

Tørstoftab ved opvarmning af kløvergræs, forårsaget af iltning og af Maillard-reaktionen

Af M. NISSEN

Bliver hø og andet lignende materiale kørt ind før det er tilstrækkeligt tørt, er det almindelig kendt, at det har tilbøjelighed til at blive varmt, og under gunstige betingelser for varmedannelsen kan der ske selvantændelse i høet. Da bakterier og svampe dør ved en temperatur, der er meget lavere end den, der ofte forekommer i hø, må det formodes at være en kemisk reaktion, der virker uafhængig af mikroorganismerne, som forårsager varmeudviklingen ved over ca. 70°C.

Det er påvist, at kløvergræs, der varmes op til 50-60°, begynder at fraspalte vand + CO₂, idet den såkaldte Maillard-reaktion kommer igang.

Om denne reaktion og dens indflydelse på tørstofbestemmelser i plantestoffer gives her en kort oversigt.

MAILLARD har i 1912 påvist, at stoffer, der indeholder monosaccharider sammen med aminosyre, ved opvarmning til 40-150°C fraspalter vand + CO₂ i forholdet 12 dele vand + 1 del CO₂ og samtidigt brunfarves. Der findes en omfattende litteratur angående denne reaktion. Et sammendrag af det vigtigste findes hos: »DANEHY, J. P. a. W. W. PIGMANN: Reactions between sugars and nitrogeneus compound and their relationship to certain food problems. *Advances in Food Research* 3:241-290. 1951« og »ELLIS, G. P.: The Maillard Reaction. *Advances in carbohydrate chemistry* 14:63-134. 1959.

Blandes hexoser med aminosyrer og passende vand, går de i forbindelse med hinanden og danner ubestandige stoffer, som i det følgende benævnes sukker-aminosyre-kondensater. I en op-

løsning der indeholder hexoser sammen med aminosyrer opstår der en ligevægtstilstand og vi har:



Ved fortynding af opløsningen vil mere og mere af sukker-aminosyre-kondensatet forsvinde efterhånden, som der fortyndes. Det er meget ustabile stoffer, der ved opvarmning til 60-120°C kan påvises ved CO₂-udvikling og brunfarvning. Sukker-aminosyre-kondensaterne er meget almindelige i planter, og ved de undersøgelser af plantedele, der er foretaget ved Tylstrup, er hver gang påvist udvikling af CO₂, men i meget forskellig mængde. Samtidigt med at der udvikles CO₂, forsvinder der tørstof. Ved at opvarme korn til 110° er det ret små mængder tørstof, der forsvinder som vand + CO₂, medens der fra kálroer kan forsvinde over 20 pct. af tørstoffet, idet kálroer har et stort indhold af sukker-aminosyre-kondensat. Ved opvarmning til 80-100° i en almindelig tørreovn, er det ikke muligt at udføre en nøjagtig tørstofanalyse i et materiale med stort indhold af sukker-aminosyre-kondensat. Tørres der ved under 50° i en egnet vakuumovn, er det derimod ikke vanskeligt at udføre en nøjagtig tørstofbestemmelse i et sådant materiale. Kálroer tørret 15-20 timer ved 40-50° i vakuum vil indeholde ca. 0,5 pct. vand, og tørres derefter 3-5 timer i vakuum ved 70-75°, vil den rigtige tørstofprocent findes uden større fejl. I vakuum kan Maillard-reaktionen vanskeligt komme i gang i omtrent vandfrit materiale. Ved tørring i vakuum må den udviklede vanddamp bortskaffes enten med vandsugende stof eller ved kølekondensering. Ved en temperatur på +10° kan vanddamp kondensere så fuldstændigt, at kun ganske små mængder vand kan opsuges i et rør med tørt kalciumklorid. Selv om der køles med 8-10° varmt ledningsvand, er kondenseringen af den dannede vanddamp så fuldstændig, at vandet ikke virker skadeligt på vakuumpumpen. Kølekondensering er derfor langt at foretrække for brug af vandsugende stoffer.

Det er ikke bekendt, at nogen tidligere har sat vanskelighederne ved gennemførelse af nøjagtige tørstofbestemmelser i plantemateriale i forbindelse med stofnedbrydningen som følge af Maillard-reaktionen.

