

# Afslutningsrapport

Forudsigelse af holdbarhed, aromaudvikling og funktionalitetsændringer i mælkepulver ud fra procesparametre og tidlige fysiske og kemiske målinger

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2005-68

*Juni 2005*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

# **Slutrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet:**

”Forudsigelse af holdbarhed, aromaudvikling og funktionalitetsændringer i mælkepulver ud fra procesparametre og tidlige fysiske og kemiske målinger”

Projektperiode: 1. juni 2000 til 31. marts 2005

## **Projektdeltagere:**

Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole  
&  
Fødevarestyrelsen, Fødevareregion Ringsted

Projektleder: Professor Leif H. Skibsted  
Lektor Jens Risbo  
Sektionsleder Henrik Stapelfeldt  
Ph.D. studerende Marianne Kaaber Thomsen  
Forskningsassistent Jes Knudsen  
Forskningsassistent Heidi Antanuse  
Forskningsassistent Lene Lauridsen  
Forskningsassistent Lone Jespersen  
Laborant Kirsten Sjøstrøm  
Laborant Solveig Nielsen

## Indholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	<b>4</b>
<b>Summary</b> .....	<b>5</b>
<b>Formål</b> .....	<b>6</b>
<b>Baggrund og mål</b> .....	<b>6</b>
<b>Metodeudvikling</b> .....	<b>7</b>
Isoterm kalorimetri til måling af laktosekrystallisation i mælkepulver .....	7
Statisk headspace GC-metode til tørt mælkepulver og modernælkserstatning.....	8
<b>Resultater</b> .....	<b>8</b>
Krystallisation af laktose .....	8
Lipidoxidation .....	12
Maillard-reaktioner.....	13
Laktosekrystallisation, lipidoxidation og Maillard-reaktioner i mælkepulver.....	14
<b>Konklusion</b> .....	<b>18</b>
<b>Liste over publikationer og offentliggørelser</b> .....	<b>19</b>
Artikler i internationale tidsskrifter .....	19
Indlæg ved faglige kongresser, symposier o.l., samt mødeindlæg .....	19
Faglige artikler .....	19
Andre referencer.....	19
<b>Forskeruddannelse</b> .....	<b>20</b>
<b>Samarbejdsrelationer (nationalt og internationalt)</b> .....	<b>20</b>

## **Sammendrag**

Projektets formål var at undersøge og beskrive vekselvirkningerne mellem lipidoxidation, laktosekrystallisation og Maillard-reaktioner (ikke-enzymatiske bruningsreaktioner) i mælkepulver. Forøget viden om samspillet mellem disse reaktioner kan medvirke til en bedre holdbarhedsforudsigelse af mælkepulvere umiddelbart efter tørring og til at fastsætte krav til opbevaringsbetingelser for de enkelte produkter.

Da laktose er hovedingrediensen i mælkepulver, har laktoses fysiske tilstand stor betydning for holdbarheden af pulveret. Når laktose er amorft og i glastilstand, er tiden før laktose krystalliserer meget lang. Når laktose krystalliserer i mælkepulver frigives vand, og ved lagring i lukkede beholdere vil vandaktiviteten i pulveret stige. Det medfører, at kemiske reaktioner som lipidoxidation og Maillard-reaktioner fremmes, hvorved kvaliteten af pulveret forringes dramatisk.

Til at forudsige laktoses fysiske tilstand under forskellige lagringsbetingelser blev et ( $a_w$ - $T$ )-tilstandsdiagram konstrueret. Ud fra diagrammet kan det afgøres, om laktose ved givne betingelser er og vil forblive amorft og i glastilstand, eller ikke er i glastilstand og derfor må forventes at krystallisere indenfor en overskuelig tidsramme.

Til at måle laktosekrystallisation i mælkepulver og bestemme mængden af amorft laktose i pulveret blev en isoterm kalorimetrisk metode udviklet. Laktose blev fundet at krystallisere ved en "alt-eller-intet" proces som rent amorft laktose og i modermælkserstatning, mens processen var gradvis i sødmælkspulver. Tilsætning af 4% sucrose til sødmælkspulver viste sig at kunne udsætte krystallisation markant.

Til at måle flygtige sekundære oxidationsprodukter i tørt pulver blev en GC-headspace metode udviklet i løbet af projektet. Med metoden har det været muligt at følge lipidoxidation i mælkepulveret mere direkte gennem hele processen. Hidtil har ESR spektroskopi været benyttet til måling af lipidoxidation i mælkepulver, da mængden af radikaler tidligere har vist sig at korrelere med dårlig smag af det rekonstituerede produkt. I dette projekt har ESR spektroskopi også været benyttet, og resultaterne indikerede dannelsen af mindst to typer af radikaler i mælkepulver, hvor den ene type blev tilegnet lipidoxidation, mens den anden blev tilskrevet sene Maillard-reaktioner. Der blev fundet meget tæt vekselvirkning mellem laktosekrystallisation og de sene Maillard-reaktioner i sødmælkspulver. Dette ses som en konsekvens af, at der afgives vand ved begge typer af reaktioner, hvorved vandaktiviteten i pulveret ændres og fremmer yderligere reaktion. Lipidoxidation synes derimod at forløbe uafhængigt af de to andre reaktioner.

Der blev påvist en meget stor temperaturafhængighed for reaktioner, der forløber i mælkepulver, og aktiveringsenergi i størrelsesordenen 200 kJ/mol (svarer til  $Q_{10} \sim 11$ ) kunne beregnes. Det kunne konkluderes, at glasovergangstemperaturen har stor betydning for langtidsholdbarheden, da lagring ved temperaturer mindre end 10 °C højere end  $T_g$  medførte drastiske forringelser i pulveret indenfor 20 dage, mens lagring ved temperaturer mindre end 10 °C under  $T_g$  ikke medførte forringelser i pulveret indenfor 150 dage. Der var dog indikationer af, at der sker kemiske reaktioner i mælkepulver i glastilstand, da der blev observeret radikaldannelse, dannelse af det tidlige Maillard-reaktionsprodukt furosin, samt dannelse af sekundære lipidoxidationsprodukter. Glasovergangstemperaturen kan derfor ikke betragtes som en absolut tærskel for holdbarheden af mælkepulver, men lagring ved temperaturer 10 °C under glasovergangstemperaturen kan dog anbefales for at sikre langtidsholdbarhed.

## **Summary**

“Prediction of shelf-life, flavor development and functionality changes in milk powder based on production parameters and early physical and chemical measurements”.

Final report from a collaboration project between the Danish Dairy Foundation and Centre for Advanced Food Studies (LMC) (1.6.2000 to 31.3.2005)

The aim of the project was to investigate the interrelations between lipid oxidation, crystallization of lactose and Maillard-reactions (non-enzymatic browning) in milk powder.

As lactose is the main ingredient in milk powder the physical state of lactose seems to govern the long-term stability of milk powder. To predict whether lactose is amorphous and in the glassy state and have long-term stability, or is in a non-glassy state and accordingly labile towards crystallization for given storage conditions, a ( $a_w$ - $T$ ) state diagram was constructed.

