

# Nye anvendelser af ESR-spektroskopi i fødevarerforskning

Detektion af radikaler i fødevarer giver vigtig information om holdbarhed og egenskaber.

Af Mogens L. Andersen,  
Institut for Fødevidenskab, Københavns Universitet

Radikaler er centrale intermediater i oxidative reaktioner i fødevarer, der ødelægger vigtige bestanddele og har indflydelse på kvalitet og holdbarhed. Elektron spin resonans spektroskopi (ESR) kan give vigtig information om radikaler, der blandt andet kan medføre nedbrydning af lipider, proteiner og vitaminer.

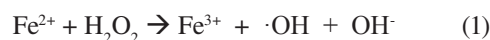
		+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (100 μM)
	$\eta_{app}$ (mPa·s)	$\eta_{app}$ (mPa·s)
2 timer	244	3,7
24 timer	113	1,7
1 uge	14	1,3

Tabel 1. Viskositet ( $\eta_{app}$ ) af beta-glucan opløsning (1 vægt%) opbevaret ved 85°C. Data fra [3].

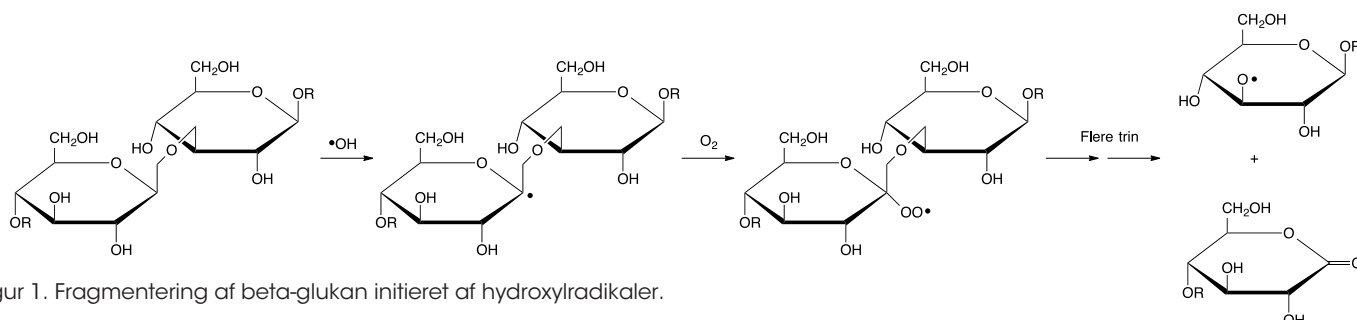
ESR har hidtil hovedsageligt været anvendt til studier af kvalitetsforringelser i fødevarer, som skyldes oxidation af lipider og proteiner. Ved Institut for Fødevidenskab har vi været involveret i projekter, som har vist, at ESR ligeledes kan anvendes til at undersøge radikaldannelse og dets konsekvenser for nedbrydning af kulhydrater og i bakteriekulturer. Stabile radikaler kan desuden bruges som prober, der giver interessante informationer om mobilitet af vigtige komponenter på et mikroskopisk plan i komplekse fødevarer-systemer, hvilket kan anvendes som model for aromaforbindelsers mobilitet og fordeling under frysning af emulsioner.

