

»Naturlige« konserveringsmidler – et alternativ til syntetiske tilsætningsstoffer

Vore forfædre udnyttede i langt højere grad end vi planternes naturlige antimikrobielle stoffer til konserveringsformål af bl.a. fødevarer. På BioCentrum-DTU har man studeret den antimikrobielle effekt af ekstrakter fra planter og urter, og det er vist, at visse stoffer er effektive i næsten smagsløse doser

Af Per Væggemose Nielsen, per.v.nielsen@biocentrum.dtu.dk og Karin Isabel Suhr, ph.d.-studerende i Mykologigruppen, Sektion for Levnedsmiddelbioteknologi og Mykologi, BioCentrum-DTU, DTU

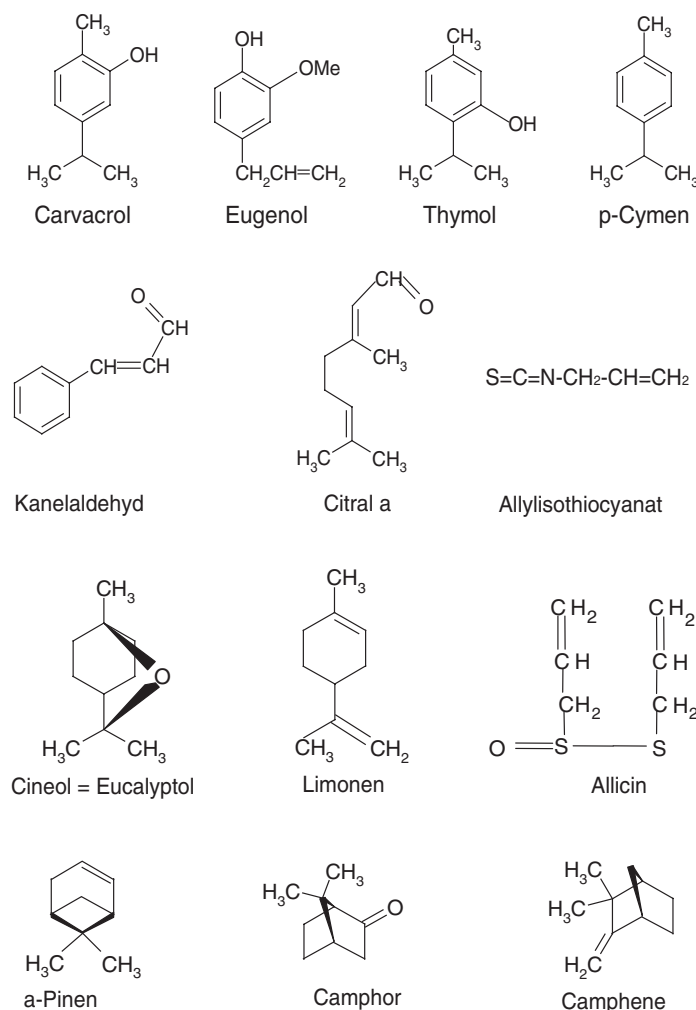
Mennesker har gennem tusinder af år lært at leve af og med naturen og udnytte de forhåndenværende plantematerialer. Dele af den viden har overlevet i form af »naturmedicin« og »gode husråd«, mens meget i dag er gået tabt eller ikke udnyttes. Moderne tænkning i miljørigtige »grønne« produktionsmetoder og negative forbrugerholdninger til kunstige til-

sætningsstoffer giver perspektiver for at (gen)indføre stoffer udvundet fra planter til erstatning for syntetisk fremstillede konserveringsmidler. Her fokuseres på anvendelsen af ekstrakter fra krydderier og krydderurter til sikring af en optimal fødevarekvalitet.

Planternes »kemiske værn«

Sekundære metabolitter, som produceres af planter, menes at være deres kommunikation med omverdenen. Iblandt dem regnes f.eks. forsvarsstoffer, som planterne har udviklet for at forhindre invasion af fjender som svampe og bakterier, insekter eller større dyr. Der er ingen tvivl om, at vore forfædre udnyttede planternes naturlige antimikrobielle stoffer i lang højere grad, end vi gør i dag. De tidligste kilder viser anvendelsen af planter og krydderier ved balsameringen af ægyptiske mumier omkring 2600 år før vor tidsregning, [1] og brug af sennepsfrø til konservering af frugtsaft i Romerriget [2]. I primitive samfund menes krydderier og krydderurter at have været brugt i lige så høj grad for deres antimikrobielle virkninger, som for de smagsgivende egenskaber. Ganske som saltning er en gammelkendt konserveringsmetode, kan krydderier og krydderurter have haft en tilsvarende funktion [3]. I dag kender vi bedst stofferne pga. deres smagskarakteristika, og brugen af dem er i nogle tilfælde blevet traditionsbunden skik. F.eks. menes humle oprindeligt at være blevet tilsat øl pga. de antimikrobielle indholdsstoffer (humuloner, lupuloner), og den bitterhed humlen forårsagede var en uønsket bivirkning. Med tiden er bitterhed så blevet en vigtig karakter for øl, der nødvendiggør brugen af humle [4].

