitikai vizsgálatok eredményei

A száraz, kezeletlen minta esetén a kéregben egy nagyságrenddel több heterociklikus amin keletkezett, mint a hús belsejében, emiatt ennek változásai egészségügyi szempontból sokkal fontosabbak. A kéregben továbbá sokkal nagyobb arányban keletkeztek a termikus HCA-k, amelyek potenciális karcinogének, ezzel szemben a csak ko-karcinogén pirolitikus HCA-k, kisebb mennyiségben képződtek a kéregben.

Az átlagmintáknál a legtöbb anyagnál szignifikáns csökkenés figyelhető meg a száraz – fiz. só – 1. minták között, viszont a 2. és 3. aszkorbinsav dózis jelentősen megemelte a mennyiségüket, főleg a norharmanét (22,9 ng/g). A 4. minta HCA-tartalma többé-kevésbé visszacsökkent a száraz minta szintjére: a harman ugyanarra a szintre, a PhIP kissé alá, a norharman, MeIQx és a DiMeIQx kissé fölé emelkedett (3. és 4. ábra).

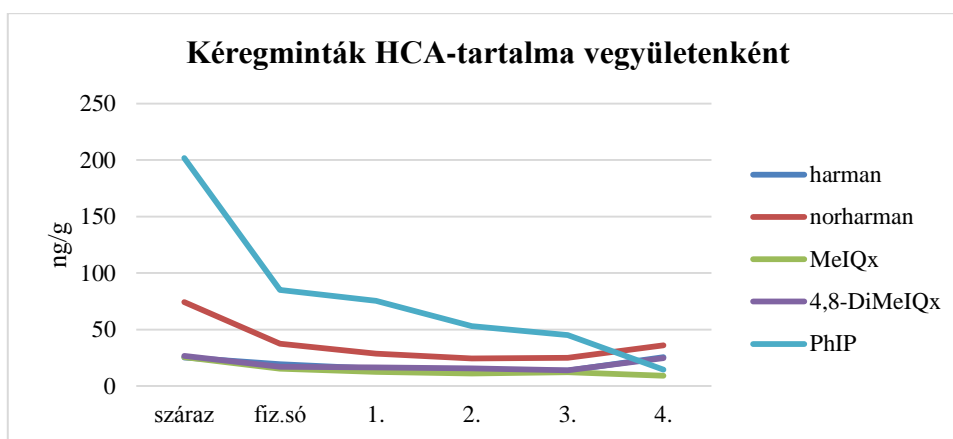


3. ábra - HCA-k mennyiségének változása a hús belsejében. A minták aszkorbinsav-tartalma: száraz – 0; fiz. só – 0; 1. – 0,04 mg/ml; 2. – 0,4 mg/ml; 3. – 4 mg/ml; 4. – 40 mg/ml

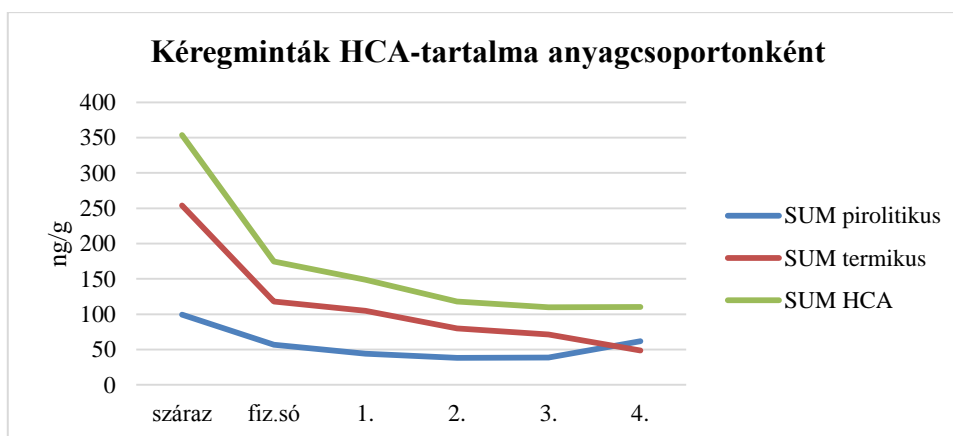


4. ábra - A HCA-k mennyiségének változása a hús kérgében, anyagcsoportonként. A minták aszkorbinsav-tartalma: száraz – 0, fiz. só – 0, 1. – 0,04 mg/ml, 2. – 0,4 mg/ml, 3. – 4 mg/ml, 4. – 40 mg/ml.

