



Rapport

Sund tilberedning af svinekød

Dannelse af stegemutagener i koteletter marineret i kommercielle marinader

Somaya Abdalas

Sammendrag

- Formål* Formålet var at undersøge dannelsen af stegemutagener i marinerede svinekoteletter tilberedt på åben grill.
- Gennemførelse* Forsøget blev gennemført i følgende trin:
- 1) Fremstilling af oreganomarinade.
 - 2) Udskæring, marineret og pakning af koteletter.
 - 3) Tilberedning af koteletter på Grilleriet.
 - 4) Prøveforberedelse af koteletter.
 - 5) Analyse for stegemutagener i marinerede koteletter
- Resultater* Fem marinader er undersøgt for deres evne til at reducere fem stegemutagener i svinekoteletter. Resultater viser at dannelse af harman og norharman er upåvirket af marinaderne ($P > 0,05$). Dannelsen af MeIQx og 4,8-DiMeIQx er betinget af, vekselvirkningen mellem marinade*kam ($P = 0,00013$ & $P = 0,022$). Dannelsen af PhiP er udelukkende påvirket af marinade ($P = 0,0006$).
- Konklusion* Det er muligt at lave marinader, der sikrer et lavt indhold af mutagene HCA'er i marinerede svinekoteletter.

Baggrund

Tilberedningsmetoder som grilning af kød har betydning for dannelsen af stegemutagener, som harman, norharman, MeIQx, 4,8-DiMeIQx og PhiP. Disse stoffer tilhører gruppen af heterocykliske aromatiske aminer (HCA).

Dannelse af HCA påvirkes i høj grad af tilberedningstemperatur og tid. Jo højere tilberedningstemperatur, jo mere HCA dannes. Tilsvarende jo længere tilberedningstid, jo mere HCA dannes. Dannelsen af HCA involverer oxidation og tidligere studier har vist at marinering af kød med naturlige antioxidanter før tilberedning, reducerer dannelsen af stegemutagener[1]. De udvalgte marinader er kommercielle marinader fra Tican, Indasia og DC samt en oreganamarinade udviklet på DMRI.

Formål

Formålet var at undersøge dannelsen af HCA i 30 svinekoteletter, marineret med tre kommercielle marinader; Tican, Indasia, DC samt DMRI's oreganamarinade. Koteletterne er blevet tilberedt på åben grill. Forsøget blev gennemført i følgende trin:

- 1) Fremstilling af oreganamarinade udviklet af en speciale-studerende.
- 2) 30 koteletter blev udskåret fra 3 svinekamme. Seks styks koteletter blev marineret med henholdsvis Tican, Indasia, DC og oreganamarinade. De sidste 6 koteletter blev ikke marineret, men fungerede som kontrol.
- 3) Koteletterne blev tilberedt på Grilleriet over åben ild.
- 4) Forberedelse af koteletter til analyse ved at skære fedtkant og skorpe fra samt blende prøverne.
- 5) Prøveforberedelse af prøver til HPLC-MS.
- 6) Analyse af marinadernes evne til at reducere dannelsen af stegemutagener.

Gennemførelse

Opskrift på oreganamarinade

Tabel 1 er en opskrift på oreganamarinade, der er udviklet i forbindelse med et speciale i samarbejde med KU science af Lone Green Engsig i 2014.

Tabel 1. Ingredienser til fremstilling af 200 g oreganomarinate til marinering af seks koteletter.

Oreganomarinate	[%]	[g]
Koldpresset rapsolie*	76,2	152,4
Salt	7,9	15,8
Oregano, tør	4,1	8,2
Timian, tør	1,7	3,4
Hvidløgsuré* *	7,4	14,8
Løgpulver	1,1	2,2
Æblecider eddike	1,7	3,4
I ALT	100	200

* Fra Lehnsgaarden, Bornholm.

**Der blev brugt knust hvidløg på glas.

Fremstilling af oreganomarinate

Marinaden er en oliebaseret marinade. Ingredienserne blev blandet og stillet på køl indtil brug.

