



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö

Examensarbete 15 hp

Kan marinering av kött reducera uppkomsten av heterocykliska aminer vid tillagning?

En litteraturstudie



Författare: Beatrice Lindh Dillon
Handledare: Maria Bergström
Examinator: Håkan Andersson
Termin: VT19
Ämne: Biomedicinsk vetenskap
Nivå: Grundnivå
Kurskod: 2BK01E

Nyckelord

Heterocyclic amines, meat, cooking process, marinade, food, food process, health, aromatic, spices, herbs, beer, wine

Tack

Jag skulle vilja börja med att rikta ett stort tack till min handledare Maria Bergström som har hjälpt under skrivandets gång.

Jag vill även tacka mina fantastiska vänner Betim Bacovic och Benjamin Fredriksson för att ni peppat mig och funnits där när jag behövt uppmuntran.

Ett stort tack till min vän och glädjespridare My Enström för att vi sporrat och inspirerat varandra till att göra det absolut bästa vi kan.

Tack till Pelle Lindh, Niklas Håkansson och Emma Lundström för korrekturläsning.

Till sist skulle jag vilja tacka alla fantastiska människor jag träffat under mina år i Kalmar som har lett mig till den person jag är idag.

Abstrakt

Bakgrund: Över 20 mutagena ämnen har detekterats i tillagade livsmedel. Till dessa räknas heterocykliska aminer. Studier har visat att dessa aminer kan orsaka mutationer och därmed öka risken för att utveckla cancer. Heterocykliska aminer bildas under tillagning av kött i höga temperaturer genom Maillardreaktionen.

Syfte: Syftet med denna litteraturstudie var att se om marinering med öl, vin eller örtekryddor kan minska bildningen av heterocykliska aminer vid tillagning av kött.

Metod: Denna studie är en litteraturstudie med ett urval av artiklar från databaserna PubMed och Web of Science. Totalt inkluderades 6 artiklar varav 3 artiklar studerade marinering med öl/vin och 3 studerade marinering med örtekryddor och örtextrakt.

Resultat: Samtliga studier som undersöktes visade att marinering har en reducerande effekt på mängden heterocykliska aminer som bildas vid tillagning. Den mest troliga hypotesen om mekanismen är att effekten beror på den antioxidativa förmågan hos marinaderna. Ett exempel är en marinad med kombinationen gurkmeja och citrongräs som reducerade koncentrationen heterocykliska aminer med 94,8%.

Slutsats: Marinering med öl, vin eller örtekryddor visades effektivt reducera mängden heterocykliska aminer. Stora reducerande effekter detekterades i marinader med gurkmeja, citrongräs, ingefära och mörk lager. Mer forskning behövs för att fastställa om reduktionen är kopplad till den antioxidativa effekten hos marinaderna.

Abstract

Background: Over 20 different mutagenic substances has been detected in cooked food. These include heterocyclic amines. Studies have shown that these amines can create mutations and increase the risk of developing cancer. Heterocyclic amines are formed in meat during the Maillard reaction which occurs at high temperature cooking.

Aim: The aim of this study was to investigate if the effect of marinating with beer, wine and herbs/spices can reduce the formation of heterocyclic amines found in cooked meat.

Method: This study is a literature study with a selection of articles from databases PubMed and Web of Science. Six articles were included in this study. 3 articles involved marinade with beer/wine and 3 articles involved marinade with herbs/spices and extract.

Results: All studies examined showed that marinating has a reducing effect on the concentration of heterocyclic amines formed during cooking. The most credible hypothesis of the mechanism is that the effect depends on the antioxidativ capacity of the marinades. For example one marinade with the combination of turmeric and lemon grass reduced the concentration of heterocyclic amines by 94,8%.

Conclusion: Marinades containing beer, wine or herbs/spices was shown to effectively reduce the amount of heterocyclic amines. Great reducing effects were found using turmeric, lemon grass, ginger and black beer. More scientific research is needed to determine if the reduction is linked to the antioxidant effect in marinades.

Innehåll

1 Bakgrund	1
1.1 Antioxidanter	2
1.2 Heterocykliska aminer	3
1.2.1 Trp-P-1 (3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole)	3
1.2.2 PhIP (2-amino-1-metyl-6-fenylimidazo [4,5-b] pyridin)	4
1.2.3 MeIQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline)	4
1.2.4 4,8-DiMeIQx (2-amino-3,4-8-trimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline)	5
1.2.5 AaC & MeAaC (α -carboliner)	5
1.2.6 Norharman och Harman (β -carboliner)	6
2 Syfte och frågeställningar	6
2.1 Frågeställningar	6
3 Material och metod	7
3.1 Artikelsökning	7
3.1.1 PubMed	7
3.1.2 Web of Science	8
4 Resultat	9
4.1 Utfall från databaser	9
4.2 Litteraturarbetets studier	9
4.2.1 Grupp 1: Öl & vin	9
4.2.2 Grupp 2: Örtkryddor	9
4.3 Melo <i>et al.</i> (2008) – Effect of Beer/Red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef	9
4.3.1 Metod	9
4.3.2 Extraktion av HA	10
4.3.3 Resultat	10
4.4 Viegas <i>et al.</i> (2012) Inhibitory effect of antioxidant-rich marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef	11
4.4.1 Metod	11
4.4.2 Resultat	11
4.5 Viegas <i>et al.</i> (2015) - Influence of beer marinades on the reduction of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled pork meat	12
4.5.1 Metod	12
4.5.2 Resultat	13
4.6 Gibis <i>et al.</i> (2012) Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties	14
4.6.1 Metod	14
4.6.2 Resultat	14
4.7 Jinap <i>et al.</i> (2015) Effect of selected local spices marinades on the reduction of heterocyclic amines in grilled beef	15
4.7.1 Metod	15
4.7.2 Resultat	16

4.8 Sepahpour et al 2018 – Inhibitory effect of mixture herbs/spices on formation of heterocyclic amines in mutagenic activity of grilled beef	17
4.8.1 Metod:	17
4.8.2 Resultat	18
5 Diskussion	19
5.1 Studiedesign	19
5.2 Resultatjämförelse	19
5.2.1 Grupp 1	20
5.2.2 Grupp 2	20
5.3 Relevansbedömning och etiska aspekter	23
5.3.1 Relevansbedömning	23
5.3.2 Etiska aspekter	23
6 Slutsats	23
Referenser	24
7 Bilagor	27
7.1 Bilaga A. Redovisning av artikelsökning	27

1 Bakgrund

Att marinera innebär en förberedelse innan tillagningen som är särskilt vanligt när det gäller grillning och stekning av köttprodukter. En marinad består i regel av en vätska som kan innehålla enzymer, salt, kryddor och något som ökar syrligheten (1). Det är vanligt att använda en oljebaserad marinering med kryddor och syntetiska aromämnen. Marinering används vanligtvis för att ge en mer intensiv smak, lukt och mörhet till det tillagade köttet. Mörheten uppstår när en vätska, som marinad, tränger igenom muskelcellerna i köttet och separerar aktin från myosin. Marinader som innehåller salter gör köttet saftigare efter tillagning då saltet binder till vätskan i kött och behåller mer köttsaft (1). Studier visar även att marinering kan påverka vilka ämnen som bildas under tillagning av kött, som till exempel heterocykliska aminer (HA) (2).

HA ingår bland de över 20 mutagena ämnen som har detekterats i tillagade livsmedel och visat sig ha negativ påverkan i kroppen (3). Dessa mutagena ämnen riskerar att utveckla tumörer hos människor och tillhör grupperna: nitrosaminer, polycykliska aromatiska kolväten (PAH) och heterocykliska aminer (HA) (4–6). Nitrosaminer är cancerogener som existerar av olika slag. De bildas huvudsakligen när nitrit och nitrat reagerar med olika ämnen i kroppen. De bildas även vid tillagning av livsmedel som innehåller höga halter av nitrit, exempelvis bacon, samt vid rökning av kött och inläggning av salt fisk eller grönsaker (7). De högsta koncentrationerna av PAH har detekterats i rökta och grillade livsmedel. PAH bildas vid upphettning och förbränning av olika organiska föreningar. Tidigare studier har visat att effekterna av dessa kolväten kan skada kromosomer och framkalla cancer. Nivåerna av PAH i rökta livsmedel har klart visats bero på flera variabler i själva processen av rökningen, som exempelvis temperatur och graden av rökning (4). Bensopyren är en av dessa PAH som är klassificerad att vara cancerframkallande hos människan (8).

HA bildas när olika sorters kött tillagas vid högre temperaturer via Maillardreaktionen från fyra substanser som kan detekteras i kött: fria aminosyror, kreatin, kreatinin och socker (6). Reaktionen leder till att livsmedlet får en brun mörk färg och ökad arom och har definierats som en icke-enzymatisk brunfärgningsreaktion. Maillardreaktionen kan delas upp i tre olika etapper. Under den första etappen reagerar karbonylgruppen i en reducerande sockerart med aminogruppen i en aminosyra och kondenserar, vilket leder till en bildning av en ostabil N-substituerade glykosylamin och vatten. I den andra etappen sker dehydrering, fragmentering och en mångfald av reaktioner som ger olika mellanprodukter där kreatin och kreatinin deltar. Dessa produkter kan i sista etappen, vid reaktion av kreatin/kreatinin, bilda heterocykliska kväveföreningar, brunfärgande polymerer (melanoidin) samt andra ämnen som ger livsmedel både ökad färg och arom (9). De bildade ämnena kan ha både negativa och positiva effekter på hälsan. I vissa fall har de visat sig ha en antioxidativ effekt och fungera bakteriehämmande och som antiallergener, men i andra fall har ämnena visats verka cancerogent, vilket alltså beror på processningen av livsmedel (10).

Kreatin och kreatinin är kväveinnehållande ämnen som endast finns naturligt i muskler hos alla däggdjur och därför bildas HA främst vid tillagning av kött. Bildandet av HA kan variera från olika sorters kött men oavsett kötttyp bildas HA vid tillagningsprocesser som stekning, grillning och långkok. Tillagningsprocesser där temperaturen överstiger ca 148°C tenderar att bilda större mängd HA utan att typen av kött har betydelse (11). Kött med en lägre fetthalt visar högre koncentrationer av HA efter tillagning. Vid tillagningsprocesser där tillagningstiden är längre eller temperaturen högre har högre koncentrationer av HA visats. Längre tillagningstider kan innebära rostning, långkok och rökning (5).

Minst 25 olika typer av HA har identifierats i tillagade och bearbetade livsmedel (12).

Heterocykliska ämnen är organiska föreningar som består av minst en heteroatom i sitt ringskelett. Heteroatomer är atomer som inte är kol eller väte utan exempelvis syre, kväve, svavel och fosfor och i fallet med HA så är det en kväveatom (se figur 1-8). HA har studerats och har i många fall visat sig vara cancerogener. Detta sker genom att de orsakar genmutationer som kan leda till en okontrollerad tillväxt av nya celler samt tumörbildningar (13). Något som betraktas som ett skydd mot cancer är antioxidanter (14).

1.1 Antioxidanter

Antioxidanter är kemiska föreningar som motverkar oxidativa reaktioner i kroppen. De hjälper kroppens mekanismer att hantera överskott av fria radikaler som bildas vid oxidering (14). De fria radikalerna kan orsaka skada på kroppen och har visats vara betydelsefulla för utvecklingen av hjärt- och kärlsjukdomar och cancer (15). Kroppen utsätts för fria radikaler från inre och yttre faktorer. De yttre faktorerna kan vara cigarettök, luftföroreningar och solljus. När vi andas in syre bildas fria syreradikaler. Syret behövs för att kroppen skall kunna omvandla energi och förbränna födan. Energin omvandlas genom elektrontransportkedjan i mitokondrierna och under denna process läcker det ut en del fria radikaler. Kroppen behöver alltså syre för att få energi, men det kan även orsaka skada om det bildas för mycket fria syreradikaler som kroppen inte hinner ta hand om vilket kan leda till utveckling av oxidativ stress (16).

