



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einflüsse der Inhaltsstoffe von Margarine auf deren
oxidative Stabilität“

verfasst von / submitted by

Sandra Egger, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfillment of the requirements for the
degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme
code as it appears on the student record sheet:

A 066 659

Studienrichtung lt. Studienblatt / degree
programme as it appears on the student record
sheet:

Masterstudium Lebensmittelchemie

Betreut von / Supervisor:

Ass.-Prof. Mag. Dr. Marc Pignitter

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei Ass.-Prof. Mag. Dr. Marc Pignitter für die Ermöglichung und die stets motivierende Betreuung der Forschungsarbeit am Institut für Physiologische Chemie bedanken. Weiters gilt mein Dank insbesondere auch Hr. Michael Höbinger und Hr. Stefan Hackel für die Ermöglichung und Finanzierung der Kooperationsarbeit von Senna Nahrungsmittel GmbH & Co KG mit der Universität Wien.

Frau Nesrin Firat danke ich für ihre professionelle und persönliche Betreuung meiner Masterarbeit. Durch ihre positive, motivierende Art konnte ich persönlich sehr viel dazulernen und im Laufe der Arbeit sogar über mich hinauswachsen.

Ein großes Dankeschön gilt auch Sarah Frühwirth. Ihr danke ich für ihr stets offenes Ohr und ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung in der selbstständigen Forschungsarbeit.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir die Möglichkeit des Studiums erst ermöglichten und bei meinen Freunden, allen voran bei Thomas, der mich immer aufbaute und an mich glaubte, wenn es mir selber schwer fiel. Ich danke euch allen für die aufbauende, motivierende Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung und Hypothesen	11
2. Literaturübersicht	13
2.1 Margarineproduktion	13
2.1.1 Margarine Produktionsprozess	14
2.2 Emulsionen	17
2.2.1 Emulgatoren	18
2.2.2 Emulsionsbildung	19
2.3 Lipidoxidation	21
2.3.1 Autoxidation	22
2.3.2 Einflüsse auf die Lipidoxidation in W/O-Emulsionen	25
2.3.2.1 <i>Fettzusammensetzung</i>	25
2.3.2.2 <i>Sauerstoffgehalt</i>	25
2.3.2.3 <i>Lagerbedingungen und der Einfluss von Temperatur und Licht</i>	26
2.3.2.4 <i>Einflussfaktoren der Grenzfläche</i>	26
2.3.2.5 <i>Eisen, Metalle</i>	27
2.3.2.6 <i>Antioxidantien</i>	28
2.3.3 Lagerstabilitätsstudien von Margarinen	35
3. Material und Methoden	37
3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	37
3.2 Probennahme	41
3.2.1 Lagerstudie	41
3.2.1.1 Rezepturen und Zusammensetzung der Lagerproben	42
3.2.2 Produktion von Mustermargarinen im Kleinmaßstab auf der Pilotanlage	43
3.3 Beschreibung der analytischen Methoden	49

3.3.1	Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung mittels GC/FID	49
3.3.2	Bestimmung der Peroxidzahl nach Wheeler	52
3.3.3	Bestimmung der oxidativen Stabilität durch beschleunigten Oxidationsstresstest – Rancimat	53
3.3.4	Photometrische Bestimmung konjugierter Diene	55
3.3.5	Bestimmung des pH-Werts	56
3.3.6	Bestimmung volatiler Verbindungen durch SPME-GC-MS	58
3.3.7	Bestimmung oxidierter Triglyceride (oxTAGs) mit LC-MS/MS	60
3.3.8	¹ H- NMR	63
3.3.9	Bestimmung des Eisen- und Kupfergehalts durch F-AAS	64
3.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse	64
4.	Ergebnisse und Diskussion	65
4.1	Resultate der Langzeit Lagerstudie	65
4.1.1	Fettsäuremuster der Lagermargarinen	65
4.1.2	Entwicklung der Peroxidzahl während 180 Lagertagen	68
4.1.3	Bildung konjugierter Diene während der Lagerdauer	72
4.1.4	Oxidative Stabilität im Lagertest	75
4.1.5	Bildung oxidierter Triglyceride in Margarinen während der Lagerzeit	79
4.1.6	Bildung von Aceton im Zuge der Lipidoxidation von Margarinen	81
4.1.7	Zusammenfassung der oxidativen Lagerstabilität	86
4.2	Bewertung und Vergleich von Analysemethoden zur Beurteilung der Lagerstabilität von Margarineprodukten	88
4.3	Einflüsse von Einzelzutaten auf die oxidative Haltbarkeit einer Backmargarine	93
4.3.1	Emulgatoren	95
4.3.2	Antioxidantien	98
4.3.3	Auswirkungen einzelner Zutaten	103
4.3.3.1	<i>pH-Wert & Zitronensäure</i>	104
4.3.3.2	<i>Beta-Carotin</i>	108
4.3.3.3	<i>Aroma</i>	108
4.3.3.4	<i>Salz</i>	109
4.3.4	Kombinatorische Effekte	110
5.	Schlussbetrachtung	113
6.	Zusammenfassung.....	117
7.	Abstract	120

8. Literaturverzeichnis	122
9. Anhang.....	131
Eidesstattliche Erklärung.....	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Margarineproduktionsanlage	14
Abbildung 2: Veranschaulichung der Emulsionsbildung und zugrundeliegender physikochemischer Prozesse	19
Abbildung 3: Aufbau einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit den drei Phasen Ölphase – Tröpfcheninneres (engl. Oil Interior), Interface (engl. Interfacial Region) und äußerer Wasserphase (engl. Aqueous Phase)	20
Abbildung 4: Zeitabhängige Abnahme von Antioxidantien, ungesättigten Fettsäuren und die Bildung von Lipidoxidationsprodukten in Pflanzenölen	23
Abbildung 5: Prooxidative Wirkung von Übergangsmetallen	27
Abbildung 6: Antioxidativ wirksame Strukturen in Rosmarinextrakt: Carnosinsäure, Carnosol und Rosmarinsäure	32
Abbildung 7: Chemische Struktur der Catechine in Grünteeextrakt	34
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Produktionsschritte auf der Pilotanlage	44
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Bestandteile des Rancimats	54
Abbildung 10: Bestandteile einer pH-Glaselektrode	57
Abbildung 11: Standardgerade zur Bestimmung der oxTAGs	63
Abbildung 12: Gehalt an gesättigten Fettsäuren (engl. saturated fatty acids = SFA), einfach ungesättigten Fettsäuren (engl. mono-unsaturated fatty acids = MUFA) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl. poly-unsaturated fatty acids = PUFA) in den vier Margarinen LP1-LP4	65
Abbildung 13: Peroxidzahl der Margarine LP1 während der Lagerung von 180 Tagen	69
Abbildung 14: : Peroxidzahl der Margarine LP2 während der Lagerung von 180 Tagen	70
Abbildung 15: Peroxidzahl der Margarine LP3 während der Lagerung von 180 Tagen	71
Abbildung 16: Peroxidzahl der Margarine LP4 während der Lagerung von 180 Tagen	71
Abbildung 17: Konjugierte Diene in der Margarine LP1 während der Lagerung von 180 Tagen	72
Abbildung 18: Konjugierte Diene in der Margarine LP2 während der Lagerung von 180 Tagen	73
Abbildung 19: Konjugierte Diene in der Margarine LP3 während der Lagerung von 180 Tagen	73
Abbildung 20: Konjugierte Diene in der Margarine LP4 während der Lagerung von 180 Tagen	74
Abbildung 21: Oxidationsstabilität der Margarine LP1	75
Abbildung 22: Oxidationsstabilität der Margarine LP2	76
Abbildung 23: Oxidationsstabilität der Margarine LP3	77
Abbildung 24: Oxidationsstabilität der Margarine LP4	77

Abbildung 25: Heatmap zur Veranschaulichung der Erhöhung oder Verminderung der volatilen Substanzen in den vier Margarinen LP1 – LP4 während der Lagerung für 99 und 180 Tage bei 15°C.....	82
Abbildung 26: Aceton (blau) und Hexanal (gelb) in den Margarinen LP1, LP2, LP3, LP4 während 99-tägiger Lagerung in ppb	84
Abbildung 27: Gehalt an SFA, MUFA und PUFA in der Mustermargarine.....	94
Abbildung 28: POZ der Mustermargarinen MU1-MU6	95
Abbildung 29: OSI Werte der Mustermargarinen MU1-MU6	96
Abbildung 30: POZ der Mustermargarinen MU7-MU15	99
Abbildung 31: OSI Werte der Mustermargarinen MU7-MU15	100
Abbildung 32: pH-Wert der Mustermargarinen	105
Abbildung 33: POZ der Mustermargarinen MU1 (E1 Std.), MU14 (GTE -20%), MU16 (Zitronensäure), MU17 (Beta-Carotin), MU18 (Aroma), MU19 (NaCl) und MUGe (alle Zutaten, erhitzt).....	106
Abbildung 34: OSI Werte der Mustermargarinen MU1 (E1 Std.), MU14 (GTE -20%), MU16 (Zitronensäure), MU17 (Beta-Carotin), MU18 (Aroma), MU19 (NaCl) und MUGe (alle Zutaten, erhitzt).....	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fahrdaten der Pilotanlage Margarinemuster Produktion.....	45
Tabelle 2: Produktion der Margarinemuster 1 - 6	46
Tabelle 3: Produktion der Margarinemuster 7 - 15	47
Tabelle 4: Produktion der Margarinemuster 16 – 19, MUGe	48
Tabelle 5: Parameter zur Trennung der FAMES mittels GC-FID.....	50
Tabelle 6: Retentionszeiten bekannter Fettsäuren aus Ringversuchen	51
Tabelle 7: Analysenparameter der HS-SPME-GC-MS.....	58
Tabelle 8: System LC-ESI-Qq-TOF	61
Tabelle 9: Fettsäurezusammensetzung der Margarinen	66
Tabelle 10: Eigenschaften und Merkmale der Analysemethoden zur Beurteilung der Stabilität von Margarinen	88
Tabelle 11: Fettsäurezusammensetzung (%) der Mustermargarine MUGe (Kombination aller Zutaten)	93
Tabelle 12: MRM Qualifier- und Quantifier- Ionen.....	131
Tabelle 13: Rezeptur der Lagermargarinen LP1-LP4.....	132
Tabelle 14: Oxidative Stabilität der Margarinen während der Lagerung für 180 Tage bei 15°C, analysiert durch die POZ, CD und Ranzimat.....	133
Tabelle 15: Zusammenfassung jener flüchtiger Substanzen, die während der Lagerdauer anstiegen ($FC < 0$) oder abnahmen ($FC > 0$).....	134
Tabelle 16: Gehalt an oxidierten Triglyceriden (oxTAGs) in den Lagermargarinen LP2 und LP3 und der Mustermargarine MUGe T0 (=unerhitzt) und erhitzt für 1h bei 80°C.	134
Tabelle 17: pH, T_R , Fe und Cu Konzentration der Mustermargarinen MU1-MU19 und MUGe	136
Tabelle 18: Ergebnisse der Peroxidzahl und der Oxidationsstabilität der Mustermargarinen.....	137

Abkürzungsverzeichnis

DGF	Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft
FAME	fatty acid methyl esters = Fettsäuremethylester
N	Normalität
POZ	Peroxidzahl
meq	Milliäquivalent
OSI	Oxidative Stability Index
PUFAs	mehrfach ungesättigte Fettsäuren; engl. "polyunsaturated fatty acids"
UV	Ultraviolett
CD	konjugierte Diene; engl. „conjugated dienes“
SPME	engl. Solid Phase Microextraction - Festphasenmicroextraktion
EI	Elektronenionisation
MS	Massenspektrometrie
GC	Gaschromatographie
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
oxTAGs	oxidierte Triglyceride
ESI	Elektronensprayionisation
Qq	Quadrupol

TOF	engl. Time-of-flight - Flugzeit
MRM	engl. Multiple Reaction Monitoring
R ²	Bestimmtheitsmaß
PE	Petroleumether
v/v	Volumenteil pro Volumenteil
HPLC	engl. High Performance Liquid Chromatography - Hochleistungsflüssigchromatographie
NMR	engl. Nuclear Magnetic Resonance - Kernspinresonanzspektroskopie
F-AAS	Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie
rpm	engl. revolutions per minute – Einheit der Drehzahl

1. Einleitung und Hypothesen

Die Nutzung von Margarinen in der industriellen Herstellung von Backwaren wie Süßwarenbäck, Donuts oder Keksen steigt heutzutage weiter an. Margarine stellt im Vergleich zu Butter eine kostengünstige Alternative dar und trägt dabei gleichzeitig zur Vergrößerung des Teigvolumens und zur Verbesserung der Textureigenschaften der Backwaren bei. Neben ihrer technologischen Eigenschaften zeichnen sich Margarinen durch den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aus (Mordor Intelligence 2019). Aufgrund ihres Aufbaus handelt es sich bei Margarinen um Wasser-in-Öl-Emulsionen mit einem Fettgehalt von 80% (McClements und Decker 2000). Durch den hohen Fettgehalt der Margarinen ergibt sich eine Anfälligkeit für Lipidoxidation, welche in Emulsionssystemen als ein komplexes System betrachtet werden kann. Zu den zahlreichen Einflüssen zählen unter anderem die Fettzusammensetzung, die Sauerstoffkonzentration in der Wasser- und Ölphase, die Struktur der Grenzfläche (engl. „Interface“), das Vorhandensein von Pro- und Antioxidantien in den beiden Phasen, die Art der Produktverpackung und die Lagerbedingungen (Pokorna et al. 2004). Langzeitlagerstudien sind insbesondere für die Beurteilung der Lagerfähigkeit, zur Erhöhung der Produktqualität und für die Vermeidung von Lebensmittelverschwendung von großem Interesse (Maskan et al. 1993). Ein Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, den Einfluss der unterschiedlichen Fettzusammensetzung von vier Industriemargarinen auf die Lipidoxidation während ihrer Lagerung zu untersuchen. Durch die korrekte Einschätzung der Haltbarkeit der Produkte hinsichtlich ihrer oxidativen Qualität ist es möglich, den Kund*innen qualitativ hochwertige Produkte zu liefern. Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss einzelner Margarinezutaten auf die Lipidoxidation zu untersuchen. Durch den Einsatz neuer Zutaten, wie Antioxidantien, kann die oxidative Qualität gesteigert und die Kundenzufriedenheit erhöht werden, wodurch folglich Lebensmittelverschwendung minimiert werden kann. Als sekundäres Ziel wurde die Anwendbarkeit etablierter Analysemethoden zur Bestimmung der Lipidoxidation in der Qualitätssicherung eines Produktionslabores anhand unterschiedlicher Parameter wie Dauer und Aussagekraft verglichen und bewertet.

Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

„Die Zusammensetzung unterschiedlicher Margarinetypen beeinflusst ihre oxidative Stabilität während der Lagerdauer von 180 Tagen.“

„Einzelne Zutaten wie Emulgatoren, Antioxidantien, Zitronensäure, NaCl, Farbstoffe, und Aromen und deren Kombination können die Lipidoxidation von Margarinen beeinflussen.“

2. Literaturübersicht

2.1 Margarineproduktion

Bei Margarine handelt es sich laut der Definition des Anhangs XV der europäischen Verordnung Nr. 1234/2007 für eine gemeinschaftliche Organisation der Agrarmärkte um „ein aus pflanzlichen und/oder tierischen Fetten gewonnenes Erzeugnis mit einem Fettgehalt von mindestens 80 % und weniger als 90 %“ (EG 2007). Die Anfänge der Margarineproduktion gehen zurück in das Jahr 1869, als der französische Chemiker Hippolyte Mege Mouries die erste Margarine produzierte und zugleich patentieren ließ. Die damalige Margarineproduktion mit Rindertalg diente der Nachahmung von Butter, ein Lebensmittel, das im Zuge der industriellen Revolution immer rarer wurde. Im Laufe der Jahrzehnte entwickelten sich neue Formen der Margarine. Im 19. Jahrhundert waren noch vermehrt Schmalz und Rindertalg wichtige Komponenten der Margarine. Anfang des 20. Jahrhunderts produzierte man schließlich die ersten Margarinen, welche zu 100% aus pflanzlichen Ölen und Fetten wie Kokosöl und Palmkernöl bestanden und den heutigen gängigen Margarinen ähnlich waren (Clayton 1920). Der Produktname „Margarine“ stammt von der damaligen gängigen Vermutung, dass die sogenannte „Margarinsäure“ im in damaligen Margarinen eingesetzten Kalbsfett in großen Mengen enthalten war. Diese Behauptung konnte nicht bewiesen werden, der Name der Produkte blieb aber bis heute unverändert bestehen (Zaeromali et al. 2014).

Durch den Einsatz der partiellen Härtung von pflanzlichen Ölen zur Verbesserung ihrer Eigenschaften hinsichtlich Stabilität und Schmelzpunkt enthielten Pflanzenmargarinen vor einigen Jahren noch Gehalte von 60 % trans-Fettsäuren (TFA, engl. trans fatty acids) bezogen auf das Gesamtfett (Craig-Schmidt et al. 2007). Die von der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (engl. European Food Safety Authority, kurz: EFSA) im Jahr 2004 veröffentlichte Stellungnahme beschreibt einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von TFA und dem Risiko des Auftretens von koronaren Herzkrankheiten (EFSA 2004). Folglich wurde in einigen Ländern der Europäischen Union ein gesetzlicher Grenzwert von 2 g industriell produzierten TFA pro 100 g Fett im Lebensmittel erlassen, unter anderem auch in Österreich (BVL 2011). Durch den vermehrten Einsatz von

Palmöl, Palmstearin und vollständig gehärteter Öle konnte der Transfettsäuregehalt in Margarinen stark verringert werden (Abbe et al. 2009).

2.1.1 Margarine Produktionsprozess

Der klassische Prozess der Margarineproduktion setzt sich aus den fünf Abschnitten Emulgierung, Kühlung, Plastifizierung, Ruhephase und Verpackung zusammen (deMan 1994). Durch die Anpassung der Bestandteile in der Fett- und Wasserphase lassen sich neben handelsüblichen streichfähigen Margarinen besonders im Industriesegment kundenspezifische Produkte, die von Blätterteigmargarinen, Crememargarinen, Backmargarinen bis hin zu Frittiermargarinen reichen, erzeugen. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau einer Margarineproduktionsanlage (Gerstenberg Kirkeby 2007).

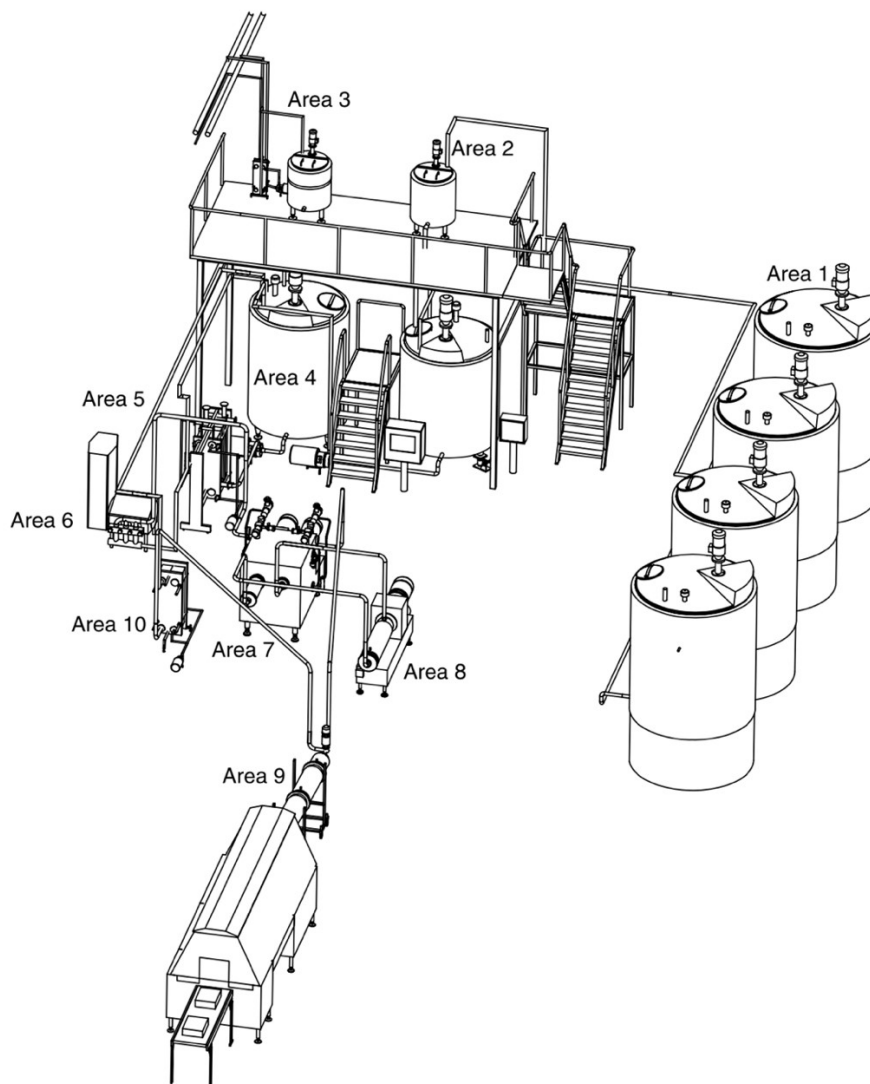


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Margarineproduktionsanlage (Gerstenberg Kirkeby 2007).

1. Herstellung der Emulsion

Bei der Margarineherstellung erfolgt zunächst die Vermengung der Wasser- und Ölphase. Die Herstellung der Wasserphase findet in einem eigenen Tank (siehe Abb. 1, Area 3) statt. Dort wird Leitungswasser mit allen zusätzlichen wasserlöslichen Zutaten vermengt: Salz, Zitronensäure, Aromen, Antioxidantien, Konservierungsmittel und weitere Zusatzstoffe. In weiteren Tanks (Siehe Abb. 1, Area 2) wird die Ölphase vorbereitet. Dabei werden die benötigten Fette und Öle aus den Rohstofftanks (siehe Abb. 1, Area 1) mit dem fettlöslichen Emulgator und weiteren Zutaten wie Aromen, Farbstoffen und Antioxidantien vorgemischt. Sobald alle Zutaten ausreichend gelöst sind werden die Wasser- und Fettlösung im nächsten Schritt im Vormischtank, auch Kirne genannt (siehe Abb. 1, Area 4), zusammengeführt. Durch intensives Rühren und Mischen bildet sich eine Wasser-in-Öl-Emulsion. Sobald die Emulsion stabil ist, wird diese über Pumpen durch einen Pasteurisationsabschnitt in den Kristallisator gepumpt (siehe Abb. 1, Area 5, 6) (Gerstenberg Kirkeby 2007). Die Funktionen von Emulgatoren und die Eigenschaften von Wasser-in-Öl-Emulsionen/ (W/O)-Emulsionen werden im Kapitel „2.2 Emulsionen“ im Detail erklärt.

2. Kristallisation und Plastifizierung

Die Konsistenz von Margarinen bei einer bestimmten Temperatur wird durch den Festfettgehalt (SFC, engl. Solid Fat Content) sowie durch die Kristallstruktur bestimmt. Dabei sollte angestrebt werden, dass Phänomene wie Ölabscheidung, Sandigkeit, Verhärtung, Wasserabscheidung und Körnigkeit der Margarinen nicht auftreten (Chateris et al. 1991). Durch Ermittlung der Verhältnisse an Protonen in der festen Phase eines Fettes zur Zahl an Protonen im Gesamtfett durch NMR (engl. Nuclear Magnetic Resonance) erhält man das Verhältnis der festen Phase zur Gesamtphase während einer spezifischen Temperaturspanne, den Festfettgehalt oder SFC (deMan et al. 1989). Je nach Produkt unterscheidet man unterschiedliche Festfettgehalte. Im Vergleich zu Blätterteigmargarine, die den höchsten Anteil an Festphase bei einer bestimmten Temperatur enthält, weist Bechermargarine typischerweise den geringsten Anteil an Festphase auf. Durch den Einsatz von Fetten und Ölen mit unterschiedlichen Schmelzpunkten in der Margarine erhält man das gewünschte SFC-Profil für den individuellen Einsatzbereich. Man unterscheidet flüssige Öle (ungesättigte, pflanzliche

Öle), halbfeste Fette mit einem Schmelzpunkt von 32 – 34°C und Fette mit großem hochschmelzendem Anteil, sogenannte „hardstock“ Fette, mit einem Schmelzpunkt über 40°C, zu denen Palmstearin zählt (Berger 1989).

Neben dem SFC wird die Konsistenz der Margarinen durch das Kristallisationsverhalten der enthaltenen Fette und Öle beeinflusst (Chateris et al. 1991). Ein typischer Aufbau der Kristallisationseinheit bei der Margarineproduktion besteht aus einem geschabten Wärmeaustauscher (SSHE engl. scraped surface heat exchanger, siehe Abb. 1 Area 7), einer oder mehrerer Pin Rotor Maschinen zur Bearbeitung der Masse (siehe Abb. 1 Area 8) und einem Ruherohr (siehe Abb. 1 Area 9). Im Wärmeaustauscher, oder Kristallisator, erfolgt die Kristallisation der Emulsion durch Kühlung (Gerstenberg Kirkeby 2007). Durch Rotation der integrierten Schaufeln wird die Emulsion stetig von der gekühlten Wand gekratzt und durch das Rohr transportiert. Die Kühlung der Emulsion wird durch den Einsatz eines Kältemittels, in vielen Fällen Ammoniak, erreicht, da so die Wand des Kristallisators, der nach außen hin isoliert ist, gekühlt wird. Die Drehzahl der integrierten Schaber kann von 300 bis 1000 rpm (engl. revolutions per minute) beliebig eingestellt werden (Joyner 1953). Eine schnelle Kristallisation kann durch eine hohe Drehzahl, die Scherkräfte der Schaufeln und die auf den Schaufeln angebrachten Stifte erreicht werden (Heertje et al. 1988). Der sogenannte Polymorphismus beschreibt die Eigenschaft von Triacylglyceriden (TAG), dass sie in den drei Kristallformen α , β und β' vorkommen können. Die Kristallisation von Fetten erfolgt in der Reihenfolge $\alpha > \beta' > \beta$, dabei haben β -kristallisierte Fette den höchsten Schmelzpunkt und können als stabilste Kristallform beschrieben werden. Bei der Produktion von Margarine wird die Umwandlung von der α -Struktur in die β' -Struktur angestrebt. Diese Kristalle sind sehr klein, nadelförmig und 5-7 μm groß. Durch die geringe Größe wird das Produkt glatt und geschmeidig. Diese Eigenschaft kann erreicht werden, da eine große Menge der flüssigen Phase durch die kleine Nadelstruktur der Festphasen-Kristalle leicht in das Netzwerk eingeschlossen werden kann. Bei der Ausbildung von β -Kristallen kommt es zu negativen Produkteigenschaften wie Sandigkeit, da β -Kristalle größer sind und sich zusammenlagern können, wodurch im Mund eine sandige Struktur wahrgenommen werden kann. Einige Fette und Öle tendieren dazu, eher in der β' -Form zu kristallisieren. Der Gehalt an Palmitinsäure und Stearinsäure und die Verteilung und Position dieser

Fettsäuren im TAG bestimmen die Tendenz zur Ausbildung von β' -Kristallen oder β -Kristallen. Aus diesem Grund sollte immer versucht werden, eine heterogene Fettsäuren-Mischung herzustellen und Fette, wie zum Beispiel Palmöl oder Rapsöl, welche die Bildung von β' -Kristallen fördern, in die Rezeptur von Margarinen einzubinden (deMan et al. 1995).

Auf die Kühlung und Kristallisierung der Emulsion folgt als nächster Produktionsschritt das Bearbeiten und Kneten in kleinen „Pin Rotor“ Maschinen, wodurch die spezifische Plastizität und Elastizität der Margarine durch unterschiedliche Knetintensität und Knetdauer erreicht wird (Gerstenberg Kirkeby 2007). Auf der Innenseite dieser Zylinder befinden sich ineinandergreifende bewegliche Stahlstifte, welche für die Weiterbearbeitung und vollständige Kristallisation der gekühlten Masse in bestimmten Geschwindigkeiten eingesetzt werden. Durch die hohe mechanische Bearbeitung der Masse und die hohe Rate an Kristallisation kann es zu einer Temperaturerhöhung kommen (Heertje et al. 1988). Bei Industriemargarinen erfolgt abschließend vor der Verpackung die Aushärtung der Margarine in Ruherohren (Gerstenberg Kirkeby 2007).

2.2 Emulsionen

Bei Margarinen handelt es sich um Wasser-in-Öl-(W/O)-Emulsionen. Wenn zwei nicht mischbare Flüssigkeiten - üblicherweise Wasser und Öl - vermengt werden spricht man von einer Emulsion, wobei jene Phase, die als Tropfen in der Emulsion vorkommt, als disperse Phase definiert wird. In W/O-Emulsionen ist die disperse oder interne Phase die Wasserphase, umgeben von der Ölphase, die auch kontinuierliche oder externe Phase genannt wird. Die reine Vermengung von Wasser und Öl ist nicht möglich, da die beiden Phasen thermodynamisch instabil sind und sich so nach kurzer Zeit trennen, wodurch eine Phasentrennung der Ölphase (oben) und Wasserphase (unten) sichtbar wird. Aufgrund ihrer geringeren Dichte schwimmt die Ölphase auf der Wasserphase. Durch den Einsatz von Emulgatoren kann die Stabilität einer Emulsion aus Wasser und Öl aufrecht erhalten bleiben (McClements 2016).

2.2.1 Emulgatoren

Emulgatoren sind grenzflächenaktive Substanzen und werden durch ihre Wirkung in der Erhöhung der Stabilität von Emulsionen sowie in der Verbesserung der Emulsionsbildung in Margarinen eingesetzt. Emulgatoren bestehen aus einem wasserlöslichen oder hydrophilen Kopf und einem fettlöslichen, lipophilen Schwanz (Hasenhuettl et al. 2008). Aus diesem Grund sind Emulgatoren amphiphile Moleküle, eine Eigenschaft, die sich durch die Wasser- und Fettlöslichkeit auszeichnet (McClements 2016). Man kann Emulgatoren anhand ihrer Zusammensetzung in kationisch, anionisch, zwitterionisch oder nicht ionisch unterteilen. Dabei bestimmt die Kopfregion, also der hydrophile Teil, die Ladung des Emulgators. Die meisten gängigen Emulgatoren sind nichtionisch, anionisch oder zwitterionisch. Einer der bekanntesten nichtionischen Emulgatoren ist Monoglycerid, Lecithin ist ein zwitterionischer Emulgator. Die lipophilen Abschnitte der grenzflächenaktiven Substanzen bestehen aus 10 bis 20 kohlenstoffatomlangen Kohlenwasserstoffketten und lassen sich anhand ihrer Sättigungsgrade, Verzweigungen und Substitute voneinander unterscheiden (Hasenhuettl et al. 2008).

Zur Klassifizierung von Emulgatoren und zur Bestimmung der Eignung von Emulgatoren können die Bancroft'sche Regel und der HLB-Wert (engl. hydrophilic-lipophilic balance) herangezogen werden. Die Bancroft'sche Regel besagt, dass die Löslichkeit des Emulgators bestimmt, welche Form der Emulsion gebildet wird. Ist ein Emulgator eher lipophil, so bildet sich eine W/O Emulsion, da Öl die kontinuierliche Phase ist. Eine O/W (engl. oil-in-water) Emulsion bildet sich dann, wenn der Emulgator wasserlöslich ist. Der Einsatz von Emulgatoren sollte immer in Abhängigkeit ihrer Löslichkeit in der kontinuierlichen Phase der Emulsion erfolgen (Davis 1994).

Beim HLB-Wert handelt es sich um einen Zahlenwert, welcher anzeigt, ob ein Emulgator eher lipophil oder hydrophil ist. Durch den HLB-Wert kann man eine Vorhersage treffen, welche Emulsionsform beim Einsatz des Emulgators gebildet wird. Der HLB-Wert kann aus den im Emulgator enthaltenen hydrophilen und lipophilen Gruppen wie folgt berechnet werden:

$$HLB = 7 + \sum \text{Anzahl hydrophile Gruppen} - \sum \text{Anzahl lipophile Gruppen}$$

Lipophile Emulgatoren haben einen HLB-Wert von 4-6 und stabilisieren W/O-Emulsionen, während wasserlösliche Emulgatoren höhere HLB-Werte von 8-18 aufweisen und für den Einsatz in O/W-Emulsionen geeignet sind (Davis 1994).

2.2.2 Emulsionsbildung

Der Einsatz von Emulgatoren bei der Margarineproduktion ist unumgänglich, da es nur so möglich ist, homogene Produkte mit einer feinen dispersen Wasserverteilung zu erzeugen. Bei der Margarineproduktion werden lipophile Emulgatoren zunächst in der Fettphase gelöst (Madsen 1987). Während der Homogenisierung der Wasser- und Ölphase unter ständigem Rühren bilden die zuvor gelösten Emulgatoren die stabile W/O-Emulsion, indem sie sich an die Membran der sich bildenden Wassertropfen heften und dort durch aneinander Reihung einen Schutzmantel aufbauen. Dabei ragt der hydrophile Teil in das Innere der Tröpfchen, während der hydrophobe Schwanz des Emulgators in die Ölphase ragt. Durch die Schicht an Emulgatoren zwischen Wasser- und Ölphase wird die freie Energie, die zuvor bei Kontakt von Wasser- und Ölphase geherrscht hat, minimiert und die Grenzflächenspannung wird ebenfalls minimiert (McClements 2016).

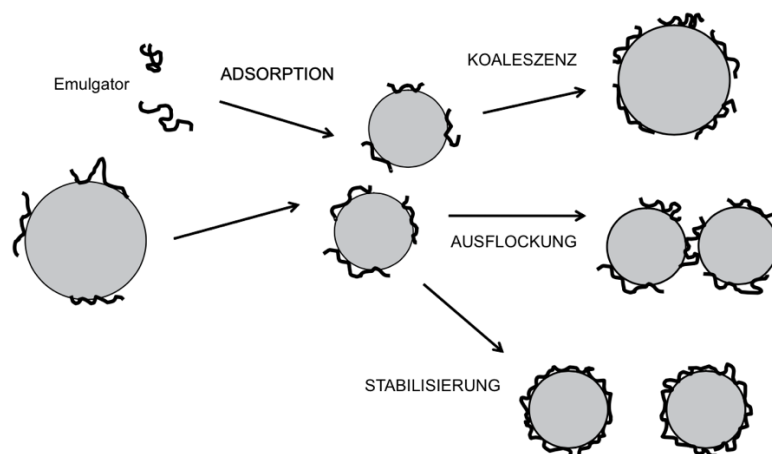


Abbildung 2: Veranschaulichung der Emulsionsbildung und zugrundeliegender physikochemischer Prozesse. Durch mechanische Bearbeitung während der Homogenisierung zerteilen sich große Tröpfchen. Durch gleichzeitige Adsorption des Emulgators werden die Tröpfchen stabilisiert. Geänderte Darstellung nach Dickinson 2009.

Da es sich bei Emulsionen um dynamische Systeme handelt, kommt es zur ständigen Kollision der Tröpfchen in der dispersen Phase. Besonders während der Homogenisierung kommt es durch das Rühren zu ständigen Tröpfchen-Tröpfchen-Kontakten. Ein Verschmelzen der Wassertropfen kann nur dann verhindert werden, wenn sich bereits genügend Emulgatormoleküle an die Außenseite der Tröpfchen positioniert haben (siehe Abb. 2). Dabei hängt die Größe der geformten Tröpfchen von zwei Faktoren ab: (1) die Zeit, die ein Emulgator benötigt, um sich an die Oberfläche der Tröpfchen zu heften (τ_1) und (2) die Zeit, die zwischen dem Kontakt von zwei Tröpfchen liegt (τ_2). Ist $\tau_1 < \tau_2$, bilden sich sofort kleine stabile Tröpfchen, welche von Emulgator umgeben sind. Wenn $\tau_1 > \tau_2$ ist, können die Tröpfchen wieder zu größeren Einheiten koalieren, da nicht genügend stabilisierender Emulgator an der Grenzfläche vorhanden ist (Hasenhuettl und Hartel 2008). Die Stabilität einer Emulsion hängt von der Effektivität des eingesetzten Emulgators ab. Diese Eigenschaft ist von den folgenden Merkmalen abhängig: (1) die Effektivität im Schutz vor Koaleszenz der Tröpfchen (siehe Abb. 2), (2) die Effizienz des Emulgators in der Verminderung der Grenzflächenspannung, (3) wie wahrscheinlich ein Emulgator an die Grenzfläche zwischen Tröpfchen und kontinuierliche Phase bindet, (4) die Zeit, die benötigt wird, damit der Emulgator von der kontinuierlichen Phase an die Grenzfläche eines Tröpfchens wandert und (5) die Menge an eingesetztem Emulgator (Dickinson 1992). Da es sich bei Emulsionen um mehrphasige Systeme handelt, können nicht nur Emulgatoren, sondern auch andere in den beiden Phasen vorkommende Verbindungen die Stabilität von Emulsionen beeinflussen (McClements et al. 2000).

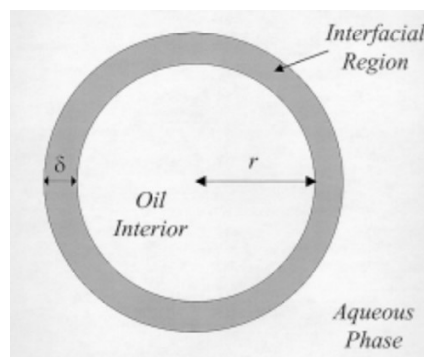


Abbildung 3: Aufbau einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit den drei Phasen Ölphase – Tröpfcheninneres (engl. Oil Interior), Interface (engl. Interfacial Region) und äußerer Wasserphase (engl. Aqueous Phase) (McClements et al. 2000).

