



Rapport

Sund tilberedning

29. april 2014
Proj.nr. 2002283-14
Version 2
KIJ/MT

Delopgave 1a. Potentielle naturlige antioxidanter

Screening af antioxidant aktivitet

Kirsten Jensen

Sammendrag Når kød tilberedes ved stegning og grilning, kan der dannes kræftfremkaldende stoffer (stege- og røgmutagener). Indledende undersøgelser på DMRI har vist, at det er muligt at hæmme dannelsen af disse uønskede stoffer via tilsætning af naturlige antioxidanter til kødet – i form af hvidløgsmarinade og æblepure – inden varmebehandling.

Formålet med nærværende projekt har været at udvikle en marineringssteknologi, der effektivt hæmmer dannelsen af kræftfremkaldende stoffer under stegning og grilning af kød. Første delopgave omfatter udvælgelse af potentielle naturlige antioxidanter med henblik på anvendelse i sunde og velmagende marinader. Der tages udgangspunkt i krydderurter, krydderier og bær, der screenes for anti-oxidativ aktivitet ved måling af iltforbrug i en oxidationsproces, og deres evne til at ødelægge frie radikalens kemiske aktivitet (DPPH-assay). Disse måleresultater er sammenholdt med tabelværdier fra yderligere en metode til bestemmelse af anti-oxidant aktivitet (ORAC).

Konklusion Blandt 20 forskellige krydderier, urter og bær, der er vurderet på baggrund af analyseresultater fra 3 forskellige metoder til screening for antioxidant aktivitet, fremstår sumak, tørret oregano og acerola som de stærkeste antioxidanter. Produkterne vurderes som særdeles velegnede med henblik på anvendelse i sunde og velmagende marinader.

Baggrund

Kød er en fødevarer med høj næringsværdi og udgør derfor en vigtig del af danskerne ernæring. Når kød tilberedes, kan der imidlertid dannes kræftfremkaldende stoffer (stege- og røgmutagener), hvilket er medvirkende til, at indtaget af kød er kædet sammen med øget risiko for udvikling af tarmkræft. Det er særdeles uheldigt, at en ellers sund fødevarer "ødelægges" under tilberedning, ikke mindst når danskerne sætter stor pris på den stegte kødsmag og netop også er blevet kåret til verdens mest grillende folkefærd. Indledende undersøgelser på DMRI har vist, at det er muligt at hæmme dannelsen af de kræftfremkaldende stoffer via tilsætning af naturlige antioxidanter i form af hvidløgsmarinade og æblepure til kødet inden varmebehandling.

Formålet med projektet har derfor været at udvikle en marineringssteknologi, der effektivt kan hæmme dannelsen af kræftfremkaldende stoffer under stegning og grilning af kød. Første delopgave omfattede udvælgelse af naturlige antioxidanter, med henblik på anvendelse i sunde og velsmagende marinader. Valget var baseret på screening af en række potentielle krydderurter, krydderier og bær for anti-oxidativ aktivitet.

Materialer og metoder

Råvarer

Der er udvalgt 20 forskellige krydderier, urter og bær ud fra en eller flere af følgende kriterier:

- Potentiale for at kunne hæmme stegemutagener
- Velkendt, tilgængelig og anvendt i de danske køkkener
- Sensorisk kvalitet

Potentialet for at kunne hæmme stegemutagener (HCA) er dels vurderet på baggrund af resultater fra tidligere undersøgelser [1], dels ud fra tabelopslag af råvarernes ORAC-værdier (Oxygen radical absorbance capacity). ORAC-værdier anvendes ofte til rangering af antioxidant aktivitet, specielt i frugt og grønt. Værdierne skal betragtes som retningsgivende, da der kan være forskelle, afhængig af kilden. De udvalgte produkter fremgår af bilag 1.

Fremstilling af ekstrakter

Såfremt produkterne ikke var tilstrækkeligt findelte, blev de blendet (Grindomix GM 200). 50 g produkt blev opslæmmet i 250 ml ionbyttet vand. Det var nødvendigt at tilsætte yderligere 250 ml vand til tørret oregano, da den oprindelige mængde ikke var tilstrækkelig til at opslæmme det store volumen. Blandingen henstod 1 time ved stuetemperatur, hvorefter den blev filtreret og overført til prøverør. Ekstrakterne blev opbevaret ved -20 °C.

