

Afslutningsrapport

Early events ved oxidation af mælk – Forbedring af holdbarheden af mælkeprodukter specielt med henblik på økologisk mælkeproduktion

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-50

Marts 2003



mejeriforeningen

danish dairy board

Slutrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet:

”Early events ved oxidation af mælk: Forbedring af holdbarheden af mælkeprodukter specielt med henblik på økologisk mælkeproduktion”

Projektperiode: 1. april 1999 til 31. august 2002

Projektdeltagere:

Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole
&
Danmarks JordbrugsForskning

Projektleder: Professor Leif H. Skibsted
Deltagende seniorforsker: Forskningsleder Jacob Holm Nielsen
Forskningslektor Dorthe Kristensen
Seniorforsker Henrik Østdal

Rapport udarbejdet af faglig sekretær:
Rikke V. Hedegaard

MARTS 2003

SAMMENDRAG

Målet med projektet var at klarlægge betydningen af tilstedeværelse af og balance mellem pro- og antioxidanter i den rå mælk på holdbarheden af forarbejdede mejeriprodukter, specielt med henblik på økologisk mælkeproduktion. Den opnåede viden om tidlig oxidation i mælk skulle give grundlaget for anvisninger om, hvorledes råmælk kan produceres og lagres, specielt økologisk mælk, for at mindske følsomheden over for oxidation, og ad den vej minimere oxidative ændringer i forarbejdede produkter med smagsfejl og næringstab til følge.

Urinsyre blev fundet at være vigtigere end ascorbinsyre som antioxidant i mælks serumfase, og det synes at være i denne fase, lipidoxidationen bliver initieret. Urinsyre blev således fundet at være effektiv som antioxidant i forbindelsen med lysinduceret oxidation i mælk. Den mikrobiologiske aktivitet i vommen påvirkede indholdet af urinsyre i mælken og dermed den antioxidative kapacitet af mælken. Mængden af urinsyre kan derfor ligesom mælkens fedtsyrefordeling ændres gennem koens fodring.

Tab af ascorbinsyre blev vist at være markør for tidlig oxidation i mælk, da ascorbinsyre nedbrydes ved en række oxidative reaktionsmekanismer, og nedbrydningen giver derfor et samlet udtryk for den generelle oxidative belastning af mælk. Enzymet xanthin oxidase initierer oxidation i mælk ved dannelse af superoxid-radikalet under omdannelsen af xanthin til urinsyre, hvilket blandt andet blev påvist ved nedbrydning af ascorbinsyre i forbindelse med denne oxygenaktivering.

Anvendelse af ESR-spektroskopi (elektron spin resonans) gjorde det muligt at påvise og kvantificere dannelsen af radikaler i mælk og mejeriprodukter. Med en nyudviklet metode kunne der registreres ændringer på et meget tidligere stadium af oxidationsforløbet, end det tidligere har været muligt. Den udviklede metode til måling på mejeriprodukter anvender spinfangning med N-t-butyl- α -phenylnitron (PBN), hvorved de reaktive radikaler stabiliseres forud for måling. Metoden gjorde det muligt at skelne mellem den oxidative stabilitet af mælk pasteuriseret ved forskellige temperaturer, hvorimod der ikke kunne skelnes mellem homogeniseret og uhomogeniseret mælks oxidationsfølsomhed.

I forbindelse med projektet blev en ny og følsom HPLC-metode til kvantificering af lipidhydroperoxider i mælk udviklet. Metoden kræver kun en lille prøvemængde, og der kan måles meget små forskelle i udviklingen af lipidhydroperoxider. Metoden har høj reproducérbarhed, og må i dag betragtes som værende den mest følsomme analytiske metode til at beskrive lipidoxidation i mælk.

Et større indhold af umættede fedtsyrer i mælk blev vist at medføre, at mælken er mere oxidativ ustabil. Ved fremstilling af "gammeldags" kærnemælk af en mælkeråvare med flere umættede fedtsyrer blev kærnemælken således oxidativ ustabil. Lipidoxidation blev vist at blive initieret i serumfasen gennem dannelse af radikaler, hvorefter effekten af radikaldannelsen efterfølgende

kunne påvirkes i fedtfasen, hvor fedtsyresammensætningen var vigtig for omfanget af dannelse af både primære og sekundære oxidationsprodukter.

Det vil være af største vigtighed for økologisk mælkeproduktion at kunne forudsige mælkens oxidative stabilitet. Det bedste bud på sådan forudsigelse synes i dag at være mælkens tendens til at danne radikaler og mælkens indhold af urinsyre. Det er derfor muligt at ændre mælkens oxidative stabilitet ved at ændre sammensætningen af foderet.

RESUMÉ

Early events in oxidation of milk: Improvement of storage stability of dairy products with focus on organic milk production.

Final report from a collaborative project between the Danish Dairy Board, The Royal Veterinary and Agricultural University and Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Center Foulum (1.4.1999 to 31.8.2002).

Uric acid was found to be more important than ascorbic acid as a serum phase antioxidant in milk for both thermal and light induced oxidation. The level of uric acid depends on the feeding regime used for the cow and may thus be controlled. As part of the project, an ESR-based method using spin trapping for quantification of the tendency of radical formation in milk was developed. This method was together with measurements of the level of uric acid concluded to provide an early indication of the oxidative stability of the milk and may be used for prediction of oxidative stability. For the detection of oxidation in milk, a new sensitive method for quantification of lipid hydroperoxides was developed. This method was concluded to be the most sensitive method available for detection of lipid oxidation in milk. The effect of the feeding regime on the oxidative stability of a processed dairy product was studied in traditionally produced buttermilk. Oxidation was initiated in the serum phase as shown by ESR-spectroscopy, but the product with a more unsaturated lipid profile was more vulnerable to oxidation.

Indholdsfortegnelse	Side
Sammendrag	1
Resume	2
Baggrund	4
Formål	5
Metodeudvikling	6
Anvendelse af ESR-spektroskopi i forbindelse med mejeriprodukter	6
Ny og følsom metode til kvantificering af lipidhydroperoxider	8
Antioxidanter i mælkelignende modelsystemer	8
Resultater	9
Xanthin oxidase	9
Markører for oxidativt stress i mælk	9
<i>Urinsyre i forbindelse med oxidativt stress i mælk</i>	9
<i>Ascorbinsyre i forbindelse med oxidativt stress i mælk</i>	11
Overgangsmetalioner	12
Fedtsyresammensætningens betydning for oxidation	13
Procesteknologisk forsøg med kærnemælk	16
Konklusion	18
Liste over publikationer og offentliggørelser	19
Artikler i internationale tidsskrifter	19
Indlæg ved faglige kongresser, symposier o. l. samt mødeindlæg	20
Faglige artikler	21
Samarbejdsrelationer (nationalt og internationalt)	21
Andre referencer	21