Det er også et kendt faktum, at stærke krydderier traditionelt anvendes langt hyppigere og i større doser i varme udviklingslande (hvor køleskabe ikke er hver mands eje). Her er det en fordel, at de aktive antimikrobielle stoffer ofte også er aromastoffer, så man kan smage om maden er tilstrækkeligt konserveret. En omfattende undersøgelse af knap 5.000 kødbaserede madopskrifter fordelt på alle kontinenter fandt en positiv korrelation mellem middeltemperaturen i landet og brugen af stærke antimikrobielle krydderier, som cayennepeber, hvidløg, løg, anis, kanel, koriander, kommen, ingefær, citrongræs og gurke-meje [3]. Mens brugen af persille og dild er omvendt korreleret til middeltemperaturen. Til gengæld var der ingen forskel på antallet af krydderurter, som voksede naturligt i de forskellige lande. Det bekræfter, at der anvendes en større del af de forhåndenværende krydderurter og krydderier i varmere lande. I den



Figur 1. Antimikrobielle stoffer i udvalgte krydderier og urter.

Tabel 1. Aktive komponenter i udvalgte krydderier og urter

Krydderi / urt	Engelsk navn	Aktive komponent
Appelsin	Orange	Limonen
Citrongræs	Lemon grass	Citral
Hvidløg (Allium familie)	Garlic	Allicin
Kanel	Cinnamon	Kanelaldehyd, Eugenol
Kommen	Cumin	Carvon, Limonen
Kryddernellike	Clove	Eugenol
Lavendel	Bay	β -Myrcen, Chavicol, Eugenol
Oregano	Oregano	Carvacrol, Thymol
Rosmarin	Rosemary	α -Pinen, Camphene, Camphor, Eucalyptol (1,8-Cineol)
Salvie	Sage	α -Pinen, Camphene, Camphor, Eucalyptol (1,8-Limonen)
Cineole), Sennep (Cruciferae)	Mustard	Allylisothiocyanat
Timian	Thyme	Thymol, p-Cymen
Vanille	Vanilla	Vanillin

»den primitive« madlavning efterleves endvidere ofte den tommelfingerregel, at kombinationskonservering med flere stoffer er at foretrække frem for et enkelt stof. Et eksempel er den unikke og specifikke »curry«-blanding, der ofte er husstandens særlige i Indien. Brug af flere stoffer giver et bredere antimikrobielt spektrum og forebygger udvikling af resistensmekanismer hos mikroorganismer.

Krydderier og krydderurter

De virksomme stoffer i planterne findes ofte i den essentielle oliedel. Foruden disse stoffer, som almindeligvis dannes i hele planten og udgør en del af den almindelige funktion og metabolisme, kan mere specifikke stoffer dannes af planten, som reaktion på stress, mikrobielt angreb o.l. Disse inducerede stoffer er som regel større molekyler, som phytoalexiner og andre polyphenoler. Mange af dem har også antimikrobiel aktivitet, ➔

Genvejen til næste generation af lægemidler!

MAXYGEN

Maxygen søger akademikere, laboranter og projektledere indenfor proteinkemi, molekylærbiologi, immunologi og farmakologi. Maxygen er en ung, dynamisk bioteknologivirksomhed med adskillige terapeutiske protein-kandidater under udvikling.

Vi tilbyder udfordrende jobs i et kreativt, målrettet, multidisciplinært miljø, der er præget af pionérånd. Du kommer til at arbejde med topmoderne udstyr og får kontakt til ledende nationale og internationale forskergrupper og

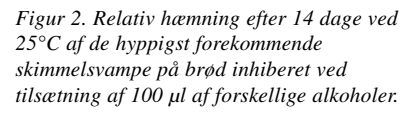
firmaer. Maxygen er et firma med en dynamisk strategi og korte kommandoveje, og vi tilbyder særdeles attraktive vilkår, et meget aggressivt optionsprogram samt gode arbejdsforhold.