Øvrige marinader

De øvrige marinader Tican, Indasia og DC var klar til brug. Hovedingredienserne i disse marinader var følgende:

Tican: Vegetabilsk olie/raps (delvis hærde), salt, krydderier (paprika, hvidløg, gurkemejerod, ingefær, koriander, kommen, chili, peber, spidskommen, bukkehornsfrø): 8,6% soltørret tomat: 2,7% tomatpulver, krydderurter (1,1% oregano, timian, basilikum, merian), krydderiekstrakter(paprikapeber).

Indasia: Vand, sukker, æbleeddike, æblemos, tomatkoncentrat, krydderier (chili, hvidløg, oregano, løg), antioxidant (E 325), salt, acerola ekstrakt stabilisator, (E 412, E415) krydderiekstrakt(paprika)konserveringsmidler (E 202, E221).

DC: Rapsolie, salt, krydderier, palmefedt, tomatpulver, dextrose, gærekstrakt, krydderiekstrakt.

pH-måling

Inden udskæring af kammene, blev der kontrolleret om de havde en pH mellem 5,5 – 5,8. Målingerne blev målt i midten af kammene, hvor elektroden blev stukket ned til centrum. pH blev målt to gange med en centimeters mellemrum. Tabel 2 viser middelværdien af de to målinger.

Tabel 2. pH-måling af 3 svinekamme (a, b og c) målt fra centrum.

Svinekam		pH-måling, fra centrum	Middelværdi [5,5-5,8]
Kam 1 eller (b)	1. Måling	5,50	5,50
	2. Måling	5,50	
Kam 2 eller (a)	1. Måling	5,47	5,48
	2. Måling	5,49	
Kam 3 eller (c)	1. Måling	5,46	5,47
	2. Måling	5,48	

Udskæring af koteletter

Kammene udskæres på pålægsmaskinen i to centimeters tykkelse, med tre millimeter spækkant. Kødet blev udskåret fra nakkeenden til hofteenden. De midterste ti koteletter blev brugt til marineret.

Marineret af koteletter

Koteletterne blev marineret enkeltvis. 12 gram marinade blev vejret af på en tallerken og koteletterne blev marineret heri.

Pakning af koteletter

De 30 koteletter blev pakket enkeltvis i vakuumposer. Koteletterne blev opbevaret på køl til næste dag, hvor de skulle tilberedes på Grilleriet.

Latin square design

Koteletterne blev nummereret systematisk fra 1-5 og fordelt på marineringsbehandling i et latins square design vist i tabel 3.

Tabel 3. Koder: a, b og c indikerer kam. n står for nakke og h står for hofte, efterfulgt af et nummer fra 1-5 for gentag. Bogstaverne sidst i koden er forkortelser på marinaderne.

	Tican	Indasia	Oregano	DC	Blank
Kam a	a-n-1-Ti	a-n-2-In	a-n-3-O	a-n-4-DC	a-n-5-B
	a-h-4-Ti	a-h-2-In	a-h-1-O	a-h-5-DC	a-h-3-B
Kam b	b-n-4-Ti	b-n-5-In	b-n-2-O	b-n-3-DC	b-n-1-B
	b-h-2-Ti	b-h-3-In	b-h-5-O	b-h-1-DC	b-h-4-B
Kam c	c-n-3-Ti	c-n-1-In	c-n-4-O	c-n-5-DC	c-n-2-B
	c-h-3-Ti	c-h-5-In	c-h-2-O	c-h-4-DC	c-h-1-B

Tilberedning af koteletter på Grilleriet

Koteletterne blev tilberedt på en åben grill, med direkte varme. På denne måde opnås en højere tilberedningstemperatur og dermed vil dannelsen af HCA være størst. De 30 koteletter er blevet tilberedt i 16 minutter. På denne måde opnås en centrumtemperatur på 80°C grader målt med et indstikstermometer. Koteletterne blev vendt hvert andet minut.

Analyse

Indholdet af HCA'er blev analyseret jævnfør analyseforskrift på DMRI.