BAGGRUND

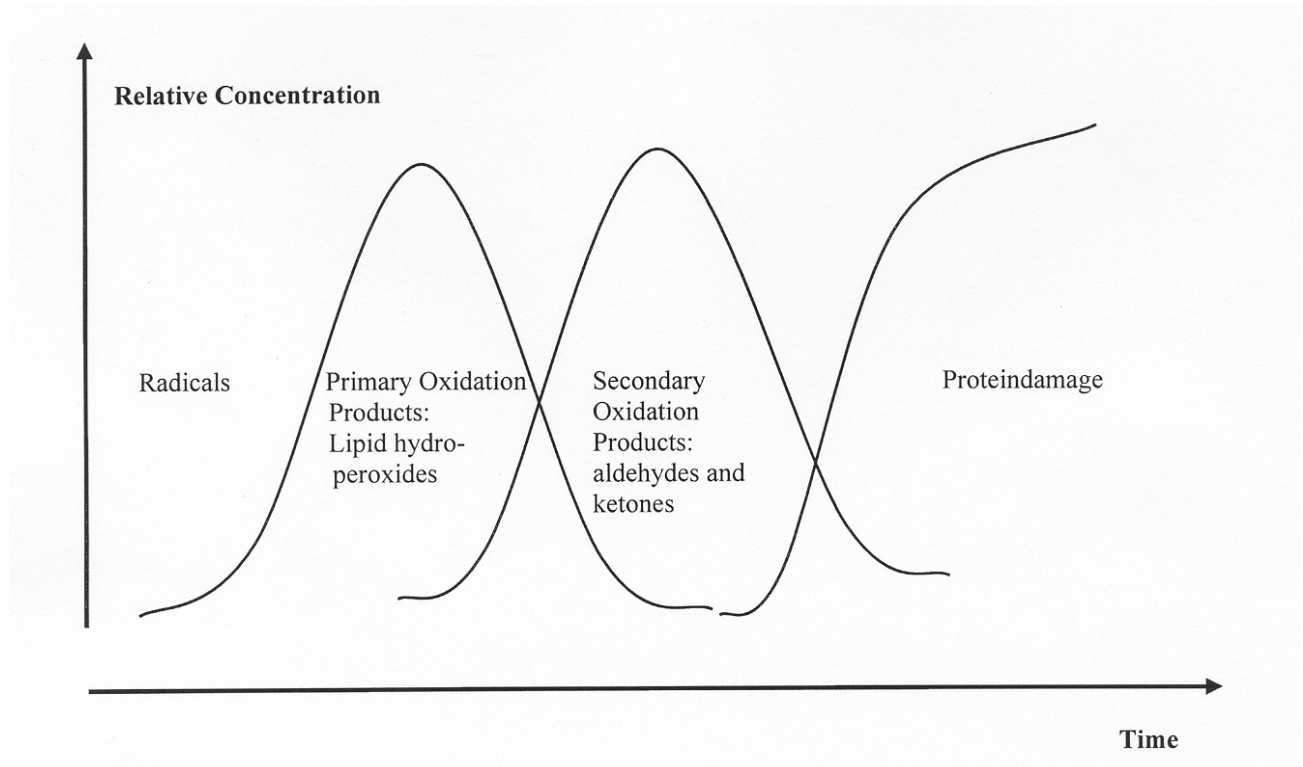
Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet på KVL og Afdeling for Råvarekvalitet på DJF har i perioden fra april 1999 til august 2002 gennemført et projekt finansieret af det statslige FØTEK-forskningsprogram og Mejeribrugets ForskningsFond med det formål at undersøge, hvorledes tidlig oxidation i mælk påvirker den oxidative stabilitet af mejeriprodukter.

I en række mejeriprodukter foregår oxidation under forarbejdningsprocessen og lagringen, som medfører forringet aroma og næringsværdi. Oxidationsprocesserne starter allerede i den rå mælk, hvor de kan være mere eller mindre fremtrædende. Det er ikke klarlagt, hvordan oxidationen initieres, eller hvorfor den varierer mellem forskellige besætninger, og den betegnes som ”spontan oxidation”. Spontan oxidation er et voksende problem med en stigende produktion af økologiske mejeriprodukter. I økologisk mejeribrug homogeniseres mælken ikke, og dette synes at fremme den spontane oxidation. En øget mælkeproduktivitet hos køen bidrager også til spontan oxidation i mælk, da mælken fra højt ydende køer generelt er mindre oxidativt stabil.

Oxidation i konsummælk har tidligere været et problem relateret til lysgennemtrængelig emballage, der medførte forringet smag i form af en karakteristiske ”brændte fjer” off-flavour, og som skyldes lysinduceret oxidation af svovlholdige aminosyrer. Oxidation af mælkens lipid medfører en såkaldt ”pap-agtig” smag af sekundære lipidoxydationsprodukter såsom hexanal. Homogenisering af mælken og anvendelse af lystæt emballage har sidenhen nedbragt disse oxidative ændringer. Problematikken er dog blevet aktuel igen med ønsket om at mindske emballageforbruget og en tendens til at øge lysintensiteten i detailhandlen i visse lande. En stadig stigende produktion af økologisk mælk, der ikke homogeniseres, og økologiske mælkeprodukter, der pasteuriseres ved en lidt lavere temperatur end konventionelle mælkeprodukter, bidrager ligeledes til øget oxidation i disse mejeriprodukter.

En beskrivelse af oxidative mekanismer i specifikke lipidfraktioner og proteiner i mælken kan bidrage til forståelse af, hvilke faktorer der influerer på tidlige oxidationsprocesser, og være med til at belyse, hvordan oxidationen initieres. Mange faktorer skønnes at indvirke på mælks tendens til at oxidere, herunder mælkens indhold af umættede fedtsyrer, som især findes i phospholipiderne. Høj grad af umættethed fremmer den termiske oxidation af lipidfraktionen, den såkaldte autooxidation. Redox-aktive metal-ioner katalyserer dannelse af radikaler fra lipidhydroperoxider, mens singlet oxygen, der især dannes fotokemisk, menes at være involveret i dannelsen af de første hydroperoxider. Derudover er enzymatiske processer også medvirkende i initieringen af oxidationsprocesserne. En bedre forståelse af, hvordan oxidationsprocesserne initieres og af deres videre forløb, kan opnås ved at kvantisere dannelsen af radikaler, samt følge omsætningen af antioxidanter. Radikaler dannes ved hydroperoxidernes spaltning, men er også mellemprodukter i visse enzymatiske processer, hvor hydroperoxiderne dannes. I det tidlige stadium af oxidationsforløbet er mælkens antioxidanter i stand til at forhindre akkumulering af primære og sekundære oxidationsprodukter. Denne fase kaldes nølefasen (se Figur 1). I takt med at antioxidanterne forbruges ved radikalprocesser, forekommer der en akkumulering af de primære

oxidationsprodukter, hydroperoxiderne. Lipidhydroperoxiderne kan spaltes under dannelse af sekundære oxidationsprodukter, som er carbonyler, der giver smagsfejl. "Early events", de tidlige begivenheder, er i oxidationsøjemed en samlet betegnelse for de processer, der i mælk betinger initiering af oxidationsprocesserne, og derved et forbrug af antioxidanter samt akkumulering af primære oxidationsprodukter og herunder dannelsen af radikaler. Denne tidlige del af oxidationsforløbet er yderst kritisk, idet en forlængelse af nølefasen giver produktet en bedre holdbarhed.



Figur 1. Oversigt over dannelsen af stoffer ved oxidation (Modificeret efter Stapelfeldt *et al.*, 1998).

Enhver oxidativ belastning af råvaren, hvorved antioxidanter bliver forbrugt, vil være med til at reducere holdbarheden og kvaliteten af forarbejdede produkter. Det er tidligere vist, at man gennem fodring kan manipulere mælkens fedtsyresammensætning samt balancen mellem naturligt forekommende pro- og antioxidanter i den rå mælk. Ved at producere rå mælk, der på grund af sammensætningen er mindre følsom overfor oxidativ stress, må forarbejdede mejeriprodukter forventes at få forbedret oxidativ stabilitet.

En begrænsende faktor i forbindelse med oxidationsstudier af mælk har været manglende følsomhed og specificitet af de anvendte analytiske metoder. I dette projekt anvendes der en række af de klassiske metoder til at analysere den oxidative status i forbindelse med mælk og mejeriprodukter. Resultaterne fra de traditionelle målemetoder sammenlignes med ESR-spektroskopi, der gør det muligt at måle ændringer på et meget tidligere stadium af oxidationsforløbet. Som en del af projektet blev disse målemetoder tilpasset analyse af

mejeriprodukter. Der blev ligeledes udviklet forbedrede metoder til måling af antioxidanter og deres nedbrydningsprodukter samt af de primære oxidationsprodukter i mælk og mejeriprodukter.

FORMÅL

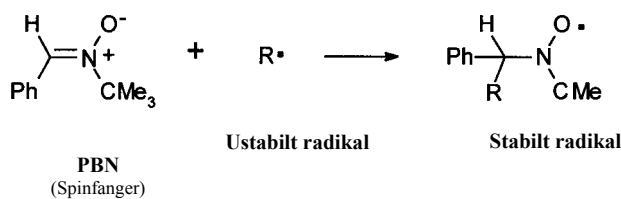
Det overordnede formål med projektet var at klarlægge, hvilken betydning tidlig oxidation, pro- og antioxidanter i den rå mælk har på holdbarheden af det forarbejdede produkt, især med henblik på økologisk mælkeproduktion. Økologisk mælk skønnes generelt mest udsat for såvel spontan oxidation som oxidation under lagring af produktet.