Hvis du er blandt de bedste på dit felt, og du - ligesom os - lægger vægt på energi, fleksibilitet og samarbejdsevner, så send din ansøgning og curriculum vitae til: Maxygen, Agern Alle 1, DK-2970 Hørsholm.

Få yderligere information på telefon 7020 5550 eller læs mere på www.maxygen.com

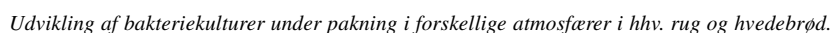
Energi, samarbejde og målrettethed

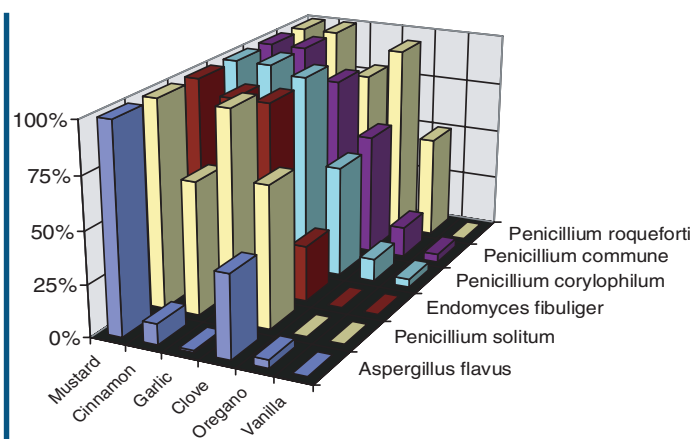




De aktive stoffer er ikke lige virksomme over for forskellige mikroorganismer (forskellige antimikrobielle spektra), og mikroorganismernes følsomhed afhænger af hvilket stof, som undersøges. Svampe synes generelt at være mere følsomme end bakterier, og Gram negative bakterier synes at være mere resistente end Gram positive [8]. Forskellige testprocedurer i litteraturen gør det dog svært at sammenligne forskellige resultater direkte med hinanden.

Da modificeret atmosfære i flere tilfælde ikke giver en tilstrækkelig konserverende effekt, er mulighederne for at benytte aktiv pakning undersøgt. Ved aktiv pakning har pakken en ekstra (aktiv) funktion ud over blot at være et (passivt) beskyttende lag mod omgivende miljø. Pakningen kontrollerer eller kan reagere på fænomener inde i pakken [11]. De mest gængse former for aktiv pakning har været at indlægge eller indbygge oxygen-absorbere i emballagen. Andre tiltag har været forskellige indikatorer som ved en farvereaktion kan vise, om produktet er nået ud





Figur 3. Relativ hæmning efter 14 dage ved 25°C af de hyppigst forekommende skimmelsvampe på brød inibet ved tilsætning af 1 µl essentiel olie (af sennep, kanel, hvidløg, nellike, oregano og vanille).

over sin holdbarhedsperiode. På BioCentrum-DTU er brugen af ekstrakter fra krydderier og urter som aktive komponenter i forbindelse med emballering undersøgt. Især de flygtige antimikrobielle stoffer har været i fokus, fordi de ikke kræver direkte kontakt mellem produkt og emballagen, og samtidig virker hvor der er behov for dem, nemlig på overfladen af produktet.

Indledningsvis blev der foretaget et screeningsforsøg på fast laboratoriemedie. Her blev en række alkoholer og flygtige olier testet mod de mest hyppigst fundne gær og skimmelsvampe på brød [12]. Figur 2 viser resultaterne fra et forsøg, hvor der blev tilsat 100 µl af de forskellige alkoholer på et lag filterpapir i låget af en petriskål podet med de forskellige svampe og forseglet med parafilm. Det ses, at den relative hæmning efter 14 dage stiger med kædelængden af alkoholen, således har ethanol, 2-propanol og tert-butanol nogenlunde den samme effekt, mens pentanol hæmmer væksten fuldstændig.

Figur 3 viser resultaterne fra et tilsvarende forsøg med krydderiekstrakter hvor der blev tilsat 1 µl til hver petriskål. De viste fuldstændig hæmning af mikroorganismer ved brug af sennep, en kraftig hæmning ved brug af kanel, hvidløg og nellike, men kun lille effekt for oregano og vanille [12].