## Nedbrydning af beta-glucan

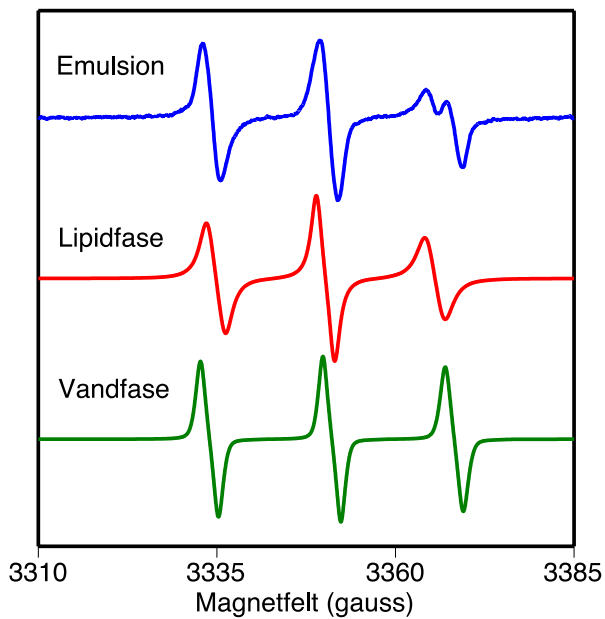
Almindeligvis bliver kulhydrater betragtet som meget stabile og inerte overfor oxidation i fødevarer. Der har været en del fokus på beta-glucaner som ernæringsinteressante opløselige fibre, og i denne sammenhæng har man observeret, at opløsninger af glucan ved henstand taber deres viskositet, hvilket indikerer nedbrydning af glucankæderne. Nedbrydningen blev accelereret især ved tilstedeværelsen af askorbinsyre og jern, hvilket indikerer dannelse af reaktive hydroxylradikaler,  $\cdot\text{OH}$ , ud fra Fenton-reaktionen (reaktion 1) [1]. Askorbinsyre sørger for, at de katalytiske mængder af jern er til stede som Fe(II), der dels er det aktive oxidationstrin af jern i Fenton-reaktionen, og som dels sikrer omdannelsen af opløst oxygen til hydrogenperoxid. Ved hjælp af spinfangningsteknikken, se faktaboks, side 18, kan tilstedeværelsen af hydroxylradikaler påvises under nedbrydningen af glucankæderne [1,2]. Hydroxylradikaler abstraherer hovedsageligt H-atomer fra C1-positionerne i glucankæderne, og de dannede alkylradikaler vil efterfølgende i nærvær af oxygen danne peroxyradikaler, som fører til spaltning af glucankæden, figur 1 [3].



Ved 85°C blev beta-glucan hurtigt nedbrudt i nærvær af hydrogenperoxid, der fremmer dannelsen af hydroxylradikaler via Fenton-reaktionen, hvorimod termisk hydrolyse kun medførte langsom nedbrydning, tabel 1 [3]. Den termiske nedbrydning var karakteriseret ved, at den monomere kemiske struktur af beta-glucan var uændret, mens den radikaldrevne nedbrydning førte til dannelse af en række nye oxiderede funktionelle grupper (carboxylsyrer, lactoner, ketoner og aldehyder).



Figur 1. Fragmentering af beta-glucan initieret af hydroxylradikaler.



Figur 2. Eksperimentelt ESR-spektrum af TEMPO i emulsion. Ved hjælp af de viste simulerede ESR-spektre kan fordelingen af TEMPO i lipid- og vandfaserne bestemmes.

Spinfangningsteknikken viste desuden, at natriumazid, som under studiet blev tilsat til glucanopløsninger for at forhindre mikrobiel vækst, effektivt reagerede med hydroxylradikaler. Natriumazid har dermed udover en antimikrobiel effekt også gode antioxidative egenskaber [2]. Azidsalte bør derfor ikke bruges som antimikrobielle midler i (længerevarende) forsøg, hvor oxidationsmæssige forhold spiller en rolle, da de må forventes at påvirke tilstedeværelsen af radikaler.

### Bakterier og radikaler

Spinfangningsteknikken har fornyligt også været anvendt til at påvise ekstracellulær produktion af radikaler i kulturer af den probiotiske mælkesyrebakterie *Lactobacillus acidophilus* NCFM [4]. Tilstedeværelsen af *L. acidophilus* NCFM forøger mængden af hydroxylradikaler i vækstmediet. Dannelsen af hydroxylradikaler blev forøget ved tilstedeværelse af rutin og quercetin, som ellers normalt betegnes som antioxidanter [5]. På lignende måde er spinfangningsteknikken og ESR-detektion anvendt til at påvise, at de pathogene bakterier *Staphylococcus aureus* hæmmer dannelse af hydroxylradikaler i vækstmedier, og at denne effekt formindskes ved behandling med antibiotika vancomycin og ciprofloxacin, som hæmmer bakteriernes evne til at udskille katalase og dermed deres beskyttelse mod ekstracellulær hydrogenperoxid [6].