A kéregmintáknál sokkal egyértelműbben látszik a hatás – itt közvetlen hőhatásnak volt kitéve a hús. Megfigyelhető, hogy már a fizioiógias sóoldatos áztatás is felére (353,6 ng/g-ról 174,8 ng/g-ra, a 49,4%-ára) csökkentette a heterociklikus aminok összmenntységét (SUM HCA) azonos hőkezelés után. A 2. aszkorbinsav töménységig mindegyik HCA menntysége csökkent, a 2.-tól megfordult a tendencia a pirolitikus HCA-knál, és a 3. és a 4. aszkorbinsav koncentráció már egyre növelte a menntységüket. A termikus HCA-knál a PhIP, amelyből alapvetően a legtöbb keletkezett a száraz mintában (201,8 ng/g), továbbra is szignifikánsan csökkent, a MeIQx és a DiMeIQx az 1.-2.-3. minták esetén nem mutatott szignifikáns változásokat. A 4. mintánál a MeIQx menntysége újra szignifikánsan csökkent, a DiMeIQx-é szignifikánsan nőtt, a kiindulási (száraz minta) szintre (5. és 6. ábra).



5. ábra - HCA-k menntységének változása a hús kérgében. A minták aszkorbinsav-tartalma: száraz – 0; fiz. só – 0; 1. – 0,04 mg/ml; 2. – 0,4 mg/ml; 3. – 4 mg/ml; 4. – 40 mg/ml



6. ábra - HCA-k menntységének változása a hús kérgében, anyagcsoportonként. A minták aszkorbinsav-tartalma: száraz – 0; fiz. só – 0; 1. – 0,04 mg/ml; 2. – 0,4 mg/ml; 3. – 4 mg/ml; 4. – 40 mg/ml

5.2 Mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

A 0-s, 1-es és 2-es minta esetén nem volt számottevő pH változás (5,45-5,93), és a redoxpotenciál-mérés során sem tapasztaltunk nagy eltéréseket a TTD (time-to-detection) időkben (~5,5 óra). Az ebből meghatározott *Salmonella* Enteritidis-számok is ugyanazon nagyságrenden belül alakultak (10^7).

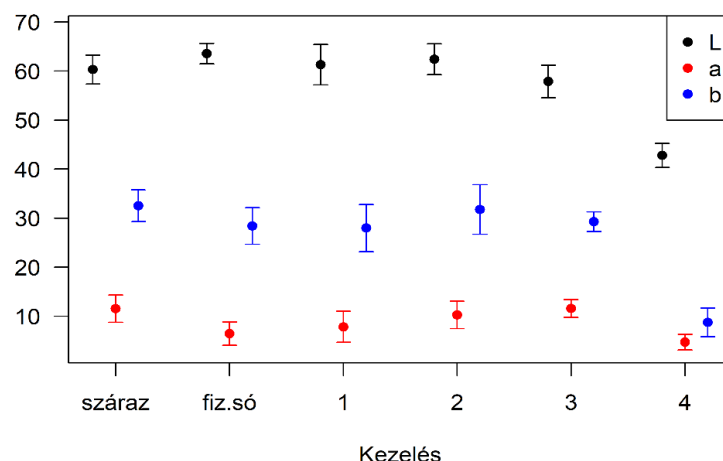
A 3-as üvegben a pH már közelített a *Salmonella* pH-tűrészhatárának aljához (4,08), ez lassította az osztódását, a 4-esnél pedig annyira lecsökkent a kémhatás (2,93), amit már nem tolerál a *Salmonella* Enteritidis, egyáltalán nem tapasztaltunk baktériumszaporodást (1. táblázat).

