

**Teilprojekt 4.1.2:** Ernährungsphysiologische Evaluierung von Polyenfettsäuren und Resveratrol in Rapsöl (Arbeitsgruppe Schwarz)

**Förderkennzeichen:** 12252L

**Zuwendungsempfänger:** Christian-Albrechts-Universität Kiel  
Ohlshausenstr. 40  
24098 Kiel

**Ausführende Stelle:** Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde,  
Lebensmitteltechnologie,  
Heinrich-Hecht Platz 10, 24118 Kiel

**Projektleiter:** Prof. Dr. K. Schwarz

**Laufzeit des Verbundprojektes:** 01.11.2001 bis 31.10.2005

Schlussbericht

---

## I Kurze Darstellung

### 1 Aufgabenstellung

1.1 Überprüfung der Ölstabilität von niedriger (5%) und höher (12%) angereicherten Ölen mit langkettig, hochungesättigten Fettsäuren (LCPUFA) unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

Der zunehmende Gehalt an LCPUFA geht mit einer erhöhten Oxidationsempfindlichkeit der angereicherten Öle einher. Es sollte daher überprüft werden, ob die alleinige Erhöhung der Tocopherolkonzentration ausreichend ist, die Öle zu stabilisieren (Lagerung bei 40°C unter Lichtausschluss) bzw. mit welchen Ölstabilitäten bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen dieser dotierten Öle zu rechnen ist (Lagerung bei Raum- und Kühlschranktemperatur, Lichteinwirkung und -ausschluss)

1.2 Qualitätsmonitoring der Öle und Ölprodukte während der Tier- und Humanstudien

Entscheidende Voraussetzung für die Aussagekraft der durchgeführten Tier- und Humanstudien ist eine einwandfreie und durchgängig gleichbleibende Qualität der Modellöle bzw. der daraus hergestellten Produkte. Daher wurde ein Monitoring der eingesetzten Ölprodukte parallel zu den Studien unter äquivalenten Lagerungsbedingungen (Temperaturen, Licht, Zeit) durchgeführt.

### 1.3 Bedeutung rapseigener Phenole zur Stabilisierung von angereicherten Ölen und Ölprodukten gegenüber einer erhöhten Lipidoxidation

Im Raps nativ vorkommende Antioxidantien sollten genutzt werden, um die angereicherten LCPUFA im Öl und in den Ölprodukten zu schützen mit gleichzeitigem Verzicht auf eine potentielle Anreicherung mit anderen Antioxidantien, um zu einer Nachhaltigkeit des Projektes sinnvoll beizutragen. Dazu wurden sowohl einzelne Extrakte aus dem Rapspresskuchen und dem Öl hergestellt als auch einzelne Fraktionen aus den Extrakten gewonnen. Diese Fraktionen wurden auf ihr antioxidatives Potential untersucht und aktive Fraktionen in Ölen und Ölprodukten auf ihre Effizienz hin getestet.

### 1.4 Stabilisierung gegenüber einer erhöhten Lipidoxidation in angereicherten Modellmargarinen durch gezielt eingesetzte, margarinetypische Lebensmittelinhaltsstoffe

Die Stabilisierung von LCPUFA in Ölprodukten wurde am Beispiel von Modellmargarinen durch den Einsatz margarinetypischer Lebensmittelinhaltsstoffe vorgenommen. Dazu wurde zum einen der Einfluss verschiedener Emulgatoren, Hydrokolloide, Synergisten und Salzkonzentrationen auf die Aktivität von (rapseigenen) Antioxidantien überprüft und zum anderen deren Auswirkung auf die Freisetzung sekundärer Oxidationsprodukte (Bildung des Off-Flavours) untersucht.

## **2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Es lagen umfangreiche Erfahrungen in der Beurteilung der Oxidation von lipidhaltigen Lebensmitteln und der Stabilisierung von komplexen lipidhaltigen Systemen vor. Im Rahmen des EU-Projekts (FAIR CT-95-0158) wurden die etablierten Methoden mit denen anderer europäischer Forschungseinrichtungen verglichen und umfangreiche Kenntnisse über den Einsatz von Antioxidantien aus pflanzlichen Rohstoffen zur Stabilisierung lipidhaltiger Systeme erworben. Folglich waren für die geplanten Vorhaben sowohl die personellen als auch die apparativen Voraussetzungen gegeben.

