

Einfluss der Verarbeitung auf den CLA-Gehalt – Untersuchungen im Rahmen eines EU-Projektes

B. Rehberger¹, W. Bisig^{1,2}, U. Bütikofer¹, M. Collomb¹ und P. Eberhard¹

¹ Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern

² Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft, Länggasse 85, CH - 3052 Zollikofen

brita.rehberger@alp.admin.ch

Zusammenfassung

Bei den Konsumentinnen und Konsumenten steigt die Nachfrage nach Nahrungsmitteln mit einem natürlichen ernährungsphysiologischen Vorteil gegenüber vergleichbaren konventionellen Produkten. Als Teil eines EU-Projektes untersuchte ALP am Beispiel der konjugierten Linolsäuren (CLA) den möglichen Einfluss von Verarbeitungsprozessen auf ernährungsphysiologisch wertvolle Milchhaltsstoffe. In welchem Ausmass die Verarbeitung den CLA-Gehalt des Endproduktes beeinflusst, wurde dabei zunächst mit Hilfe einer Literaturrecherche und eigenen Untersuchungen über biologisch und konventionell erzeugte Butter bestimmt. Des Weiteren wurden an ALP und der Universität Kassel diverse Methoden zur Bestimmung der oxidativen Stabilität von Butter entwickelt und die Lagerstabilität von CLA-angereicherter und konventioneller Butter untersucht. Das dritte Ziel bestand darin, ein Verfahren für eine schonende (low-input) Anreicherung von CLA in Milchfett zu entwickeln. Einer der zahlreichen den CLA zugeschriebenen Vorteile liegt darin, dass sie als Anti-Krebs-Wirkstoffe gelten.

Einleitung

Die Europäische Union finanziert im Rahmen des Schwerpunktthemas Lebensmittelqualität und –sicherheit mit 18 Mio. Euro das Projekt Quality Low Input Food. Dieses Projekt setzt sich zum Ziel, die Qualität, die Sicherheit und die Produktivität von schonend (low input) erzeugten Nahrungsmitteln zu verbessern. Diese Forschung umfasst die gesamte Nahrungsmittelkette von der Weide auf den Teller. Das Projekt soll zu einer Verbesserung der Wettbewerbsfähigkeit des Bio-Sektors beitragen und schliesslich den europäischen Verbrauchern und Bio-Landwirten von Nutzen sein. An diesem Projekt beteiligen sich europaweit 34 Forschungsanstalten, Universitäten und Industriepartner.

Das für ALP massgebliche Teilprojekt befasste sich mit dem Thema Verarbeitungsstrategien, dabei wurden mögliche Auswirkungen der Verarbeitung auf ernährungsphysiologisch wertvolle Milchhaltsstoffe am Beispiel der konjugierten Linolsäuren (CLA, Conjugated Linoleic Acids) untersucht.

Jüngste Studien zeigen, dass konjugierte Linolsäuren, welche natürlicherweise in Milch und Milchprodukten vorkommen, möglicherweise anti-mutagene, Krebs hemmende, antidiabetische und Arteriosklerose hemmende Wirkungen auf die Humangesundheit ausüben. Verarbeitungsstandards für biologische Nahrungsmittel zielen darauf ab, die spezifischen bioaktiven oder funktionellen Komponenten der Rohstoffe zu bewahren oder anzureichern und Verarbeitungsmethoden zu untersagen, die gegebenenfalls den Nährwert beeinträchtigen.

An ALP wurde daher innerhalb des EU-Projektes in einer ersten Studie der Einfluss der Verarbeitung auf den CLA-Gehalt der Endprodukte untersucht. In einer weiteren Studie wurde an ALP die Lagerstabilität von CLA-reicher Butter mit der von konventioneller Butter verglichen und die Veränderungen mit chemischen, sensorischen und so genannten ganzheitlichen Methoden (Biokristallisationsmethode) überprüft. In einer dritten Studie wurde ein Verfahren evaluiert, das ermöglicht, CLA in Milchfett gezielt und schonend anzureichern, mit dem Ziel, dieses Wissen der Lebensmittelindustrie zugänglich zu machen.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Studien 1 und 3 aufgeführt.