1. táblázat - A különböző aszkorbinsav-koncentrációk hatása a *Salmonella* Enteritidis szaporodására és a minta pH-jára

<i>Minta sorszáma</i>	<i>Aszkorbinsav (mg/ml)</i>	<i>TTD (óra)</i>	<i>IgN</i>	<i>N (cfu/g)</i>	<i>pH</i>
0	0	5,33	5,46	2,35E+07	5,91
1	0,04	5,83	5,16	1,34E+07	5,93
2	0,4	5,5	5,36	1,96E+07	5,45
3	4	8,17	3,76	5,65E+05	4,08
4	40	-	-	-	2,93

5.3 Digitális színelemzés eredményei

Az „L” értékek (világosság) esetében a száraz, a fiziológias sóoldatban áztatott és az 1-es, 2-es, 3-as koncentrációjú kezeléseknél nem tudtunk egyértelmű tendenciát leírni, a közöttük lévő eltérések hullámzóak ($L=57,89...63,57$). A legtöményebb aszkorbinsavas kezelés (4-es) viszont kiugró és erősen szignifikáns különbséget ($p<0,001$) mutatott az összes többi mintához képest ($L=42,79$). Ez már szabad szemmel is látható módon sötétebb, égettebb árnyalatú volt, aminek oka akár magának az aszkorbinsavnak az odaégése is lehetett, mert ebben a mintában nem mértünk kiugró HCA értékeket, így feltehetően nem a hús részei égtek meg (2. táblázat, 7. ábra).



7. ábra - A színérés változóinak átlaga és szórása kezelési csoportonként

2. táblázat - A színérés „L” értékének eredményei; „++”: szignifikáns, „+”: marginálisan szignifikáns, „-”: nem szignifikáns különbség

„L”	száraz	fiz. só	1	2	3	4
száraz		-	-	-	-	++
fiz. só			-	-	++	++
1				-	-	++
2					++	++
3						++
4						

Az „a” értékeknél (vörösség) a száraz kezelés (a=11,55) szignifikánsan magasabb értéket mutatott, mint a fiziológiás sóoldatos (a=6,46), illetve ugyanez mondható el a fiziológiás sóoldatos és az 1-es, 2-es koncentrációjú kezelés közti különbségről is, ahol a fiziológiás sóoldatos áztatott kezelés szignifikánsan alacsonyabb volt. A 4-es kezelés (a=4,71) és a fiziológiás sóoldatos kezelés között nem volt szignifikáns különbség. Az aszkorbinsavas marinád ezzel szemben elősegítette a pirulást, kivéve a 4-es koncentrációjú minta esetében, ahol égés ment végbe, bár a 4-es kezelés a szárazhoz, a 2-eshez és a 3-ashoz képest szignifikáns különbséget mutatott, az 1-eshez viszonyítva pedig marginálisan szignifikáns volt. A 2-es kezelés csak a fiziológiás sóoldatos kezeléstől mutatott szignifikáns eltérést, a 3-as koncentrációjú azonban a fiziológiás sóoldatoson kívül az 1-estől is. (3. táblázat, 7. ábra)

3. táblázat - A színmérés „a” értékének eredményei; „++”: szignifikáns, „+”: marginálisan szignifikáns, „-”: nem szignifikáns különbség

„a”	száraz	fiz. só	1	2	3	4
száraz		++	++	-	-	++
fiz. só			-	++	-	-
1				-	++	+
2					-	++
3						++
4						

A „b” értékek (sárgaság) esetében szinte sehol nem voltak szignifikáns különbségek, csak a 4-es koncentrációjú kezelésnél (b=8,76), ahol a fiziológiás sóoldatos, a száraz, az 1-es, a 2-es és a 3-as kezelésnél (b=27,98...32,50) is szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott. A 3-as kezelés csak a fiziológiás sóoldatostól és a 2-es kezeléstől tért el szignifikánsan, mindkettő esetben alacsonyabb a 3-as kezelés. (4. táblázat, 7. ábra)

4. táblázat - A színmérés „b” értékének eredményei; „++”: szignifikáns, „+”: marginálisan szignifikáns, „-”: nem szignifikáns különbség

