

Lipidkrystallisering

Indhold

Formål	1
Introduktion	1
Triacylglycerider	2
DSC	3
LF-NMR	4
Metoder	4
DSC	4
LF-NMR	4
Resultater	5
Diskussion	8
Konklusion	12
Referencer	13
Bilag	14

Formål

DSC:

Bestem smeltepunktet for kakaosmør, kokosfedt samt forskellige slags chokolader ved hjælp af differential scanning calorimetry (DSC) og evaluere på kvaliteten af chokoladen.

LF-NMR:

Undersøg kokosfedts smeltekarakteristik ved hjælp af low-field nuclear magnetic resonance (NMR) under hhv. temperaturændringer og tilføjelse af rapsolie.

Introduktion

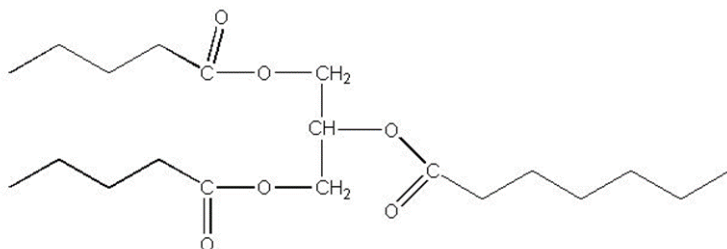
I fødevarerindustrien vil man gerne kunne minimere råvareomkostningerne. Derfor benyttes f.eks. vegetabiliske olier i chokolade og slikproduktion i stedet for kakaofedt. Dette kræver, at man kender til, hvordan fedtet krystalliserer og hvilke polymorfe former, der bliver dannet, da dette har betydning for mundfølelsen, strukturen og smeltepunktet.

I produktionen af smør tilføjes også flydende fedtstoffer som rapsolie, for at gøre smørret mindre fast, så det har en bedre smørbarhed, samt reducerer råvareomkostningerne. For at kunne undersøge hvilken betydning det har at udskifte en del af fedtet med vegetabiliske olier, bruges DSC og LF-NMR.

Triacylglycerider

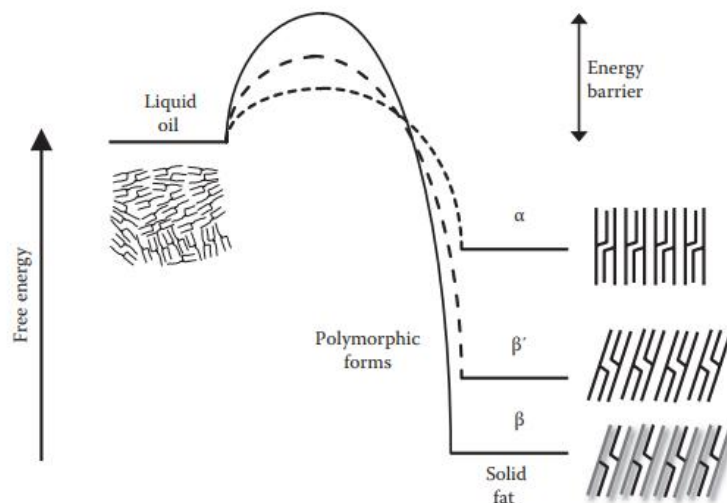
Mennesket indtager typisk lipider gennem kosten i form af triacylglycerider. Et triacylglycerid består af en glycerolbackbone, der er bundet til tre fedtsyrer vha. esterbindinger. Triacylglycerider har ofte Tuning fork strukturen, hvor sn1 og sn3 fedtsyrerne sidder på samme side og sn2 fedtsyren sidder på den anden side af glycerolbackbone. Dette ses i figur 1.

Lipider, der er på fast form ved stuetemperatur, defineres som fedt, mens lipider, der er flydende ved stuetemperatur, defineres som olie. Det har stor betydning for smeltepunktet af triacylglycerider om de består af cis-monoumættet eller cis-polyumættet fedtsyrer. Grunden hertil er, at en cis-dobbeltbinding gør, at fedtsyrens struktur ikke er vandret, men knækker ved dobbeltbindingen. Derfor er det ikke længere muligt for fedtsyrerne at pakke sig fuldstændig tæt sammen. Dette gør, at der forbruges mindre energi på at smelte lipiderne. (Damodaran and Parkin, 2017)



Figur 1: Tuning fork strukturen af en triacylglycerider med tre mættede fedtsyrer.

