

Afslutningsrapport

Cholesteroxidation i mejeriprodukter
Mejeribrugets ForskningsFond
Rapport nr. 1995-1

September 1995



mejeriforeningen
danish dairy board

Afsluttende rapport for FØTEK I projektet

Cholesteroloxidation i mejeriprodukter

Et samarbejde mellem KVL Center for Fødevareforskning og
Mejeribrugets ForskningsFond

Udarbejdet af: Ph. D. Jacob Holm Nielsen, Afdeling for Råvarekvalitet, Danmarks JordbrugsForskning og
professor Leif Skibsted, Levnedsmiddelkemi, Mejeri- og Levnedsmiddelinstittet, Den Kgl. Veterinær- og
Landbohøjskole, april 1997.

Cholesteroxidation i mejeriprodukter, projektoversigt.

Varighed: Marts 1992- september 1995.

Projektmedarbejdere:

Projektleder: Professor Leif H. Skibsted, Levnedmiddelkemi, Mejeri-og Levnedsmiddelinstitutet.

Ph. D. studerende, cand.scient. Jacob Holm Nielsen (maj 1992 - maj 1995).

Ph. D. Kevin Jørgensen (december 1992 - marts 1993).

Forskningsassistent, cand.brom. Gitte Sørensen (i perioder i 1994/1995).

Laborant Christina Duedahl, laborant Elisabeth Krogh, laborant Marianne Olsen og laborant Laurette Sosniecki var tilknyttet (og aflønnet af) projektet i forskellige perioder afhængig af projektets faser og de aktuelle laboratorieopgaver.

Herudover havde projektet tæt samarbejde med lektor Carl Erik Olsen, Kemisk Institut vedrørende massespektrometri (MS).

Industriel samarbeidspartner: MD Foods Udviklingscenter, Brabrand, ved afdelingsleder John Sørensen.

Internationale kontakter: Projektet var partner i en international ringtest om analyse af cholesteroxidider i levnedsmidler ledet af professor L.-Å. Appelqvist, Sveriges Landbruksuniversitet, Uppsala.

Publicering: Projektets resultater er publiceret i 4 artikler i internationale tidsskrifter med referebehandling (i Journal of Dairy Research og i Food Chemistry).

INTRODUKTION

På foranledning af IDF (International Dairy Federation) udarbejdede Bosinger & Brandl i 1990 rapporten: "Oxysterols: Their occurrence and biological effects". Denne rapport giver et overblik over den daværende viden om indholdet af cholesteroxidationsprodukter (oxysteroler) i levnedsmidler og oxysterolers mulige betydning for udvikling af atherosclerosis og cancer. Med denne rapport som udgangspunkt etableredes samarbejdsprojektet mellem Mejeribrugets ForskningsFond og KVL Center for Fødevarerforskning finansieret af Det Fødevareteknologiske Forsknings- og Udviklingsprogram og af Mejeribrugets ForskningsFond.

Projektets overordnede formål var at give dansk mejeribrug anvisninger med henblik på produktion af mejeriprodukter, hvor cholesteroxidationen var begrænset. Anvisningerne skulle bygge på udvikling af specifikke analysemetoder og reaktionskinetiske studier.

Dette overordnede mål omfattede følgende delmål:

- 1) at udvikle en pålidelig metode til detektering og kvantificering af oxysteroler i mejeriprodukter
- 2) at undersøge indholdet af oxysteroler i danske mejeriprodukter og undersøge proces teknologiske parametres indflydelse på dannelsen af oxysteroler i mejeriprodukter
- 3) at foretage reaktionskinetiske undersøgelser af, hvilke parametre der har indflydelse på cholesteroxidation
- 4) at rådgive mejeribrug således at cholesteroxidation begrænses mest muligt i (udvalgte) mejeriprodukter.