„b”	száraz	fiz. só	1	2	3	4
száraz		-	-	-	-	++
fiz. só			-	-	++	++
1				-	-	++
2					++	++
3						++
4						

6. Az eredmények megbeszélése

Kutatásom három szálon futott, és ez a három szál egymást kiegészítve komplex információ megismerését segítette elő az aszkorbinsav ételmiszer-higiéniái jelentőségéről grillezett csirkehús esetén. Új ismeretekhez jutottunk a HCA képződést, a *Salmonella*-szaporodást és a Maillard-színreakciót befolyásoló képességéről, és ezzel újabb lehetőséget nyújthatunk a tudatos fogyasztóknak a hús-előkészítési szokásaik optimalálásához.

Az ételmiszer-kémiai mérések során a különböző töménységű aszkorbinsavoldatba áztatott, majd ugyanazon körülmények között hőkezelt csirkemellfilé-szeletek HCA tartalmát vizsgáltuk, a húsok kérgi és belső rétegét külön szedve. A belső részben az aszkorbinsav dózisának hatása nem mutatott tendencia jellegű befolyást: 2. és 3. töménységekben kimondottan megemelte a HCA-k mennyiségét, míg az 1. és 4. csökkentette, illetve nem változtatta lényegében az értéket. Az aszkorbinsavas áztatás 4 órája alatt lehetséges, hogy a különböző töménységű oldatokból nem a töménységgel arányos aszkorbinsav diffundált a hússzeletek belsejébe. A jövőben mindenképpen érdemes lenne pontosan visszamérni a hús aszkorbinsav tartalmát, amire jelenleg sajnos nem volt lehetőségünk.

Ezzel szemben a kéreg, ahol a HCA-k, azon belül is a karcinogén termikus HCA-k nagyobb mennyiségben keletkeztek, sokkal egyértelműbben mutatkozott meg az aszkorbinsav antioxidáns hatása. Dózissal összefüggő, szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a szárazon sütött mintához képest, már a fiziológiás sóoldat esetében is. Ezt a hatást az aszkorbinsav a különböző HCA-k esetében különböző töménységig fokozta, PhIP esetében, amely a legnagyobb mennyiségben keletkezett a száraz mintában, végig szignifikáns/marginálisan szignifikáns csökkenést mérhettünk; a pirolitikus HCA-k esetén viszont a túl nagy dózis megfordította a tendenciát. Ennek oka lehet az, hogy az aszkorbinsav a 4. minta esetén már akkora mennyiségben volt jelen a húsban, hogy a hő hatására maga is elkezdett oxidálódni, elégni. Ezt támasztja alá a színmérés eredménye is.

A digitális színelemzés analízálása során ugyanis a 4. dózis esetén kimondottan (szabad szemmel is láthatóan) feketés, sötét, odaégett színeképet mérhettünk. A többi minta (0., 1., 2., 3.) esetén sem az „L”, sem az „a”, sem a „b” érték nem mutatott különösebb eltérést a minták között, de a 4., legaszkorbinsavasabb kezelés mindhárom paraméter esetén szignifikáns eltérést idézett elő. Az aszkorbinsav a kéregben jelentős anti-HCA hatást fejtett ki, de ez a színeképből nem jelent meg, ugyanakkor a színösszetétel jelentős

eltolódása a 4. mintánál esetünkben nem jelentett szignifikáns HCA-szintemelkedést. Ez utóbbi ténylegesen az aszkorbinsav „odaégése” miatt történhetett, mert a hús odaégését jelző HCA-k szintje nem emelkedett egyértelműen. Érdeemes lenne a jövőben aszkorbinsav oxidációs termékeit vizsgálni az ilyen módon kezelt húsokban, hogy megismerhessük a színváltozás kiváltó okát és tisztában lehessünk a veszélyeivel.