Det synes ikke påvist, at Maillard-reaktionen er en varmfrem-

bringende proces, men hvis det er Maillard-reaktionen, der fremkalder selvantændelse i hø, må den være varmefrembringende, og da hø jo isolerer godt, vil selv en forholdsvis ringe varmetoning være i stand til at frembringe en stor temperaturforøgelse.

For om muligt at belyse dette forhold, er der ved Tylstrup foretaget nogle orienterende undersøgelser. Materialet, der skulle undersøges, anbragtes i en erlenmeyerkolbe, som blev sat i en elektrisk termostat. Gennem termostatens ventil førtes ledninger til kolben, hvorigennem der blev suget en for vand og CO_2 befriet luftstrøm. Luften fra kolben befriedes for vand ved at blive ledet gennem en afkølet kolbe og et rør med tør klorkalcium, og derefter befriedes luften for CO_2 ved at passere enten natronkalk eller bariumhydroxyopløsning.

Et blindforsøg gennemført i 8 timer ved 50° gav ingen uklarhed i en bariumhydroxyopløsning. Der udførtes derefter nogle forsøg med rent kløver og rent græs, der forud var tørret ved under 50° til et indhold på ca. 10 pct. vand og derefter malet. Ved opvarmning afgav disse prøver CO_2 , og der var en tendens til, at græs afgav lidt mere CO_2 end kløver.

25 g stof afgav ved opvarm. til $50-55^\circ$ ca.	0.7 mg CO_2 pr. time
25 « « « « « 80° «	10.0 « « « «
25 « « « « « 100° «	70.0 « « « «

Ved $50-55^\circ$ er CO_2 -udviklingen målt i ca. 20 timer. Det tager temmelig lang tid for CO_2 -udviklingen at komme rigtig i gang. Ved 100° er CO_2 -udviklingen kun målt ca. $\frac{1}{4}$ time, men efter at have nået fuld styrke. Luftgennemstrømningshastigheden holdtes på 1-5 liter i timen, og for det meste på ca. 1 liter i timen. Sker der ingen iltning, og anlægget fungerer uden fejl, vil den samlede vægt af de ca. 25 g stof i arbejde ikke forandres, idet vand og CO_2 , der stammer fra fordampning og spaltning af sukker-aminosyre-kondensat, bliver opsamlet. Vægt af stof i kolben + vægt af opsamlet vand + CO_2 vil stadigt give udgangsvægten. Vægtsvind for stof i kolben = vægt af opsamlet vand + CO_2 .

Der var god overensstemmelse mellem svindet i kolbens vægt og vægten af det opsamlede vand + CO_2 . Ved Maillard-reaktionen optages ikke ilt, og der fraspaltes kun vand + CO_2 , hvorfor der

kan blive god overensstemmelse mellem vægtsvindet for den opvarmede prøve i kolben og vægten af det opsamlede vand og CO₂.

I nyslået kløvergræs sker ofte et stort tørstoftab, særligt hvis det pakkes sammen, så det bliver varmt. Herved kan tørstofprocenten falde 1-2 i løbet af 1-2 døgn. Maillard-reaktionen kommer sædvanligt ikke i gang før ved ca. 60° og i fugtigt materiale ved endnu højere temperatur, så det er usandsynligt, at den kan fremkalde det store tab. Det første tab kan også vanskeligt tænkes fremkaldt af mikroorganismer, da der ikke ses spor af deres virksomhed.

For at belyse forholdet, blev en helt frisk prøve kløvergræs skåret meget fint, og ca. 200 g deraf pakkedes fast i en kolbe og anbragtes i forbindelse med den foran omtalte opstilling i termostat ved 50-55°. Resultatet blev overraskende, idet vægten af opsamlet vand + CO₂ var langt større end vægtsvindet af stoffet i kolben. Ved at opvarme vejret kløvergræs, der kun indeholdt 36 pct. vand, fandtes kun ringe CO₂-udvikling, og ingen vægtforøgelse. (Prøve 4). Ved at suge luften ud af en prøve af frisk kløvergræs og opvarme den under vakuum, fandtes ingen udvikling af CO₂ og ingen væsentlig vægtforøgelse (Prøve 3). I tabel 1 er vist nogle resultater fra undersøgelsen.