En gennemgang af litteraturen viste, at de hidtidig benyttede metoder til kvantificering af frie oxysteroler i levnedsmidler var uspecifikke med risiko for generering af artefakter i forbindelse med oprensningen af oxysteroler, hvorfor der udarbejdedes en ny analysemetode baseret på præparativ HPLC og GC/MS. Efterfølgende blev foretaget en screening af indholdet af oxysteroler i en række danske mejeriprodukter, særligt udsat for oxidation, ligesom der blev foretaget en sammenligning af cholesteroxidationen i smør og blandingsprodukter ("dairy spread") under lagring. Ved reaktionskinetiske forsøg, herunder isotopmærkning, blev dannelsen af 7-ketocholesterol nærmere undersøgt for at forklare akkumulering af 7-ketocholesterol som det dominerende oxysterol i en række mejeriprodukter, og for at kunne anvende denne forbindelse som markør ved rutineanalyser. I feta fremstillet af termisk bleget smørolie blev cholesteroxidation fulgt under efterfølgende lagring og sat i relation til de anvendte procesparametre (blegningstemperatur og holdetid). For dette produkt, der skønnes at være blandt de mest udsatte mejeriprodukter med hensyn til cholesteroxidation, kunne gives entydige anvisninger for at begrænse cholesteroxidation.

Den forliggende rapport beskriver dannelsen af oxysteroler, metoder til oprensning og kvantificering af oxysteroler, indholdet af oxysteroler i mejeriprodukter, som det er fundet ved analyse og endelig proces teknologiske forhold af betydning for dannelsen af oxysteroler.

PROJEKTETS RESULTATER

A. Udvikling af metode til detektion og kvantificering af oxysteroler i mejeriprodukter

I forbindelse med projektet er der udviklet en ny og specifik metode til kvantificering af frie oxysteroler i mejeriprodukter baseret på fast-fase ekstraktion i kombination med præparativ HPLC og GC/MS til separation og kvantificering af oxysteroler. Fordelen ved den udviklede metode til opkoncentrering af oxysteroler er en høj genfinding af såvel polære som apolære oxidationsprodukter (for standardstoffer er fundet 88 - 98%). Mange tidligere anvendte metoder er begrænset af artefaktdannelse hvilket ikke synes at være et problem at påvise ved den nyudviklede metode. Detektionsgrænsen for oxysteroler ligger med den nye metode på 0,3 - 35 pg/ μ l af de isomere former af 7-hydroxycholesterol, 20 α -hydroxycholesterol, de isomere former af kolesterol-5,6-epoxider, cholestanetriol, 25-hydroxycholesterol og 7-ketocholesterol, hvilket svarer til kvantificeringsgrænser på 2-6 ng/g lipid. Metoden er anvendt ved en ringtest med 14 europæiske laboratorier som deltagere. Resultaterne af denne test viste særdeles store afvigelser imellem de enkelte laboratorier, men ved at anvende den nyudviklede metode lå resultaterne for flertallet af prøver tæt på medianen blandt resultaterne. Metoden er efterfølgende blevet anvendt til analyse af kolesteroloxidationsprodukter under hele projektet. Den udviklede metode var 400 gange så følsom som andre metoder tilgængelige for mejeriprodukter på publiceringstidspunktet.

Referencer:

Nielsen J. H., Olsen C. E., Duedahl C. & Skibsted L. H. (1995) Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Dairy Research* 62 101-113.

B. Indholdet af oxysteroler i danske mejeriprodukter og procesteknologiske parametres indflydelse på dannelsen af oxysteroler i mejeriprodukter

Lagring af en række oste i kølemontre ved 4 °C under lys fra lysstofrør som i detailbutikker viste generelt tilvækst i indholdet af oxysteroler indenfor den normale holdbarhedsperiode men afhængig af ostetype. 7-ketocholesterol blev fundet at være det dominerende oxysterol i revet ost og gul ost i skiver og fandtes efter holdbarhedsperiodens udløb i koncentrationer på 5,8 -17 µg/g lipid. I fetaost lagret i saltlage i 30 dage i en åben dåse ved 4 °C fandtes 7-ketocholesterol i en koncentration af 220 µg/g lipid, hvilket er den højeste koncentration af oxysteroler der blev målt under hele projektet i et levnedsmiddel.