En flydende olie skal afkøles til under smeltepunktet for at krystalliseringen sker, idet faseovergangen kræver en aktiveringsenergi. På fast form kan lipiderne placere sig i forskellige polymorfe forme som f.eks. α , β' eller β . Dette ses i figur 2. Her kan det ligeledes ses, at det kræver mindst aktiveringsenergi at danne til α -polymorfe krystaller, mens det kræver størst aktiveringsenergi at danne β -polymorf. β -polymorfe krystaller ligger ligeledes i det laveste energiniveau og derfor er denne krystal mest stabil. Dette resulterer i, at alle krystaller over tid vil gå mod β -polymorf. (Damodaran and Parkin, 2017)



Figur 2: Den aktiveringsenergi der kræves for at danne de polymorfe krystaller ved krystallisering af olie

De dannede polymorfe former har forskellige smeltepunkter. Dette er især vigtig i forhold til chokolade. Figur 3 viser smeltetemperaturen for de forskellige polymorfe strukturer af kakaosmør, som især er vigtig i forhold til chokoladens egenskaber.

Code	Unit cell	Melting point ^a , °C
I	γ	5–18
II	α	16–24
III	β'_2 -L2	20–27
IV	β'_1 -L2	25–28
V	β_2 -L3	26–33
VI	β_1 -L3	32–36

^aPeak temperature on DSC curve.

Figur 3: polymorfe krystaller af kakaosmør. (Lipidkrystallisering 2022)

DSC

DSC bruges til at måle faseskift og denaturering. Dette gøres ved, at DSC har plads til to prøver ad gangen. Den ene er en reference prøve, hvor der kun er luft i. Den anden er den ønskede prøve. DSC programmeres til det ønskede temperaturforløb i forhold til, at prøven skal krystallisere eller smelte. DSC måler den varmtilførsel(watt) der er nødvendig for at opretholde den ønskede temperatur i både prøven og referencen.

De data, som DSC producerer, er forskellen i varmetilførsel og afkøling mellem prøven og referencen. Dette betyder, at når der sker en krystallisering, vil der ske en øgning af varmetilføjelsen, da krystalliseringen er en exoterm reaktion. Samtidigt vil der ske en reducere af varmetilføjelsen når prøven smeltes, da det er en endoterm reaktion.

LF-NMR

LF-NMR benyttes til at bestemme solid fat content (SFC%), som angiver den procentdel der er på krystal form. Dette kan bestemmes vha. LF-NMR, fordi protoner resonerer forskelligt om de er på fast eller flydende form.

En NMR-prøve indsættes i et magnetisk felt. Her vil kernerne excitere og kernespinene vil lægge sig parallelt med det magnetiske felt. Når det magnetiske felt brydes, vil de exciterede kerner vende tilbage til ligevægten mellem spin op og spin ned. Man kan måle på retentionstiden, som er den tid, før ligevægten igen er opnået. Denne retentionstid kan benyttes til bestemmelse af mobiliteten af opløsningen, idet kernerne opfører sig forskelligt afhængig af hvilken opløsning de er i. Den krystallinske tilstand har mindre fri bevægelse og vil derfor have kortere retentionstid end den flydende tilstand. I forhold til lipider og smeltepunkter findes to typer af kerner; kernen på krystallinsk form og kernen på flydende form, og vha. en extern standard kan det relative forhold findes mellem disse to tilstande. Dette relative forhold svarer til SFC%.

Metoder

DSC

I forsøget blev kokosfedt, kakaosmør samt to forskellige chokolader undersøgt. Forskellen på de to chokolader var, at den ene havde været opbevaret ved konstant temperatur, mens den anden slags chokolade blev udsat for temperatursvingninger. Prøverne blev fremstillet ved at overføre 10-20 mg til en DSC-skål, hvorefter DSC-skålen blev lukket og placeret i DSC-autosampleren. Vægten blev noteret og benyttet til programmering af DSC.

LF-NMR

Forsøget med LF-NMR var opdelt i to mindre forsøg hvoraf den ene omhandlede temperaturændringer og den anden omhandlede tilføjelse af rapsolie.

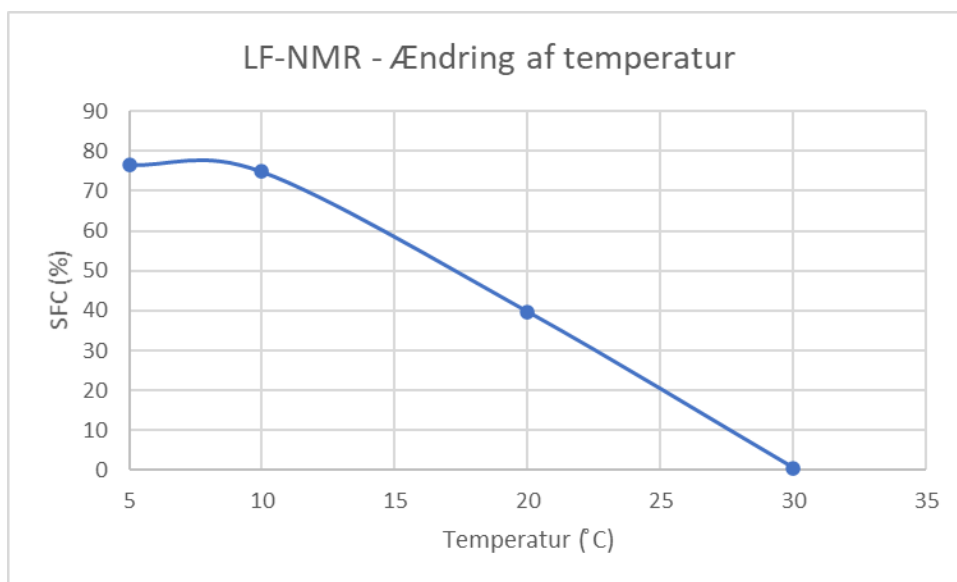
Delforsøg 1: kokosfedt blev opvarmet til 70°C. 2,5 mL kokosfedt blev overført til en NMR-tube, hvorefter tuben blev placeret i et vandbad, som var indstillet til 5°C. Efter stabilisering