Strong interrelations between crystallization of lactose and late Maillard-reactions were observed in whole milk powder, whereas lipid oxidation progressed independently of the other reactions. Strong temperature dependence was observed for reactions in milk powder and activation energies in the order of 200 kJ/mol (corresponding to  $Q_{10} \sim 11$ ) were observed.

The glass transition temperature,  $T_g$ , could not be considered an absolute threshold of long-term stability of milk powder since radicals, furosine and secondary lipid oxidation products were formed in milk powder at storage at temperatures below  $T_g$ . However, storage at temperatures 10 °C below  $T_g$  is recommended for long-term storage in order to minimize physical and chemical changes in the powder.

## **Formål**

Det overordnede formål med projektet var at frembringe forøget viden om samspillet mellem lipidoxidation, laktosekrystallisation og Maillard-reaktioner (ikke-enzymatiske brunfarvningsreaktioner) i mælkepulver. Dette skulle gennemføres ved systematiske undersøgelser af vekselvirkningen mellem varmebehandling som en del af produktionen, temperatur og vandaktivitet under lagring, samt effekten af endogene pro- og antioxidanter på graden af lipidoxidation og Maillard-reaktioner. Desuden skulle indflydelsen af mælkepulverets fysiske tilstand som den amorfe glastilstand og efterfølgende krystallisation på lipidoxidation og Maillard-reaktioner undersøges ved hjælp af differential scanning calorimetry (DSC).

## **Baggrund og mål**

Institut for Fødevarevidenskab har i perioden fra juni 2000 til marts 2005 finansieret af det statslige fødevarerforskningsprogram FØTEK 3 og Mejeribrugets ForskningsFond gennemført undersøgelser af samspillet mellem lipidoxidation, faseomdannelser såsom laktosekrystallisation, samt Maillard-reaktioner (ikke-enzymatiske brunfarvningsreaktioner) i mælkepulver.

Det faglige udgangspunkt for projektet var blandt andet resultater opnået under FØTEK 1 indenfor rammerne af et to-årigt samarbejdsprojekt mellem det daværende KVL Center for Fødevareforskning, det daværende MD Foods og NIRO A/S (dengang del af Danisco koncernen). De vigtigste resultater af dette projekt kan opsummeres som følger:

- Radikaler kunne detekteres allerede i frisk fremstillet mælkepulver og koncentrationen af radikaler varierede i forhold til fremstillingsmetoden, fx. varmebehandling af mælken før tørring.
- Der blev påvist en negativ korrelation mellem koncentrationen af radikaler i mælkepulver og den sensoriske kvalitet af den rekonstituerede mælk.
- Det normalt antagne minimum for lipidoxidationshastigheden ved vandaktivitet 0,3 for tørrede fødevarer blev ikke fundet at gælde for mælkepulver, og mælkepulver blev fundet mere stabilt ved vandaktivitet 0,1-0,2. Ved højere vandaktivitet blev såvel bruningsreaktioner som oxidationsprocesser fremmet og kvaliteten af pulveret blev forringet hurtigere end ved lave vandaktiviteter.
- De funktionelle egenskaber af pulveret ændredes væsentligt som følge af reaktion mellem carbonylforbindelser, dannet som sekundære lipidoxidationsprodukter, og valleproteinerne, samt Maillard-reaktioner mellem laktose og valleproteiner, hvilket resulterede i dannelse af polymere forbindelser.

Der blev desuden fundet tydelige indikationer af, at laktosekrystallisation og proteindenaturering havde stor betydning for kvalitetsforringelser i mælkepulver.

I de senere år er forståelsen af glastilstandens betydning for tørrede fødevarers funktionalitet, fx opløselighed ved rekonstituering, øget. Laktose i spraytørret mælkepulver er amorft og i glastilstand og som sådan kun metastabilt. Andre studier har vist, at krystallisationshastigheden af laktose afhænger af fedtindhold og forøges med stigende vandaktivitet. Ved krystallisation frigives vand, og ved lagring i lukkede beholdere vil vandaktiviteten stige, hvorved lipidoxidation og bruningsreaktioner formodentlig vil blive accelererede. Desuden har en del studier vist, at den

fysiske stabilitet af amorf systemer kan forudsiges ud fra forskellen mellem lagringstemperaturen,  $T$ , og glasovergangstemperaturen,  $T_g$ , dvs. ud fra  $(T-T_g)$ .

De seneste år har ydermere frembragt en række analysemetoder, hvormed indholdet af specifikke Maillard-reaktionsprodukter som furosin og hydroxymethylfurfural (HMF) kan kvantificeres. Derudover har metodeudvikling indenfor differential scanning calorimetry (DSC) muliggjort påvisning af glasovergange og krystallisation i levnedsmiddelsystemer som f.eks. mælkepulver. Derved er der blevet åbnet mulighed for mere detaljerede studier af koblingen mellem Maillard-reaktioner, lipidoxidation og faseomdannelser i mælkepulver, undersøgelser det ikke tidligere har været muligt at udføre systematisk.

På denne baggrund opstilledes følgende delmål til opfyldelse af projektets overordnede formål:

- Udarbejdelse af et  $(a_w, T)$ -stabilitetsdiagram for mælkepulver til planlægning af senere lagringsforsøg med henblik på at kunne forudsige pulverets stabilitet mod krystallisation.
- Tilpasning af oximetri til mælkepulver, hvorved ændringer i koncentrationen af oxygen i pulveret følges i en lukket beholder gennem en længere periode uden at bryde emballagen.
- I bredt anlagte lagringsforsøg med mælkepulver følges lipidoxidation, Maillard-reaktioner og laktosekrystallisation samtidig.
- Baseret på samhörørende data opnået i lagringsforsøgene tilstræbes en model til beskrivelse af i hvilken grad lipidoxidation fremmer Maillard-reaktioner, i hvilken grad Maillard-reaktionsprodukter virker som antioxidanter og bremser videre lipidoxidation, samt i hvilken grad overgang fra glastilstand til krystallinsk laktose fremmer lipidoxidationen og Maillard-reaktionerne.
- Ved en bedre karakterisering af de radikaler, der findes i mælkepulver er det målet at opnå øget viden om de kemiske processer, der forløber i pulveret og forårsager kvalitetsforringelser.

Opfyldelsen af disse delmål forventes at medvirke til en bedre holdbarhedsforudsigelse af pulvere ud fra målinger umiddelbart efter tørring med henblik på procesoptimering. En beskrivelse af koblingen mellem de tre nævnte processer kunne ydermere danne baggrund for styring af aromaudvikling i pulvere til specialformål som f.eks. konfektur.