Resultater af lagringsforsøg med smør viste, at dette er stabilt når det opbevares ved 4 °C eller lavere temperatur, og at oxysteroler ikke udgør et problem i dette oxidationsstabile produkt. Blandingsprodukter er på grund af højere indhold af flerumættede fedtsyrer fra planteolien oxidative labile, og en akkumulering af oxysteroler under lagring ved 4 og 20 °C blev konstateret. En vigtig observation var en nølefasen på ca. 7 uger for blandingsprodukter opbevaret ved 4 °C forud for oxidation, mens nølefasen for blandingsprodukter lagret ved 20 °C var meget kort. Dette resultat antyder, at lagring af den nye vigtige produkttype, hvor mælkefedt tilsættes vegetabilsk olie, ved en lavere temperatur kan forlænge nølefasen og dermed forlænge produktets holdbarhed.

Cholesteroxidation i fetaost fremstillet ud fra smørolie bleget ved høje temperaturer, som det er praksis ved fremstilling af feta fra komælk, blev sammenlignet med cholesteroxidation i fetaost fremstillet ud fra ikke-bleget smørolie. Blegningen blev foretaget ved henholdsvis 265 og 280 °C, og olien blev bleget i henholdsvis 2,4, 3,8 og 4,3 minutter ved begge temperaturer, mens en reference fetaost blev fremstillet helt uden blegning. Alle oste blev lagret i saltlage ved 4 °C, og cholesteroxidationen blev målt løbende under en 5 måneders lagringsperiode. Under de første 11 ugers lagring var niveauet af oxysteroler ens for de blegede fetaoste, men derefter steg koncentrationen af oxysteroler signifikant i de fetaoste, der var bleget ved 280 °C, i forhold til de oste, der var bleget ved 265 °C. Holdetiden synes ikke at have den samme dramatiske effekt på cholesteroxidationen i produkterne, og der var ingen signifikant forskel på koncentrationen af oxysteroler ved forskellige holdetider. 7-ketocholesterol udgjorde ca. 50% af alle oxysteroler i fetaostene. I fetaoste bleget ved 265 °C var koncentrationen af 7-ketocholesterol i intervallet 3,7 - 4,9 µg/g lipid efter endt lagring, mens koncentrationen af 7-ketocholesterol i fetaoste bleget ved 280 °C var 10,4 - 13,1 µg/g lipid. I reference fetaosten var koncentrationen af 7-ketocholesterol kun 1,2 µg/g

lipid efter endt lagring. Der var ingen forskel i farve på fetaoste bleget ved henholdsvis 265 og 280 °C og forsøg med blegning af smørolie viste, at man kunne foretage en komplet blegning på temperaturer helt ned til 220 °C. Vi foreslår derfor, at blegningen af smørolie bør foregå ved så lave temperaturer som muligt for at hindre cholesteroxidation.

Referencer:

Nielsen J. H., Olsen C. E., Duedahl C. & Skibsted L. H. (1995) Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Dairy Research* 62 10 1-113.

Nielsen J. H., Olsen C. E., Jensen C. & Skibsted L. H. (1996) Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. *Journal of Dairy Research* 63 159-167.

Nielsen J. H., Olsen C. E., Lyndon J. & Skibsted L. H. (1996) Cholesterol oxidation in feta cheese produced from high-temperature bleached and from non-bleached butteroil from bovine milk. *Journal of Dairy Research* 63 615-621.