A mikrobiológiai vizsgálat során az aszkorbinsavas marinád *Salmonella* Enteritidis-re gyakorolt specifikus hatását vizsgáltuk. Az eredmények alapján elmondható, hogy az aszkorbinsav nagyobb dózisban ténylegesen gátolta a *Salmonella* szaporodását, de ez inkább hozható összefüggésbe a savas kémhatással, mintsem antimikrobiális aktivitással. Azokon a szinteken (1., 2.) ahol a pH-t nem befolyásolta nagyban az aszkorbinsav, a 0-s, aszkorbinsav mentes mintával megegyező nagyságrendű *Salmonella*-szám jelentkezett, a csökkenő pH először csökkentette (3.) majd meg is állította (4.) a szaporodást. A hipotézis igazolásához egyrészt több mérésre, másrészt egy párhuzamos vizsgálatra lenne szükség egy bizonyítottan *Salmonella* ellenes hatású szerves sav azonos pH-ra beállított oldataiban kezelt sorral.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az aszkorbinsav mind toxikológiai, mind mikrobiológiai szempontból csökkentheti az élelmiszer-biztonsági kockázatot, de ehhez helyes dózisban kell alkalmazni, lehetőleg más szerekkal párhuzamosan, amik fokozhatják az élelmiszerekre kifejtett jó hatását. A HCA-k csökkentését segíthetik más antioxidánsok vagy növényi kivonatok, míg a mikrobiológiai biztonságot egyéb szerves savak egyidejű használatával érhetjük el.

7. Összefoglaló

Az ételkészítés során számos olyan káros anyag keletkezhet, amelyekre figyelmet kell fordítani az egészségmegőrzés céljából. A hőkezelés egy olyan ősidők óta alkalmazott eljárás, amellyel mind a növényi, mind az állati eredetű élelmiszerek biztonságosabbá tehetők mikrobiológiai szempontból, és jelentősen hozzájárul a tápanyagok felvehetőségének megkönnyítéséhez is. Egyre több kutatás utal azonban arra, hogy a túlzásba vitt hőkezelés problémákat okozhat, többek között a potenciális karcinogén vegyületek kialakulása miatt. Ilyen genotoxikus karcinogének a heterociklikus aminok (HCA-k), melyek magas hőmérsékleten jönnek létre hús és halételekben.

Szakirodalmi adatok szerint a HCA-k keletkezésének gátlására hatékony módszerek lehetnek az antioxidáns tartalmú marinádokkal történő előkezelések. Vizsgálatok igazolták, hogy a különféle zöldség és gyümölcs kivonatok mellett sok vitamin is fontos szereppel bír a HCA-k mennyiségének redukálásában. Az aszkorbinsav antioxidáns hatása tisztázott, de a HCA-k keletkezésére kifejtett hatása nem. Ugyanezen anyag bakteriosztatikus vagy baktericid hatása szintén kérdéses, ezért vizsgálataim egy része az aszkorbinsav HCA-k-ra gyakorolt hatására irányult, másik része pedig arra, hogy hogyan viselkedik a *Salmonella* Enteritidis aszkorbinsavas közegben.

Kísérleteink során az aszkorbinsav hatásait vizsgáltuk a különböző területeken. A vizsgálatok három részből tevődtek össze: mikrobiológiai és élelmiszer-analitikai vizsgálatokból, valamint digitális színelemzésből.

A kutatássorozat, amelynek az én TDK-kutatásom is része, párhuzamosan vizsgálja a HCA-k keletkezését, és az azonos módon kezelt előzőleg *Salmonella* Enteritidis-szel kontaminált minták *Salmonella*-szennyezettségi szintjét. Az aszkorbinsav HCA-k képződésére kifejtett hatása mellett így a *Salmonellával* való interakcióját is megvizsgáltuk, hogy mennyire befolyásolja a mikrobiológiai biztonságot.

A mikrobiológiai vizsgálat során *Salmonella* Enteritidist és NaCl-os peptonvizet tartalmazó edényekbe aszkorbinsavat mértünk különböző mennyiségekben és ebbe helyeztük a vizsgálatra szánt csirkemell mintákat. Inkubáció után megvizsgáltuk a húsok *Salmonella*-tartalmát redoxpotenciál-méréssel.