Statistisk Analyse

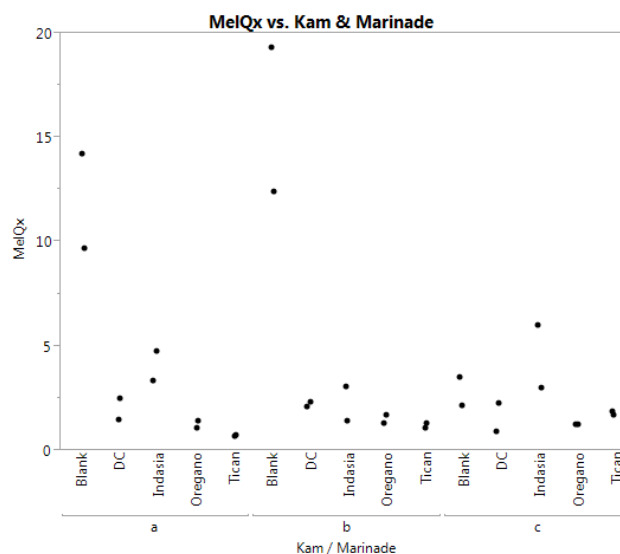
Databehandling er udført i et statistikprogram "The SAS System" (vers 9.4, NC, USA). Graferne er udarbejdet i et statistikprogram "JUMP (JMP)" (vers. 11, NC, USA). Indholdet af stegemutagener analyseres med en variansanalyse med marinade, kam, placering samt vekselvirkninger mellem marinade*kam og marinade*placering. Dernæst analyseres en reduceret model med marinade som fixed effekt og kam som random.

Resultater

Der var ikke effekt af marinering på harman og norharman. MeIQx viser effekt af både marinade ($P < 0,0001$) og marinade*kam ($P = 0,013$). 4,8-DiMeIQx viser både effekt af marinade ($P = 0,002$) og tendens til effekt af marinade*kam ($P = 0,083$). PhiP viser kun effekt af marinade ($P = 0,003$). Da der ses en vekselvirkning mellem marinade*kam for både MeIQx og 4,8-DiMeIQx, undersøges dette samspil.

Marinade*kam for MeIQx

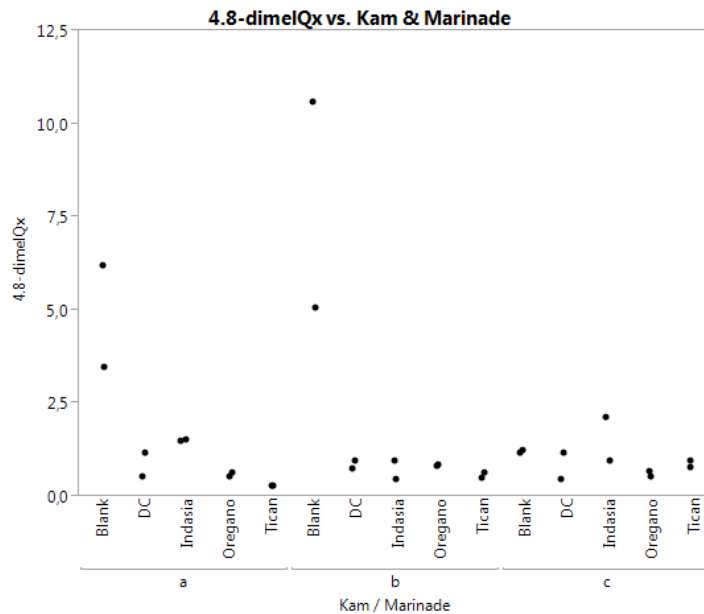
Figur 1 viser vekselvirkningen mellem marinade*kam for MeIQx. Prikkerne viser gennemsnitskoncentrationen af MeIQx i ng/g, i henholdsvis nakke og hofte per marinade per kam (dobbelbestemmelse). Figuren viser at blankprøver fra kam c indeholder en lavere gennemsnitskoncentration af MeIQx, end blankprøver fra kam a og b. Figuren viser også at de øvrige marinader, uafhængig af kam, generelt indeholder en lavere gennemsnitskoncentration af MeIQx, end blankprøverne.



Figur 1. Vekselvirkning mellem marinade*kam for MeIQx. Prikkerne viser gennemsnitskoncentrationen af MeIQx (ng/g) i henholdsvis nakke og hofte per marinade per kam.