## **Metodeudvikling**

### **Isoterm kalorimetri til måling af laktosekrystallisation i mælkepulver**

Ved isoterm differential scanning calorimetry (DSC) måles varmeudvikling eller varmekonsum i irreversible processer. Som en del af projektet blev en metode til bestemmelse af mængden af amorf laktose i mælkepulver udviklet og løbende forbedret. Ved denne metode bliver pulveret i kalorimetret opvarmet med 1 °C/minut til en fastlagt temperatur, der ligger under krystallisationstemperaturen. Herefter holdes temperaturen konstant (isoterm) og der måles indtil der ikke udvikles mere varme i prøven, og al laktose således er krystalliseret. Ved at beregne arealet under kurven kan størrelsen af varmeudviklingen bestemmes. Når der ikke er mere amorf laktose tilbage i pulveret, vil der ikke udvikles varme under målingen og størrelsen af varmeudviklingen bliver nul. Metoden har været benyttet med succes i et stort lagringsforsøg.

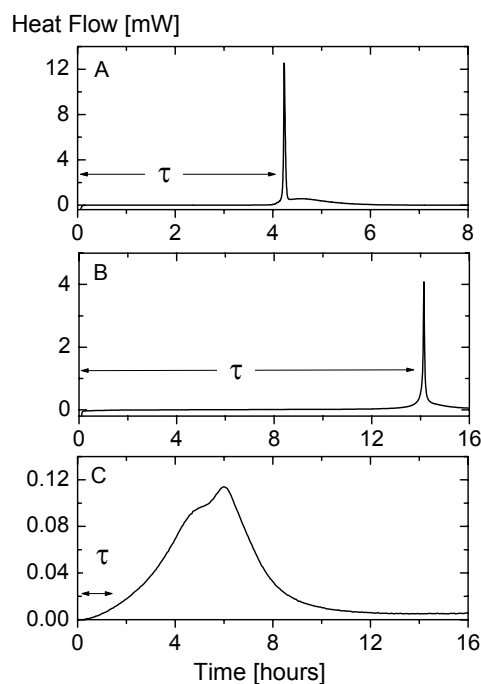
## Statisk headspace GC-metode til tørt mælkepulver og modernælkserstatning

I forbindelse med projektet blev en metode til bestemmelse af flygtige sekundære lipidoxiderationsprodukter i tørt pulver udviklet. Normalt tilsættes en vandig opløsning af en intern standard til kvantificering af udviklede flygtige stoffer direkte til prøven, men specielt modernælkserstatning viste sig at være følsomt overfor vands tilstedeværelse. Der dannedes artefakt-oxiderationsprodukter i friskt pulver ved selv meget små mængder vand tilstede sammen med pulveret. For at løse dette problem opløses den interne standard istedet for i 1,2-propandiol og tilsættes i en glasindsats over det tørre pulver i den nye metode. Derved opnås en semi-kvantitativ metode med meget lidt prøveforberedelse, der gør det muligt at følge dannelsen af flygtige sekundære oxiderationsprodukter i mælkepulver under lagring. Metoden har vist sig at være følsom og reproducerbar og har været benyttet i flere lagringsforsøg i projektet.

## Resultater

### Krystallisation af laktose

Undersøgelser af laktosekrystallisation med isotherm kalorimetri ved 65 °C viste, at krystallisationsprocessen er meget forskellig i sødmælkspulver, modernælkserstatning og ren, amorf laktose. Figur 1 viser termogrammer af de tre produkter, hvor en stigning i varmeudvikling er udtryk for at laktose krystalliserer.

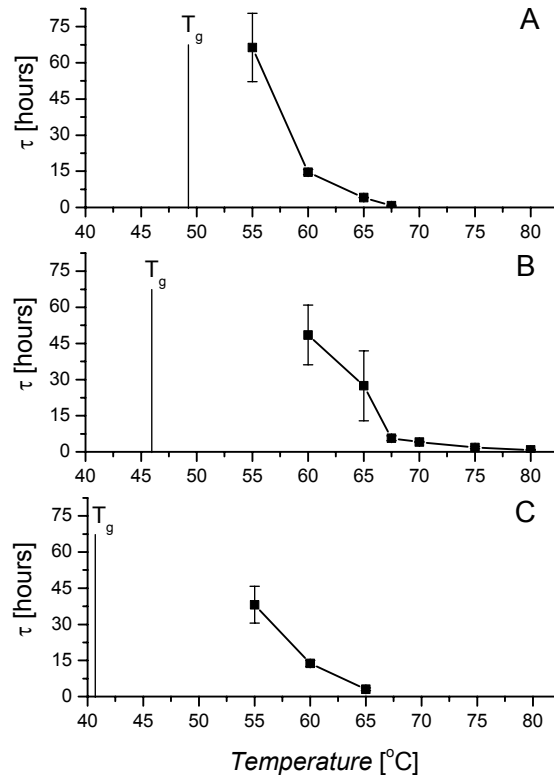


**Figur 1.** Varmeudvikling målt med isotherm kalorimetri ved 65 °C for A: amorf laktose, B: modernælkserstatning og C: sødmælkspulver. Induktionstiden,  $\tau$ , før krystallisationen starter er markeret med en pil. Fra Knudsen et al., 2002.

Det ses af figur 1, at ren amorf laktose og laktose i modernælkserstatning krystalliserer ved en slags "alt-eller-intet" proces, mens laktose i sødmælkspulver krystalliserer mere gradvist. I det samme studie blev det klart, at forskellen mellem lagringstemperaturen,  $T$ , og



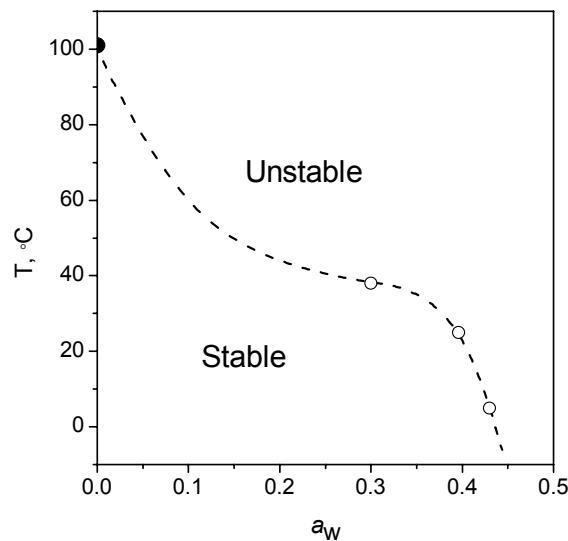
glasovergangstemperaturen,  $T_g$ , har meget stor betydning for størrelsen af induktionstiden,  $\tau$ . I figur 2 er sammenhængen mellem  $(T-T_g)$  og  $\tau$  vist for ren laktose, modernælkserstatning og sødmælkspulver.



**Figur 2.** Induktionstiden,  $\tau$ , som funktion af temperaturen for A: amorf laktose, B: modernælkserstatning og C: sødmælkspulver. Fra Knudsen et al., 2002.

Det ses af figur 2, at jo større afstand i temperatur til glasovergangstemperaturen,  $T_g$ , des hurtigere krystalliserer laktose.