Det blev undersøgt, om der ved forsøget kunne påvises en tem-

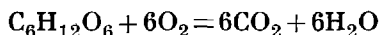
Tabel 1. Vand og CO₂-udviklingen ved opvarmning af kløvergræs

Prøve nr.		Dato	pct. tørstof	g. i arbejdet	Tørring		Fundet g pr. 100 g i arbejde				
					ant. timer	temp.	svind i kolbe	opsamlet			opt. ilt. be- regn.
								vand	CO ₂	ialt	
1	Frisk kløvergræs	13/6	20	208.2	18	50-65°	1.43	1.73	0.31	2.04	0.61
2	» »	19/6	24	190.4	7	50-55°	0.18	0.52	0.45	0.97	0.79
2	» » fortsat	20/6			7	56°	1.27	0.87	0.61	1.48	0.21
2	» » »	21/6			15	65°	2.64	2.38	0.59	2.93	0.28
2	» » »	21/6			4	90°	3.18	3.12	0.00	3.12	0.00
3	» » tørret i vakuum	21/6	24	225.1	19	6 tim. 65° 13 tim. 20°	37.04	37.09	0.00	37.09	0.05
4	Vejret kløvergræs	22/6	64	116.1	17	50°	1.58	1.47	0.07	1.54	0.01
4	» » fortsat	23/6			7	90-100°	11.04	10.66	0.45	11.11	0.07

peraturstigning i kolben, idet der blev anbragt et termometer midt i kolben. Selv om der for nogle af prøverne påvistes en kraftig iltning af stoffet, kunne der dog ikke påvises nogen sikker temperaturstigning.

Da varmetoningen ved Maillard-reaktionen må antages at være langt mindre end ved den i undersøgelsen påviste iltning, vil det antagelig være vanskeligt at påvise en eventuel varmetoning ved Maillard-reaktionen.

De to første prøver i tabel 1 viser, at der i nysået, fintskåret kløvergræs sker en kraftig iltning ved opvarmning til 50°. Medens der for et lignende materiale, tørret ved under 50°, til et indhold på ca. 10 pct. vand, er særdeles god overensstemmelse mellem vægtsvindet af stof i kolben og fraspaltet vand + CO₂, er der for prøve 1 og 2 stor vægtforøgelse, og denne kan vanskeligt stamme fra andet end en iltoptagelse. For prøve 2 er der foretaget vejninger flere gange. Iltoptagelsen har været størst den første dag, og det må antages, at en del af det dannede vand er blevet i kolben med kløvergræsset. Det samme gælder for CO₂. Kløvergræsset i kolben var fast sammenpresset, og den første iltning må antages at stamme fra ilten i massen. Ved afslutningen af forsøget med prøve 1 har der muligvis endnu været en del CO₂ i stoffet i kolben, da der kun er sket en ringe fordampning. Regnes der med iltning af kulhydrater efter formelen:



skulle der i prøve 1 være dannet 0,84 g CO₂, og der er kun fundet 0,31 g CO₂. For prøve 2 skulle der være dannet 1,76 g CO₂, og der er fundet 1,65 g. Ved Maillard-reaktionen dannes der langt mere vand end CO₂, og muligvis kan der også ved iltning forekomme en større vanddannelse end vist i den anførte formel, da iltoptagelsen sikkert er en ret indviklet proces. Maillards opgivelse af, at der dannes 12 dele vand for 1 del CO₂ må tages med forbehold. Ved nærmere undersøgelser har mængdeforholdet mellem vand og CO₂ været meget vekslende, og sædvanligvis findes der betydeligt mere CO₂ end Maillard opgiver. Ved 65° fortsætter iltoptagelsen, medens den synes helt at være standset ved 90°, og Maillard-reaktionen synes ikke at være kommet i gang. For at undersøge hvordan opvarmningen uden ilt virker på en prøve

svarende til prøve 2, opvarmedes prøve 3, efter at luften var suget ud, og der altså ikke kunne ske en iltning af stoffet. Der blev ikke fundet CO_2 -udvikling og ingen sikker vægtforøgelse. Temperaturen i stoffet steg på grund af en kraftig fordampning ikke til mere end $20-40^\circ$, selv om der i 6 timer var varmet op til 65° .