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 3 anhand einer O/W-Emulsion, die charakteristischen Abschnitte einer Emulsion: (1) das Tröpfcheninnere, (2) die kontinuierliche oder äußere Phase und (3) die Grenzfläche, die die Tröpfchen umgibt, auch „Interface“ genannt. Da ein großer Teil an kommerziell erhältlichen Lebensmitteln Emulsionen sind, ist die oxidative Veränderung in der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen von großem wissenschaftlichem Interesse (McClements und Decker 2000). Beispielsweise haben Dridi et al. (2016) den Einfluss von wasserlöslichen prooxidativen Metallkationen auf die Lipidoxidation und die Rolle des Aufbaus des Interfaces in W/O-Emulsionen untersucht (Dridi et al. 2016). Silvestre et al. (2000) haben untersucht, welchen Einfluss Emulgatoren auf die Interface Beschaffenheit und die Lipidoxidation in O/W-Emulsionen haben (Silvestre et al. 2000). Im folgenden Kapitel werden die Mechanismen der Lipidoxidation und die Einflüsse der Beschaffenheit der Emulsionen im Detail betrachtet.

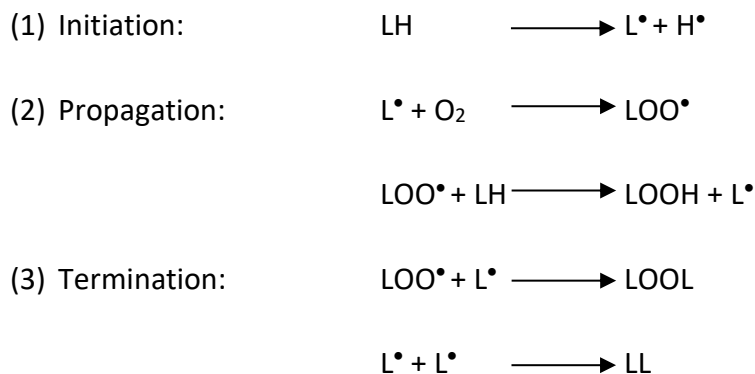
2.3 Lipidoxidation

Da der Großteil der Zusammensetzung von Margarinen auf Fette und Öle fällt, sind diese Produkte besonders anfällig für Lipidoxidation. In Emulsionen wird die Lipidoxidation durch viele Faktoren beeinflusst, unter anderem vom Gehalt an Sauerstoff in der Fett- und Wasserphase, von den Lagerungsbedingungen der Emulsionen, vom Vorkommen von Prooxidantien und Antioxidantien in beiden Phasen sowie von der Struktur des Interfaces (Pokorna et al. 2004). Durch die Lipidoxidation entstehen komplexe Veränderungen in Emulsionen, welche die Qualität beeinflussen. So führt beispielsweise ein veränderter Geschmack, ein sogenannter „off-flavor“, oder die Entwicklung von Ranzigkeit zu Qualitätseinbußen der Produkte (McClements et al. 2000). Die Oxidation von Lipiden geschieht durch Prozesse der Photooxidation, Autoxidation und enzymkatalysierter Oxidation, wobei die Autoxidation den Hauptprozess der Lipidoxidation darstellt (Sun et al. 2011). Während die Lipidoxidation in Ölen und in O/W-Emulsionssystemen bereits intensiv erforscht wurde, fehlen zu den Prozessen und Einflüssen der Lipidoxidation in W/O-Emulsionen noch aussagekräftige wissenschaftliche Studien. Die Mechanismen und komplexen Einflüsse auf die

Lipidoxidation in Emulsionen werden im folgenden Kapitel erläutert. Dabei wird angenommen, dass einige Mechanismen in O/W-Emulsionen auch auf W/O-Emulsionen anzuwenden sind, da sie sich in ihrem Aufbau ähneln.

2.3.1 Autoxidation

Die Autoxidation von Lipiden wird als dreistufiger Prozess definiert. Initiation, Propagation und Termination bilden dabei die drei Abschnitte der Radikalkettenreaktion, welche in den folgenden Reaktionsgleichungen ((1)-(3)) veranschaulicht werden.



In der Phase der Initiation werden freie Radikale durch den Einfluss von Initiatoren wie Licht, Metalle oder Wärme und den Abzug von Wasserstoff aus ungesättigten Fettsäuren (LH) gebildet (1). Während der Propagation (2) reagiert das entstandene freie Radikal ($\text{L}^\bullet$) mit Sauerstoff, wodurch Peroxyl-Radikale ($\text{LOO}^\bullet$) entstehen. Durch weitere Abspaltung von Wasserstoffatomen von anderen Lipidmolekülen werden Hydroperoxide (LOOH) gebildet. Hydroperoxide zählen zu den primären Oxidationsprodukten. Daneben zählen konjugierte Diene ebenfalls zu den primären Oxidationsprodukten, da diese während der Entstehung von Hydroperoxiden aus ungesättigten Fettsäuren durch Verlagerung der Doppelbindungen entstehen können. Hydroperoxide sind instabile Verbindungen, weshalb aus ihnen im Zuge der fortlaufenden Lipidoxidation sekundäre Oxidationsprodukte wie Ketone, Alkohole und Aldehyde entstehen (Frankel 1984). Abbildung 4 veranschaulicht die Abnahme der primären und die Bildung sekundärer Oxidationsprodukte, welche zeitabhängig voranschreitet (Pignitter und Somoza 2012). Die Termination ist dann erreicht, sobald zwei Lipidradikale vorhanden sind, oder wenn alle Lipide oxidiert sind. Danach reagieren

zwei Peroxyl-Radikale zu nichtradikalischen Verbindungen, wodurch die Radikalkettenreaktion beendet wird (3) (Frankel 1984).

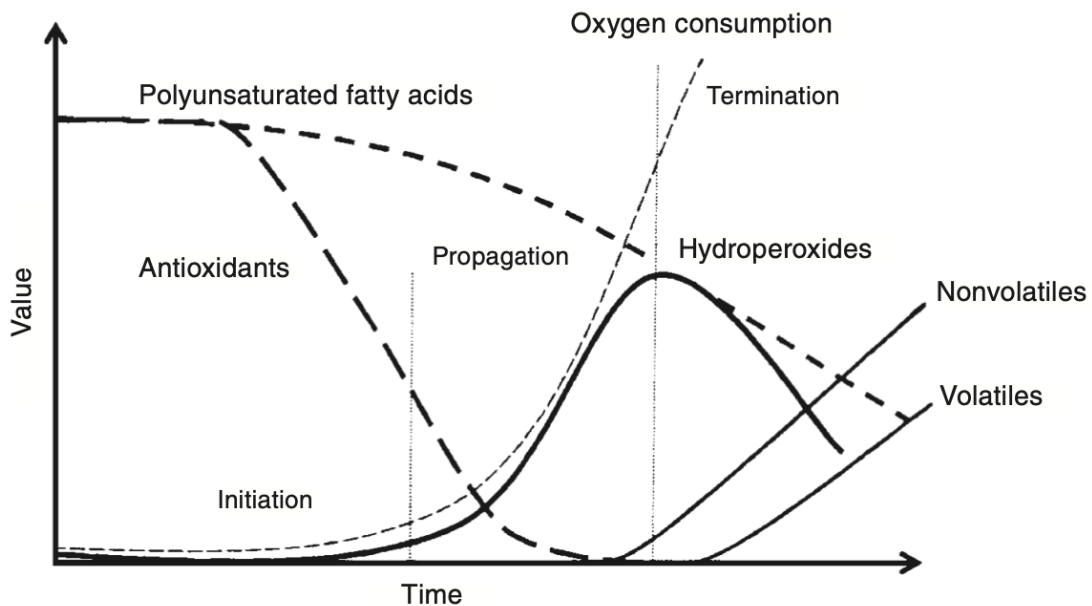
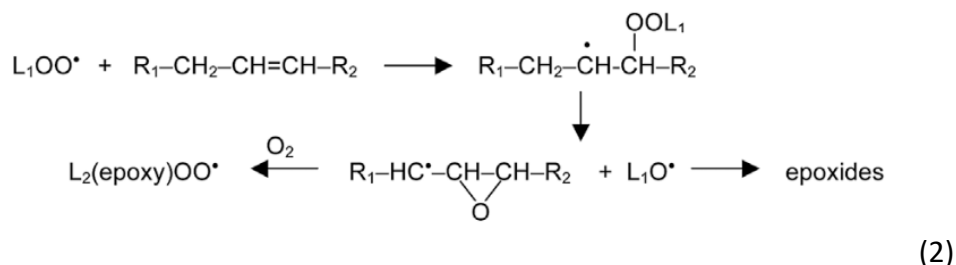
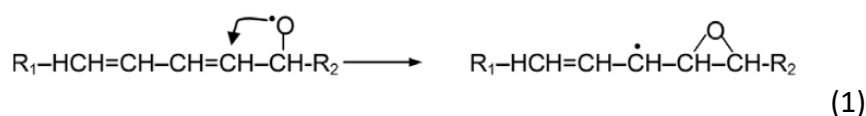


Abbildung 4: Zeitabhängige Abnahme von Antioxidantien, ungesättigten Fettsäuren und die Bildung von Lipidoxidationsprodukten in Pflanzenölen (Pignitter und Somoza 2012).

Schaich et al. (2017) zeigten, dass alternative Reaktionswege für die Ausbildung von weiteren Lipidoxidationsparametern verantwortlich sein können und die Auswirkung der Lipidoxidation in Lebensmitteln sowie in biologischen Systemen beeinflussen können. Durch die alleinige Analyse von Hydroperoxiden und Hexanal durch gängige Analysemethoden kann daher das volle Ausmaß der Lipidoxidation unterschätzt werden. Besonders die Bildung von Epoxiden - Verbindungen die in höherem Ausmaß mit Proteinen und Nukleinsäuren reagieren können als Hydroperoxide, und als potentiell gesundheitsschädlich gelten - waren Gegenstand ihrer Arbeit, in der sie weitere Reaktionsmechanismen zur Bildung von Epoxiden und daraus entstehender flüchtiger Verbindungen aufzeigten. Laut Schaich et al. (2017) konnten Epoxide aus zwei möglichen Reaktionen gebildet werden: (1) die interne Umlagerung von $LO^\bullet$ in den Fettsäuren und (2) die Addition von $LOO^\bullet$ an Doppelbindungen:



Schaich et al. (2017) oxidierten in ihrem Versuch Methylolinoleat bei 25°C, 40°C und 60°C für jeweils 20 Tage in offenen und geschlossenen Systemen. Durch die Analyse nicht flüchtiger Hydroperoxide mittels Xylenolorange, durch HPLC Trennung der Diethyldithiocarmat-Komplexe mit Epoxiden und mittels HPLC Trennung der Dinitrophenylhydrazone von Carbonylprodukten konnten sie zeigen, dass die Bildung von Epoxiden von Beginn an jene der Hydroperoxide übersteigt. Weiters fanden sie heraus, dass die Mengen aller Oxidationsprodukte in den offenen Systemen mit zunehmender Inkubationstemperatur absanken und sich auch die proportionale Verteilung der Produkte veränderte. In den geschlossenen Systemen stiegen die Carbonylprodukte an, was sie auf das Zurückhalten der flüchtigen Verbindungen zurückführten. Sowohl in den geschlossenen als auch in den offenen Systemen zeigten Epoxide eine höhere Temperaturstabilität oder eine erhöhte Bildungseffizienz als Hydroperoxide an, welche im Gegensatz zu Epoxiden mit steigender Temperatur zersetzt wurden. Der Gehalt an CD überstieg die Menge aller anderen Oxidationsprodukte, obwohl CD abnehmen, wenn Epoxide gebildet werden. Aus diesem Grund gingen Schaich et al. (2017) davon aus, dass weitere, bis dato unbekannte Verbindungen mit dien-Struktur in hohem Ausmaß gebildet wurden. Durch zusätzliche Analyse der flüchtigen Produkte konnten sie darüber hinaus zeigen, dass Pentan in höherem Ausmaß als Hexanal gebildet wurde. Neben Pentan und Hexanal konnten sie auch die Verbindungen t-2-Octenal, Methyloctanoat und t-2-Heptenal detektieren. Die Bildung dieser flüchtigen Zersetzungsprodukte führten Schaich et al. (2017) auf die Epoxidbildung an C9 und C13 von Methylolinoleat zurück. Sie behaupteten, dass bei Anlagerung von LOO• an die Doppelbindung bei C9 und die Bildung des C9-Epoxids zu

den Spaltprodukten Methyloctanoat, Octenal und Heptenal führte. Die Bindung von LOO• an die Doppelbindung bei C13 resultierte laut Schaich et al. (2017) im C13-Epoxid und schließlich in hohen Mengen des Aldehyds Pentan. Diese Erkenntnisse zeigen mögliche Reaktionswege der Epoxidbildung und die daraus resultierenden Sekundärprodukte auf und zeigen auch die Bedeutung weiterer alternativer Mechanismen der Lipidoxidation, welche neben den bekannten Reaktionswegen zur Bildung von Epoxiden und weiterer wenig bekannter, aber möglicherweise gesundheitlich und qualitativ weitaus bedeutsamerer Verbindungen, führen können (Schaich et al. 2017).

2.3.2 Einflüsse auf die Lipidoxidation in W/O-Emulsionen

2.3.2.1 Fettzusammensetzung

Die Zusammensetzung eines Fettes bestimmt seine Anfälligkeit auf Oxidation. Dabei ist besonders die Anzahl und Lage der in den Fettsäuren enthaltenen Doppelbindungen von großer Bedeutung (Frankel 1984). Fette und Öle, welche einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren aufweisen, werden wegen ihrer gesundheitlichen Vorteile auch in Margarinen eingesetzt. Besonders mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl. polyunsaturated fatty acids, PUFAs) sind bekannt für ihre positiven gesundheitlichen Auswirkungen (Sharma 2012). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Oxidationsrate von Ölen mit steigendem Anteil an ungesättigten Fettsäuren steigt (Frankel 1984). Folglich muss besonders in Margarinen mit einem hohen Anteil an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren versucht werden, die Lipidoxidationsrate durch den Einsatz von Antioxidantien zu verringern.

2.3.2.2 Sauerstoffgehalt

Sauerstoff ist einer der Hauptinitiatoren der Oxidation von Lipiden. Dabei ist Sauerstoff in Emulsionssystemen vor allem in der Ölphase präsent, da sich O₂ darin im Vergleich zur Wasserphase besser löst (McClements und Decker 2000).

2.3.2.3 Lagerbedingungen und der Einfluss von Temperatur und Licht

Die oxidative Stabilität von Ölen sinkt mit steigenden Temperaturen. Dabei können hohe Temperaturen die Bildung von Autoxidationsprodukten in der Induktionsperiode beschleunigen. Eine Lagerung von Ölen im Dunkeln bei Temperaturen von 0 bis 20 °C kann die Oxidationsrate verringern (Choe und Min 2006). Ein weiterer Faktor, der die Lipidoxidation während der Lagerung von Ölen und ölhaltigen Produkten beeinflusst, ist Licht. Pignitter et al. (2014) konnten zeigen, dass ultraviolette (UV-) Licht als Initiator der Lipidoxidation gilt, da es zur homolytischen Spaltung von Hydroperoxiden führt, wodurch reaktive Alkoxyl- und Hydroxylradikale entstehen, die die Radikalkettenreaktion vorantreiben (Pignitter et al. 2014). Produktverpackungen, bestehend aus Laminaten mit einer undurchlässigen Aluminiumschicht, können den Lichteintrag minimieren und die Stabilität von Butterprodukten erhöhen, weshalb sie auch in der Verpackung von Margarineprodukten eingesetzt werden (Lamberti und Escher 2007).

2.3.2.4 Einflussfaktoren der Grenzfläche

Liu et al. (2019) untersuchten die Einflüsse der Beschaffenheit des Interface in O/W-Emulsionen auf die Lipidoxidation. Dabei wurde insbesondere die Fähigkeit des Transports von Prooxidantien aus der Wasserphase in die Ölphase evaluiert. Durch NMR-Spektroskopie analysierten sie den strukturellen Aufbau der Grenzfläche zwischen Wasser- und Ölphase. Dabei konnten sie zeigen, dass die molekulare Mobilität im Interface und die Dichtheit der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen Einfluss auf die Lipidoxidation in der Ölphase haben (Liu et al. 2019). Auch Sun et al. (2011) beschrieben, dass die Interface-Membran als physikalische Barriere gesehen werden kann, da sie potentielle Prooxidantien daran hindert, in die Ölphase von O/W-Emulsionen zu diffundieren. Durch Erhöhung der Dicke der Membran sank die Lipidoxidation in den Öltröpfchen der Emulsion (Sun et al. 2011). Dies kann zur Annahme führen, dass auch die Dicke des Interfaces in W/O-Emulsionen entscheidend dafür ist, wie gut Prooxidantien in der Wasserphase in die Ölphase diffundieren können.

2.3.2.5 Eisen, Metalle

Dridi et al. (2016) untersuchten den Einfluss von Eisen auf die Lipidoxidation, welches in die Wasserphase einer W/O-Emulsion integriert wurde. Eisen ist eine der am stärksten prooxidativ wirksamen Substanzen. Sie konnten zeigen, dass das Einbringen von Eisen in die Wasserphase signifikant negative Auswirkungen auf die Lipidoxidation hatte. Je höher der Gehalt an Eisen in den Wassertröpfchen war, desto schneller stieg die Oxidationsrate der Öle in der Emulsion an. Dridi et al. (2016) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Eisenmoleküle über das Interface in die Ölphase gelangten und dieser Übergang nicht durch eine Emulgatorschicht, die aus einem hohen Anteil an Monoglyceriden mit niedrigem Molekulargewicht besteht, verhindert werden konnte. Erst bei Erhöhung des Anteils des Polymers Polyglycerol Polyricinoleat in der Grenzschicht, konnte die Lipidoxidationsrate verringert werden. Dies kann auf eine Erhöhung der Wanddicke des Interfaces zurückzuführen sein, wodurch eine physikalische Barriere zwischen dem prooxidativen Eisen in der Wasserphase und der Ölphase gebildet wird (Dridi et al. 2016).

Die starke prooxidative Wirkung von Übergangsmetallen beruht einerseits auf ihrer Fähigkeit, ungesättigte Fette direkt in Alkylradikale zu spalten. Eine weitere prooxidative Eigenschaft von Metallionen ist, dass sie Hydroperoxide (ROOH) in reaktive Peroxyl- (ROO•) und Alkoxyradikale (RO•) spalten, wie in Abbildung 5, Abschnitt (1) und (2) dargestellt.

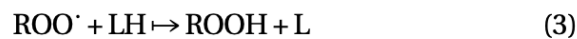


Abbildung 5: Prooxidative Wirkung von Übergangsmetallen (McClements and Decker 2000).

Diese Radikale können weiters mit ungesättigten Fettsäuren reagieren und zur Bildung von Lipidradikalen (L•, LOO•) führen (5) (McClements and Decker 2000).

Longyuan et al. (1997) konnten zeigen, dass die Ladung der Grenzfläche der Tröpfchen in einer O/W-Emulsion, in Abhängigkeit der eingesetzten Emulgatoren und des vorliegenden pH-Werts, die Lipidoxidation beeinflussen kann. Eine positiv geladene Grenzfläche führte zu einer Abnahme der Lipidoxidation, was sie durch die Abstoßung der positiv geladenen Eisen-Ionen begründeten. Durch Anziehung der Metallionen an die negativ geladene Grenzfläche wurde eine Steigerung der Lipidoxidation festgestellt, während bei einer ungeladenen Grenzfläche die Eisenbindung durch nichtionische Interaktionen mit dem im Kopf des ungeladenen Emulgators vorhandenen elektrophilen Sauerstoffs möglich ist. Eine Erhöhung der Lipidoxidationsrate konnte bei Senkung des pH-Werts von 6,5 auf 4 bei negativ geladener Grenzfläche nachgewiesen werden. Dies könnte durch die verbesserte Löslichkeit von Eisen bei niedrigem pH-Wert in der Wasserphase verursacht worden sein (Longyuan et al. 1997).

2.3.2.6 Antioxidantien

Antioxidantien sind Substanzen, welche die Lipidoxidation in Ölen und Fetten sowie in fetthaltigen Produkten verzögern und die Lagerstabilität erhöhen können. Anhand ihrer Mechanismen kann man zwei verschiedene Arten von Antioxidantien unterscheiden: primäre und sekundäre Antioxidantien. Zu den primären Antioxidantien zählen beispielsweise natürliche Antioxidantien wie Tocopherole, Phenole oder Ascorbinsäure. Primäre Antioxidantien agieren als Unterbrecher der Kettenreaktion der Autoxidation von Lipiden. Sie sind in der Lage, freie Lipid- oder Peroxylradikale aufzunehmen und sie in stabilere, weniger reaktive Formen umzuwandeln. Durch ihre besonders hohe Affinität zu Peroxylradikalen können primäre Antioxidantien dazu beitragen, die Radikalkettenreaktion zu verlangsamen. Durch Reaktion mit Alkoxyradikalen, Peroxylradikalen oder anderen Antioxidantien können sie darüberhinaus dazu beitragen, die Autoxidation zu terminieren. Zu den sekundären Antioxidantien zählen Substanzen, welche die Lipidoxidation durch Mechanismen wie die Chelatbildung mit Metallionen, den Transfer von Wasserstoff zu primären Antioxidantien, das Auffangen von Sauerstoff oder die Deaktivierung von reaktiven Verbindungen verzögern können. Im Vergleich zu primären Antioxidantien führen die Mechanismen von sekundären Antioxidantien nicht zur Umwandlung von Radikalen in stabilere Verbindungen. Zu den bekanntesten sekundären Antioxidantien zählt der Chelator

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), welcher in der Lage ist, in der Wasserphase vorliegende Metallionen in Emulsionen zu binden und so die Förderung der Lipidoxidation durch Eisen- oder Kupferionen zu verringern (McClements and Decker 2000).

Die Polarität von Antioxidantien beeinflusst ihren Einsatz in O/W- oder W/O-Emulsionen. Während hydrophile, polare Antioxidantien wie Ascorbinsäure oder Grünteeextrakt stärkere antioxidative Wirkung in Ölen zeigen, können lipophile, apolare Antioxidantien wie Tocopherole oder Ascorbylpalmitat besser in O/W-Emulsionen wirken. In O/W-Emulsionen orientieren sich lipophile Antioxidantien daher im Wasser-Öl-Interface, während hydrophile Antioxidantien in der Wasserphase verteilt bleiben. Dieses „polare Paradox“ beschreibt die bessere Wirkung von Antioxidantien in Lösungen umgekehrt zu ihrer Polarität und ist entscheidend für die effiziente Wirkung von Antioxidantien in Emulsionssystemen (Frankel et al. 1994).

Einige Studien konnten konträre Ergebnisse zum Polaren Paradox der Wirksamkeit von Antioxidantien in Emulsionssystemen aufzeigen (Stöckmann et al., 2000; Sasaki et al. 2010). Stöckmann et al. (2000) beobachteten zum Beispiel, dass die antioxidative Effektivität des Antioxidans Gallussäure und seiner Alkylester Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Octylgallat durch den Einsatz unterschiedlicher Emulgatoren in Maisöl basierten O/W-Emulsionen abhängt. Während beim Einsatz von Lecithin die Wirksamkeit der Antioxidantien das Polare Paradox bestätigte, zeigten Emulsionen, welche durch die Emulgatoren Natriumdodecylsulfat oder Polyalkylenglycolether („Brij 35“) stabilisiert wurden widersprüchliche Ergebnisse. Die Wirksamkeit der Antioxidantien stieg nicht mehr mit steigender Hydrophobizität und zeigte, dass die Anwendbarkeit des Polaren Paradox in Emulsionssystemen limitiert sein könnte (Stöckmann et al. 2000). Sasaki et al. (2010) demonstrierten darüber hinaus, dass sich in einer O/W-Emulsion, stabilisiert durch den Emulgator Polyalkylenglycolether („Brij 35“), phenolische Antioxidantien, welche mit Kohlenwasserstoffketten konjugiert wurden, zwar vermehrt in die Öltröpfchen integrierten, jedoch dort keine erhöhte antioxidative Wirksamkeit hervorruften (Sasaki et al. 2010). Zur Erklärung der widersprüchlichen Ergebnisse formulierten Laguerre et al. (2009) die Hypothese, dass die Beziehung zwischen antioxidativer Kapazität und der Hydrophobizität der Verbindungen ein

nichtlinearer sein könnte. Mit steigender Alkylkettenlänge der Chlorogensäure stieg zunächst die Wirksamkeit in der O/W-Emulsion bis zu einem Maximum an und sank dann mit weitersteigender Kettenlänge rapide ab. Die Alkylkettenlänge mit maximaler antioxidativer Wirksamkeit, bevor diese absank, bezeichneten Laguerre et al. (2009) als „critical chain length“ (CCL) oder zu Deutsch „kritische Kettenlänge“ (Laguerre et al. 2009). Die Mechanismen, welche dem nichtlinearen „cut-off“ Phänomen der Antioxidantien-Wirksamkeit in Emulsionen zu Grunde liegen könnten, begründeten Laguerre et al. (2015) mit drei möglichen Theorien: (1) die Hypothese der reduzierten Mobilität durch die Erhöhung der Alkylkettenlänge, (2) die Hypothese der Internalisierung, also der Annahme, dass die Erhöhung der Alkylkettenlänge von mittel- zu langkettigen Verbindungen die Antioxidantien vom Interface in das Zentrum der Emulsionströpfchen treibt und (3) die Hypothese der Selbstaggregation, bei der sich die langkettigen Antioxidantien zu Micellen zusammenschließen und sich folglich vom Interface entfernen. Lag die Kettenlänge bei kurz- bis mittelkettigen Antioxidantien unter der CCL begründeten Laguerre et al. (2015) die verringerte antioxidative Kapazität durch die verringerte Verfügbarkeit der Antioxidantien am Interface, wo die Oxidation stattfindet. Zusammenfassend konnten Laguerre et al. (2015) zeigen, dass mit steigender Hydrophobizität der Antioxidantien nach dem Punkt der CCL der „cut-off“ Effekt einsetzt und die antioxidative Kapazität der Verbindungen in Emulsionen abnimmt. Somit herrscht laut Laguerre et al. (2015) kein linearer Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der Antioxidantien und ihrer antioxidativen Wirksamkeit in O/W-Emulsionen, wie dies durch das polare Paradox suggeriert wird (Laguerre et al. 2015).

Durch das kinetische Pseudophase-Modell können darüber hinaus wichtige Informationen über die Verteilung von Antioxidantien in den drei Emulsionsbereichen Wasserphase, Ölphase und Interface erlangt werden. Da durch Zugabe der Emulgatoren kinetisch stabile Emulsionen erzeugt werden und sich eine zusätzliche Region, das Interface formt, ist es nicht möglich, die Konzentration von Antioxidantien in den unterschiedlichen Phasen von Emulsionen durch die Trennung dieser Phasen zu bestimmen, da es nicht möglich ist, Wasser- und Ölphase vom Interface zu trennen, ohne das Equilibrium zu stören und dadurch verfälschte Ergebnisse zu erhalten. Bei der

Pseudophase-Modell-Methode wird die Reaktivität eines im Interface lokalisierten Arendiazonium-Ions, 4-Hexadecylbenzendiazonium, 16-ArN_2^+ mit Antioxidantien herangezogen. Die reaktive $-\text{N}_2^+$ Gruppe kommt ausschließlich im Interface der Emulsionen vor, wo sie mit den Antioxidantien reagiert. Anhand des kinetischen Pseudophase-Modells erhält man Auskunft über die Verteilungskonstanten zwischen Wasserphase und Interphase, P_W^I , und zwischen Ölphase und Interphase, P_O^I , und über die Geschwindigkeitskonstante im Interface k_1 , ohne dass die Phasen voneinander getrennt werden müssen. Will man die Verteilung hydrophiler Antioxidantien beschreiben, benötigt man ausschließlich die Verteilungskonstante P_W^I , für hydrophobe Antioxidantien benötigt man P_O^I (Losada-Barreiro et al. 2015). Durch dieses Modell gelingt eine Evaluierung der Verteilung der Antioxidantien zwischen der Öl- und Wasserphase und dem Interface (Bravo-Diaz et al. 2017).

Aufgrund des Trends in Richtung natürlicherer Lebensmittel und des Verlangens von Konsument*innen, weniger synthetische Lebensmittelzusatzstoffe in der Lebensmittelproduktion einzusetzen, steigt vermehrt die Nachfrage nach natürlichen Antioxidantien. Dieser Trend ist beispielsweise durch Antioxidantien wie Butylhydroxytoluol (BHT) begründet, ein synthetischer Lebensmittelzusatzstoff (E 321), welcher im Tierversuch zur Entwicklung hepatozellulärer Karzinome führte (European Food Safety Authority (EFSA) 2012). Beispiele aktuell häufig eingesetzter natürlich antioxidativ wirksamer Pflanzenstoffe sind Rosmarinextrakt und Grünteeextrakt (McClements et al. 2000, Senanayake 2013).

Rosmarinextrakt

Die antioxidative Wirkung von Rosmarinextrakt kann auf die enthaltenen Verbindungen Carnosinsäure, Carnosol und Rosmarinsäure zurückgeführt werden.

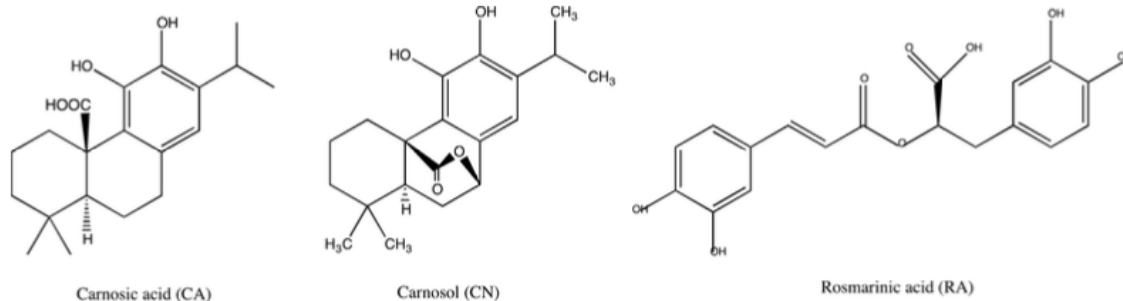


Abbildung 6: Antioxidativ wirksame Strukturen in Rosmarinextrakt: Carnosinsäure, Carnosol und Rosmarinsäure (Xie et al. 2017).

Von den drei Hauptkomponenten ist Carnosinsäure die am stärksten wirksamste Verbindung. Carnosinsäure kann durch Umlagerung anfänglich oxidierte phenolischer Verbindungen in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten Wasserstoffatome abgeben und so als Reduktionsmittel wirken (Xie et al. 2017). Rosmarinextrakt wird aus den Blättern von Rosmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) erzeugt und zeichnet sich neben seinem Gehalt an phenolischen Diterpenen besonders durch seinen charakteristischen Geschmack aus, weshalb der Einsatz von Rosmarinextrakt in Lebensmitteln nicht immer auf vollen Zuspruch der Konsument*innen trifft (Erdmann et al. 2015). Durch seine lipophilen Eigenschaften kann Rosmarinextrakt gut in Ölen und Fetten eingesetzt werden (Azizkhani und Zandi 2010). Frankel et al. untersuchten die unterschiedliche Wirkung von Rosmarinextrakt in Maisöl im Vergleich zu ihrer Wirkung in O/W-Emulsionen. Rosmarinsäure und Carnosinsäure sind im Vergleich zu Carnosol stärker polar. Dies führte dazu, dass die polarerer Komponenten weniger wirksam in O/W-Emulsionen als in Ölen waren, da sie in der Wasserphase verweilten, und in der Ölphase nicht ihre antioxidative Wirkung ausüben konnten. Rosmarinextrakt zeigte allgemein eine signifikant höhere antioxidative Aktivität beim Einsatz in „bulk“ Öl Systemen im Vergleich zum Einsatz in O/W-Emulsionen (Frankel et al. 1996).

Durch die bessere Wirksamkeit von Rosmarinextrakt in Ölen als in O/W-Emulsionen, deren Hauptbestandteil Wasser ist, kann angenommen werden, dass Rosmarinextrakt auch in Margarinen eine gute antioxidative Wirksamkeit ausüben kann. Azizkhani und

Zandi (2010) untersuchten die Wirksamkeit von Mischungen aus natürlichen Antioxidantien, Tocopherolen, Ascorbylpalmitat, Rosmarinextrakt und Lecithin auf die Stabilität von Margarinen. Dabei konnten sie zeigen, dass eine Kombination von Rosmarinextrakt mit Ascorbylpalmitat oder mit Tocopherol und Lecithin eine hohe antioxidative Wirkung in Margarinen hat. Lecithin, welches üblicherweise als Emulgator in Margarinen eingesetzt wird, kann die Propagation der freien Radikale in der Lipidoxidation verhindern, indem es die Verteilung von Antioxidantien in Emulsionen verbessert, wodurch die Reaktivität mit freien Radikalen verstärkt werden kann. Besonders in Kombination mit phenolischen Antioxidantien zeigt Lecithin synergistische, protektive Effekte. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass Kombinationen von 200 ppm Ascorbylpalmitat und 200 ppm Rosmarinextrakt oder von 200 ppm Rosmarinextrakt, 200 ppm Tocopherol und 1000 ppm Lecithin in Margarinen das synthetische Antioxidationsmittels 2-tert-Butylhydrochinon, welches potentiell karzinogene Eigenschaften aufweist, ersetzen können (Azizkhani und Zandi 2010). Auch Wada und Fang (1992) konnten zeigen, dass die antioxidative Wirksamkeit von Rosmarinextrakt in Sardinenöl verstärkt wird, wenn man es in Kombination mit alpha-Tocopherol einsetzt, wodurch ein synergistischer Effekt der beiden Antioxidantien angenommen werden kann (Wada und Fang 1992). Somit kann angenommen werden, dass der Einsatz von Rosmarinextrakt in Margarinen in Kombination mit anderen Antioxidantien wie Tocopherolen oder Ascorbylpalmitat und Lecithin eine starke protektive Wirkung gegen Lipidoxidation und eine Erhöhung der Stabilität bewirken kann.

Grünteextrakt

Grünteextrakt wird aufgrund seines Gehalts an Polyphenolen als Antioxidans in Lebensmitteln eingesetzt. Ein großer Anteil der Grünteblätter besteht aus den Catechinen: 25 – 35% der Trockenmasse von Grünteblättern besteht aus den Catechinen, welche zur strukturellen Familie der Flavonoide zählen. Die wichtigsten aktiven Komponenten in Grünteextrakt werden in Abbildung 7 dargestellt. Zu ihnen zählen die Flavanol Monomere Epigallocatechin-3-Gallat, Epicatechin-3-Gallat, Epicatechin und Epigallocatechin (Senanayake 2013).

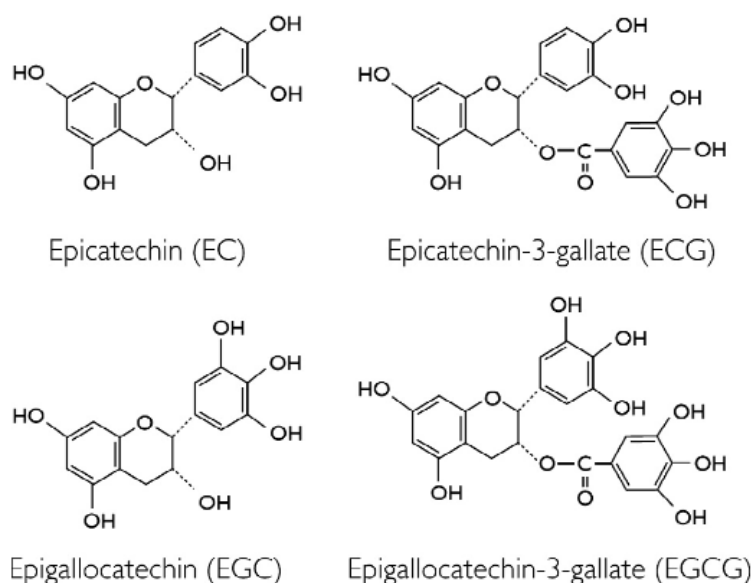


Abbildung 7: Chemische Struktur der Catechine in Grünteeextrakt (Senanayake 2013).

Das Hauptstrukturmerkmal der Catechine sind die beiden Benzenringe, welche als A- und B-Ringe bezeichnet werden. Darüber hinaus enthalten alle Catechinmoleküle einen Dihydropyran Heterozyklen mit einer Hydroxylgruppe am dritten Kohlenstoffatom. Eine weitere typische Eigenschaft der Catechine ist die Chiralität: sie besitzen zwei chirale Zentren am 2. und 3. Kohlenstoffatom. Dadurch haben die Moleküle vier Diastereoisomere, von denen zwei Isomere in *trans* Konfiguration und die beiden anderen Isomere in *cis* Konfiguration vorkommen. *Trans* Isomere bezeichnet man als Catechine, während die *cis* Isomere auch Epicatechine genannt werden. Einige weitere Strukturmerkmale bestimmen die antioxidative Aktivität der Moleküle, wie zum Beispiel die Anzahl und Position der Hydroxylgruppen. Durch die aromatischen Strukturen und Hydroxylgruppen in den Catechinen wird die Bindung und Neutralisierung von freien Radikalen in der Lipidoxidation gewährleistet. Neben ihrer Eigenschaft als Radikalfänger wirken Catechine auch als Chelatbildner antioxidativ, indem sie Metallionen binden. Darüber hinaus besitzen Grüntecatechine die Fähigkeit, beta-Carotine vor Oxidation zu schützen, indem sie diese wie ungesättigte Fettsäuren vor Radikalangriffen schützen. Kommerziell erhältliche Grünteeextrakte sind als wasserlösliche Pulver oder in flüssiger Form erhältlich. Ihre Stabilität ist abhängig vom pH-Wert. Besonders hohe Stabilität zeigen Grüntecatechine in Lösungen mit einem pH-Wert unter 4, während sie bei pH Werten über 8 sehr instabil sind. Ihr Einsatzbereich reicht von Fleischprodukten, über

Mayonnaisen bis hin zu W/O-Emulsionen wie Margarinen, in denen sie eine ähnliche antioxidative Wirkung wie das synthetische Antioxidans 2-tert-Butylhydrochinon haben (Senanayake 2013).