Oxidativ stress är en biokemisk process där fria radikaler skadar celler eller organ i kroppen. För att förebygga oxidativ stress kan antioxidanter hjälpa. Antioxidanter kan vara konstgjorda eller naturliga och de kan alltså förhindra eller fördröja cellskador. Det finns flera konstgjorda antioxidanter i form av antioxidationsmedel som används i livsmedel. Exempel på dessa är citronsyra (E330), askorbinsyra (E300), butylhydrocyanisol (BHA, E320) och butylhydroxitoulen (BHT, E321) som används bland annat för att förhindra härskning av fett och missfärgning av fruktprodukter (17). Att använda konstgjorda antioxidanter som kosttillskott har visat sig ha en negativ påverkan på hälsan. Kopplingar har hittats mellan konstgjorda antioxidanter och en ökad risk för cancer, då de skyddar cancercellerna från kroppens försvar, men detta sker endast när de överkonsumeras (18). Intag av naturliga antioxidanter genom kosten har visat sig vara fritt från risker.

Speciellt viktiga och betydelsefulla antioxidanter är E-vitamin som finns rikligt i oljor och nötter, C-vitamin samt karotenoider som finns i många frukter och grönsaker. Även intag av mineraler som zink, mangan och koppar är viktiga eftersom de ingår i enzymer med antioxidativa funktioner (11). Bär, lök och frukter innehåller även stora mängder antioxidanter som inte är vitaminer (bioaktiva ämnen). Livsmedel som vin, öl och örtekryddor används ofta i marinader, främst för att bidra till smaken, men de innehåller även bioaktiva ämnen med antioxidativa funktioner som till exempel polyfenoler (14).

Polyfenoler är en grupp bioaktiva ämnen och naturliga antioxidanter som tillhör växtriket. Till polyfenoler kan antioxidanterna resveratrol och katekiner kategoriseras. Antioxidanten resveratrol finns rikligt i vindruvor och därmed naturligt i vin (19). Epigallokatekingallat (EGCG) är en av de vanligaste katekinerna och har också detekterats i vin men även i grönt te. Enligt tidigare forskning har det visat sig att antioxidanten EGCG agerar som ett effektivt skydd mot skador på huden från UV-strålning (20). Förutom att det har visat sig ha positiva effekter på både hälsan och livsmedel bidrar polyfenoler även till en ökad arom hos livsmedel. Antioxidanter kan även påverka processningen av olika livsmedel. Tidigare antaganden har utformats om att användning av antioxidanter som öl, vin och örtekryddor vid marinering av kött, kan vara en anledning till att bildningen av HA minskar vid tillagning tack vare den antioxidativa effekten (21,22).

1.2 Heterocykliska aminer

Under åren har ett flertal HA upptäckts och klassificerats. Mellan 1975-1980 upptäcktes den första klassen av mutagena HA som fick namnet pyrolytiska mutagener. Dessa har vanligtvis en exocyklisk aminogrupp och ibland en exocyklisk metylgrupp bundet till en pyridin-ring. För att pyrolytiska aminer ska bildas krävs upphettning av aminosyror, kreatin/kreatinin och sockerarter till en temperatur på 250-300°C. Till pyrolytiska HA räknas alfa-och gamma-carbolinerna A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2 och Benzimidazol (23). Beta-carbolinerna Harman och Norharman saknar den exocykliska aminogruppen och är därmed inte mutagena men har visat vara komutagena, det vill säga att de har effekt på andra aminer som är mutagena. Trots detta räknas beta-carbolinerna som pyrolytiska (12).

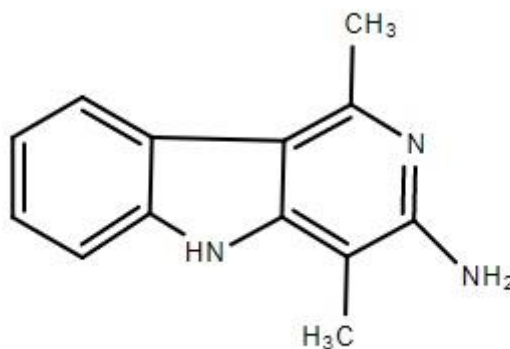
Den andra klassen kallas termiska HA. De bildas, som de pyrolytiska, vid upphettning av aminosyror, kreatin/kreatinin och sockerarter men vid en lägre temperatur. De kräver endast 150-250°C för att bildas. Till termiska HA räknas PhIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Imidazo Quinoxalines (IQx) och Imidazo Quinolines (IQ).

För att HA skall kunna skada i kroppen krävs aktivering efter att de absorberats.

Bioaktivering sker under metabolismen där det kan bildas reaktiva metaboliter som i sin tur reagerar med DNA. Metabolismen sker främst i levern där reaktionerna katalyseras av CYP 1A2 enzymer (24–26).

1.2.1 Trp-P-1 (3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole)

Trp-P-1 är en heterocyklisk amin, som tillhör gruppen γ -carboliner som har cancerframkallande egenskaper och aktiveras genom bioaktivering. Trp-P-1 har immunosuppressiva effekter då aminen hämmar nybildningen av T- och B-lymfocyter hos människan (27). T-lymfocyter är vita blodkroppar och har en stor roll i det cellmedierade immunförsvaret. T-cellernas uppgift är att aktivera T-mördarcellerna så de kan attackera och förstöra vävnadsceller som blivit infekterade. De hjälper också till vid aktiveringen av B-celler så de kan utvecklas till antikroppsbildande plasmaceller (28). Effekten av Trp-P-1 är att hämma nybildningen av dessa celler vilket leder till en sämre immunologisk funktion i kroppen. Trp-P-1 aminen stör också utveckling och aktivering av de dendritiska cellerna, vilka är kroppens antigenpresenterande celler som har stor betydelse för immunförsvaret, inkluderat cancerförsvaret, då de styr över det medfödda och adaptiva immunsystemets delar. Detta i sin tur leder till en minskning av deras förmåga att döda cancerceller och stimulera nybildning av T-celler. Trp-P-1 ger alltså cancerceller en gynnsam miljö utan något motstånd från världens immunförsvaret (27).

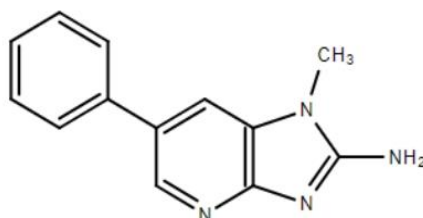


Figur 1. Kemiska strukturen för Trp-P-1.

1.2.2 PhIP (2-amino-1-metyl-6-fenylimidazo [4,5-b] pyridin)

PhIP är en av den vanligaste HA som uppkommer i tillagat kött. PhIP har klassificerats som cancerogent med eventuell cancerframkallande påverkan på människor. Tillräckliga bevis har endast hittats hos försöksdjur (13). PhIP har återfunnits i tillagat nötkött, fläskkött, kyckling och fisk. PhIP har en inhiberande effekt på proliferationen av T-lymfocyter (29). För att PhIP skall klassas som ett mutagent ämne i kroppen krävs det en metabolisk aktivering. Tidigare studier har visat att PhIP omvandlas till en genotoxisk metabolit i levern genom oxidering i fas 1 av CYP1A2 enzym. CYP1A2 kan variera från individ till individ och kan påverkas av yttre faktorer som rökning, kronisk hepatit samt kostvanor (30). Genom att fastställa aktiviteten av CYP1A2 fenotyp kan individer klassas ha snabba eller långsamma N-oxiderande system där individerna med snabba N-oxiderande system har en högre risk att utveckla cancer genom att effektivisera metaboliseringen av PhIP (30).

Den kemiska strukturen för PhIP visas i figur 2.

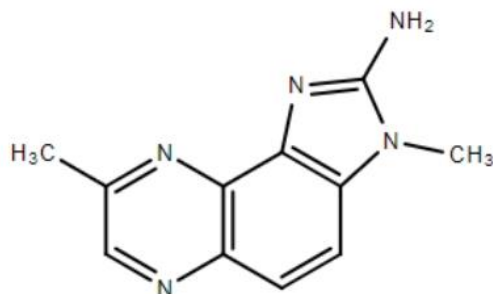


Figur 2. Kemiska strukturen för PhIP.

1.2.3 MeIQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline)

MeIQx är en av de mest förekommande HA som detekterats i kött och fisk där högst koncentration visats i rött kött (31). Aminen är cancerogen och associerad med en ökad risk för kolorektal cancer och anses även orsaka bukspottkörtelcancer (32).

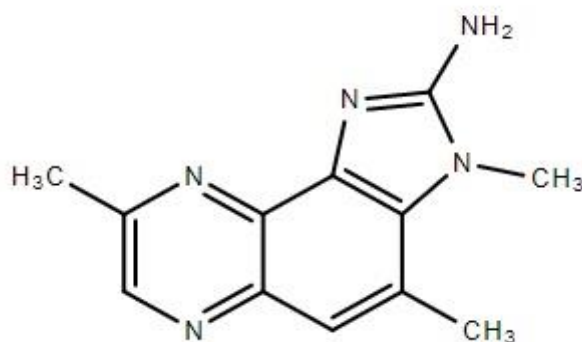
Det har visats att när MeIQx absorberas in i cellerna sker en bioaktivering genom N-oxidation av den exocykliska aminogruppen som ger mutagena N-hydroxyderivater. Dessa leder till att DNA-replikationen ändras på grund av att de reagerar kovalent med guanin i DNA (23).



Figur 3. Kemiska strukturen för MeIQx.

1.2.4 4,8-DiMeIQx (2-amino-3,4,8-trimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline)

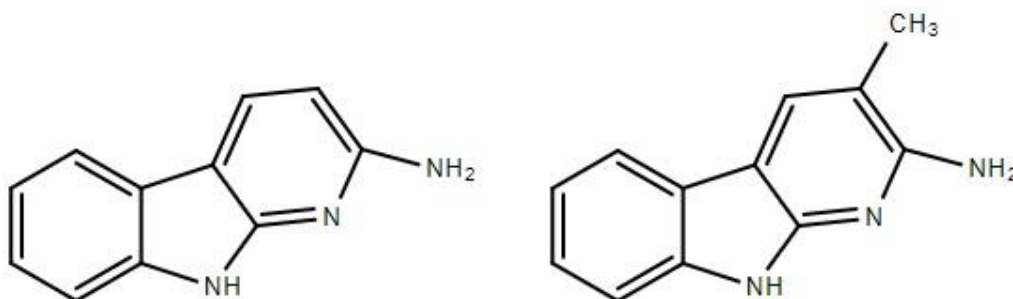
4,8-DiMeIQx är en mutagen HA som bildas via DiMeIQx (utveckling från MeIQx) genom upphettning av kreatinin, fruktos och aminosyrorna treonin och alanin (33). För att aminen skall vara mutagen krävs, som med alla heterocykliska aminer, att den aktiveras när den väl absorberats. Aminen härstammar från metylgruppen i aminosyran alanin. Bildningen av 4,8-DiMeIQx är, vilket är gemensamt för alla HA, beroende av kinetiken i Maillardreaktionen där fria radikaler, pyridin och pyrazin, reagerar med kreatin/kreatinin (23).



Figur 4. Kemiska strukturen för 4,8-DiMeIQx.

1.2.5 A α C & MeA α C (α -carboliner)

A α C och MeA α C är mutagena och cancerogena pyrolytiska HA som klassas som α -carboliner. Aminerna har visats vara närvarande i olika livsmedel som kött, fisk och svamp men även i tobaksrök och flodvatten (34). Aktivering av aminerna sker genom bioaktivering efter att de absorberats av kroppen. Under metabolismen kan det bildas reaktiva metaboliter som skapar mutationer i DNA. A α C är en av de HAs som detekterats i högst koncentration medan MeA α C är av lägre koncentration (35).



Figur 5-6. Kemiska strukturen för A α C (vänster) och MeA α C (höger).

1.2.6 Norharman och Harman (β -carboliner)

Harman (1-Methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole) är en heterocyklisk amin och Norharman (β -Carboline, 9H-pyrido[3,4-b]indole) är en kväveinnehållande heterocyklisk förening. Både Harman och Norharman tillhör gruppen β -carboliner. Harman och Norharman har detekterats i kött och köttextrakt i relativt höga koncentrationer men aminernas största källor är bryggt kaffe och tobaksrök. Harman har visats agera som en reversibel hämmare av monoaminoxidas A och verkar som en agonist vid inbindningsstället för bensodiazepiner på GABA-receptorer. Koncentrationerna av β -carbolinerna ökar vid närvaro av glukos och kreatin men har även identifierats som alkaloider i olika växtarter och agerar som aktiva beståndsdelar i vissa hallucinogena växter. Dessa ämnen kan alltså detekteras i livsmedel utan krav på upphettning och Maillardreaktion (41).