## NEED A CREATIVE ADVISOR?

Between you and your ideas, we'll find the spark for brilliant business opportunities. From IP strategy, legal services and analysis to patents, trademarks, design and copyright, we help illuminate the vast potential in your creation. [www.awapatent.com](http://www.awapatent.com)

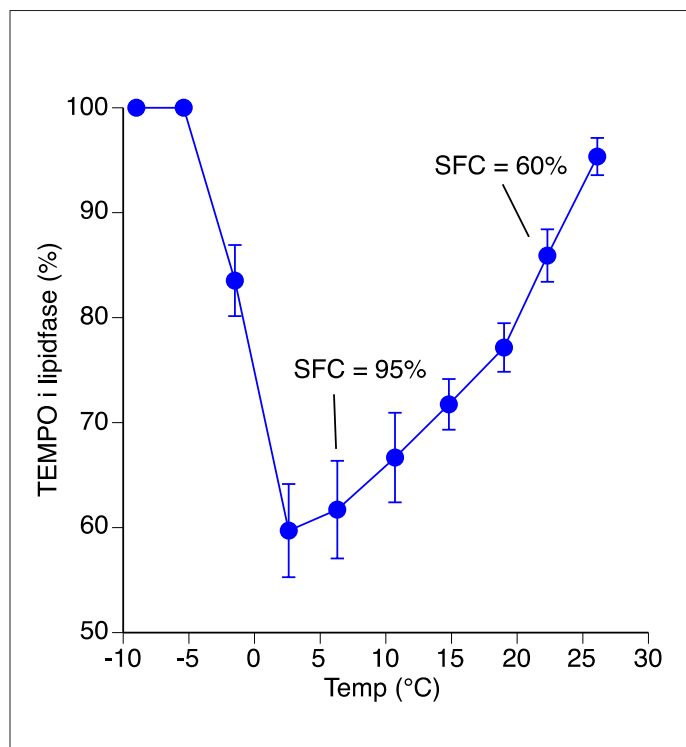
**AW APATENT**

### Molekylær mobilitet

ESR-spektre kan give interessant information om de fysiske omgivelser, radikalerne befinder sig i. Dette kan udnyttes ved at bruge stabile radikaler, såsom TEMPO, som prober. TEMPO kan betragtes som en model for små organiske forbindelser, og den kan derfor bruges som model for, hvordan aromaforbindelser fordeler sig i en emulsion, såsom is, under frysning og tøning. TEMPO er opløselig i både vand og fedt, og ved tilsætning af TEMPO til en emulsion, vil den fordele sig mellem fedt- og vandfasen. De forskellige polariteter i de to faser påvirker koblingen mellem den uparrede elektron og <sup>14</sup>N-atomet, hvilket giver sig udslag i ESR-spektre med forskellig afstand mellem de tre linjer. Et ESR-spektrum af TEMPO opløst i en emulsion består derfor af to spektre, som overlapper hinanden [7]. Ved simulering af det eksperimentelle spektrum kan de to spektre adskilles, og man kan bestemme den relative fordeling af TEMPO mellem vand og fedtfaserne, figur 2, side 17. Dette er anvendt til at undersøge, hvordan TEMPO fordeler sig i en emulsion, lavet med et fedtstof, hvor indholdet af fast fedt (SFC) ændrer sig med temperaturen, figur 3. Ved 25°C, hvor indholdet af fast fedt er lavt (SFC = 60%), er TEMPO hovedsageligt opløst i fedtfasen. Når temperaturen sænkes og indholdet af flydende fedt samtidig falder, vil en stigende del af TEMPO flyttes over i vandfasen. Ved temperaturer under 0°C, hvor vandfasen fryser, bliver TEMPO tvunget tilbage i fedtfasen. Forsøgene viser, at fordelingen af aromaforbindelser mellem vand- og fedtfaser kan være meget temperaturafhængig og kan ændre sig betydeligt, når en emulsion fryser.