2.3.3 Lagerstabilitätsstudien von Margarinen

Margarinen sind aufgrund ihres hohen Gehalts an Fetten besonders anfällig für Lipidoxidation. Lipidoxidation in Emulsionssystemen ist ein komplexer Mechanismus, der von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird, wie in vorherigen Abschnitten gezeigt werden konnte. Auch Margarineprodukte entwickeln bei fortschreitender Lipidoxidation charakteristische Eigenschaften wie unangenehme Gerüche (Chougui et al. 2015). Studien über die stattfindenden Oxidationsprozesse zur genauen Evaluierung der Haltbarkeit von Margarinen sind aufgrund der mangelnden Studienlage von steigendem Interesse (Maskan et al. 1993). So können gesündere Produkte entwickelt werden und die Verschwendung von Lebensmitteln minimiert werden (Zaeromali et al. 2014). Einige wenige Studien untersuchten bereits die Veränderungen von Margarinen während unterschiedlicher Lagerdauern (Maskan et al. 1993; Zaeromali et al. 2014; Nogala-Kalucka und Gogolewski 2000). Dabei wurden bei allen Studien die Peroxidzahlen (POZ) der Margarinen bestimmt, welche mit fortschreitender Lagerdauer zunahmen. Obwohl der Codex Alimentarius einen Grenzwert von 10 meq O₂/kg Öl für die Peroxidzahl von raffinierten Ölen vorschreibt, gibt es keinen Grenzwert für Margarinen, obwohl diese zu einem Großteil aus raffinierten Ölen und Fetten bestehen (Codex Alimentarius 2001). Schaich et al. (2017) zeigten auf, dass neben den klassischen Reaktionswegen und der Bildung von Hydroperoxiden auch weitere alternative Oxidationsprodukte von Bedeutung sind (Schaich et al. 2017). Als primäres Ziel dieser Forschungsarbeit wurde der Einfluss einzelner Zutaten, wie Emulgatoren oder Antioxidantien, auf die oxidative Stabilität von Margarinen untersucht. Im Zuge dieser Masterarbeit wurden als sekundäres Ziel, neben der Analyse der POZ, weitere Analysemethoden herangezogen, um die oxidative Stabilität von Margarinen während der Lagerdauer von 180 Tagen zu evaluieren und die Ergebnisse auf potentielle neue Lipidoxidationsmarker in Margarinen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit können als Grundstein für weitere Analysen für die Bestimmung der Einflüsse auf die Oxidationsstabilität von Margarinen und zur

Verbesserung der Produkte durch den Einsatz bestimmter Zutaten herangezogen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Im Anschluss werden alle Materialien, welche für die einzelnen Analysen der Forschungsarbeit erforderlich waren, aufgeführt.

Chemikalien für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung	Hersteller
Isooctan ROTIPURAN® ($\geq 99,5\%$, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co KG
Kaliumhydroxid ($\geq 85\%$, p.a., in Plätzchen)	Carl Roth GmbH & Co KG
Methanol ROTIPURAN® ($\geq 99,9\%$, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co KG
Salzsäure 1N	Carl Roth GmbH & Co KG
Methylorangelösung 0,1%	Merck KgaA
Stickstoff 5.0	Air Liquide Austria GmbH
Wasserstoff 5.0	Air Liquide Austria GmbH
Synthetische Luft 5.0	Air Liquide Austria GmbH
Chemikalien für die Bestimmung der Peroxidzahl	Hersteller
Essigsäure ROTIPURAN® (100%, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co KG

Isooctan ROTIPURAN® (≥99,5%, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co KG
Kaliumjodid (≥99,5%, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumthiosulfatlösung	Carl Roth GmbH & Co KG
Chemikalien zur Bestimmung der Oxidationsstabilität	Hersteller
Natriumsulfat Decahydrat	Carl Roth GmbH & Co KG
Chemikalien für die Bestimmung der Konjugierten Diene	Hersteller
Isooctan ROTISOLV® (≥99,8%, UV/IR-Grade)	Carl Roth GmbH & Co KG
Chemikalien für die Bestimmung der Oxidierten Triglyceride	Hersteller
Diethylether ROTIPURAN® (≥99,5%, p.a., stab.)	Carl Roth GmbH & Co KG
Petrolether 40-60°C ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH & Co KG
Acetonitrile HiPerSolv Chromanorm®	VWR Chemicals
Ameisensäure ROTIPURAN® (≥98%, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co KG

2-Propanol ROTISOLV® (≥99,95%, LC/MS-Grade)	Carl Roth GmbH & Co KG
Ammoniumformiat (≥99,0%)	Sigma-Aldrich
Glyceryl triheptadecanoat	Sigma-Aldrich
Allgemeine verwendete Chemikalien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Argon 5.0	Linde Gas GmbH
Stickstoff 5.0	Linde Gas GmbH
Verbrauchsmaterialien	Hersteller
20 ml Headspace Vial, Braunglas	Shimadzu
Dichtscheibe/Septa N17, Sil. Blau transp. PTFE weiß, 1,5 mm	Macherey-Nagel
Autosamplerfläschchen GC 1,5 ml	VWR Chemicals
Quarzglas Küvette, Makro	Hellma GmbH & Co KG
Flaschenaufsatz-Dispenser Dispensette®S 10-100ml	BRAND GmbH & Co KG

Strata® SI-1 Silica Tubes (55 µm, 70 Å)	Phenomenex Ltd. Deutschland
Eppendorf® Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf Austria GmbH
Trennsäule für die Gaschromatographie: HP-88 100 m x 250 µm x 0,2 µm	Agilent Technologies, Inc.
Faltenfilter Typ MN 615 ¼ Ø: 150mm	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
PVDF Filter 0,22µm	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
Trennsäule für die LC-MS: C18 Säule TMS endcapped Luna 150 x 2,1 mm, 3 µm	Phenomenex Ltd. Deutschland
Geräte	Hersteller
Titrimo plus 848	Metrohm Inula GmbH
ONDA UV-30 SCAN Spectrophotometer	Giorgio Bormac s.r.l
Ranzimat 743	Metrohm Inula GmbH
Analysenwaage New Classic MS	Mettler-Toledo GmbH
GC, Agilent 7890A	Agilent Technologies
Heizplatte mit Magnetrührer RET basic	IKA
Vortex, RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH
Trockenofen DRY-Line®	VWR International GmbH

LCMS- 8040	Shimadzu
SCADA SPX Flow Technology	Gerstenberg Schröder
Softwares	Hersteller
743 Rancimat Steuerung	Metrohm AG
Excel	Microsoft
Sigma Plot	Systat Software GmbH
Agilent Chemstation GC7890 online	Agilent Technologies
LC MS Software	Lab Solutions

3.2 Probennahme

3.2.1 Lagerstudie

Bei den Lagerproben handelte es sich um vier handelsübliche Industriemargarinen, welche an acht Lagertagen (Tag 0, Tag 1, Tag 7, Tag 14, Tag 28, Tag 56, Tag 99, Tag 180) analysiert wurden. Die Margarinen wurden an der Produktionslinie einzeln in 2,5 kg Riegel in Aluminium-Verbundstoff gewickelt. In einem Karton wurden vier Riegel abgepackt. Für die Lagerstudie wurden ab dem Produktionstag zwei Kartons der jeweiligen Margarine im 15°C Lagerraum aufbewahrt. Im Zuge der Lagerstudie wurde je ein 2,5 kg Margarineblock pro Lagertag entnommen. Von jedem Block wurde zunächst eine 1 cm Schicht abgekratzt, die Margarine darunter entnommen und in 50 ml Tubes überführt. Nach der Aliquotierung wurden die Proben mit Argon begast und bei -80°C im Gefrierfach gelagert. Die Proben des letzten Lagertages konnten nicht begast werden, da aufgrund der Covid-19-Maßnahmen ein Betreten der Universität nicht

möglich war. Bei der Analyse dieser Margarinen wurde vor der Analyse eine 1 cm Schicht der Proben in den Proben-Tubes abgetragen und die Probe darunter entnommen.

3.2.1.1 Rezepturen und Zusammensetzung der Lagerproben

Alle Lagerproben wurden auf derselben Produktionslinie hergestellt. Bei den Margarinen handelte es sich um Back- und Crememargarinen. Die Zusammensetzung der Margarinen LP1-LP4, die enthaltenen Fette und Öle sowie die Einzelzutaten werden in Tabelle 13 (Anhang) angeführt. Backmargarinen werden in der Herstellung von Kuchen, Süßgebäckwaren und Keksen eingesetzt und zeichnen sich durch ihre hohe Plastizität aus. Bei der Bearbeitung von Teigen unter dem Einsatz von Backmargarinen müssen diese einerseits formbar bleiben und geschmeidig bleiben. Backmargarinen müssen in der Regel nicht gekühlt werden, da sie sehr hart sind (Manley 1991).

Crememargarinen werden in der Herstellung von Cremen eingesetzt. Dabei ist es wichtig, dass die Margarine dazu beiträgt, dass ausreichend Luft in die Masse eingearbeitet werden kann und die Creme stabil bleibt. Besonders Öle mit hohem Anteil an Laurinsäure (C12:0), wie Kokosöl, werden in Crememargarinen eingesetzt (Gerstenberg Kirkeby 2007).

Rezeptur Margarine LP1

Die Margarine LP1 besteht aus 80 % Fett und 20 % Wasser. In der Fettphase enthält LP1 die Zutaten Beta – Carotin, Emulgatormischung (Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren E471, Polyglycerol Ester von Speisefettsäuren E475) auf Palmölbasis und Butteraroma. In der Margarine LP1 werden raffiniertes und gehärtetes Kokosöl, eine Palmöl-Palmkernöl-Umesterung, raffiniertes Sonnenblumenöl und raffiniertes Rapsöl eingesetzt. LP1 ist eine Crememargarine und wird zum Aufschlagen von Tortencremen verwendet.

Rezeptur Margarine LP2

Bei Lagerprobe LP2 handelt es sich um eine Backmargarine mit 80 % Fettanteil und 20 % Wasseranteil. Neben den Emulgatoren Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren (E471) und Lecithin, Beta-Carotin und Butteraroma enthält LP2 mit Joghurtkulturen

gesäuerte, pasteurisierte Magermilch und Kaliumsorbat als weitere Zutaten. In der Wasserphase werden zusätzlich Salz und Zitronensäure eingesetzt. Die enthaltenen Fette sind raffiniertes Kokosöl, raffiniertes Palmöl, Butterschmalz und raffiniertes Rapsöl. Die Margarine LP2 findet in der Herstellung von unterschiedlichen Backwaren und Teigen Anwendung.

Rezeptur Margarine LP3

Lagermargarine LP3 ist eine Backmargarine mit 80 % Fett- und 20 % Wassergehalt. Die enthaltenen Zutaten sind die Emulgatoren Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren (E471) und Lecithin, Beta-Carotin, Butteraroma, Salz und Zitronensäure. In der Fettphase werden die Rohstoffe raffiniertes Palmöl, raffiniertes Palmstearin und raffiniertes Rapsöl verwendet. Lagerprobe LP3 ist eine Backmargarine und sorgt bei Mürbe- und Hefeteigen für gute Stabilität.

Rezeptur Margarine LP4

Die Margarine LP4 ähnelt in ihrer Zusammensetzung jener von LP1. In LP4 werden jedoch keine palmölbasierten Rohstoffe eingesetzt. Die Emulgatormischung (Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren, E471 und Polyglycerol Ester von Speisefettsäuren E475) auf Rapsölbasis, Beta-Carotin, Butteraroma, Salz und Zitronensäure werden als Zutaten in der Produktion eingesetzt. Als Rohstoffe werden gehärtetes und raffiniertes Kokosöl, eine gehärtete Kokosöl-Rapsöl-Umesterung, raffiniertes Sonnenblumenöl und raffiniertes Rapsöl eingesetzt. LP4 ist palmölfrei und ist wie LP1 eine Crememargarine. Sie wird in der Herstellung von Dekorcremen und Füllungen verwendet.

3.2.2 Produktion von Mustermargarinen im Kleinmaßstab auf der Pilotanlage

Für die Evaluierung der Einflüsse von Zutaten auf die Stabilität einer Backmargarine wurden auf Basis der Rezeptur von Margarine LP3 20 Mustermargarinen produziert. Die Produktion der Mustermargarinen erfolgte auf der Anlage SCADA SPX Flow Technology der Firma Gerstenberg Schröder. In Abbildung 8 werden die Arbeitsschritte schematisch dargestellt:

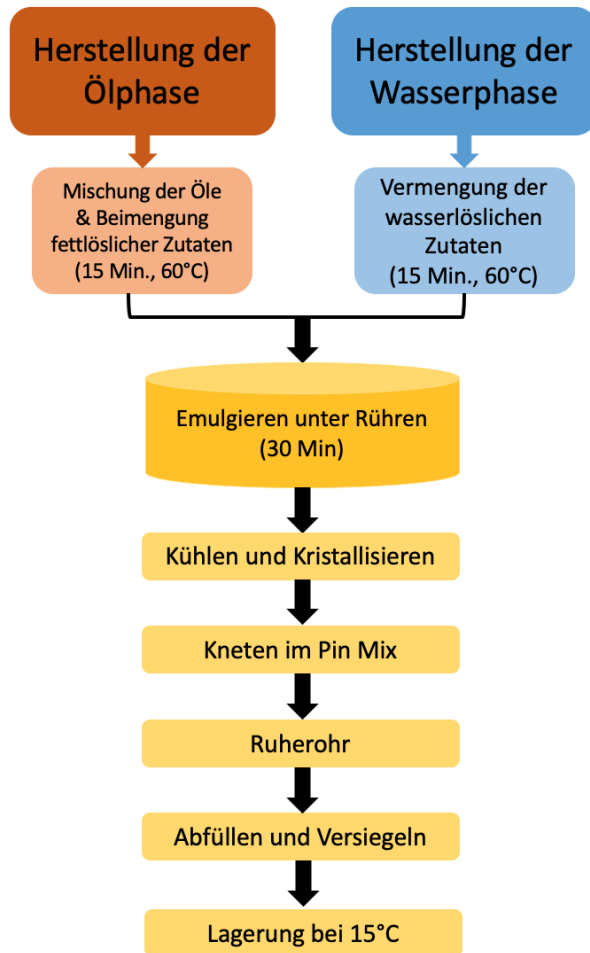


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Produktionsschritte auf der Pilotanlage.

Die Fette und Öle wurden an den Produktionstagen aus dem Tanklager in bereits aufgeschmolzener Form bei 60°C vorbereitet. Die Pilotanlage besteht aus einem Emulsionsbehälter, einer Pumpe, zwei Kristallisationseinheiten, einem „Pin Mix“ und einem Ruherohr. Zu Beginn der Produktion wurden die aufgeschmolzenen Fette und Öle im vorgeheizten Emulsionsbehälter für 15 Minuten bei 60°C unter Rühren vermengt. Alle fettlöslichen Komponenten wurden in die Fettphase zugegeben und darin gelöst. Vor Zugabe des Wassers wurden darin alle wasserlöslichen Zutaten vollständig für 15 Minuten bei 60°C gelöst. Die Wasserphase wurde dann langsam und stetig unter ständigem Rühren mit der Fettphase vermengt. Nach 30 Minuten Rühren bildete sich eine stabile W/O-Emulsion.

Vor dem Aktivieren der Pumpe wurden folgende Fahrdaten im System der Anlage gespeichert:

Tabelle 1: Fahrdaten der Pilotanlage Margarinemuster Produktion.

Kapazität Pumpe	80 l/h	
Kristallisator 1	-6°C	500rpm
Kristallisator 2	-4°C	800rpm
Pin Rotor	1000rpm	

Für die Produktion der Mustermargarinen wurden die Rohstoffe raffiniertes Palmöl, raffiniertes Palmstearin und raffiniertes Rapsöl in Anlehnung an die Rezeptur von Margarine LP3 verwendet. Die weiteren Zutaten wurden laut den Tabellen 2 - 4 in den entsprechenden Konzentrationen beigelegt. Bei allen Mustermargarinen wurden dieselben Fettrohstoffe eingesetzt.

Zuerst wurden zwei Emulgatoren getestet. Die beiden getesteten Emulgatoren sind Monoglyceride und sie sind als *quantum satis* Zusatzstoffe mit der E-Nummer 471 und der Bezeichnung Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren in der Zusatzstoffverordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments geregelt (Europäische Union (EU) 2008).

Bei Emulgator 1 (E1) handelt es sich laut Hersteller Danisco um ein destilliertes Monoglycerid, welches aus vollständig gehärtetem Öl auf Palmbasis produziert wird. Der Emulgator kann laut Hersteller für die Herstellung von Margarinen im Bereich von 0,1 – 1,0% des Gesamtprodukts eingesetzt werden. Der Einsatz von E1 in den Mustermargarinen erfolgte im Bereich von 0,14– 0,21%. E1 hat sich als Emulgator in der Herstellung von palmölbasierten Margarinen am Produktionsstandort von Senna Nahrungsmittel bewährt.

Bei Emulgator 2 (E2) handelt es sich laut Herstellerbezeichnung ebenfalls um ein Monoglycerid des Herstellers Danisco, welches auf Basis von ungehärtetem Sonnenblumenöl hergestellt wird. Dieser Emulgator ist bis dato nicht im Einsatz in der Margarineproduktion der Firma Senna Nahrungsmittel GmbH, hat aber aufgrund seiner palmfreien Zusammensetzung Potential für den Einsatz in palmölfreien Produkten. E2

unterscheidet sich von E1 auch in seinem empfohlenen Einsatzbereich für Margarinen: In Crememargarinen empfiehlt der Hersteller Danisco einen Einsatz von 0,5 – 1,0% am Gesamtprodukt. Bei der Herstellung der Mustermargarinen wurde E2 im Bereich von 0,75 – 0,9% an der Gesamtmargarine eingesetzt.

Tabelle 2: Produktion der Margarinemuster 1 - 6

Muster (MU)	Zutat	Gehalt in Margarine [%]
MU1	Emulgator 1	0,175
MU2	Emulgator 1	0,140
MU3	Emulgator 1	0,210
MU4	Emulgator 2	0,750
MU5	Emulgator 2	0,600
MU6	Emulgator 2	0,900

Die folgenden Muster wurden mit der Emulgatorkonzentration von Margarinemuster 1 produziert. Zur Testung der Wirkung unterschiedlicher Antioxidantien wurden drei Antioxidantien gewählt, welche bereits in Öl- und Margarineprodukten der Firma Senna Nahrungsmittel GmbH verwendet werden: DL- α -Tocopherylacetat (aTA), Rosmarinextrakt E392 (RE) und Grünteeextrakt (GTE).

DL- α -Tocopherylacetat ist ein synthetisches Vitamin E-Supplement und sein Einsatz wird im Rahmen der Verordnung (EG) Nr. 1925/2006 zugelassen (Europäische Union (EU) 2006).

Rosmarinextrakt ist als das Antioxidationsmittel E 392 in der EU-Zusatzstoffverordnung (EG) Nr. 1333/2008 für den Einsatz in Fetten und Ölen mit Beschränkungen auf die

eingesetzte Menge (Höchstmenge 30 bzw. 50 mg/l bzw. mg/kg) und die Art der Öle zugelassen. Der Einsatz in Streichfetten ist bis dato auf den Einsatz in Produkten mit einem Fettgehalt von weniger als 80% mit einer Höchstmenge von 100 mg/kg beschränkt (Europäische Union (EU) 2008).

Grünteeextrakt wird laut dem Hersteller Danisco als Aroma und aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften unter anderem in Margarinen und Fleischwaren eingesetzt. Der Extrakt besteht laut Hersteller aus 20% Catechinen sowie aus der Trägersubstanz NaCl. Aufgrund seiner Aromaeigenschaften wird der Einsatz von Grünteeextrakt in der Verordnung (EU) 1334/2008 als natürliches Aroma zugelassen und kann als solches in Lebensmittel eingesetzt und deklariert werden (Europäische Union (EU) 2008).

Die Antioxidantien wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen (Standard, -20%, +20%) eingesetzt (Tab. 3), ausgehend von den Standardkonzentrationen, in denen sie bereits in der Produktion im Einsatz sind, um zusätzlich die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen zu evaluieren.

Tabelle 3: Produktion der Margarinemuster 7 - 15

Muster (MU)	Zutat	Gehalt in Margarine [%]
MU7	Vitamin E Acetat	0,2 %
MU8	Vitamin E Acetat	0,16 %
MU9	Vitamin E Acetat	0,24 %
MU10	Rosmarinextrakt	0,2 %
MU11	Rosmarinextrakt	0,16 %
MU12	Rosmarinextrakt	0,24 %

MU13	Grünteextrakt	0,2 %
MU14	Grünteextrakt	0,16 %
MU15	Grünteextrakt	0,24 %

Bei den finalen Margarinemustern (Tab. 4) wurden zusätzlich zu Emulgator 1 und Grünteextrakt Zutaten, welche standardisiert in Margarinen eingesetzt werden, in ihrer Standardkonzentration einzeln beigefügt. Bei MUGe wurden alle Zutaten kombiniert eingesetzt.

Tabelle 4: Produktion der Margarinemuster 16 – 19, MUGe

Muster (MU)	Zutat	Gehalt in Margarine [%]
MU16	Zitronensäure	0,01 %
MU17	Beta – Carotin	0,001 %
MU18	Butteraroma	0,04 %
MU19	NaCl	0,1 %
MUGe	enthält alle Zutaten	

Die Margarinemuster wurden in 500g-Becher abgefüllt und mit einer Folie versiegelt. Zur vollständigen Aushärtung wurden sie einen Tag im Dunkeln bei 15°C gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurde vor der Aliquotierung eine 1 cm Schicht abgekratzt, die Probe darunter entnommen und eingewogen.

Zur Beschleunigung der Lipidoxidation der Mustermargarinen wurden diese bei 80°C für 1 h im Ofen erhitzt und danach mit Argon begast. Dafür wurden Amber Glass Vials verwendet, welche nach dem Verfahren von Grüneis et al. (2019) gereinigt wurden, um alle oxidationsfördernden Rückstände in den Gefäßen zu entfernen:

Zuerst wurden die Gläser 1 h mit Natriumhydroxid gesättigter Ethanol-Lösung eingeweicht, danach wurden sie dreimal mit bi-distilliertem Wasser gespült, bevor sie 1 h in 1 N Salzsäure eingeweicht wurden. Abschließend wurden die Gläser dreimal mit bi-distilliertem Wasser gespült und im Trockenschrank vollständig getrocknet.

Für die Analyse der Fettsäuren und der Oxidationsstabilität am Rancimat wurden die Proben nicht erhitzt.

3.3 Beschreibung der analytischen Methoden

3.3.1 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung mittels GC/FID

Als Basis für die weiteren Analysen der unterschiedlichen Margarinen spielt der Anteil der enthaltenen Fettsäuren eine entscheidende Rolle. Basierend auf der von der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) etablierten Methode *C-VI 10a* wurden die in ihre flüchtigeren Methylester überführten Fettsäuren im Gaschromatographen mittels Flammenionisationsdetektor bestimmt (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014). Durch Zugabe einer methanolischen Kaliumhydroxidlösung kann eine rasche, basisch katalysierte Bildung der Ester garantiert werden (Bannon et al. 1982). Die Fettsäuremethylester (fatty acid methyl esters - FAMES) werden dabei aufgrund ihrer Zusammensetzung und daraus resultierenden unterschiedlichen Affinität zur stationären und mobilen Phase in der Kapillare aufgetrennt (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014).

Durchführung

Von den eingewogenen 50 g, welche bis zur Phasentrennung in einem Becherglas im Ofen bei 80°C erhitzt wurden, wurden 200 µl der Fettphase in einer Epruvette mit 2ml Isooctan vermengt. Danach wurden 100 µl einer methanolischen Kaliumhydroxid-

Lösung hinzugefügt. Die Epruvetten wurden im Anschluss verschlossen für mindestens 30 Sekunden geschüttelt. Danach wurde ein Tropfen einer 0,1% Methylorange-Lösung hinzugegeben. Mittels 1N Salzsäure wurde der pH-Wert sauer eingestellt. Nach dem Absetzen zweier Phasen wurde die obere Phase abgenommen und zur Analyse in Autosamplerfläschchen überführt. Die Proben wurden im Vierfachansatz analysiert.

Die Analyse wurde unter folgenden Bedingungsparametern, basierend auf den Empfehlungen der Methode C-VI 10a, durchgeführt:

Tabelle 5: Parameter zur Trennung der FAMEs mittels GC-FID

Detektor	FID
Injektortemperatur	250°C
Detektortemperatur	270°C
Ofen-Temperatur-Programm	4 Min. 100°C; 6 Min. 170 °C; 10 Min. 240 °C
Trägergas	Wasserstoff
Trennsäule	HP-88 (Cyanopropylaryl-) Polysiloxan 100 m x 250 µm x 0,2 µm
Säulenfluss	2 mL/min
Injektionsvolumen	2 µl

Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte über die Software Agilent Chemstation GC7890. Dort wurden alle Peaks gleichmäßig und vollständig integriert. Mit Hilfe von

Vergleichschromatogrammen aus vorangegangenen Ringversuchen von bekannten Ölen und Fetten konnte eine Zuordnung der Retentionszeiten zu den einzelnen Fettsäuren erfolgen.

Tabelle 6: Retentionszeiten bekannter Fettsäuren aus Ringversuchen

Fettsäure	Retentionszeit [min]
C 4:0	5,5
C 6:0	6,6
C 8:0	8,8
C 10:0	12,0
C 12:0	15,5
C 14:0	18,8
C 16:0	22,9
C 18:0	27,7
C 18:1	28,9
C 18:2	30,7
C 20:0	32,3
C 18:3	33,0
C 20:1	33,3
C 22:0	36,3
C 24:0	40,8

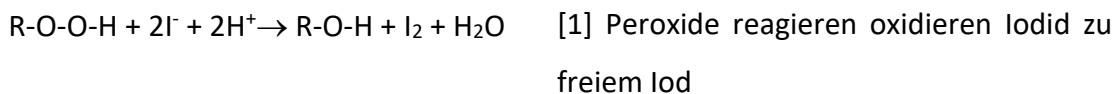
Zur quantitativen Auswertung der Fettsäuremuster wurde die prozentuelle Verteilung der Fettsäuren anhand der Peakflächenanteile der FAMES an der Gesamtfläche aller

FAMES ermittelt. Auf die Umrechnung und Einberechnung der Korrekturfaktoren für die Massenanteile der FAMES in g/100g Fett wurde in dieser Analyse verzichtet, da die prozentualen Anteile der Fettsäuren berechnet wurden.

3.3.2 Bestimmung der Peroxidzahl nach Wheeler

Die Bestimmung der Peroxidzahl (POZ) ist heute eine beliebte und häufig angewandte Methode in der Praxis zur Bestimmung des oxidativen Verderbs von Fetten und Ölen (Pignitter et al. 2012). Durch Bindung von Sauerstoff in Fetten und Ölen entstehen im Zuge der frühen Lipidoxidation Hydroperoxide und andere Peroxide. Per Definition beschreibt die POZ das Maß an aktiv gebundenem Sauerstoff, der in 1 kg Probe vorliegt. Die Angabe der Peroxidzahl erfolgt in Milliäquivalent (meq) O₂/kg Fettphase (Mattisek et al. 2014).

Basierend auf der Methode nach Wheeler (Wheeler 1932), welche als DGF Methode C VI 6a etabliert wurde, wird die POZ mittels elektrochemischer Endpunktbestimmung durch einen Titrierautomaten bestimmt. Die in Eisessig und Isooctan gelöste Probe wird dabei mit einer gesättigten Kaliumiodidlösung versetzt, wodurch Peroxidgruppen zur Oxidierung des Iodids zu freiem Iod führen. Durch Rücktitration mit Natriumthiosulfat-Lösung wird die dabei gebildete Iodmenge bestimmt (siehe nachfolgende Reaktionsgleichungen [1] und [2]) (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014; Mattisek et al. 2014).



Durchführung

Die Durchführung basiert mit einigen Änderungen auf der DGF Methode C VI 6a, „Verfahren mit elektrochemischer Endpunktbestimmung“ (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014).

Vor jeder Messung wurde der Titer der verwendeten 0,001 mol/l Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) - Maßlösung mittels Kaliumiodat Ursubstanz ermittelt. Der Faktor wurde im Gerät gespeichert und bei der Berechnung der POZ automatisch miteinberechnet.

Es wurden 2,5 g Probe auf 0,001 g genau eingewogen und vorsichtig bei 50°C aufgeschmolzen. Daraufhin wurden 20 ml einer Eisessig-Isooctan-Lösung im Verhältnis 60:40 zugefügt und die Probe wurde darin unter leichtem Schwenken gelöst. Nach Zugabe eines Rührknochens wurde das Becherglas auf den Titrierautomat gestellt, der Rührer aktiviert und unter Zugabe von 200 µl der gesättigten Kaliumiodid-Lösung wurde das Programm gestartet. Vor Ablauf des am Display angezeigten Countdowns wurden noch 80ml destilliertes Wasser hinzugefügt.

Der Titrierautomat dosierte die Zugabe der 0,001 mol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solange, bis an der kombinierten Platinelektrode der Äquivalenzpunkt erreicht wurde. Die Auswertung des Endpunkts erfolgte automatisch im Titrierautomat, ebenso die Anzeige der POZ in meq O_2 /kg Fettphase. Die Proben wurden im Vierfachansatz gemessen und die POZ wurde in Absolutwerten angegeben. Die Analyse der POZ am Titrino ermöglicht eine Bestimmung der Peroxide von 0-30 meq O_2 /kg Fettphase (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V., 2014)

3.3.3 Bestimmung der oxidativen Stabilität durch beschleunigten

Oxidationsstresstest – Rancimat

Bei der Bestimmung der Oxidationsstabilität handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung des *Oxidative Stability Index* (OSI). Der OSI beschreibt die Zeit in Stunden (h), die erforderlich ist, um die Leitfähigkeit von Ölen und Fetten während der Messung im *Rancimat* der Firma *Metrohm* (Herisau, Schweiz) stark zu verändern. Man bezeichnet die Zeitspanne, die bis zur stark ansteigenden Bildung von Oxidationsprodukten benötigt wird auch als Induktionsperiode (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014).

Während der Messung werden die Proben im Heizblock bei 121,6°C erhitzt. Unter konstanter Sauerstoffzufuhr (10 l/h) wird die Oxidation der Proben kontrolliert unter standardisierten Bedingungen beschleunigt. Am Endpunkt der Messung steigen die

flüchtigen, niedermolekularen Verbindungen stark an. Diese werden in ein zweites Gefäß, das destilliertes Wasser und eine Elektrode, welche die Leitfähigkeit misst, enthält, geleitet. Die resultierende Veränderung der Leitfähigkeit wird konduktometrisch erfasst (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014; Velasco et al. 2004).

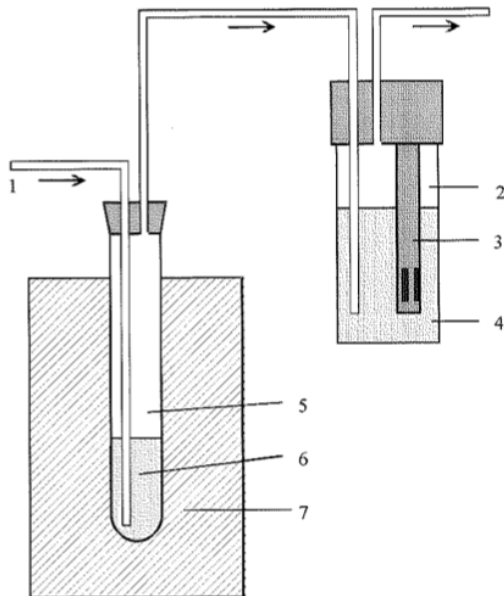


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Bestandteile des Rancimats. Mit [1] Luftanschluss, [2] Messgefäß, [3] Elektrode, [4] Messlösung, [5] Belüftungsgefäß, [6] Probe, [7] Heizblock (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014).

Der beschleunigte Oxidationstest ist eine etablierte Methode der DGF und findet Anwendung in der Bestimmung der Oxidationsstabilität von Fetten und Ölen.

Durchführung

Je 20g der Proben wurden bei 80°C für 25 Minuten aufgeschmolzen. Milchhaltige Proben mussten vor der Messung über einen Trichter, der Filterpapier und 3g Natriumsulfat-Decahydrat enthielt, beim Aufschmelzen im Ofen geklärt werden. Dabei band das Natriumsulfat-Decahydrat die wässrigen Milchbestandteile in der Margarine, wodurch das aufgeschmolzene Öl geklärt wurde (Hefter 1921). In die Messeinheiten wurden 50ml deionisiertes Wasser gefüllt. Nach dem vollständigen Aufheizen der beiden Heizblöcke auf 121,6°C wurden je 3g der Fettphase der Probe in Reaktionsgefäße eingewogen, mit der Dichtungskappe verschlossen, mit allen Zu- und Abflussschläuchen angeschlossen, in die Vertiefungen in den Heizblöcken gestellt und die Messung gestartet. Die

Aufzeichnung endet automatisch, sobald das Signal 100% der Skala des Aufzeichnungsgerätes erreicht hat. Die Berechnung der Oxidationsstabilität erfolgte automatisch mittels Software „743 Rancimat-Steuerung“. Die Induktionsperiode wurde aus dem Maximum der zweiten Ableitung der Leitfähigkeitskurve berechnet. Die Proben wurden im Vierfachansatz analysiert. Die Oxidationsstabilität wurde in Absolutwerten gemessen.

3.3.4 Photometrische Bestimmung konjugierter Diene

Bei der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (engl. poly-unsaturated fatty acids – PUFAs) kommt es zur Bildung konjugierter Doppelbindungen. Konjugierte Diene zählen zu den primären Oxidationsprodukten. Konjugierte Dien-Strukturen entstehen dann, wenn ein freies Radikal ein H-Atom von der Divinylmethan-Struktur von PUFAs abtrennt. Durch Verlagerung der Doppelbindung entsteht aus der nichtkonjugierten Fettsäure eine konjugierte Struktur (Pegg 2005).

Die Bestimmung des Gehalts an konjugierten Dien-Fettsäuren ist eine physikalische Methode, welche als DGF-Methode C-IV 6 etabliert wurde und in der Praxis in der Analytik von pflanzlichen und tierischen Fetten Anwendung findet. Konjugierte Diene absorbieren spezifisch bei einer Wellenlänge von 233 nm. Im UV-Spektrometer kann der Gehalt an konjugierten Dienen in Proben, welche gelöst in Isooctan gegen den Lösungsmittelblindwert vermessen werden, einfach und schnell bestimmt werden (Shahidi et al. 2017).

Durchführung

Die Durchführung erfolgte mit einigen Anpassungen auf Basis des Messverfahrens von Pegg (2005) und der Methode der DGF C-IV 6 (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014; Pegg 2005).

3 g der Margarineproben wurden bei auf einer Heizplatte bei 50°C aufgeschmolzen. Von der Fettphase wurden mit einer Pasteurpipette $0,01 \pm 0,005$ g in einen 10 ml Messkolben eingewogen. Die Probe wurde in Isooctan gelöst und der Kolben wurde bis zur Marke mit dem Lösungsmittel aufgefüllt. Bei 233 nm wurde zunächst der Blindwert von Isooctan bestimmt. Der Blindwert wurde anschließend automatisch von allen

Probenmesswerten subtrahiert. Die Messung der Proben erfolgte in einer 1 cm Quarzküvette und der Versuch wurde in Vierfachbestimmung durchgeführt.

Der Gehalt an konjugierten Dienenen (engl. conjugated dienes – CD) wurde mit folgenden Formeln nach Pegg (2005) berechnet und als CD value angegeben:

$$C_{CD} = \frac{A_{233}}{(\varepsilon * l)}$$

$$CD = \frac{[C_{CD} * 10^4]}{W}$$

C_{CD}	Konzentration konjugierter Diene in mmol/ml
A_{233}	Absorption der Fettlösung bei 233 nm
ε	Absorptionskoeffizient von Linolsäurehydroperoxid ($2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
l	Quarzküvettenlänge in cm
10^4	Volumen von Isooctan zur Lösung der Ölprobe in μl
W	Einwaage der Ölprobe in g

Der Gehalt an CD in den Proben wurde in Absolutwerten angegeben. Die Nachweisgrenze der Methode lag bei $2,9 \times 10^{-6}$ mmol/ml und wurde mit der Formel von Shrivastava et al. (2011) bestimmt.

3.3.5 Bestimmung des pH-Werts

Der pH-Wert hat beeinflusst die Stabilität von Emulsionen, weshalb die Bestimmung des pH-Werts auch in der Analyse von Margarinen von großer Bedeutung ist (Osborn-Barnes et al. 2003; Wenlei et al. 2007). Osborn-Barnes und Akoh (2003) beschrieben den Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Oxidation einer O/W-Emulsion während 8 Tagen bei 50°C, gemessen anhand der Peroxidzahl und der Anisidinzahl. Dabei konnten sie unter Anderem zeigen, dass die Emulsionströpfchen bei pH 7,0 negativ geladen sind, da der pH-Wert über dem isoelektrischen Punkt (pI 5,0) der enthaltenen Molkenproteine lag. Durch die negative Oberflächenladung der Tröpfchen kam es zur erhöhten elektrostatischen Anziehung zwischen positiv geladenen Übergangsmetallen

und der negativ geladenen Tröpfchenmembran. Dies führte zur Erhöhung des Abbaus der Hydroperoxide in sekundäre Produkte, gemessen durch eine Erhöhung der Anisidinzahl (Osborn-Barnes und Akoh 2003).