När Harman och Norharman identifierades som pyrolytiska aromatiska aminer i tillagad mat undersöktes gentoxicitet och den komutagena effekten av aminerna. Vid ytterligare undersökningar hittades molekylära likheter mellan aminerna och det Parkinson-inducerande neurotoxinet N-Metyl-4-fenylpyridinium som orsakar tremor (36).

Beta-karbolinerna har även visat sig påverka neurotransmittorkoncentrationer (36).

Forskning visar att Harman och Norharman kan bildas även vid lägre temperaturer (40°C) vid tillsättning av järn och koppar (36).



Figur 7-8. Kemiska strukturen för Harman (vänster) och Norharman (höger).

2 Syfte och frågeställningar

Syftet med denna litteraturstudie var att ta reda på om man med hjälp av marinering med öl, vin eller örtekryddor kan minska bildningen av heterocykliska aminer som uppstår vid tillagning av kött. Syftet var även att ge ökade kunskaper om de olika heterocykliska föreningarna och deras effekter.

2.1 Frågeställningar

- ✚ Kan marinering reducera bildningen av heterocykliska aminer vid tillagning av rött kött?
- ✚ Kan marinader innehållande antioxidanter från öl, vin och örtekryddor reducera mängden heterocykliska aminer som bildas vid tillagning?

3 Material och metod

3.1 Artikelsökning

Sökning efter artiklar gjordes i databaserna PubMed och Web of science. Sökorden som användes var "heterocyclic amines", "meat" och "marinade". Inklusionskriterier för urvalet var att det skulle vara: originalartiklar, artiklarna skulle kunna läsas i fulltext, studien skulle vara trovärdig och relevant, studien skulle innehålla någon form av marinering av rött kött samt att titeln skulle innehålla "heterocyclic amines". Den första sökningen gjordes på PubMed där 4 artiklar valdes ut och den andra sökningen gjordes på Web of Science. Innan den andra sökningen gjordes lades ytterligare kriterier till för att specificera valet av artiklar. De valda artiklarna skulle kunna kategoriseras in till någon av följande 2 grupper: 1) marinering med öl/vin, 2) marinering med örtekryddor.

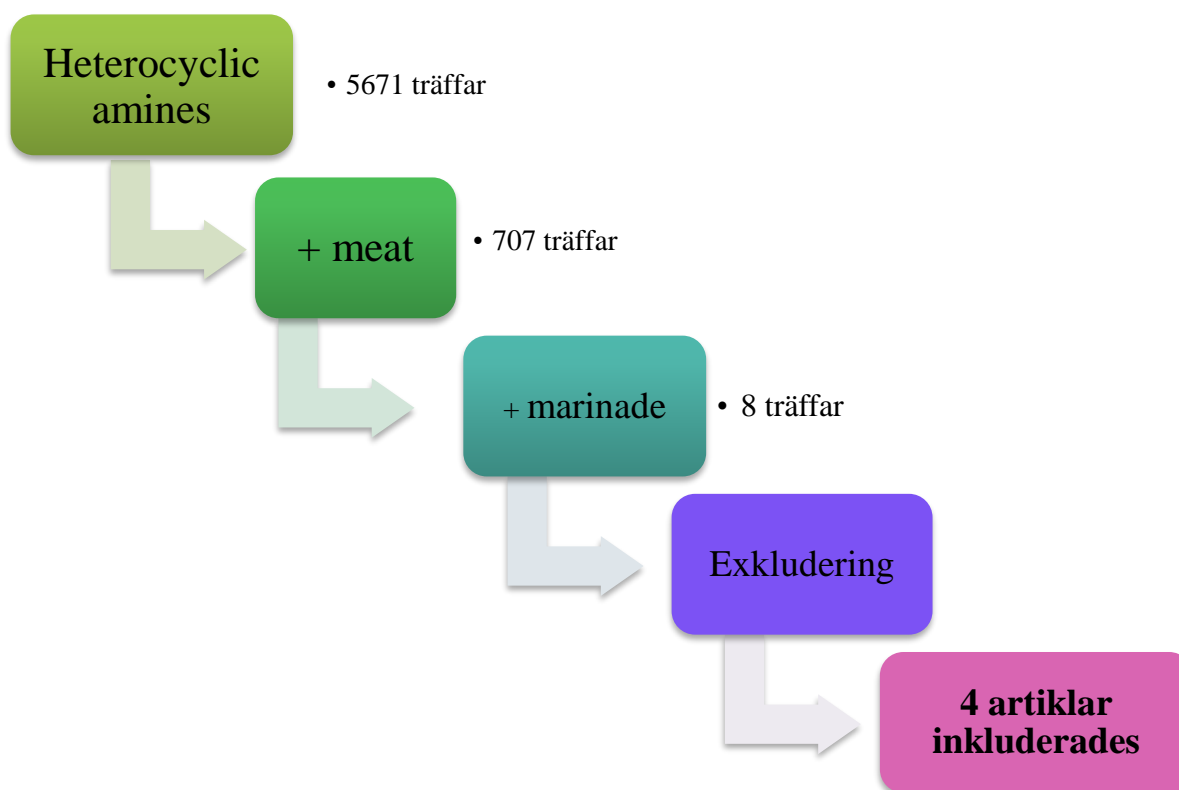
Kriterier för exkludering var de artiklar som publicerades innan 2008, artiklar som handlade om fisk och kyckling samt att de inte hade marinerats med antingen öl, vin eller örtekryddor.

De artiklar som användes för inkludering var välgjorda, trovärdiga och relevanta för detta arbete. Antalet artiklar som ingick i exkludering och inkludering redovisas i bilaga A.

3.1.1 PubMed

Första sökningen på PubMed bestod av "heterocyclic amines" och gav 5671 träffar. I andra sökningen lades "meat" till och gav 707 träffar. För att ytterligare begränsa antalet träffar lades "marinade" till i sökningen och gav 8 träffar. Artiklar som publicerats innan 2008 filterades och kvar var 7 artiklar. Efter noggrann läsning inkluderades 4 artiklar baserat på inklusionskriterierna (se ovan).

Se figur 9 för filtreringsschema.



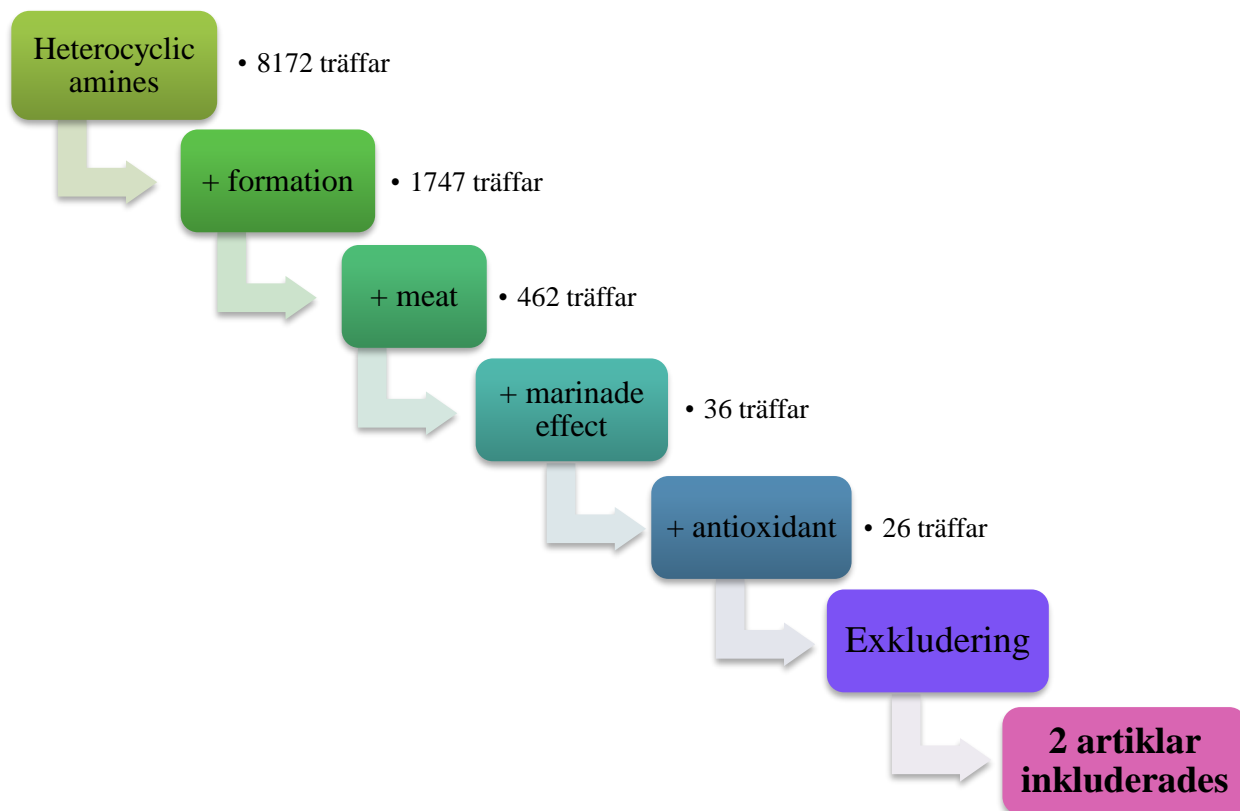
Figur 9. Filtreringsschema över exkludering av artiklar från PubMed. Sökningen var sorterad efter relevans.

3.1.2 Web of Science

Då PubMed endast innehåller biomedicinska arbeten och antalet träffar blev få, gjordes ytterligare en sökning på databasen Web of Science. Detta för att Web of Science har en bredare utsträckning av publicerade kemiska arbeten och kunde därför ge ett större urval av artiklar.

Inkluderingskriterierna var samma som tidigare sökning men fler ord användes vid sökningen för att filtrera antalet artiklar ytterligare. Första sökningen av "heterocyclic amines" gav 8172 träffar. Vid andra sökningen lades "formation" till och gav 1747 träffar. När ordet "meat" lades till filtrerades sökningen till 462 träffar och ytterligare till 36 träffar när "marinade effect" lades till. Då antalet träffar fortfarande var för många lades även "antioxidant" till i sökningen, vilket resulterade i 26 artiklar. De artiklar som var publicerade innan 2008 filtrerades bort och kvar var 23 studier. Efter exkludering av de artiklar som inte uppfyllde kriterierna, samt redan valda artiklar från PubMed, återstod 4 stycken artiklar som lästes igenom. Slutligen valdes 2 stycken av dessa ut för att inkluderas i studien. De artiklar som valdes var de som var mest relevanta för denna studie.

Se figur 10 för filtreringschema.



Figur 10. Filtreringschema över exkludering av artiklar från Web of Science. Sökningen var sorterad efter relevans.

Titel, årtal samt anledning till exkludering för de artiklar från Web of Science kan läsas i bilaga A. De artiklar som är markerade är de som är valda för denna studie och övriga artiklar exkluderades.

4 Resultat

4.1 Utfall från databaser

Web of Science och PubMed gav olika antal träffar. PubMed gav totalt 8 träffar och den första sökningen som gjordes på Web of Science gav 50 träffar när samma ord användes. Eftersom detta var för många träffar gjordes ytterligare sökningar där flera ord lades till i sökrutan för att specificera antalet artiklar. Orden ”formation”, ”effect” och ”antioxidant” lades till (se figur 10). Detta ledde till en filtrering där antalet träffar slutligen blev 23. Dock visade det sig att träffarna som gavs från PubMed också fanns med bland träffarna på Web of Science. Slutsatsen som kan dras av detta resultat var att användning av databasen PubMed egentligen var onödig eftersom det gav ett relativt litet utbud av artiklar samt att de valda artiklarna även fanns med i Web of Science.