Et andet mål med projektet var at finde nye markører for oxidation i mælk, der kan anvendes til at udvikle metoder, som kan belyse en given råvares egnethed til videre forarbejdning og benyttes til forudsigelse af produktholdbarheden. Derudover var det et mål at komme med anvisninger på, hvorledes man kan producere og lagre råmælk, specielt økologisk mælk, så den er mindre følsom overfor oxidation, og ad den vej minimere oxidative ændringer i det forarbejdede produkt.

METODEUDVIKLING

Anvendelse af ESR-spektroskopi i forbindelse med mejeriprodukter

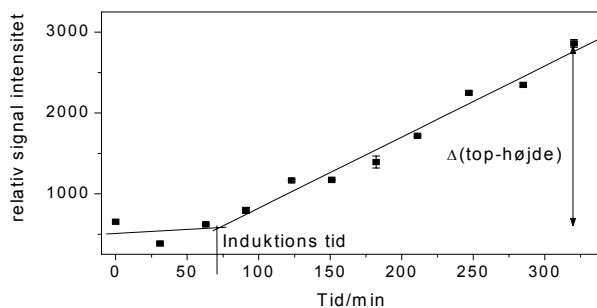
I løbet af projektet blev der udviklet forskellige metoder baseret på elektron spin resonans-spektroskopi (ESR), der kunne anvendes til måling af radikaler i mælk og mejeriprodukter, og derved medvirke til at belyse de tidlige oxidationsprocesser i mælk. Radikaler blev kvantiseret ved hjælp af spinfangning (se Figur 2). En metode, hvor ustabile radikaler reagerer med en spinfanger såsom *N-tert-butyl- α -phenylnitron* (PBN) og danner et stabilt radikal, der efterfølgende kan detekteres ved ESR-spektroskopi. Der blev i projektet udviklet metoder til anvendelse af spinfangning i forbindelse med mejeriprodukter.



Figur 2. Reaktion mellem spinfangeren PBN og et ustabilt radikal.

I forbindelse med udviklingen af ESR-metoder, blev der målt direkte på radikaler i frysetørret mælk. Derudover blev der målt på induktionstiden for dannelse af spin-addukter med spinfangeren PBN i mælk under accelererede betingelser, og i den forbindelse blev to metoder afprøvet, som tidligere er blevet anvendt på øl og spiseolier. Disse metoder var udgangspunkter i frembringelsen

af en metode, hvor spinfangere anvendes under moderat accelererede betingelser i mejeriprodukter.



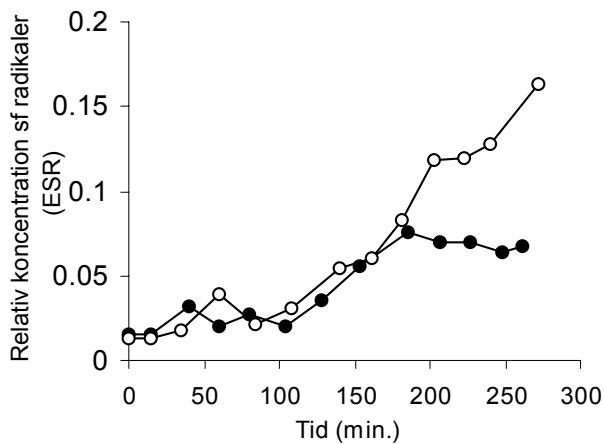
Figur 3. Relativ signal intensitet af PBN spin-addukter i fedt isoleret fra smør ved 80°C. Induktionstiden og tophøjden er markeret.

Intensiteten af signalet af spinfangeren måles over en given tid, hvorefter en graf fremkommer og induktionstiden samt tophøjden ved en bestemt tid aflæses (se Figur 3).

Desuden blev der udviklet en ESR-metode til måling af ascorbyl radikalet, som er et mellemprodukt ved oxidation af ascorbinsyre (findes som ascorbat i mælk) til dehydroascorbinsyre. De udviklede ESR-assays blev anvendt til at måle på forskellige mejeriprodukter og mælk, og et udvalg heraf præsenteres i det følgende.

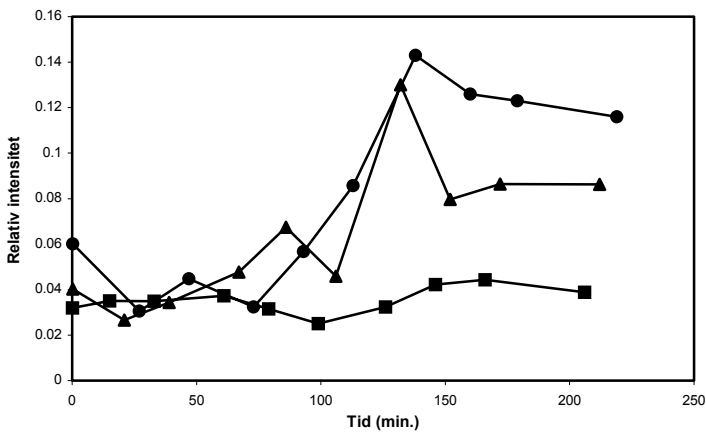
Spinfangeren PBN blev tilsat direkte til fedt isoleret fra smør, der var opvarmet til 80°C, og derefter blev dannelsen af radikaler fulgt, som funktion af tiden (se Figur 3). Resultatet viste en induktionstid for dannelsen af radikaler i fedtet fra smørret (indtil omtrent 100 minutter), hvorefter dannelsen af radikaler foregik med en større lineær hastighed efter omtrent 00 minutter. Resultatet stemmer overens med, hvad der tidligere er observeret fra accelererede oxidationstests som metoder baseret på til Rancimat- og Oxidograph-instrumenter. ESR-spektroskopi har dog den fordel, at der analyseres under mildere betingelser og i kortere tid (Kristensen *et al.*, 2002).

Der blev målt på lysinduceret oxidation i ubehandlet mælk ved brug af spinfangeren PBN, og mængden af radikaler i mælk opbevaret i lys (1000 lux) var større end i mælkeprøver lagret i mørke (Figur 4). Forsøget viste en klar pro-oxidativ effekt af lys, hvilket var forventelig fra tidligere erfaringer. Der var ingen forskel i induktionstiden, hvilket tyder på, at der ikke var en forskel i forbruget af antioxidanter i prøverne opbevaret i lys i forhold til prøverne i mørke ved denne lettere forhøjede temperatur (Kristensen *et al.*, 2002).



Figur 4. Effekten af lyspåvirkning (1000 lux) (○) eller mørke (●) for mælk lagret 48 timer ved 20°C målt ved det relative signalthøjde af ESR-spektret. Assay betingelser: Mælken blev inkuberet med 30 mM PBN ved 55°C.

Det var muligt at skelne mellem mælk pasteuriseret ved forskellige temperaturer ved brug af spinfangeren *N-tert-butyl- α -phenylnitrone* (PBN). Mælk pasteuriseret ved en højere temperatur indeholdt færre radikaler (se Figur 5) end mælk pasteuriseret ved lavere temperatur, hvilket stemmer overens med tidligere resultater. Der var ikke var forskel i mængden eller forløbet i dannelse af radikaler mellem homogeniseret og uhomogeniseret mælk.



Figur 5. Relativ intensitet af ESR-spektret af spinfangeren PBN tilsat homogeniseret mælk pasteuriseret ved forskellige temperaturer 69°C (●), 76°C (▲), og 82°C (■).

Ny og følsom metode til kvantificering af lipidhydroperoxider

I forbindelse med projektet er der endvidere udviklet en ny og meget følsom metode til kvantificering af lipidhydroperoxider i mælk. Metoden kræver kun 10-20 mg lipid og forskellen mellem udviklingen i lipidhydroperoxider kan ses i mælk lagret i mørke i 24 timer ved 4°C, ligesom det er muligt at måle lysinitieret oxidation i mælk efter kun 2 timers eksponering med kunstigt lys

(3400 lux). Metoden er reproducérbar og må i dag betragtes som værende den mest følsomme analytiske metode til at beskrive lipidoxidation i mælk (Østdal *et al.*, 2001).