Der pH-Wert wird definiert als der negative, dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität. Der pH-Wert einer wässrigen Lösung wird mit Hilfe einer Glaselektrode elektrometrisch erfasst und im pH-Meter berechnet. Vor jeder Messung muss das pH-Meter mittels pH-Pufferlösungen kalibriert werden (Degner 2009). Zur Analyse des pH-Werts in Margarinen muss die Probe im Trockenofen bei 80°C bis zur Phasentrennung erhitzt werden. Zur pH-Messung wird die Fettphase abdekantiert und die wässrige Phase herangezogen (LFGB 2005).

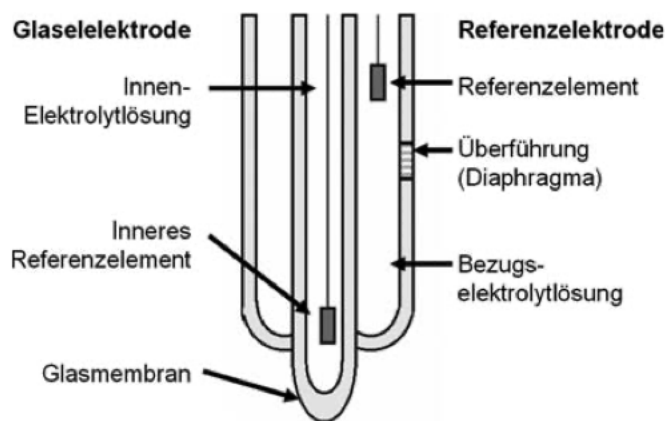


Abbildung 10: Bestandteile einer pH-Glaselektrode (Degner 2009)

Die Messeinheit besteht aus einer Glas- und einer Referenzelektrode (Silber-Silberchlorid-Elektrode). Weitere Teile der Glaselektrode sind die Referenzelektrolytlösung (Kaliumchlorid), eine pH-sensitive Glasmembran aus 70 % Siliciumoxid und eine Innen-Elektrolytlösung (Pufferlösung) mit konstantem pH-Wert. Die Referenzelektrode steht über das Diaphragma in Kontakt mit der Probelösung, während das innere Rohr über die Glasmembran Bezug zur Messlösung hat. An der Außenseite der Glasmembran entsteht ein elektrisches Potential, welches durch das Gleichgewicht zwischen im Silikatglas gebundenen Wasserstoffionen und in der Probe befindlichen Wasserstoffionen entsteht und vom pH-Meter erfasst wird. Je höher der pH-Wert, umso geringer ist die Menge an gebundenen Wasserstoffionen und umso höher ist das negative Potential an der Membranglas-Außenseite (Degner 2009).

Durchführung

Das pH-Meter, welches im Titrierautomat der Firma Metrohm integriert ist, wurde vor Beginn jeder Messung mit zwei Pufferlösungen (pH 4,01 und pH 7) geeicht. Ein 250 ml Becherglas wurde mit Margarineprobe gefüllt und bei 80°C im Trockenschrank für 2 h bis zur vollständigen Phasentrennung aufgeschmolzen. Nach Absetzen der zwei Phasen wurde die Fettphase abgegossen. Im Anschluss wurde die wässrige Phase mit einer Pasteurpipette in ein 50 ml Becherglas überführt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde die Glaselektrode in die Probelösung gehängt und die Messung wurde am pH-Meter gestartet. Die Ermittlung des pH-Werts erfolgte im Vierfachansatz. Die pH-Werte wurden in Absolutwerten angegeben.

3.3.6 Bestimmung volatiler Verbindungen durch SPME-GC-MS

Die Entstehung volatiler Substanzen in den Margarinen während der Lagerzeit von sechs Monaten wird durch die Komplexität ihrer Lebensmittelmatrix beeinflusst. Dadali et al. (2019) konnten zeigen, dass eine unterschiedliche Rezeptur, Fettzusammensetzung und der Einsatz unterschiedlicher Emulgatoren die Freisetzung volatiler Komponenten beeinflussen können. Mittels Headspace-Festphasen-Microextraktion (engl. Solid Phase Microextraction – SPME) können flüchtige Verbindungen aus der Probe extrahiert werden. Im Anschluss werden die Komponenten im Gaschromatographen getrennt und mittels Elektronenionisation-Massenspektrometrie (EI-MS) über ihr m/z -Verhältnis detektiert (Dadali et al. 2019).

Die Analyse wurde in Anlehnung an die Methoden von Dadali et al. (2019) und Shiota et al. (2011) in Kooperation mit Mag. Dr. Miriam Ressler und Dipl. Ing. Thomas Flecker, BSc an der Fachhochschule Joanneum mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Tabelle 7: Analysenparameter der HS-SPME-GC-MS

SPME-Faser	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm mit 2cm
Säule	Agilent CP9103 VF-624ms, 60m x 250 μm x 1,4 μm

Trärgas, Flussrate	Helium (99,999%), 1,2 ml/min, 18,768 cm/sek
Ofentemperatur Programm	40°C (5min); 8°C/min auf 240°C; 15°C/min auf 270°C (8min)
Energie EI Quelle	70 eV
Filamentstrom	150 µA
Temperatur Ionenquelle	230°C
Temperatur Quadrupol	150°C
Scanbereich EI	30 – 550 m/z

Headspace-Festphasen-Microextraktion (SPME)

In SPME-Vials wurden je 1 g der Margarineproben mittels einer Spritze eingewogen, um zu verhindern, dass Probenmaterial an der Wand der Vials verbleibt. Die Extraktion der volatilen Substanzen erfolgte anschließend durch Erhitzung der Proben auf 50°C für 40 Minuten unter einer 50/30 µm DVB/CAR/PDMS SPME Faser (2 cm) in einem PAL3 RSI System.

Analyse mittels GC-MS

Zunächst wurden die Analyten für 1 Minute von der SPME-Faser in die Einlassöffnung des Gaschromatographen desorbiert. Das System bestand aus einem Gaschromatographen mit der Agilent VF-624 MS Kapillarsäule, gekoppelt an ein Single-Quadrupol-Massenspektrometer. Die GC wurde im „splitless“ Modus bei einer Temperatur von 230°C betrieben. Die GC-MS Analyse erfolgte mittels der angegebenen Analyseparameter in Tabelle 7.

3.3.7 Bestimmung oxidierter Triglyceride (oxTAGs) mit LC-MS/MS

Durch die Bestimmung der Peroxidzahl werden primäre Lipidoxidationsprodukte, Hydroperoxide, ermittelt. Epoxide, welche im Zuge der primären Lipidoxidation auch aus anderen Reaktionswegen unabhängig der Wasserstoffabspaltung gebildet werden, können dabei nicht gemessen werden. Durch die Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Methode (LC-MS/MS) können Peroxide und Epoxide simultan mit minimaler Probenvorbereitung analysiert werden (Grüneis et al. 2019).

Nach Extraktion der polaren Fraktion, abgewandelt nach dem Prinzip von Marquez-Ruiz et al. (1996), wurden die Proben, gelöst in Isopropanol, auf der HPLC getrennt und mittels Elektronensprayionisation–Triple Quadrupol–Time-of-flight (ESI-Qq-TOF) im Massenspektrometer im Multiple Reaction Mode [MRM(+)] analysiert. Zur Quantifizierung der oxidierten Triglyceride wurde eine externe Kalibrierung ($R^2 = 0,9944$) mittels Standard Glyceryl Triheptadecanoat (5 μ M) durchgeführt.

Probenvorbereitung: Extraktion der polaren Phase nach Marquez-Ruiz et al. (1996)

Die Analyse wurde im Vierfachansatz durchgeführt. 50 mg der Margarineproben wurden in einem Gemisch aus Petroleumether (PE) und Diethylether (9:1, v/v) gelöst. Zur Trennung der polaren Oxidationsprodukte von Triglyceriden in den Proben wurden Sep-Pak Säulen (Strata SI-1 Silica, 500 mg, Phenomenex), angeschlossen an ein kleines Vakuum-Gerät, verwendet. Zunächst wurden die Säulen mit 10 ml PE-Diethylether-Lösung (9:1, v/v) konditioniert. Im nächsten Schritt wurden die Proben auf die Säulen aufgetragen und so die apolare Phase eluiert und verworfen. Im Anschluss wurde die polare Phase in 2 ml Diethylether in saubere Braungläser eluiert. Nach dem Einengen mit Stickstoff wurden die Proben mit Argon begast und bei -40°C gelagert.

Für die Integration der Wiederfindungsrate und der Bewertung der Qualität der Methode wurden allen Proben 100 μ l einer 100 μ M Stammlösung mit dem Standard Glyceryl Triheptadecanoat und 1,9 ml Isopropanol beigefügt.

Hochauflösende LC-MS/MS Analyse

Zur Analyse der Lipidoxidationsprodukte wurden Massennionen und deren Fragmente in der hochauflösenden LC-MS/MS Anlage nach der Methode von Grüneis et al. (2019)

bestimmt. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben durch einen 0,22µm PVDF Filter in kleine verschließbare Braunglasgefäße filtriert. Anschließend wurden 4 µl der Proben in das LC-MS System injiziert und auf der C18 Säule getrennt. Als mobile Phase wurden (A) Acetonitril und Wasser (60/40) mit 0,1% Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat sowie (B) Acetonitril und Isopropanol (20/80) mit 0,1% Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat verwendet. Zur Erleichterung der Ionisation im positiven Modus wurde Ameisensäure beigefügt. Das Ammoniumformiat wurde eingesetzt, um die Sensitivität der MS durch Bildung von Ammoniumaddukten zu erhöhen.

Das HPLC-System und die mit ESI gekoppelte MS wurden nach den folgenden Parametern eingesetzt:

Tabelle 8: System LC-ESI-Qq-TOF

HPLC-System	
Säule	TMS endcapped Luna C18 mit Kohlenstoff Ladung von 17,5%, 150 x 2,1 mm, 3 µm, Phenomenex
Laufmittel Gradient HPLC	0-8 Min: 60-100% B
	8-28 Min: 100% B
	28-30 Min: 100-60% B
	30-35 Min: 60% B
Flussrate	0,3 ml/min
Injektionsvolumen	4 µl
MS-System	

Nebulizer Gasfluss	3 l/min
Trockengasfluss	12 l/min (N ₂)
Desolvation line Temperatur	250°C
Heizblocktemperatur	350°C
Kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) Gas	Argon
Kollisionsenergie	20 eV

Die Analyse der oxidierten Verbindungen erfolgte durch Multiple Reaction Monitoring [MRM(+)]. In diesem Modus können Analyten über ihre Produkt- und Tochterionen, welche durch die Fragmentierung der Precursor Ionen entstehen, quantifiziert werden. Die in Tabelle 12 (Anhang) genannten Übergänge wurden analog zu Grüneis et al. (2019) im MRM Modus analysiert.

Auswertung und Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibrationskurve mit dem Standard Glyceryl Triheptadecanoat. Die verwendeten Standardlösungen enthielten die folgenden Konzentrationen: 10 µM - 5 µM - 2,5 µM - 1 µM - 0,5 µM - 0,05 µM - 0,005 µM - 0,001 µM und 0,0005 µM. Die erhaltene Kalibrationskurve diente nach Auswertung der Proben-Chromatogramme zur Berechnung des Gehalts an enthaltenen hydroperoxidierten und epoxidierten Triglyceride in µM.

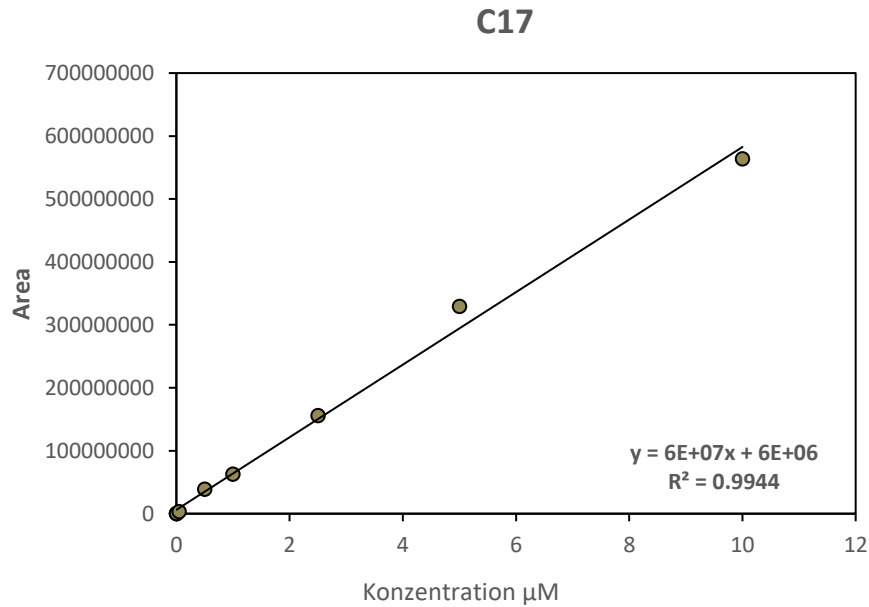


Abbildung 11: Standardgerade zur Bestimmung der oxTAGs.

Zum Ausgleich möglicher Verluste der Analyten während des Analysenprozesses wurde die Wiederfindungsrate anhand des internen Standards bei 5 µM berechnet und in die Berechnung der oxTAGs in den Proben berücksichtigt. Die Wiederfindung betrug 90%.

Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenze wurde anhand der Formel nach Shrivastava et al. (2011) wie folgt berechnet:

$$LOD = X_{b1} + 3S_{b1}$$

$$LOQ = X_{b1} + 10S_{b1}$$

X_{b1} Mittelwert Blindwert

S_{b1} Standardabweichung Blindwert

Für die Bestimmung der oxTAGs wurden $LOD = 0,0048 \mu\text{M}$ und $LOQ = 0,0157 \mu\text{M}$ ermittelt.

3.3.8 H- NMR

Die Bestimmung der Relaxationszeiten T_1 und T_2 sowie des Verhältnisses T_2/T_1 wurde in Anlehnung an das Protokoll von Liu et al. (2019) in Kooperation mit Assoz. Prof. Dr. Dennis Kurzbach am NMR Zentrum der Universität Wien, Währinger Straße 38, 1090

Wien mittel H-Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance, NMR) durchgeführt.

3.3.9 Bestimmung des Eisen- und Kupfergehalts durch F-AAS

Die Analyse des Eisen- und Kupfergehalts in den Mustermargarinen wurde in Kooperation mit Mag. Dr. Franz Jirsa und Jakob Windisch, BSc, MSc, am Institut für Anorganische Chemie der Universität Wien, Althanstraße 14, 1090 Wien mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (F-AAS) durchgeführt.

3.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Datenauswertung erfolgte in der Software SigmaPlot 13 und SigmaPlot 14. Für die Berechnung von Ausreißern wurden Nalimov-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde als $\alpha \leq 5\%$ festgelegt. Die Daten wurden in der Software Microsoft Excel 2016 grafisch dargestellt. Die Überprüfung der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Shapiro-Wilk Test und anschließend post-hoc Holm-Sidak Test. Bei verfehltem Test auf Normalverteilung durch Shapiro-Wilk wurden die Daten mit der einfaktoriellen Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und Dunn's post-hoc Test ausgewertet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Resultate der Langzeit Lagerstudie

4.1.1 Fettsäuremuster der Lagermargarinen

Die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Margarinen und der Grad der Sättigung dieser Fettsäuren hat Einfluss auf die Rate der Oxidation von Fetten und Ölen (Lundberg 1962). Die Anteile an gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren unterschieden sich zwischen den vier Margarinen signifikant voneinander ($p < 0,05$).

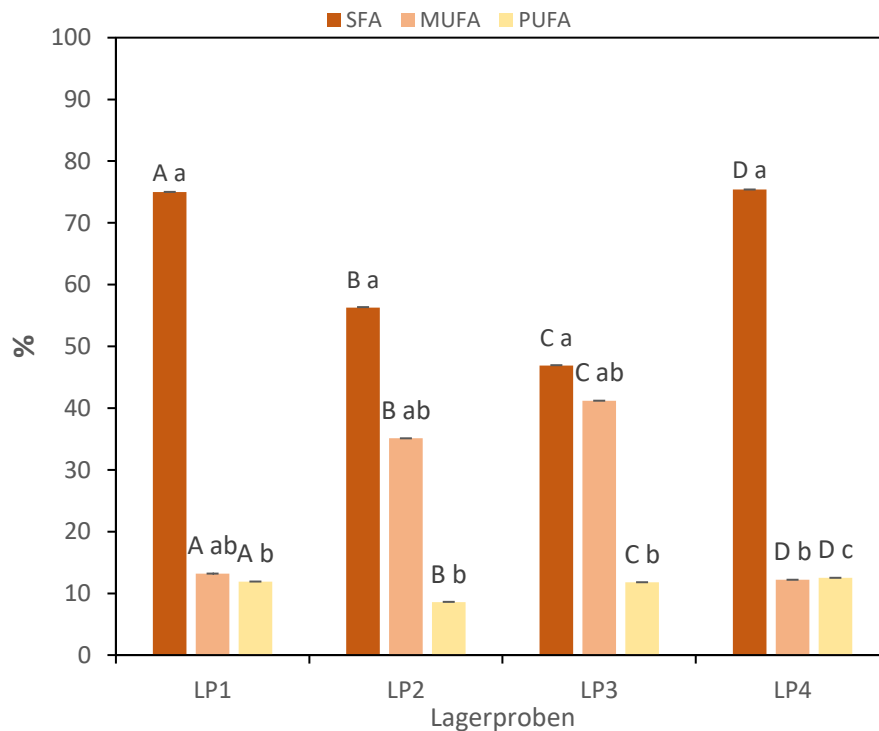


Abbildung 12: Gehalt an gesättigten Fettsäuren (engl. saturated fatty acids = SFA), einfach ungesättigten Fettsäuren (engl. mono-unsaturated fatty acids = MUFA) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl. poly-unsaturated fatty acids = PUFA) in den vier Margarinen LP1-LP4. Darstellung der Daten in MW + SD ($n = 4$). Die unterschiedlichen Kleinbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede der Sättigungsgrade innerhalb der Margarinetypen, die Großbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen SFAs, MUFAs und PUFAs der vier verschiedenen Margarinetypen (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test).

Es wird ersichtlich (Abb. 12), dass die Verteilung der Fettsäuren in den Margarinen LP1 und LP4 ähnlich ist. Dies lässt sich auf die ähnlichen enthaltenen Fette zurückführen, da in beiden Proben in der Fettphase zu einem Großteil (67% in LP1 und 70% in LP4) Kokosöl und ein gehärtetes Kokosölderivat enthalten waren. Die in LP1 und LP4 enthaltenen Fettsäuren bestanden zu je einem Drittel aus Laurinsäure (C12:0), eine Fettsäure, die typisch für Kokosöl ist. Kokosöl besteht zu 48% aus Laurinsäure und zu 18% aus Myristinsäure (C14:0) (Amri 2011). Tabelle 9 verdeutlicht die Ähnlichkeit der Lagerprobe LP1 und Lagerprobe LP4 im Gehalt ihrer C12:0, C14:0 und C18:1 Fettsäuren. Der hohe Gehalt an Linolsäure (11,7% in LP1 und 12,1% in LP4) ist auf den Gehalt an Sonnenblumenöl in den beiden Margarinen zurückzuführen. Sonnenblumenöl ist besonders reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und zeichnet sich durch seinen hohen Anteil an Linolsäure C18:2 (48,3 – 74,0%) aus (BMEL 2011).

Der Gehalt an gesättigten Fettsäuren ist in Margarine LP4 signifikant am höchsten ($p < 0,05$) im Vergleich zu den anderen Lagermargarinen. Die Margarine LP4 unterscheidet sich darüber hinaus im Gehalt an PUFAs statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den anderen Margarinen. Dieser ist bei Margarine LP4 am höchsten (12,5%) und kann durch den Gehalt an Rapsöl begründet werden. Rapsöl ist neben Sonnenblumenöl ein Öl, das sich durch den hohen Gehalt an Linolsäure (15,0 – 30,0%) auszeichnet (BMEL 2011).

Tabelle 9: Fettsäurezusammensetzung der Margarinen. ($n=4$, $MW \pm SD$)

Analyse		LP1	LP2	LP3	LP4
Fettsäuren- zusammensetzung [%]	C8:0	4,7 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	-	5,0 $\pm$ 0,0
	C10:0	3,8 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,0	-	4,0 $\pm$ 0,0
	C12:0	31,7 $\pm$ 0,0	2,8 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	32,4 $\pm$ 0,0
	C14:0	13,2 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0	13,4 $\pm$ 0,0

C16:0	13,5± 0,0	42,1± 0,0	40,4± 0,0	10,1± 0,0
C18:0	6,7± 0,0	5,1± 0,0	4,3± 0,0	9,3± 0,0
C18:1	13,2± 0,0	35,1± 0,1	40,9± 0,0	12,2± 0,0
C18:2	11,7± 0,0	8,2± 0,0	10,9± 0,0	12,1± 0,0
C18:3	0,2± 0,0	0,4± 0,0	1,0± 0,0	0,4± 0,0
C20:0	0,4± 0,0	0,7± 0,0	0,4± 0,0	0,3± 0,0
C22:0	0,3± 0,0	0,2± 0,0	0,2± 0,0	0,3± 0,0
C24:0	0,3± 0,0	0,2± 0,0	0,3± 0,0	0,2± 0,0

Die in Margarine LP2 enthaltenen Fette und Öle bestanden zu mehr als einem Drittel aus einfach ungesättigten Fettsäuren. Der Gehalt an gesättigten Fettsäuren war bei LP2 am zweithöchsten mit 56,3%. Mit 42,1% machte Palmitinsäure (C16:0) einen Großteil der in LP2 enthaltenen Fettsäuren aus. Mehr als ein Drittel (35,1%) der Fettsäuren in LP2 entfielen auf die Ölsäure (C18:1). Der Gehalt an C16:0 und einfach ungesättigten Fettsäuren in LP2 kann durch den hohen Gehalt an Palmöl (76%) in der Margarine begründet werden. Die charakteristischen Fettsäuren in Palmöl sind Palmitinsäure (C16:0), mit durchschnittlich 44% Anteil und Ölsäure (C18:1) mit einem durchschnittlichen Anteil von 39% (Tan et al. 1981). Der hohe Gehalt an C16:0 und C18:1 konnte außerdem auf die 10% Butterschmalz in der Margarine zurückgeführt werden. Butterschmalz besteht zu 99,3% aus Kuhmilchfett und setzt sich zu einem Drittel aus der Fettsäure Palmitinsäure (C16:0) zusammen. 22,8% der in Milchfett enthaltenen Fettsäuren entfallen auf C18:1 (Mansson 2008).

LP3 hatte unter den vier Margarinen mit 41,2% den signifikant ($p < 0,05$) höchsten Anteil an einfach ungesättigten und mit 46,9% den signifikant ($p < 0,05$) niedrigsten Anteil an gesättigten Fettsäuren. 40,9 % der einfach ungesättigten Fettsäuren in LP3 entfielen auf C18:1, der Anteil von 0,4% wurde ergänzt durch die einfach ungesättigte Fettsäure C20:1. Die Margarine LP3 hatte mit 72% Palmöl in der Fettphase der Margarine den zweithöchsten Palmöl Gehalt der vier Margarinen. Daraus konnte der hohe Anteil an Ölsäure (C18:1) und Palmitinsäure (C16:0) in der Margarine abgeleitet werden (Tan et al. 1981).

4.1.2 Entwicklung der Peroxidzahl während 180 Lagertagen

Die von Ölen und Fetten aufgenommene Menge an Sauerstoff durch die Bildung von Peroxiden wird als Peroxidzahl bezeichnet. Die vom Codex Alimentarius bestimmten Höchstwerte von 15 meq O_2 /kg in nativem oder kaltgepresstem Öl und 10 meq O_2 /kg in raffiniertem Öl zeigen, dass die Peroxidzahl eine häufig angewandte Analyse in der Bestimmung der Ranzigkeit von Ölen ist (Codex Alimentarius 2001). Dennoch gibt es, trotz des hohen Fettgehalts, keine Höchstwerte für die Bildung von Peroxiden in Margarinen. In den Abbildungen 13-16 werden die Entwicklungen der POZ der vier Margarinen dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass die POZ in allen Margarinetypen über die Lagerdauer von 180 Tagen anstieg. Dieser Anstieg konnte auch in anderen Lagerstudien bei geringerer Lagerdauer gezeigt werden (Zaeromali et al. 2014; Nogala-Kalucka und Gogolewski 2000). Zaeromali et al. (2014) untersuchten die Auswirkung einer 90-tägigen Lagerung von Margarine bei 15°C. Dabei stieg die POZ nach 90 Tagen auf $2,23 \pm 0,05$ meq O_2 /kg Fettphase, ein Wert der den im Iran gültigen nationalen Standard von maximal 2 meq O_2 /kg Fettphase überschritt. Dieser Wert wurde bereits ab Lagertag 75 nach der Produktion mit $2,03 \pm 0,57$ meq O_2 /kg Fettphase in der Margarine überschritten (Zaeromali et al. 2014). Nogala-Kalucka et al. (2000) führten ihre Lagerstudie mit Margarine, welche sie für 136 Tage bei 4°C und für 158 Tage bei 20°C lagerten, durch. Dabei zeigten sie, dass die Lagerung bei 4°C zu einer Erhöhung der POZ von 0,08 auf 0,14 mmol O_2 /kg Fettphase nach 136 Tagen und eine Lagerung bei 20°C zu einer Erhöhung der POZ auf 4,04 mmol O_2 /kg Fettphase nach 136 Tagen führte (Nogala-Kalucka und Gogolewski 2000). Durch Umrechnung der POZ-Werte ihrer Studie in meq O_2 /kg Fettphase entsprach dies 0,16 meq O_2 /kg Fettphase an Tag 136 nach 4°C und 8,08

meq O₂/kg Fettphase an Tag 136 bei 20°C. (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014).

Die POZ-Werte am Tag der Produktion der im Rahmen der Forschungsarbeit analysierten Margarinen unterschieden sich zwischen den vier Margarinetypen. LP1 hatte die niedrigste POZ von 0,33 meq O₂/kg Fettphase (Abb. 13), gefolgt von LP4 (Abb. 16) und LP3 (Abb. 15) mit 0,40 und 0,86 meq O₂/kg Fettphase. Der Gehalt an Peroxiden stieg bei LP2 von Tag 0 auf Tag 180 um 333%. Der zweit niedrigste Anstieg konnte in LP3 analysiert werden, bei dieser Margarine stieg die POZ um 362%. Den höchsten prozentualen Anstieg zwischen Tag 0 und Tag 180 wiesen die Margarinen LP1 und LP4 auf, mit 567% und 583%.

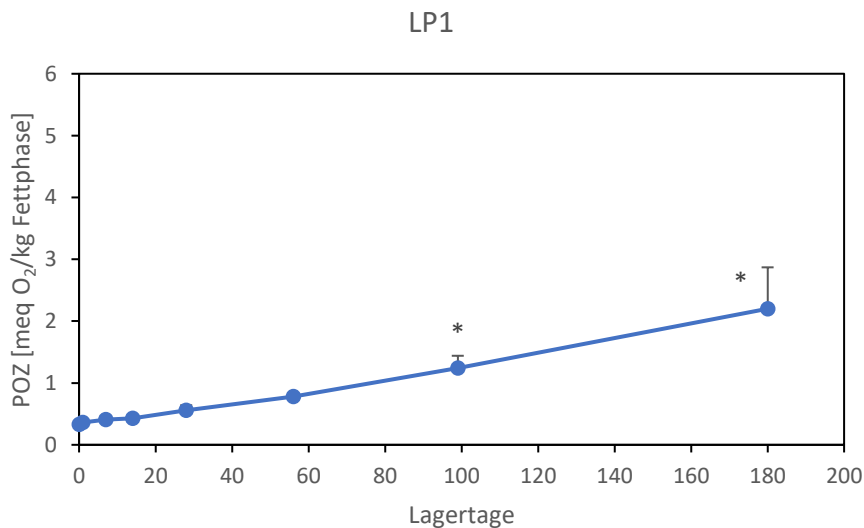


Abbildung 13: Peroxidzahl (meq O₂/kg Fettphase) der Margarine LP1 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten in MW + SD ($n=4$).

Die Margarine LP2 hatte mit 1,10 meq O₂/kg Fettphase bereits die höchste POZ am Tag der Produktion (Abb. 14). LP2 hatte auch die höchste POZ bei Erreichung des letzten Lagertages: 4,76 meq O₂/kg Fettphase. Ein Grund für die hohe POZ bereits zu Beginn der Lagerstudie bei LP2 könnte der Gehalt an 8% Butterschmalz sein. Butterschmalz wird während der Herstellung bereits viele Male erhitzt, was in eine geringere Stabilität während des Produktionsprozesses der Margarine resultieren könnte (Dairy Processing Handbook 2020). Interessant ist jedoch, dass LP2 den geringsten prozentuellen Anstieg der POZ während der Lagerung hatte.

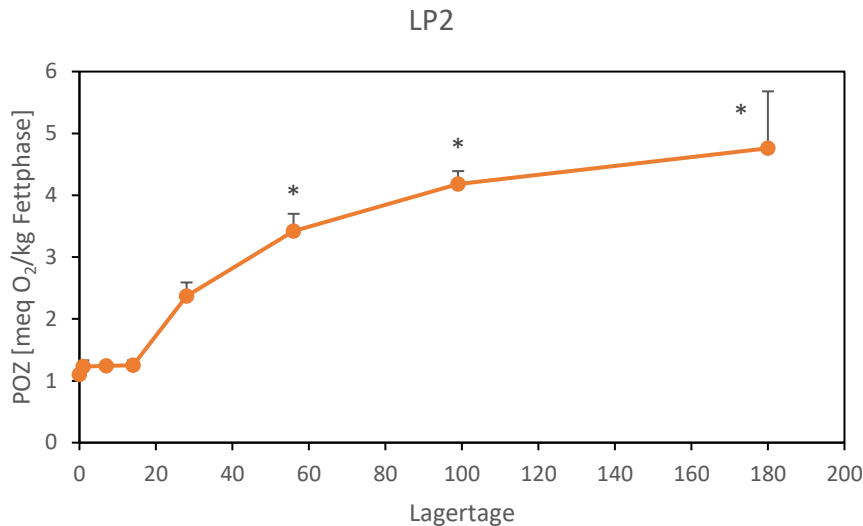


Abbildung 14: : Peroxidzahl (meq O₂/kg Fettphase) der Margarine LP2 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten in MW + SD ($n=4$).

Der hohe prozentuale Anstieg an Peroxiden in den Margarinen LP1 und LP4 kann auf den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren zurückgeführt werden. Diese Margarinen enthalten mit 12% (Tabelle 9) den höchsten Anteil an PUFAs, was durch den Gehalt von Sonnenblumenöl und Rapsöl begründet werden kann. Die Autoxidation von Linolsäure C18:2 und die Abstraktion des Wasserstoffs an C-11 führt zur Bildung des Pentadienylradikals, welches mit Sauerstoff weiter unter der Bildung von konjugierten C-9- und C-13-Dienhydroperoxiden reagiert. Während der Autoxidation der Linolensäure C18:3 wird Wasserstoff an den beiden reaktiven Kohlenstoffen an Position 11 und 14 abstrahiert, was zur Bildung zweier Pentadienylradikale und nach Reaktion der Zwischenprodukte mit Sauerstoff zur Bildung von Monohydroperoxiden führt (Frankel 1980). Dabei überwiegen die Hydroperoxid-Isomere an C-9 und C-16. Durch den hohen Gehalt an reaktiven Allylgruppen in den mehrfach ungesättigten Fettsäuren C18:2 und C18:3, welche in LP1 und LP4 enthalten sind, kann der höhere Anstieg von Hydroperoxiden während der Lagerung begründet werden (Belitz et al. 2009).

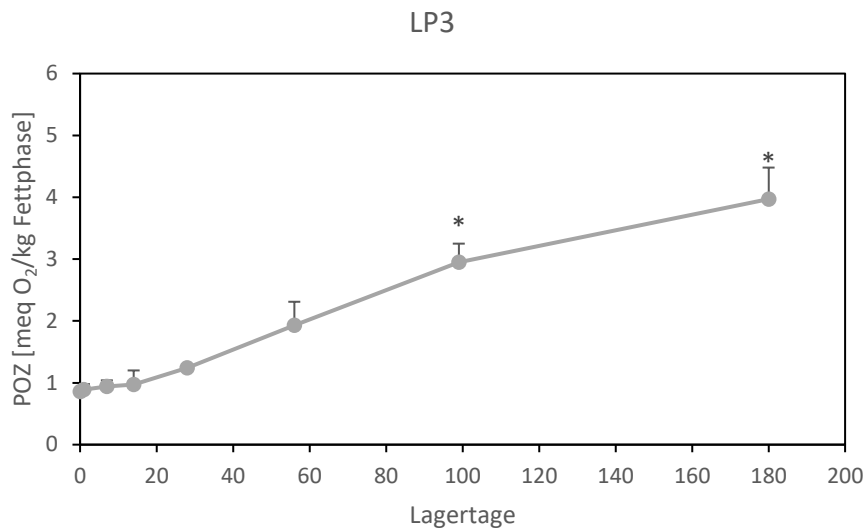


Abbildung 15: Peroxidzahl (meq O₂/kg Fettphase) der Margarine LP3 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten in MW + SD ($n=4$).

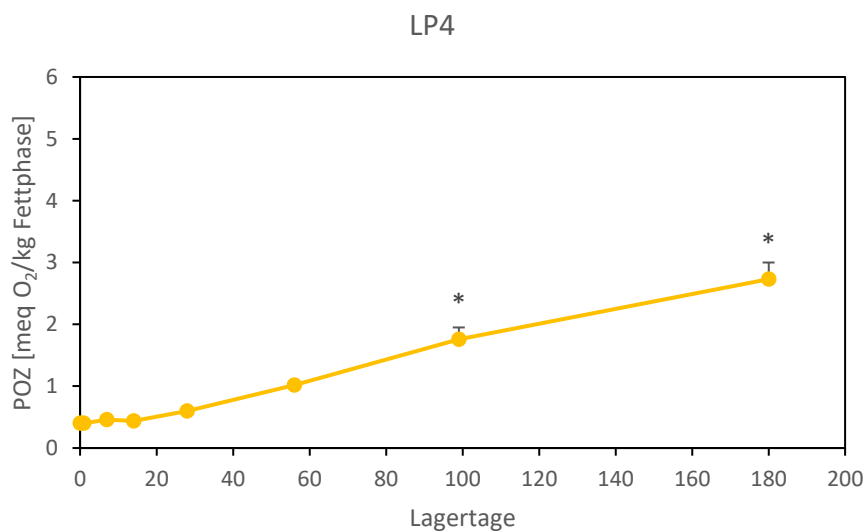


Abbildung 16: Peroxidzahl (meq O₂/kg Fettphase) der Margarine LP4 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten in MW + SD ($n=4$).

Betrachtet man die Ergebnisse der POZ so bestätigen diese die Hypothese, dass die oxidative Stabilität der Margarinen durch die unterschiedliche Fettzusammensetzung der Margarinen, den unterschiedlichen Gehalt an PUFAs beeinflusst wird. Die Werte der prozentualen Erhöhung können in Tabelle 13 (Anhang) eingesehen werden. Um die

Ergebnisse der POZ-Analyse zu verifizieren, wurde eine zweite Analysemethode zur Bestimmung primärer Lipidoxidationsparameter in Margarinen angewandt.

4.1.3 Bildung konjugierter Diene während der Lagerdauer

Die Analyse konjugierter Diene (CD) ist eine häufig angewandte Methode in der Bewertung der Lipidoxidation (Pignitter und Somoza 2012). Abbildungen 17-20 zeigen die Ergebnisse der CD in den vier Margarinen während der Lagerzeit von 180 Tagen.

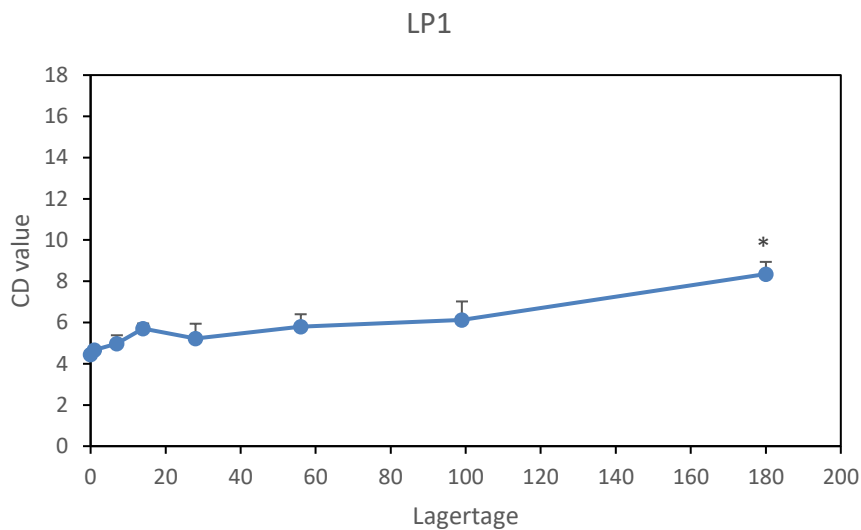


Abbildung 17: Konjugierte Diene (CD value) in der Margarine LP1 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test) Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

Wie bei der POZ steigen auch die CD in den Margarinen an. Darüber hinaus sind auch die Ausgangswerte ähnlich wie jene der POZ: LP2 hat an T0 den höchsten CD Gehalt, gefolgt von LP3, LP4 und LP1. Auch die prozentuale Steigerung, wie in Tabelle 13 (Anhang) angegeben verhält sich ähnlich zu den Ergebnissen der POZ: Während die CD bei LP1 und LP4 um 87,6% und um 45,6% von T0 zu T180 steigen, beträgt dieser prozentuale Anstieg bei LP2 und LP3 31,3% und 28,8%.