ved 5°C blev tuben overført til LF-NMR, hvor en prøve blev kørt. Efterfølgende blev tuben overført til vandbadet igen, hvor temperaturen nu var hævet til 10°C. Analysen blev gentaget både ved 10, 20 og 30°C.

Delforsøg 2: Fem prøver blev fremstillet. Disse prøver indeholdte 2,5 mL kokosfedt samt hhv. 1, 2, 4, 8 eller 10% rapsolie. Prøverne blev nedkølet til 5°C hvorefter de blev analyseret vha. LF-NMR.

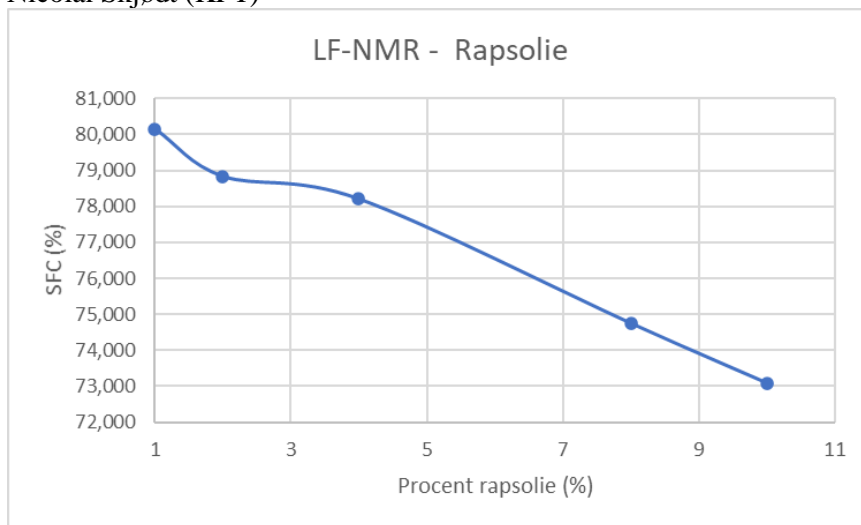
Resultater

LF-NMR forsøg:



Figur 4: smeltningsskurve for kokosfedt

Figur 4 viser, at SFC% for kokosfedtet falder i takt med, at temperaturen stiger. Det kan ses at kokosfedtet begynder at smelte ved ca. 7°C og er helt smeltet ved 30°C eftersom SFC% er nul.