4.2 Litteraturarbetets studier

De inkluderade studierna hade alla undersökt bildningen och uppkomsten av heterocykliska aminer vid tillagning av rött kött. Ytterligare gemensamt för studierna var att de hade undersökt effekten av att marinera med antingen öl/vin eller örtekryddor. De inkluderade studierna som valdes ut från artikelsökningen analyserades till en början var för sig. Under punkt 4.3 till 4.8 presenteras sammanfattningar av studiernas metod och resultat. Tabell 8 ger en sammanfattning av samtliga studiernas val av marinering, vilka heterocykliska aminer som undersöktes, kötttyp, tillagningsmetod samt temperatur under tillagning.

4.2.1 Grupp 1: Öl & vin

I den första gruppen valdes 3 studier ut. **4.3** – Melo *et al.* (2008), **4.4** – Viegas *et al.* (2012) och **4.5** – Viegas *et al.* (2015). Vissa författare var delaktiga i samtliga artiklar vilket kan ha påverkat studiernas metod och resultat. Viegas *et al.* studerade öl, vin och örter men kategoriserades i gruppen öl och vin med anledning av resultaten som redovisas i 4.5.2.

4.2.2 Grupp 2: Örtekryddor

I den andra gruppen valdes också 3 studier ut. **4.6** – Gibis *et al.* (2012), **4.7** – Jinap *et al.* (2015) och **4.8** – Sepahpour *et al.* (2018). Två artiklar, **4.7** – Jinap *et al.* (2015) och **4.8** – Sepahpour *et al.* (2018) hade en författare som var delaktig i båda dessa studier, vilket kan ha påverkat studiernas metod och resultat.

4.3 Melo *et al.* (2008) – Effect of Beer/Red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef

Syftet med studien var att se om marinering med öl och rött vin hade någon effekt på bildandet av heterocykliska aminer vid tillagning av nötkött (3).

4.3.1 Metod

Totalt inskaffades 20 biffar av nöt (ca 90-100 g st) som förvarades i ett kylrum i 24 h innan marinering. Vid marinering användes två marinader med 8 st biffar i vardera marinad samt en kontrollgrupp med 4 st biffar. En marinad bestod av pilsner med en alkoholhalt på 5,4% och den andra marinaden bestod av rött vin med en alkoholhalt på 13%.

Proverna marinerades under 1, 2, 4 respektive 6 h i en temperatur på 18°C och innan tillagning avlägsnades marinaden för att låta biffarna torka något.

Vid tillagning användes en stekpanna av teflon och varje biff stektes fyra min på vardera sida utan någon användning av fett i stekpannan. Temperaturen på ytan av

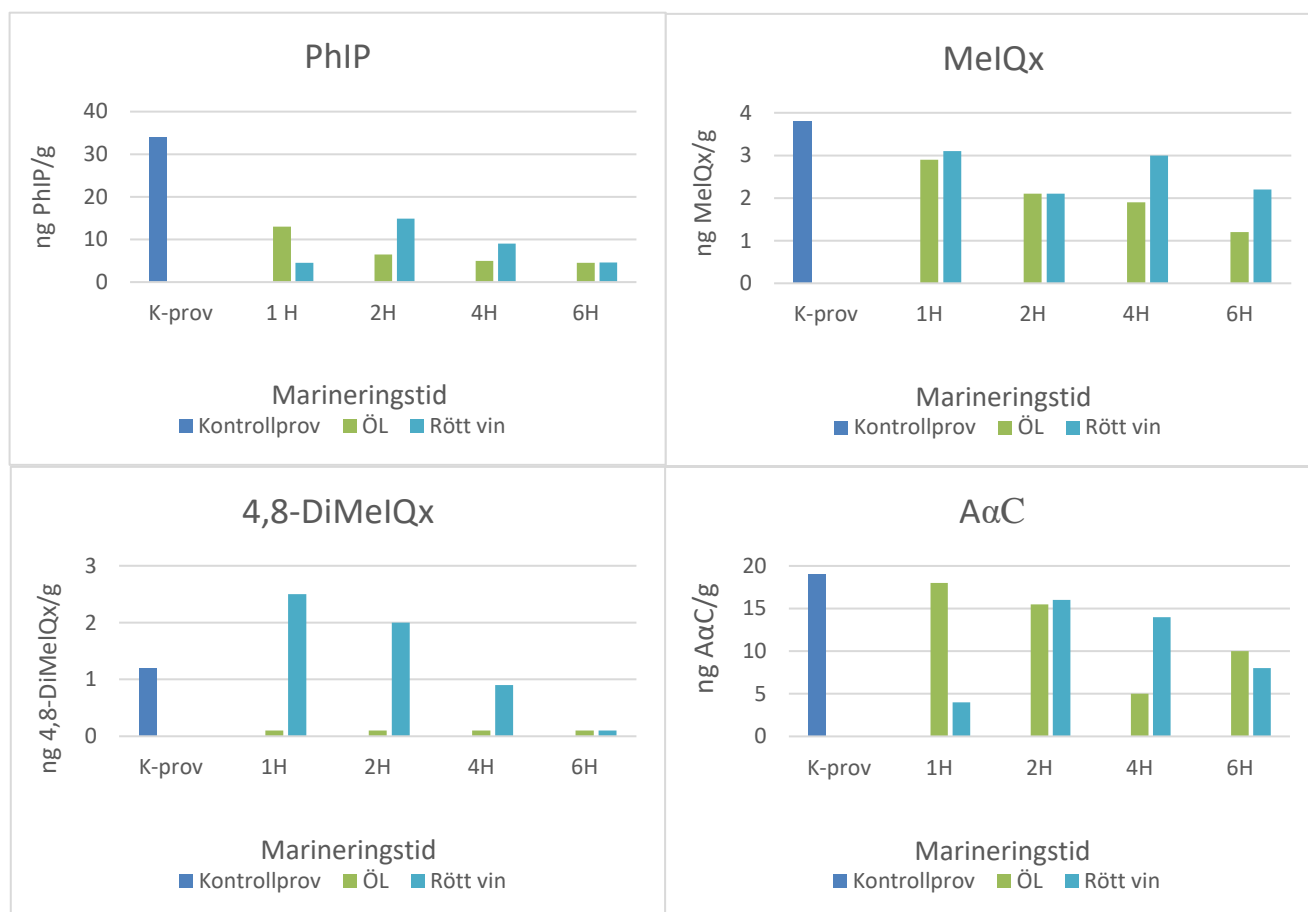
köttet varierade mellan 180-200°C och bevakades kontinuerligt under tillagningen med hjälp av en kött-termometer. Efter tillagning användes en kniv för att skära biffarna, därefter mixades de i en matberedare och förvarades därefter i -20°C fram till analys.

4.3.2 Extraktion av HA

Efter tillagning togs ett stickprov av köttet på 5g. Därefter mixades köttet och homogeniserades med natriumhydroxid. För att extrahera aminerna genomfördes en fast-fas extraktion (solid phase extraction, SPE) följt av en högupplösande kromatografisk omvänd-fas-kromatografi även kallad reversed phase chromatography, (RP-HPLC). På detta sätt kunde de olika HA-molekylerna separeras baserat på polariteten hos de olika aminerna vilket resulterade i koncentrationerna som redovisas i figur 11.

4.3.3 Resultat

HA analyserades från varje provexemplar och det konstaterades att varje köttbit innehöll de HA som analyserades, PhIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx samt AαC. Bildningen av de olika HA visas i figur 11.



Figur 11. Provresultat från bildningen av HA i de olika marinaderna efter tillagning. Mörkblå (kontrollprov), grön (öl) och turkos (vin).

Marinering med både öl och vin hade stor effekt på bildningen av PhIP där den procentuella reducerande effekten av HA blev 88% efter 6 h. Bildningen av 4,8-DiMeIQx förhindrades helt vid marinering av öl och kunde inte detekteras i resultaten. Marinering

i rött vin under en längre tid (6 h) förhindrade också bildningen av 4,8-DiMeIQx men marinerings under kort tid (1 h) gav en ökad koncentration jämfört med kontrollgruppen. Effekten av marinerings på bildningen av MeIQx var inte lika tydlig som PhIP och 4,8-DiMeIQx, men mängden minskade tydligt med längre marinerings i öl. Effekten av marinerings på bildningen av AαC var inte heller så betydande utom för rött vin vid marinerings i 1 h där koncentrationen var som lägst.

Slutsatsen som drogs var att marinerings med öl och rött vin ger en effekt på bildningen av HA men ölmarinad visade vara mer effektivt för att minska både MeIQx och 4,8-DiMeIQx.

4.4 Viegas et al. (2012) Inhibitory effect of antioxidant-rich marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef

Syftet med denna studie var att studera effekten av att marinera kött i marinader rika på antioxidanter och se om något samband finns mellan marinaden och bildningen av HAs. Studiens syfte var även att studera om endast öl/vin kunde reducera bildningen av HA eller om en kombination med kryddor kunde reducera ytterligare (37).

4.4.1 Metod

Nötkött inskaffades från ett lokalt slakteri. Köttet kylades ner över natten i 4°C och sedan putsades allt fett och bindväv bort. Köttet skivades upp i ca 1.5 cm tjocka skivor och lades sedan i marinad. För marinerings användes 6 st olika marinader. Öl, öl + örter, vin, vin + örter, alkoholfritt vin samt alkoholfritt vin + örter. Till ölmarinerings användes pilsner med en alkoholhalt på 5,2% och ingredienserna i ölen var vatten, malt, omälat spannmål och humle. Till vinmarinaden inskaffades ett vitt vin med en alkoholhalt på 13,5% och samma vin användes till den alkoholfria marinaden genom att vinet avalkoholiserades innan användning. Kryddor som användes var ingefära, vitlök, rosmarin, timjan och röd chilipeppar. Marinaderna tillagades precis före användning och köttet marinerades i 4 h.

Till en marinad på 100g användes: 2,8g ingefära 2,9g vitlök 0,4g rosmarin 0,25g timjan 0,1g röd chilipeppar
--

Vid tillagning användes en stekpanna i teflon och biffarna stektes 3 min på vardera sida. Temperaturen i pannan var ca 180°C. Efter att köttet hade tillagats skars det ner i småbitar, mixades för ett jämnare resultat och frystes sedan ner i -20°C fram till analys.

För att extrahera de olika HA användes samma metod som tidigare beskrivits i punkt 4.3.2. Efter detta gjordes ytterligare en analys med hjälp av en masspektrometer (LC-MS/MS-analys) för att få en mer specifik detektion och koncentration av de olika HA. Resultaten redovisas i tabell 1 nedan.

4.4.2 Resultat

I kontrollprovet kunde 4 olika HA detekteras, PhIP, IQ, MeIQx och 4,8-DiMeIQx. Flera aminer bildades i kontrollprovet men i så låga koncentrationer att de knappt kunde detekteras (mindre än 1ng/g).

PhIP kunde detekteras i alla prover, men samtliga marinader förutom marinaden som endast bestod av vitt vin, hade en reducerande effekt.

Resultaten visade även en signifikant lägre PhIP-koncentration vid marinerings i öl/vin+örter jämfört med enbart öl/vin men detta gällde inte andra HA som i vissa fall

ökade tillsammans med örter. Marinering med öl (med eller utan örter) var generellt sett mer effektivt för att minska bildningen av HA jämfört med vin (med eller utan örter) och den bästa reduktionen återfanns vid marinering med endast öl.

Alkoholfritt vin gav en större reduktion av PhIP och 4,8-DiMeIQx, jämfört med vanligt vitt vin, men samtidigt en lägre reduktion av MeIQx. En möjlig slutsats från denna studie är att alkohol kan ha både positivt och negativt inflytande på bildningen av HA. Resultat och HA-koncentrationer redovisas i tabell 1.

Tabell 1. Tabellen redovisar koncentrationerna av bildad mängd HAs i de olika marinaderna. (Koncentration av HA ± standardavvikelse) ND = Non detectable, NQ = Non qualified. Procentuell inhibering utifrån kontrollprov redovisas (%).