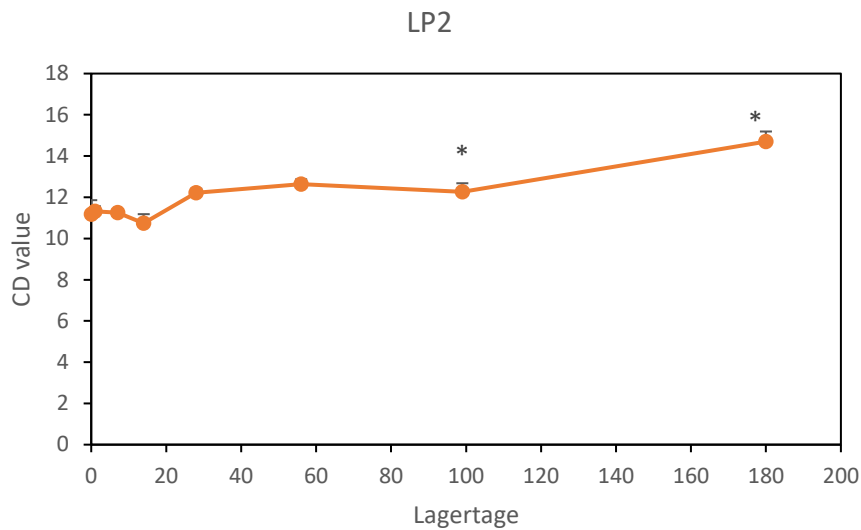


Abbildung 18: Konjugierte Diene (CD value) in der Margarine LP2 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test) Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

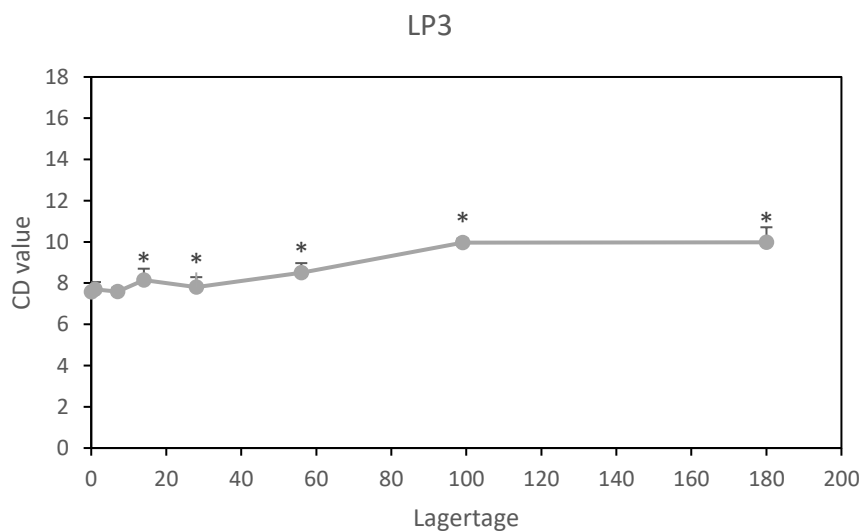


Abbildung 19: Konjugierte Diene (CD value) in der Margarine LP3 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test) Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

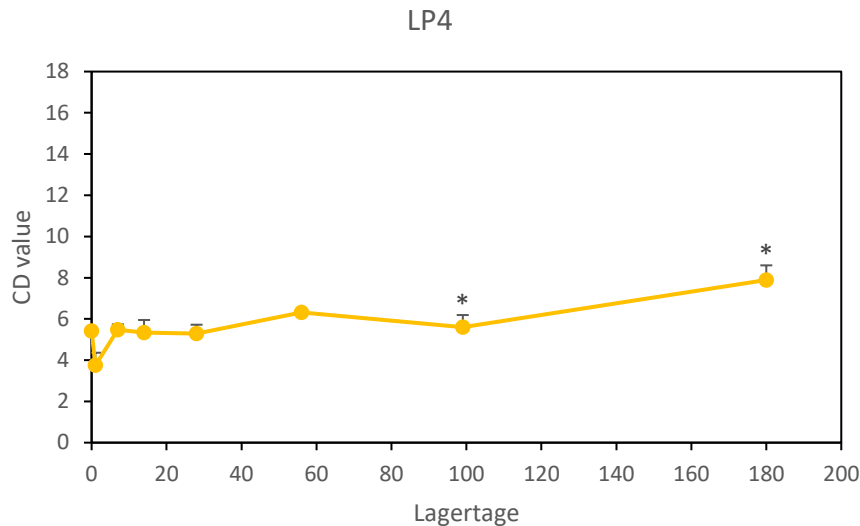


Abbildung 20: Konjugierte Diene (CD value) in der Margarine LP4 während der Lagerung von 180 Tagen. Mit Stern gekennzeichnete Werte zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test) Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

Der hohe Anstieg an konjugierten Dienen kann durch den hohen Gehalt an Linolsäure in den Margarinen LP1 und LP4 begründet werden (Tabelle 9). Im Zuge der Autoxidation stabilisiert sich das gebildete Pentadienylradikal an C9 oder C13 durch die Bildung von zwei Hydroperoxiden, welche konjugierte Diensysteme enthalten. Diese Diensysteme wurden analytisch durch ihre spezifische Absorption von UV-Licht bei 235 nm erfasst (Belitz et al. 2009). Durch den hohen Gehalt an Linolsäure erfolgte der höchste prozentuale Anstieg von CD in den Margarinen LP1 und LP4, gefolgt von LP3, welche den dritthöchsten Anteil an Linolsäure aufwies (Tabelle 9). Der hohe Ausgangswert an CD in LP2 (Abb. 18) weist auf die bereits fortgeschrittene Oxidation der enthaltenen Linolsäure hin, was auf den Produktionsprozess des enthaltenen Butterschmalzes zurückgeführt werden kann. Die fortgeschrittene Oxidation wurde auch durch den hohen Ausgangswert der Peroxidzahl bestätigt.

Auch die Analyse der CD bestätigte die Hypothese, dass die unterschiedliche Fettzusammensetzung der Margarinen, einhergehend mit den unterschiedlichem Gehalt an PUFAs, die oxidative Stabilität der Produkte beeinflusst.

Da mittels POZ und CD nur primäre Oxidationsprodukte bestimmt werden, wurde mittels Ranzimat Methode die Bildung sekundärer Lipidoxidaionsprodukte evaluiert.

4.1.4 Oxidative Stabilität im Lagertest

Die instabilen, primären Oxidationsprodukte zerfallen in sekundäre Produkte welche in weiteren Schritten in der Bildung flüchtiger Verbindungen resultieren können (Pignitter und Somoza 2012). Die Entwicklung der Oxidationsstabilitäten (h) der vier Margarinen sind in den Abbildungen 21-24 abgebildet. Bei allen vier Margarinetypen sank die Oxidationsstabilität bis zum Tag 180 ab. Aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung (Tabelle 9) zeigten LP2 und LP3 eine höhere Oxidationsstabilität im Vergleich zu LP1 und LP4.

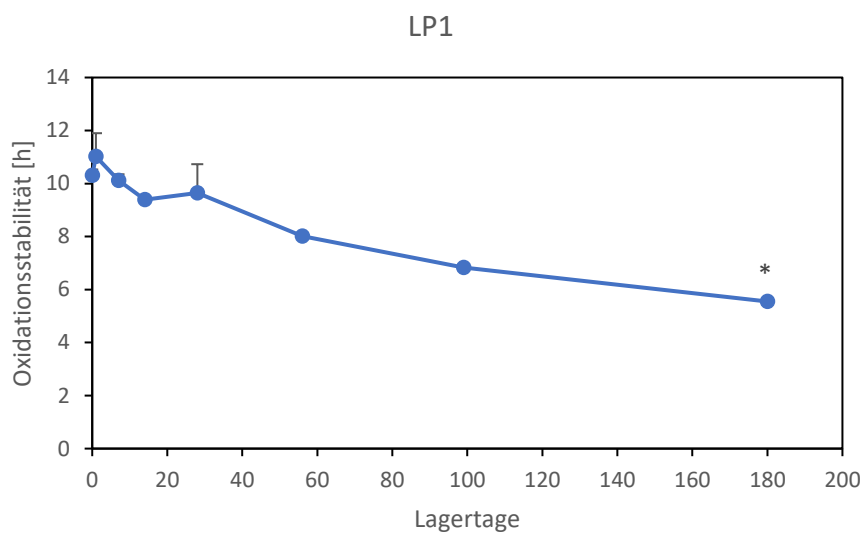


Abbildung 21: Oxidationsstabilität (h) der Margarine LP1. Mit Sternen markierte Daten zeigen signifikante Unterschiede zu T0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

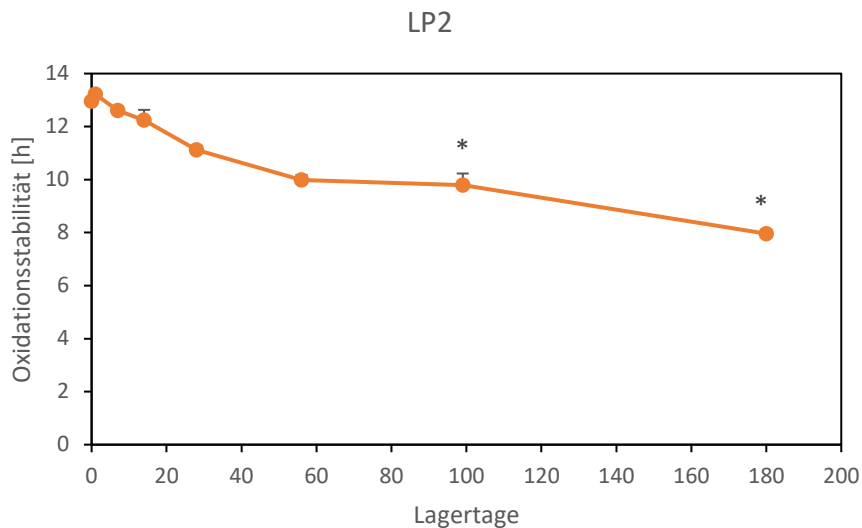


Abbildung 22: Oxidationsstabilität (h) der Margarine LP2. Mit Sternen markierte Daten zeigen signifikante Unterschiede zu T0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

Die Oxidationsstabilitäten (OS) lagen an Tag 0 bei $13,0 \pm 0,2$ h bei LP2 und $10,3 \pm 0,2$ h bei LP3. LP1 hatte nach der Produktion an Tag 0 eine OS von $10,3 \pm 0,2$ h und LP4 von $10,7 \pm 0,1$ h. Die prozentuelle Veränderung der Oxidationsstabilität verhielt sich ähnlich zur Bildung von Peroxiden und CD in den Margarinen. Die Veränderung war am geringsten bei LP2 und LP3, welche eine Stabilitätsabnahme von 38,8% und 34,1% aufwiesen, während die Stabilität der anderen beiden stärker sank mit prozentuellen Abnahmen von 46,1% bei LP1 und 50,9% bei LP4 (Tabelle 13, Anhang).

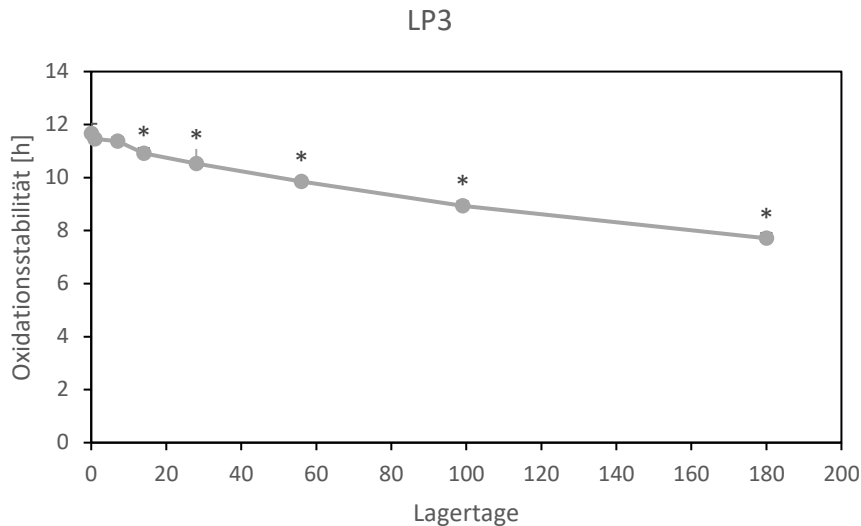


Abbildung 23: Oxidationsstabilität (h) der Margarine LP3. Mit Sternen markierte Daten zeigen signifikante Unterschiede zu T0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

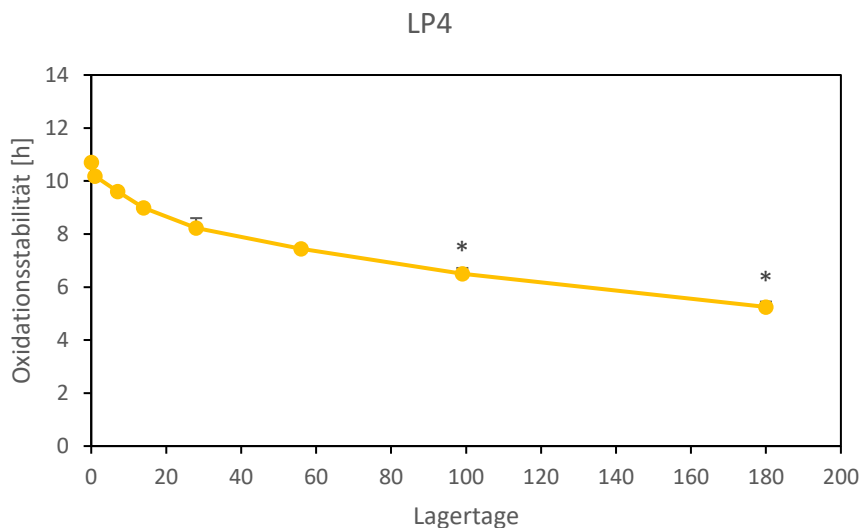


Abbildung 24: Oxidationsstabilität (h) der Margarine LP4. Mit Sternen markierte Daten zeigen signifikante Unterschiede zu T0 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test). Darstellung der Daten als MW + SD ($n=4$).

Die Margarinen LP2 und LP3 zeigten die höchste Oxidationsstabilität und die geringste prozentuelle Abnahme während der 180 Lagertage. Obwohl die prozentuale Veränderung der Oxidationsprodukte auch bei den Analysen der POZ und CD bei LP2 und LP3 am geringsten im Vergleich zu LP1 und LP4 war, so wurden am Ende der Lagerdauer in LP2 und LP3 höhere Werte von Hydroperoxiden und konjugierten Dienen nachgewiesen. Die hohen Mengen an Hydroperoxiden und CD in LP2 und LP3 und eine höhere Oxidationsstabilität, gemessen im Ranzimat, weisen darauf hin, dass die in den

Margarinen LP2 und LP3 gebildeten Hydroperoxide und CD stabiler waren und weniger rasch in flüchtige, sekundäre Oxidationsprodukte umgewandelt wurden. Dies kann auf den niedrigeren Gehalt an Linolsäure in den Margarinen LP2 und LP3 im Vergleich zu LP1 und LP4 zurückgeführt werden. Neben C16:0 war C18:1 die vorkommende Hauptfettsäure in LP2 und LP3 (Tabelle 9). Im Vergleich zur Linolsäure sinkt die relative Oxidationsgeschwindigkeit der Ölsäure, C18:1, um das 12-fache, was eine Verlangsamung der Oxidation bedeuten kann und zu einer höheren Oxidationsstabilität, gemessen im Ranzimat, führen kann (Belitz et al. 2009). Eine mögliche Begründung für die höchste Oxidationsstabilität in LP2, trotz der hohen POZ und CD Werte könnte der hohe Wassergehalt in der Probe sein. Neben der 20% Wasserphase enthält LP2 zusätzlich wasserhaltiges Magermilchjoghurt. Der höhere Wassergehalt in der Probe könnte zur Verdampfung der bei der Erhitzung im Ranzimat gebildeten flüchtigen Verbindungen geführt haben. Die Verdampfung flüchtiger Prooxidantien in Margarine konnten Kirkhus et al. (2015) zeigen.

Die Ergebnisse der Oxidationsstabilität, gemessen am Ranzimat, zeigten wiederum, dass die Zusammensetzung und das Fettprofil der Margarinen Auswirkungen auf die oxidative Stabilität hat, wodurch die Hypothese abermals bestätigt wurde.

Die stärkere Abnahme der Oxidationsstabilität in den Margarinen LP1 und LP4 lässt sich durch den hohen Gehalt an Linolsäure begründen. Die Methylengruppe an C11, benachbart neben zwei Doppelbindungen, ist durch diese Stellung besonders reaktionsfreudig, wodurch die relative Oxidationsgeschwindigkeit der Fettsäure C18:2 im Vergleich zur gesättigten Fettsäure C18:0 um das 100-fache ansteigt (Belitz 2009). Im Ranzimat führte der hohe Gehalt an Linolsäure in den Margarinen LP1 und LP4 dazu, dass der während der Analyse zugeführte Sauerstoff die ungesättigte Fettsäure rasch oxidierte und die gebildeten Monohydroperoxide durch beta-Spaltung rasch in flüchtige Verbindungen wie Ketone, Aldehyde und niedermolekulare organische Säuren umgewandelt wurde. Mit fortschreitender Lagerdauer stieg der Gehalt an Hydroperoxiden und konjugierten Dienen in den Margarinen LP1 und LP4 prozentuell am stärksten an. Umso rascher konnten die bereits zu Hydroperoxiden reagierten Fettsäuren zerfallen und umso schneller wurde auch ein Anstieg an flüchtigen

Oxidationsprodukten im Gerät detektiert, wodurch die Oxidationsstabilität während der Lagerdauer von 180 Tagen prozentuell am stärksten abnahm.

Bei der Analyse der POZ, der CD und des OSI, allesamt weitverbreitete Analysemethoden zur Evaluierung der Lipidoxidation, werden nur Hydroperoxide und ihre Spaltprodukte analysiert, wobei die Bildung von Epoxiden außer Acht gelassen wird (Grüneis et al. 2019). Es konnte nachgewiesen werden, dass Epoxide gesundheitsschädlicher als Lipidaldehyde sein können, weshalb zusätzlich hydroperoxidierte und epoxidierte TAG mittels LC-MS analysiert wurden (Schaich et al. 2017).

4.1.5 Bildung oxidierter Triglyceride in Margarinen während der Lagerzeit

Schaich et al. (2017) zeigten auf, dass während der Oxidation von Methylinoleat bei den Temperaturen 25°C, 40°C und 60°C für 20 Tage Epoxide in höherem Ausmaß als Hydroperoxide gebildet wurden. Dies ist vor allem aufgrund der gesundheitlichen Wirkungen bedenklich, da Epoxide mit DNA oder Proteinen reagieren können (Schaich et al. 2017). Bei der Analyse der Margarinen LP1 – LP4 konnten nur Epoxide detektiert werden, während die Hydroperoxidwerte an Tag 0 und 180 unter dem LOD der Analyse lagen. Die Analyse der oxTAGs basiert auf der Methode von Grüneis et al. (2019), in der spezifisch nur hydroperoxidierte Triglyceride detektiert werden, während durch die POZ alle vorliegenden Hydroperoxide gemessen werden können (Grüneis et al. 2019). Dies kann bedeuten, dass die in den Margarinen LP1 – LP4 vorkommenden Hydroperoxide nicht gebunden an Triglyceride vorlagen und sie somit nur durch die Peroxidzahl gemessen werden konnten.

Bei der Arbeit von Grüneis et al. (2019) wurden ebenfalls mehr epoxidierte Triglyceride als hydroperoxidierte Triglyceride in Margarinen und Rapsöl gebildet. Grüneis et al. erhitzten dabei Margarine und Rapsöl bei 25, 80 und 180°C für 15, 30, 45 und 60 Minuten unter Lichtausschluss in geschlossenen Braunglas Gefäßen. Die Summe der epoxidierten TAGs überstieg in Rapsöl jene in Margarinen. Bei der Erhitzung von Margarine bei 180°C für 15 Minuten kam es zu einer Erhöhung der epoxidierten TAGs auf $23,48 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Die unter diesen Bedingungen in der Margarine gebildeten

hydroperoxidierten TAGs unterschritten mit $4,95 \pm 0,03 \mu\text{M}$ den Gehalt an Epoxiden (Grüneis et al. 2019).

Es konnten nur in den Margarinen LP2 und LP3 Epoxide detektiert werden. In diesen Margarinen konnten auch die höchsten POZ, bereits an Tag 0, nachgewiesen werden (Abbildung 13). Aufgrund der langen Analysendauer und der hohen Probenanzahl wurden die oxidierten Triglyceride nur an Tag 0 und Tag 180 gemessen.

In Margarine LP2 wurden während der Lagerung die Epoxide 54:1 (O) und 54:2 (O) gebildet. Beide Epoxide nahmen im Zuge der Lagerung ab. Der Wert von Epoxid 54:1 (O) sank von $0,62 \pm 0,03 \mu\text{M}$ auf $0,26 \pm 0,07 \mu\text{M}$, das Epoxid 54:2 (O) sank von $0,20 \pm 0,01 \mu\text{M}$ auf $0,08 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (Tabelle 14, Anhang). Der hohe Gehalt an Epoxiden in LP2 an T0 weist auf eine starke Oxidation der Margarine hin. Dies deckt sich mit der Peroxidzahl, welche von allen Margarinen bei LP2 an Tag 0 am höchsten war. Während der primären Lipidoxidation können Epoxide aus Reaktionswegen, welche unabhängig von Wasserstoffabstraktion sind ebenso gebildet werden, wie aus Wasserstoffabstraktions-abhängigen Reaktionswegen (Grüneis et al. 2019). Es kann somit angenommen werden, dass die Epoxide in Margarine LP2 im Rahmen der frühen Lipidoxidation gebildet wurden.

In Margarine LP3 konnten drei Epoxide detektiert werden: 54:1 (O), 54:2 (O) und 54:3 (O). Alle drei stiegen im Zuge der Lagerung an. Während das Epoxid 54:1 (O) von $1,12 \pm 0,11 \mu\text{M}$ auf $1,69 \pm 0,35 \mu\text{M}$ anstieg, stiegen die anderen beiden Epoxide 54:2 (O) und 54:3 (O) von $0,82 \pm 0,12 \mu\text{M}$ auf $1,40 \pm 0,35 \mu\text{M}$ und von $0,07 \pm 0,05 \mu\text{M}$ auf $0,28 \pm 0,17 \mu\text{M}$ an. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Epoxide von Tag 0 auf Tag 180 in LP3 kann sein, dass die Epoxide als sekundäre Lipidoxidationsprodukte gebildet wurden. Epoxide können sekundär durch Umlagerung der gebildeten Alkoxyradikale gebildet werden. Dabei bilden sie sich nur aus den Alkoxyradikalen, welche durch den Zerfall der Hydroperoxide gebildet werden (Xia und Budge 2017). Es kann daher angenommen werden, dass in den 180 Tagen einige der gebildeten Hydroperoxide in Alkoxyradikale zerfielen, welche weiters in Epoxide umgewandelt wurden, was zu einem Anstieg der enthaltenen Monoepoxide in LP3 während der Lagerung führte.

4.1.6 Bildung von Aceton im Zuge der Lipidoxidation von Margarinen

Die Analyse volatiler Oxidationsprodukte wurde in Kooperation mit Mag. Dr. Miriam Ressler und Dipl. Ing. Thomas Flecker, BSc, an der Fachhochschule Joanneum mittels SPME-GC-MS durchgeführt. Dabei wurde die Bildung flüchtiger Substanzen in den vier Margarinen LP1-LP4 im Zuge der Lagerung für 99 Tage bei 15°C untersucht. Abbildung 10 veranschaulicht die Unterschiede zwischen den in den Margarinetypen gebildeten flüchtigen Verbindungen. Eindeutig erkennbar wird der höhere Gehalt an volatilen Verbindungen in der Margarine LP2. Darüber hinaus kann man die Ähnlichkeit der Margarinen LP1 und LP4 erkennen, da sie sich in der Bildung der flüchtigen Substanzen ebenso wie in ihrer Fettsäurezusammensetzung ähnelten (Tabelle 9).

Die folgenden Verbindungen konnten nur in der Margarine LP2, welche als einzige der vier Margarinen Butterschmalz und Magermilch mit Joghurtkultur enthält, nachgewiesen werden: 2-Pentanon, 5-Hydroxy-2-Pentanon, 4-Methyl-2-Pentanon, (E)-2-Hexenal, Butansäure, 2-Heptanon und Nonansäure. Die Methylketone 2-Pentanon und 2-Heptanon stammen aus kurz- und mittelkettigen Fettsäuren (<C14), welche typisch in MilCHFetten vorkommen und entstehen durch enzymatische Hydrolysierung und einen Seitenweg der beta-Oxidation der Triglyceride. 2-Hexenal entsteht aus der zunächst durch die Autoxidation der alpha-Linolensäure entstehenden Aldehyde 2,4-Heptadienal, welches durch beta-Spaltung aus dem 12-Hydroperoxidisomer abgespalten wird und 2,4,7-Decatrienal, welches aus dem 9-Hydroperoxidisomer abgespalten wird. 2-Hexenal entsteht entweder durch weitere Autoxidation der Aldehyde oder durch weitere Oxidation der labilen Monohydroperoxide (Belitz et al. 2009). Butansäure ist eine typische Fettsäure, welche in MilCHFett vorkommt und konnte daher nur in Margarine LP2 detektiert werden, da diese Butterschmalz enthält (0,3% ± 0,0) (Gaßmann 2006). Das Methylketon 2-Heptanon kann durch die Erhitzung von gesättigten Fettsäuren, wie der Stearinsäure (C18:0), aus der thermisch induzierten beta-Oxidation und der Decarboxylierung entstehen. Nonansäure, oder Pellargonsäure, leitet sich von der Ölsäure ab und entsteht durch Oxidation des Aldehyds Nonanal zur Nonansäure (Belitz et al. 2009). Die Komponente Octansäure konnte nur in der Margarine LP3 analysiert werden. Octansäure, oder Caprylsäure, ist eine kurzkettige Fettsäure und kann abgeleitet von den ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und

Linolensäure und von ihren 9-Hydroperoxiden als beta-Spaltprodukt im Zuge der Lipidoxidation gebildet werden (Brühl 2014). LP3 enthielt im Vergleich zu den anderen drei Margarinen hohe Mengen an Hexanal.

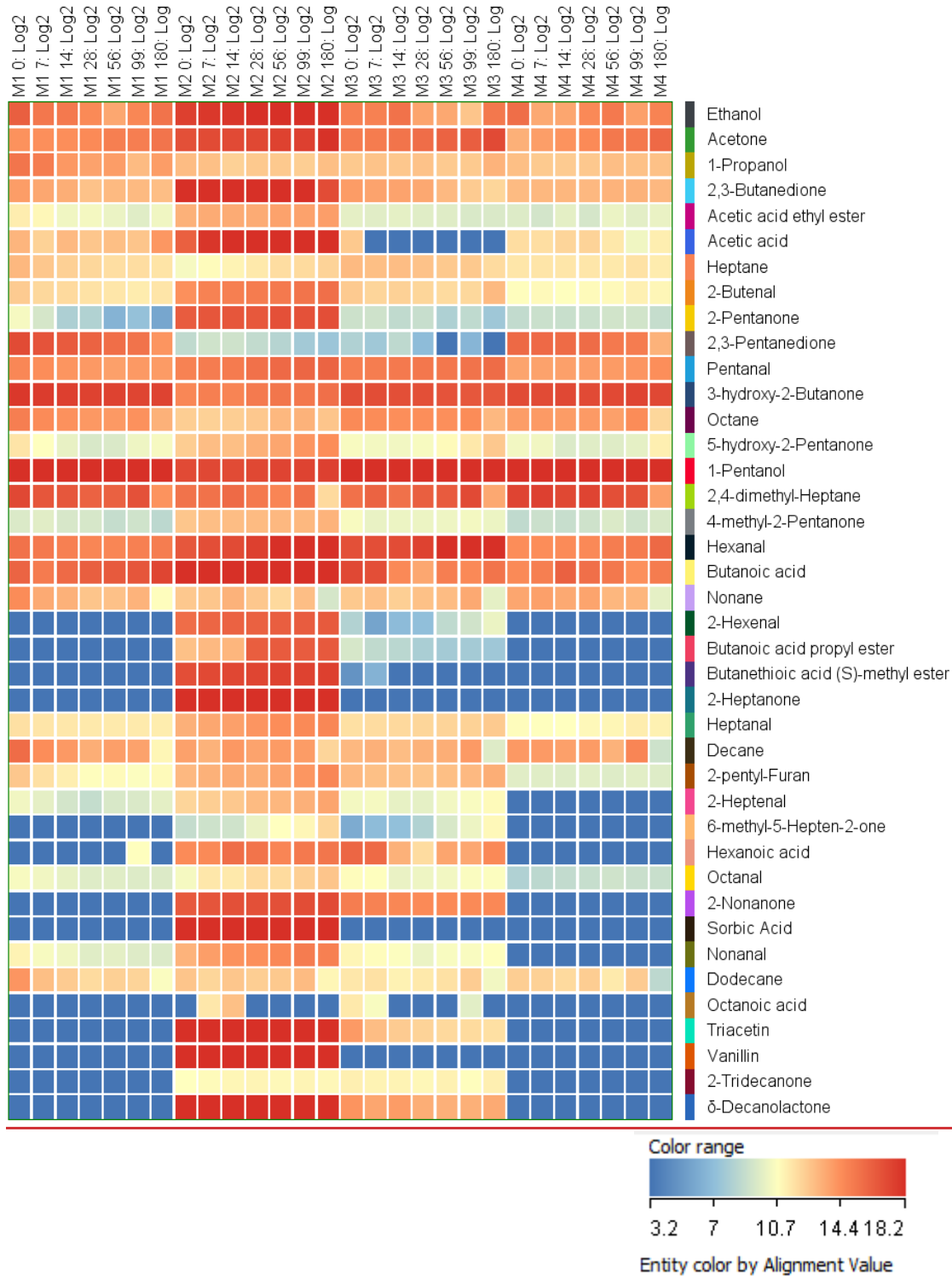


Abbildung 25: Heatmap zur Veranschaulichung der Erhöhung oder Verminderung der volatilen Substanzen in den vier Margarinen LP1 – LP4 während der Lagerung für 180 Tage bei 15°C.

Hexanal entsteht durch Oxidation der Linolsäure und Spaltung des entstandenen 13-Hydroperoxids (Azarbard und Jelen 2015). LP3 enthielt den dritt höchsten Anteil an Linolsäure nach LP4 und LP1 (Tabelle 9), der höhere Anteil an Hexanal kann durch den höheren Gehalt an Hydroperoxiden in LP3 als in LP1 und LP4 begründet werden (Abb. 14).

In Abbildung 25 werden alle Verbindungen, welche sich während der Lagerung erhöhten, rot dargestellt. Alle Verbindungen, die während der 180 Tage in den vier Margarinen abnahmen, werden blau dargestellt. Dabei wird neben dem hohen Anstieg und den zahlreichen vielen flüchtigen Sekundärprodukten in LP2 die Ähnlichkeit von LP1 und LP4 deutlich erkennbar.

Tabelle 12 im Anhang zeigt darüber hinaus jene Komponenten, deren Konzentrationen in den Margarinen sich während der Lagerzeit verändert haben. Dabei liegen bei Verbindungen, welche während der Lagerung von 99 Tagen anstiegen negative FC-Werte vor, während Verbindungen, welche abnahmen, positive FC-Werte ergaben. Aceton war dabei die einzige Substanz, deren Konzentrationen sich in allen vier Margarinen verändert hat. Der Gehalt an Aceton stieg in allen vier Margarinen im Zuge der Lagerung an. Die FC-Werte für Aceton in den Margarinen waren -3,35 in LP1, -1,29 in LP2, -3,21 in LP3 und -2,86 in Margarine LP4. Somit kann angenommen werden, dass die Veränderung des Acetongehalts auf den Margarinetyp zurückzuführen ist.

Erhöhung des Aceton Gehalts während der Lipidoxidation in Margarine

Aufgrund der Werte für Aceton, welche in allen Margarinen über die Lagerung anstiegen (Abb. 27 und Tab. 12, Anhang), wurde die Überlegung angestellt, ob Aceton als neuer Marker für die Lipidoxidation in Margarine herangezogen werden kann. Die Konzentrationen von Aceton und Hexanal wurden mittels eines Standardadditionsverfahrens bestimmt. Hexanal ist ein bekannter Marker für die Lipidoxidation, da es das Abbauprodukt der Linolsäure darstellt. Hexanal wird mittels Headspace-Analyse bestimmt und als Indikator für die Lipidoxidation herangezogen, da es zu Aromafehlern führt (Belitz et al. 2009). Dabei entsteht Hexanal, neben weiteren

Spaltprodukten aus der Spaltung der 9- und 13-Linolsäure-Hydroperoxide (Frankel 1980).

Abbildung 26 zeigt die Erhöhung von Hexanal und Aceton in allen vier Margarinetypen während der 99 Lagertage:

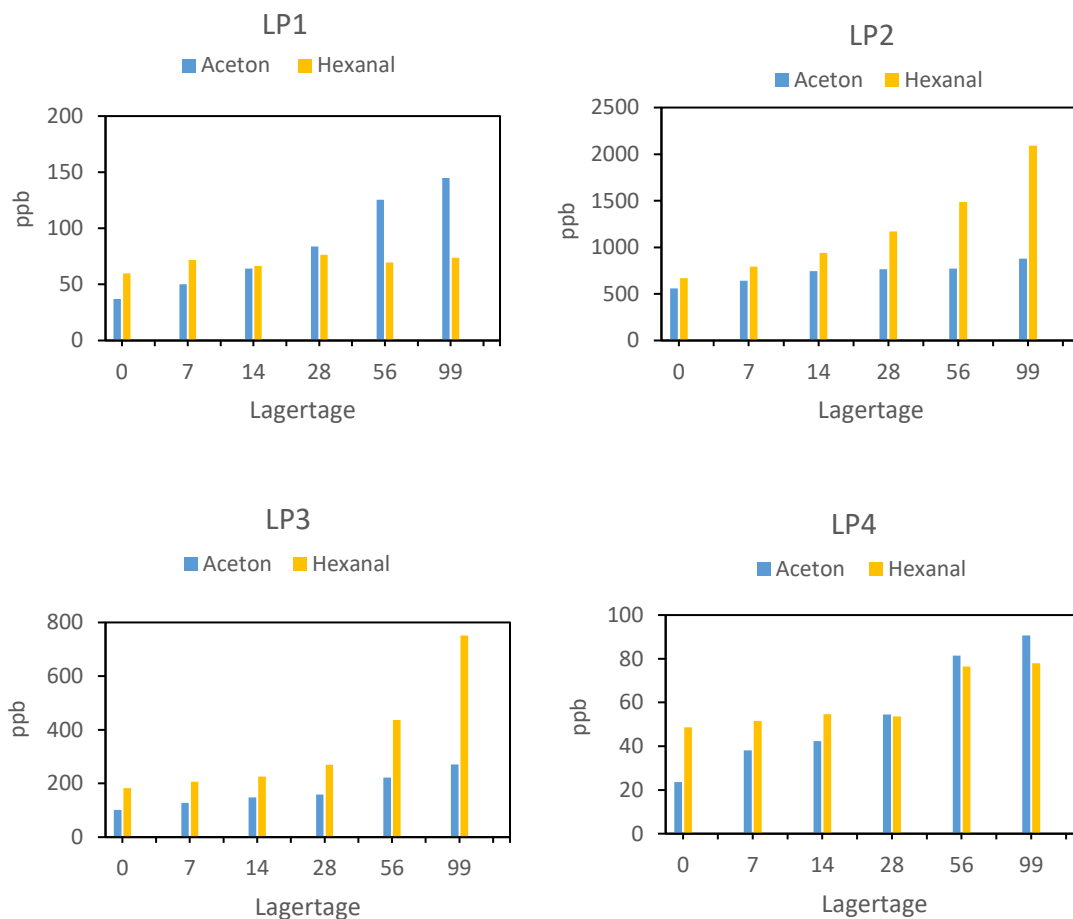


Abbildung 26: Aceton (blau) und Hexanal (gelb) in den Margarinen LP1, LP2, LP3, LP4 während 99-tägiger Lagerung in ppb. Darstellung der Daten als MW (n=2).

In Margarine LP1 stieg der Acetongehalt von 37,4 ppb an Tag 0 auf 144,8 ppb an Tag 99. Bei LP2 stieg der Gehalt von 622 ppb auf 791,0 ppb, bei Margarine LP3 von 97,2 ppb auf 270,2 ppb und von 23,5 ppb auf 90,7 ppb an Tag 99 bei LP4. Der höchste Gehalt an Aceton nach 99 Lagertagen wurde in Margarine LP2 gebildet, gefolgt von Margarine LP3. Der Gehalt an Aceton überstieg in den Margarinen LP1 und LP4 sogar den Gehalt an Hexanal, was die Möglichkeit seines Einsatzes als Lipidoxidationsmarker unterstützt. Auch im Vergleich zu den Ergebnissen der POZ, CD und OSI konnte eine Ähnlichkeit im

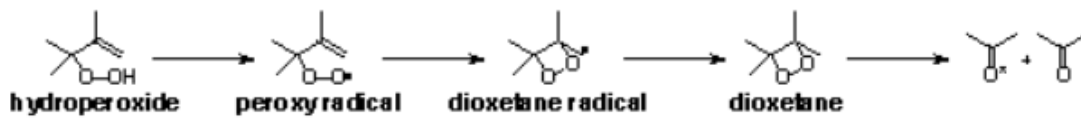
Anstieg und in der Entwicklung der Lipidoxidationsparameter in den vier Margarinen gezeigt werden. In Margarinen LP1 und LP4 stieg der Acetongehalt um 376% und 426%, während der Anstieg bei LP2 um 76,1% und bei LP3 um 356% lag. Diese Werte decken sich mit den Ergebnissen der POZ- und CD-Analysen, welche bei LP1 und LP4 auch stärker anstiegen als bei den Margarinen LP2 und LP3. Der Anfangsgehalt an Aceton an Tag 0 überstieg bei Margarine LP2 mit 622 ppb jene der anderen drei Margarinen um ein Vielfaches. Dies ist neben der hohen Ausgangs-POZ und dem hohen Gehalt an CD und Epoxiden an Tag 0 ein weiteres Indiz dafür, dass die in LP2 enthaltenen Fette und Öle bereits am Tag 0, am Tag der Produktion, stark oxidiert waren, was man auf das enthaltene Butterschmalz und damit verbundenen Produktionsprozess zurückführen könnte. Da die Oxidation bereits an Tag 0 weit fortgeschritten war, wurde im Vergleich ein weniger starker prozentualer Anstieg des Acetongehalts als in den Margarinen LP1, LP3 und LP4 verzeichnet, welche zu Beginn der Lagerung weniger stark oxidiert waren.