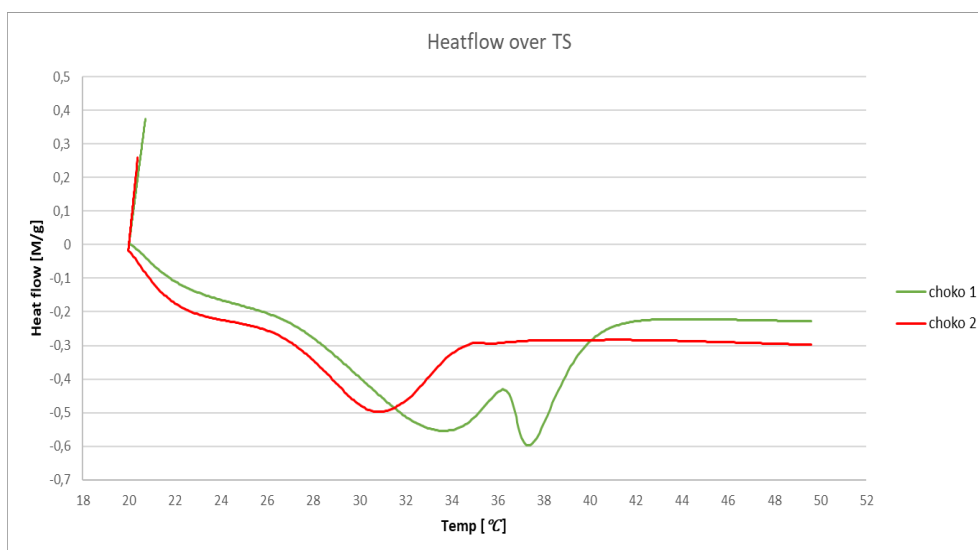


Figur 5: SFC% for kokosfedt ved forskellige tilsætninger af rapsolie

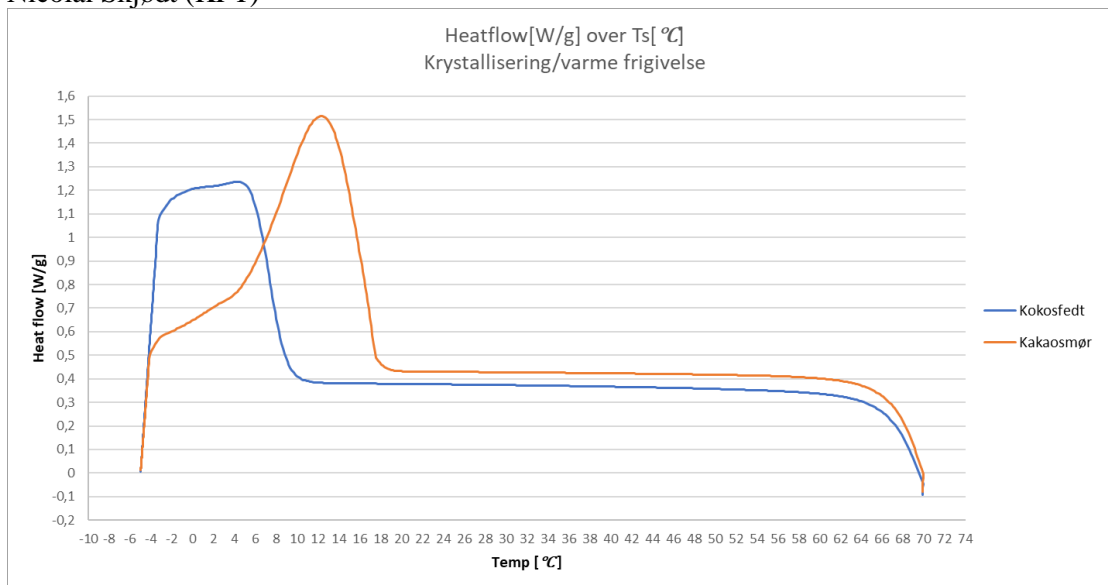
Figur 5 angiver, at kokosfedts SFC% falder jo mere rapsolie, der tilføjes.

DSC forsøg:

Ud fra teorien vides det, at DSC vil forsøge at vedligeholde temperaturen ved at forøge eller reducere heatflow. Smeltning af fedt er en endoterm reaktion, fordi fedtet optager varme ved smeltning. Dermed vil der ske en reduktion af heatflow, som er det, der kan ses på figur 6. Grafen i figur 6 angiver sammenhængen mellem heatflow og temperatur for chokolade 1 og 2. Chokolade 1 har været opbevaret ved konstant temperatur, mens chokolade 2 har været udsat for temperatursvingninger. I bilag 4 kan de to grafer adskilt fra hinanden ses. Temperaturprofilen der er benyttet til DSC ses i bilag 5.

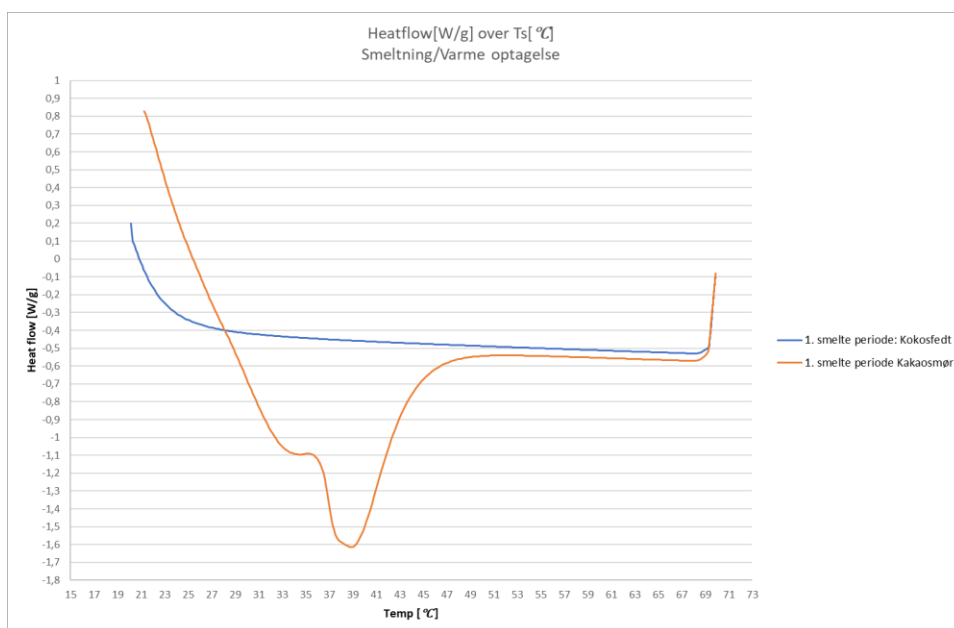


Figur 6: Sammenligning af heatflow for chokolade 1 og chokolade 2



Figur 7: Sammenhæng mellem heatflow og temperatur for hhv. kokosfedt og kakaofedt