På baggrund af resultaterne afprøvede vi sennep, kanel og nellike i et pilot-pakkeforsøg med brød, hvor vi forinden podede brødene med svampe/gær¹ og doserede olien i petriskåle, der blev pakket sammen med brødene uden at have direkte kontakt.

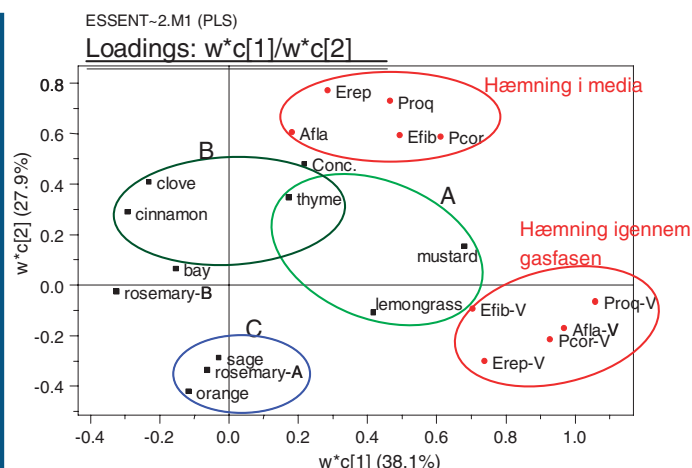
Disse forsøg viste, at sennepsolie var særdeles effektivt, hvori mod de to andre olier skulle op i meget store mængder, som antageligt var sensorisk uacceptabel i et så følsomt produkt som brød. Derfor fortsatte vi med at fokusere på sennepsolie.

Senneps essentielle olie

Det aktive stof i sennepsolie er allylisothiocyanat (AITC), som udgør helt op til 95% af olien. AITC dannes ud fra glucosinolater, som findes oplagret i vakuoler inde i plantecellerne. Når cellerne knuses eller går i stykker, kommer glucosinolaterne i kontakt med enzymet myrosinase, som spalter det til AITC og andre produkter.

I vores undersøgelser fandt vi, at *Aspergillus flavus* var den svamp, som krævede højst sennepsoliedosis for at blive hæmmet. Men ved at kombinere sennepsolien med MAP, var det muligt at hæmme svampen, når der blev anvendt en sensorisk acceptabel dosis af sennepsolie. Yderligere forsøg med hvedebrød har dog vist, at dosis skal omkring eller over den sensoriske kritiske grænse (2 µl/brød) for at hæmme gær i MAP-pakket hvedebrød.

Derimod var det muligt at hæmme alle undersøgte skim-



Figur 4. PLS-r plot over hæmning af svampegæst på rugbrød enten ved tilsætning af ekstrakter til mediet eller i flygtig form.

melsvampe og gær på rugbrød i en sensorisk acceptabel dosis (ca. 1 µl/1000 ml luft/brød). Rugbrød er dog også væsentligt forskelligt fra hvedebrød med bl.a. meget lavere pH og mere »egensmag«.

De lovende resultater med anvendelse af AITC til konservering har gjort, at vi er gået videre med at få indbygget stoffet i fødevareremballage. Det sker bl.a. i EU-projektet BioPack (www.biopack.org), hvor vi vil indbygge aktive komponenter i bionedbrydelige film fremstillet af polylactat og poly-3-hydroxy-butyrat. Stofferne bygges først ind i cyclodextriner, som dels beskytter under indbygningen i polymeren, dels sørger for en kontrolleret frigivelse af stofferne.

Som nævnt benyttede de gamle romere sennep/AITC til konservering. I dag findes en række patenter på forskellige applikationsmetoder, hvor AITC anvendes som aktivt antimikrobielt stof. De er især af japansk eller amerikansk oprindelse. AITC er godkendt som aromastof i EU (opført i »den blå bog«), som et kategori A stof og en TDI (tolerabelt dagligt indtag) på 3,6 mg/dag/person. Til sammenligning skal nævnes, at i Dijon sennep findes omkring 0,22% AITC svarende til ca. 11 mg i en teskefuld (Moutarde de Dijon, Eldorado). Men da stoffet ikke er godkendt og optaget i positivlisten som et konserveringsmiddel, kan det ikke anvendes som sådan. Det vil i givet fald kræve en godkendelse i EU-systemet [12].

Har fasen betydning?