Die Bildung von Aceton im Rahmen der Lipidoxidation von Margarinen war bis heute noch nicht Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten. Nur wenige wissenschaftliche Arbeiten beschäftigen sich mit der Bildung von Aceton während der Lipidoxidation im Allgemeinen. Während die Entstehung von Hexanal durch die Oxidation der Linolsäure und die Spaltung ihrer Hydroperoxide bekannt ist, wurde die Entstehung von Aceton im Rahmen der Lipidoxidation weniger erforscht.

Die Entstehung von Ketonen aus ungesättigten Fettsäuren in Triacylglyceriden während der Lipidoxidation wurde durch Xia und Budge (2017) erläutert. Xia und Budge (2017) zeigten auf, dass einerseits langkettige Ketone durch die Rekombinierung von sekundären Alkoxyradikalen mit Alkylradikalen oder durch die Eliminierung von OH^- von Hydroperoxiden gebildet werden können (Xia und Budge 2017).

Timmins et al. (1997) zeigten einen Reaktionsmechanismus, durch den auch die Bildung kurzkettiger Ketone während der Lipidoxidation begründet werden könnte. Da es sich bei Aceton um ein kurzkettiges Keton handelt, kann die Entstehung von Aceton über den Modell-Mechanismus der Fragmentierung durch Thermolyse der Dioxetan – Zwischenstufe erklärt werden. Dabei entsteht zunächst durch die Oxidation eines Hydroperoxids zum Alkyl-Peroxyradikal und durch anschließende Zyklisierung das

Dioxetanradikal. Durch H-Abstraktion formiert sich daraus das Dioxetan, welches durch Fragmentierung (Thermolyse) durch C-Spaltung auf beiden Seiten zu Aceton zerfällt, wie in folgendem Reaktionsschema nach Timmins et al. (1997) veranschaulicht wurde (Timmins et al. 1997):



In der Atemluft wurde Aceton als Biomarker für beim Menschen stattfindende Lipidoxidation beschrieben (Amlendu et al. 2014).

Obwohl die Bildung von Aceton in Margarinen und Ölen bis dato nicht Gegenstand von wissenschaftlichen Arbeiten war, so zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Aceton als möglicher Indikator für die Lipidoxidation herangezogen werden könnte. Durch die Analyse weiterer Margarinen, in größeren Mengen, könnte der Einsatz von Aceton als Lipidoxidationsmarker für Margarinen bestätigt werden.

4.1.7 Zusammenfassung der oxidativen Lagerstabilität

Abschließend kann festgehalten werden, dass LP2 die oxidativ instabilste Margarine der vier getesteten darstellte. Die vier Analysen POZ, CD, oxTAGs und Aceton wiesen auf den hohen Grad der Autoxidation im Produkt zu Beginn (T0) und am Ende der Lagerdauer (T180) hin. Lediglich die Bestimmung des OSI deckte sich nicht mit den anderen Analysen und suggerierte eine bessere oxidative Stabilität, was sich durch den niedrigeren Gehalt an Linolsäure erklären lässt. Nur vier Wochen nach der Produktion überstieg die Peroxidzahl den internen Maximalwert von maximal 2 meq O₂/kg Fettphase.

Aufgrund ihrer Zusammensetzung zeigte LP3 den zweitschlechtesten Verlauf der Lipidoxidation in den vier getesteten Margarinen. Sie enthielt den höchsten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren vor LP2, unterschied sich aber von LP2 aufgrund ihres Produktionsprozesses, da kein Butterschmalz eingesetzt wurde, was sich in geringeren Ausgangswerten der Oxidationsparameter niederschlug. Der interne Maximalwert der POZ wurde bei LP3 an Tag 56 mit $1,93 \pm 0,38$ meq O₂/kg Fettphase knapp erreicht.

Aufgrund der hohen oxidativen Instabilität der Margarinen LP2 und LP3 und der hohen Ausbildung unangenehmer, flüchtiger Aromen, empfiehlt sich eine Verbesserung der Margarinerzeptur von LP2 und LP3. Aufgrund des hohen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren, waren diese Margarinen besonders anfällig für Lipidoxidation. Um die Lagerqualität der beiden Margarinen zu verbessern empfiehlt sich der Einsatz natürlicher Antioxidantien, wie Grünteeextrakt, um eine Erhöhung der Oxidationsstabilität der Margarinen herbeizuführen.

Bei den Margarinen LP1 und LP4 handelte es sich, wie erwartet, um die oxidativ stabilsten Produkte. Aufgrund ihres hohen Gehalts an gesättigten Fettsäuren waren sie zu Beginn der Lagerung stabiler, was sich in geringeren Anfangswerten der POZ, CD, Aceton und Hexanal zeigte. Obwohl die Oxidationsprodukte während der Lagerung am stärksten anstiegen, was durch den hohen Gehalt an Linolsäure begründet werden kann, so erreichten diese an Tag 180 geringere Werte als die Margarinen LP2 und LP3. Aufgrund der hohen oxidativen Stabilität ist keine Rezepturoptimierung nötig. Um die Bildung flüchtiger, sekundärer Oxidationsprodukte wie Hexanal und Aceton zu verringern können auch in den Margarinen LP1 und LP4 natürliche Antioxidantien getestet werden.

Durch die alleinige Analyse der Peroxidzahl kann es zur Unterschätzung des Status der Lipidoxidation kommen (Schaich et al. 2017). Aus diesem Grund und auch aus dem Grund, dass es bei sich bei der Lipidoxidation um komplexe Reaktionswege handelt, wird empfohlen, nicht nur eine Methode, sondern eine Kombination von Methoden zur Qualitätsbeurteilung von fetthaltigen Produkten anzuwenden. Folglich werden daher die angewendeten Analysemethoden anhand ihrer Aussagekraft und ihrer Anwendbarkeit und Integration in einem Qualitätssicherungslabor eines Produktionsbetriebes verglichen.

4.2 Bewertung und Vergleich von Analysemethoden zur Beurteilung der Lagerstabilität von Margarineprodukten

Zur Beurteilung der fortgeschrittenen Lipidoxidation in den vier Margarinetypen LP1, LP2, LP3 und LP4 wurden fünf Analysemethoden angewandt. Diese Analysen werden in Tabelle 10 anhand der Schritte der Aufwendigkeit der Probenvorbereitung, der erforderlichen Reagenzien, der Messdauer, der Gerätekosten und der für die Durchführung der Analyse erforderlichen Grundkenntnisse miteinander verglichen.

Tabelle 10: Eigenschaften und Merkmale der Analysemethoden zur Beurteilung der Stabilität von Margarinen.

	Proben- vorbereitung	Reagenzien	Messdauer	Gerätekosten	Kenntnisse erforderlich	Notizen
POZ	Einwaage Schmelzen Lösen	Na ₂ S ₂ O ₃ Eisessig Isooctan Kaliumiodid	5 Min.	10 000 €	nein	Grenzwert nur für Öle
CD	Einwaage Schmelzen Lösen	Isooctan	5 Min.	4000 €	nein	
Ranzimat	Einwaage Schmelzen	keine	Stunden, abhängig von Stabilität	22 000 €	nein	Kombination mit POZ sinnvoll
oxTAGs	Einwaage Extraktion LC-MS	Isopropanol Petroleum- ether Diethylether Laufmittel	40 Min.	ab 180 000 €	ja	Durchführung in Kooperation mit Forschungs- einrichtungen
flüchtige Oxidations Produkte, Aceton	Erhitzen SPME Desorption GC-MS	Helium	1h	ab 100 000 €	ja	Durchführung Kooperation mit Forschungs- einrichtungen

Die Analyse der Peroxidzahl ist eine in der Margarineindustrie etablierte Methode zur Beurteilung der Qualität der Produkte. Wichtig anzumerken ist, dass für raffinierte Öle, nicht jedoch für Margarine, ein Grenzwert von 10 meq O₂/kg Öl gilt (Codex Alimentarius 2001). Die Analyse der Peroxidzahl ist eine einfache und rasche Methode, welche keine chemischen Vorkenntnisse erfordert und leicht in den Alltag eines Produktionslabores integriert werden kann. Die für die Messung verwendeten Glasgefäße sollten frei von Fett- und Detergentien sein, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern.

Im Rahmen der Lagerstudie konnte gezeigt werden, dass die POZ in allen Margarinen anstieg, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Tab. 14, Anhang; Abb. 13-16). Die Bestimmung der Peroxidzahlwerte mittels Titrimetrie ist von 0 – 30 meq O₂/kg Fettphase möglich (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014). Ein signifikanter Anstieg der Peroxidzahl konnte bei den Margarinen frühestens ab Tag 56 detektiert werden. Die Ermittlung der Peroxidzahl gibt nur bedingt Auskunft über den Fortschritt der Lipidoxidation in Margarinen, da Peroxide im Laufe der Autoxidation in sekundäre Lipidoxidationsprodukte zerfallen und die Peroxidzahl dadurch sinkt (Pignitter und Somoza 2012). Folglich sollte die Peroxidzahl mit einer weiteren Analysemethode zur Evaluierung sekundärer Lipidoxidationsparameter kombiniert werden, um Fehleinschätzungen der Qualität der Produkte zu vermeiden. Zudem werden weitere primäre Lipidoxidationsprodukte, wie Epoxide, nicht erfasst.

Die Ermittlung der Gehalte an konjugierten Dienen (CD) in den Lagermargarinen zeigte einen Anstieg an CD während der Lagerung, ähnlich zum Anstieg der Peroxidzahl in den Produkten. Eine signifikante Erhöhung der CD in den Margarinen LP1 – LP4 konnte ebenfalls erst nach der Lagerung von 56 Tagen detektiert werden (Abb. 17 – 20). Die Nachweisgrenze der photometrischen Methode lag bei $2,9 \cdot 10^{-6}$ mmol/ml. Die Angabe der konjugierten Diene erfolgte als „CD value“, mit Bezug auf die Einwaage der Margarine in Gramm nach Pegg (2005). Die Bestimmung der konjugierten Diene ist eine etablierte, weit akzeptierte Analysenmethode zur Beurteilung der Lipidoxidation. Aufgrund der raschen und einfachen Probenvorbereitung sowie des geringen Materialaufwandes als auch der einfachen Bedienung des Photometers ist die Methode für die Anwendung im Produktionslabor geeignet. Da jedoch sowohl Hydroperoxide als auch CD primäre Oxidationsparameter darstellen, welche mit fortschreitender

Ranzigkeit unter der Bildung sekundärer Verbindungen zerfallen, könnte eine Kombination der beiden Methoden keine sichere Beurteilung der Qualität der Produkte bedeuten (Pignitter und Somoza 2012). Die Analyse der CD in den unterschiedlichen Margarinen konnte die Werte der POZ bestätigen (Tab. 14, Anhang; Abb. 17 – 20).

Flüchtige sekundäre Oxidationsprodukte konnten durch die in der Handhabung einfache Methode am Ranzimat bestimmt werden (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014). Einer der Vorteile der Methode ist, dass keine Reagenzien erforderlich sind und die Messung nach dem Einbringen der Probe vollautomatisch stattfindet. Für die Durchführung der Messung sind keine chemischen Grundkenntnisse erforderlich, weshalb sie gut in den Alltag der Qualitätskontrolle im Produktionslabor integriert werden könnte. Bei der Reinigung aller mit der Probe in Kontakt kommenden Gefäße und Schläuche ist darauf zu achten, dass diese frei von Proberückständen sowie fett- und wasserfrei sind. Die Ergebnisse der Messung der OSI zeigten ebenfalls ähnliche Entwicklungen während der Lagerdauer, wie die POZ und CD (Tab. 14, Anhang; Abb. 21 – 24). Die Bestimmung des OSI zeigte bereits ab Lagertag 14 signifikante Veränderungen in Margarine LP3 (Abb. 23) an. Bei allen vier Margarinetypen sank die Oxidationsstabilität in Abhängigkeit ihrer Fettsäurezusammensetzung während der Lagerdauer ab. Die Kombination der Messung der Peroxidzahl und der Messung am Ranzimat ist eine sinnvolle Überlegung in der Analyse von Margarineprodukten im Alltag eines Produktionslabors, da so im Falle einer niedrigen Peroxidzahl die Oxidationsstabilität mit Hilfe des Ranzimats Auskunft über den wahren Fortschritt der Ranzigkeit der Produkte geben kann.

Da nur in den zwei Margarinetypen LP2 und LP3 Epoxide detektiert werden konnten, da diese einen niedrigeren Gehalt an gesättigten Fettsäuren als LP1 und LP4 aufwiesen, ist die Bestimmung der Epoxide zur Beurteilung der Qualität der Produkte nur bedingt geeignet (Tab. 16, Anhang). Es konnte gezeigt werden, dass Epoxide bereits zu Beginn der Lagerung in Margarineprodukten enthalten sein können. Die Probenvorbereitung inklusive der Extraktion der polaren Phase ist im Vergleich zu den anderen Analysemethoden sehr aufwendig. Auch die Gerätekosten sind vergleichsweise sehr hoch (Tabelle 10), weshalb sich eine Etablierung der Methode im Umfeld eines Betriebslabors nur bedingt eignet. Aufgrund der potentiell toxischen Wirkung von

Epoxiden sollten zukünftige Forschungsarbeiten vermehrt die Einflüsse auf die Entstehung von Epoxiden in Margarinen untersuchen und ein Höchstwert von Epoxiden in Ölen und Margarineprodukten angedacht werden (Grüneis et al. 2019). Die Analyse von Epoxiden in weiteren Margarinetypen in Kooperation mit Forschungseinrichtungen könnte als weitere Methode der Qualitätsbeurteilung der Margarinen etabliert werden.

Die Detektion flüchtiger Substanzen mittels SPME-GC-MS ergab spezifische Unterschiede zwischen den Margarinetypen. So konnte in allen vier Margarinetypen eine Veränderung der flüchtigen Verbindung Aceton während der 180 Lagertage gezeigt werden. Der Gehalt an Aceton stieg in allen Margarinetypen während der Lagerung an. Ähnlich zu den Ergebnissen der POZ, der CD, der OSI und der Epoxide lag der Gehalt an Aceton ebenfalls in den Margarinen LP2 gefolgt von LP3 am höchsten, während in LP1 und LP4 geringere Gehälter gezeigt wurden (Abb. 26) Da bis dato die Bildung von Aceton während der Lagerung von Margarinen nicht in Studien behandelt wurde, bedarf es weiterer Studien, auch bezüglich Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode, um die Bedeutung von Aceton als Lipidoxidationsmarker bewerten zu können. Für die Analyse des flüchtigen Acetons in weiteren Margarinearten bedarf es hoher Gerätekosten, während die Messdauer und die Probenbearbeitung weniger kosten- und zeitintensiv sind. Für die Durchführung sind jedoch chemisch-analytische Grundkenntnisse erforderlich, weshalb eine detaillierte Schulung und der Transfer des wissenschaftlichen Know-hows unerlässliche Schritte in der Etablierung der Methode auf der Ebene der Qualitätssicherung in der Praxis sind.

Für die Einschätzung der Qualität von Margarineprodukten durch Qualitätssicherungsmitarbeiter*innen in einem Produktionslabor eignet sich die Peroxidzahl aufgrund ihrer schnellen, einfachen Analysemethodik (Tabelle 10). Um eine Fehleinschätzung der POZ aufgrund fortgeschrittener Lipidoxidation zu vermeiden, sollte eine kombinierte Analytik mittels Ranzimat bei all jenen Produkten stattfinden, welche die Lagerdauer von 6 Monaten oder das Mindesthaltbarkeitsdatum bereits überschritten haben und organoleptisch einen ranzigen Geruch aufweisen. Die Analyse von Epoxiden kann in Kooperationen mit Forschungseinrichtungen verfolgt werden, um so kosteneffizient agieren und weitere Einflüsse auf die Stabilität der Produkte wie Antioxidantien untersuchen zu können. Zeigen weitere Studien, dass Aceton als

Lipidoxidationsmarker für Margarinen geeignet ist, sind hohe Investitionskosten und ein Transfer des wissenschaftlichen Know-hows auf die Ebene der Praxis eines Produktionsbetriebes für die Etablierung der Methode im Alltag der Qualitätssicherung der Margarinen notwendig.

4.3 Einflüsse von Einzelzutaten auf die oxidative Haltbarkeit einer Backmargarine

Im Zuge des zweiten Teils der Forschungsarbeit wurden anhand der Rezeptur der Backmargarine LP3 auf der Pilotanlage Mustermargarinen hergestellt, deren Zusammensetzungen in den Tabellen 2-4 (S47-49) erläutert werden. So konnten die Einflüsse von Emulgatoren, Antioxidantien und weiteren Einzelzutaten, wie beispielsweise Zitronensäure oder Beta-Carotin, auf die Stabilität der Industriemargarine untersucht werden.

Die Zusammensetzung der Fettphase der Mustermargarinen erfolgte in Anlehnung an die Rezeptur von Lagerprobe LP3 und setzte sich aus Palmöl, Palmstearin und Rapsöl zusammen und wird in Tabelle 11 dargestellt. Aufgrund des hohen Gehaltes an Palmöl ergab sich ein hoher Anteil an Palmitinsäure C16:0 und Ölsäure C18:1 in der Margarine, wie in Tabelle 11 veranschaulicht wird. Wie bei LP3 kann das Fettsäuremuster auf den hohen Gehalt an Palmöl zurückgeführt werden (Tan et al. 1981). Der Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ergibt sich wie bei LP3 aus dem Inhalt von Rapsöl, ein Öl mit hohem Gehalt der Fettsäure C18:2 (BMEL 2011).

Tabelle 11: Fettsäurezusammensetzung (%) der Mustermargarine MUGe (Kombination aller Zutaten). Darstellung der Daten als MW $\pm$ SD (n=4).

FS	MUGe (%)
C12:0	0,2 $\pm$ 0,0
C14:0	0,9 $\pm$ 0,0
C16:0	40,4 $\pm$ 0,0
C18:0	4,2 $\pm$ 0,0
C18:1	41,6 $\pm$ 0,3

C18:2	10,7± 0,1
C18:3	1,1± 0,0
C20:0	0,4± 0,0
C22:0	0,1± 0,0
C24:0	0,2± 0,0

Die Mustermargarine hatte ein ähnliches Sättigungsmuster wie Margarine LP3 (Abb. 12).

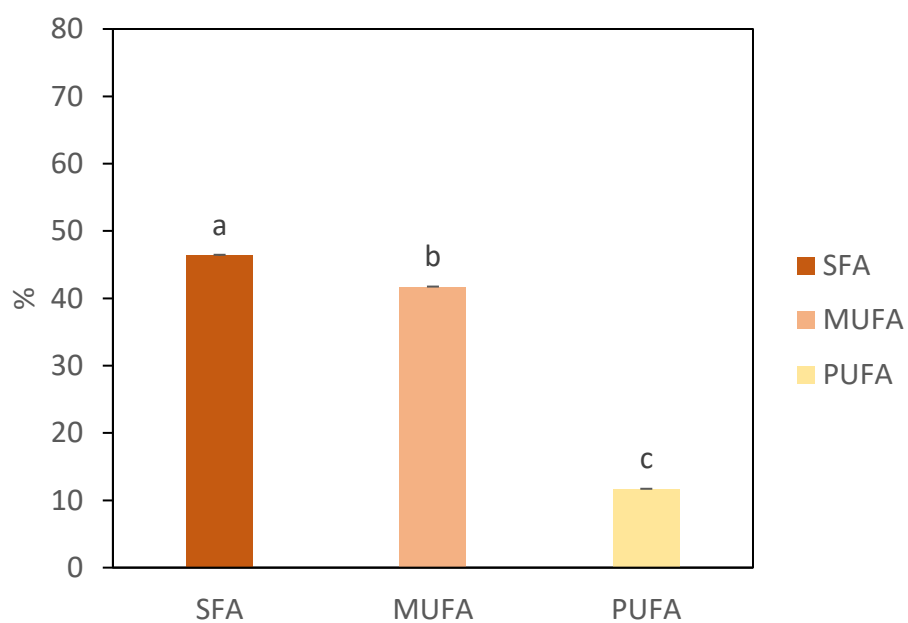


Abbildung 27: Gehalt an SFA, MUFA und PUFA in der Mustermargarine. Angabe der Daten in MW + SD (n=4). Die unterschiedlichen Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den SFAs, MUFAs und PUFAs der MUGe Margarine (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test).

4.3.1 Emulgatoren

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der POZ-Messungen der erhitzten Margarinemuster MU1-MU6. Dabei wird ersichtlich, dass die unterschiedlichen Konzentrationen von E1 (MU1-MU3) keinen signifikanten Einfluss auf die POZ hatten. Emulgator 1 entspricht in der Standardkonzentration (MU1) der eingesetzten Menge in der Margarine LP3. Dies stimmt mit den Werten der OSI in Abbildung 29 überein. Die POZ stieg jedoch signifikant ($p < 0,05$) beim Einsatz von E2 in der Standardkonzentration (MU4) und beim Einsatz von E2 in um 20% verringerter Konzentration (MU5) auf $3,33 \pm 0,51$ meq O₂/kg Fettphase in MU4 und $3,38 \pm 0,48$ meq O₂/kg Fettphase in MU5 im Vergleich zu den Margarinen mit E1. Beim Einsatz von +20% E2 in der Margarine sank die POZ wiederum auf $1,39 \pm 0,22$ meq O₂/kg Fettphase ab.

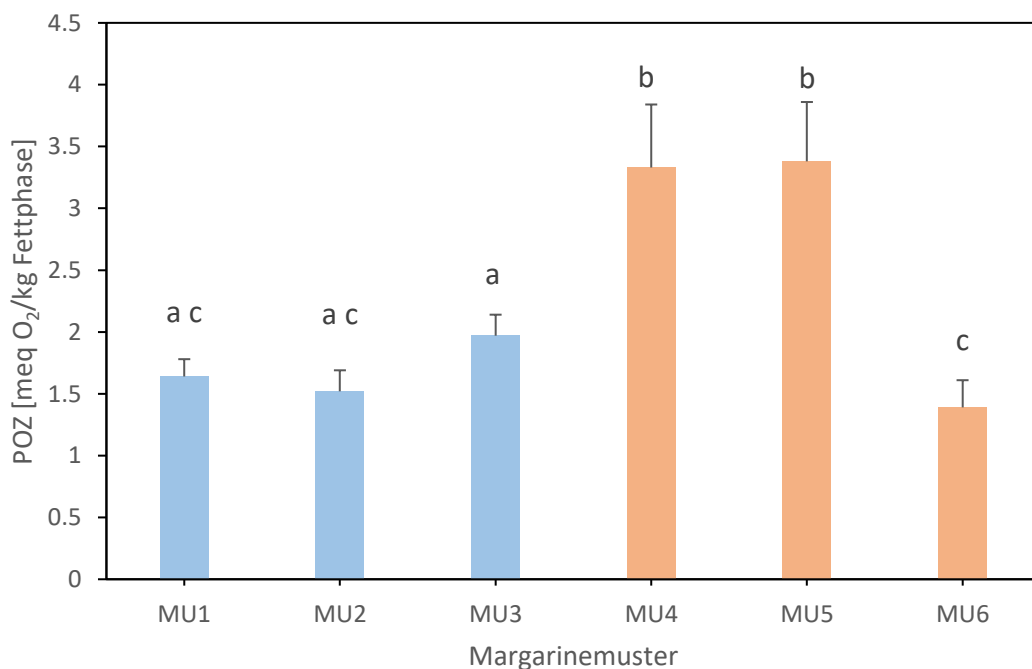


Abbildung 28: POZ (meq O₂/kg Fettphase) der Mustermargarinen MU1-MU6. MU1-3 enthielten E1 mit der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. MU4-6 enthielten E2 mit der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. Darstellung der Daten in MW + SD ($n = 4$). Unterschiedliche Kleinbuchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test) zwischen den Mustermargarinen.

Die Werte der OSI unterscheiden sich zwischen den eingesetzten Emulgatortypen E1 und E2 nicht signifikant. Es wird jedoch ersichtlich, dass durch den Einsatz von +20% mehr E2 eine signifikante ($p < 0,05$) Stabilitätssteigerung im Vergleich zur

Standardkonzentration (MU4) und -20% der Standardkonzentration (MU5) von E2 erreicht wurde. Die Oxidationsstabilität stieg so von $7,47 \pm 0,30$ h (MU4) und $7,64 \pm 0,14$ h (MU5) auf $8,64 \pm 0,12$ h signifikant ($p < 0,05$). Die Analyseergebnisse zeigen, dass die oxidative Stabilität der Margarinen mit E2 konzentrationsabhängig sind, während die Konzentration von E1 keinen Einfluss auf die Stabilität der Mustermargarinen hat. Yi et al. (2015) konnten zeigen, dass die oxidative Stabilität von Wasser-in-Walnussöl-Emulsionen unter anderem durch die Konzentration von bestimmten eingesetzten Emulgatoren beeinflusst werden kann. Mit Erhöhung der Konzentration des Emulgators PGPR (Polyglycerol-Polyricinoleat, E476) von 0,3 wt% auf 1,0 wt% sank die Bildung von Lipidhydroperoxiden nach 25 Lagertagen bei 45°C ab. Sie zeigten diese Abnahme durch die Zunahme der „lag phase“ für die Hydroperoxidbildung von 8 Tagen bei 0,3 wt% PGPR auf 11 Tage bei 1,0 wt% PGPR und begründeten dies durch das Entfernen von Peroxiden aus dem Öl-Wasser-Interface durch die überschüssigen Emulgatormoleküle und die daraus resultierende Bildung reverser Micellen in der kontinuierlichen Ölphase (Yi et al. 2015).

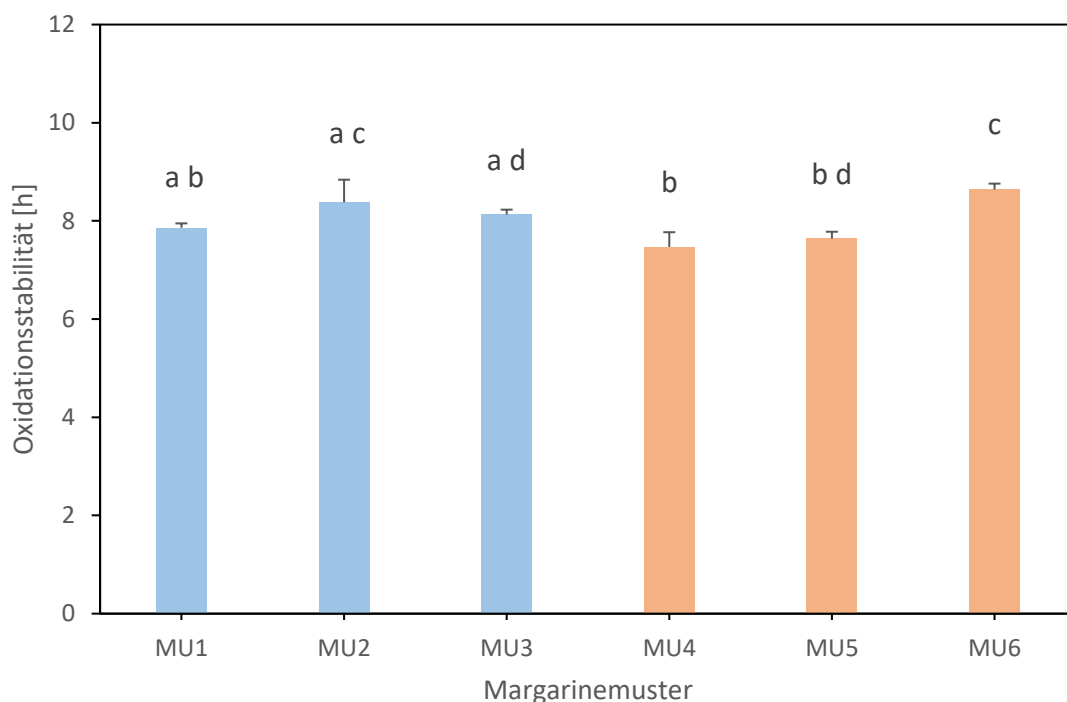


Abbildung 29: OSI (h) Werte der Mustermargarinen MU1-MU6. MU1-3 enthielten E1 in der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. MU4-6 enthielten E2 mit den Konzentration Standard, -20% und +20%. Darstellung der Daten in MW + SD ($n = 4$). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede (ANOVA $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test) zwischen den Mustermargarinen.

Die Abhängigkeit der oxidativen Stabilität von O/W- und W/O-Emulsionen von den eingesetzten Emulgatoren war bereits Gegenstand zweier weiterer Studien (Dridi et al. 2016; McClements und Decker 2000). Dridi et al. (2016) kombinierten in den Wasser-in-Rapsöl-Emulsionen die Emulgatoren Monoglycerid (DMG) und Polyglycerin-Polyricinoleat (PGPR), NaCl und FeSO_4 und veränderten das Verhältnis der beiden Emulgatoren im Versuch. Sie lagerten die Emulsionen für 78h bei 25°C, um die Auswirkungen auf das Interface zu beobachten. Während sie die Konzentration des Monoglycerids bei 1,5 wt% beließen, erhöhten sie die Konzentration des zweiten Emulgators PGPR von 1,5 auf 3 und 5wt%. Durch Erhöhung des Gehalts an PGPR in der Emulsion verlangsamte sich die Lipidoxidation. Dies begründeten Dridi et al. (2016) durch die höhere Menge an polaren Einheiten in PGPR Ketten als in Monoglycerid-Molekülen. Daraus zogen sie die Annahme, dass die Erhöhung des PGPR-Anteils zu einer Verdickung der Interface Schicht zu einer physikalischen Barriere und zu einer Trennung der Lipide von den Eisenmolekülen in der Wasserphase führte. Bei den Emulsionen, welche kein FeSO_4 in der Wasserphase enthielten, konnten Dridi et al. (2016) keine Auswirkung auf die Bildung von konjugierten Dienen zeigen. Daraus schlossen sie, dass der Einfluss des Interfaces bei Abwesenheit von wasserlöslichen Prooxidantien in W/O-Emulsionen vernachlässigbar wird (Dridi et al. 2016). Für die Bestimmung der Einflüsse der Emulgatoren auf die Durchlässigkeit des Interfaces von W/O-Emulsionen sind weitere Arbeiten mit sich in der Polarität und im Aufbau unterscheidenden Emulgatoren notwendig.

McClements und Decker (2000) fassten den Einfluss der Ladung der Emulsionströpfchen in O/W-Emulsionen zusammen. Die in O/W-Emulsionen eingesetzten Emulgatoren weisen unterschiedliche Ladung auf: SDS (Natriumlaurylsulfat) ist anionisch, DTAB (Dodecyl Trimethylammonium Bromid) kationisch und Brij 35 (Polyalkylenglycolether) ungeladen. In O/W-Emulsionen führte der Einsatz des Emulgators SDS zur negativen Ladung der Tröpfchenmembran und zur höheren Anziehung positiv geladener Metallionen wie Eisen, was zu einer höheren Lipidoxidation führte. Bei positiv geladenen oder ungeladenen Tröpfchenmembranen von O/W-Emulsionen sinkt laut McClements und Decker (2000) die Lipidoxidation ab (McClements und Decker 2000).

Aufgrund der gleichbleibenden Stabilität der Margarinen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Emulgator 1 sowie der Erfahrung mit dem Einsatz von E 471 auf Palmbasis wurde in den weiteren Margarinemustern der Emulgator E1 in der Standardkonzentration von 0,175% eingesetzt.

4.3.2 Antioxidantien

Bei der Zugabe von DL- α -Tocopherylacetat zu den Mustermargarinen MU7, MU8 und MU9, zusätzlich zu Emulgator 1 in der Standardkonzentration stieg die POZ von $1,64 \pm 0,14$ meq O₂/kg Fettphase in MU1 signifikant auf $3,95 \pm 0,067$ meq O₂/kg Fettphase (MU7), $3,79 \pm 0,41$ meq O₂/kg Fettphase (MU8) und $3,89 \pm 0,14$ meq O₂/kg Fettphase (MU9) an (Abb. 30). Die Konzentration von aTA hatte dabei keinen Einfluss auf die Hydroperoxidbildung in den Mustermargarinen. Beim Einsatz von aTA in der Konzentration -20% der Standardkonzentration (0,16% in der Gesamtmargarine) oder +20% der Standardkonzentration (0,24% in der Gesamtmargarine), unterschieden sich jedoch die Werte der OSI signifikant vom Wert der Standardkonzentration (0,2%). Lag der Wert des OSI bei MU7 bei $6,23 \pm 0,10$ h unter der Oxidationsstabilität der Mustermargarine ohne Antioxidans (MU1) ($7,86 \pm 0,09$ h), so stieg der OSI bei MU8 und MU9 auf $8,84 \pm 0,10$ h und $8,75 \pm 0,41$ h an (Abb. 31).

DL- α -Tocopherylacetat wird als Vitamin E-Supplement neben anderen Lebensmitteln und Futtermitteln auch in Margarine eingesetzt, zeigt aber eine prooxidative Wirkung beim alleinigen Einsatz in Margarinen. Es handelt sich bei aTA um ein Provitamin, da es erst nach Aktivierung in vivo seine Wirksamkeit entfaltet (Scheibner und Elmadfa 1984). Die prooxidative Wirkung von α -Tocopherol in Soyaöl ab einer Konzentration von 0,002% konnte von Martin-Rubio et al. (2018) gezeigt werden. Während der Erhitzung des Soyaöls für 20 Tage bei 70°C konnten sie in den Proben mit α -Tocopherol einen höheren Anstieg der Hydroperoxide detektieren. Der Gehalt an Tocopherol bestimmte dabei sowohl die Kinetik der Hydroperoxidbildung, die Höchstkonzentration als auch die Rate des Hydroperoxidabbaus, welcher bei den Soyaölen mit α -Tocopherol früher begann.

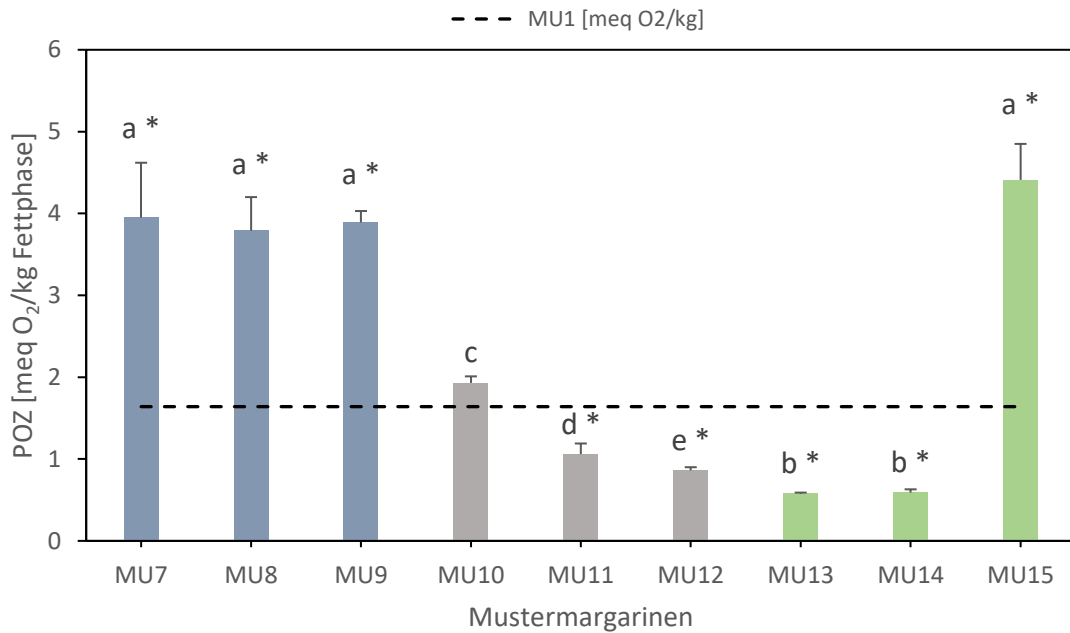


Abbildung 30: POZ (meq O₂/kg Fettphase) der Mustermargarinen MU7-MU15. MU7-9 enthielten aTA in der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. MU10-12 enthielten RE in der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. MU13-MU14 enthielten GE in der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. Darstellung der Daten in MW + SD (n = 4). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Antioxidantien (ANOVA, p<0,05, post-hoc) Mit Stern gekennzeichnete Daten zeigen einen signifikanten Unterschied zu MU1 ohne Antioxidans (ANOVA, p<0,05, Dunn's post-hoc Test).