## **3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Die Qualität der hoch ungesättigten Öle und Ölprodukte ist die entscheidende Voraussetzung für eine gesundheitliche Unbedenklichkeit und eine geschmackliche Akzeptanz von neuartigen Produkten. Die Anreicherung von Rapsöl mit langkettigen, hoch ungesättigten Fettsäuren (LCPUFA) führt zu einer deutlichen Abnahme der Ölstabilität und eine starke Off-Flavourbildung kann hervorgerufen werden, die mit marinen Ölen vergleichbar ist (Frankel et al., 2002). Bei der oxidativen Schädigung von hoch ungesättigten Fettsäuren werden primäre und sekundäre Lipidoxidationsprodukte gebildet. Zur Bestimmung primärer Oxidationsprodukte sind zahlreiche photometrische Methoden am Lehrstuhl etabliert (Stöckmann et al. 2000). Einerseits kann der Anstieg an konjugierten Dienen erfasst werden, die durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 234 nm quantifizierbar ist. Andererseits können gebildete Lipidhydroperoxide mit Hilfe der

Oxidation von Eisen(II)-Ionen zu Eisen(III)-Ionen nachgewiesen werden, die mit Thiocyanat einen rötlich gefärbten Komplex bilden und so photometrisch bei 485 nm vermessen werden können. Als Marker für sekundäre Oxidationsprodukte von  $\omega$ -3-Fettsäuren ist das Aldehyd Propanal geeignet (Frankel et al., 1994), was in Anlehnung an der am Lehrstuhl etablierten Methode (Headspace-Gaschromatographie) zur Bestimmung von Hexanal für  $\omega$ -6-Fettsäuren (Schwarz et al., 2000) modifiziert werden konnte.

Aus Studien von Lampi et al. (1999) sowie Kulas und Ackmann (2001) war bekannt, dass die Stabilisierung von Ölen mit Tocopherolen nur in begrenztem Maße möglich ist. Die gilt insbesondere für alpha-Tocopherol, für das in Fischölen eine maximale Aktivität von 100 ppm festgestellt wurde und eine weitere Erhöhung der Konzentration zu einer Abnahme der Wirksamkeit führt. (Für gamma-Tocopherol liegt das Konzentrationoptimum bei 500 ppm). Aus diesem Grund war es von Interesse phenolische Antioxidantien, die ebenfalls im Raps vorkommen auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Rapspresskuchen zeichnet sich durch einen Gehalt von ca. 1,5% phenolischen Komponenten als eine interessante Quelle aus Kozłowska and Zadernowski, (1988); Bouchaereu et al. (1991).

Extrahierte und isolierte Antioxidansfraktionen aus Rapspresskuchen und Rapsöl konnten hinsichtlich ihres antioxidativen Potentials gegenüber dem stabilen Radikal ( $\alpha,\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -Picrylhydrazyl; DPPH) gescreent werden, da die Aktivitäten von Antioxidantien gegenüber DPPH überwiegend vergleichbar sind mit der Inhibierung der primären Lipidoxidationsprodukten in homogenen Systemen wie Ölen (Schwarz et al. 2001).

Der Einsatz von Antioxidantien in heterogenen Systemen wie Emulsionen ist jedoch problematisch, da die Aktivität der Antioxidantien wesentlich von der Art und den Eigenschaften der eingesetzten Lebensmittelinhaltsstoffe beeinflusst wird (Schwarz et al., 2000). Zum einen ist die Verteilung der Antioxidantien in den verschiedenen Phasen einer Emulsion maßgebend für deren Wirksamkeit, wobei das Verteilungsverhalten sowohl von der Molekülstruktur des Antioxidans als auch von Matrixbestandteilen der Emulsion wie z.B. des Emulgators beeinflusst wird (Stöckmann und Schwarz, 1999). Zum anderen konnte zwar die Phasengrenze als überwiegender Ort der Lipidoxidation charakterisiert werden (Barclay et al., 1995; Barclay and Vinqvist, 1994; Pryor et al., 1993), wobei allerdings eine höhere Anreicherung der Antioxidantien an der Phasengrenze in micellaren Systemen oder Emulsionen nicht zur erwarteten Aktivitätssteigerung führte (Stöckmann et al., 2000). Als Ursache für den erheblichen Verlust der Wirksamkeit von Antioxidantien wird das Eingehen von Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien und Matrixbestandteilen an der Phasengrenze angenommen. Verantwortlich werden dafür spezifische Interaktionen, wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen gemacht (Pryor et al., 1988), bei denen insbesondere die Wasserstoffatome der phenolischen Hydroxylgruppen involviert sind, so dass deren Abspaltung und eigentliche radikalreduzierende, antioxidative Funktion wesentlich beeinträchtigt ist (Iwatsuki et al., 1994; Stöckmann et al., 2000; Polewski et al., 2002).