Resultaterne fra forsøgene med antimikrobielle stoffer fra krydderier og urter er på sin vis i modstrid med de resultater, der findes i litteraturen, og som vores samarbejdspartner i EU har fundet. Sennep findes således langt nede på listen over de mest antimikrobielle planter. Men da mange af forsøgene er udført ved at tilsætte stofferne til produktet blev betydningen af, om stoffet var i gasfase eller tilsat produktet undersøgt. I en forsøgssopstilling tilsattes derfor den samme mængde stof enten til vækstsubstratet eller til gasfasen over substratet (i begge tilfælde hhv. 125 og 250 µl/ml).

Figur 4 viser et PLS-r model over hæmning, afhængig af hvilket stof der tilsættes. På plottet ses det, at det er forskellige stoffer, der hæmmer svampene i de to systemer (mærket med røde ringe). De stoffer, som virker bedst i det flygtige system, ligger foruden i plottet, mens de der virker bedst, når de bliver tilsat mediet, ligger foroven. Jo længere stofferne ligger mod højre i plottet, des mere aktive er de. Stofferne mærket med A (sennep, citrongræs og timian) virker godt i begge systemer. Timian, nellike og kanel virker godt, når de tilsættes mediet (B) og appelsin, rosmarin og salvie (C) virker godt, når de tilsættes

i gasfasen. Sammenholdes figur 4 med tabel 1 og figur 1 ses, at de ekstrakter, der virker bedst ved tilsætning til mediet (B), hovedsageligt består af phenoliske stoffer. Det er også disse stoffer, som i litteraturen angives som de mest antimikrobielle komponenter i planteekstrakter efterfulgt af aldehyder, ketoner, alkoholer og andre hydrocarboner. Sennep og citrongræs virkede godt i mediet, men virker bedre som flygtige stoffer, faktisk var sennep effektiv selv ved 1 µl/ml i gasfasen. Grunden til den store forskel i aktivitet er sandsynligvis, at allylisothiocyanat ved tilsætning til mediet reagerer med proteinerne i mediet og bliver delvist inaktiveret.

Perspektiver for naturstoffer

Sekundære metabolitter i vore fødeplanter er noget, som pr. tradition ikke har haft stor interesse. De er som regel blevet minimeret eller ignoreret gennem avlsarbejde. I nyere tid er interessen dog blevet skærpet for stofferne, som følge af den jagt man har drevet for at finde en forklaring på det industrialiserede samfunds velfærdssygdomme (som sukkersyge, hjertekar-sygdomme og kræft). I den sammenhæng har de naturlige aktive stoffer fået tillagt (ny) stor betydning, og man har skelet kraftigt til isolerede natur-/stammefolk, hvor »medicin« og føde ikke rigtigt skelnes fra hinanden [13]. Antioxidanter er nu almindelig kendt for at have en forebyggende virkning på kræft og hjertekar-sygdomme. Mange af disse antioxidanter er netop de samme (specielt phenol-forbindelser), som er blevet nævnt ovenstående for deres antimikrobielle egenskaber (figur 1).

Det giver et perspektiv for disse stoffer i den fremtidige levnedsmiddelproduktion, som både antimikrobielle og antioxidative stoffer. Der findes ganske givet også naturlige stoffer, som ikke har så kraftige smagsvirkninger, men stadige er antimikrobielle og antioxidative.

Den fornyede interesse har givet mange teorier inden for området, specielt for hvordan deres funktion er i relation til den menneskelige krop. Nogle hævder, at de stoffer man p.t. anser for ønskede (f.eks. anthocyaniner) måske kun er markørstoffer for de virkelig aktive og interessante stoffer. Eller i virkeligheden er deres virkning »skadelig«, hvilket er godt, da en lille dosis skadelige stoffer er ønskeligt, fordi det booster kroppens forsvarssystem, så det selv er »kampdygtigt«.

Fordi vi ikke fuldt ud kender de specifikke reaktionsmekanismer, findes der ikke nogen endegyldig teori. Den manglende viden vanskeliggør også arbejdet med at teste mange af stofferne og give vejledning til lovgivere på området, da det er svært at vurdere om testmetoden overhovedet er relevant og reali-

stisk. En sådan situation leder f.eks. til paradokset omkring AITC. Stoffet er i en undersøgelse blevet fundet at være kræftfremkaldende i rotteleverceller, men samtidigt bliver netop glucosinolatholdige grøntsager anbefalet specielt mod kræft pga. beviser for forebyggende virkning. Dette paradoks bunder sandsynligvis i rette dosis-respons-forhold.