Az élelmiszer-analitikai vizsgálatok során ugyanígy, aszkorbinsavas marináddal kezelt szeleteket sütöttünk kontaktgrillen 230°C-on 10 percig kétoldalas sütést alkalmazva, melynek során folyamatosan mértük a maghőmérsékletet. Az aszkorbinsav HCA keletkezést gátló hatását vizsgáltuk a kutatás fókuszát képző öt vegyület (PhIP, MeIQx, DiMeIQx, harman, noharman) esetében. A minta-előkészítést követően a HCA-k mennyiségét UHPLC-MSMS műszer segítségével mértük.

Vizsgálatunk eredményeképpen jobban feltártuk az aszkorbinsav élelmiszer-kémiai és mikrobiológiai – hőkezelés során potenciálisan előnyös – tulajdonságait.

8. Summary

Many harmful substances may be produced during food preparation needing to be paid attention. Heat treatment has been used since ancient times. It makes food of both plant and animal origin microbiologically safer and it makes easier the uptake of nutrients. However, more and more research suggests that excessive heat treatment can cause problems including the development of potential carcinogenic compounds. Such genotoxic carcinogens are the heterocyclic amines (HCA's) that are produced at high temperature in meat and fish meals.

According to the literature, pretreatment with marinades containing an antioxidant agent can be an effective method of decreasing the formation of HCA's. Studies show that in addition to various vegetable and fruit extracts, many vitamins play an important role in reducing the amount of HCA's. It is already proved that ascorbic acid has antioxidant activity but its effect on the formation of HCA's is not clarified completely. The bacteriostatic or bactericidal activity of ascorbic acid is also unrevealed yet. Therefore the first part of our study is focused on the anti-HCA effect of ascorbic acid and the other part of it investigates the effect of ascorbic acid rich environment on *Salmonella*.

In our experiments we compared the effects of ascorbic acid in different areas. The study consisted of three parts: microbiology, food chemistry and digital spectral analysis.

The series of studies that includes my TDK thesis investigates in parallel the formation of HCA's and the *Salmonella* content of samples that were previously artificially contaminated with *Salmonella* Enteritidis. In addition to the effect of ascorbic acid on the formation of HCA's, its interaction with *Salmonella* was also investigated for its effect on microbiological safety.

During the microbiological examination, ascorbic acid was added to the flasks containing *Salmonella* Enteritidis in NaCl peptone water in different amounts and the chicken breast specimens were placed therein. After incubation, the *Salmonella* content of the meat was examined by redox potential measurement.

Similarly, in our food chemistry experiments slices treated with ascorbic acid marinade were grilled at 230 °C for 10 minutes using two-side grilling during which the core temperature was continuously measured. The inhibitory effect of ascorbic acid was

followed by measuring the amount of five compounds (PhIP, MeIQx, DiMeIQx, harman, noharman) that are the focus of our study. Following the sample preparation the amount of heterocyclic amines was measured by UHPLC-MSMS.

As a result of our study the food chemical and microbiological properties of ascorbic acid, which are potentially beneficial in heat treatment, were further explored.

9. Irodalomjegyzék

Abdulkarim, B. G., Smith, J. S., 1998: Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46. 11. 4680-4687.

Aaslyng, M. D., Duedahl-Olesen, L., Jensen, K., Meinert, L., 2013: Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef and chicken barbecued at home by Danish consumers. *Meat Science*, 93. 1. 85–91.

Bogen, T. K., Keating, G. A., 2001: US dietary exposures to heterocyclic amines. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 11. 3. 155.

Cross, A. J., Sinha, R., 2004: Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44. 1. 44-55.

Dashwood, R. H., 2002: Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 511. 2. 89-112.

Edenharder, R., Leopold, C., Kries, M., 1995: Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline (IQ) and 2-amino-3, 4-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 341. 4. 303-318.

Emamgholizadeh F. 2008: Effects of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks. Doctoral dissertation. Kansas, State University. p.113.

Gibis, M., Weiss, J., 2010: Inhibitory effect of marinades with hibiscus extract on formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of fried beef patties. *Meat Science*, 85. 4. 735–742.

Gibis, M., Weiss, J., 2012: Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. *Food Chemistry*, 134. 2. 766–774.