Antioxidanter i mælkelignende modelsystemer

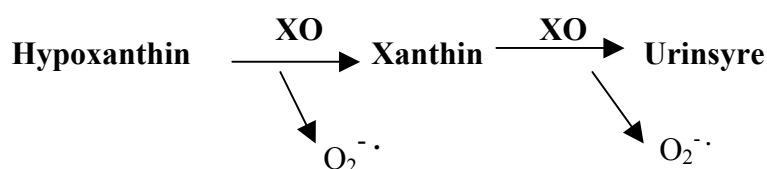
Som del af projektet blev der udført en række modelforsøg med mælkelignende emulsioner, hvor dannelsen af radikaler blev fulgt ved hjælp af ESR-spektroskopi og spinfangeren α -4(4-pyridyl 1-oxide)-N-*tert*-butylnitrone (POBN). De mælkelignende emulsioner indeholdt forskellige antioxidanter i samme koncentration, som de naturligt findes i mælk. Emulsionerne blev sat i vandbad ved 30 °C i 4 dage med daglig udtagning. Efter udtagning blev POBN tilsat og prøven sat i vandbad ved 55 °C i 15 minutter, hvorefter der blev målt. Et tidsforløb på 4 dage blev valgt som en gennemsnitlig opbevaringstid af mælk, og udviklingen i radikaler blev fulgt.

I dette modelsystem virkede ascorbinsyre som pro-oxidant, hvorimod α -tocopherol og β -caroten ikke førte til en øget mængde radikaler. Der blev på de samme emulsioner målt sekundære oxidationsprodukter ved GC-MS for at undersøge om tilstedeværelsen af forskellige antioxidanter påvirker fordelingen af sekundære oxidationsprodukter (Kröger-Ohlsen *et al.*).

RESULTATER

Xanthin oxidase i mælk

Enzymatisk aktivitet i mælken kan medvirke til en initiering af oxidationsprocesserne. Både xanthin oxidase og peroxidase aktivitet medførte en øget oxidation af ascorbinsyre i mælk (Nielsen *et al.*, 2000). Xanthin oxidase, som findes i relativ høj koncentration i mælkens fedtkuglemembran, katalyserer omdannelsen af xanthin til urinsyre under forbrug af O_2 og dannelse af superoxid ($O_2^{\bullet-}$) (se Figur 6). Superoxid virker som svag oxidant i vandige opløsninger og kan derudover abstrahere svagt bundne hydrogenatomer fra blandt andet tocopheroler, thiole og ascorbinsyre, og derved mindske den antioxidative kapacitet af mælken. Når hypoxanthin blev tilsat rå mælk, sås en øget oxidation i form af dannelsen af hydroperoxider. Dette kan forklares med, at xanthin oxidase katalyserer omdannelsen af hypoxanthin til xanthin, under dannelsen af superoxid.



Figur 6. Omdannelse af hypoxanthin til xanthin ved enzymet xanthin oxidase (XO) under dannelsen af superoxid.

Det blev i projektet vist, at aldehyder, der dannes som sekundære oxidationsprodukter, kunne øge oxidationsprocesserne, sandsynligvis fordi de virker som substrat for xanthin oxidase. Dette blev set som en akkumulering af lipidhydroperoxider i rå mælk, når der var tilsat hexanal (Steffensen *et al.*, 2001).

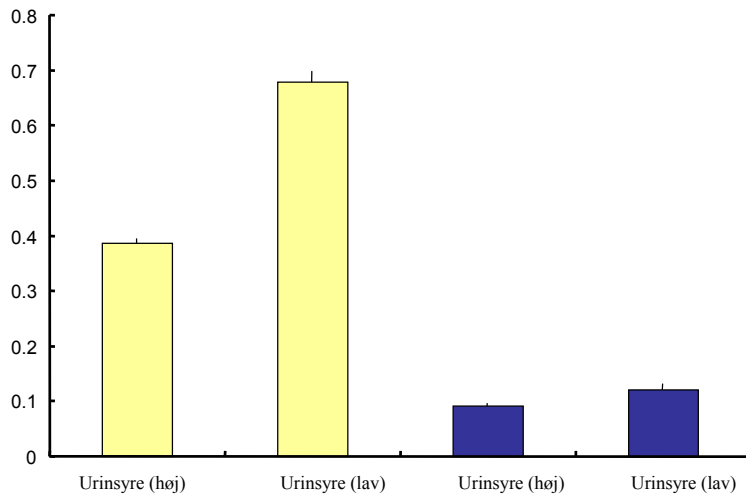
Peroxidaseaktivitet i mælk medførte oxidativ nedbrydning af ascorbinsyre. Dette blev påvist ved tilsætning af hydrogenperoxid (der kan virke som substrat for peroxidase) til mælk, hvorefter koncentrationen af ascorbinsyre faldt. Tilsætning af samme mængde hydrogenperoxid til UHT mælk, der ikke har peroxidaseaktivitet, medførte ikke et tilsvarende fald i koncentrationen af ascorbinsyre (Nielsen *et al.*, 2000).

Markører for oxidativt stress i mælk

Urinsyre i forbindelse med oxidativt stress i mælk

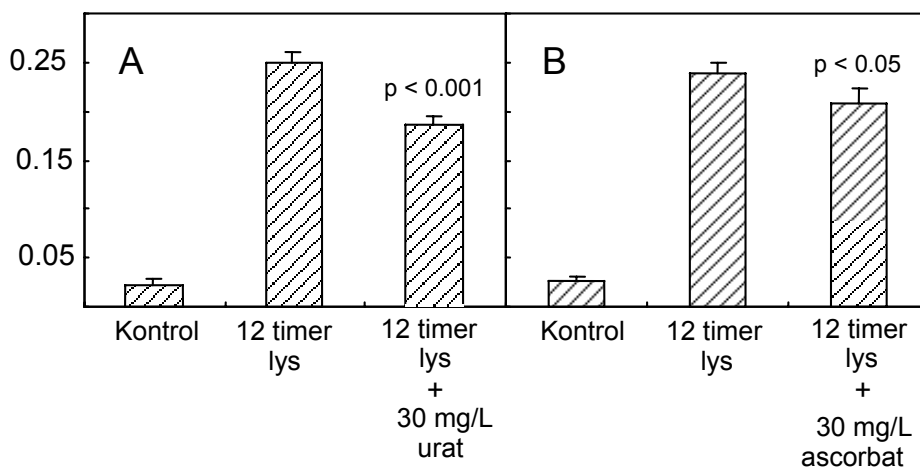
Urinsyre er en kendt antioxidant i biologiske systemer og findes naturligt i mælk med en koncentration på 16-22 mg/L. Indholdet påvirkes af forskellige faktorer, blandt andet af den mikrobiologiske aktivitet i vommen, af mælkeydelsen og af fodring. Det blev påvist i projektet, at det var muligt at øge koncentrationen af urinsyre gennem fodring. Et fodringseksperiment med høj og lav mikrobiologisk aktivitet i vommen gav mælk med samme koncentration af poly- og monoumættede fedtsyrer, men med en forskellig koncentration af urinsyre. Mælk fra køer med en

høj mikrobiologisk aktivitet i vommen havde en større antioxidativ kapacitet. Der var et højere niveau af lipidhydroperoxider i mælk fra køer med en lav mikrobiologisk aktivitet i vommen sammenlignet med mælk fra køer med høj mikrobiologisk aktivitet i vommen, når mælken blev udsat for lyspåvirkning. Den lavere oxidative stabilitet i mælk fra køer med lav mikrobiologisk aktivitet i vommen kan forklares ved, at mælken indeholdt mindre urinsyre (17,4 mg/L) i forhold til mælk fra køer med en høj mikrobiologisk aktivitet i vommen, hvor koncentration af urinsyre var større (22,4 mg/L) (se Figur 7).



Figur 7. Relativ koncentration af lipidhydroperoxider i to typer mælk med højt og lavt indhold af urinsyre afhængig af mikrobiologisk aktivitet i vommen. Mælk udsat for lys (gul) sammenlignet med mælk opbevaret i mørke (blå).

Det blev påvist i projektet, at urinsyre virkede som en antioxidant, og det var muligt af reducere lysinduceret oxidation i mælk ved tilsætning af urinsyre. Dette sås ved at dannelse af lipidhydroperoxider ved lyspåvirkning var højere i mælk med et lav indhold af urinsyre (se Figur 8).