Einfluss der Milchverarbeitung auf den CLA Gehalt

Ziel der ersten Studie war, einen Überblick über den momentanen Wissensstand zum Einfluss von Milchverarbeitung und Lagerung auf den CLA-Gehalt des Endproduktes zu vermitteln und dabei auf mögliche Unterschiede zwischen Milchprodukten biologischer und konventioneller Herkunft zu achten. Beim Vergleich biologischer und konventioneller Milchprodukte zeigte sich, dass biologische Milchprodukte einen um 14 bis 50 % höheren CLA-Gehalt und des Weiteren höhere Gehalte an Linolsäure, Trans-Vaccensäure, β -Carotin und α -Tocopherol aufwiesen. In neueren Forschungsarbeiten über die Wirkung von Erhitzungsschritten während der Milchverarbeitung und Lagerung wurden keine Veränderungen des CLA-Gehalts oder des CLA-Isomeren-Profiles beobachtet. In kommerziellen Milchprodukten, die einer Fermentierung unterliegen, wie Joghurt, Butter aus fermentiertem Rahm sowie Käse wurde kein Einfluss der Fermentierung auf den CLA-Gehalt oder das CLA-Isomeren-Profil beobachtet. Jüngste Studien zeigten bei Käse keine Veränderung des CLA-Gehalts während der Herstellung oder Reifung. Während der Herstellung von fermentierter Butter aus CLA-angereichertem Rahm blieb der CLA-Gehalt stabil. Dies wurde durch eigene Untersuchungen von Butter aus fermentiertem Rahm sowohl biologischen als auch konventionellen Ursprungs bestätigt. Bei diesen Versuchen zeigten sich signifikante Unterschiede der Gesamt-CLA-Gehalte zwischen Rahm aus Biomilch und konventionell hergestellter Milch (Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigene Untersuchungen von fermentierter Butter

Herkunft	n	CLA Rahm [g/100 g Fett]	CLA Butter [g/100 g Fett]	Differenz Butter - Rahm [g/100 g Fett]
Integrierte Produktion	7	1.35 ^{ax}	1.31 ^{cx}	-0.04
Bio-Produktion	5	1.54 ^{by}	1.48 ^{dy}	-0.06

a, b und c, d: Unterschiedliche Buchstaben in einer Spalte zeigen signifikante Differenzen an ($p < 0.005$); x, y: Unterschiedliche Buchstaben in einer Zeile zeigen signifikante Differenzen an ($p < 0.01$); n: Probenanzahl

In mehreren neueren Arbeiten im Labormassstab über probiotische Bakterien (Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus rhamnosus* oder *Lactobacillus acidophilus*, Propionsäurebakterien und Bifidusbakterien wie *B. breve* und *B. dentium* oder andere Stämme dieser Bakteriengruppen) konnte ein Anstieg der CLA beobachtet werden, wenn freie Linolsäure im Medium verfügbar war.

Mittels spezifischer physikalischer und chemischer Verfahren lässt sich der CLA-Gehalt in einer Fraktion steigern. Zu diesen Verfahren gehören die Trockenfraktionierung (15 bis 63%ige Zunahme), die Fraktionierung mit überkritischem Kohlendioxid (89%ige Zunahme) sowie die Harnstoff Komplexbildung (2.5-fache Steigerung). Mikrofiltration erhöhte den CLA-Gehalt hingegen nicht. (Bisig et al., 2007)

Fraktionierungsprozess zur Anreicherung von CLA

Milchfett eignet sich auf Grund seiner grossen Zahl an verschiedenen Fettsäuren sehr gut zur Herstellung von Spezialprodukten. Der Einsatz von Milchfett wird jedoch zum Teil durch seine thermischen Eigenschaften und die Schwankungen in Abhängigkeit der Tierfütterung begrenzt, da bei spezifischen industriellen Anwendungsbereichen konstante Produktqualität sowie definierte physiko-chemische Eigenschaften erforderlich sind. Um diesen begrenzten Einsatz von Milchfett zu überwinden, wird die Fraktionierung des Milchfettes angewendet.