Da laktose er hovedingrediensen i mælkpulver, har laktoses tilstand stor betydning for holdbarheden af pulveret. Når laktose er amorf og i glastilstand, dvs.  $T < T_g$ , vil induktionstiden til krystallisation således være meget lang. Størrelsen af  $T_g$  i pulveret afhænger af vandaktiviteten, da vand har en plasticerende effekt. Til at forudsige laktoses tilstand ved forskellige lagringsbetingelser er et  $(a_w - T)$ -tilstandsdiagram konstrueret. Dette er gjort ved at måle den stabiliserede  $T_g$  i laktose ved forskellige kombinationer af vandaktivitet og lagringstemperatur,  $T$ . For hver lagringstemperatur findes den vandaktivitet, hvor  $T$  er den samme som  $T_g$ , og dette punkt  $(a_w, T)$  afbildes som et punkt i tilstandsdiagrammet. I figur 3 er det endelige diagram vist.

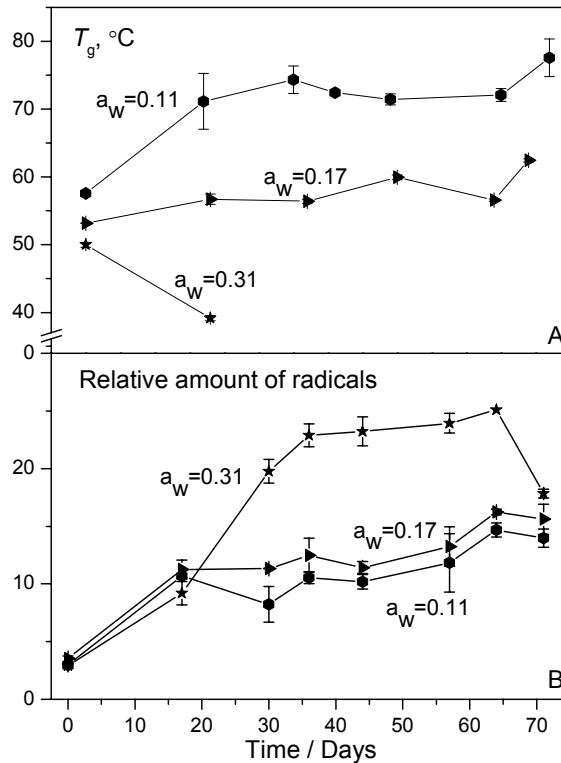


**Figur 3.** ( $a_w - T$ )-tilstandsdiagram for laktose. Den stiplede linie er en hjælpelinie tegnet for at lede øjet. Under linien er laktose amorft og i glastilstand og derfor ”stabil”, mens det over linien ikke længere er i glastilstand og således ”ustabil” og vil krystallisere indenfor en overskuelig tidsskala. Fra Thomsen et al., 2005c.

I et bachelorprojekt blev effekten af sucrosetilsætning til sødmælkspulver på stabiliteten af pulveret i forhold til krystallisation undersøgt. Det kunne konkluderes at sucrose (4% i forhold til det færdige produkt) har en stabiliserende effekt på mælkpulveret i forhold til krystallisation, da induktionsperioden inden krystallisation udtrykt ved induktionstiden,  $\tau$ , var markant længere i pulver tilsat sucrose i forhold til almindeligt sødmælkspulver.

En af de formodede effekter af laktosekrystallisation i mælkpulver er, at pulveret klumper. På baggrund af en reklamation over klumpning i modernælkserstatning eksporteret til Malaysia blev et specialeprojekt gennemført på KVL i samarbejde med Arla Foods ARINCO. I projektet skulle det undersøges hvilke parametre, der har betydning for klumpning i modernælkserstatning. På baggrund af resultaterne i dette projekt kunne det konstateres, at under lagring i intakte dåser ved temperaturer over  $T_g$  (60 °C) klumpede pulveret efter kun en uges lagring, mens laktose først krystalliserede efter ca. 4 uger. Ved temperaturer under  $T_g$  (45 °C) blev der observeret klumpning indenfor 7 uger, men ingen krystallisation i samme periode. Ved lagring ved 25 °C blev der ikke observeret hverken klumpning eller krystallisation indenfor de 7 ugers lagring. Som forklaring på disse observationer blev det foreslået at to faktorer har betydning for klumpning før laktose krystalliserer, nemlig at frit fedt i pulveret fungerer som ”bindemiddel” mellem pulverpartiklerne. Ved temperaturer fra 45 °C og derover er fedtet over sit smeltepunkt og derfor mere flydende. Den anden forklaring kunne være, at laktose ved temperaturer over  $T_g$  bliver mere ”flydende” og således fremmer klumpning i pulveret. I det samme projekt blev sammenhængen mellem klumpning og oxidation undersøgt, men der kunne ikke umiddelbart påvises nogen sammenhæng mellem klumpning, lagringstemperatur og oxidation i modernælkserstatning.

Sammenhængen mellem krystallisation og lipidoxydation i modernælkserstatning er også undersøgt i et mindre lagringsforsøg. Modernælkserstatning ( $a_w = 0,23$ ;  $T_g = 53$  °C) blev lagret ved 40 °C ved vandaktiviteterne 0,11, 0,23 og 0,31 i 72 dage. Resultaterne viste, at vandaktiviteten har stor betydning for holdbarheden af pulveret, idet der i pulver lagret ved  $a_w = 0,31$  efter 17 dage ikke kunne detekteres nogen  $T_g$ , hvilket indikerede at laktose var krystalliseret. Samtidig blev en kraftig stigning i mængden af radikaler i pulveret observeret, hvilket er vist i figur 4.