Analysemetoder

Fastlæggelse af anti-oxidativ aktivitet er en kompleks opgave, hvorfor der sædvanligvis anvendes flere metoder med forskellige analyseprincipper. For at understøtte ORAC-værdier fra tabelopslag er der derfor gennemført måling af anti-oxidativ aktivitet med to andre metoder, baseret på måling af iltforbrug ved lipidoxidation og evnen til at reducere frie radikaler.

Måling af iltforbrug ved lipidoxidation

Antioxidativ aktivitet for en given prøve følges ved at registrere iltforbrug over passende intervaller ved oxidation af methyl linoleat. Der anvendes en oxygen mikro sensor (Clark elektrode, micro-respiration system, Unisense). Resultatet angives som et indeks baseret på forholdet mellem hastigheden i iltforbrug, henholdsvis med og uden teststof i reaktionsblandingen, jf. bilag 1. Indekset udtrykker teststoffets kapacitet til at hæmme oxidationen.

DPPH radikal scavenging kapacitet (reduktion af frie radikaler)

Frie radikaler er yderst aktive kemiske forbindelser, der kan reagere med såvel proteiner som lipider. Når antioxidant reagerer med oxidanten (det frie radikal), ødelægges radikalernes kemiske aktivitet. Det stabile frie radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl), DPPH• har en dyb violet farve. Når en opløsning af DPPH• blandes med en antioxidant (teststoffet), dannes den ufarvede, reducerede form, og den violette farve tabes. Farvetabet, der måles spektrofotometrisk, er udtryk for teststoffets antioxidative kapacitet.

Tørstofanalyse

Tørstofindhold i produkterne blev bestemt ved tørring (103 ± 2 °C), indtil konstant vægt var opnået, hvilket svarer til prøvens tørstofindhold.

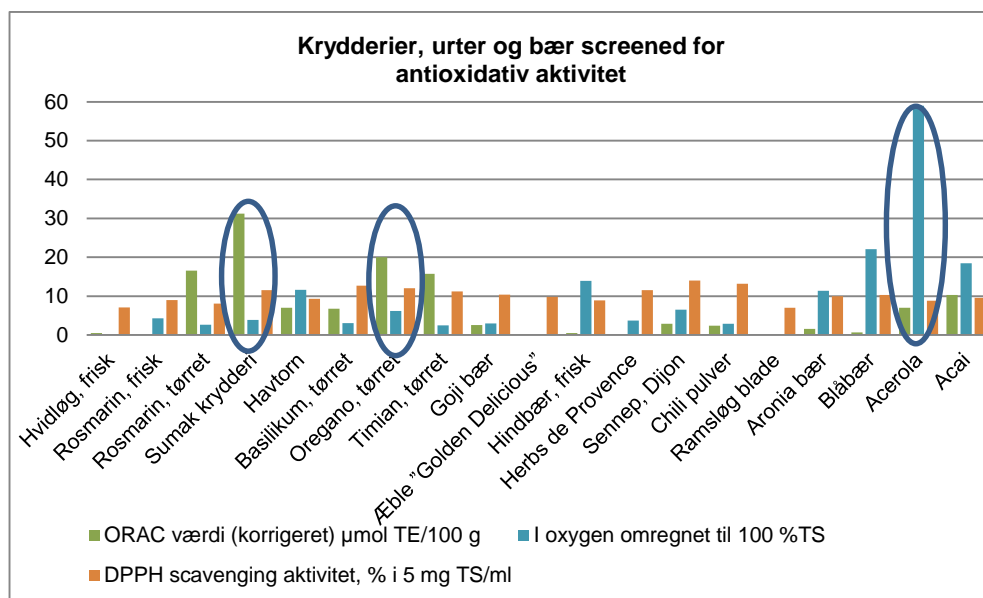
Resultater

Tørstof

Resultaterne fra tørstofanalyserne fremgår af tabellen i bilag 1.