Besonderer Fokus wurde daher auf die gezielte Auswahl von Matrixbestandteilen gelegt, so dass die Aktivität der Antioxidantien möglichst vollständig erhalten bleibt. Von besonderem Interesse

war es, den Einfluss von margarinetypischen Lebensmitteladditiven wie Emulgatoren, Hydrokolloide in Low-fat-Produkten, Synergisten und Salz auf die antioxidative Aktivität der Antioxidantien zu überprüfen.

#### **4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Das Saatgut „Libelle“ wurde von der DSV bereitgestellt, woraus das Rapsöl mit niedrigen  $\alpha$ -Linolengehalten von der PPM Magdeburg abgepresst wurde. Das Rapsöl wurde von der Union in Vlaardingen mit den von der BASF AG gelieferten Fettsäuren und Tocopherol angereichert und teilweise zu Margarinen verarbeitet. Die dotierten Öle und Ölprodukte wurden an die Uni Kiel/DFA (Arbeitsgruppe Erbersdobler/ Somoza) für die Tierstudien bzw. an die FH Münster für die Humanstudien geliefert. Repräsentative Proben dieser Produkte wurden an die Uni Kiel (Arbeitsgruppe Schwarz) für die Lagerungsstudien bzw. das Qualitätsmonitoring der Tier- und Humanstudien verschickt. Die Analytik der Fettsäurezusammensetzung, des Resveratrolgehalts und des Tocopherolgehalts in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Erbersdobler/Somoza entwickelt und etabliert. Für die FH Münster wurde die Oxidationsstabilität der Öl- und Margarineproben zusätzlich bei erhöhten Temperaturen untersucht, um die Qualität der erhitzten Speisen während der 1. Humanstudie zu überprüfen.

## **II. Eingehende Darstellung**

### **1 Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse**

#### **1.1. Untersuchung mit LCPUFA angereicherten Ölen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen**

##### **1.1.1 Methodenvergleich zur Hydroperoxidbestimmung**

In Ergänzung der Methodenetablierung zur Bestimmung von primären und sekundären Oxidationsprodukten wurde die Hydroperoxidbildung in Ölen mit unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzungen verglichen. Die Bestimmung der Hydroperoxide über die konjugierten Diene (CD) und die Bildung des Thiocyanatkomplexes wurden im letzten Zwischenbericht ausführlich beschrieben. Diesen Methoden wurde die Referenzmethode nach Wheeler (POZ) gegenübergestellt. Zur Durchführung wurden die Öle von Antioxidantien befreit und bei 40°C über mehrere Wochen oxidiert. In Tabelle 1 sind die Korrelationsfaktoren der einzelnen Methoden aufgeführt. Der Vergleich zwischen der Peroxidzahl nach Wheeler und der Hydroperoxidbestimmung über den Thiocyanatkomplex, welche beide auf der Reduktion der Hydroperoxidgruppe basieren, unterschieden sich im Mittel um einen Faktor von 3,3. Da diese Faktoren zwischen den Ölen mit unterschiedlichen Fettsäuren nur geringfügige Schwankungen aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass diese Methoden unabhängig von der Fettsäurezusammensetzung miteinander korrelieren. Die Ergebnisse der Thiocyanatmethode sind daher ebenso verlässlich, jedoch um den Faktor 3,3 empfindlicher. Die Vorteile bei dieser Methode liegen weiterhin in der schnelleren und preisgünstigern Durchführung. Die größeren Schwankungen bei den Korrelationen von konju-

gierten Dienen mit der Hydroperoxidbestimmung über den Thiocyanatkomplex und der POZ lassen sich wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Messprinzipien zurückführen. Bei der Bestimmung von konjugierten Dienen werden auch andere Bestandteile die ihr Absorptionsmaximum bei 234 nm haben detektiert.