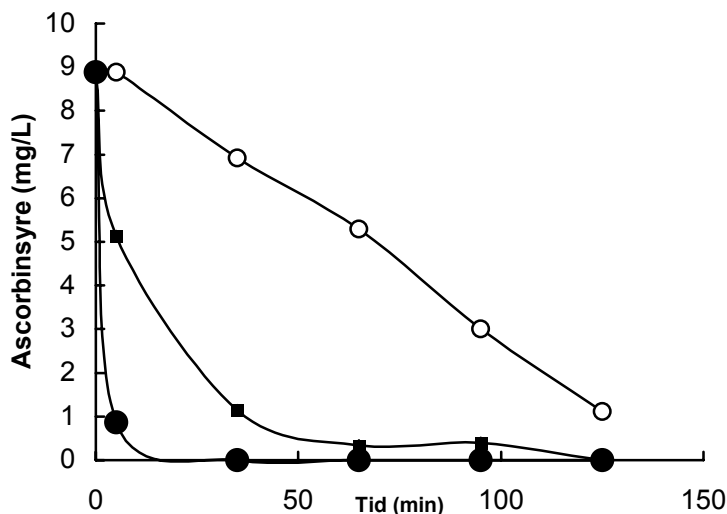


Figur 8. Relativ effekt af urat (A) eller ascorbat (B) på dannelsen af lipidhydroperoxider i pasteuriseret mælk under lyspåvirkning ved $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Værdierne er gennemsnittet af tre individuelle målinger. Kontrolmælken var indpakket i folie og ikke tilsat urat eller ascorbat.

Urinsyre blev nedbrudt under lyspåvirkning, og beskytter mod oxidation ved selv at blive oxideret. Urinsyre viste sig at være en effektiv antioxidant i mælk og mere effektiv end ascorbinsyre (se Figur 8). Urinsyre findes normalt i højere koncentration i mælk i forhold til ascorbinsyre (Østdal *et al.*, 2000).

Ascorbinsyre i forbindelse med oxidativt stress i mælk

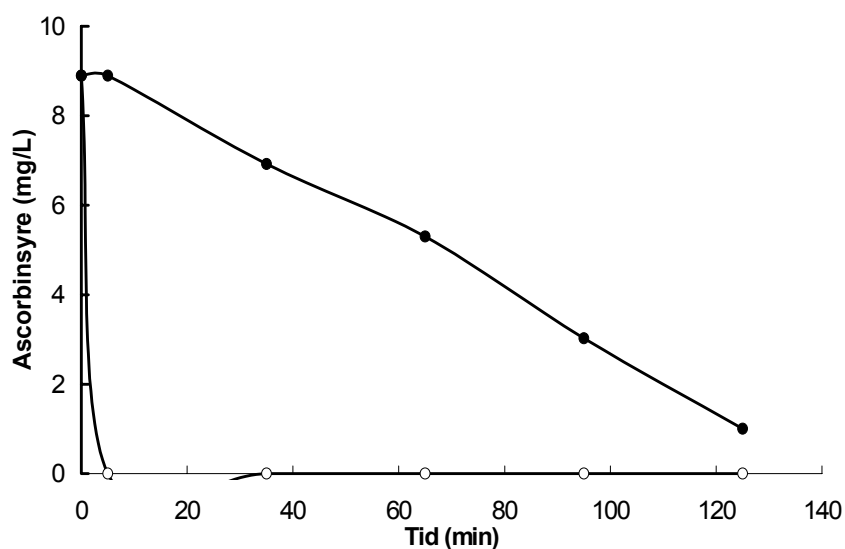
Et af formålene med projektet var at finde en markør for oxidativt stress i mælk, og derfor blev nedbrydning af ascorbinsyre til dehydroascorbinsyre (med ascorbylradikalet som mellemprodukt) fulgt ved forskellige betingelser. Det er velkendt, at overgangs-metal-ionerne Fe(III) og Cu(II) kan initiere oxidation, og den oxidative nedbrydning af ascorbinsyre blev undersøgt i mælk tilsat forskellige koncentrationer disse metal-ioner. Resultatet viste, at tilsætning af Cu(II) førte til en betydelig oxidativ nedbrydning af ascorbinsyre, hvorimod tilsætning af Fe(III) ikke medvirkede til en væsentlig reduktion af ascorbinsyre (Nielsen *et al.*, 2000).



Figur 9. Koncentrationen af ascorbinsyre som funktion af tiden, i rå mælk (○) og rå mælk tilsat 735 µM hypoxanthin (●) eller 735 µM hypoxanthin + katalase (■).

Xanthin oxidase og peroxidase accelererede drastisk den oxidative nedbrydning af ascorbinsyre. Tilsætning af hypoxanthin medførte således et fald i koncentrationen af ascorbinsyre på grund af dannelsen af superoxid ved nedbrydning af hypoxanthin til urinsyre (se Figur 6 og Figur 9).

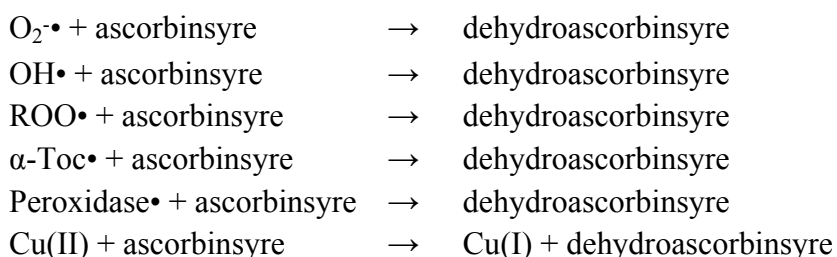
Påvirkningen af lactoperoxidase blev undgået ved tilsætning af katalase. Tilsætning af hexanal medførte et fald i koncentrationen af ascorbinsyre (se Figur 10) hvilket kan skyldes, at hexanal virker som substrat for xanthin oxidase, og dermed accelerer oxidationen af ascorbinsyre.



Figur 10. Koncentrationen af ascorbinsyre som funktion af tiden i mælk (●) og i mælk tilsat 1 mM Hydrogenperoxid (○).

Peroxidaseaktivitet i mælk kan medvirke til oxidativ nedbrydning af ascorbinsyre. Dette blev indirekte påvist ved tilsætning af hydrogenperoxid, der kan virke som substrat for peroxidase. Tilsætning af hydrogenperoxid i rå mælk medførte en nedbrydning af ascorbinsyre, hvorimod der ikke sås en effekt i UHT mælk, der ikke har peroxidaseaktivitet, hvorfor hydrogenperoxid synes at virke som substrat for peroxidase (Nielsen *et al.*, 2000).

Nedenfor ses en opsummering af de processer, som der i projektet blev fundet at indvirke på oxidation af ascorbinsyre til dehydroascorbinsyre:



Ascorbinsyre bliver således oxideret af flere forskellige reaktionsveje, og oxidation kan forårsages af både kobber, enzymatisk aktivitet og α -tocopherol. Disse processer er alle relevant for oxidation i mælk, og tab af ascorbinsyre synes således at være en anvendelig markør for oxidativt stress i mælk (Østdal *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2002).

Overgangs-metal-ioner

$Cu(II)$ viste sig at have en pro-oxidativ effekt i mælk, hvilket sås ved oxidation af ascorbinsyre, men også ved dannelse af hexanal i mælk for en kobber koncentration der var relevant for mælk ($10 \mu M$

Cu²⁺) (Nielsen *et al.*, 2000). Derimod var det ikke muligt at påvise tidligere forsøgsresultater omkring den pro-oxidative effekt af Fe(III), når dette blev målt ved oxidation af ascorbinsyre (Nielsen *et al.*, 2000). Dette kan skyldes tilstedeværelsen af chelerende stoffer i mælk i form af proteiner og citrat, der ved binding af jernet forhindrer jern-katalyserede reaktioner og efterfølgende reaktioner med ascorbinsyre.

