

IZABELA STEINKA, PIOTR PRZYBYŁOWSKI

WPŁYW CZYNNIKÓW BIOGENNYCH NA TWORZENIE N-NITROZOAMIN

EFFECT OF BIOGENIC FACTORS ON N-NITROSAMINES FORMATION

Z Zakładu Żywności i Żywienia na Statkach Wyższej Szkoły Morskiej w Gdyni
Kierownik: doc. dr hab. P. Przybyłowski

Dokonano charakterystyki uwarunkowań mikrobiologicznych tworzenia prekursorów reakcji nitrozowania oraz udziału enzymów i elementów morfotycznych mikroorganizmów w syntezie N-nitrozoamin

Przeświadczenie o istnieniu związku między sposobem żywienia a powstawaniem nowotworów przewodu pokarmowego implikuje w ostatnich czasach nasilenie badań w kierunku wyjaśnienia mechanizmów tej zależności.

Niemalą rolę w indukcji karcinogenezy przypisuje się procesom wywołanym obecnością i metabolizmem drobnoustrojów. Masa mikroflory jelit u dorosłego człowieka wynosi ok. 1 kg i w jej aktywności oraz sposobie żywienia można by szukać przyczyn powstawania nowotworów przewodu pokarmowego. Dieta bogata w tłuszcze sprzyja rozwojowi takiej flory bakteryjnej, której metabolizm stymuluje wzmożone wydzielanie rakotwórczych kwasów: taurodeoksycholowego i lithocholowego [23]. Z kolei dieta obfitująca w pektyny sprzyja rozwojowi populacji bakterii produkujących w nadmiarze amoniak i azotyny – prekursory karcinogennych N-nitrozoamin [23]. Ustalenie odpowiedniej diety nie jest jednak gwarancją bezpieczeństwa konsumentów, ponieważ związki rakotwórcze mogą być wprowadzone do organizmu już z pożywieniem. Dużym zagrożeniem jest obecnie żywność skażona N-nitrozoaminami.

Z opublikowanych dotychczas prac wynika, że N-nitrozoaminy mogą tworzyć się w wielu produktach spożywczych na poziomie od kilku do kilkunastu μg w kg. Obecność tych związków stwierdzono w wędzonych i konserwowanych rybach, niektórych rodzajach serów, przetworach z mięsa peklowanego, smażonym bekonie, piwie, mące i grzybach [8, 10, 11, 13, 19, 28].

Zaleski uważa, że zanieczyszczeniu tymi związkami może ulegać tylko ten rodzaj żywności, do której dodaje się jony azotanowe i azotynowe w celu konserwacji, a następnie poddaje się ją obróbce termicznej [28]. Wykazano, że istnieje możliwość przechodzenia N-nitrozozwiązków z przewodu pokarmowego do krwi, mleka i jaj [9]. Według Karłowskiego źródłem zanieczyszczenia przetworów mleczarskich N-nitrozoaminami jest obecność azotanów w mleku [11]. Ich obecność może być przyczyną powstawania związków N-nitrozowych w żołądku człowieka [10]. W środowisku zawierającym jony azotanowe istotną rolę w tworzeniu N-nitrozoamin odgrywa metabolizm drobnoustrojów. Z badań *Hawkswortha* [5] wynika, że niektóre szczepy

enterokoków i bakterie z rodzaju *Clostridium* charakteryzowały się zdolnością do syntetyzowania N-nitrozodwumetyloaminy (NDMA). Niewielkie ilości N-nitrozodwumetyloaminy stwierdzono również w środowisku, w którym były obecne bakterie z rodzaju *Pseudomonas* [2]. Zdolność syntetyzowania N-nitrozodwumetyloaminy, N-nitrozodwumetyloaminy i N-nitrozodwupropyloaminy wykazały również szczepy *Lactobacillus casei* [18].

Ayanaba [2] informuje, że szczepy *Escherichia coli* i *Streptococcus epidermis* syntetyzowały N-nitrodwumetyloaminę w środowisku pH 7,5. Dwuheksylnitrozoaminę wyizolowano ze środowiska jako metabolit takich szczepów, jak: *E. coli*, *Bacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces lipolitica* [18]. Szlit i wsp. [25] podają, że niektóre szczepy *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani* i *Proteus rettgeri* są zdolne do tworzenia N-nitrozodwumetyloaminy. Z dość dużą wydajnością NDMA mogą syntetyzować gronkowce [24].