Marinad	HAs (ng/g)			Inhibering (%)
	PhIP	IQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx
Kontrollprov	9,69 ± 2,27	6,45 ± 0,35	9,07 ± 0,6	3,60 ± 1,64
Öl	4,84 ± 0,93 (50)	ND (>97)	ND (>99)	ND (>98)
Öl + örter	0,84 ± 0,04 (91)	ND (>97)	NQ (>76)	1,30 ± 0,62 (64)
Vin	9,82 ± 2,19 (-1)	ND (>97)	NQ (>76)	1,08 ± 1,52 (70)
Vin + örter	6,61 ± 2,14 (32)	1,82 ± 0,11 (72)	6,09 ± 3,27 (33)	1,29 ± 0,48 (64)
Alkoholfritt vin	3,81 ± 1,03 (61)	ND (>97)	4,38 ± 0,79 (52)	ND (>98)
Alkoholfritt vin + örter	2,25 ± 1,32 (77)	ND (>97)	4,44 ± 0,23 (51)	ND (>98)

4.5 Viegas *et al.* (2015) - Influence of beer marinades on the reduction of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled pork meat

Syftet med studien var att se om marinering med öl kunde reducera bildningen av heterocycliska aminer i kolgrillat fläskkött. Tre olika sorters öl testades (38).

4.5.1 Metod

Benfri fläskkotlett marinerades i 4 timmar i tre olika typer av öl. En öl med en alkoholhalt på 0,5%, en ljus lager med en alkoholhalt på 5,2% och en mörk lager med 5,0% alkoholhalt.

Ingredienserna för vardera öl varierade. Den alkoholfria samt den mörka lagern innehöll någon form av socker medan den ljusa lagern inte innehöll någon sötning. Se tabell 2.

Tabell 2. Tabell över ingredienser i varje ölsort.

	Alkoholfri öl	Ljus lager	Mörk lager
Ingredienser	Vatten, kornmalt, omältad spannmål, humle, glukos-fruktos sirup och aromämnen	Vatten, kornmalt, omältat spannmål & humle	Vatten, kornmalt, socker, humle & E150C

Innan tillagning användes 32 fläskkotletter som delades upp i fyra grupper med 8 st i varje grupp; en för varje typ av öl samt en kontrollgrupp (Kg). Öl var den enda ingrediensen som tillsattes i marineringen och precis före tillagning togs varje stek ut ur marinaden för att torka.

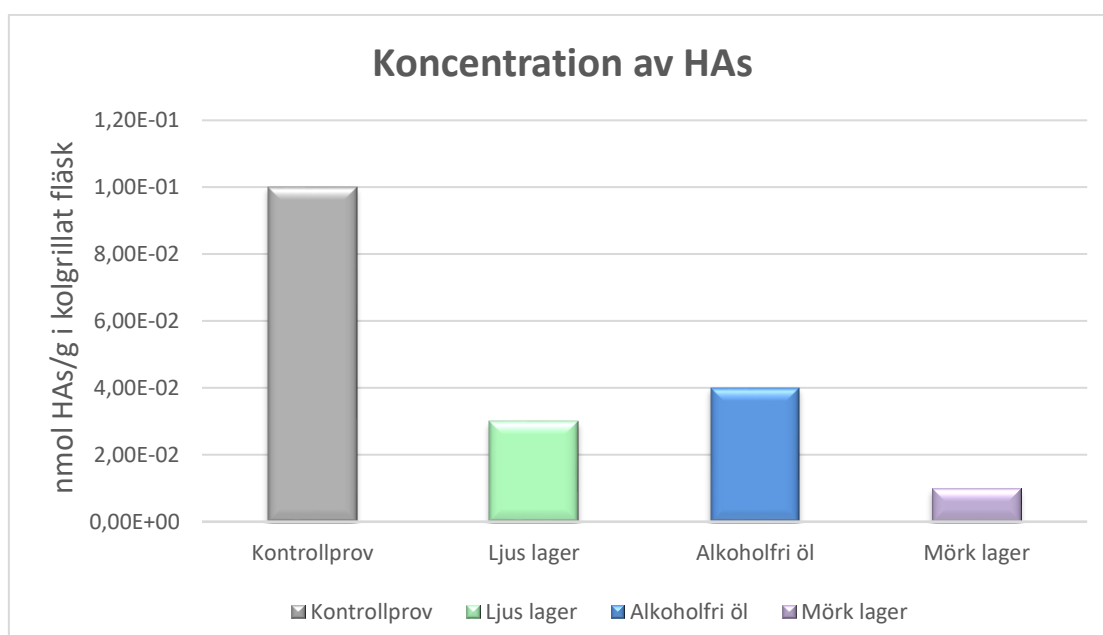
Vid grillning placerades köttet på en kolgrill med ett avstånd på 15 cm från värmen. Temperaturen på grillen var ca 200-230°C och köttet tillagades i 10 min med 5 min på vardera sida. Innertemperaturen på köttet visade 71°C med hjälp av en digital termometer (Testo 926). Efter tillagning mixades köttet i en Grindomix GM 200.

För att extrahera de olika HA användes samma metod som tidigare beskrivits i punkt 4.3.2.

4.5.2 Resultat

Den totala mängden av HA i köttet efter marinering i de olika ölsorterna presenteras i tabell 2. PhIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx och AαC kunde detekteras och var de HA som mättes vid jämförelse av marinaderna. Aminnen PhIP visade störst förekomst i kontrollgruppen (Kg). I jämförelse med kontrollprovet resulterade marinering av alla öltyper till en utmärkande minskning i bildandet av PhIP och AαC. Marinering med mörk lager visade en reducering av HA på 90%, ljus lager 70% och alkoholfri öl visade 58% reducering.

Slutsatsen var att ölmarinering är en effektiv reduceringsstrategi för att minska bildandet av HA. Den totala mängden HA som bildats ifrån varje typ av prov visas i figur 12 nedan.



Figur 12. Koncentration av HA-bildningen i de olika ölsorterna: 0,1 nmol motsvarar ca 20-25 ng/g HA

4.6 Gibis *et al.* (2012) Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties

Syftet med denna studie var att studera effekten av att marinera med antioxidanter i form av extrakt från rosmarin och druvkärnor. Studiens undersökte om marinering med extrakten har en reducerande effekt på bildningen av heterocykliska aminer i stekt nötfärs (22).

4.6.1 Metod

Fryst nötfärs inskaffades från en lokal affär. Druvkärnextrakt inskaffades även och löstes i vatten innan marinering. Druvkärnextraktet tillsattes i olika mängder, 0,2g, 0,4g, 0,6g och 0,8g /100g vatten. Rosmarinextraktet framställdes med rapsolja och blandades med solrosolja i de olika koncentrationerna 0,4g, 0,6g, 1,0g och 1,5g. Marinaderna tillverkades genom att homogenisera solrosolja, 32g med druvkärnextrakt respektive rosmarinextrakt samt 0,5g emulgeringsmedel bestående av citronsyrastrar av mono- och diglycerider av fettsyror (E472c). Direkt efter tillverkning av marinaderna tillsattes de till färsen genom att den frusna färsen penslades med marinaderna och kontrollgruppen penslades med vanlig solrosolja.

Vid tillagning användes ett grilljärn med temperaturen 230°C. Den marinerade färsen täcktes med aluminiumfolie och lades i grillen i 2 min och 40 sekunder.

Efter tillagning togs ett stickprov av köttet på 5g. För att extrahera de olika HA användes samma metod som tidigare beskrivits i punkt 4.3.2. Vid extraktionen jämfördes 15 olika polära och icke-polära HA för att kunna identifiera vilka aminer som bildats i denna studie. Av de 15 som testades hittades koncentrationer av MeIQx, PhIP och ko-mutagenerna Norharman och Harman.

4.6.2 Resultat

Efter extraktionen av de olika HA kunde 4 stycken identifieras i proverna. MeIQx, PhIP, Norharman och Harman. Marinering med druvkärnextrakt (0,6-0,8 g/100g) reducerade bildningen av MeIQx och PhIP i jämförelse med kontrollprovet, samtidigt som halten av Harman ökade. Marinering med rosmarinextrakt sänkte nivåerna av samtliga HA när högre koncentrationer av extraktet användes (1-1,5 g/100g). Totalt ledde båda marinaderna till en signifikant minskning med 90% när det gäller koncentrationen av PhIP.

Resultatet redovisas i tabell 3-5 nedan.

Tabell 3. Resultat av HAs i kontrollprov med solrosolja och marinad utan extrakt. Koncentrationerna visas i µg/100g medelvärde ± standardavvikelse.

	Kontrollprov utan marinad µg/100g	Kontrollmarinad utan extrakt
MeIQx	1,0 ± 0,02	0,9 ± 0,06
PhIP	0,3 ± 0,07	0,3 ± 0,08
Norharman	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,01
Harman	1,1 ± 0,02	1,1 ± 0,02

Tabell 4. Resultat av HAs i de olika marinaderna av druvkränextrakt. Koncentrationerna visas i µg/100g medelvärde ± standardavvikelse. Grön visar reducering, röd visar ökning och blå visar ingen skillnad jämfört med kontrollprov utan medräkning av standardavvikelse.

<u>Druvkärn</u>	0,2g extrakt	0,4g extrakt	0,6g extrakt	0,8g extrakt
MeIQx	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,14	0,3 ± 0,01
PhIP	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,08	0,03 ± 0,01	<0,02 ± 0,01
Norharman	0,5 ± 0,03	0,6 ± 0,01	0,7 ± 0,03	0,6 ± <0,01
Harman	1,1 ± 0,02	1,5 ± 0,02	1,6 ± 0,02	1,7 ± 0,02

Tabell 5. Resultat av HAs i de olika marinaderna av rosmarin extrakt. Koncentrationerna visas i µg/100g medelvärde ± standardavvikelse. Grön visar reducering i jämförelse med kontrollprov utan medräkning av standardavvikelse.

<u>Rosmarin</u>	0,12g extrakt	0,4g extrakt	0,6g extrakt	1,0g extrakt	1,5g extrakt
MeIQx	0,6 ± 0,07	0,6 ± 0,07	0,6 ± 0,04	0,5 ± 0,05	0,3 ± 0,03
PhIP	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Norharman	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,01	0,3 ± <0,01	0,2 ± <0,01	0,3 ± 0,02
Harman	0,9 ± 0,09	0,9 ± 0,06	0,5 ± 0,05	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,05

Resultaten visade att marinad med rosmarinextrakt hade störst reducerande effekt på bildningen och koncentrationen av HA.

4.7 Jinap *et al.* (2015) Effect of selected local spices marinades on the reduction of heterocyclic amines in grilled beef

Syftet med studien var att studera effekterna av att marinera nötkött i färsk kryddor och se om marineringen kunde reducera mängden heterocykliska aminer som bildas vid tillagning. Kryddor som testades var gurkmeja, curry, ingefära samt citrongräs (39).

4.7.1 Metod

Nötkött inskaffades från lokal handel och förvarades i -20°C fram till användning. Köttet tinades i 4°C och skars sedan i 100g bitar. Kryddor som användes för marinad var gurkmeja, curry, ingefära och citrongräs vilka köptes från en lokal handel. Alla kryddor tvättades, torkades med pappershandduk, finhackades och frystorkades i 2 dagar vid -20°C.

Vid marinering användes olika mängd kryddor för varje provexemplar. 1g, 2g, 3g och 4g/100g användes för gurkmeja och 2,5g, 5g, 7,5g och 10g/100g användes för curry, citrongräs och ingefära. Tester togs efter 0h och 24h marinering samt en kontrollgrupp med ingen marinering. Efter att köttet marinerats skars det ner i kuber, sattes på grillspett och sedan grillades på en elektrisk grill med en temperatur på 300°C för att få resultaten medium och well done på köttet. Medium nådde en innetemperatur på 70°C (nåddes efter 3 min) och well done en innetemperatur på 80°C (nåddes efter 4 min).

Efter tillagning togs ett stickprov av köttet på 5g. För att extrahera de olika HA användes samma metod som tidigare beskrivits i punkt 4.3.2. Efter detta gjordes ytterligare en analys med hjälp av en masspektrometer (LC-MS/MS-analys) för att få en mer specifik detektion och koncentration av de olika HA.

4.7.2 Resultat

Maillardreaktionen är grunden för bildningen av HA. Mer tid vid tillagning leder till ett mer brunfärgande resultat och mer HA kommer att bildas. Observationer av brunfärgningen gjordes under experimentet och resultaten visade att gurkmeja, citrongräs, curry och ingefära reducerade brunfärgningen på köttet. Ingen skillnad i brunfärgningen mellan medium och well done visades. Författarna framför teorier om att reduceringen av brunfärgningen kan bero på närvaron av polyfenoler som finns i kryddorna. Resultaten av de olika marinadernas effekt på HA redovisas nedan.