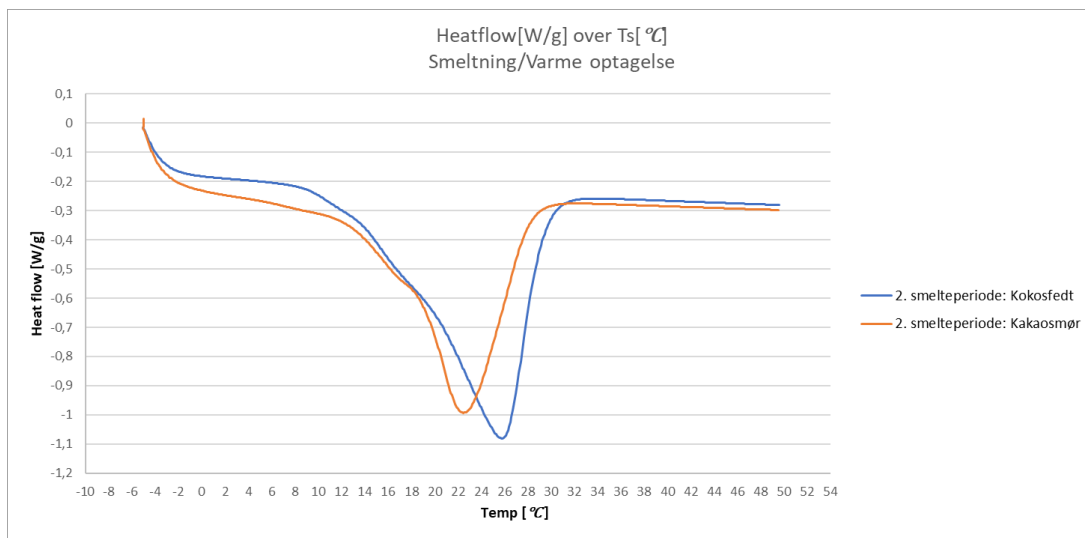
Ud fra figur 7, kan man se, at kokosfedts og kakaosmørs peak for krystallisering sker ved hhv. $\approx 1.23 \frac{W}{g}, 5^{\circ}C$ og $\approx 1.51 \frac{W}{g}, 12^{\circ}C$. Ud fra teorien ved vi, at DSC vil forsøge at vedligeholde temperaturen, ved at forøge eller reducere heatflow. Da krystallisering af fedt er en exoterm reaktion, idet fedtet frigiver varme ved krystallisering, vil der ske en forøgelse af heatflow, hvilket kan ses i figur 7. Temperaturprofilen for kokosfedt og kakaosmør ses i bilag 6.



Figur 8: Første periode af smeltning og varme optag for kokosfedt og kakaosmør (sample 0-500)

På baggrund af temperaturprofilen, som ses i bilag 6, er der to smelteperioder, hvilket ses i figur 8 og 9. Figur 8 viser første smelteperiode og her ses kun smeltning af kakaosmør, idet kokosfedt er på flydende form ved stuetemperatur. Smeltningen af kakaosmør ses i form af peaksene ved 31-41°C.

Figur 9 viser anden smelteperiode, hvor det kan ses, at både kakaosmør og kokosfedt smelter idet begge grafer har et stort fald i heat flow.



Figur 9: Anden periode af smeltning/varme optag for kokosfedt og kakaosmør (sample 1300-2012)

Diskussion

Describe the melting curves and estimate the number of polymorphic forms of coconut and cocoa fat.

Ud fra figur 8, som er første smelteperiode af fedt i DSC-analysen, kan det ses, at kokosfedt ikke umiddelbart har et peak. Dette kan skyldes, at kokosfedtet har stået i samletallerknerne længe før analysen begyndte, og derfor nået stuetemperatur, som har gjort, at kokosfedtet har været delvist, hvis ikke helt smeltet. Kakaosmør har derimod 2 peaks; et ved $-1.1 \frac{W}{g}$, 34°C hvor man kan antage alle de β' -polymorfe krystaller smelter, og et ved $-1.61 \frac{W}{g}$, 38°C hvor alle de β -polymorfe krystaller smelter. Herudfra kan det antages, at kakaosmør har antaget sin sjette form (jf. figur 3), og har derfor stået i lang tid, før det blev smeltet.