Ayanaba [2] uważa, że rola mikroorganizmów w tworzeniu N-nitrozoamin sprowadza się do: redukcji azotanów do azotynów, degradacji białka do II rzędowych amin, wytworzenia enzymu katalizującego reakcję nitrozowania oraz stwarzania odpowiedniego środowiska reakcji, tzn. zakwaszania. Kwasowość środowiska ma wpływ nie tylko na samą reakcję nitrozowania ale również na wcześniejsze wytwarzanie azotynu. W związku z tym aktywność bakterii reduktazy w procesie redukcji azotanów do azotynów uzależniona jest w dużym stopniu od składu podłoża, szczególnie wtedy gdy rozwijają się na nim bakterie fermentacji mlekowej.

Np. Rogosa podaje, że redukcja azotanów przy udziale szczepów *Lactobacillus* była tylko możliwa w podłożu z ograniczoną ilością węglowodanów [22]. W środowisku o wysokiej zawartości węglowodanów proces ich fermentacji dość szybko i znacznie zakwasza podłoże, co w konsekwencji ogranicza lub uniemożliwia metabolizowanie azotanów przez reduktazę azotanową. Autor ten wskazuje również, że ciśnienie tlenu w środowisku jest także ważnym czynnikiem, decydującym o zdolności bakterii do redukcji azotanów.

Z kolei Podhorski wykazał inhibicyjne działanie azotanów w stosunku do bakterii fermentacji mlekowej [17]. Związane to jest prawdopodobnie z blokowaniem funkcji enzymatycznych dehydrogenazy mleczanowej, która katalizuje przemianę kwasu pirogronowego do kwasu mlekowego. Środowisko bogate w pektyny sprzyja rozwojowi mikroflory, która odznacza się 8–10 krotnie wyższą aktywnością reduktazy azotanowej w porównaniu z wydajnością tej reakcji w środowisku ubogim w związki pektynowe [23]. Wpływ na reakcję tworzenia prekursorów N-nitrozozwiązków może mieć ilościowy stosunek grup drobnoustrojów takich, jak: *coli* i tlenowe laseczki przetrwalnikujące. Wydajność redukcji NO_3^- do NO_2^- jest wyższa zawsze w przypadku przewagi liczebnej pałeczek z grupy *coli* nad bakteriami z rodzaju *Bacillus*.

Z badań Usajewicz [26] wynika, że enterokoki posiadają zdolność stymulowania syntezy amin przez bakterie z grupy *coli*. Pirolidyna i piperydyna przekształcane z argininy i lizyny przez bakterie kałowe mogą być następnie nitrozowane przez szczepy *E. coli* nawet w warunkach braku glukozy w podłożu [6]. W degradacji choliny do dwumetyloaminy aktywność wykazują bakterie z rodzaju *Clostridium* [6]. Również bakterie kałowe syntetyzują ok. 20% dwumetyloaminy z choliny i lecytyny.

Z pożywieniem do przewodu pokarmowego dostają się nieznaczne ilości II-rzędowych amin. Ilość ich w jelicie cienkim jest niewielka, dopiero w jelicie grubym zachodzi

proces wytwarzania piperydyny, pirolidyny i syntezy NDMA [6]. Duże stężenie aminy II-rzędowej nie jest jednak konieczne, ponieważ wzrost wydajności reakcji nitrozowania w środowisku rozwoju *E. coli* może spowodować jedynie zwiększenie stężenia azotanu, a nadmiar aminy ma nawet działanie inhibicyjne [6].

N-nitrozozwiązki powstają w reakcji elektrofilowego podstawienia azotu organicznego związkami nitrozującymi. W reakcję wchodzi jednak azot nieprotonowany aminy. Można przypuszczać, że związanie bakteryjnego białka enzymatycznego z aminą ochrania i stabilizuje jej nieprotonowaną postać. Archer i wsp. [1] sądzą, że hydrofobowa interakcja aminy ze składnikiem komórkowym, zlokalizowanym głównie w ścianie komórkowej, przyspiesza istotnie reakcję nitrozowania nawet w środowisku o pH 3,5.

Prawdopodobnie ten rodzaj interakcji zabezpiecza aminę przed elektrostatyczną destabilizacją do formy protonowej w tak kwaśnym środowisku. Sądzi się również, że kationowe części powierzchni komórek bakterii przyciągają jony azotynu i w ten sposób wytwarzają odpowiednio wysokie stężenie czynnika nitrozującego w obecności amin.