Guo, D., Schut, H. A., Davis, C. D., Snyderwine, E. G., Bailey, G. S., Dashwood, R. H., 1995: Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis*, 16. 12. 2931-2937.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2009: Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food microbiology*, 26. 2. 142-150.

Istrati, D., Constantin, O., Ionescu, A., Vizireanu, C., Dinica, R., 2011: Study of the combined effect of spices and marination on beef meat vacuum packaged. *The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. Food Technology*, 35. 2. 75.

Jägerstad, M., Skog, K., 2005: Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574. 1-2. 156-172.

Khalifah, R. G., Baynes, J. W., Hudson, B. G., 1999: Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochemical and biophysical research communications*, 257. 2. 251-258.

- Khan, I. A., Yiqun, C., Zongshuai, Z., Ijaz, M. U., Brohi, S. A., Ahmad, M. I., ... Huang, M., 2019: Occurrence of Heterocyclic Amines in Commercial Fast-Food Meat Products Available on the Chinese Market and Assessment of Human Exposure to these Compounds. *Journal of food science*, 84. 1. 192-200.
- Kizil, M., Oz, F., Besler, H. T., 2011: A Review on the Formation of Carcinogenic/Mutagenic Heterocyclic Aromatic Amines. *Journal of Food Processing & Technology*, 02. 05.
- Kondjoyan, A., Chevolleau, S., Portanguen, S., Molina, J., Ikonic, P., Clerjon, S., Debrauwer, L., 2016: Relation between crust development and heterocyclic aromatic amine formation when air-roasting a meat cylinder. *Food chemistry*, 213. 641-646.
- Laczay P., 2018: Élelmiszer-higiéna. Élelmiszerlánc-biztonság. Budapest, A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft. 52-55; 156-157.
- Lee, H. W., Chien, J. T., Chen, B. H., 2008: Inhibition of cholesterol oxidation in marinated foods as affected by antioxidants during heating. *Food chemistry*, 108. 1. 234-244.
- Latif, S. S., 2010: Effect of marination on the quality characteristics and microstructure of chicken breast meat cooked by different methods. *Lucrări Stiintifice*, 54. 314-324.
- Nerurkar, P. V., Marchand, L. L., Cooney, R. V., 1999: Effects of marinating with Asian marinades or western barbecue sauce on PhIP and MeIQx formation in barbecued beef. *Nutrition and cancer*, 34. 2. 147-152.
- Ohgaki, H., Adamson, R. H., Snyderwine, E. G., Nakagama, H., Shirai, T., Imaida, K., Ito, N., 2000: Carcinogenicity in animals and specific organs. *Food borne carcinogens: heterocyclic amines.*, 197-284.
- Puangsoombat, K., Gadgil, P., Houser, T. A., Hunt, M. C., Smith, J. S., 2012: Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products. *Meat Science*, 90. 3. 739-746.
- Quelhas, I., Petisca, C., Viegas, O., Melo, A., Pinho, O., Ferreira, I., 2010: Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. *Food Chemistry*, 122. 1. 98-104.
- Rohrmann, S., Hermann, S., Linseisen, J., 2009: Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study. *The American journal of clinical nutrition*, 89. 5. 1418-1424.
- Schirmer, B. C., Langsrud, S., 2010: Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria In Vitro and in Vacuum-Packed Pork Meat. *Journal of food science*, 75. 2. M98-M102.
- Skog, K., Jägerstad, M., 1990: Effects of monosaccharides and disaccharides on the formation of food mutagens in model systems. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 230. 2. 263-272.
- Skog, K., Johansson, M. A., Jägerstad, M., 1998: Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36. 9-10. 879-896.