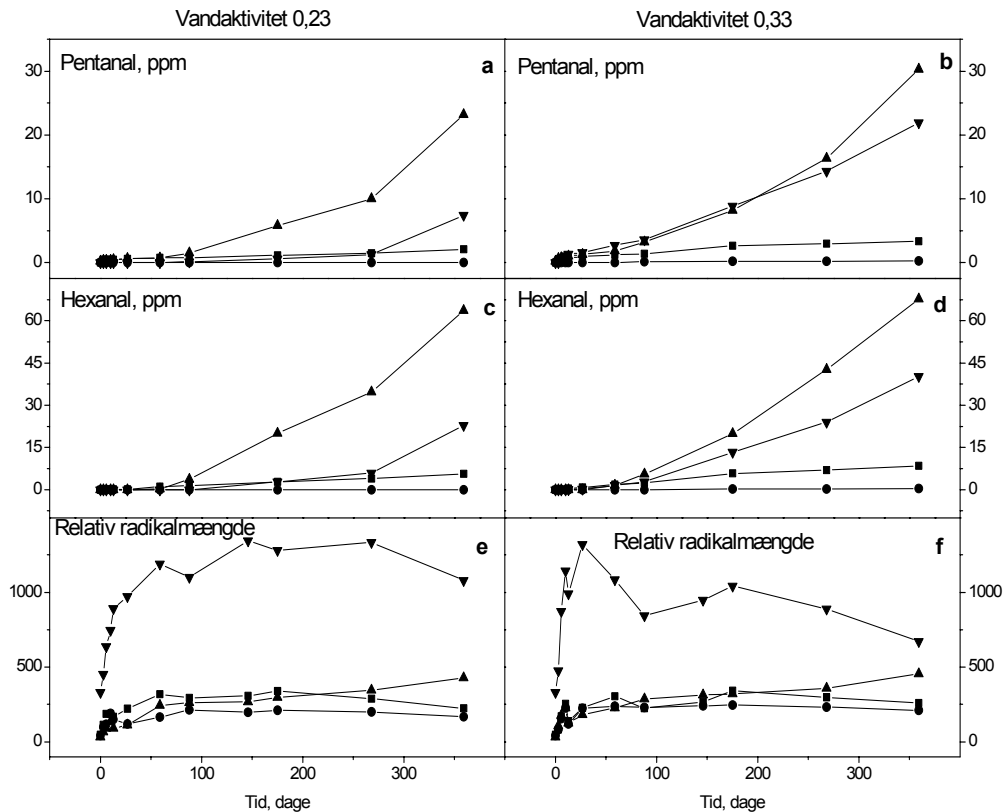


**Figur 4.** Sammenhæng mellem glasovergangstemperaturen,  $T_g$ , og dannelsen af radikaler i modernælkserstatningspulver lagret ved 40 °C og varierende vandaktivitet. A.  $T_g$  målt med DSC og B. Mængden af radikaler målt med ESR. Modificeret fra Thomsen et al., 2003.

På baggrund af disse resultater blev det konkluderet, at der forekommer en betydelig vekselvirkning i modernælkserstatning mellem laktosekrystallisation og lipidoxydation, som øges og kan måles som en markant stigning i dannelsen af radikaler.

## Lipidoxidation

Lipidoxidation i mælkepulver medfører afsmag grundet dannelse af sekundære oxidationsprodukter. Der er tidligere fundet en sammenhæng mellem fremkomst af radikaler i sødmælkspulver målt med ESR spektroskopi og dårlig smag af det rekonstituerede produkt (Stapelfeldt et al, 1997). Et længerevarende lagringsforsøg blev gennemført med henblik på at klarlægge lipidoxidation i forskellige pulvertyper ved lav vandaktivitet og stuetemperatur. Ved dette forsøg blev dannelse af radikaler og flygtige sekundære oxidationsprodukter fulgt med hhv. ESR spektroskopi og statisk headspace GC. Resultaterne ses i figur 5.



**Figur 5.** Dannelse af radikaler og sekundære oxidationsprodukter i forskellige mælkepulvertyper under lagring ved stuetemperatur og vandaktivitet 0,23 eller 0,33. ■ kærnemælkspulver; ● skummetmælkspulver; ▲ sødmælkspulver; ▼ Dano, modernmælkserstatning.

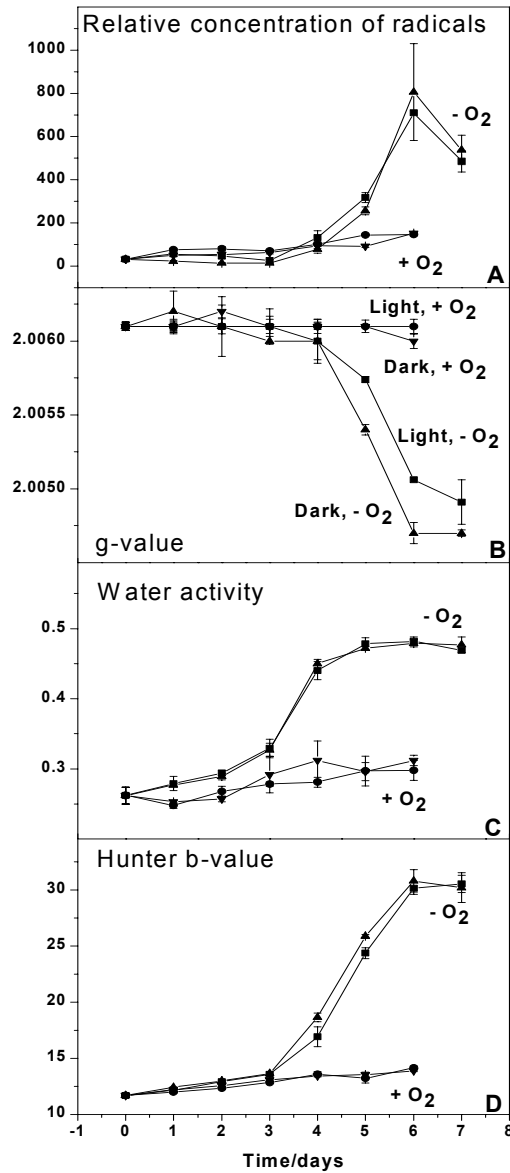
De opnåede resultater bekræftede den tidligere observerede sammenhæng mellem radikaldannelse og lipidoxidation i sødmælkspulver, da en stigning i radikalmængden korrelerede med en markant stigning i koncentrationen af pentanal og hexanal. Til gengæld viste resultaterne, at koblingen mellem radikaldannelse og lipidoxidation ikke er helt så ligetil i andre pulvertyper. Mængden af radikaler dannet i skummetmælks- og kærnemælkspulver gennem lagringsperioden svarede stort set til mængden i sødmælkspulver, men en tilsvarende høj koncentration af pentanal og hexanal blev ikke observeret. Der blev observeret store mængder radikaler i modernmælkserstatning, men ikke en tilsvarende høj koncentration af sekundære flygtige oxidationsprodukter. Det kan på den baggrund konkluderes, at headspace GC metoden giver de mest præcise resultater med hensyn til lipidoxidation i mælkepulver i forhold til ESR metoden.

## **Maillard-reaktioner**

Med henblik på at opnå et bedre teoretisk, men også praktisk kendskab til Maillard-reaktioner i mælkepulver blev et specialeprojekt omkring Maillard-reaktioner i rollertørret mælkepulver gennemført på KVL i samarbejde med Arla Foods Innovationscenter Nr. Vium. Rollertørret mælkepulver fremstilles ved en mindre skånsom proces end spraytørring, og produktet får en ”opvarmet” (”kakao”) smag, som gør det anvendeligt i konfekturer. I forbindelse med dette specialeprojekt blev et større lagringsforsøg gennemført, hvor rollertørret mælkepulver varierende i pH og tilsætning af sucrose blev lagret i 77 dage ved 45 °C. Ved forsøget blev forskellige analytiske metoders anvendelighed til bestemmelse af indikatorer for Maillard-reaktioner samtidig testet. Undersøgelserne viste, at pulveret blev lysere under lagring, hvilket blev tolket som en blegning af de mørkebrune slutprodukter (melanoidinerne) i forbindelse med at disse fungerer som ”selvopofrende” antioxidanter, da mængden af radikaler i pulveret samtidig faldt gennem hele forsøget.