Måling af iltforbrug

De filtrerede ekstrakter blev anvendt direkte til test af antioxidant aktivitet, ved målinger af iltforbrug. Resultaterne, omregnet til 100 % tørstof i teststoffet, fremgår af figur 1, hvor de er sammenlignet med korrigerede tabelværdier for ORAC (reduceret med faktor 10.000) og analyseresultaterne fra det anvendte DPPH assay. Analyseresultaterne er desuden samlet i bilag 1. Det fremgår af resultaterne, at de "friske" bær generelt er de bedste til at hæmme oxidationen, hvor især acerola skiller sig ud. I stevia pulver blev der fundet en meget lav aktivitet, og det blev derfor fravalgt til videre analyse.



Figur 1. Analyseresultater fra oxidationsmåling med iltforbrugende elektrode (blå) og DPPH-assay (orange), sammenholdt med korrigerede ORAC-værdier fra tabel (grøn).

For at få en mere direkte sammenligning af resultaterne, i forhold til ORAC-værdierne, der angiver trolox ekvivalenter ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$), er koncentrationerne i de 3 udvalgte produkter bestemt ud fra en standardkurve, baseret på henholdsvis 6, 4 og 2 mM trolox.

Resultaterne er vist i nedestående tabel, hvoraf det fremgår, at der ikke er nogen direkte sammenhæng mellem niveauerne af ORAC-værdier og oxygenindekset, I. Dette bekræfter nødvendigheden af at anvende forskellige screeningsmetoder.

Tabel 1. ORAC-værdi og oxygenforbrug af udvalgte krydderier.

	ORAC værdi $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$	I oxygen	I oxygen omregnet til TE, mM	I oxygen omregnet til TE, $\mu\text{mol}/100\text{g}$
Sumak-krydderi	312400	3,0	5,5 $\pm 0,5$	2750 ± 250
Oregano, tørret	200129	5,6	11,5 $\pm 1,15$	5600 ± 575
Acerola	70000	3,6	7,7 $\pm 1,0$	3850 ± 500

DPPH

Produkternes procentvise radical-scavenging-kapacitet er testet i 5 mg tørstof pr. ml mod 0,05 mM DPPH-. Resultaterne er anført som et gennemsnit af en tripelbestemmelse i figur 1 og bilag 1. Som det fremgår af resultaterne, findes de højeste aktiviteter i sumak, basilikum, oregano, sennep og chili, men forskellene er ikke markante.

Samlet vurdering

Ved en samlet vurdering af analyseresultater og ORAC-værdier fremstår sumak, tørret oregano og acerola som de stærkeste antioxidanter blandt de afprøvede produkter. I forhold til udvælgelseskriterierne kan det diskuteres, hvorvidt sumak og acerola er velkendte, tilgængelige produkter, der anvendes i de danske køkkener – her er der nok mere tale om en positiv nyhedsværdi. Sumak, der er et rødt krydderi med en salt, citrusagtig smag, anvendes i alle de mellemøstlige

lande til kebab, grillstegt kød, marinader og kød-, kylling og grøntsagsretter. Krydderiet forhandles i Danmark hos grønthandlere, internet m.m. Den farvestrålende røde acerola-frugt (Barbados-kirsebær) kommer fra Centralamerika og Brasilien. Den har en god, sødlig, men frisk smag, og den indeholder ca. halvtreds gange mere C-vitamin end appelsiner. Acerola anvendes i den danske industri og forhandles bl.a. som pure og juice i dagligvareforretninger. På den baggrund vurderes de udvalgte produkter som særdeles velegnede, med henblik på anvendelse i sunde og velmagende marinader.

Screeningsforsøgene har indtil nu været udført i vandig opløsning. For at teste om den antioxidative kapacitet i de udvalgte råvarer ændres, når de kombineres med indholdsstoffer, der indgår i kommercielt tilgængelige marinader, vil der blive arbejdet videre med modelsystemer for marinader, hvor effekten af pH, fedtindhold samt varmepåvirkning testes.