Fedtsyresammensætningens betydning for oxidation

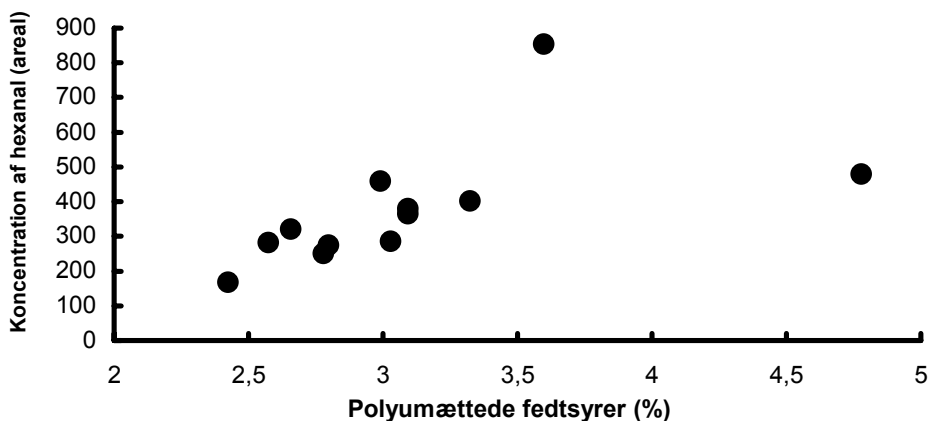
Det var muligt at fremstille mælk med forskellig fedtsyresammensætning ved manipulering af foderet til køerne. Der blev fremstillet tre forskellige slags mælk med forskellig fedtsyresammensætning (se Tabel 1).

Tabel 1. Gennemsnitlig fedtsyrefordeling af de tre typer mælk anvendt i projektet.

	Mælketype I (høj <i>de novo</i>)	Mælketype II (mættet)	Mælketype III (umættet)
Fedtsyre	Vægt %	Vægt %	Vægt %
C4	4.2±0.1	3.4±0.5	4.7±1.2
C6	3.4±0.2	2.1±0.4	2.9±0.7
C8	2.1±0.2	1.0±0.2	1.4±0.3
C10	4.6±0.7	2.0±0.4	2.4±0.5
C12	5.3±0.8	2.3±0.4	2.5±0.3
C14	14.4±1.0	9.3±1.0	9.8±0.7
C16	38.1±2.4	57.8±1.6	25.0±1.0
C16:1	1.9±0.1	3.8±0.8	0.1±0.0
C18:0	6.4±0.1	3.1±0.5	13.2±1.3
C18:1	16.7±1.6	13.4±0.5	30.6±3.4
C18:2	2.4±0.2	1.4±0.2	5.6±0.5
C18:3	0.5±0.1	0.4±0.2	1.9±0.3

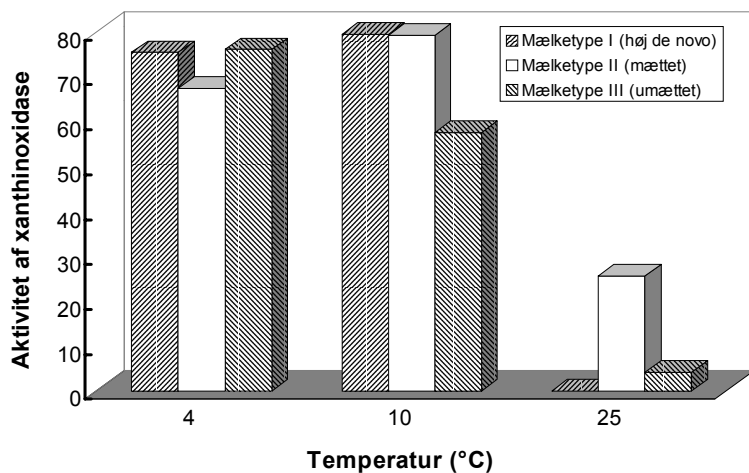
Ved mælketype I indeholdt foderet både byg og soja, således at det medførte en højere *de novo* syntese (nyopbygning) af fedtsyrer. Derved får mælken et højere indhold af kortkædede mættede fedtsyrer. Mælketype II indeholdt flere umættede fedtsyrer, da der var fodret med soja, som indeholder en større mængde umættede fedt, samt en mælketype III, hvor mættet fedt i form af 50 % palmitinsyre og 50 % stearinsyre blev tilsat foderet, resulterende i en større mængde mættede fedtsyrer i mælkefedtet.

Indholdet af polyumættede fedtsyrer viste sig at influere på mælkens oxidative stabilitet (se Figur 11), målt ved stigende koncentration af hexanal med et øget indhold af umættede fedtsyrer.



Figur 11. Den relative koncentration af hexanal i mælk som funktion af indholdet af polyumættede fedtsyrer.

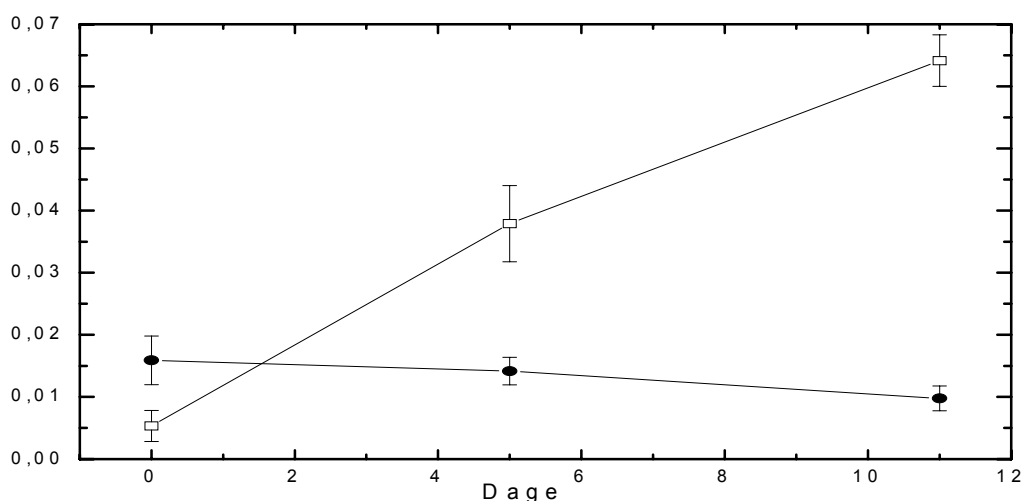
Denne observation kan forklares ved, at umættede fedtsyrer autooxiderer med en betydelig hastighed på grund af tilstedeværelsen af dobbeltbindingerne, hvorimod oxidation af mættet fedt foregår endog særdeles langsomt ved stuetemperatur. Derudover har fedtsyresammensætningen af mælken også en betydning for, hvor meget xanthin oxidase, der bliver frigivet fra fedtkuglemembranen ved køling (se Figur 12), idet fedtsyresammensætningen er påvirket af hvilken temperatur udkrystalliseringen foregår ved.



Figur 12. Aktivitet af xanthin oxidase i mælk med forskellig fedtsyresammensætning ved temperaturerne 4°C, 10°C og 25°C. Mælketype I indeholder en større mængde korte mættede fedtsyrer, mælketype II indeholder en større mængde mættede fedtsyrer, og mælketype III indeholder mere flere umættede fedtsyrer.