Ud fra figur 9, som er anden smelteperiode af fedt i DSC-analysen, kan det ses, at kokosfedt og kakaosmør begge har to peaks. Første peak for kokosfedt ses ved $-0.5 \frac{W}{g}$, 17°C og for kakaosmør ved $-0.5 \frac{W}{g}$, 16°C . Her smelter alle α -polymorfe krystaller. Andet peak for kokosfedt er ved $-1.08 \frac{W}{g}$, 26°C og for kakaosmør ved $-1.0 \frac{W}{g}$, 22°C . Her smelter alle de β' -polymorfe krystaller. Der er ikke et tredje peak, da hverken kokosfedt eller kakaofedt har stået lang nok tid til, at β -polymorfe krystaller har nået at blive dannet.

Ud fra disse aflæsninger, kan det antages, at kokosfedt har to polymorfe former og et højere smeltepunkt end kakaosmør, som også her to polymorfe former.

What is the desired crystal form in chocolate and why?

For chokolade er den mest ønskede krystalform, femte form (jf. figur 3). Dette er ikke den mest stabil form, men derimod den form der giver chokolade de bedste egenskaber. Ved femte form (jf. figur 3) vil chokolade være fast ved stuetemperatur og først smelte omkring $33-35^{\circ}\text{C}$ hvilket svarer til temperaturen, der er i munden og på samme tid giver chokoladen knæk ved bid. I modsætning til femte form, vil sjette form smelte langsommere i munden og desuden danne blooming, hvilket ikke er ønskværdigt.

How are melting points of coconut and cocoa fat relative to each other? Explain this based on the fatty acid composition of the fats.

Tabel 1 viser fedtsyresammensætningen i kokosfedt og kakaosmør. Her kan det ses, at kakaosmør har en større mængde umættede lipider end kokosfedt. Ud fra ovenstående resultater er det bestemt, at kakaosmør har et smeltepunkt på 22°C og kokosfedt på 26°C , ved anden smelteperiode. Gruppen har valgt at kigge på anden smelteperiode, da smeltningen af kokosfedt og kakaosmør tilnærmelsesvis ligner hinanden i denne smelteperiode (jf. Figur 9). Dette giver god mening ift. teorien om at jo flere dobbeltbindinger, jo lavere smeltepunkt. Grunden til dette er, at det kræver mindre energi at smelte kakaosmørret, når lipiderne ikke kan pakke sig tæt sammen pga. cis-dobbeltbindingerne. Samtidigt har kakaosmør flere lange fedtsyrer end kokosfedt, hvilket er med til at øge smeltepunktet. Dette kan være grunden til, at der ikke er en større forskel på smeltepunktet mellem kakaosmør og kokosfedt end 4°C .

Tabel 1: Sammensætning af fedtsyrer i kokosfedt og kakaosmør (Forskningsgruppen for ernæring, 2022, Caligiani et al., 2015)

Fedtsyre		Kokosfedt	Kakaosmør
		%	%
Caprylsyre (mættet)	C6:0	1	
	C 8:0	8	
	C 10:0	6	
Laurinsyre (mættet)	C 12:0	47	
Myristinsyre (mættet)	C 14:0	18	
Palmitinsyre (mættet)	C 16:0	9	25
Stearinsyre (mættet)	C 18:0	3	37
Oliesyre (umættet)	C 18:1	6	35
	C 18:2	2	3

Discuss the results in relation to the use of coconut fat as replacer for cocoa fat

Når kakaosmør udskiftes med kokosfedt, vil fedtsyresammenhæng bestå af flere mættede fedtsyrer. Dette resulterer i, at smeltepunktet ændres, og at det bliver dermed højere. Det er på grund af at mængden af den umættede oliesyre bliver formindsket som følge af tilsætning af kokosfedt der har en større mængde mættede fedtsyrer. (jf. tabel 1 og figur 8)

Describe the melting curves of the chocolate samples and explain the differences in the melting curves. Shortly describe the quality traits of each of the chocolates – why is the melting point so important for a product such as chocolate?

På figur 6 kan det ses, at peaksene for de to typer chokolade ikke er placeret lige oven i hinanden. Chokolade 1 har tre peaks, som relaterer sig til α , β' og β polymorfe krystaller. De tre peaks ligger ikke oven i hinanden, da de forskellige polymorfe former kræver forskellige aktiveringsenergier, som opnås ved forskellige temperaturer. For chokolade 1 angiver det første peak smeltningen af alle α -polymorfe krystaller. Dette peak er lidt svært at aflæse, men på

grafnen kan det ses ved 22-24°C. Andet peak er smeltning af alle β' -krystallerne, som ses ved 33-34°C, og det tredje peak, er smeltning af alle β -krystallerne, som ses ved 37-38°C.

Chokolade 2 har været udsat for temperatursvingninger, og derfor er der kun blevet dannet α - og β' -polymorfe krystaller. Dette resulterer i, at der kun ses to peaks - altså ved 22-24 °C og 30-32 °C.