4.7.2.1 Gurkmeja

Resultaten för marinering med gurkmeja visade tydligt ha en reducerande effekt på samtliga HA. Desto högre koncentration av gurkmeja desto mer effektivt reducerades mängden HA, förutom vid bildningen av DiMeIQx i mediumtemperatur där marinering med den lägsta koncentrationen (1g/100g) gurkmeja hade störst effekt. Slutsatsen som kan dras är att marinering med gurkmeja reducerar bildningen av HA vid tillagning, men effekten av kryddan var inte lika bra som med curry och ingefära.

4.7.2.2 Citrongräs

Marinering med citrongräs hade också ha en reducerande effekt på bildningen av HA i samtliga koncentrationer, dock inte lika effektivt som de andra kryddorna. Störst effekt kunde ses för bildningen av DiMeIQx och A α C i mediumtemperatur med den högsta koncentrationen (10g/100g) av citrongräs där koncentrationen av aminosyror nästan halverades. Slutsats för marinering med citrongräs är att det har en reducerande effekt på bildningen av HA, men citrongräs var den kryddan som hade minst effekt av de som testades i denna studie.

4.7.2.3 Ingefära

Marinering med ingefära visade sig ha stor reducerande effekt på koncentrationen av bildat HA. Resultaten visade tydligt att vid högre koncentrationer av ingefära reducerades koncentrationen av HA mer. Den högsta koncentrationen (10g/100g) av ingefära reducerade koncentrationen av alla HAs med över 50% i jämförelse med kontrollgruppen. Det enda värdet som stack ut var koncentrationen av A α C vid well done temperatur, med marinering av 2,5g/100g ingefära, där bildningen av aminosyran nästan dubblerades. Trots detta är effekten av att marinera med ingefära större än marinering med gurkmeja och citrongräs. Detta gav slutsatsen att marinad med ingefära är det mest effektiva sättet att reducera bildningen och koncentrationen av HA.

4.7.2.4 Curry

Marinering med curry visade sig ha stor reducerande effekt på koncentrationen av bildat HA. Curry visade sig vara nästan lika effektivt som ingefära då det halverade koncentrationen av samtliga HAs. Marinering med curry visade att ju högre koncentration av kryddan desto lägre blev koncentrationen av bildade HA, liksom de andra kryddorna som användes. Jämfört med ingefära hade curry högre koncentrationer av DiMeIQx och A α C (well done) men något längre koncentration av Harman. Slutsatsen blev att curry var effektivt för att minska bildningen av HA.

4.8 Sepahpour et al 2018 – Inhibitory effect of mixture herbs/spices on formation of heterocyclic amines in mutagenic activity of grilled beef

Syftet med denna studie var att studera och fastställa om man med hjälp av marinering med färska kryddor och kryddblandningar kan minska bildningen av heterocykliska aminer i grillat nötkött. 4 kryddor användes totalt i denna studie (40).

4.8.1 Metod:

Gurkmeja, curry, ingefära och citrongräs inskaffades från en lokal affär. Samtliga färska kryddor tvättades med kranvatten, torkades, finhackades och frystorkades. Efter detta mixades kryddorna separat till pulver, siktades och förvarades sedan i -20°C fram till marinering.

I studien utfördes 2 olika tester. Det första testet bestod av att fastställa den totala antioxidativa effekten hos varje krydda vilket utfördes genom en DPPH-analys. DPPH är en fri radikal som ändrar färg när den inaktiveras av en antioxidant, vilket ger ett mått på den antioxidativa effekten hos ämnet. Resultaten visade som följande (\pm standardavvikelse): Gurkmeja: 47,4% (\pm 2,6), Curry: 41,7% (\pm 1,0), Ingefära: 27,0% (\pm 1,9), Citrongräs: 10,4% (\pm 1,1)

Det andra testet bestod av att undersöka koncentrationen av HA i marinerat nötkött. Färsk nötbiff, med en fetthalt på 12,4%, inhandlades och förvarades i -20°C fram till marinering där köttet fick tina i 4°C i ett dygn. Köttet skars i små kuber och marinerades med kryddor. Mängden kryddor som användes i samtliga marinader var 3g/100g och totalt testades 19 olika kryddblandningar som redovisas nedan i tabell 6. Kuberna marinerades under 8 h i 4°C innan de placerades på grillspett. Köttet tillagades på en elgrill i 10 minuter. Temperaturen på grillen var 240°C.

För att extrahera de olika heterocykliska aminerna användes samma metod som nämns tidigare under 4.3.2.

Tabell 6. Koncentrationer av kryddor i de olika marinaderna. Samtliga marinader 1-19 bestod av 3g kryddor per 100g kött.

Marinad	Gurkmeja g/100g	Curry g/100g	Ingefära g/100g	Citrongräs g/100g
1	3			
2		3		
3			3	
4				3
5	1,5	1,5		
6	1,5		1,5	
7	1,5			1,5
8		1,5	1,5	
9		1,5		1,5
10			1,5	1,5
11	1	1	1	
12	1	1		1
13	1		1	1
14		1	1	1
15	0,75	0,75	0,75	0,75
16	1,875	0,375	0,375	0,375
17	0,375	1,875	0,375	0,375
18	0,375	0,375	1,875	0,375
19	0,375	0,375	0,375	1,875

4.8.2 Resultat

Kryddor och örter har bevisats hämma bildningen av HA, troligen tack vare deras antioxidativa egenskaper (22,41). Effekten av de fyra kryddorna som användes i denna studie redovisas nedan i tabell 9. Vid jämförelse av de enskilda kryddorna var gurkmeja, ingefära och citrongräs ungefär likvärdiga när det gällde att minska bildningen av HA, medan curry hade en betydligt lägre effekt. Det verkar inte finnas någon direkt korrelation mellan antioxidativ förmåga (mätt enligt DPPH) och reduktion av HA eftersom curry hade relativt hög antioxidativ effekt men inte var effektiv när det gällde att minska bildningen av HA. Detta kan även stödjas från resultatet av citrongräs som hade lägst antioxidativ effekt men en god förmåga att minska bildningen av HA.

Marinad 7 med gurkmeja och citrongräs visade sig ha störst reducerande effekt (94,8%) följt efter marinad nr 19 (93,2%) som innehöll samtliga kryddor men med högre koncentration av citrongräs. Marinad 6 och 13 hade också över 90% reduktion och båda dessa innehöll gurkmeja (men även andra kryddor). Blandning av kryddor hade alltså en större effekt än samma mängd kryddor av en enskild sort.

De HAs som kunde detekteras var IQ, IQx, MeI, MeIQx, 7,8-DimeIQx, PhIP, Harman, Norharman och AαC. Resultaten för samtliga marinerade köttbitars koncentration av HA visas i tabell 7.

Tabell 7. Koncentrationen av heterocykliska aminer som detekterats i samtliga marinerade köttbitar. Koncentrationen visas i ng/g. Standardavvikelsen är markerad ±. De marinader med störst procentuella effekt är markerade med grönt.

Marinad	Total mängd HA (ng/g)	Procentuell reduktion av HA (%)
Kontroll	207,2 ± 14,1	
1	51,1 ± 6,1	75,4
2	163,1 ± 10,8	21,3
3	68,5 ± 8,4	67,0
4	58,1 ± 7,2	71,9
5	86,9 ± 10,4	58,1
6	17,1 ± 4,2	91,7
7	10,9 ± 2,7	94,8
8	43,2 ± 6,2	79,2
9	62,1 ± 4,8	70,1
10	28,3 ± 4,1	86,4
11	22,4 ± 4,7	89,2
12	38,2 ± 6,8	81,6
13	15,1 ± 3,9	92,7
14	29,1 ± 4,7	86,0
15	29,6 ± 5,5	85,7
16	33,3 ± 4,1	83,9
17	57,4 ± 5,5	72,3
18	22,2 ± 2,9	89,3
19	14,2 ± 2,0	93,2

5 Diskussion

Att heterocykliska aminer (HA) bildas i en reaktion vid upphettning av kreatin, kreatinin, sockerarter och fria aminosyror är bevisat. Det som styr hur mycket HA som bildas är mängden av de olika utgångsämnen (42). I kött där kreatinhalten är hög, är även risken att det bildas mer HA hög. Ytterligare faktorer som styr mängden HA som bildas är tillagningsmetod, tillagningstid och temperatur. HA bildas inte endast i kött, även om detta är fokus i denna litteraturstudie, utan det bildas även i kyckling och fisk. En av anledningarna till att mängden HA varierar kan vara att olika typer av kött har olika innehåll av kreatin, kreatinin, sockerarter och fria aminosyror. Tidigare studier har visat att fläskkött och fisk innehåller en större mängd HA än vad nötkött gör (42). En grov uppskattning om mängden HA man får i sig per dag är beräknat till några mikrogram per person och dag (11).

5.1 Studiedesign

Den äldsta studien som användes var från 2008, den senaste studien var från 2018 och de resterande studierna var från 2012 (2st) och 2015 (2st). Studiedesignen hos de inkluderade studierna hade många likheter i form av syfte och metodologi. Syftet för samtliga studier var att se om marinering hade effekten att reducera bildningen av HA. Alla studier använde samma analytiska processer (SPE samt RP-HPLC) men hade vissa skillnader i uppmätta koncentrationer och ytterligare analys av de olika HA. Jinap *et al.* (2015) (39) och Viegas *et al.* (2012) (37) använde sig av en masspektrometrisk analys (LC-MS/MS-analys) för att kunna specificera och säkerställa koncentrationerna av de olika HA.

Andra skillnader mellan studierna var även tillagningsmetoden, temperaturer och kötttyper. Viegas *et al.* (2015) (38) använde sig av fläskkött och resterande studier använde nötkött. Melo *et al.* (2008) (3) och Viegas *et al.* (2012) (37) använde stekpanna av teflon och Viegas *et al.* (2015) (38) använde kolgrill som tillagningsmetod. Gibis *et al.* (2012) (22) använde ett grilljärn och Jinap *et al.* (2015) (39) samt Sepahpour *et al.* (2018) (40) använde sig av elgrill. Studierna där grill användes som tillagningsmetod hade något högre temperaturer där alla låg mellan 200-300°C, i de studierna där stekpanna användes var temperaturen mellan 180-200°C. Ytterligare skillnader mellan studierna var tillagningstiden (se tabell 8).

Melo *et al.* (2008) (3), Viegas *et al.* (2012) (37) och Viegas *et al.* (2015) (38) använde sig av alkoholhaltig dryck i marinaderna. Gibis *et al.* (2012) (22), Jinap *et al.* (2015) (39) samt Sepahpour *et al.* (2018) (40) använde örtekryddor/örtextrakt som marinad.

De studerade HA varierade även mellan studierna. Melo *et al.* (2008) (3), Viegas *et al.* (2012) (37) och Viegas *et al.* (2015) (38) identifierade och studerade samma HA. Gibis *et al.* (2012) (22), Jinap *et al.* (2015) (39) och Sepahpour *et al.* (2018) (40) studerade olika HA, även om flera HA var lika mellan studierna. Det kan noteras att MeIQx fanns med i samtliga studier och PhIP fanns med i 5 av sex studier (se tabell 8).

5.2 Resultatjämförelse

Alla studier visade att det bildades HA vid tillagning. Koncentrationen av HA varierar beroende på tillagningsprocess och vilken HA som studerats. Baserat på resultaten från kontrollgrupperna (utan marinad) i samtliga studier (förutom Jinap *et al.*) kan ett medelvärde beräknas på koncentrationen av mängden PhIP som bildats, vilket blev: 19,5 ng/100g.

Även om HA uppstår i låga koncentrationer så är de mutagena ämnen som kan framkalla cancer, och resultaten från studierna visar att en åtgärd som kan vidtas för att minska bildandet av dem är att marinera köttet innan tillagning.

5.2.1 Grupp 1

I studien av Melo *et al.* (2008) (3) visade det sig att marinering med öl och rött vin hade olika effekt på de heterocykliska aminerna. Rött vin är rikt på antioxidanter och kan vara en av anledningarna till att rött vin visade sig ha en reducerande effekt på bildningen av HAs. Trots det rika innehållet av antioxidanter var det öl som visade sig ha störst effekt och öl reducerade mängden betydligt mer än vad rött vin gjorde. Även öl har dock en viss antioxidantisk effekt från naturliga ämnen i frukt, malt och humle.