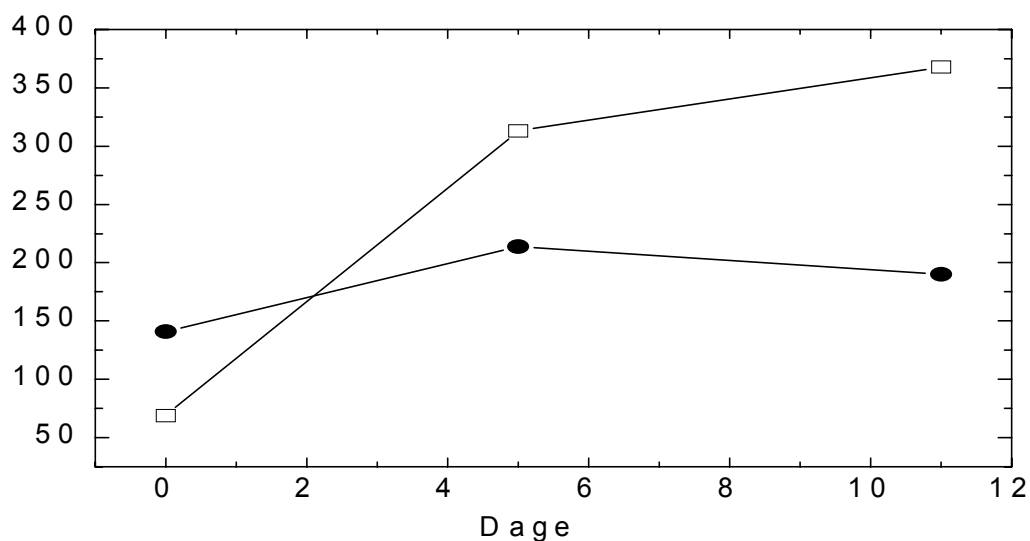
Procesteknologisk forsøg med kærnemælk

Projektet blev afsluttet med et procesteknologisk forsøg med kærnemælk. Der blev fremstillet ”gammeldags” kærnemælk på en UCR 060 smørkærne fra Paasch & Silkeborg ud fra to typer mælk hos Arla Foods amba i Holstebro. Fedtsyresammensætning af mælken blev varieret ved manipulation af foderet på grundlag af fodringsforsøg udført tidligere i projektet, hvilket resulterede i kærnemælkstype I (ud fra mælketype I), der indeholdt en større mængde korte mættede fedtsyrer, og kærnemælkstype II (ud fra mælketype III), der indeholdt en større mængde umættede fedtsyrer. De to typer kærnemælk blev lagret over 11 dage, og oxidationen blev fulgt ved ESR-spektroskopi samt ved indholdet af primære oxidationsprodukter i form af peroxider og ved indholdet af det sekundære oxidationsprodukt hexanal.



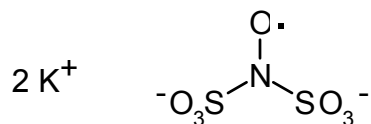
Figur 13. Absorbansen ved 500 nm, som et relativt mål for dannelse af peroxider i type I kærnemælk (●), og den mere umættede type II (på basis af type III) (□) kærnemælk under lagring ved 4 °C (Kristensen *et al.*, 2003).

Derudover blev koncentrationen af de fedtopløselige antioxidant α -tocopherol og β -caroten fulgt. Det var muligt at skelne mellem de to typer kærnemælk med hensyn til indholdet af peroxider (se Figur 13) og det sekundære oxidationsprodukt hexanal (se Figur 14) (Kristensen *et al.*, 2003).



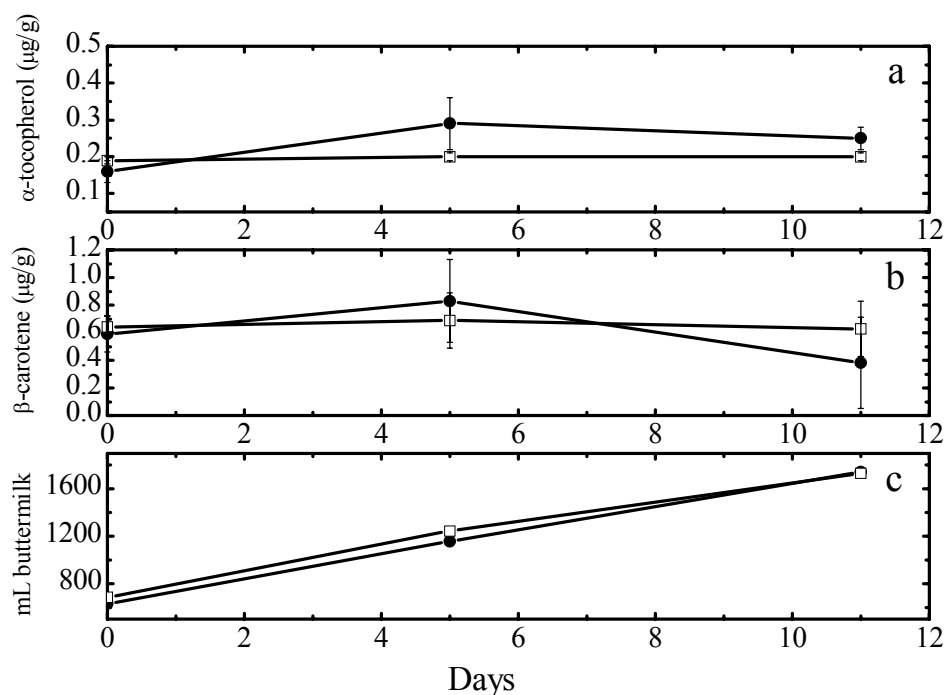
Figur 14. Arealet af den integrerede top I i GC-kromatogrammet som et relativt mål for hexanal in type I (●) og den mere umættede type III (på basis af type II) (□) kærnemælk under lagring ved 4 °C (Kristensen *et al.*, 2003).

Den antioxidative kapacitet af kærnemælken blev bestemt ved et ESR-assay, der tidligere er blevet anvendt i forbindelse med måling på både whisky og rødvin (Gardner *et al.*, 1999). I denne metode anvendes et vandopløseligt stabilt radikal ”Fremy’s salt” (se Figur 15), der tilsættes kærnemælken, hvorved et ESR-signal kan måles. Ved dannelsen af radikaler i kærnemælken vil disse reagere med Fremy’s salt og reducere dette, hvilket gør saltet usynligt ved detektion med ESR. Den volumen kærnemælk, det kræver at reducere ESR-signalet af Fremy’s salt med 50 % i forhold til en reference, bestemmes. Den antioxidative kapacitet af kærnemælken kan således bestemmes ved, at sammenligne den mængde kærnemælk, der skal tilsættes, for at reducere samme mængde Fremy’s salt (Kristensen *et al.*, 2003).



Figur 15. Fremy’s salt (kalium nitrosodisulfonat), et vandopløseligt stabilt radikal.

Resultatet viste, at den antioxidative kapacitet af begge typer kærnemælk faldt under lagringen, sandsynligvis på grund af en øget oxidation med et forbrug af antioxidanter i serumfasen til følge. Derimod var der overraskende ikke et tab i fedtopløselige antioxidanter (α -tocopherol og β -caroten) (se Figur 16).



Figur 16. Den antioxidative kapacitet af type I kærnemælk (●), og den mere umættede type III (fra type II) (□) kærnemælk efter lagring ved 4°C. A: Koncentration af α -tocopherol, B: β -caroten, og C: volumen kærnemælk tilsat for at reducere 50 % af det semi-stabile vandopløselige radikal nitrosodisulfonate (63 μM) (Kristensen *et al.*, 2003).

Lipidoxidationen i kærnemælken var lav og medførte ikke et fald i fedtopløselige vitaminer. Dannelsen af radikaler, der initierede oxidationen, synes derfor at starte i serumfasen, hvor enzymer og metal-ioner kunne katalysere oxygen-aktivering. Effekten af radikaldannelsen sås efterfølgende i fedtfasen, og fedtsyresammensætningen var således vigtig for dannelsen af både primære og sekundære oxidationsprodukter (Kristensen *et al.*, 2003). Det var muligt at påvirke den oxidative stabilitet af kærnemælk ved at påvirke mælkenes fedtsyresammensætning ved hjælp af foderet. Det åbner mulighed for at uønskede oxidative ændringer i andre mejeriprodukter kan mindskes ved at manipulere fedtsyresammensætningen af mælk ved fodring (Kristensen *et al.*, 2003).

KONKLUSION

Anvendelse af ESR-spektroskopi viste sig at være et glimrende værktøj til at analysere dannelsen af radikaler i mælk og mejeriprodukter. Gennem en videreudvikling af metoder til ESR, kan en dybere forståelse af initieringen af oxidationsprocesser i mælk muligvis opnås og medvirke til at klarlægge, hvilke processer der er af betydning for den tidlige oxidation, og dermed den videre produktholdbarhed.

I forbindelse med projektet er der endvidere udviklet en ny og meget følsom metode til kvantificering af lipidhydroperoxider i mælk. Metoden udmærker sig ved kun at kræve en lille

prøvemængde og være i stand til at detektere små forskelle i udviklingen af lipidhydroperoxider i mælk. Metoden er derfor både reproducérbar og en yderst følsom analytisk metode til at beskrive lipidoxidation i mælk.