Während die Peroxidzahl signifikant durch den Einsatz von Tocopherylacetat anstieg, sank der Abbau der Peroxide durch die Messung im Ranzimat bei höherer Konzentration ab. Der OSI lag bei MU8 und MU9 über jenem der Mustermargarine MU1 ohne Tocopherylacetat (Abb. 31). Mögliche Gründe für die Erhöhung des OSI in Margarinen zeigten Kirkhus et al. (2015). In ihrer Analyse hatte Margarine im Vergleich zu Öl einen höheren OSI, was sie durch das enthaltene Wasser begründeten. Sie schlugen vor, dass flüchtige Prooxidantien mit dem enthaltenen Wasser während der Erhitzung im Ranzimaten bei 160°C verdampften. Durch diese Verdampfung wurden folglich während der Messung weniger flüchtige, niedermolekulare Verbindungen gebildet, wodurch die gemessene Leitfähigkeit im Ranzimat weniger rasch anstieg und die Induktionsperiode verlängert wurde. Der OSI der festen Margarine bei 160°C ($1,30 \pm 0,18$ h) war signifikant höher als jener von Rapsöl ($0,33 \pm 0,05$ h). Die Verdampfung der Wasserphase in der Margarine konnten sie auch durch die höhere Gewichtsabnahme in der Margarine als

im Öl bestätigen. Mögliche Gründe für die von Kirkhus et al. (2015) beobachtete Erhöhung der Induktionszeit bei der Messung der oxidativen Stabilität im Ranzimat könnte ein Destillationseffekt, wodurch flüchtige oxidierte Verbindungen und freie Radikale mit Wassertröpfchen verdampft wurden, oder die Tatsache, dass Wasser mit Hydroperoxiden Wasserstoffbrücken bilden konnte, wodurch der Abbau der Hydroperoxide verhindert wurde, gewesen sein (Kirkhus et al. 2015).

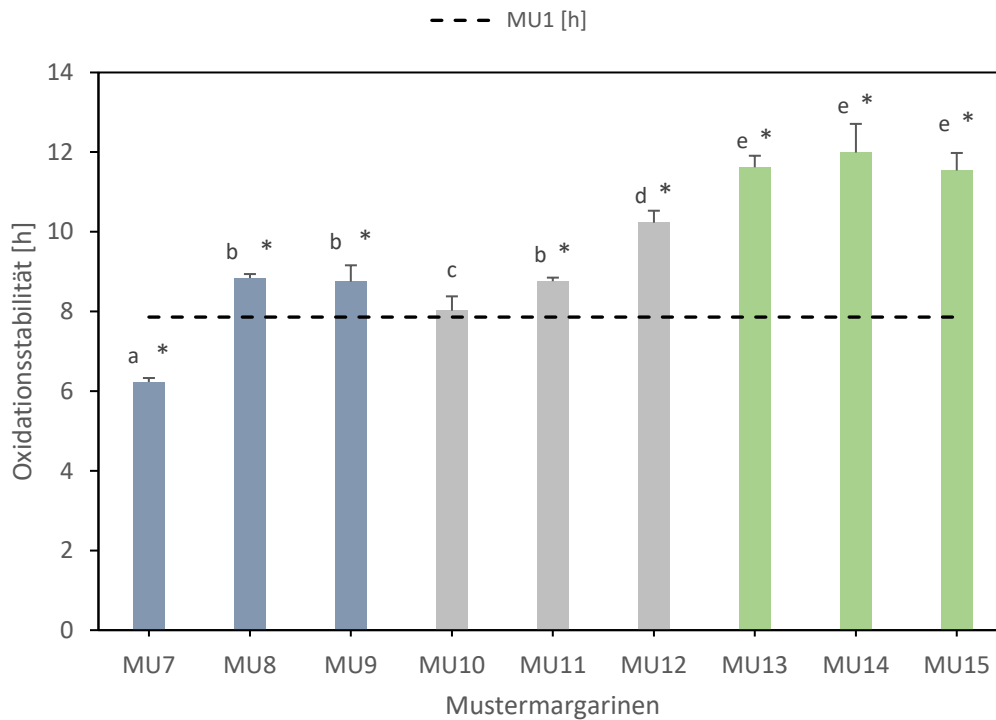


Abbildung 31: OSI (h) Werte der Mustermargarinen MU7-MU15. MU7-9 enthielten aTA in der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. MU10-12 enthielten RE in der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. MU13-MU15 enthielten GE in der Standardkonzentration, -20% und +20% der Standardkonzentration. Darstellung der Daten in MW + SD (n = 4). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Antioxidantien, Sterne zeigen statistische Signifikanz zu MU1 ohne Antioxidans (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test).

Die Peroxidzahl stieg beim Einsatz von Rosmarinextrakt in der Standardkonzentration (MU10) leicht auf $1,93 \pm 0,08$ meq O_2 /kg Fettphase im Vergleich zur Margarine ohne Antioxidans ($1,64 \pm 0,14$ meq O_2 /kg Fettphase) an (Abb. 30). Deutlich erkennbar ist, dass bei der Zugabe von -20% RE (MU11) und +20% RE (MU12) die POZ signifikant auf $1,06 \pm 0,13$ meq O_2 /kg Fettphase und $0,86 \pm 0,04$ meq O_2 /kg Fettphase sank. Eine Änderung der Standardkonzentration an Rosmarinextrakt in der Margarine führte somit zu einer

signifikanten Senkung der POZ ($p < 0,05$). Der gleiche Effekt konnte bei der Oxidationsstabilität gezeigt werden, der OSI stieg bei MU12 auf $10,23 \pm 0,30$ h an (Abb.31). Die Oxidationsstabilität ist bei Zugabe von Rosmarinextrakt höher als bei der Mustermargarine ohne Antioxidans ($7,86 \pm 0,09$ h) (Abb. 31).

Die in Rosmarinextrakt enthaltenen phenolischen Diterpene Carnosinsäure und Carnosol zeigten starke antioxidative Wirksamkeit und verhindern die Bildung von Hydroperoxiden, indem sie als Metallchelatoren oder Radikalfänger wirken können. Bubonja-Sonje et al. (2011) untersuchten die antioxidative und antilisterale Aktivität von Polyphenolen in Olivenöl, Rosmarinextrakt und Kakao. Mittels 2,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Essay konnten sie zeigen, dass Rosmarinextrakt in der Konzentration von 1mg/ml zur höchsten Radikalfängeraktivität (engl. radical scavenging activity, RSA) im Vergleich zu Olivenöl und Kakao führte. Das DPPH Essay verwendeten sie, um die Radikalfänger-Fähigkeit antioxidativ wirksamer Substanzen zu testen und deren antioxidative Aktivität in Lebensmitteln zu evaluieren. Die RSA lag bei Rosmarinextrakt bei 81,60%, während die Polyphenolextrakte aus Kakao und Olivenöl nur eine geringere antioxidative Wirkung zeigten. Carnosinsäure, das in Rosmarinextrakt am häufigsten vorkommende Polyphenol, zeigte verglichen mit Epicatechin und Hydroxytyrosol ebenfalls die höchste antioxidative Aktivität, mit 77,30% RSA, an (Bubonja-Sonje et al. 2011).

Bei den Mustermargarinen mit Grünteeextrakt in der Standardkonzentration und der um -20% verringerten Konzentration konnte die signifikant kleinste POZ nachgewiesen werden. MU13 und MU14 unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von allen anderen Antioxidantien enthaltenden Mustermargarinen. Die POZ sank im Vergleich zur Mustermargarine ohne Antioxidans von $1,64 \pm 0,14$ meq O_2 /kg Fettphase auf $0,58 \pm 0,01$ meq O_2 /kg Fettphase (MU13) und $0,59 \pm 0,04$ meq O_2 /kg Fettphase (MU14). Bei der Zugabe von Grünteeextrakt 20% über der Standardkonzentration kam es zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg auf $4,41 \pm 0,44$ meq O_2 /kg Fettphase (Abb. 30).

Während die POZ von der Konzentration des Grünteeextrakts in den Margarinen abhing, unterschieden sich die OSI-Werte der Margarinen mit Grünteeextrakt nicht signifikant voneinander. Alle Margarinetypen mit GTE hatten unter den getesteten Margarinetypen

mit Antioxidantien die signifikant höchste Oxidationsstabilität von $11,62 \pm 0,29$ h bei MU13, $11,99 \pm 0,72$ h bei MU14 und $11,54 \pm 0,44$ h bei MU15 (Abb. 31).

Grünteextrakt wirkt aufgrund der enthaltenen Polyphenole Epicatechin (EC), Epicatechin-3-gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) antioxidativ. Der verwendete Grünteextrakt enthält laut Hersteller Danisco 20% Catechine, die genaue Zusammensetzung der Catechine ist unbekannt. Die antioxidative Wirkung von Grünteextrakt konnten Chen et al. (1998) zeigen, da Grünteextrakt im Vergleich zu Rosmarinextrakt stärker wirksam ist in der Verringerung der O₂-Aufnahme und der Oxidation von Linolsäure und α -Linolensäure in Rapsöl, Schweinschmalz und Hühnerfett (Chen et al. 1998). Huang und Frankel (1997) zeigten auf, dass die antioxidative Wirksamkeit von Grüntecatechine von dem sie umgebenden Lipidsystem abhängen kann. Beim Einsatz von 140 μ M Grüntecatechinen in für 16 Tage bei 50°C erhitztem Maisöl führten die Catechine zur Verringerung der Hydroperoxidbildung. Die Catechine Gallussäure, Epicatechingallat, Epigallocatechingallat und Epigallocatechin zeigten in der Verringerung der Hydroperoxidbildung eine höhere antioxidative Wirkung im Vergleich zu Pyrogallol und Epicatechin. Jedoch zeigten die Grüntecatechine beim Einsatz von 5 und 20 μ M in einer bei 50°C für 4 Tage erhitzten Maisöl-in-Wasser-Emulsion eine prooxidative Wirkung, was zu einer Erhöhung der Peroxidzahl führte. Dabei stieg der prooxidative Effekt mit der Konzentration der Catechine in der O/W-Emulsion an. Beim Einsatz in bei 50°C oxidierten Liposomen basierend auf Soya Lecithin zeigten die Grüntecatechine wiederum eine antioxidative Wirkung. Die verbesserte antioxidative Aktivität der Catechine in Liposomen im Vergleich zur prooxidativen Wirkung in O/W-Emulsionen begründeten Huang und Frankel (1997) durch die höhere Affinität der polaren Catechine zur polaren Lecithin-Bilayer der Liposome, wodurch sich ihre antioxidative Aktivität erhöhte. (Huang und Frankel 1997).

Beim Einsatz des wasserlöslichen Grünteextrakts in W/O-Emulsionen kann angenommen werden, dass die Catechine im Inneren der dispergierten Wassertropfen vorliegen. Dieser Effekt konnte in der Mustermargarine MU14 gezeigt werden. Diese Margarine hatte von allen Mustermargarinen die höchste Mobilität im Interface, mit $T_R = 33,2$ (Tab. 16, Anhang). Der geringste Gehalt an GTE führte zur geringsten Blockade im

Interface, wodurch Übergangsmetalle in die Grenzschicht gelangen konnten und die Bildung von Hydroperoxiden in der Fettphase, katalysiert durch Metallionen, abnahm.

Die prooxidative Wirkung konnte in der signifikanten Erhöhung der POZ (Abb. 30) im Vergleich zu MU1 ohne Antioxidans gezeigt werden. In in-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte phenolische Verbindungen prooxidativ auf Desoxyribose, DNA und Glutaminsynthetase wirken können, indem sie mit Metallionen reduzieren und so die Bildung von Peroxiden und freien Radikalen erhöhen (Decker 1997). Einen ebenfalls prooxidativen Effekt der Grünteecatechine konnten Azam et al. (2004) zeigen. Polyphenole reduzierten Cu(II) zu Cu(I), was zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Hydroxylradikale, führte. Die Fähigkeit von EC und EGCG, Hydroxylradikale bei Anwesenheit von Cu(II) zu generieren, wurde durch die Freisetzung von Thiobarbitursäure aus dem Abbau von DNA durch Hydroxylradikale gezeigt. Dabei führte die Erhöhung der EC und EGCG Konzentration zu einer Erhöhung der Hydroxylradikalbildung. (Azam et al. 2004). Folglich kann angenommen werden, dass der hohe Gehalt an Grünteextrakt zur Reduzierung des enthaltenen Kupfers (Tabelle 16, Anhang) führte, wodurch reaktive Sauerstoffspezies entstanden, welche die Bildung von Hydroperoxiden beschleunigten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Grünteextrakt den größten antioxidativen Effekt auf Margarinen aufweist, sofern der Extrakt in der Standardkonzentration 0,2% oder in der um -20% verringerten Konzentration (0,16% an der Gesamtmargarine) verwendet wird. Da durch die Verringerung der Menge an Grünteextrakt die oxidative Stabilität der Margarinen gleich blieb, jedoch eine Kostenersparnis erwartet werden kann, wurde in den folgenden Margarinen Grünteextrakt in der Menge von 0,16% eingesetzt.

4.3.3 Auswirkungen einzelner Zutaten

Als folgende Schritte wurden den Margarinen zusätzlich zu Emulgator 1 und Grünteextrakt Zutaten, welche typisch für den Einsatz in Margarineprodukten sind, einzeln zugefügt, um die individuellen Auswirkungen der Zutaten auf die oxidative Stabilität der Margarinen zu untersuchen.

4.3.3.1 pH-Wert & Zitronensäure

Zitronensäure (E330) wurde als 0,1%-Lösung zur Wasserphase der Margarine zugesetzt. Daraus ergibt sich ein Endgehalt von 0,01% Citronensäure an der gesamten Margarine. Citronensäure wird bei Margarinen eingesetzt, um den pH-Wert zu senken, wodurch die Haltbarkeit der Produkte verlängert werden kann und die Luftigkeit von Teigen erhöht werden kann (Gerstenberg Kirkeby 2007).

Die Verringerung des pH-Werts in den Mustermargarinen wird in Abbildung 32 deutlich. Dabei wird ersichtlich, dass nicht nur die Zugabe von Citronensäure den pH-Wert der Wasserphase der Margarine verringerte, sondern auch Grünteeextrakt. Grünteeextrakt wurde in Pulverform in der Wasserphase gelöst. Obwohl vom Hersteller DuPont nicht angegeben, ist es wahrscheinlich, dass Citronensäure als Säuerungsmittel eingesetzt wurde, und so der pH-Wert absank. Lediglich der Einsatz der Trägersubstanz NaCl zur Gewährleistung der besseren Löslichkeit und Wirksamkeit des Extraktes wurde vom Hersteller bestätigt. Die Stabilität der in Grünteeextrakt enthaltenen Catechine ist vom pH-Wert der Lösung abhängig, weshalb ein Zusatz von Säuerungsmitteln denkbar ist. Die Catechine zeigten höhere Stabilität in sauren Lösungen ($\text{pH} < 4$) als in basischen ($\text{pH} > 8$), wo sie rasch in ihre weniger wirksameren Isomere umgesetzt wurden (Senanayake 2013).

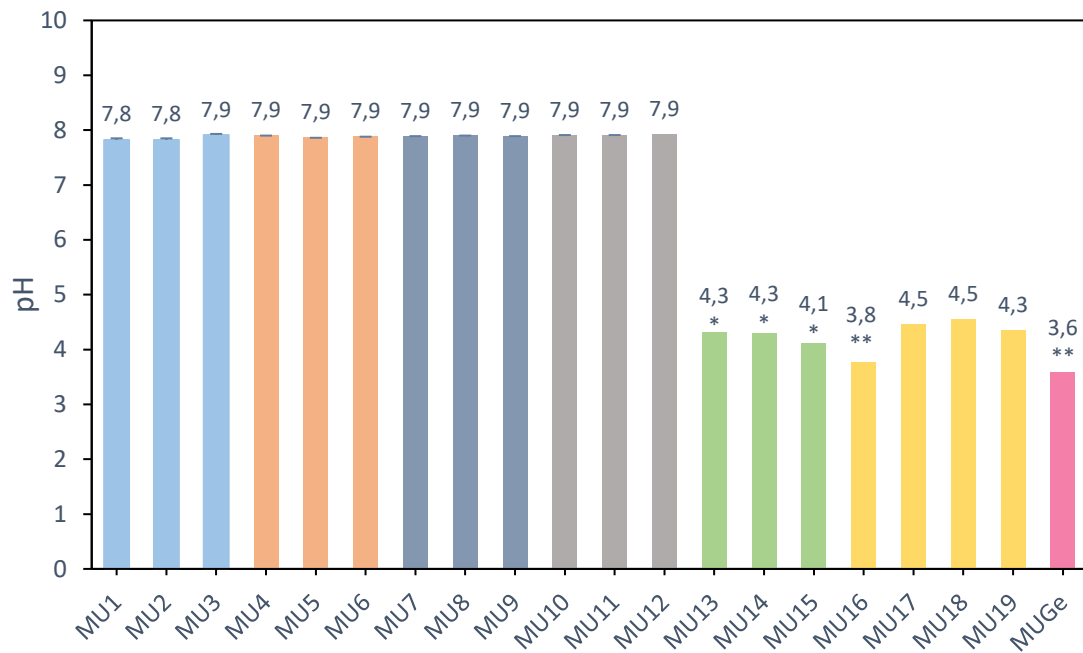


Abbildung 32: pH-Wert der Mustermargarinen. Angabe der Ergebnisse in MW + SD (n=4). Mit Stern gekennzeichnete Daten zeigen eine statistische Signifikanz zu MU1, Kennzeichnung mit 2 Sternen zeigt eine statistische Signifikanz zu MU14 (GTE allein) (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test).

Die Zugabe der Citronensäure führte nicht nur zu einer signifikanten Veränderung des pH-Wertes im Vergleich zu MU14 (Abb. 32) sondern auch zu einer signifikanten Erhöhung der POZ von $0,59 \pm 0,04$ meq O_2 /kg Fettphase (MU14) auf $1,21 \pm 0,10$ meq O_2 /kg Fettphase ($p < 0,05$) (Abb. 33).

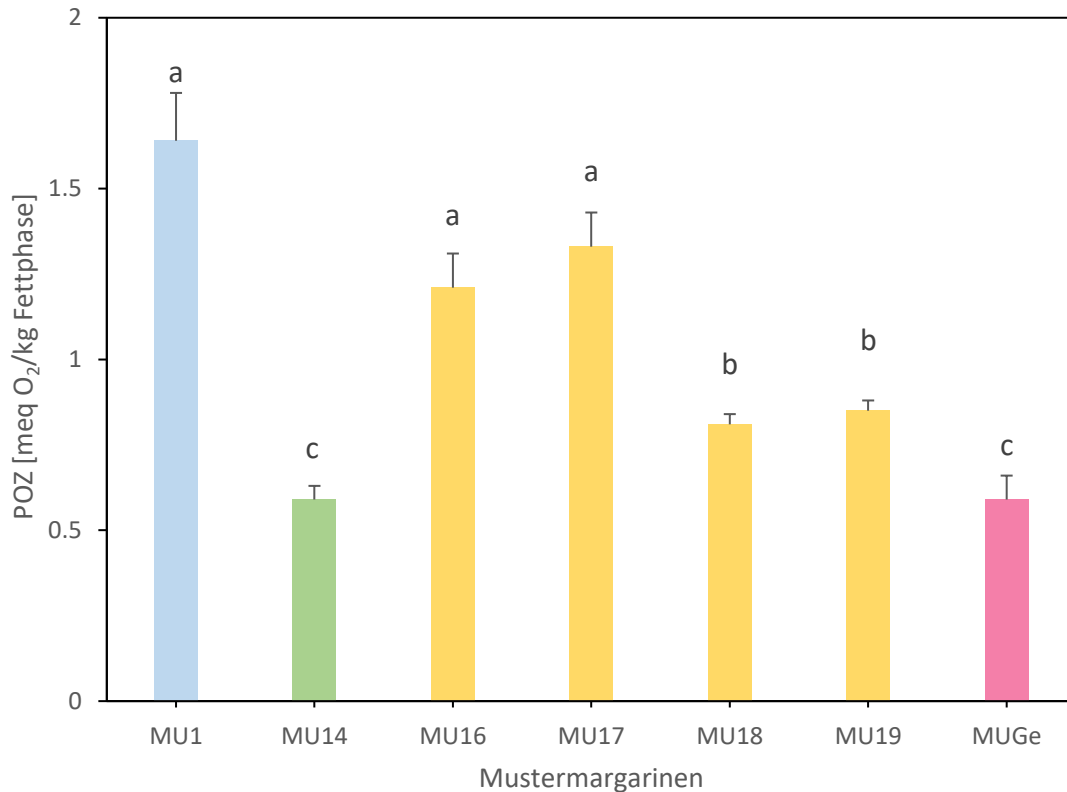


Abbildung 33: POZ (meq O₂/kg Fettphase) der Mustermargarinen MU1 (E1 Std.), MU14 (GTE -20%), MU16 (Citronensäure), MU17 (Beta-Carotin), MU18 (Aroma), MU19 (NaCl) und MUGe (alle Zutaten, erhitzt). Darstellung der Daten als MW + SD (n=4). Unterschiedliche Buchstaben stellen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mustermargarinen dar (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test).

Durch die Zugabe von Citronensäure in der Mustermargarine kam es zu einer deutlichen Verringerung der Mobilität T_R von 33,2 auf 2,02. Die Erhöhung der Peroxide kann folglich durch die verringerte Durchlässigkeit des Interface begründet werden, wodurch sich Übergangsmetalle nicht in das Interface einlagern konnten und als Prooxidantien in der Ölphase wirkten. Eine Erhöhung der Lipidoxidation bei verringertem pH-Wert und die daraus resultierende höhere Löslichkeit von Metallionen konnte in O/W-Emulsionen nachgewiesen werden. In O/W-Systemen gelangten so in der Wasserphase vorliegende Prooxidantien einfacher durch das Interface in die Nähe der Öltröpfchen (Mei et al. 1998). Wang et al. (2008) konnten außerdem zeigen, dass die Abnahme des pH-Werts von 7 auf 3 zu einer höheren Anziehung der Metallionen an die Öltröpfchen führte (Wang und Wang 2008). Da in der Mustermargarine Eisen ($2,41 \pm 0,43$ mg/kg) und Kupfer ($0,066 \pm 0,020$ mg/kg)

in der Wasserphase vorkamen, kann dies als ein weiterer Grund für die Erhöhung der Peroxidzahl angenommen werden.

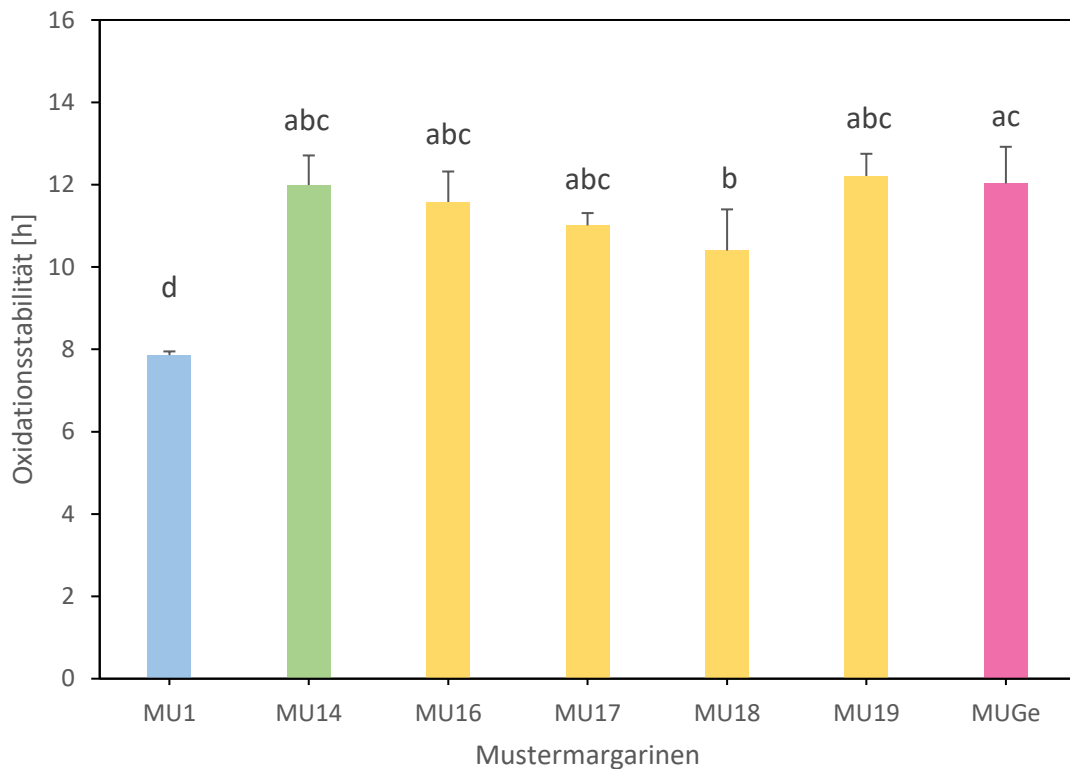


Abbildung 34: OSI (h) Werte der Mustermargarinen MU1 (E1 Std.), MU14 (GTE -20%), MU16 (Citronensäure), MU17 (Beta-Carotin), MU18 (Aroma), MU19 (NaCl) und MUGe (alle Zutaten, erhitzt). Darstellung der Daten als MW + SD (n=4). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mustermargarinen an (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test).

Die Zugabe von Citronensäure und die Verringerung des pH-Werts führte zu keiner signifikanten Veränderung der Oxidationsstabilität der Mustermargarine verglichen zu MU14. Aus den Daten in Abbildung 34 kann geschlossen werden, dass die Zugabe von Zitronensäure zu keiner signifikanten Erhöhung sekundärer Oxidationsprodukte, deren flüchtige Abbauprodukte im Ranzimat detektiert wurden, führte. Eine mögliche Begründung der gleichbleibenden Oxidationsstabilität bei steigender Peroxidzahl kann die während dem Erhitzen im Ranzimat auftretende Verdampfung flüchtiger Prooxidantien, wie freie kurzkettige Fettsäuren, mit der Wasserphase, wie dies durch Kirkhus et al. (2015) beschrieben wurde, sein (Kirkhus, et al. 2015).

4.3.3.2 Beta-Carotin

Der Farbstoff β -Carotin (E160a) wurde in Form einer 0,01%-Farblösung in Rapsöl in der Konzentration von 0,001% β -Carotin an der Gesamtmargarine eingesetzt um die natürliche Färbung von Butter zu imitieren (Gerstenberg Kirkeby 2007).

Durch Zugabe der β -Carotin Lösung stieg die POZ signifikant von $0,59 \pm 0,04$ meq O_2 /kg Fettphase auf $1,33 \pm 0,10$ meq O_2 /kg Fettphase an ($p < 0,05$). Die prooxidative Wirkung von β -Carotin kann auf die Instabilität der Carotinoide zurückgeführt werden. So konnten Zeb et al. (2013) zeigen, dass in Ölen, zu denen β -Carotin zugesetzt wurde und welche für 14 h bei 110°C erhitzt wurden, die enthaltenen Carotine in Verbindungen zerfielen, welche prooxidativ wirkten und so zu einer Erhöhung der POZ führten. Da der Großteil der Zerfallsreaktionen in den ersten 5 h des Versuchs stattfand, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Erhitzung der vorliegenden Mustermargarine bei 80°C für 1 h ebenfalls ein Teil der Carotine oxidiert wurde, wodurch die POZ in der Mustermargarine anstieg (Zeb und Murkovic 2013).

Obwohl die Zugabe von Beta Carotin zu einer signifikanten Erhöhung der Peroxidzahl in der Margarine MU17 verglichen mit MU14 führte, sank die oxidative Stabilität, gemessen im Ranzimat als OSI, nicht signifikant ab. Derselbe Effekt konnte auch in MU16, MU18, MU19 und MU20 gezeigt werden und kann auf die Verdampfung volatiler Prooxidantien durch die Wasserphase begründet werden (Kirkhus, et al. 2015).

4.3.3.3 Aroma

Butteraromen werden in Margarineprodukten zur Nachahmung des Geschmacks von tierischer Butter eingesetzt (Gerstenberg Kirkeby 2007). Beim Aroma, welches in Margarine MU18 eingesetzt wurde handelte es sich um Butteraroma des Herstellers Firmenich, welches nach der Verordnung (EG) Nr.1334/2008 und Deklaration als Aroma eingesetzt werden kann (Europäische Union (EU) 2008).

Das Aroma ist wasserlöslich und wurde daher gemeinsam mit dem Grünteeextrakt in der Wasserphase zur Produktion der Margarine beigemischt. Durch die Zugabe des Butteraromas erhöhte sich die Peroxidzahl signifikant von $0,59 \pm 0,04$ meq O_2 /kg Fettphase (MU14) ohne Aroma auf $0,81 \pm 0,03$ meq O_2 /kg Fettphase mit Aroma ($p < 0,05$) (Abb. 33). Die Peroxidzahl zeigte dabei unter den Mustermargarinen mit den Einzelzutaten die zweithöchste Erhöhung der Peroxidzahl in den Mustermargarinen an. Die Oxidationsstabilität verringerte sich hingegen nicht durch die Zugabe des Aromas (Abb. 34). Die Erhöhung der Peroxidzahl durch das Butteraroma kann auf mögliche Verunreinigungen des Produktes zurückgeführt werden. Durch die prooxidative Wirksamkeit von Metallionen kann die signifikante Erhöhung der Peroxidzahl nach Zugabe des Butteraromas begründet werden (McClements und Decker 2000). Da das Aroma laut dem Hersteller Firmenich Rapsöl als Zutat enthielt, kann auch angenommen werden, dass das im Aroma enthaltene Öl bereits oxidierte und zur Erhöhung der Peroxidzahl in MU18 führte.

Ähnlich wie in MU16, MU17, MU19 und MU20 führte die Zugabe von Butteraroma zu keiner Abnahme des OSI im Vergleich zu MU14. Laut Kirkhus et al. (2015) kann die Wasserphase in der Margarine zur Erhöhung des OSI im Vergleich zu Ölen beitragen, da flüchtige Prooxidantien verdampfen (Kirkhus, et al. 2015).

4.3.3.4 Salz

Eine weitere Zutat der Wasserphase ist Natriumchlorid ($NaCl$), welches wegen seiner geschmacksgebenden und antimikrobiellen Eigenschaften in Margarineprodukten eingesetzt wird. Der Anteil von 0,1% $NaCl$ in der Gesamtmargarine entspricht dem europäischen Durchschnitt von Salzgehalt von Margarinen. Dieser variiert weltweit von 1% in Europa zu bis zu 3% in Südamerika (Gerstenberg Kirkeby 2007).

Durch die Zugabe von $NaCl$ steigt die POZ der Mustermargarine signifikant von $0,59 \pm 0,04$ meq O_2 /kg Fettphase (MU14) auf $0,85 \pm 0,03$ meq O_2 /kg Fettphase an ($p < 0,05$) (Abb. 33). Der Effekt von $NaCl$ auf die Lipidoxidation und die Stabilität von Emulsionen bleibt aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnissen von Studien unklar. Während

Studien auf die antioxidative Wirkung von NaCl in O/W-Emulsionen hindeuteten (Shao und Tang 2014), zeigten einige Studienergebnisse ebenso prooxidative Effekte in O/W-Emulsionen auf (Osborn-Barnes und Akoh 2003; Mei et al. 1998). Ein Grund für die prooxidative Wirkung von NaCl in Emulsionen kann einerseits die Erhöhung der Wasserlöslichkeit und der katalytischen Aktivität von Metallionen durch Chloridionen sein (Kanner et al. 2016). Weiters können in Salzen vorkommende Gegenionen (Na^+ und Cl^-), welche an geladene Lipidtröpfchenmembranen binden, die Bindung von Metallionen an diese Oberflächen beeinflussen. Die strukturelle Anordnung von Emulgatoren in der Grenzschicht von O/W-Emulsionen kann durch die Bindung von Salzen verändert werden, wodurch Pro- oder Antioxidantien leichter in Kontakt mit den Lipidtröpfchen kommen können (Liu et al. 2019).

Neben der Vielzahl von möglichen Einflüssen von NaCl auf die Lipidoxidation von Emulsionen, konnte auch der Einfluss auf die Beschaffenheit der Grenzfläche von O/W-Emulsionen gezeigt werden. Liu et al. (2019) zeigten, dass bei Erhöhung des NaCl-Gehalts von 0 auf 0,8% der T_R -Wert und damit die Beweglichkeit und Durchlässigkeit des Interface anstiegen. Durch die Lockerung der Interface-Membran konnten vermehrt Prooxidantien aus der Wasserphase in die Öltröpfchen diffundieren. Durch die höhere Mobilität erhöhten sich die Massentransferprozesse zwischen den beiden Phasen der Emulsion, wodurch der Kontakt und Austausch von prooxidativ wirksamen Molekülen zwischen der Wasser- und Ölphase anstieg (Liu et al. 2019).

Auch bei Zugabe von NaCl wurde keine Abnahme des OSI im Vergleich zu MU14 gemessen (Abb. 34). Gleich wie bei MU16, MU17, MU18 und MU19 kann dieser Effekt durch die Verdampfung der flüchtigen Substanzen mit der Wasserphase begründet werden (Kirkhus, et al. 2015).

4.3.4 Kombinatorische Effekte

Die Auswirkungen der Kombination aller Einzelzutaten inklusive Grünteeextrakt konnten in Mustermargarine „MUGe“ gezeigt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Kombination der typischen Einzelzutaten zu einer signifikanten Verringerung der Peroxidzahl in der Mustermargarine MUGe im Vergleich zu den Margarinen MU16, MU17, MU18 und MU19 führte (Abb. 33). Sie konnte auf den Wert der Mustermargarine

gesenkt werden, in der nur Grünteeextrakt eingesetzt wurde (MU14). Die Peroxidzahl lag wie bei MU14 bei $0,59 \pm 0,07$ meq O_2 /kg Fettphase (Abb. 33). Die Erhöhung der oxidativen Stabilität der Mustermargarine kann durch kombinierende Effekte aus den Einzelzutaten resultieren. Die Oxidationsstabilität (h) ergab bei Margarine „MUGe“ einen ähnlichen Wert von $12,03 \pm 0,89$ h im Vergleich zu $11,99 \pm 0,72$ h in MU14 (Abb. 34).

Die Peroxidzahl verringerte sich im Vergleich zur Margarine, in der nur Emulgator (E1) in Standardkonzentration eingesetzt wurde, einerseits durch den Einsatz von Grünteeextrakt und andererseits durch den Einsatz aller Einzelkomponenten, welche typisch für die Rezeptur einer Margarine sind, signifikant ($p < 0,05$). Auch die Oxidationsstabilität erhöhte sich signifikant durch den Einsatz von GTE und durch die Zugabe aller Zutaten, verglichen mit MU1 (Abb. 33).

Die Erhöhung der oxidativen Stabilität in der Margarine MUGe kann durch die Kombination aus niedrigem pH-Wert durch Zugabe der Citronensäure und die Chelatbildung von GTE und Citronensäure mit prooxidativ wirksamen Übergangsmetallen in der Wasserphase begründet werden (Senanayake 2013; Yi et al. 2015). Die Verringerung des pH-Wertes auf 3,58 führt zu einer Erhöhung der Stabilität der Grüntee catechine (Senanayake 2013). Die Beweglichkeit im Interface T_R sank von 2,02 beim Einsatz von Citronensäure auf 1,25 in der Margarine MUGe, was auf eine dicht gepackte Grenzschicht zwischen Wasser- und Ölphase hindeuten kann (Liu et al. 2019). Obwohl Mustermargarine MUGe einen höheren Eisengehalt als alle anderen Mustermargarinen mit den Einzelzutaten aufwies ($3,42 \pm 0,33$ mg/kg, Tab. 17, Anhang), kam es zu keiner Erhöhung der Peroxidzahl und zu keiner Beschleunigung der Lipidoxidation. Dies kann auf die Fähigkeit des GTE zurückgeführt werden, mit Eisen Chelate zu bilden zurückgeführt werden (Senanayake 2013). Durch die Bildung von Chelatkomplexen mit den Übergangsmetallen Eisen und Kupfer durch GTE können diese aus der Nähe der Tröpfchenoberfläche entfernt werden, wodurch sie nicht in die Ölphase gelangen und Lipidoxidation fördern können (McClements und Decker 2000). Obwohl Citronensäure zur Verbesserung der Luftigkeit der Teige eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass Citrate neben EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und

DFO (Deferoxamin) auch als natürliche Chelatbildner in W/O-Emulsionen eingesetzt werden können und Übergangsmetalle binden können (Yi et al. 2015).

Zusätzlich zur Bestimmung der Peroxidzahl und der Oxidationsstabilität (OSI) wurden auch Epoxide in der Margarine MUGe bestimmt. Ähnlich wie bei der Lagermargarine LP3, auf deren Rezeptur die Produktion von Margarine MUGe basierte, wurden auch in der Mustermargarine nur Epoxide gebildet. Zum Vergleich der Auswirkung Langzeitlagerung wurde der Epoxidgehalt der Mustermargarine MUGe im unerhitzten Zustand und nach der Erhitzung bei 80°C für eine Stunde ermittelt (Tabelle 16, Anhang). Wie bei Lagermargarine LP3 nach 180 Tagen konnten auch in der Mustermargarine drei Epoxide detektiert werden: 54:1 [O], 54:2 [O] und 54:3 [O]. Alle drei Epoxidwerte stiegen, wie bei LP3 während der 180 Lagertage, durch die Erhitzung der Margarine MUGe an. Das Epoxid 54:1 [O] erhöhte sich von $2,30 \pm 0,91 \mu\text{M}$ auf $3,12 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Die Epoxide 54:2 [O] und 54:3 [O] stiegen von $2,11 \pm 1,00 \mu\text{M}$ auf $3,23 \pm 0,24 \mu\text{M}$ und von $0,60 \pm 0,36 \mu\text{M}$ auf $1,05 \pm 0,08 \mu\text{M}$. Obwohl MUGe Grünteeextrakt enthält, und eine geringe POZ mit $0,59 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ Fettphase hatte, konnten Epoxide detektiert werden. Dies zeigt wiederum, dass die POZ als alleinige Analysemethode wenig Aussagekraft hat, da die Lipidoxidation unterschätzt werden könnte. Der hohe Gehalt an Epoxiden im Vergleich zur niedrigen Peroxidzahl von $0,0003 \mu\text{M}$ in MUGe zeigte, dass Epoxide in MUGe zu Beginn nicht als sekundäre Oxidationsprodukte, sondern durch alternative Reaktionsmechanismen gebildet wurden. Schaich et al. (2017) wiesen darauf hin, dass Epoxide in höheren Mengen gebildet werden können als Hydroperoxide. Der höhere Gehalt an Epoxiden als Hydroperoxiden in der Mustermargarine MUGe weist darauf hin, dass die Bindung von Epoxiden an Doppelbindungen von Fettsäuren schneller ablief, als die Wasserstoffabstraktion, wodurch Hydroperoxide entstehen. (Schaich et al. 2017). Während der Erhitzung der Margarine konnten Epoxide darüber hinaus als sekundäre Lipidoxidationsprodukte gebildet werden, indem sie sich aus der Umlagerung der gebildeten Alkoxyldradikale formten, was zu einem Anstieg der Epoxide führte (Xia und Budge 2017).