C. Reaktionskinetiske undersøgelser af, hvilke parametre der har indflydelse på kolesteroloxidation

Da det blev konstateret, at 7-ketocholesterol i alle de analyserede mejeriprodukter udgjorde en relativ stor og overraskende konstant andel af den totale mængde af oxysteroler, blev de reaktionskinetiske studier centreret om dannelsesmekanismer for 7-ketocholesterol. Anvendelsen af 7-ketocholesterol, som markør for kolesteroloxidation og måske generelt for lipidoxidation i mejeriprodukter vil gøre rutineanalyser i industriel praksis mulige, men har som forudsætning, at andre oxysteroler ikke ophobes. Dannelsen af C-7 allyliske kolesteroloxidationsprodukter blev derfor fulgt i et modelsystem med kolesterol opløst i Tween-20 miceller i vand. Oxidationen blev initieret med den vandopløselige frie radikal initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid og bevirkede en akkumulering af 7-ketocholesterol som det dominerende oxysterol. Under forsøget blev de isomere former af 7-hydroxycholesterol ligeledes dannet. Resultater af modelforsøg viser noget overraskende, at disse kan dehydrogeneres til 7-ketocholesterol gennem en to-trins radikalproces. Resultater af modelforsøg viste endvidere, at dehydrogenering af 7 β -hydroxycholesterol til 7-ketocholesterol sker dobbelt så hurtigt som omdannelsen af 7 α -hydroxycholesterol til 7-ketocholesterol. Dette blev forklaret ved, at β -overfladen af sterolet er mere direkte eksponeret mod vandfasen, og at der derfor er bedre kontakt mellem hydroxygruppen og det fri radikal i vandfasen. Initiering i vandfasen blev valgt for at efterligne forholdene i mejeriproduktet, hvor oxidation initieres i vandfasen af metalioner eller enzymer.

Referencer:

Nielsen J. H., Olsen C. E. & Skibsted L. H. (1996) Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated by water-soluble radicals. *Food Chemistry* 56, 33-37.

AFSLUTTENDE BEMÆKNINGER

Alle projektets delmål er gennemført, og resultaterne fra disse undersøgelser er blevet publiceret internationalt, ligesom resultaterne har dannet grundlag for Jacob Holm Nielsen's ph.d.-afhandling. Resultaterne er endvidere løbende blevet formidlet ved nationale og internationale møder og kongresser. Projektet er afsluttet inden for de opstillede tidsrammer, og forsinkelser p.g a. analytiske problemer i projektets indledende faser er blevet indhentet i projektets senere faser. Det er i projektet konkluderet, at cholesteroxidation ikke er et problem i danske mejeriprodukter, når de opbevares hensigtsmæssigt. Grundlaget er endvidere skabt for udvikling af mere rutineprægede metoder til produktovervågning. Ved udvikling af nye produkter, hvor mælkefedt delvis erstattes af planteolie, bør cholesteroxidation dog undersøges, ligesom indførelse af nye processer med anvendelse af høj temperatur (eller i øvrigt ekstreme betingelser) bør give anledning til kontrol af oxidative processer.

PUBLIKATIONER i FORBINDELSE MED PROJEKTET:

Nielsen J. H., Olsen C. E., Duedahl C. & Skibsted L. H. (1995) Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Dairy Research* 62 101-113.

Nielsen J. H., Olsen C. E., Jensen C. & Skibsted L. H. (1996) Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. *Journal of Dairy Research* 63 159-167.

Nielsen J. H., Olsen C. E., Lyndon J. & Skibsted L. H. (1996) Cholesterol oxidation in feta cheese produced from high-temperature bleached and from non-bleached butteroil from bovine milk. *Journal of Dairy Research* 63 615-621.

Nielsen J. H., Olsen C. E. & Skibsted L. H. (1996) Cholesterol oxidation in a heterogeneous system initiated by water-soluble radicals. *Food Chemistry* 56, 33-37.

Nielsen J. H. (1995) Cholesteroxidation i mejeriprodukter. Ph.d.-afhandling.

En dansk oversigtsartikel over projektets resultater og deres praktiske betydning vil blive publiceret 1997 i *Mælkeritidende*.