*Marinade*kam
for 4,8-DiMeIQx*

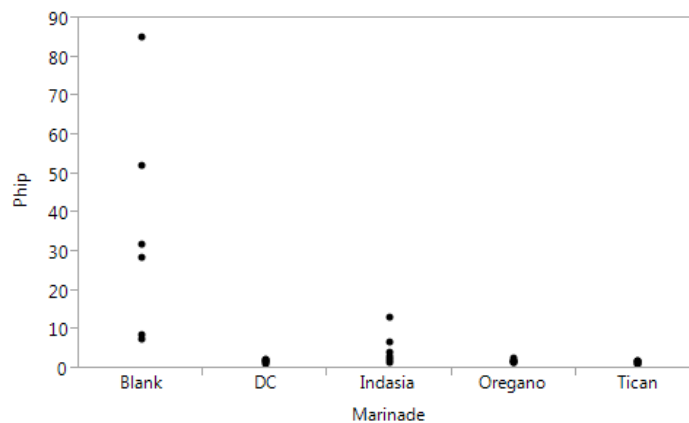
Figur 2 viser vekselvirkningen mellem marinade*kam for 4,8-DiMeIQx. Prikkerne viser gennemsnitskoncentrationen af 4,8-DiMeIQx i ng/g i henholdsvis nakke og hoftede per marinade per kam (dobbelbestemmelse). Figur 2 viser, ligesom på figur 1, at indholdet af 4,8-DiMeIQx for blankprøverne i kam c er lav. Figuren viser også, at de øvrige marinader uafhængig af kam generelt indeholder en lavere gennemsnitskoncentration af 4,8-DiMeIQx end blankprøverne.



Figur 2. Vekselvirkning mellem marinade*kam for 4,8-DiMeIQx. Prikkerne viser gennemsnitskoncentrationen af 4,8-DiMeIQx (ng/g) i henholdsvis nakke og hoftede per marinade per kam.

*Marinade for
PhiP*

PhiP viste også at have en tydelig effekt af marinade. Figur 3 viser, at der på blankprøverne er stor forskel på hvor meget PhiP der dannes. Koteletter der er marineret, indeholder et fast lavt niveau af PhiP, i modsætning til blankprøverne.



Figur 3. Prikkerne indikerer gennemsnitskoncentrationen (n=6) af PhiP (ng/g) i koteletter marineret med 4 forskellige marinader, samt en blank.

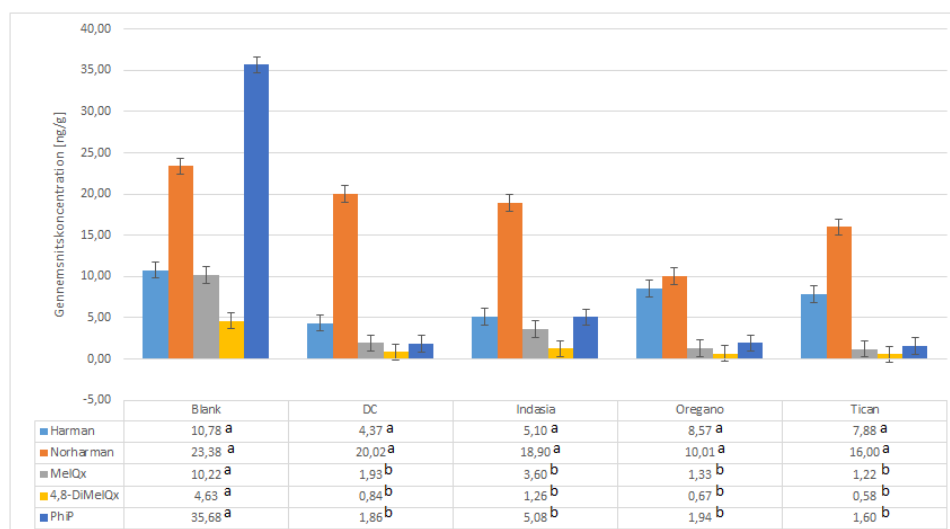
Reduktion af effekter og vekselvirkninger

Vekselvirkninger, der ikke er signifikante, fjernes og hovedvirkningerne (kam, marinade & placering) og vekselvirkningen (marinade*kam) der er signifikante bevares.