Vanskelighederne ved at teste de aktive naturlige stoffer i et passende system, og de dermed forbundne økonomiske omkostninger, er formodentlig en af bevæggrundene til, at de endnu ikke har været benyttet i udstrakt grad i levnedsmiddelindustrien. Men den øgede fokus på sundere fødevarer vil formodentligt være et incitament til at kigge nærmere på dem i fremtiden.

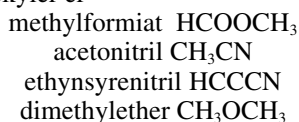
- 1) Hvedebrød blev podet med: *Penicillium commune*, *P.solium*, *Aspergillus flavus* og *Endomyces fibuliger*. Rugbrød med: *Proqueforti*, *P.corylophilum*, *Eurotium repens* og *Endomyces fibuliger*.

Referencer

1. David, A.R., 1992. Plants and plant products used in mummification, i H.N.Nigg & D.Seigler; *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*, Plenum Press, New York, USA, s.15-32
2. Holm, F. 1999. Natural food preservatives. Antimicrobials, Report for The Nordic Minimal Processing Network, FoodGroup Denmark.
3. Billing, J. & Sherman, P.W., 1998. Antimicrobial functions of spices: Why some like it hot. *The Quarterly Review of Biology*, 73, 1, 3-49.
4. Walker, J.R.L., 1994. Antimicrobial Compounds in Food Plants, i V.M.Dillon & R.G.Board; *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*, CAB International, UK, s.181-204.
5. Deans, S.G. & Ritchie, G. 1987. Antimicrobial properties of plant essential oils, *International Journal of Food Microbiology*, 5, 165-180.
6. Gould, G.W., 1996. Industry Perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications, *Journal of Food Protection*, supplement, 82-86.
7. Del Campo, J., Amiot, M. & Nguyen-The, C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts, *Journal of Food Protection*, 63, 10, 1359-1368.
8. Zaika, L.L., 1987. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination, *Journal of Food Safety*, 9, 97-118.
9. Nychas, G.J.E., 1995. Natural Antimicrobial from Plants, i G.W. Gould; *New Methods of food preservation*, Blackie, Chapman & Hall, UK, s.58-89.
10. Delaquis, P.J. & Mazza, G., 1995. Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation, *Food Technology*, 11, 73-84.
11. Fabeck et. al., 2000. Active and Intelligent Food Packaging, *TemaNord 2000:584*, Nordic Council of Ministers, DK-København.
12. Nielsen, P.V. & Rios, R., 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil, *International Journal of Food Microbiology*, 60, 219-229.
13. Johns, T. & Chapman, L., 1995. Phytochemicals ingested in traditional diets and medicines as modulators of energy metabolism, i J.T. Arnason et al.; *Phytochemistry of medicinal plants*, Plenum Press, New York, USA, s.161-188.

Nyt om kemi mellem stjernerne

Man har nu identificeret en række organiske molekyler i halen af kometen Hale-Bopp, der passerede tæt forbi jorden i 1999. Blandt disse molekyler er



Disse stoffer kan enten være dannet i kometen eller være »samlet op« i det interstellare rum, kometen har passeret igennem. Man kender en del til den kemi, der kan foregå i en komet. På dette grundlag har man konkluderet, at disse stoffer ikke kan være syntetiseret i kometen; men må være samlet op ved passagen gennem det interstellare rum. Dette svarer også til tidligere spektroskopiske observationer af sådanne stoffer mellem stjernerne.

Carl Th.

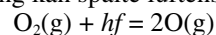
Organic synthesis in the coma of Comet Hale-Bopp? *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* **320** (2001): L61.

Nyt om stjernekastere

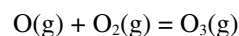
Ved juletid og andre højtider er det populært at antænde stjernekastere. Det kraftige lys og de glødende partikler fryder børn og voksne.

På Nehru universitetet i New Delhi har en gruppe kemikere undersøgt luften i forbindelse med massiv afbrænding af stjernekastere og påvist forøgede mængder af ozon (trioxygen O_3).

Lyset fra en stjerne kaster indeholder ifølge deres undersøgelse betydelige mængder stråling med bølglængde under 240 nm. Så energirig stråling kan spalte luftens ilt (dioxygen O_2)



Det dannede oxygen reagerer med luftens dioxygen og danner trioxygen



Bos

2001: The colorful sparkle of ... ozone? *Chemical & Engineering News*. 2. juli: 23.