- Stavric, B., 1994: Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: a critical review. *Food and Chemical Toxicology*, 32. 10. 977-994.
- Sugimura, T., 1997: Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376. 1-2. 211-219.
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., Nagao, M., 2004: Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95. 4. 290-299.
- Tai, C. Y., Lee, K. H., Chen, B. H., 2001: Effects of various additives on the formation of heterocyclic amines in fried fish fibre. *Food Chemistry*, 75. 3. 309-316.
- Taylor, R. T., Fultz, E., Knize, M., 1986: Mutagen formation in a model beef supernatant fraction. IV. Properties of the system. *Environmental health perspectives*, 67. 59-74.
- Tengilimoglu-Metin, M. M., Hamzalioglu, A., Gokmen, V., Kizil, M., 2017: Inhibitory effect of hawthorn extract on heterocyclic aromatic amine formation in beef and chicken breast meat. *Food Research International*, 99. 586-595.
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall P., 2008: Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50. 3. 346-363.
- Verdin S. H. 2002: Prevention of Heterocyclic amines in beef fortified with spices. Doctoral dissertation Masters Thesis. Kansas, State University, Manhattan, KS
- Vlahova-Vangelova, D., Dragoev, S., 2014: Marination: effect on meat safety and human health. A review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20. 3. 503-509.
- Wong, D., Cheng, K. W., Wang, M., 2012: Inhibition of heterocyclic amine formation by water-soluble vitamins in Maillard reaction model systems and beef patties. *Food Chemistry*, 133. 3. 760-766.
- World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer., 1993: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56.
- Zamora, R., Hidalgo, F. J., 2015: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) formation and fate: an example of the coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the production and elimination of processing-related food toxicants. *RSC Advances*, 5. 13. 9709-9721.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., ... Yan, W., 2007: Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against Salmonella Typhimurium. *Journal of Food Protection*, 70. 7. 1704-1709.

10. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Pleva Dánielnek, aki lelkiismeretes munkájával és szakértelmével mindenben a segítségemre volt, és bármikor rendelkezésemre állt. Köszönettel tartozom továbbá dr. Lányi Katalinnak és dr. Szakmár Katalinnak, akik folyamatos szakmai segítséget nyújtottak a munkámhoz, illetve külön köszönöm dr. Laczay Péter tanszékvezető úrnak a lehetőséget, hogy bekapcsolódhattam a tanszéki kutatómunkába.

Szeretném megköszönni az Élelmiszer-higiéniai Tanszék munkatársainak, köztük is Csendes András Péternek, dr. Darnay Líviának, Lucsányi Georgina Rebekának, Szita Mónikának, Utsi Tibornak, Domak Adriennek, és dr. Tözsér Dórának a rengeteg segítséget a mérések és kísérletek lebonyolításához.


Külön szeretnék köszönetet mondani Tóth Rita biológus MSc hallgatónak, aki a statisztikai elemzésekben volt a segítségemre, mindemellett számos tanáccsal látott el, melyek hozzájárultak a dolgozatom sikeres elkészültéhez.

Végezetül köszönettel tartozom a családomnak és barátaimnak a türelmükért és támogatásukért, hiszen mindezek nélkül nem jöhetett volna létre ez a TDK-dolgozat.

Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

AlulírottDEBRECENI DORINA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címeA PÁCOLÁS HATÁSA A RÁKKELTŐ HETEROCIKLIKUS
.....AMINOK KELETKEZÉSÉRE ÉS A MIKROFLÓRÁRA BAROMFIHÚSBAN
.....
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a 2019.
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest,2020. 11. 13......

.....DEBRECENI DORINA
..........

a hallgató neve és aláírása

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott DR. PLEVA DÁNIEL igazolom, hogy

..... DEBRECZENI DORINA (a hallgató neve)

..... A PÁCOLÁS HATÁSA A RÁKKELTŐ HETEROCIKLIKUS
..... AMINOK KELETKEZÉSÉRE ÉS A MIKROFLÓRÁRA BAROMFIHÚSBAN

című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. 11. 13.

..... DR. PLEVA DÁNIEL
.....

a témavezető neve és aláírása

..... ÉLELMISZER-HIGIÉNIAI
.....

TANSZÉK
.....

tanszék

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: DEBRECZENI DORINA
Elérhetőség (e-mail cím): dorina.debreczeni.95@gmail.com
A feltöltendő mű címe: A PÁCOLÁS HATÁSA A RÁKLELTŐ HETEROCIKLIKUS
AMINOK KELETKEZÉSÉRE ÉS A MIKROFLÓRÁRA BAROMFIHÚSBAN
A mű megjelenési adatai: 2020
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyag rész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2010 év ...11.....hó ...13....nap



aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*