Grunden til, at det er vigtigt at kende smeltepunktet på fødevareprodukter såsom chokolade er, at det har en stor betydning for oplevelsen af produktet. Hvis man tager udgangspunktet i chokolade, er det vigtigt, at den forbliver fast før, det optages i munden og at den smelter i munden. Dette vil give den bedste oplevelse.

Describe the melting curve of coconut fat. Is it sharp or does it melt over a wide temperature range. Why is that?

Figur 4 viser, at smeltningsskurven for kokosfedt er meget lineær, da det smelter over en lang tidsperiode fra 7-30°C. Det ses også, at kokosfedt har et højt SFC% ved de 5°C. Dette er fordi kokosfedt indeholder en stor andel af mættet fedtsyrer i forhold til andre vegetabiliske olier. Dette gør, at kokosfedt kan holde sin krystallinske struktur længere, da det kræver en større mængde energi at smelte.

Discuss the addition of rapeseed oil in relation to the use of oils to improve spreadability of fats, for instance butter stored at 5°C

Rapsolie er et polyumættet lipid og har derfor et lavere smeltepunkt. Dette gør, at smørbar har et lavere SFC% end almindeligt smør ved 5°C, idet smørbar er et blandingsprodukt mellem smør og rapsolie. Produktet har derfor en større smørbarhed end almindeligt smør.

Try to describe the effect of rapeseed oil on the melting point of coconut fat using a phase diagram.

Et fasediagram er en grafisk fremstilling af et stof faseovergange ofte ved ændring af temperatur og tryk.

Når der sker en faseovergang, kræver det en specifik mængde energi før et stof kan skifte fase. I forsøget er der tale om smeltevarme. Hvert stof har sin egen specifikke smeltevarme.

Siden rapsolie har en lavere smeltepunkt og smeltevarme end kokosfedt, vil fasegrænsen mellem fast og flyende bliver rykket ned mod lavere temperatur, da det kræver mindre energi for at smelte rapsolie.

It can be observed that butter spread, such as Kærgården becomes harder if it undergoes a temperature cycle of $5^{\circ}\text{C} \rightarrow 22^{\circ}\text{C}$, 1 hour $\rightarrow 5^{\circ}\text{C}$, as compared to a sample stored constantly at 5°C . Explain this observation

Dette skyldes, at en stor del af de faste fedtstoffer smelter ved temperaturer over 5°C og mister derfor deres krystallinske form. Kærgården består af 75% mælkefedt og 25% rapsolie. I denne proces vil der også blive frigivet vand, som var med til at blødgøre produktet. Når smørret størkner igen ved 5°C , krystalliserer de faste fedtstoffer(mælkefedtet) relativt hurtigt, hvilket leder til mange små krystaller. Dette gør produktet mere fast, da krystallerne nu er pakket tættere. Derudover sker størkningen heller ikke under en kontrolleret proces, som når det bliver fremstillet, hvilket også resulterer i et hårdere produkt.

Konklusion

Der kan konkluderes, at kakaosmør under første smeltning smelter ved 38°C , mens det smelter ved 22°C ved anden smeltning. Dette er fordi β -polyforme krystaller ikke er blevet dannet imellem de to opvarmninger.

Kokosfedt har et smeltepunkt på 26°C ved anden opvarmning. Under første opvarmning er produktet smeltet og derfor er smeltepunktet svært at konkludere.

Chokolade 1 er smeltet ved en temperatur på 38°C , og chokolade 2 er smeltet ved 31°C . Forskellen mellem smeltepunkterne skyldes de polymorfe krystaller i chokoladerne. Dermed har chokolade 1 en bedre kvalitet end chokolade 2.

Ved analyse af kokosfedt vha. LF-NMR kan det ses, at fedtet begynder at smelte ved 7°C og er fuldstændig smeltet ved 30°C , da SFC% er 0. Ved tilsætning af rapsolie falder SFC%, idet der dannes et blandingsprodukt. Blandingsproduktet har et lavere smeltepunkt, da rapsolien har et lavere smeltepunkt end kokosfedt grundet flere umættede fedtsyrer.

Sofie Lentz Adersen (KFT)
Sofie Munch Agerskov (BT-Dip)
Vatunyu Pimkeeree Bruuse (KFT)
Mykola Franckuk (KFT)
Nicolai Skjødt (KFT)

Gruppe 10

Referencer

CALIGIANI, A., MARSEGLIA, A. & PALLA, G. 2015. *Cocoa: Production, Chemistry, and Use*. Elsevier Ltd.
DAMODARAN, S. & PARKIN, K. L. 2017. *Fennema's Food Chemistry*, London, CRC Press.
FORSKNINGSGRUPPEN FOR ERNÆRING, B. O. S. 2022. Frida fooddata.dk. DTU Fødevareinstituttet.