För att ytterligare undersöka betydelsen av antioxidanters effekter testade Viegas *et al.* (2012) (37) att även tillsätta färska kryddor och örter till öl och vitt vin för att se om bildningen av HA kunde inhiberas. Örterna som tillsattes var: ingefära, vitlök, rosmarin, timjan och röd chilipeppar vilka samtliga har visat sig ha antioxidativa effekter. Dock visade resultaten att tillsättning av dessa kryddor inte var det mest effektiva sättet att minska bildningen av samtliga aminer. Den mest effektiva marinaden var öl utan örter, även om resultaten visade att vid tillsättning av örter minskade koncentrationen av exempelvis PhIP något mer, men i gengäld ökade koncentrationen av 4,8-DiMeIQx.

I den tredje studien analyserades effekten av olika öltyper i Viegas *et al.* (2015) (38) Ett oväntat resultat erhöles då den mörka lagern var mest effektiv på reduktionen av HA. Det var oväntat eftersom den innehöll både socker och E150C, sockerkulör, som borde bidra till en högre halt av HA. Den ljusa lagern innehöll inget tillsatt socker men visade sig ge en betydligt högre koncentration av HA i köttet än vad den mörka lagern gjorde. Den alkoholfria ölen förväntades ha minst effekt, vilket stämde överens med resultaten från studien.

En uppenbar likhet mellan de 3 studierna som undersöktes i gruppen med öl/vin-marinering (grupp 1) är att ett antal av författarna var delaktiga i samtliga studier och en röd tråd kunde ses mellan de olika studierna. I den första studien undersöktes effekten av öl och rött vin. I den andra studierades effekten av öl, vitt vin och tillsättning av färska kryddor och örter. Eftersom resultaten från båda dessa studier visade att öl var det mest effektiva sättet att reducera mängden HA gjordes ytterligare en undersökning i form av den tredje studien där olika sorters öl testades. Det slutgiltiga resultatet blev att mörk lager hade störst effekt. Dock skall det även nämnas att samma typ av kött inte användes i dessa 3 studier eftersom Viegas *et al.* (2015) (38) använde sig av fläskkött och de andra använde nötkött. Tidigare studier visar att tillagat fläskkött oftast bildar en större mängd HA än vad nötkött gör (42). Detta kunde dock inte bekräftas i dessa studier då koncentrationen av HA visade sig vara i ungefär samma nivå i samtliga studier.

Eftersom dessa 3 artiklar hade författare som var delaktiga i samtliga studier så bör man förhålla sig kritiskt till samstämmigheten i resultaten, även om utförandet är korrekt. Eftersom samma forskare har medverkat i studierna så kan det påverka metod, resultat och personliga intentioner så att brister och skillnader i studierna inte kommer fram. Dessa 3 studier undersökte också uppkomsten av exakt samma HA.

5.2.2 Grupp 2

Gibis *et al.* (2012) (22) studerade effekten av att tillsätta två olika örtextrakt till marinader med en bas av olja. Detta visade sig vara effektivt vid användning av rosmarinextrakt för att reducera mängden HA. Druvfröextraktet ökade dock koncentrationerna av vissa HA (Harman och Norharman). Anledningen till detta är oklart eftersom druvor är rikt på antioxidanter och därmed borde sänka koncentrationen av HA när det används i marinering.

Jinap *et al.* (2015) (39) studerade effekten av att endast använda kryddor som marinad, utan att tillsätta någon vätska. Av de kryddorna som användes visade ingefära och curry ha störst reducerande effekt på samtliga HA. Alla kryddor är naturliga antioxidanter och någon slutsats om varför gurkmeja och citrongräs inte visade sig vara lika effektiva som ingefära och curry kunde inte dras. Kryddorna studerades var för sig, inte blandade med varandra **men curry är i sig självt en blandning av kryddor där bland annat gurkmeja och ingefära brukar ingå**. Resultaten från studien styrker att en större mängd HA bildas vid längre tillagningstid eftersom de köttbitar som blev tillagade till well done visade på högre koncentrationer än köttet som tillagats till en mediumtemperatur. I studien formas även en teori om att brunfärgningen reducerades på grund av fenolföreningar som förekommer i kryddorna som användes till marinaderna.

I studien av Sepahpour *et al.* (2018) (40) marinerades köttet med samma kryddor som Jinap *et al.* (2015) (39) använde. Sepahpour *et al.* (2018) (40) studerade även kombinationen av dessa kryddor och resultaten visade att marinaden som reducerade HA mest (94,8%) var en kombination av gurkmeja och citrongräs. Marinaden som innehöll samtliga kryddor men en högre koncentration av citrongräs visade sig också vara effektiv då denna blandning reducerade mängden bildade HA med 93,2%. Marinaden som visade sig ha minst effekt var ren curry, vilket var oväntat då resultaten från Jinap *et al.* visade att curry var en av de mest effektiva kryddorna. Som nämnts ovan är curry en blandning av kryddor, som kan variera mellan olika tillverkare, och detta kan eventuellt förklara skillnaden i resultat mellan studierna eftersom Jinap *et al.* (2015) (39) använde curryblad. Sepahpour *et al.* (2018) (40) marinerade köttet i 8 h, temperaturen på grillen var 240°C och köttet grillades i 10 min till skillnad mot Jinap *et al.* (2015) (39) som marinerade köttet i 24 h och hade 300°C på grillen där köttet grillades i 3 min för medium och 4 min för well done. Dessa skillnader kan också vara anledningen till att resultaten från studierna blev olika.

Syftet med denna litteraturstudie var att se om marinerings är ett effektivt sätt att minska bildningen av heterocykliska aminer vid tillagning, vilket bekräftas i de studier som undersöktes. En viktig begränsning i detta arbete är att endast en jämförelse av öl, vin och örtekryddor gjordes och det finns många andra typer av marinader som kan undersökas.

Sepahpour *et al.* (2018)

Gurkmeja (50%) citrongräs (50%): 94,8%

Gurkmeja (12,5%) ingefära (12,5%) curry (12,5%) citrongräs (62,5%): 93,2%

Gurkmeja (33%) ingefära (33%) citrongräs (33%): 92,7%

Gurkmeja (50%) ingefära (50%): 91,7%

Viegas *et al.* (2015)

Mörk lager: 90%

Jinap *et al.* (2015)

Ingefära: 80% (Endast procentuell minskning av DiMeIQx)

Gibis *et al.* (2012)

Rosmarinextrakt: 72,73% (Endast procentuell minskning av MeIQx med 1,5g extrakt)

Figur 13. Procentuell jämförelse av marinader från Sepahpour *et al.* (2018), Viegas *et al.* (2015), Jinap *et al.* (2015) och Gibis *et al.* (2012) (22,38–40).

Resultaten visar att marinerings är ett effektivt sätt att minska bildningen av HA men det är värt att notera att val av tillagningsmetoder också kan reducera mängden, genom att exempelvis koka eller tillaga köttet i ugn vid lägre temperatur och kortare tid (3).

Varför marinering med öl, vin och örtekryddor, som är naturliga antioxidanter, minskar koncentrationerna av HA är fortfarande oklart. En hypotes är att det är den antioxidativa effekten hos dessa ämnen som påverkar Maillardreaktionen så det bildas mindre HA vid tillagningen, men det finns inga bevis för detta. I studien av Sepahpour *et al.* (2018) (40) mättes den antioxidativa effekten hos de igående örtekryddorna men det fanns inget uppenbart samband med inhiberingen av HA. Detta kan bero på att det finns flera olika metoder som används för att mäta den antioxidativa effekten och det är oklart vilken metod som är mest pålitlig. Reduceringen kan alltså bero på antioxidanterna även om deras effekt är svår att mäta. Det skall även nämnas att marinering i vissa fall ökade koncentrationerna av enskilda HA, även om majoriteten av resultat visade på en minskning.

Tabell 8. Sammanfattande tabell över samtliga studiers metod, tillagning samt identifierade och studerade HA.

Studie	Köttstort	Marinad + tid	Tillagning metod	Temperatur	Tillagningstid	Identifierade HA
Melo <i>et al</i> 2008	Nötkött	Öl och rött vin 1, 2, 4 och 6 h	Stekpanna	180-200°C	8 min	PhIP MeIQx 4,8-DiMeIQx AαC
Viegas <i>et al</i> 2012	Nötkött	Öl, vitt vin och örter 4 h	Stekpanna	180°C	6 min	PhIP MeIQx 4,8-DiMeIQx IQ
Viegas <i>et al</i> 2015	Fläskkött	3 sorters öl 4 h	Kolgrill	200-230°C	10 min	PhIP MeIQx 4,8-DiMeIQx AαC
Gibis <i>et al</i> 2012	Nötkött	Druvfröextrakt Rosmarinextrakt 0 h	Grilljärn	230°C	2 min 40 s	PhIP MeIQx Harman Norharman
Jinap <i>et al</i> 2015	Nötkött	Gurkmeja, curry, ingefära och citrongräs 24 h	Elgrill	300°C	3 min (medium) 4 min (well done)	MeIQx DiMeIQx Harman Norharman AαC
Sepahpour <i>et al</i> 2018	Nötkött	Gurkmeja, curry, ingefära och citrongräs 8 h	Elgrill	240°C	10 min	PhIP MeIQx 7,8-DiMeIQx IQ, IQx Harman Norharman AαC

5.3 Relevansbedömning och etiska aspekter

5.3.1 Relevansbedömning

Livsmedel är något som alla människor kommer i kontakt med dagligen vilket gör att denna studie är både relevant och relaterbar för många. Under de senaste åren har nyheter publicerats i media angående riskerna med kött och att grilla, men oftast saknas bra beskrivningar om varför de har en mutagen effekt och vad man kan göra för att minska riskerna när det gäller PAH och HA, som båda visat sig vara cancerframkallande (43).

Livsmedelsverkets information om heterocykliska aminer är nästan obefintlig. En sökning av heterocykliska aminer på Livsmedelsverkets hemsida gav endast en rapport som gav information om HA (21). Viss information har hittats om andra hälsofarliga ämnen som exempelvis PAH, men nästan ingenting om HA.

När ytterligare en sökning av HA gjordes på Folkhälsomyndighetens hemsida blev resultatet 0 träffar. För att undersöka detta närmre gjordes även en sökning på EFSA, European Food Safety Authority, där antal träffar också blev 0. Anledningen till att ingen information om dessa cancerogena aminer finns på dessa sidor är oklart.

Studien bedöms vara relevant utifrån den bristfälliga informationen från dessa myndigheter.

En slutsats som kan dras från denna studie att mer lättillgänglig och tillförlitlig information borde finnas om heterocykliska aminer, och hur man kan förhindra att de bildas vid tillagning.

5.3.2 Etiska aspekter

I denna litteraturstudie finns det inga uppenbara etiska dilemman. I de inkluderade studierna kunde inga etiska dilemman identifieras.

6 Slutsats

Syftet med denna litteraturstudie var att få ökade kunskaper om heterocykliska aminer samt att undersöka om marinering med öl, vin och örtekryddor kan vara ett effektivt sätt att reducera bildningen av HA vid tillagning av kött. Denna studie gav ökade kunskaper om heterocykliska aminer samt dess cancerogena funktioner i kroppen. Ytterligare en slutsats som kan dras är att mer information behövs om HA än vad som i dagsläget finns tillgängligt hos svenska myndigheter.

Utifrån de valda artiklarna och dess resultat dras en slutsats om att marinering med flera olika kryddor och/eller mörk öl, effektivt reducerar koncentrationerna av de olika HA som kan bildas. Hypotesen som framställdes om att marinadens antioxidativa effekt var mekanismen bakom reduceringen är fortfarande obesvarad. För att fastställa om hypotesen är riktig krävs mer forskning och tillförlitliga metoder för att mäta antioxidativ effekt hos livsmedel.