Prøve nr. 4 stammer fra nyligt stakket kløvergræs med et indhold af 36 pct. vand. Ved at opvarme 17 timer til 50° , blev der ingen vægtforøgelse og kun ganske ringe CO_2 -udvikling. Ved opvarmning 7 timer til $90-100^\circ$ blev der heller ingen sikker vægtforøgelse, men derimod en ret kraftig udvikling af CO_2 , så Mailard-reaktionen var kommet i gang. De refererende undersøgelser har et meget begrænset omfang, men muligvis har de betydning med hensyn til at finde de rigtige metoder ved ensilering. Det må formodes, at den påviste iltning har interesse for gennemførelse af en god ensilering af kløvergræs og lignende afgrøder, idet ilten i materialet vil blive forbrugt til dannelse af CO_2 . Derved vil betingelserne for de fleste mikroorganismer blive ugunstige, dels på grund af iltmangel og dels på grund af kulsyreens virkninger. Når der opnås et gunstigt resultat ved at ensilere materiale, der nyligt er høstet med grønthøster, skyldes det muligvis i nogen måde, at ilten i et sådant materiale særlig let omdannes til CO_2 . Når der ligeledes kan opnås forholdsvis gunstige resultater ved at presse temmeligt grønt hø i store faste baller, skyldes det muligvis også, at der kommer en iltning i gang. Ligeledes har undersøgelserne interesse med hensyn til at udføre rigtige tørstofbestemmelser. Det er en gammel erfaring, at det er vanskeligt at udføre nøjagtige tørstofanalyser i grønne, skårne afgrøder ved at tørre 200 g eller mere i bakker. Uden påviselig grund bliver der ofte dårlig overensstemmelse mellem fællesprøverne. Særligt har det været galt med majs og især, når en ovn fyldtes helt med prøver. Ud fra tabel 1 kan dette forhold forklares. I stærkt sønderdelt materiale som majs, vil der ved moderat opvarmning ske en kraftig iltning, som først standser, når materialet enten bliver for tørt eller for varmt. Da der sker en fordampning og derved en afkøling af det fugtige materiale, er det vanskeligt at nå så høj temperatur, at iltningen standser. Materialet kan ikke fordeles helt ensartet i bakkerne, og derfor vil iltningen ikke blive

ensartet for fællesprøverne. Hele spørgsmålet trænger til en grundig undersøgelse.

Selv om de her refererede undersøgelser er meget begrænsede, er der grund til at offentliggøre dem, da de berører vigtige spørgsmål, der vil have interesse for større kredse. For kløvergræs og og lignende afgrøder bør iltningen undersøges ved forskellige temperaturer helt ned til 15-20°, og Maillard-reaktionen ved 50-110°.

KONKLUSION

Undersøgelserne har vist, at det ikke var muligt, med det til rådighed stående apparatur, med sikkerhed at påvise en varmeudvikling i en kolbe med så lille indhold som 200 g kløvergræs. For at påvise en eventuel varmeudvikling ved Maillard-reaktionen, vil det formodentlig være nødvendigt at opvarme en ret stor mængde materiale i en isoleret beholder, hvori der er anbragt et maximumtermometer.

Desuden viste undersøgelsen en uventet vægtforøgelse af stoffet. Denne kan vanskeligt tænkes at stamme fra andet end en ilt-optagelse, og undersøgelsen viser, at der med det anvendte apparatur, kan føres nøje kontrol med omsætningen i en prøve. Både for ensilering og for tørstofbestemmelse er det af betydning at få undersøgt denne omsætning nærmere.

Maillard-reaktionen og iltningens indflydelse på tørstofbestemmelser kan herved blive kendt ved forskellige temperaturer. Ved ret omfattende kontrolanalyser på forskellige laboratorier, har det vist sig vanskeligt at få god overensstemmelse mellem tørstofbestemmelser. Der synes derimod at kunne opnås tilfredsstillende overensstemmelse for kvælstofbestemmelse og andre analyser, når prøverne tilsendes afvejete. Da analyseresultater sædvanligt angives i pct. af tørstof, er det nødvendigt at tørre analyseprøverne rigtigt for at opnå nøjagtige resultater. Tørres der i vakuum ved en passende temperatur, kan både Maillard-reaktionen og iltning undgås, og der kan derfor, når der tørres tilstrækkeligt, udføres en nøjagtig tørstofbestemmelse. For at få et sikkert mål for Maillard-reaktionens og iltningens indflydelse på tørstofbestemmelsen, vil det være nødvendigt at sammenligne med tørring i vakuum.