PowerPoint fra lektion 9. Lipidkrystallisering 2022

Bilag

Bilag 1: SFC% for kokosfedt ved forskellige temperaturer

Temperatur	SFC%
5°C	76,677
10°C	74,926
20°C	39,745
30°C	0,481

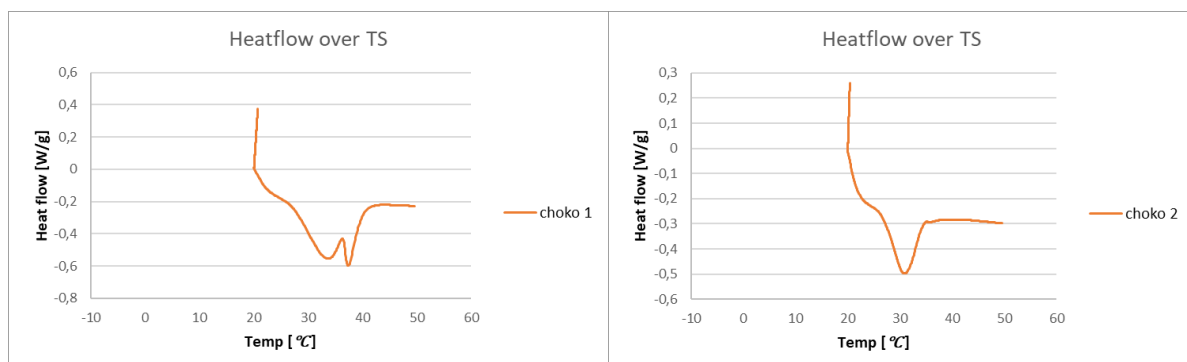
Bilag 2: SFC% for kokosfedt efter tilsætning af forskellige mængder rapsolie

Procentdel rapsolie tilføjet	SFC%
1%	80,154
2%	78,835
4%	78,209
8%	74,754
10%	73,09

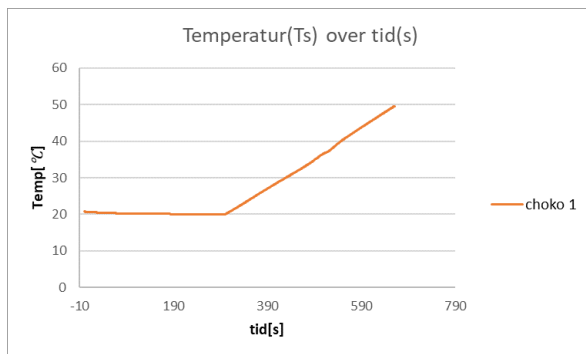
Bilag 3: Vægt for prøverne benyttet til DSC

Prøver	Choko 1	Choko 2	Kakao	Fedt
Vægt, g	18,63	14,29	15,13	14,45

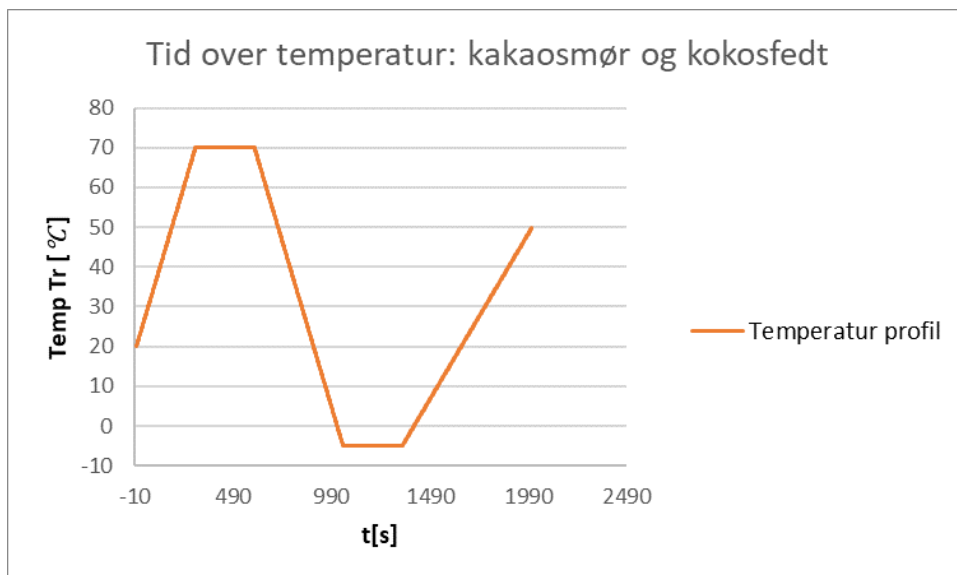
Bilag 4: smeltning af chokolade 1 og 2/ varme optagelse for chokolade 1 og 2



Bilag 5: Temperatur profil for chokolade 1 og 2



Bilag 6: Temperaturprofil for kakaosmør og kokosfedt



Bilag 7: Heatflow for kokosfedt og kakaosmør