Resultater viser, at der for effekter som marinade, kam og placering for harman og norharman stadig ikke signifikante. MeIQx viser en signifikant effekt af marinade ($P=0,0001$), kam ($P=0,037$) samt marinade*kam ($P=0,0013$). For 4,8-DiMeIQx er marinade ($P=0,0002$) samt marinade*kam ($P=0,022$) signifikante. PhiP viser også at være meget signifikant ($P=0,0006$) for marinaden. Bemærk at effekterne samt vekselvirkningen for MeIQx, 4,8-DiMeIQx og PhiP er blevet mere signifikante, efter fjernelse af de andre vekselvirkninger.

Endelige model

På baggrund af ovenstående resultater laves den endelige model med marinade som fixed effekt og kam som tilfældig. Placering er fjernet fra modellen, da den ikke var signifikant ved nogle af stofferne. Figur 4 viser gennemsnitskoncentrationen (ng/g) på indholdet af stegemutagener. Figur 4 viser, at dannelsen af MeIQx, 4,8-DiMeIQx og PhiP i blankprøverne er signifikant forskellige fra de øvrige marinader, mens marinaderne indbyrdes ikke er signifikant forskellige.



Figur 4. Gennemsnitskoncentration ($n=6$) (ng/g) af harman, norharman, MeIQx, 4,8-DiMeIQx og PhiP målt i koteletter marineret i 4 forskellige marinader, samt en blank. Tal i samme række med forskellige bogstaver er signifikant forskellige.

Harman & norharman

P-værdierne for harman og norharman er estimeret til henholdsvis 0,318 og 0,461. Det vil sige at indholdet af harman og norharman ikke er signifikant forskellige afhængig af marinering.

Gennemsnitskoncentrationen af harman i marinaderne er mellem 4-9 ng/g og mellem 10-20 ng/g for norharman, hvoraf blankprøverne indeholder henholdsvis 11 og 23 ng/g. Der var en signifikant effekt af marinade på såvel MeIQx ($P=0,031$) og 4,8-DiMeIQx ($P=0,047$). Indholdet af MeIQx og 4,8-DiMeIQx er betydelig forskellige i marinaderne. Bemærk at der dannes dobbelt så meget MeIQx, som 4,8-DiMeIQx i blankprøverne (figur 4), men begge stoffer reduceres med op til 88%, og specielt Tican og Oregano er effektive (tabel 4).

MeIQx & 4,8-Di-MeIQx

PhiP

Der var en meget stor signifikant effekt af marinade på PhiP (p -værdi=0,0004). Blankprøverne indeholder i gennemsnittet 36 ng/g, og er den HCA der dannes mest af (figur 4), men er også den der reduceres over 86%, uanset marinade (tabel 4).

Tabel 4. Procentvise reduktion i forhold til blankprøven (n=6).

[%]	DC	Indasia	Oregano	Tican
Harman	59	53	20	27
Norharman	14	19	57	32
MeIQx	81	65	87	88
4,8-DiMeIQx	82	73	86	88
PhiP	95	86	95	96

Diskussion

Resultater viser, at vekselvirkningen mellem marinade*kam har den største effekt af MeIQx og 4,8-DiMeIQx. Vekselvirkningen er et udtryk for, hvor godt marinaden virker afhængig af kam. PhiP viser kun signifikans ved marinade.

Ved fjernelse af ikke signifikante vekselvirkninger og effekter, ser man at MeIQx, 4,8-DiMeIQx og PhiP kun bliver mere signifikante. Det skyldes, at vi ikke bruger frihedsgrader på andre effekter, og det gør det muligt, at forklare de effekter der er til stede. Indholdet af harman og norharman er upåvirket, uanset marinade, placering og kam.