Referenser

1. Corriher S. Marinades add flavour but don't always tenderize. Fine Cooking [Internet]. 34:e uppl. [citerad 22 april 2019]; Tillgänglig vid: <https://www.finecooking.com/article/marinades-add-flavor-but-dont-always-tenderize>
2. Nerurkar PV, Marchand LL, Cooney RV. Effects of Marinating With Asian Marinades or Western Barbecue Sauce on PhIP and MeIQx Formation in Barbecued Beef. *Nutrition and Cancer*. juli 1999;34(2):147–52.
3. Melo A, Viegas O, Petisca C, Pinho O, Ferreira IMPLVO. Effect of Beer/Red Wine Marinades on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pan-Fried Beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26 november 2008;56(22):10625–32.
4. Yurchenko S, Mölder U. The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *Journal of Food Composition and Analysis*. december 2005;18(8):857–69.
5. Yurchenko S, Mölder U. Volatile N-Nitrosamines in various fish products. *Food Chemistry*. maj 2006;96(2):325–33.
6. Liao GZ, Wang GY, Xu XL, Zhou GH. Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. *Meat Science*. maj 2010;85(1):149–54.
7. Livsmedelsverket [Internet]. [citerad 18 maj 2019]. Tillgänglig vid: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/oonskade-amnen/nitrat-nitrit-och-nitrosaminer>
8. Livsmedelsverket [Internet]. [citerad 18 maj 2019]. Tillgänglig vid: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/oonskade-amnen/miljogifter/polycykliska-aromatiska-kolvaten-pah>
9. Hodge JE. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. oktober 1953;1(15):928–43.
10. Hiramoto S, Itoh K, Shizuuchi S, Kawachi Y, Morishita Y, Nagase M, m.fl. Melanoidin, a Food Protein-Derived Advanced Maillard Reaction Product, Suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter*. oktober 2004;9(5):429–35.
11. Jägerstad M, Skog K. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. juli 2005;574(1–2):156–72.
12. Felton JS, Knize MG. Heterocyclic-Amine Mutagens/Carcinogens in Foods. I: Cooper CS, Grover PL, redaktörer. *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1990. s. 471–502.
13. Cross AJ, Sinha R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2004;44(1):44–55.
14. Livsmedelsverket [Internet]. [citerad 18 maj 2019]. Tillgänglig vid: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/vitaminer-och-antioxidanter/antioxidanter>

15. Helmersson J, Basu S. Bioaktiva isoprostaner. Läkartidningen [Internet]. [citerad 09 maj 2019];2009-01–27(5). Tillgänglig vid:
<http://www.lakartidningen.se/Functions/OldArticleView.aspx?articleId=11247>
16. Läkartidningen [Internet]. [citerad 18 maj 2019]. Tillgänglig vid:
<http://www.lakartidningen.se/Functions/OldArticleView.aspx?articleId=11247>
17. antioxidationsmedel - Uppslagsverk - NE.se [Internet]. [citerad 18 maj 2019].
Tillgänglig vid:
<https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/antioxidationsmedel>
18. Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, m.fl. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science Translational Medicine*. 07 oktober 2015;7(308):308re8-308re8.
19. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. juli 2004;52(15):4713–9.
20. Katiyar S, Elmets C, Katiyar S. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. maj 2007;18(5):287–96.
21. Abrahamsson Zetterberg L. Akrylamid och andra värmeinducerade ämnen i livsmedel. 2017.
22. Gibis M, Weiss J. 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*. september 2012;134(2):766–74.
23. Jägerstad M, Skog K, Arvidsson P, Solyakov A. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 30 november 1998;207(6):419–27.
24. Rostkowska K, Zwierz K, Roszczenko A. Formation and Metabolism of N-Nitrosamines. *Polish Journal of Environmental Studies*. 1998;7(6):321–5.
25. Turesky RJ. Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis and carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews*. 2002;2002(34):625–50.
26. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbonds and DNA damage: A Review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005(202):119–23.
27. Jeon JH, Kim SK, Im J, Ahn KB, Baik JE, Park O-J, m.fl. Trp-P-1, a carcinogenic heterocyclic amine, inhibits lipopolysaccharide-induced maturation and activation of human dendritic cells. *Cancer Letters*. februari 2011;301(1):63–74.
28. Lännergren J, Lundeberg T, Ulfendahl M, Westerblad H. *Fysiologi*. 6:e uppl. Studentlitteratur AB; 2017. 397 s.
29. Im J, Choi HS, Kim SK, Woo SS, Ryu YH, Kang S-S, m.fl. A food-born heterocyclic amine, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), suppresses tumor necrosis factor- α expression in lipoteichoic acid-stimulated RAW 264.7 cells. *Cancer Letters*. februari 2009;274(1):109–17.

30. Schweikl H, Taylor JA, Kitareewan S, Linko P, Nagorney D, Goldstein JA. Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver. *Pharmacogenetics*. oktober 1993;3(5):239–49.
31. Delannée V, Langouët S, Théret N, Siegel A. A modeling approach to evaluate the balance between bioactivation and detoxification of MeIQx in human hepatocytes. *PeerJ*. 01 september 2017;5:e3703.
32. Stolzenberg-Solomon RZ, Cross AJ, Silverman DT, Schairer C, Thompson FE, Kipnis V, m.fl. Meat and Meat-Mutagen Intake and Pancreatic Cancer Risk in the NIH-AARP Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 01 december 2007;16(12):2664–75.
33. Takahashi M, Wakabayashi K, Nagao M, Yamaizumi Z, Sato S, Kinae N, m.fl. Identification and quantification of 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo-[4,5-*f*]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) in beef extract. *Carcinogenesis*. 1985;6(10):1537–9.
34. Kataoka H, Hayatsu T, Hietsch G, Steinkellner H, Nishioka S, Narimatsu S, m.fl. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the water of the Danube River. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. mars 2000;466(1):27–35.
35. Steffensen I-L, Paulsen JE, Alexander J. The food mutagen 2-amino-9H-pyrido[2,3-*b*]indole (AαC) but not its methylated form (MeAαC) increases intestinal tumorigenesis in neonatally exposed multiple intestinal neoplasia mice. *Carcinogenesis*. augusti 2002;23(8):1373–8.
36. Pfau W, Skog K. Exposure to β-carbolines norharman and harman. *Journal of Chromatography B*. mars 2004;802(1):115–26.
37. Viegas O, Amaro LF, Ferreira IMPLVO, Pinho O. Inhibitory Effect of Antioxidant-Rich Marinades on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pan-Fried Beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 20 juni 2012;60(24):6235–40.
38. Viegas O, Moreira PS, Ferreira IMPLVO. Influence of beer marinades on the reduction of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled pork meat. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 16 februari 2015;1–9.
39. Jinap S, Iqbal SZ, Selvam RMP. Effect of selected local spices marinades on the reduction of heterocyclic amines in grilled beef (satay). *LWT - Food Science and Technology*. oktober 2015;63(2):919–26.
40. Sepahpour S, Selamat J, Khatib A, Manap MYA, Abdull Razis AF, Hajeb P. Inhibitory effect of mixture herbs/spices on formation of heterocyclic amines and mutagenic activity of grilled beef. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 03 oktober 2018;35(10):1911–27.
41. Yashin A, Yashin Y, Xia X, Nemzer B. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. *Antioxidants*. 15 september 2017;6(3):70.
42. Puangsombat K, Gadgil P, Houser TA, Hunt MC, Smith JS. Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products. *Meat Science*. mars 2012;90(3):739–46.
43. Farligt gott med grillat – alla hälsofallorna! [Internet]. MåBra. 2016 [citerad 20 maj 2019]. Tillgänglig vid: <https://www.mabra.com/farligt-gott-med-grillat-alla-halsofarllorna/>

7 Bilagor

7.1 Bilaga A. Redovisning av artikelsökning

Studier som lästes och inkluderades i material. Valda artiklar är markerade med fet stil. Övriga artiklar valdes bort vid exkludering, se under punkt 3.1 för mer information om exkluderingsskriterier.

Pubmed

- 1. Inhibitory effect of mixture herbs/spices on formation of heterocyclic amines and mutagenic activity of grilled beef (2018)**
- 2. Influence of beer marinades on the reduction of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled pork meat. (2015)**
- Inhibitory effect of liposomal solutions of grape seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines. (2014) – studerade liposomal vilket ej var relevant för denna studie.
- 4. Inhibitory effect of antioxidant-rich marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef. (2012)**
- Inhibitory effect of marinades with hibiscus extract on formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of fried beef patties. (2010)
- Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks. (2008) – studien använde sig ej av öl, vin eller örtekryddor. De studerade marinader av pulverform som blandades med vatten, olja och vinäger vilket ej var relevant för denna studie.
- 7. Effect of beer/red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef. (2008)**

Web of Science

- Effects of Phenolic Acid Marinades on the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Charcoal-Grilled Chicken Wings (2019) – studerade ej fläsk/nötkött.
- 2. Inhibitory effect of mixture herbs/spices on formation of heterocyclic amines and mutagenic activity of grilled beef (2018) – (Vald från PubMed)**
- Inhibitory effect of cellulose fibers on the formation of heterocyclic aromatic amines in grilled beef patties (2017) – studerade ej öl, vin eller örtekryddor.
- Inhibitory profiles of chilli pepper and capsaicin on heterocyclic amine formation in roast beef patties (2017) – exkluderades på grund av att capsaicin ej var relevant för denna studie.
- Effect of Natural Food Condiments on Carcinogenic/Mutagenic Heterocyclic Amines Formation in Thermally Processed Camel Meat (2017) – studerade ej fläsk/nötkött.
- Inhibitory effects of grape seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs cooked by different techniques (2017) – studerade rött kött men även kyckling.
- Inhibitory effects of apple peel polyphenol extract on the formation of heterocyclic amines in pan fried beef patties (2016) – studerade ej öl, vin eller örtekryddor.
- Effect of phenolic compounds from spices consumed in China on heterocyclic amine profiles in roast beef patties by UPLC-MS/MS and multivariate analysis (2016) – Artikeln var en av 6 som lästes men exkluderades då de studerade kryddor som inte används i Sverige och var då orelevant för denna studie.

9. Heterocyclic aromatic amines in deep fried lamb meat: The influence of spices marination and sensory quality (2016) – studerade ej fläsk/nötkött
- 10. Effect of selected local spices marinades on the reduction of heterocyclic amines in grilled beef (satay) (2015)**
- 11. Influence of beer marinades on the reduction of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled pork meat (2015) – (vald från PubMed)**
12. Inhibitory Effect of Liposomal Solutions of Grape Seed Extract on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines (2014) – studien var redan exkluderad från PubMed på grund av att de studerade liposomal-extrakt vilket inte kategoriseras som öl, vin eller örtekryddor och exkluderades därför från studien.
13. Inhibition of mutagenic 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP) formation using various food ingredients in a model systems (2013) – studerade endast bildningen av PhIP och ingen marinering av öl, vin eller örtekryddor användes.
- 14. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties (2012)**
- 15. Inhibitory Effect of Antioxidant-Rich Marinades on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pan-Fried Beef (2012) – (vald från PubMed)**
16. Inhibitory Activity of Asian Spices on Heterocyclic Amines Formation in Cooked Beef Patties (2011) – Artikeln var en av 4 som lästes men exkluderades då de studerade effekten av kryddor som ej var relevanta för denna studie.
17. Inhibitory Effect of Nelumbo nucifera Leaf Extracts on the Formation of Heterocyclic Amines and Mutagenicity during Cooking Beef Steak (2011) – studerade bladextrakt från Lotusblomma vilket ej var relevant för denna studie.
18. Influence of natural food ingredients on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties and chicken breasts (2011) – studerade ej fläsk/nötkött.
19. Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef (2010) – Artikeln var en av 4 som lästes men exkluderades då effekten av grönt te ej var relevant för denna studie trots den antioxidativ effekten.
20. Inhibitory effect of marinades with hibiscus extract on formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of fried beef patties (2010) – studerade hibiscusextrakt vilket ej var relevant för denna studie.
21. The effect of rosemary on the mutagenic activity of heterocyclic amines extracted from common food consumed in Saudi Arabia (2010) – studerade kyckling och lever, vilket ej var relevant för denna studie.
- 22. Effect of Beer/Red Wine Marinades on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pan-Fried Beef (2008)**
23. Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks (2008) – Studien var redan exkluderad från PubMed eftersom de ej använde sig av öl, vin eller örtekryddor. De studerade marinader av pulverform som blandades med vatten, olja och vinäger vilket ej var relevant för denna studie.