Dowodem na taką rolę drobnoustrojów w reakcji nitrozowania może być 12–49-krotny wzrost szybkości tworzenia dwuheksylonitrozoaminy przy pH 3,5 przez *Saccharomyces lipolitica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Bacillus brevis* i 6-krotny wzrost reakcji nitrozowania w środowisku, w którym są obecne bakterie z rodzaju *Staphylococcus* [18, 24].

Ayanaba [2] sugeruje, że za katalizę reakcji nitrozowania są odpowiedzialne nieenzymatyczne substancje wewnątrzkomórkowe. Mills [16] uważa również, że za procesy syntezy N-nitrozoamin w środowisku rozwoju *Pseudomonas stutzeri* mogły być odpowiedzialne komponenty nieenzymatyczne. Badania tego autora wykazały, że czynnik ten jest termostabilny, bowiem działanie temperatury nie obniżyło wydajności reakcji nitrozowania. Niektórzy badacze uzyskali jednak wyniki, które pozwalają biokatalityczne funkcje drobnoustrojów w reakcji nitrozowania łączyć z działaniem ich enzymów.

Biokatalityczne działanie pleśni w reakcji syntezy N-nitrozoamin, bez próby wyjaśnienia mechanizmów, eksponuje Klein [14], przypisując je takim gatunkom jak: *Penicillium roquefortii*, *Penicillium camemberti* i *Pennicillium caseoliuticum*. Nowsze teorie zakładają, że reakcję nitrozowania katalizują metabolity bakterii, co w pewnym sensie potwierdza wcześniejsze tezy *Hawkswortha* [19, 21]. *Ho Seung Yang* i wsp. [7] sugerują, że wpływ na ilość syntetyzowanej N-nitrozoaminy ma "szczególna frakcja" błony komórkowej drobnoustrojów. Z badań *Przybyłowskiego* [18] wynika, że w przypadku szczepu *Lactobacillus casei* reakcję nitrozowania katalizuje ekstrakt enzymów wewnątrzkomórkowych oraz enzymy zlokalizowane w ścianie komórkowej.

Żywność, a szczególnie mleko i jego przetwory są dogodnym środowiskiem, tak dla rozwoju drobnoustrojów, jak i przemian wynikających z metabolizmu poszczególnych grup drobnoustrojów. Dane na temat obecności N-nitrozoamin wskazują na fakt, że N-nitrozoaminy mogą być obecne w mleku w proszku [10, 13, 27], a sery są szczególnie dobrym podłożem, w którym istnieją wszystkie warunki podane przez *Ayanaba*, konieczne dla procesu syntezy tych związków [15, 21]. Część N-nitrozoamin może być absorbowana przez takie białka, jak albumina i kazeina a w przewodzie pokarmowym może ulegać działaniu pankreatyny i lipazy [3] lub degradacji w wyniku

hydrolitycznej działalności enzymów, bakterii z grupy *coli* [5] i pleśni z rodzaju *Rhizopus* [4].

Nie zmniejsza to jednak niebezpieczeństwa wynikającego z ich obecności lub syntezy w przewodzie pokarmowym. Istnieje prawdopodobieństwo, że w procesie syntezy N-nitrozoamin dużą rolę odgrywa wzajemny układ ilościowy populacji bakterii *coli* i mikroflory psychotroficznej [20]. Z badań *Przybyłowskiego* i wsp. [21] wynika, że za powstawanie N-nitrozoamin w serach odpowiedzialne są enzymy lub metabolity bakterii z grupy *coli*. Nie jest jednak znana odpowiedź na pytanie, czy czynniki biogenne są jedynymi, które wywierają działanie katalityczne, czy też istnieją inne współzależności środowiskowe, które pozwalają bakteriom odgrywać stymulującą rolę w procesie nitrozowania. Wydaje się, że odpowiedzi na to pytanie warto byłoby poświęcić dalsze badania.

I. Steinka, P. Przybyłowski

THE EFFECT OF BIOGENIC FACTORS ON FORMATION OF N-NITROSAMINES

Summary

On the grounds of a literature survey, the microbiological prerequisites for the formation of precursors of the nitrosation reaction, as well as the participation of microbial enzymes and morphotic elements in the synthesis of N-nitrosamines were characterized.