SAMMENDRAG

Allerede 1912 har MAILLARD påvist, at hexoser + aminosyre + vand danner stoffer, der ved opvarmning spaltes til vand + CO_2 og brunfarves. Disse stoffer er her betegnet »sukker-aminosyre-kondensater«. De synes at findes i alle planter, men i meget forskellig mængde, og da de ved opvarmning til over 60° spaltes og derved forårsager tørstofftab, vanskeliggør de tørstofbestemmelse i plantestoffer. Kålroer har et stort indhold af sukker-aminosyre-kondensater, så allerede ved opvarmning til 80° sker et betydeligt tørstofftab, og ved opvarmning til 110° kan mere end 20 pct. af tørstoffet gå tabt. Også græs har et stort indhold af sukker-aminosyre-kondensater, og ved opvarmning af hø til omkring 60° , er der mulighed for, at Maillard-reaktionen kan komme i gang. Det må anses for muligt, at selvantændelse i hø skyldes Maillard-reaktionen. For om muligt at påvise en varmetoning ved Maillard-reaktionen, opvarmedes 200 g fint skåret, friskt kløvergræs til ca. 50° i et apparat, hvor fraspaltning af vand og CO_2 kunne måles. Der viste sig en ret betydelig vægtforøgelse for vægten af stof i arbejde + fraspaltet vand + CO_2 , og denne vægtforøgelse kan formodentlig ikke stamme fra andet end en iltning. Selv om der skete en iltning, kunne der ikke påvises en sikker temperaturstigning i stoffet, så det må formodes, at det bliver nødvendigt at arbejde med forholdsvis store stofmængder, for at påvise en varmetoning ved Maillard-reaktionen. Den påviste kraftige iltning af friskt kløvergræs må antages at spille en rolle ved ensilering og ved tørstofbestemmelse. Iltningen kunne hindres ved at suge luften fra prøven med en vakuumpumpe, og ligeledes ved at kløvergræsset vejredes, så vandindholdet kom ned på 36 pct. For at udføre en rigtig tørstofbestemmelse, er det nødvendigt at kende forholdene med hensyn til iltning og Maillard-reaktionen i det materiale, der skal undersøges.

SUMMARY

Loss of dry matter by heating of clover grass caused by oxidation and by the Maillard-reaction.

Already in 1912 MAILLARD proved that hexoses+amino acid+water develop substances which by heating will decompose into water+CO₂ and assume a brown colour. In the following these substances are called "sugar-amino-acid-condensates". They seem to be found in all plants, but in varying quantities, and as by heating to a temperature of over 60°C they are decomposed, thus causing a loss of dry matter, they make it difficult to have the content of dry matter of vegetable matters determined.

Swedes contain a considerable quantity of sugar-amino-acid-condensates, and already heating to a temperature of 80°C will cause a considerable loss of dry matter. By heating to 110°C, more than 20 per cent of the dry matter may be lost. Grasses equally have a great content of sugar-amino-acid-condensates, and by heating of hay to about 60°C, there is a possibility that the Maillard-reaction will start. It must be regarded very likely that spontaneous combustion in hay is due to the Maillard-reaction.

In order to establish – if possible – a heat content change during the Maillard-reaction, 200 grammes of finely cut, fresh clover grass was heated to a temperature of about 50°C in an apparatus in which it was possible to measure the decomposition into water and CO₂. There proved to be a rather considerable increase in the weight of the remaining matter+decomposed water+CO₂ and this increase in weight can probably be due to nothing but an oxidation. Even if an oxidation took place, no certain increase of temperature could be detected in the matter, so it seems to be necessary to use relatively large quantities of the matter to be able to establish a heat content change during the Maillard-reaction.

The considerable oxidation of fresh clover grass which was detected must be supposed to be of importance by ensiling and determination of the dry matter percentage. Oxidation could be prevented by drawing the air from the sample by means of a vacuum pump, or by tedding the clover grass thus reducing the content of water to 36 per cent. In order to undertake a correct determination of the dry matter percentage, it will be necessary to know the conditions determining the oxidation and the Maillard-reaction of the material which should be examined.