## Laktosekrystallisation, lipidoxidation og Maillard-reaktioner i mælkepulver

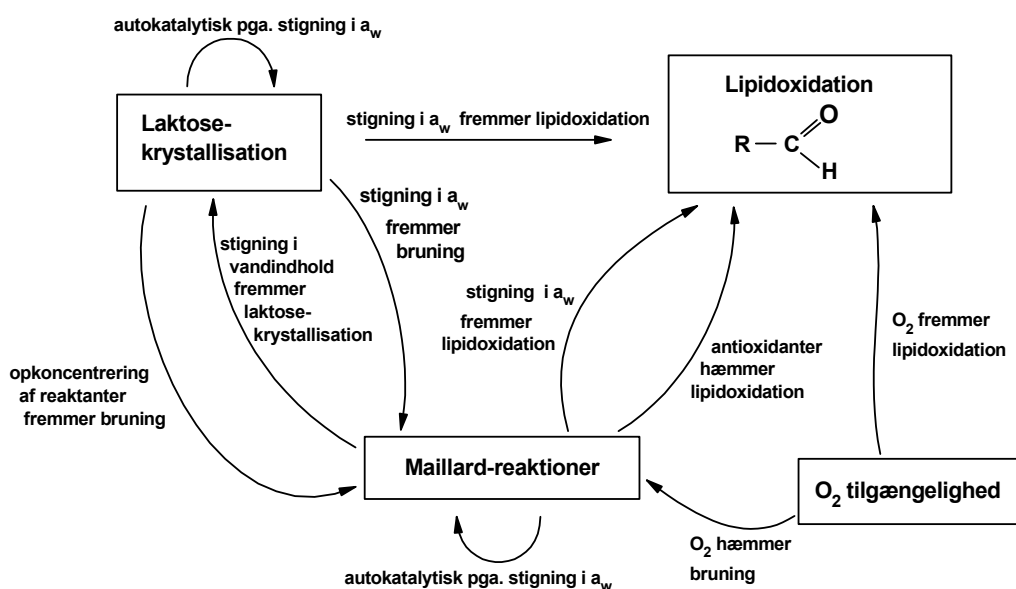
Sammenhængen mellem lipidoxidation, Maillard-reaktioner og laktosekrystallisation i sødmælkspulver blev først undersøgt i to lagringsforsøg, hvor det første mindre forsøg fik karakter af et forforsøg for det større anlagte afsluttende lagringsforsøg. Her blev sødmælkspulver lagret i forseglede beholdere ved 60 °C med eller uden tilstedeværelse af oxygen, samt med eller uden beskyttelse mod lys. I figur 6 er resultaterne fra dette forsøg vist.



**Figur 6.** Udviklingen i radikaldannelse (A), ændringer i g-værdien for radikaler (B), stigning i vandaktivitet (C) og brunfarvning (D) i sødmælkspulver lagret ved 60 °C med eller uden oxygen, samt med eller uden beskyttelse mod lys: ▲ mørke og fravær af oxygen; ■ lys og fravær af oxygen; ▼ mørke ved tilstedeværelse af oxygen; ● lys ved tilstedeværelse af oxygen. Fra Thomsen et al, 2005a.

Resultaterne viste en stærk kobling mellem de tre reaktionstyper i sødmælkspulver, og at krystallisation af laktose medfører en kraftig brunfarvning (fig. 6 C og D). Tilstedeværelsen af oxygen viste sig at have stor betydning for krystallisering og brunfarvning af pulveret, da disse fænomener kun blev observeret i prøver uden oxygen tilstede indenfor lagringsperioden i dette forsøg. Dette er observeret i andre studier og kan muligvis forklares med at oxygen kan oxidere tidlige Maillard reaktionsprodukter og derved hindre dem i at reagere videre i Maillard reaktionerne. Derudover viste resultaterne, at der findes mindst to slags radikaler i mælkpulver, der adskiller sig i  $g$ -værdi og liniebredde. Det ene blev tilegnet lipidoxidation, da det viste sig at være følsomt overfor oxygen og observeredes i ”hvidt” pulver, mens det andet blev tilegnet sene Maillard-reaktionsprodukter (melanoidiner), da det observeredes i ”brunt” pulver og dets fremkomst var uafhængig af tilstedeværelsen af oxygen (Thomsen et al., 2005a).

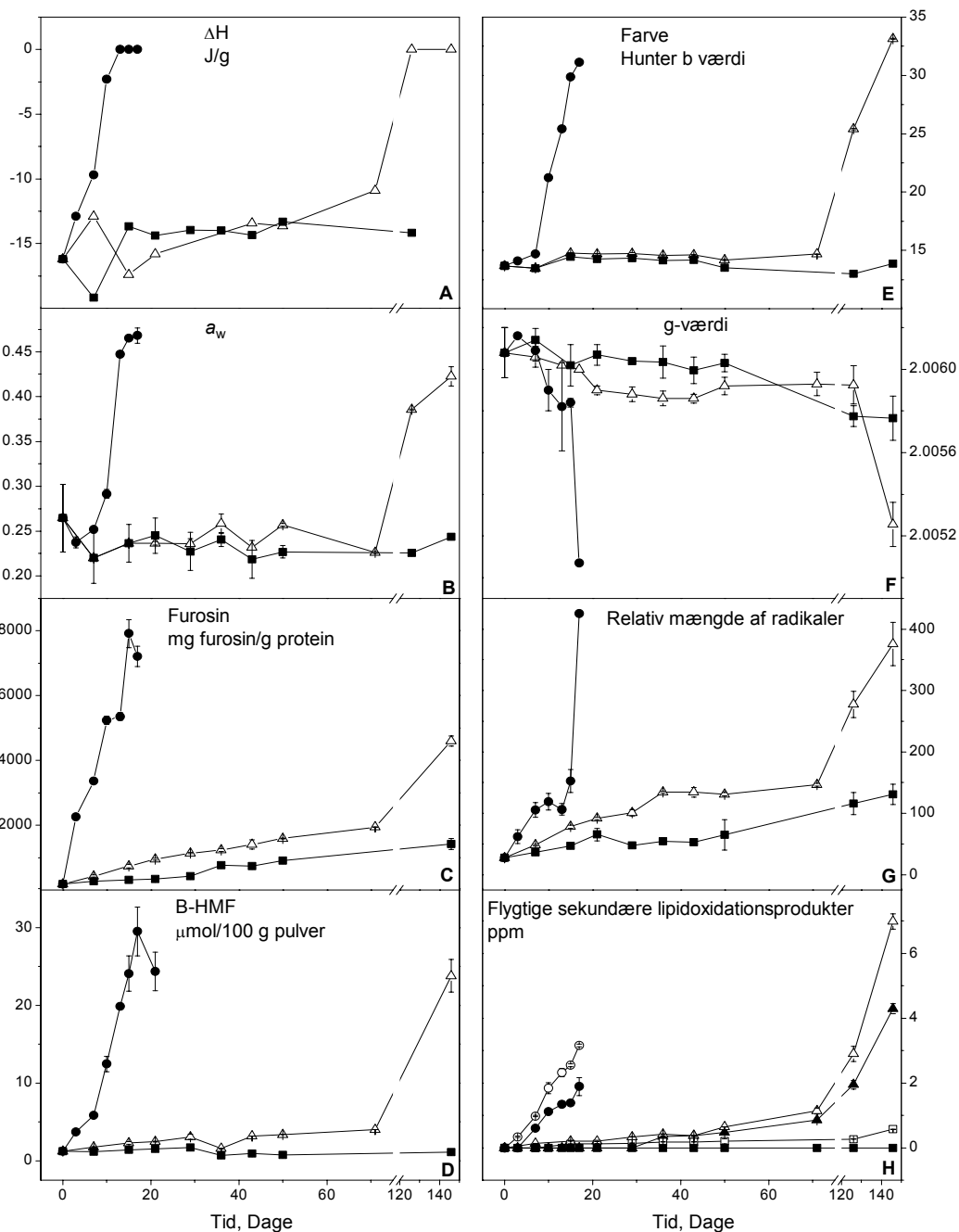
På baggrund af resultaterne i dette forsøg sammenholdt med resultater fra litteraturen kunne vekselvirkningerne i mælkpulver opsummeres og illustreres som vist i figur 7.