Bei der Fraktionierung handelt es sich um ein Verfahren, welches erlaubt, aus dem Ausgangsfett mittels partieller Kristallisation in begrenzten Temperaturintervallen definierte Fraktionen zu gewinnen. Diese Temperaturintervalle geben den Schmelzbereich der Fraktion an. Bei dieser Trennung entstehen zwei verschiedene Produkte nämlich das Stearin, die hochschmelzende Fraktion (Klarschmelzpunkt bei 41-48°C) und das Olein, die tiefschmelzende Fraktion (Klarschmelzpunkt von 15-32°C). In der Stearinphase reichern sich dabei Triglyceride aus langkettigen gesättigten Fettsäuren an, im Olein mehr die Triglyceride mit kurzkettigen und ungesättigten Fettsäuren, sowie Aroma, Farbstoffe und Antioxidantien.

Die trockene Fraktionierung geht von wasserfreiem Milchfett aus. Die entwässerte Butter wird bei 60-80°C geschmolzen und unter Rühren auf die gewünschte Kristallisationstemperatur abgekühlt

und die Kristallisation eingeleitet. In den industriell eingesetzten Trockenfraktionierungsverfahren werden die Triglyceride diskontinuierlich in grossen Behältern während einer längeren Zeit kristallisiert. Wird die Schmelze auf eine bestimmte Temperatur gekühlt, kristallisieren die hochschmelzenden Triglyceride während der mehrstündigen Ruhepause aus, der tiefschmelzende Teil bleibt flüssig. Bei zu raschem Abkühlen können Mischkristalle durch den Einschluss von Öl in den grösseren Kristallen und in Kristallagglomeraten entstehen. Die Ruhepause sollte lange dauern, da die freiwerdende Kristallwärme dosiert abgeleitet werden muss, zur Verhinderung des Wiederaufschmelzens bereits entstandener Kristalle. Die Trennung des Öls und der Kristalle erfolgt in der Regel kontinuierlich mittels Spezialzentrifugen oder in Vakuumfiltrationsanlagen und ist meistens unvollständig. Neuerdings werden auch Druckfilteranlagen eingesetzt.

Im Rahmen einer Diplomarbeit mit der Schweizerischen Hochschule für Landwirtschaft und der Praxis wurde nun ein Verfahren zur schonenden Anreicherung von CLA in Alpbutter entwickelt. Da es sich bei dem im Rahmen der Arbeit gewählten Verfahren um einen schonenden physikalischen Anreicherungsprozess handelt, wird dieser von internationalen Biokreisen akzeptiert. In Bio-Produkten könnten damit auch CLA-reiche Fraktionen eingesetzt werden.

Alpbutter stellt einen geeigneten Rohstoff dar, da sie einen deutlich höheren CLA-Gehalt als herkömmliche Butter aufweist. Der erhöhte CLA-Gehalt von Alpbutter ist vermutlich auf die abweichende Fütterung der Kühe mit Gras von Naturwiesen, die artenreichen Alpweiden mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, welche die Pansen-Mikroorganismen beeinflussen sowie auf ein Energiedefizit und den veränderten Stoffwechsel der Kühe zurückzuführen. Eine abschliessende Beurteilung der Ursachen des erhöhten CLA-Gehaltes auf der Alp bedarf jedoch noch weiterer Abklärungen.