Marinade*kam

Gennemsnitskoncentrationen af både MeIQx og 4,8-DiMeIQx i kam c for blankprøverne er lav. Det betyder, at den mængde HCA der kan reduceres i de andre kamme, er forskellig fra kam c. Den effekt der er i marinaderne afhænger af kam. Dette skyldes ikke, at der bliver dannet mere MeIQx og 4,8-DiMeIQx i kammene, eller at marinaderne ikke virkede på kam c, men

fordi gennemsnitskoncentrationen af MeIQx og 4,8-DiMeIQx i kam c som udgangspunkt er lavere.

<i>Marinade</i>	Gennemsnitskoncentrationen af PhiP i blankprøverne er meget høj, sammenlignet med gennemsnitskoncentrationen i de marinerede prøver uanset kam.
<i>Harman & norharman</i>	Marinering havde ikke effekt på dannelsen af harman og norharman. Antioxidanter i marinaderne har ikke været i stand til at reducere dannelsen. Disse stegemutagener kaldes også co-mutagener. De er ikke i sig selv mutagene, men forstærker mutagenicitet af de andre HCA'er.
<i>MeIQx & 4,8-Di-MeIQx</i>	Indholdet af MeIQx og 4,8-DiMeIQx er betydelig lavere i de marinerede koteletter end i blankprøverne, idet antioxidanterne i marinaderne har reduceret dannelsen af de to stegemutagener med op til 88%, i forhold til blankprøverne.
<i>PhiP</i>	<p>PhiP er et af de HCA'er, der oftest dannes meget af i kød under tilberedning. PhiP reduceres signifikant ved marinering i forhold til kontrollen. Det er det stof, marinaderne er mest effektive overfor.</p> <p>Marinader med et naturligt indhold af antioxidant, som stammer fra de bær og krydderurter, der anvendes til fremstilling, kan reducere dannelsen af HCA under tilberedning. HCA mistænkes for at være potentielt kræftfremkaldende, og øger risikoen for blandt andet tarmkræft [3]. Antioxidanter har potentiale til at forebygge oxidativ stress, ved afgivelse af elektroner til frie radikaler.</p> <p>De opnåede resultater fra dette forsøg viser, at det er muligt, at lave marinader, der sikre et lavt indhold af de tre mutagene HCA'er, men det er ikke muligt at favorisere nogle marinader over andre.</p> <p>Alle koteletter i forsøget er blevet tilberedt på en åben grill. På denne måde opnås de højeste koncentrationer af stegemutagener. Koteletterne havde en centrumstemperatur på cirka 80°C. I en tidligere undersøgelse, foretaget af DMRI, viste at forbruger tilbereder kød med en centrumstemperatur på 70°C eller derover [2]. Derfor må man forvente at, de bliver eksponeret for koncentrationer svarende til de resultater, som er udregnet i forsøget.</p> <p>HCA dannes i al slags kød, men har ingen grænseværdi, ligesom for røgmutagener (PAH). Udover at marinering kan reducere dannelsen af HCA, kan man som forbruger også minimere dannelsen, ved at bruge indirekte varme, vende kødet jævnlige, og</p>

undgå at brænde kødet. Studier viser også, at ved indtagelse af kostfibre og kød samtidig, sænkes risikoen for tarmkræft. Marinering af kød er til gengæld en nem og effektiv måde at reducere indholdet af HCA'er på. En anden undersøgelse viser også, at 50% af de adspurgte danske forbrugere oftest marinerer svinekød, mere end oksekød og kylling, og da svinekød er det der spises mest af i Danmark, er der gode muligheder for, at udvikle velsmagende og sunde marinader.

Konklusion

Marinaderne DC, Tican, Indasia og Oregano er lige gode til at reducere indholdet af de mutagene HCA'er. Der er ingen af marinaderne der effektivt reducerer dannelsen af harman og norharman.

Referencer

- [1] Zhang, Yan et al. (2013): Formation and mitigation of heterocyclic aromatic amines in fried pork. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30, pp. 1501-1507.
- [2] Aaslyng, Margit Dall (2015): Sund tilberedning af svinekød. Teknologisk Institut – DMRI. Rapport.
- [3] Aaslyng, Margit Dall m.fl. (2012): Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef, and chicken barbecued at home by Danish consumers. *Meat Science*: 93, pp. 85-91.