PIŚMIENNICTWO

1. *Archer M.C., Yang H.S., Okun J.D.*: Acceleration of nitrosamine formation at pH 3,5 by microorganisms. Lyon IARC, 1978, 19, 239. – 2. *Ayanaba A., Alexander M.*: Microbial formation of nitrosamines *in vitro*. Appl. Microbiol., 1973, 25, 862. – 3. *Cantoni C., Redealli A., Brenna O.*: Adsorbimento di nitrosamine da protaine. Estratto dalla rivista industrie Alimentari 1982. – 4. *Harada K.*: Microbial degradation of nitrosamines., Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries. 1980, 46, 723. – 5. *Hawksworth G.M., Hill M.J.*: Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines., Brit. J. Cancer., 1971, 25, 520. – 6. *Hill M.J., Hawksworth G.M.*: Bacterial production of nitrosamines *in vitro* and *in vivo*., IARC Scientific Publication. 1971, 3, 3. – 7. *Ho Seung Yang J.D., Okun M.C., Archer M.C.*: Nonenzymatic microbial acceleration of nitrosamine formation., J. Agric. Food Chem., 1977, 25, 1181. – 8. *Janicek G., Pokorny J., Dawidek J.*: Chemia żywności, 1977, WNT. – 9. *Juszkiewicz T., Kowalski B.*: Przechodzenie karcynogennych N-nitrozoamin z przewodu pokarmowego do mleka., Bromat. Chem. Toksykol., 1974, 7, 423. – 10. *Karłowski K., Bojewski J.*: Zawartość N-nitrozamin w wybranych środkach spożywczych. Roczn. PZH, 1982, 33, 403.

11. *Karłowski K., Bojewski J.*: Występowanie azotanów i azotynów w żywności., Roczn. PZH, 1984, 35, 411. – 12. *Karłowski K., Bojewski J.*: N-nitrozoaminy w piwie., Roczn. PZH, 1983, 34, 197. – 13. *Karłowski K.*: Występowanie związków N-nitrozowych w żywności i tworzenie się ich w warunkach *in vivo*., Roczn. PZH, 1985, 36, 289. – 14. *Klein D.P., Lafont A., Keshawarz.*: Influence des microorganismes sur la formation des nitrosamines., Ann. Nut. Aliment., 1978, 32, 425. – 15. *Lipparini L., Rompa A.*: Note sulla resenza di residui di nitrati e nitriti e di N-nitrosoamine nei prodotti lattiero-caseari del commercio., Estratto. del Rev. Chimica, 1983, 2, 73. – 16. *Mills B., Aleksander M.*: N-nitrosamine formation by cultures of several microorganisms., Appl. Microbiol., 1976, 31, s. 892. – 17. *Podhorski M.*: Fermentacyjne zdolności mleka w odniesieniu do podwyższonej zawartości azotanów i azotynów w paszach dla krów., Zbiór Prac Badawczych Instytutu Mleczarskiego w Pradze, 1984, 30, 47. – 18. *Przybyłowski P.*: Studia nad rolą wybranych szczepów bakterii fermentacji mle-

kowej w przemianach azotanów i syntezie N-nitrozoamin., *Zeszyty Naukowe ART*, 1984, 19, 3, – 19. *Przybyłowski P.*: Aktualne poglądy na możliwość tworzenia się N-nitrozoamin w żywności., *Przem. Spoż.*, 1985, 39, 155. – 20. *Przybyłowski P., Sajko W., Kisza J., Janicka B.*: Badania występowania azotanów i produktów ich przemian w mleku i wyrobach mleczarskich. *Roczn. PZH*, 1987, 38, 209.

21. *Przybyłowski P., Kisza J., Karłowski K., Sajko W., Urbańska J., Janicka B.*: Badania występowania azotanów i produktów ich przemian w mleku i wyrobach mleczarskich. *Roczn. PZH*, 1987, 38, 214. – 22. *Rogosa M.*: Experimental conditions for nitrate reduction by certain strains of the genus *Lactobacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, 1961, 24, 401. – 23. *Rotenberg S.*: Pektyny, *Żyw. Człow. Met.*, 1986, 13, 133. – 24. *Szumilak K.*: Mechanizm tworzenia się N-nitrozoamin., *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1983, 16, 75. – 25. *Szylił O.R., Ducluzeau M., Champ Dż., Klein D.P.*: La formation des nitrosoamines dans le tube digestif., *Ann. Nutr. Alim.*, 1976,, 30, 805. – 26. *Usajewicz J.*: Enterokoki w artykułach mleczarskich., *Przem. Spoż.*, 1986, 10-11-12, 207. – 27. *Weston R.J.*: Trace amounts of nitrosamines in powdered milk and milk proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 1983, 34, 893. – 28. *Zaleski S.J.*: Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego, 1985, WNT.

Dn. 1989. 09. 23

81-962 Gdynia, ul. Czerwonych Kosynierów 83