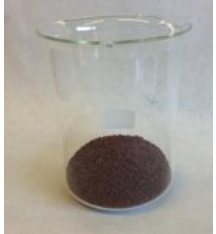


Konklusion










Blandt 20 forskellige krydderier, urter og bær, der er vurderet på baggrund af analyseresultater fra 3 forskellige metoder til screening for antioxidant aktivitet, fremstår sumak, tørret oregano og acerola som de stærkeste antioxidanter. Produkterne vurderes som særdeles velegnede, med henblik på anvendelse i sunde og velmagende marinader.









Referencer









[1] Rapport "Betydning af antioxidanter og brug af mikrobølgeovn på spisekvalitet og dannelse af stegemutagener", MDAG, Projekt 1378961-03/2000220 DMRI





Bilag 1. Oversigt over krydderier, urter og bær der er screenet for antioxidativ aktivitet

Produkt			Koncentration i ekstrakt	ORAC værdi ¹⁾ $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$	I oxygen ²⁾ Omregnet til 100 % TS i teststoffet	DPPH scavenging kapacitet, % i 5 mg TS/ml	Tørstof % (w/w)
Hvidløg, frisk			1:5	5.346	5,2	7,1	32,7
Rosmarin, frisk			1:5	Ikke oplyst	4,3	9,0	37,6
Rosmarin, tørret			1:5	165.280	2,6	8,1	90,8
Sumak			1:5	312.400 (sumac bran)	3,9	11,5	77,6
Havtorn			1:5	70.000	11,6	9,3	13,8

Produkt			Koncentration i ekstrakt	ORAC værdi ¹⁾ $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$	I oxygen ²⁾ Omregnet til 100 % TS i teststoffet	DPPH scavenging aktivitet, % i 5 mg TS/ml	Tørstof % (w/w)
Basilikum, tørret			1:5	67.553	3,1	12,7	94,1
Oregano, tørret			1:10	200.129	6,2	12,0	90,2
Timian, tørret			1:5	157.380	2,4	11,2	94,0
Goji bær			1:5	25.300	3,0	10,4	81,3
Æble "Golden Delicious"			1:5	2.670	0	9,8	14,0

Produkt			Koncentration i ekstrakt	ORAC værdi ¹⁾ $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$	I oxygen ²⁾ Omregnet til 100 % TS i teststoffet	DPPH scavenging aktivitet, % i 5 mg TS/ml	Tørstof % (w/w)
Hindbær, frisk			1:5	4.882	13,9	8,9	12,2
Herbes de Provence			1:5	Ikke oplyst	3,7	11,5	91,8
Sennep, Dijon			1:5	29.257 (sennepsfrø)	6,5	14,0	23,1
Chilipulver			1:5	23.636	2,9	13,2	84,2

Produkt			Koncentration i ekstrakt	ORAC værdi ^{1*)} $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$	I oxygen ^{2*)} Omregnet til 100 % TS i teststoffet	DPPH scavenging aktivitet, % i 5 mg TS/ml	Tørstof % (w/w)
Ramsløg, blade			1:5	Ikke oplyst	0	7,0	7,7
Stevia, pulver			1:5	Ikke oplyst	0,9	Ikke analyseret	Ikke analyseret anslået til 100 %
Aronia, bær			1:5	16.062	11,4	10,0	21,1
Blåbær			1:5	6.552	22,1	10,3	9,5

Produkt			Koncentration i ekstrakt	ORAC værdi ¹⁾ µmol TE/100 g	I _{oxygen} ²⁾ Omregnet til 100 % TS i teststoffet	DPPH scavenging aktivitet, % i 5 mg TS/ml	Tørstof % (w/w)
Acerola, puré			1:5	70.000	59,0	8,8	6,1
Acai, puré			1:5	102.700 Pulver af frugt- kød og -skind	18,4	9,6	10,3

¹⁾ ORAC-værdier (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

<http://modernsurvivalblog.com/health/high-orac-value-antioxidant-food-top-100>
<http://www.oracvalues.com>
<http://www.drjeffsoftware.com/FP/ORAC.txt>

²⁾ I_{oxygen} (index) : Hædningen beregnet på 80-40 % af kurveforløbet

$$I_{\text{oxygen}} = \frac{VO_2 \text{ med antioxidant}}{VO_2 \text{ uden antioxidant}}$$

$$V_{O_2} = \frac{dydx}{tid} = \frac{\text{iltforbrug}}{\text{tid}}$$