**Figur 7.** Vekselvirkninger mellem nedbrydende reaktioner i sødmælkspulver. Modificeret fra Thomsen et al. 2005a.

For at undersøge koblingen mellem laktosekrystallisation, lipidoxidation og Maillard-reaktionerne nærmere og samtidig belyse effekten af lagringstemperaturen i forhold til glasovergangstemperaturen blev et stort anlagt lagringsforsøg gennemført. I dette forsøg blev sødmælkspulver lagret ved tre temperaturer, 37 °C, 45 °C og 55 °C, tæt på glasovergangstemperaturen ( $T_g = 48$  °C) i forseglede beholdere. Ved forsøget blev krystallisation af laktose målt dels ved isotherm kalorimetri, som beskrevet under metodeudvikling, og dels ved at måle ændringer i vandaktiviteten. Da forsøget foregik i lukkede beholdere var en stigning i vandaktiviteten en indikation på laktosekrystallisation, når vandindholdet samtidig forblev konstant. Udvikling i Maillard-reaktionerne blev målt ved at følge to tidlige Maillard-reaktionsprodukter, hydroxymethylfurfural (HMF) og furosin, samt ved at måle farvedannelsen i pulveret.

Lipidoxidationen blev fulgt med ESR til måling af radikaler og statisk headspace-GC til måling af de sekundære oxidationsprodukter pentanal og 2-heptanon. Resultaterne er vist i figur 8.

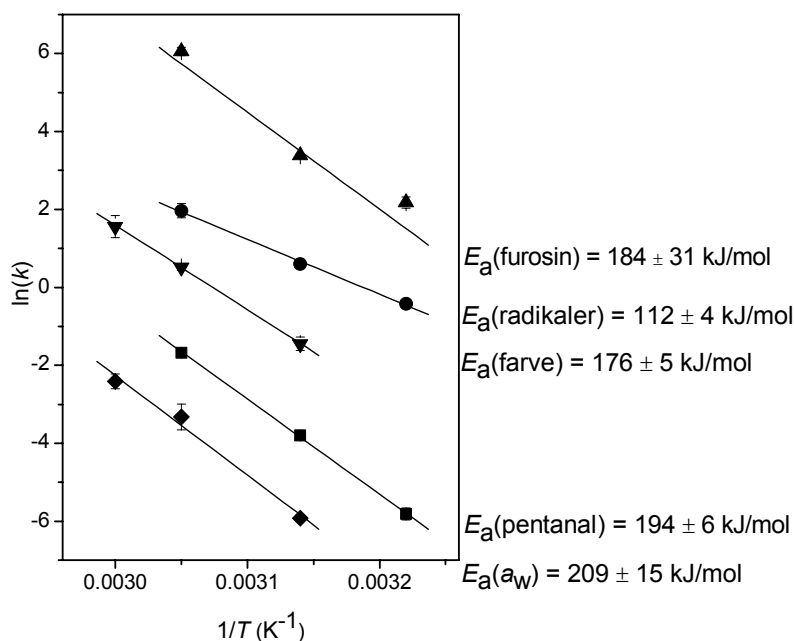


**Figur 8.** Udviklingen i laktosekrystallisation,  $\Delta H$ , (A), stigning i vandaktivitet (B), dannelse af furosin (C), dannelse af bundet HMF (D), brunfarvning (E), ændringer i g-værdien (F), dannelse af radikaler (G) og dannelse af flygtige oxidationsprodukter (pentanal: åbne symboler og 2-heptanon: lukkede symboler) (H) i sødmælkspulver lagret ved 37 °C (■), 45 °C (Δ) og 55 °C (●) op til 146 dage. Modificeret fra Thomsen et al., 2005b.



Der kan drages flere bemærkelsesværdige konklusioner fra dette forsøg. Det fremgår af figur 8, at ved 55 °C ( $T-T_g > 0$ ) sker der dramatiske ændringer i pulveret i løbet af 20 dage. Efter 10 dages lagring er al laktose krystalliseret ( $\Delta H = 0$ ,  $a_w$  fordoblet), hvilket korrelerer med et fald i  $g$ -værdien som indikation på dannelsen af ”brune” radikaler og samtidig øges brunfarvningen voldsomt (Hunter  $b$ -værdien fordobles). Der er således en tæt vekselvirkning mellem laktosekrystallisation og de sene Maillard-reaktioner, mens lipidoxidationen ser ud til at forløbe relativt upåvirket. Således ses en lineær stigning i dannelsen af pentanal og 2-heptanon uden antydning af, at hastigheden ændres som følge af laktosekrystallisation (figur 8 H). Et tilsvarende mønster observeres ved 45 °C ( $T-T_g \sim 0$ ), men med en meget længere tidsskala. Således er laktose først fuldstændig krystalliseret ( $\Delta H = 0$ ) efter 71 dages lagring ved denne temperatur. Dette er som ved 55 °C korreleret med de sene Maillard-reaktioner. Også ved denne temperatur ser lipidoxidationen ud til at forløbe uafhængigt af de andre reaktioner i mælkepulveret. Ved 37 °C ( $T-T_g < 0$ ) ses ingen laktosekrystallisation og heller ingen udvikling af sene Maillard-reaktioner. Ved denne temperatur ses dog en stigning i dannelsen af radikaler og furosin, hvilket indikerer, at reaktioner forløber i mælkepulveret på trods af, at laktose er i glastilstand.

Det fremgår af resultaterne vist i figur 8, at der er en kraftig temperaturafhængighed af reaktionerne i mælkepulver. For en del af parametrene har det været muligt at beregne aktiveringsenergi og resultatet heraf kan ses i figur 9.



**Figur 9.** Aktiveringsenergi beregnet ud fra den relative hastighed for dannelse af radikaler (”hvide”) (●) svarende til 0’te-ordens kinetik, hastighed for dannelse af furosin (▲) svarende til 0’te ordens kinetik, hastighed af pentanaldannelse (■) svarende til 0’te ordens kinetik, brunfarvning (▼) svarende til en lineær stigning i Hunter  $b$ -værdien efter en nølefase og hastighed af den lineære stigning i vandaktivitet (◆) efter en nølefase. Modificeret fra Thomsen et al., 2005b.