E-mail:

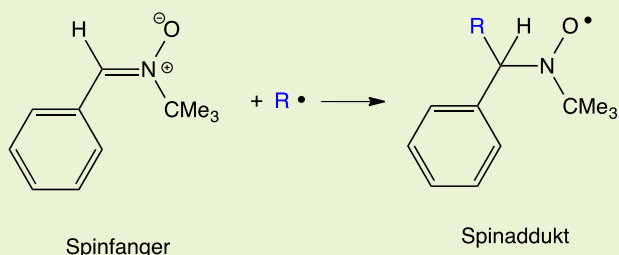
Mogens L. Andersen: mola@food.ku.dk



Figur 3. Andel af TEMPO i fedtfasen ved køling af en emulsion af fuldhærdet palmekerneolie. Ved lavere temperaturer stiger mængden af fast fedt (SFC), og fordelingen af TEMPO forskydes mod vandfasen. Men når vandfasen fryser ved temperaturer under 0°C, tvinges TEMPO tilbage i fedtfasen. Data fra [7].

### Spinfangning

De fleste organiske radikaler er for kortlivede i opløsning ved stuetemperatur til at kunne akkumuleres i detekterbare steady-state koncentrationer i vandholdige fødevarer-systemer, selvom ESR-teknikken kan under optimale forhold detektere radikaler i koncentrationer ned til 10 nM. I nærvær af spinfangere, som ofte er baseret på molekyler, der indeholder en nitron- eller nitroso-gruppe, kan en vis del af de reaktive radikaler fanges ved at danne et spinaddukt med spinfangeren. Spinaddukter er stabile nitroxylradikaler, som kan akkumuleres over tid og dermed nå detekterbare koncentrationer.



### Referencer

- Mäkinen, O. E., R. Kivelä, L. Nyström, M. L. Andersen and T. Sontag-Strohm (2012). "Formation of oxidizing species and their role in the viscosity loss of cereal beta-glucan extracts". *Food Chemistry* **132**: 2007-2013.
- Faure, A. M., M. L. Andersen and L. Nyström (2012). "Ascorbic acid induced degradation of beta-glucan: Hydroxyl radicals as intermediates studied by spin trapping and electron spin resonance spectroscopy". *Carbohydrate Polymers* **87**(3): 2160-2168.
- Faure, A. M., A. Sánchez-Ferrer, A. Zabara, M. L. Andersen and L. Nyström (2014). "Modulating the structural properties of β-D-glucan degradation products by alternative reaction pathways". *Carbohydrate Polymers* **99**: 679-686.
- Hougaard, A. B., N. Arneborg, M. L. Andersen and L. H. Skibsted (2013). "ESR spin trapping for characterization of radical formation in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Listeria innocua*". *Journal of Microbiological Methods* **94**: 205-212.
- Hougaard, A. B., H. Pindstrup, N. Arneborg, M. L. Andersen and L. H. Skibsted (2016). "Free radical formation by *Lactobacillus acidophilus* NCFM is enhanced by antioxidants and decreased by catalase". *Food Research International* **79**: 81-87.
- Wang, Y., A. B. Hougaard, W. Paulander, L. H. Skibsted, H. Ingmer and M. L. Andersen (2015). "Catalase expression is modulated by vancomycin and ciprofloxacin and influences free radical formation in bacterial cultures of *Staphylococcus aureus*". *Applied and Environmental Microbiology* **81**(18): 6393-6398.
- Munk, M. B., H. R. Erichsen and M. L. Andersen (2014). "The effects of low-molecular-weight emulsifiers in O/W-emulsions on microviscosity of non-solidified oil in fat globules and the mobility of emulsifiers at the globule surfaces". *Journal of Colloid and Interface Science* **419**: 134-141.