Mit Bratbutter (entwässerte Butter) wurden zunächst geeignete Fraktionierungsbedingungen evaluiert. Die Alpbutter wurde vor der Fraktionierung entwässert. Beim Anreicherungsverfahren von CLA wurde die entwässerte Butter bei 75°C geschmolzen und anschliessend auf die gewünschte Kristallisationstemperatur abgekühlt. Bei 75°C werden alle Triglyceride flüssig. Durch Änderung der Parameter Zeit und Temperatur wie auch anhand der Mehrfachfraktionierung wurde Einfluss auf die Kristallisation der Butter und damit die Ausbeute an CLA in der jeweiligen Fraktion genommen. Dabei wurde der Temperaturbereich zwischen 32°C und 9.5°C und Kristallisationszeiten zwischen einer und 20 Stunden geprüft. Der höchste CLA-Anteil wird nach Literatur in der Oleinfraktion erwartet. Ziel des physikalischen Trennungsprozesses war ein hoher CLA-Gehalt in einer Fraktion bei einer optimalen Trennung der beiden Fraktionen sowie einer wirtschaftlich interessanten Ausbeute der CLA-haltigen Fraktion. Die CLA Isomere wurden mittels Ag⁺-HPLC analysiert. Fettsäuren und der CLA-Gehalt der Olein- und Stearinfraktion wurden im

Labor an ALP gaschromatographisch bestimmt und mit dem CLA-Gehalt der jeweiligen Ausgangsbutter verglichen.

Aus den verschiedenen geprüften Fraktionierungsbedingungen ist nachfolgend der optimale Zeit- und Temperaturverlauf des gewählten Verfahrens zur Anreicherung von CLA aufgeführt. Nach der Erwärmung der entwässerten Butter auf 75°C folgte eine langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf Raumtemperatur (24°C). Anschliessend wurde das Kristall-Flüssigbutterfett während vier Stunden im 20°C warmen Wasserbad temperiert, wobei die hochschmelzenden Triglyceride auskristallisierten und die tiefschmelzenden flüssig blieben. Da die freiwerdende Kristallwärme dosiert abgeleitet werden musste, dauerte der Kühlungsprozess entsprechend lange. Der Kühlungsprozess hat zudem einen wichtigen Einfluss auf die Kristallform. Bei einer zu raschen und unkontrollierten Kühlung war eine spätere Trennung der beiden Fraktionen schwierig. Nach der Kristallisation wurde die Kristall-Flüssigbutterfett-Suspension durch eine Vakuumfiltration in eine Olein- und Stearinfraktion aufgetrennt. Die gewonnene Oleinfraktion wurde für eine zweite Fraktionierung noch einmal auf 75°C erwärmt und anschliessend wieder langsam auf 24°C abgekühlt und anschliessend während vier Stunden bei 16°C und weitere 15 Stunden bei 12.5°C im Wasserbad temperiert und danach vakuumfiltriert.

Die so gewonnene Oleinfraktion erreichte für Bratbutter einen CLA-Gehalt von 10.2 mg / g Fett. Dies sind 2.5 mg CLA pro g Fett mehr als der CLA-Gehalt des Ausgangsproduktes Bratbutter.

Die Zweifach-Fraktionierung von entwässelter Alpbutter mit dem bei Bratbutter ermittelten Zeit- und Temperaturverlauf erzielte insgesamt eine mittlere Zunahme des CLA-Gehaltes von 3.3 mg / g Fett in der Oleinfraktion, dies entspricht im Vergleich zum Ausgangsprodukt Alpbutter einer Zunahme von 15.3 % (Tabelle 2).

Bei Versuchen mit Temperaturen über 12.5°C wurden keine vergleichbaren CLA - Gehalte erzielt (Rehberger et al., 2007).