Aktiveringsenergi omkring 200 kJ/mol svarer til en  $Q_{10}$  på  $\sim 11$ . Baseret på disse resultater ville krystallisation ved 37 °C således være forventet efter ca. 900 dage.

På baggrund af resultaterne fra dette store lagringsforsøg kan det konkluderes, at glasovergangstemperaturen har stor betydning for langtidsholdbarheden, da lagring ved temperaturer under 10 °C over  $T_g$  medfører drastiske forringelser i kvaliteten af pulveret.  $T_g$  er afhængig af vandaktiviteten i pulveret og falder med stigende vandindhold i pulveret, da vand har plasticiserende effekt. Vandindholdet i pulveret efter endt tørring har således meget stor betydning for langtidsholdbarheden af mælkepulver, da et højere vandindhold vil medføre en lavere  $T_g$ .

## **Konklusion**

Ud fra de resultater, der er opnået i løbet af projektet kan følgende konklusioner drages:

- $(a_w - T)$ -tilstandsdiagram kan bruges til at forudsige laktoses fysiske tilstand ved givne lagringsbetingelser. Dette kan få stor praktisk betydning, da laktoses fysiske tilstand har vist sig at være meget væsentlig i forhold til langtidsholdbarheden af mælkepulver.
- Forskellen mellem lagringstemperaturen og glasovergangstemperaturen,  $(T - T_g)$ , har stor betydning for hvor længe det tager, før amorf laktose krystalliserer i mælkepulver.
- Laktose krystalliserer ved en "alt-eller-intet" proces i amorf laktose og modermælks-erstatning, mens processen er gradvis i sødmælkspulver.
- Tilsætning af sucrose til mælkepulver kan udsætte krystallisation af laktose markant.
- Der er stærk temperaturafhængighed for reaktioner i mælkepulver ( $Q_{10} \sim 11$ ).
- Laktosekrystallisation og de sene Maillard-reaktioner er tæt forbundne i mælkepulver, hvilket er en konsekvens af ændringer i vandaktiviteten som følge af begge reaktioner (se fig. 7).
- Lipidoxidation foregår uafhængigt af de andre reaktioner i mælkepulver.
- Glasovergangstemperaturen,  $T_g$ , kan ikke betragtes som en absolut tærskel for langtidsholdbarheden af mælkepulver, da furosin, lipidoxideringsradikaler og sekundære oxidationsprodukter dannes ved temperaturer under  $T_g$ .
- Mindst to typer af radikaler dannes i mælkepulver.

## **Liste over publikationer og offentliggørelser**

### **Artikler i internationale tidsskrifter**

Knudsen, J. C.; Antanuse, H.; Risbo, J.; Skibsted, L. H. (2002) Induction time and kinetics of crystallisation of amorphous lactose, infant formula and whole milk powder as studied by isothermal differential scanning calorimetry. *Milchwissenschaft* **57**(9/10), 543-546.

Thomsen, M. K.; Knudsen, J. C.; Risbo, J.; Skibsted, L. H. (2003) Effect of lactose crystallisation on the oxidative stability of infant formula. *Milchwissenschaft* **58**(7/8), 406-409.

Thomsen, M. K.; Lauridsen, L.; Skibsted, L. H.; Risbo, J. (2005a) Two types of radicals in whole milk powder. Effect of lactose crystallization, lipid oxidation and browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* **53**(5), 1805-1811

Thomsen, M. K.; Lauridsen, L.; Skibsted, L. H.; Risbo, J. (2005b) Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions and lipid oxidation in whole milk powder. Indsendt til *J. Agric. Food Chem.*

Thomsen, M. K.; Jespersen, L.; Sjøstrøm, K.; Risbo, J.; Skibsted, L. H. (2005c) Water activity – temperature state diagram of amorphous lactose. Indsendt til *J. Agric. Food Chem.*

Thomsen, M. K.; Sjøstrøm, K.; Jørgensen, S. S.; Risbo, J. Development of static Headspace-GC method for dry foods. (arbejdstitel) Manuskript under udarbejdelse.

Thomsen, M. K.; Reimer, S.; Risbo, J.; Skibsted, L. H. Effect of sucrose addition to milk powder on lactose crystallization. Manuskript under udarbejdelse til *Milchwissenschaft*.

### **Indlæg ved faglige kongresser, symposier o.l., samt mødeindlæg**

Leif Skibsted har ved flere lejligheder præsenteret resultater fra projektet som del af foredrag om lipidoxidation på faglige kongresser herhjemme og i udlandet.

### **Faglige artikler**

Lauridsen, L.; Thomsen, M. K.; Skibsted, L. H. (2003) Forudsigelse af holdbarhed, aromaudvikling og funktionalitetsændringer i mælkepulver. *Mælkeritidende*, **4**, 96-99.

Thomsen, M. K.; Risbo, J.; Skibsted, L. H. (2005) Laktosekrystallisation, Maillard-reaktioner og lipidoxidation i mælkepulver. Manuskript under udarbejdelse til *Mælkeritidende*.

### **Andre referencer**

Stapelfeldt, H.; Nielsen, B.R.; Skibsted, L.H. (1997) Towards use of electron spin resonance spectrometry in quality control of milk powder. Correlation between sensory score of instant whole milk powders and concentration of free radicals and 2-thiobarbituric acid reactive substances. *Milchwissenschaft* **52**(12), 682-685.

## **Forskeruddannelse**

Lactose crystallization, Maillard reactions and lipid oxidation in milk powder. Ph.d afhandling udarbejdet af Marianne Kaaber Thomsen. Afleveret 18.02.05. Forsvaret 07.04.05.

Fysisk stabilitet i sødmælkspulver tilsat sucrose. Bachelorprojekt udarbejdet af Steen Reimer (2003).

Oxidative ændringer i mælkepulver. 15 ETCS-point opgave udarbejdet af Charlotte Strand Frederiksen (2002).

Undersøgelse af Maillard-reaktioner i rollertørret mælkepulver ved anvendelse af kemiske og spektrale analyser. Specialeprojekt udarbejdet af Bente B. Østergaard (2002).

Clumping and oxidative stability of infant formula. Specialeprojekt udarbejdet af Karen Bülow-Olsen (2002).

## **Samarbejdsrelationer (*nationalt og internationalt*)**

Specialeprojektet omkring klumpning af modernælkserstatning blev gennemført i samarbejde med Arla Foods ARINCO.

Specialeprojektet omkring Maillard-reaktion i rollertørret mælkepulver blev gennemført i samarbejde med Arla Foods Danmark Protein.

Bachelorprojektet omkring sødmælkspulver tilsat sucrose blev gennemført i samarbejde med Arla Foods AKAFKA.

Samtlige lagringsforsøg i projektet er gennemført med mælkepulver og modernælkserstatning doneret af Arla Foods ARINCO.