Tab. 1: Korrelationsfaktoren verschiedener Methoden zur Hydroperoxidbestimmung von Ölen mit unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzungen.

Öl	Thiocyanat <sup>a</sup> -POZ <sup>b</sup>		Thiocyanat <sup>a</sup> -CD <sup>c</sup>		POZ <sup>b</sup> -CD <sup>c</sup>	
	Faktor <sup>d</sup>	<i>r</i>	Faktor <sup>d</sup>	<i>r</i>	Faktor <sup>d</sup>	<i>r</i>
Fischöl	3.2	0.98	8.0	0.96	2.4	0.96
Leinöl	3.2	0.99	6.1	0.99	1.9	1.00
EPA/DHA <sup>e</sup>	3.1	0.99	6.7	0.99	2.2	0.99
Maiskeimöl	3.5	0.99	4.4	0.99	1.2	0.99
Rapsöl	3.3	0.97	7.2	0.96	2.1	0.99
Olivenöl	3.4	0.90	6.7	0.96	1.5	0.99

<sup>a</sup> Hydroperoxidkonzentration photometrisch bestimmt über den Thiocyanatkomplex bei 485 nm

<sup>b</sup> Hydroperoxidkonzentration jodometrisch bestimmt nach Wheeler

<sup>c</sup> Anstieg konjugierter Diene photometrisch bestimmt bei 234nm

<sup>d</sup> Steigung der Korrelationsfunktion nach Pearson, *r* = Korrelationskoeffizient

<sup>e</sup> Mit 5% EPA/DHA (1:1) dotiertes Rapsöl

### 1.1.2 Stabilität von Rapsölen angereichert mit ca. 5% LCPUFA

Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurden adäquate Proben der angereicherten Modellöle mit  $\alpha$ -Linolensäure (ALA), mit Eicosapentaensäure (EPA), Docosahexaensäure (DHA) und einem Gemisch aus gleichen Teilen an EPA und DHA (EPA/DHA) bei fünf unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Dabei entsprach die Lagerung bei  $-40^{\circ}\text{C}$  und  $-20^{\circ}\text{C}$  der Lagerung der Öle und des Tierfutters vor und während des Fütterungszeitraumes. Als weitere Lagerungstemperaturen wurden  $+4^{\circ}\text{C}$  als Kühlschrankschranktemperatur,  $+20^{\circ}\text{C}$  als Zimmertemperatur und  $+40^{\circ}\text{C}$  zur Überprüfung der Oxidationsempfindlichkeit der Öle gewählt. Untersucht wurden die Fettsäurezusammensetzung und der Oxidationsstatus anhand der primären und sekundären Lipidoxidationsprodukte. Dabei wurden die primären Oxidationsprodukte über den Anstieg der konjugierten Diene sowie über die Hydroperoxide (Thiocyanatkomplex mit Eisen(III)-Ionen) erfasst.

Der Oxidationsverlauf der bei  $+40^{\circ}\text{C}$  gelagerten Modellöle gibt einen Überblick über die Empfindlichkeit der mit  $\omega$ -3-Fettsäuren dotierten Öle (EPA, DHA, EPA/DHA) im Vergleich zu handelsüblichem Rapsöl (ALA). Das mit  $\alpha$ -Linolensäure angereicherte Öl weist einen Gesamtgehalt an C18:3 von ca. 9% auf, was einem handelsüblichen Rapsöl entspricht. Anhand der Oxidationsverläufe werden die unterschiedlichen Oxidationsgeschwindigkeiten deutlich (Abb.1). Während ALA eine sehr viel längere Induktionsperiode sowie einen flacheren Anstieg aufweist, oxidieren die mit  $\omega$ -3-Fettsäuren dotierten Öle mit einer wesentlich verkürzten Induktionsperiode und schnellerer Geschwindigkeit aufgrund ihrer höheren Anzahl an Allylgruppen. Ein Unterschied zwischen EPA und DHA bzw. ihrem Gemisch konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die entsprechenden Proben, analysiert auf den Gehalt an konjugierten Dienen, zeigten den gleichen Oxidationsverlauf (ohne Abb.). Daraus wird ersichtlich, dass die Stabilität eines Rapsöls durch die An-