Tabelle 2: Auszug von Ergebnissen aus Versuchsreihen

Produkt	T [°C]	n	CLA-Gehalt [g/100 g Fett]
Wasserfreies Butterfett	-	1	0.768^b
Erste Fettfraktionen	20	8	0.866 ^a ± 0.009
Erste Fettfraktion	22	1	0.866 ^a
Erste Fettfraktionen	24	3	0.868 ^a ± 0.020
Erste Fettfraktion	28	1	0.872 ^a
Durchschnittliche Differenz, verglichen mit wasserfreiem Butterfett		13	0.1 ± 0.01
ANOVA			***
Erste Fettfraktion	20	1	0.860
Zweite Fettfraktion	12.5	1	1.017
Differenz, verglichen mit der ersten Fettfraktion		1	0.16
Alpbutter	-	1	2.159
Erste Fettfraktionen	20	2	2.277 ± 0.005
Durchschnittliche Differenz, verglichen mit Alpbutter		2	0.12 ± 0.005
ANOVA			*
Erste Fettfraktion A	20	1	2.281
Zweite Fettfraktion A1	12.5	1	2.512
Zweite Fettfraktion A2	12.5	1	2.447
Erste Fettfraktion B	20	1	2.274
Zweite Fettfraktion B1	12.5	1	2.51
Durchschnittliche Differenz, verglichen mit der ersten Fettfraktion		3	0.21 ± 0.04
t-Test			*

T: Fraktionierungstemperatur; n: Versuchsanzahl; Angaben Mittelwert ± Standardabweichung; Signifikanz: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns (nicht signifikant); a, b: unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an (Fisher-LSD-Test $p \leq 0.05$); ANOVA: Varianzanalyse; t-Test: Students t-Test

Resultate

Die konjugierten Linolsäuren sind wichtige, natürliche Transfettsäuren in Milch und Fleisch. CLA überstehen eine Verarbeitung wie auch Lagerung unbeschadet und gehen bei der Verarbeitung proportional zum Fett in die Produkte über. Es besteht ein gewisses Potenzial mittels chemischer und physikalischer Verfahren, den CLA-Gehalt in Milchfett zu erhöhen. Zudem konnte bei ausgewählten Stämmen für fermentierte Milchprodukte in Versuchen im Labormassstab bei Zusatz von freier Linolsäure, ein Anstieg an CLA beobachtet werden. CLA können durch die Milchverarbeitung jedoch nur sehr begrenzt erhöht werden.

Die durchgeführten Versuche im Rahmen der Evaluation eines Fraktionierungsprozesses zur Anreicherung von CLA zeigen, dass der gewählte physikalische Trennungsprozess, der von internationalen Biokreisen akzeptiert wird, eine Anreicherung ermöglicht. CLA-haltige Triglyceride finden sich dabei sowohl in der Olein- als auch der Stearinfraktion. Je nach Zusammensetzung des Triglycerids und dem dadurch bestimmten Kristallisationspunkt gelangt das gebundene CLA-

Isomer bei einer Fraktionierung in die Stearinfraktion oder in die Oleinfraktion, was eine Anreicherung mit einer rein physikalisch-mechanischen Methode schwierig gestaltet. Der höhere Anteil befindet sich jedoch bei beiden Butterarten in der Oleinfraktion. Während bei Bratbutter eine Anreicherung von CLA in der Oleinfraktion von 32.5 % erzielt wurde, zeigte sich bei Alpbutter lediglich eine Anreicherung um 15.3 %. Dies ist in Anbetracht des aufwändigen, viele Schritte umfassenden Verfahrens für den Industriemassstab wenig und zudem zu gering, um entscheidende positive Einflüsse auf die Gesundheit zu erzielen.

Dank

Die Autoren danken der Europäischen Gemeinschaft für ihre finanzielle Beteiligung im Rahmen des 6. Forschungsprogrammes für das integrierte Projekt QUALITYLOWINPUTFOOD, FP6-FOOD-CT-2003-506358 sowie dem Schweizerischen Staatssekretariat für Bildung und Forschung für dessen Kofinanzierung.

Literaturverzeichnis

Bisig, W., Eberhard, P., Collomb, M. & B. Rehberger. 2007. Influence of processing on the fatty acid composition and the content of conjugated linoleic acid in organic and conventional dairy products – a review. *Le Lait* 87: 1-19

Rehberger, B., Bütikofer, U., Bisig, W. & M. Collomb. 2007. Influence of a dry fractionation of butter fat on the content of fatty acids including conjugated linoleic acids. *Eur Food Res Technol* (Status: online verfügbar)