Urinsyre blev vist at være en glimrende antioxidant i forbindelsen med lysinduceret oxidation i mælk, og synes at være en vigtigere antioxidant i mælk end ascorbinsyre. Det var muligt at påvirke indholdet af urinsyre i mælken gennem fodring. Derudover havde den mikrobiologiske aktivitet i vommen også en påvirkning på indholdet af urinsyre i mælken, og dermed den antioxidative kapacitet af mælken.

Ascorbinsyre kan anvendes som markør for oxidativt stress, da den nedbrydes via flere forskellige oxidative reaktionsmekanismer. Derfor kan nedbrydning af ascorbinsyre bruges som et mål for hvorvidt oxidationsprocesser finder sted i et produkt.

Det blev påvist, at sammensætningen af mælk kan manipuleres ved hjælp af foderet til køerne. Det var muligt at påvirke og ændre fedtsyresammensætningen, som influerede på følsomheden overfor oxidation. Et større indhold af umættede fedtsyrer medførte, at mælken var mere oxidativt ustabil.

Fedtsyresammensætningen af mælk havde betydning for den oxidative stabilitet af et videreforarbejdet produkt i form af ”gammeldags” kærnemælk. Mælk, der indeholder flere umættede fedtsyrer, gav en mere oxidativt ustabil kærnemælk. I ”gammeldags” kærnemælk blev det vist, at lipidoxidation initieres i serumfase ved dannelse af radikaler. Effekten af radikaldannelsen sås efterfølgende i fedtfasen, og fedtsyresammensætningen var således vigtig for dannelsen af både primære og sekundære oxidationsprodukter.

Den oxidative stabilitet af mælk kan tilsyneladende skønnes ud fra tidlige målinger af tendensen til at danne radikaler og ud fra mælkens indhold af og urinsyre. Det var muligt at ændre mælkens oxidative stabilitet ved at ændre sammensætningen gennem foderet. Metoderne er dog ikke klar til implementering, men kræver afprøvning på flere typer mejeriprodukter.

Undersøgelserne fortsættes nu i to nye projekter delvist finansieret af Mejeribrugets ForskningsFond: Et projekt om økologisk mælk under FØJO II-programmet og et dansk-svensk projekt om oxidationsmekanismer i mejeriprodukter under ØFORSK-programmet.

LISTE OVER PUBLIKATIONER OG OFFENTLIGGØRELSER

Artikler i internationale tidsskrifter

Kristensen, D.; Kröger-Ohlsen, M. & Skibsted, L.H. (2002) Radical Formation in Dairy Products. Prediction of Oxidative Stability based on Electron Spin Resonance Spectroscopy. *American Chemical Society's Symposium Series* **807**, 114-125.

- Kristensen, D.; Andersen, M.L. & Skibsted, L.H. (2002) Prediction of Oxidative Stability of Raw Milk using Spin Trapping Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Milchwissenschaft* **57** (5), 255-258.
- Kristensen, D.; Nielsen, J.H.; Frøst, M.B.; Østdal, H.; Hermansen, J.E.; Kröger-Ohlsen, M. & Skibsted, L.H. Early events in oxidation and lipolysis of milk as influenced by manipulation of the fatty acid composition through feeding. (*arbejdstitel*) Manuskript under udarbejdelse.
- Kristensen, D.; Jensen, P.N.; Laustsen, A.; Poll, L.; Nielsen, J.H.; Østdal, H. & Skibsted, L.H. Effect of homogenisation and temperature of pasteurisation on the sensory and oxidative stability of whole milk. (*arbejdstitel*) Manuskript under udarbejdelse.
- Kristensen, D.; Hedegaard, R.V.; Nielsen, J.H. & Skibsted, L.H. (2003) Oxidative stability of buttermilk as influenced by fatty acid composition of cows milk manipulated through feeding. *Journal of Dairy Research*. In press.
- Kröger-Ohlsen, M.; Kristensen, D.; Carlsen, C.U.; Månsson, L. & Bibby, B.M. Relative importance of prooxidants and antioxidants in a milk-like emulsion: ascorbinsyre, urate, α -tocopherol and β -carotene. (*arbejdstitel*) Manuskript under udarbejdelse.
- Nielsen J. H., Andersen H. J. & Østdal H. (2002) The influence of ascorbic acid and uric acid on the oxidative stability of raw and pasteurized milk. *American Chemical Society's Symposium Series* **807**, 126-137.
- Nielsen J.H.; Hald, G.; Kjeldsen, L.; Andersen, H.J. & Østdal, H. (2000) Oxidation of ascorbinsyre in raw milk. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2998-3003.
- Nielsen, J.H.; Østdal, H.; Skibsted, L.H.; Kröger-Ohlsen, M.; Andersen, H.J. & Kristensen, D. Effect of pasteurisation on the oxidation of ascorbinsyre in milk. (*arbejdstitel*) Manuskript under udarbejdelse.
- Steffensen, C.; Andersen, H.J. & Nielsen, J.H. (2003) Aldehydes as substrate for xanthin oxidase in raw milk. *J. Agric. Food Chem.* **50** (25), 7392-7395.
- Steffensen, C. & Nielsen, J.H. Release of xanthine oxidase during cooling in milk with different fatty acid composition. (*arbejdstitel*) Manuskript under udarbejdelse.
- Østdal, H.; Andersen, H.J. & Nielsen, J.H. (2000) Antioxidative activity of urate in bovine milk. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 5588-5592.

Indlæg ved faglige kongresser, symposier o. l. og mødeindlæg

Poster: "Early events in the oxidation of milk as influenced by the level of citrate and polyunsaturated fatty acids". Præsenteret ved Lipidforum seminaret "Lipid oxidation and antioxidants: From the farm to our heart" i Uppsala, Sverige, 17-18. november 1999.

Samme resultater er præsenteret ved den parallelle session "Oxidations betydning" på LMC, Levnedsmiddelkongressen 2000.

"Oxidation of ascorbic acid in raw milk" af Nielsen, J.H.; Hald, G.; Kjeldsen, L. & Østdal, H. Præsenteret ved Lipidforum seminaret "Lipid oxidation and antioxidants: From the farm to our heart" i Uppsala, Sverige, 17-18. november 1999.

"Regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in bovine milk" af Nielsen, J.H.; Østdal, H. & Andersen, H.J. Mundtlig indlæg ved American Chemical Society "Free Radicals in Food" 26-30. marts 2000, USA.

"Lactoperoxidase-induced protein oxidation in bovine milk and the antioxidative effect of uric acid and ascorbic acid" af Østdal, H.; Nielsen, J.H.; Albrechtsen, R. & Andersen, H.J. Mundtlig indlæg ved American Chemical Society "Free Radicals in Food" 26-30. marts 2000, USA.

Kröger-Ohlsen, M.; Kristensen, D.; Månsson, L. & Skibsted, L.H. (2001) Relative importance of water- and fat-soluble antioxidants in a milk related emulsion. Poster, 21. Nordiske Lipid Symposium, Os, Norge. D. 5-8. juni, 2001.

Nielsen, J.H. (2001) Pro- and antioxidative effects of xanthine oxidase in raw milk. Abstrakt til 21. Nordiske Lipid Symposium, Norge, d. 5-8. juni, 2001.

Faglige artikler

Nielsen, J.H.; Hedegaard, R.V. & Skibsted, L.H. (2003). Early events ved oxidation af mælk. *Mælkeritidende* **5**, 120-124.

Samarbejdsrelationer (nationalt og internationalt)

- Fodringsforsøg 3 blev gennemført i samarbejde med Sensorikgruppen på Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet på KVL, der varetog sensoriske analyser.
- Der blev udført et produktionsforsøg af gammeldags kærnemælk ved forsøgsfaciliteter hos Arla Foods i Holstebro.
- Der har været samarbejde med Vegetabilieområdet på Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet på KVL.

- Der er etableret kontakt mellem DJF og ph.d. I. J. Wilk Stanford Universitet CA, USA vedr. mekanismer ansvarlige for regenerering af ascorbinsyre.

Andre referencer

Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Crozier, A. & Duthie, G.G. (1999) Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopic assessment of the contribution of quercetin and other flavonols to the antioxidant capacity of red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 1011-1014.

Stapelfeldt, H.; Nielsen; B.R. & Skibsted, L. (1998) Oxidativ stabilitet af mælkepulver. Kan tidlige forandringer anvendes til at forudsige holdbarhed? *Mælkeritidende* **2**, 34-37.