5. Schlussbetrachtung

In der Margarineproduktion des Kooperationspartners Senna Nahrungsmittel GmbH & Co KG werden viele verschiedene Margarinetypen hergestellt, welche sich anhand ihrer Rezeptur maßgeblich voneinander unterscheiden. Die Beurteilung der Lipidoxidation von Margarinen, welche sich in ihrer Fettzusammensetzung voneinander unterscheiden, wurde bis dato in keiner Langzeitlagerstudie durchgeführt. Das oxidative Verhalten unterschiedlicher Margarinetypen ist beim Produzenten der Margarinen von besonderem Interesse, da nur durch das Wissen über die unterschiedlich lange oxidative Haltbarkeit der Produkte das MHD richtig begrenzt werden kann. Im Zuge der Forschungsarbeit wurde die Lipidoxidation von vier Margarinen LP1, LP2, LP3 und LP4 während der Lagerung für 180 Tage bei 15°C im Dunkeln auf die Hypothese, dass die Zusammensetzung der Produkte einen Einfluss auf ihre oxidative Stabilität hat, untersucht. Ziel war es, die oxidative Stabilität der Margarinen während der 8 Messzeitpunkte (T0, T1, T7, T14, T28, T56, T99, T180) zu evaluieren, um das MHD von 198 Tagen zu beurteilen. Der letzte Messzeitpunkt, T180, wurde aufgrund der sechsmonatigen Dauer der Forschungsarbeit gewählt. Obwohl kein gesetzlicher Maximalwert für die POZ von Margarinen festgelegt wurde, gilt dennoch eine POZ von maximal 2 meq O₂/kg Fettphase als inoffizieller, interner Maximalwert in der Firma Senna Nahrungsmittel & Co KG. Dies bedeutet, dass die Peroxidzahl als Standardmethode verwendet wird, um die oxidative Qualität der gelagerten Margarinen zu beurteilen. Im Zuge der Lagerstudie wurde nicht nur der unterschiedliche Verlauf der Lipidoxidation der Margarinen LP1-LP4 untersucht. Es wurden auch weitere Analysemethoden, neben der POZ, herangezogen, um das Ausmaß der Lipidoxidation zu messen.

Die Analyse der Peroxidzahl während der 180 Lagertage ergab, dass in allen Margarinen der interne Maximalwert von max. 2 meq O₂/kg Fettphase überschritten wurde. Während die Peroxidzahl bei LP1 und LP4 mit $2,2 \pm 0,02$ meq O₂/kg Fettphase und $2,73 \pm 0,03$ meq O₂/kg Fettphase nur knapp über den internen Maximalwert stieg, so führte die Lagerung der Margarinen LP2 und LP3 zu mehr als doppelt so hohen und in etwa

doppelt so hohen Peroxidzahlen von $4,76 \pm 0,1$ meq O_2 /kg Fettphase und $3,97 \pm 0,06$ meq O_2 /kg Fettphase. LP2 und LP3 waren zu Beginn der Lagerung bereits stärker oxidiert als LP1 und LP4, was auf ihren höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren als in LP1 und LP4 zurückgeführt werden kann.

Es konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Zusammensetzung der Margarinen einen starken Einfluss auf ihre oxidative Stabilität hat. Wie erwartet oxidierten die Margarinen mit dem höchsten Anteil an ungesättigten Fettsäuren, LP2 und LP3, bereits im Zuge der Produktion und führten schließlich zu den höchsten gemessenen Mengen an Hydroperoxiden (Abb. 14, 15), konjugierten Dienen (Abb. 18, 19), Epoxiden (Tab. 16, Anhang), Hexanal und Aceton (Abb. 26). Die Margarinen LP1 und LP4 zeigten zu Beginn der Lagerung (T0) eine höhere oxidative Stabilität, was durch den hohen Gehalt an gesättigten Fettsäuren begründet werden kann. Im Laufe der Lagerung waren es jedoch dieselben Margarinen, in denen die höchsten prozentualen Anstiege der Peroxidzahl und der konjugierten Diene verzeichnet wurden (Tab. 14, Anhang). Die oxidative Stabilität sank prozentual von T0 bis T180 in LP1 und LP4 am stärksten. Dieser rasche prozentuale Anstieg beziehungsweise Abfall der Oxidationsprodukte kann auf den hohen Gehalt an MUFAs in den Margarinen zurückgeführt werden. Da sie insgesamt jedoch einen niedrigeren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aufwiesen, lag die Menge an epoxidierten Triglyceriden unter dem Detektionslimit. Auch der Acetongehalt lag unter den in LP2 und LP3 gemessenen Werten.

Aufgrund des hohen Gehalts an ungesättigten Fettsäuren in LP2 und LP3 und damit verbundenen hohen Ausbildung unangenehmer, flüchtiger Aromen empfiehlt sich, durch den Einsatz von Antioxidantien, die Lipidoxidation zu verlangsamen, um so die Qualität der Produkte bis zum Erreichen des MHDs gewährleisten zu können.

Obwohl der Einfluss von Einzelzutaten wie Antioxidantien, Emulgatoren und NaCl auf O/W-Emulsionen bereits Gegenstand vieler Studien war, mangelt es an Studien, welche den Einfluss dieser Einzelzutaten auf die oxidative Stabilität von W/O-Emulsionen, wie Margarine, untersuchen. Im Zuge des zweiten Teils der Forschungsarbeit wurde somit Anhand der Hypothese, dass Einzelzutaten wie Emulgatoren, Antioxidantien, Zitronensäure, NaCl, Farbstoffe und Aromen sowie deren Kombination die

Lipidoxidation von Margarinen beeinflussen können, Margarinemuster erstellt, in denen die Zutaten einzeln eingesetzt wurden. Die Mustermargarinen wurden in Anlehnung an die Rezeptur von Margarine LP3 auf der Pilotanlage gefertigt. Zur Beurteilung der Lipidoxidation wurden die POZ und die Messung des oxidativen Stabilitätsindex (OSI) herangezogen. Darüber hinaus wurden bei Margarine MUGe oxTAGs bestimmt, diese Analyse wurde jedoch aufgrund der hohen Probenanzahl der Lagerstudie nur bei MUGe durchgeführt. Für die Messung der POZ sowie der oxTAGs wurden alle Margarinen für 1h bei 80°C erhitzt, um die Lipidoxidation zu beschleunigen. Für die Messung am Ranzimat wurden die Proben nicht erhitzt, da sie im Rahmen des oxidativen Stresstests im Ranzimat bei 121,6°C erhitzt wurden. Nach dem Einsatz einer Zutat wurden anhand der Analyseergebnisse der POZ und OSI die besten Zutaten ausgewählt, welche sodann in den folgenden Margarinemustern integriert wurden. Ziel war es, einerseits den Einfluss der Einzelzutaten zu untersuchen und andererseits eine verbesserte Rezeptur der Margarine LP3 zu kreieren, welche eine hohe oxidative Stabilität aufweist.

Beim Test zweier E471 Emulgatoren, welche auf Palmöl (E1) und Sonnenblumenöl (E2) basierten, zeigte E1 eine gleichbleibende oxidative Stabilität. E1 wurde ebenfalls in LP3 eingesetzt, weshalb alle folgenden Margarinemuster (MU7-MUGe) mit dem Emulgator in Standardkonzentration gefertigt wurden.

Obwohl LP3 kein Antioxidans enthielt, wurden in den folgenden Mustern unterschiedliche Antioxidantien getestet, um durch ihren Einsatz eine mögliche Steigerung der oxidativen Qualität der Margarine zu testen. Es wurden DL- α -Tocopherylacetat, Rosmarinextrakt und Grünteeextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Dabei zeigte DL- α -Tocopherylacetat eine prooxidative Wirkung, während Rosmarinextrakt und Grünteeextrakt antioxidativ wirkten. Die höchste Steigerung der oxidativen Stabilität konnte durch den Einsatz des wasserlöslichen Grünteeextrakts gezeigt werden. Da Grünteeextrakt sowohl in der Standardkonzentration als auch in der um 20% verringerten Konzentration von 0,16% an der Gesamtmargarine dieselbe antioxidative Wirkung zeigte, wurden alle folgenden Margarinen (MU16-MUGe) auf Basis des Emulgators E1 in der Standardkonzentration inklusive des Grünteeextrakts in der um 20% verringerten Konzentration hergestellt.

Zu guter Letzt wurde der Einfluss der Zutaten Citronensäure, Beta-Carotin, Butteraroma und NaCl einzeln in Form der Mustermargarinen MU16-MU19 getestet. Dabei stieg bei Zugabe aller Einzelzutaten die POZ signifikant an, was auf eine Beeinflussung der oxidativen Stabilität der Einzelzutaten schließen lässt. Bei Kombination der Einzelzutaten kam es jedoch zur signifikanten Verringerung der POZ, was auf kombinatorische Effekte durch die Bildung von Chelatkomplexen mit prooxidativ wirksamen Übergangsmetallen durch Citronensäure und Grünteeextrakt in der Wasserphase geschlossen werden konnte. Durch die Chelatbildung des Grünteeextrakts konnte die Lipidoxidation in der kontinuierlichen Phase signifikant im Vergleich zur Mustermargarine ohne GTE verringert werden. Zur Veranschaulichung der deutlichen Verringerung der Lipidoxidation kann die POZ herangezogen werden. Die Peroxidzahl der Margarine LP3 betrug an T0 $0,86 \pm 0,06$ meq O_2 /kg Fettphase und stieg während der Lagerung auf $3,97 \pm 0,51$ meq O_2 /kg Fettphase an. Die unerhitzte Margarine MUGe inklusive GTE hatte eine POZ von $0,34 \pm 0,02$ meq O_2 /kg Fettphase, und stieg nach der Erhitzung bei 80°C auf nur $0,59 \pm 0,07$ meq O_2 /kg Fettphase an.

Die Erhöhung der oxidativen Stabilität durch den Einsatz von Grünteeextrakt in der Margarine kann als erster Schritt in der Rezeptur- und Qualitätsverbesserung von Margarinen durch den Einsatz von natürlichen Antioxidantien gesehen werden. Neben der Beurteilung durch die POZ sollten weitere Analysemethoden, wie die Bildung von oxTAGs oder die Bildung von Hexanal und Aceton zur Bestimmung der oxidativen Stabilität in den Mustermargarinen herangezogen werden. Zukünftig sollte die antioxidative Wirkung von Grünteeextrakt in weiteren Margarinen, mit unterschiedlicher Fettrezeptur und unterschiedlichem Gehalt an MUFAs und PUFAs, getestet werden. Besonders in Margarinen mit hohem Anteil an ungesättigten Fettsäuren sollte die Anwendung von Antioxidantien getestet werden, um die Lagerqualität der Produkte hinsichtlich ihrer oxidativen Stabilität zu verbessern. Die Erhöhung der oxidativen Lagerqualität der Produkte geht somit Hand in Hand mit der erhöhten Kundenzufriedenheit und dem Vermeiden von „food waste“.

6. Zusammenfassung

Margarine, eine Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsion, erfreut sich im Einsatz in der industriellen Produktion von Backwaren, Gebäck und Keksen aufgrund der Kostenersparnis gegenüber Butter, immer steigender Beliebtheit. Im Vergleich zu W/O-Emulsionen, wurde dem Einfluss unterschiedlichster Faktoren auf die oxidative Stabilität von O/W-Emulsionen höhere Aufmerksamkeit zu Teil. Aufgrund ihres hohen Fettgehalts sind Margarinen besonders anfällig für Lipidoxidation, die Einflüsse und Mechanismen gelten aufgrund des Emulsionsaufbau als sehr komplex. Neben dem Vorkommen von Pro- und Antioxidantien spielt die Fettzusammensetzung eine entscheidende Rolle bei der Lipidoxidation von Margarinen, da ungesättigte Fettsäuren besonders anfällig für Oxidation sind.

Im Rahmen der Forschungsarbeit wurden vier Industriemargarinen (LP1-4), welche sich in ihrer Fettzusammensetzung unterschieden, über 180 Tage bei 15°C gelagert. Trotz unterschiedlicher Rezepturen wurde für alle Margarinen dasselbe Mindesthaltbarkeitsdatum von 198 Tagen angegeben. Viele Firmen definieren außerdem, dass eine maximale POZ von 2 meq O₂/kg Fettphase als Qualitätsparameter eingehalten werden muss. Die erste Hypothese der Arbeit, dass die Zusammensetzung der Margarinen ihre oxidative Stabilität entscheidend beeinflusst, wurde als Basis dafür genommen, die vier Margarinen anhand ihrer Rezeptur miteinander zu vergleichen und die Unterschiede ihrer oxidativen Haltbarkeit hervorzuheben. Die Lipidoxidation der Margarinen LP1-LP4 während der Lagerung bei 15°C wurde an 8 Lagertagen (T0, T1, T7, T14, T28, T56, T99 und T180) anhand der POZ, CD und des OSI bestimmt. Zusätzlich erfolgte die LC-MS Bestimmung der oxTAGs an T0 und T180. Weiters wurde die Entwicklung von flüchtigen, sekundären Oxidationsprodukten wie Aceton und Hexanal von T0 bis T99 mittels HS-SPME-GC/MS bestimmt.

Wie erwartet konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Fettsäurezusammensetzung einen entscheidenden Einfluss auf die oxidative Haltbarkeit der Produkte hat. LP2 und LP3 oxidierten bereits während der Produktion, was zu den höchsten Werten der POZ, CD, oxTAGs, Aceton und Hexanal führte. LP2 und

LP3 enthielten den höchsten Anteil an ungesättigten Fettsäuren von den getesteten Margarinen. Die hohe oxidative Stabilität der Margarinen LP1 und LP4 zu Beginn der Lagerung kann auf den höheren Gehalt an gesättigten Fetten im Vergleich zu LP2 und LP3 zurückgeführt werden. Durch ihren hohen Gehalt an Linolsäure kam es jedoch zu den höchsten prozentualen Anstiegen der POZ und CD, sowie zur höchsten prozentualen Abnahme des OSI. In allen vier Margarinen konnte erstmalig eine Erhöhung des Acetongehalts während der Lagerung gezeigt werden. Dies und auch die Tatsache, dass Aceton in den Margarinen LP1 und LP4 in höherem Ausmaß als Hexanal gebildet wurde, lässt darauf schließen, dass Aceton als möglicher Lipidoxidationsparameter für Margarinen geeignet sein könnte.

Die Lagerstudie vier unterschiedlicher Margarinen zeigte den erwarteten Einfluss der Fettzusammensetzung auf die Lipidoxidation. Darüber hinaus konnten während der Lagerstudie neue wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. (1) Bei Margarinen mit hohem Anteil an ungesättigten Fettsäuren sollten Antioxidantien getestet werden, um ihre oxidative Stabilität zu erhöhen, da sie bereits während der Produktion zur Oxidation neigen. (2) Die POZ allein ist kein aussagekräftiger Parameter in der Bestimmung der Lipidoxidation von Margarinen, da das Ausmaß der Lipidoxidation unterschätzt werden kann. (3) Es sollten weitere Studien mit größeren Margarinemengen für die Anwendbarkeit von Aceton als sekundärer Lipidoxidationsmarker bei Margarinen durchgeführt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, den pro- und antioxidativen Einfluss von Margarinezutaten zu untersuchen. Es wurde die Hypothese erstellt, dass Einzelzutaten einen Einfluss auf die Lipidoxidation von Margarinen haben. Die Prüfung der Hypothese erfolgte durch die Fertigung von Margarinemustern mit Emulgatoren, Antioxidantien, Citronensäure, Beta-Carotin, Butteraroma, und NaCl und anschließende Messung der unerhitzten, frischen Proben am Ranzimat sowie der POZ der für 1 h bei 80°C erhitzten Proben. Als wichtigste Erkenntnis konnte gezeigt werden, dass Grünteeextrakt ein wirksames Antioxidationsmittel in Margarinen darstellt. Durch den Einsatz in der um 20% verringerten Konzentration von Grünteeextrakt (0,16% an Gesamtmargarine) konnte nicht nur dieselbe antioxidative Kapazität wie in der Standardkonzentration (0,20%) gewährleistet werden, die Reduktion der eingesetzten Menge würde in Zukunft

auch mit einer Kostenersparnis einhergehen. Dabei konnte die antioxidative Wirkung auf die Fähigkeit zurückgeführt werden, dass Grünteeextrakt Chelatkomplexe mit Übergangsmetallen bildete, wodurch ihre prooxidative Wirkung in der kontinuierlichen Fettphase verringert wurde. Im Anschluss an die Durchführung weiterer Tests mit Grünteeextrakt in unterschiedlichen Margarinetypen stellte der Extrakt ein Antioxidans mit hohem Potential in der Verbesserung der oxidativen Lagerstabilität von Margarinen dar.

7. Abstract

It's especially because of the cost effectiveness and the high content of unsaturated fatty acids that the interest in the use of margarines in the food industry today is growing in Europe and worldwide. Per definition, margarine can be described as a water-in-oil (W/O)-emulsion, with a minimum of 80% fat by weight. Due to the high fat content, the products are prone to lipid oxidation. As this can cause rancidity and influence customer satisfaction with the products, there is an ongoing search for options to increase the oxidative stability of margarines. However, lipid oxidation in emulsion systems can be a very complex feature with many influencing factors like the fatty acid composition in the fat phase, the interface structure, the absence and presence of pro- and antioxidants in the fat and waterphase or the storage conditions. Thus, the aim of this study was to investigate the impact of different ingredients on the extent of lipid oxidation in four different types of industrial margarine stored at 15°C for 180 days and at 80°C for 1 h. The impact on lipid oxidation was evaluated by analyzing the generation of peroxides, conjugated dienes, epoxides, volatile compounds and by measuring the oxidative stability index (OSI).

As expected from earlier studies regarding lipid oxidation, the progress of lipid deterioration depended on the lipid profile of the fat phase of the margarines, which led to high levels of peroxides, conjugated dienes and epoxides in the samples with the highest percentage of unsaturated fatty acids. Besides hexanal, a commonly detected lipid oxidation marker, acetone was shown, for the first time, to be generated at concentration up to 791 ppb after storage for 99 days. Further analyses with a higher amount of margarine should be carried out to confirm acetone as a possible new indicator for secondary lipid oxidation in margarine.

Among the tested additives, alpha-tocopheryl acetate showed a prooxidative effect, while rosemary and green tea extract showed a decrease in lipid oxidation in the tested margarine, which was treated at 80°C. Especially green tea extract showed the most prominent antioxidant effect, even at less concentration than commonly applied. While combination of green tea extract with citric acid, beta-carotene or NaCl increased lipid

oxidation compared to green tea extract alone, a combination of all ingredients showed a decrease of lipid oxidation to the same level as green tea extract alone. Green tea extract in the dispersed water phase of margarines might chelate transition metals thus lowering the oxidation of the continuous phase in heated margarine. This result leads to the suggestion that green tea extract can be seen as a potential antioxidant in increasing the oxidative stability of margarines.

8. Literaturverzeichnis

- Abbe, M.R.L., S. Stender, C.M. Skeaff, und M. Ghafoorunissa and Travella. 2009. „Approaches to removing trans fats from the food supply in industrialized and developing countries.“ *European Journal of Clinical Nutrition* (63): 50-67.
- Amlendu, P., Q. Ashley, W. Di, Z. Haojiong, T. Mirna, J. David, X. Xiaojun, T. Francis, T. Nongjian, und S. Erica. 2014. „Breath Acetone as Biomarker for Lipid Oxidation and Early Ketone Detection.“ *Global Journal of Obesity, Diabetes and Metabolic Syndrome* (1): 012-019.
- Amri, I.N. 2011. „The lauric (coconut and palmkernel) oils.“ In *Vegetable Oils in Food Technology. Composition, Properties and Uses.*, 169-197. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Azam, S., N. Hadi, N.U. Khan, und S.M. Hadi. 2004. „Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties.“ *Toxicology in Vitro* (18): 555-561.
- Azarbard, M. H., und H. Jelen. 2015. „Determination of Hexanal - an Indicator of Lipid Oxidation by Static Headspace Gas Chromatography (SHS-GC) in Fat-Rich Food Matrices.“ *Food Analytical Methods* (8): 1727-1733.
- Azizkhani, M., und P. Zandi. 2010. „Effects of Some Natural Antioxidant Mixtures on Margarine Stability.“ *Pak. J. Agri. Sci.* 47 (3): 251-257.
- Bannon, Cecil D., Geoffrey J. Breen, John D. Craske , Ngo Trong Hai, Neil L. Harper, and Kerry L. O'Rourke . 1982. "Analysis of Fatty Acid Methyl Esters with High Accuracy and Reliability." *Journal of Chromatography*, 71-89.
- Belitz, H.-D., W. Grosch , und P. Schieberle . 2009. *Lebensmittelchemie*. Berlin - Heidelberg: Springer Verlag .
- Berger, K.G. 1989. „Functionality and interchangeability of fats.“ *Lipid Technology* 1 (2): 40-43.
- BMEL. 2011. „Deutsches Lebensmittelbuch - Leitsätze für Speisefette und Speiseöle.“
- Brühl, L. 2014. „Fatty acid alterations in oils and fats during heating and frying.“ *European Journal of Lipid Science and Techology* (116): 707-715.

- Bravo-Diaz, C., S.R. Romsted, S. Losada-Barreiro, und F. Paiva-Martins. 2017. „Using a pseudophase model to determine AO distributions in emulsions: Why dynamic equilibrium matters.“ *European Journal of Lipid Science and Technology* (119): 1600277.
- Bubonja-Sonje, M., J. Giacometti, und M. Abram. 2011. „Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols.“ *Food Chemistry* (127): 1821-1827.
- BVL. 2011. „Berichte zur Lebensmittelsicherheit.“ (Springer Basel AG).
- Chateris, W., und K. Keogh. 1991. „Fats and oil in table spread.“ *Lipid Technology* 3: 16-22.
- Chen, Zhen-Yu, Li-Ya Wang, Ping Tim Chan, Zesheng Zhang , und Hau Yin Chung. 1998. „Antioxidative Activity of Green Tea Catechin Extract Compared with That of Rosemary Extract.“ *Journal of the Americal Oil Chemists' Society* 75 (9): 1141-1145.
- Choe, E.C., und D.B. Min. 2006. „Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation.“ *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5 (4): 169-186.
- Chougui, N., N. Djerroud, F. Naraoui, S. Hadjal, K. Aliane, B. Zeroual, und R. Larbat. 2015. „Physicochemical properties and storage stability of margarine containing Opuntia ficus-indica peel extract as antioxidant.“ *Food Chemistry* (173): 382-390.
- Clayton, W. 1920. *Margarine*. New York: Longmans Green.
- Codex Alimentarius. 2001. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission*. Bd. Second Edition.
- Craig-Schmidt, M.C., und C.A. Teodorescu. 2007. „Trans Fatty Acids in Foods.“ *Chow CK. Fatty acids in foods and their health implications* (CRC Press).
- Dadali, Ceyda, und Yesim Elmaci. 2019. „Characterization of Volatile Release and Sensory Properties of Model Margarines by Changing Fat and Emulsifier Content.“ *European Journal of Lipid Science and Technology* (121): 1900003.
- Dairy Processing Handbook . 2020. *Manufacture of AMF from Butter*. Zugriff am 29. 09 2020. <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/anhydrous-milk-fat-amf-and-butteroil>.
- Davis, H.T. 1994. „Factors determining emulsion type: Hydrophile - lipophile balance and beyond.“ *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (91): 9-24.

- Decker, Eric A. 1997. „Phenolics: Prooxidants or Antioxidants?“ *Nutrition Reviews* 396-407.
- Degner, Ralf. 2009. *pH-Messung: Der Leitfaden für Praktiker*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- deMan J.M., und deMan L. 1995. „Palm oil as a component for high quality margarine and shortening formulations.“ *Malaysian Oil Science and Technology (MOST)* (4): 56-60.
- deMan, L., J.M. deMan, und B. Blackman . 1989. „Physical and textural evaluation of some shortenings and margarines.“ *Journal of the American Oil Chemists' Society* 66 (1): 128-132.
- deMan, L., und J.M. deMan. 1994. *Functionality of palm oil, palm oil products and palm kernel oil in margarine and shortening*. Kuala Lumpur: PORIM .
- Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2014. *Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen*. Frankfurt am Main.
- Dickinson, E. 2009. „Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers.“ *Food Hydrocolloids* 1473-1482.
- . 1992. *Introduction to Food Colloids*. Oxford: Oxford University Press.
- Dridi, W., W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal-Calderon, und M. Cansell. 2016. „Influence of formulation on the oxidative stability of water-in-oil emulsions.“ *Food Chemistry* 205-211.
- EFSA. 2004. „trans-Fettsäuren: EFSA-Gremium überprüft Aufnahme über die Nahrung und gesundheitliche Auswirkungen.“ Pressemitteilung.
- EG. 2007. „Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates über eine gemeinsame Organisation der Agrarmärkte und mit Sondervorschriften für bestimmte landwirtschaftlich Erzeugnisse.“ Anhang XV.
- Erdmann, M.E., B. Zeeb, H. Salminen, M. Gibis, R. Lautenschlaeger, und J. Weiss. 2015. „Influence of droplet size on the antioxidant activity of rosemary extract loaded oil-in-water emulsions in mixed systems.“ *Food & Function* (6): 793.
- Europäische Union (EU). 2008. „Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 über Lebensmittelzusatzstoffe.“
- . 2008. „Verordnung (EG) Nr. 1334/2008.“ *Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln*.

- . 2006. „Verordnung (EG) Nr. 1925/2006 über den Zusatz von Vitaminen und Mineralstoffen sowie bestimmten anderen Stoffen in Lebensmitteln.“
- Europäische Union. 2008. „Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln.“
- European Food Safety Authority (EFSA). 2012. „Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive.“ *EFSA Journal* 10 (3): 2588.
- Frankel, E.N. 1980. „Lipid Oxidation.“ *Progress in Lipid Research* (19): 1-22.
- Frankel, E.N. 1984. „Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance.“ *Journal of American Oil Chemist Society* (61): 1908-1917.
- Frankel, E.N., S.W. Huang, J. Kanner, und J.B. German. 1994. „Interfacial Phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (42): 1054-1059.
- Frankel, E.N., S.-W. Huang, R. Aeschbach, und E. Prior. 1996. „Antioxidant Activity of Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (44): 131-135.
- Fritsch, C.W. 1994. „Lipid oxidation - The other dimension.“ *Inform* (5): 423-436.
- Gaßmann, B. 2006. „Lipide.“ *Ernährungs-Umschau* (7): 272-278.
- Gerstenberg Kirkeby, P. 2007. „Margarine and Dairy Spreads: Processing and Technology.“ In *Handbook of Food Products Manufacturing*, von Hui Y.H., 705-722. John Wiley & Sons Inc. .
- Grüneis, V., S Fruehwirth, M. Zehl, J. Ortner, A. Schamann, J. König, und M. Pignitter. 2019. „Simultaneous Analysis of Epoxidized and Hydroperoxidized Triacylglycerols in Canola Oil and Margarine by LC-MS.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (67): 10174-10184.
- Gramza , Anna, und Jozef Korczak. 2000. „Tea constituents (Camellia sinensis L.) as antioxidants in lipid systems.“ *Trends in Food Science & Technology* (16): 351-358.
- Hasenhuettl, G.L., und R.W. Hartel. 2008. *Food Emulsifiers and Their Applications*. New York: Springer Science + Business Media, LLC.

- Heertje, I., J. van Eendenburg, J.M. Cornelissen, und A.C. Juriaanse. 1988. „The Effect of Processing on Some Microstructural Characteristics of Fat Spreads.“ *Food Structure* 7 (2): 189-193.
- Hefter, Gustav. 1921. *Gewinnung der Fette und Öle*. Berlin: Springer Verlag GmbH.
- Hopia, Anu I, Shu-Wen Huang, Karin Schwarz, J. Bruce German, und Edwin N. Frankel. 1996. „Effect of Different Lipid Systems on Antioxidant Activity of Rosemary Constituents Carnosol and Carnosic Acid with and without alpha-Tocopherol.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (44): 2030-2036.
- Huang, S-W., und E.N. Frankel. 1997. „Antioxidant Activity of Tea Catechins in Different Lipid Systems.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (45): 3033-3038.
- Joyner, N.T. 1953. „The plasticizing of edible fats.“ *American Oil Chemists' Society* 30 (11): 526-535.
- Kanner, J., S. Harel, und R. Jaffe. 2016. „Lipid peroxidation of muscle food as affected by sodium chloride.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (39): 1017-1021.
- Kirkhus, B., A. Lamglait, Storro I., I. Storro, G. Vogt, E. Olsen, F. Lundby, und H. Standal. 2015. „The Role of Water in Protection Against Thermal Deterioration of Liquid Margarine.“ *Journal of the American Oil Chemists' Society* (92): 215-223.
- Laguerre, M., C. Bayrasy, A Panya, J Weiss, D.J. McClements, J. Lecomte, E.A. Decker, und P. Villeneuve. 2015. „What Makes Food Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox.“ *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (55): 183-201.
- Laguerre, M., L. Lopez Giraldo, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, B. Barea, J. Weiss, E.A. Decker, und P. Villeneuve. 2009. „Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: The cut-off theory behind the polar paradox.“ *Journal of Agricultural Food Chemistry* (57): 11335-11342.
- Lamberti, M., und F. Escher. 2007. „Aluminium Foil as a Food Packaging Material in Comparison with other Materials.“ *Food Reviews International* 23 (4): 407-433.
- LFGB. 2005. *Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung des pH-Wertes in Margarine*. Bde. 1984-05.
- Liu, J., Y. Guo, X. Li, T. Si, und D.J. McClements. 2019. „Effects of Chelating Agents and Salts on Interfacial Properties and Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (67): 13718-13727.
- Longyuan, M., J. McClements, J. Wu, und E.A. Decker. 1997. „Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl.“ *Food Chemistry* 61 (3): 307-312.

- Losada-Barreiro, S., V. Sanchez-Paz, und C. Bravo-Diaz. 2015. „Transfer of antioxidants at the interfaces of model food emulsions: distributions and thermodynamic parameters.“ *Royal Society of Chemistry* (13): 876.
- Lundberg, W.O. 1962. *Lipids and Their Oxidation*. Westport, CT: ACI Publishing Co.
- Madsen, J. 1987. „Emulsifiers Used in Margarine, Low Calorie Spread, Shortening, Bakery Compound and Filling.“ *Fat Science Technology* (4): 165-172.
- Manley, D.J.R. 1991. *Technology of Biscuits, Crackers and Cookies*. Chichester, UK: Ellis Horwood Limited Publishers.
- Mansson, H. L. 2008. „Fatty acids in bovine milk fat.“ *Food & Nutrition Research* (52:1): 1821.
- Marquez-Ruiz, G., N. Jorge, M. Martin-Polvillo, und M. C. Dobarganes. 1996. „Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard.“ *Journal of Chromatography* (749): 55-60.
- Maskan, M., M.D. Öner, und A. Kaya. 1993. „A Storage stability and accelerated shelf-life testing of margarine samples.“ *Journal of Food Quality* (16): 175-186.
- Mattisek, Reinhard, Gabriele Steiner, und Markus Fischer. 2014. *Lebensmittelanalytik*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag .
- McClements, D.J. 2016. *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*. Bd. Boca Raton. CRC Press.
- McClements, D.J., and E.A. Decker. 2000. "Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogenous Food Systems." *Journal of Food Science* 65 (8): 1270-1282.
- McClements, D.J., und E.A. Decker. 2000. „Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogenous Food Systems.“ *Journal of Food Science* 65 (8): 1270-1282.
- Mei, L., J. McClements, J. Wu, und E. Decker. 1998. „Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl.“ *Food Chemistry* (61): 307-312.
- Mordor Intelligence . 2019. *Global Margarine Market - Growth, Trends, and Forecasts (2020-2025)*. Zugriff am 29.. 09. 2020. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/margarine-market>.
- Nogala-Kalucka, M., und M. Gogolewski. 2000. „Alteration of fatty acid composition, tocopherol content and peroxide value in margarine during storage at various temperatures.“ *Nahrung* (44): 431-433.

- Osborn-Barnes, H. T., und C. C. Akoh. 2003. „Copper-catalyzed oxidation of a structured lipid-based emulsion containing alpha-tocopherol and citric acid: influence of pH and NaCl.“ *Journal of agricultural and food chemistry*, 6851-6855.
- Patel, A.R., J-M. Lecerf, S. Schenker, und Koen Dewettinck. 2016. „The Contribution of Modern Margarine and Fat Spreads to Dietary Fat Intake.“ *Reviews in Food Science and Food Safety* (15): 633-645.
- Pegg, R. B. 2005. „Measurement of primary lipid oxidation products.“ In *Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids and Carbohydrates*, 515-529. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Pignitter , Marc, und Veronika Somoza. 2012. „Critical Evaluation of Methods for the Measurement of Oxidative Rancidity in Vegetable Oils.“ *Journal of Food and Drug Analysis*, 772-777.
- Pignitter, M., K. Stolze, S. Gartner, B. Dumhart, C. Stoll, G. Steiger, K. Kraemer, und V. Somoza. 2014. „Cold Fluorescent Light as Major Inducer of Lipid Oxidation in Soybean Oil Stored at Household Conditions for Eight Weeks.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (10): 2297-2305.
- Pokorna, I., V. Filip, und J. Smidrkal. 2004. „Lipid Oxidation in Margarine Emulsions.“ *Czech Journal of Food Sciences* (22): 140.
- Sasaki, K., Alamed J., J. Weiss , P. Villeneuve , L.J. Lopez Giraldo, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, und E.A. Decker. 2010. „Relationship between the physical properties of chlorogenic acid esters and their ability to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions.“ *Food Chemistry* (118): 830-835.
- Schaich, K.M., J. Xie, und B.A. Bogusz. 2017. „Thinking outside the classsial chain reaction box of lipid oxidation: Evidence for alternate pathways and the importance of epoxides. .“ *Lipid Technology* (29): 91-96.
- Scheibner, J., und I. Elmadfa. 1984. „In vivo-Vergleich der Wirksamkeit von dl-alpha Tocopherolacetat und BHT - Versuche an Ratten.“ *European Journal of Lipid Science and Technology* 86 (52): 613-618.
- Senanayake, S.P.J.N. 2013. „Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications - A review.“ *Journal of Functional Foods* (5): 1529-1541.
- Shahidi, F., J. Wang , und U. N. Wanasundara. 2017. „Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils.“ In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, von C. C. Akoh, 519-537. Boca Raton: CRC Press.

- Shao, Y., und C. Tang. 2014. „Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: Influence of ionic strength and heat pretreatment.“ *Food Hydrocolloids* (37): 149-158.
- Sharma, R. 2012. „Omega-3 fatty acids in prevention of cardiovascular disease in Humans: Chemistry, Dyslipidemia.“ *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease* 465.
- Shiota, Makoto, Tomoyuki Isogai, Ai Iwasawa, und Mariko Kotera. 2011. „Model Studies on Volatile Release from Different Semisolid Fat Blends Correlated with Changes in Sensory Perception.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (59): 4904-4912.
- Shrivastava, Alankar, und Vipin B. Gupta. 2011. „Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods.“ *Chronicles of Young Scientists* 2 (1): 21-25.
- Silvestre, M.P.C., W. Chaiyasit, R.G. Brannan, D.J. McClements, und E.A. Decker. 2000. „Ability of Surfactant Headgroup Size To Alter Lipid And Antioxidant Oxidation in Oil-in-Water Emulsions.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2057-2061.
- Stöckmann, H., K. Schwarz, und T. Huynh-Ba. 2000. „The influence of various emulsifiers on the partitioning and antioxidant activity of hydroxybenzoic acids and their derivatives in oil-in-water emulsions.“ *Journal of the American Oil Chemists' Society* (77): 535-542.
- Sun, Y-E, W-D Wang, H-W. Chen, und C. Li. 2011. „Autoxidation of Unsaturated Lipids in Food Emulsion.“ *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (51): 453-466.
- Tan, B.K., und F.C.H. Oh. 1981. „Oleins and stearins from Malaysian palm oil: Chemical and physical characteristics.“ *PORIM Technology*, 1-6.
- Timmins, G.S., R.E. dos Santos, A.C. Whitwood, L.H. Catalani, P. Di Mascio, B.C. Gilbert , und E.J.H. Bechara . 1997. „Lipid Peroxidation-Dependent Chemiluminescence from the Cyclization of Alkylperoxyl Radicals to Dioxetane Radical Intermediates.“ *Chem. Res. Toxicol.* (10): 1090-1096.
- Velasco, Joaquin, Mogens L. Andersen, und Leif H. Skibsted. 2004. „Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry.“ *Food Chemistry*, 623-632.

- Wada, S., und X. Fang. 1992. „The Synergistic Antioxidant Effect of Rosemary Extract and alpha-Tocopherol in Sardine Oil Model System and Frozen-Crushed Fish Meat.“ *Journal of Food Processing and Preservation* 16 (4): 263-274.
- Wang, G., und T. Wang. 2008. „Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion.“ *Journal of agricultural and food chemistry* 56 (23): 11424-11431.
- Wenlei, X., J. Junmin, und W. Hongyan. 2007. „Impact of surfactant type, pH and antioxidants on the oxidation of methyl linoleate in micellar solutions.“ *Food Research International*, 1270-1275.
- Wheeler, D. H. 1932. „Peroxide Formation as a Measure of Autoxidative Deterioration.“ *Oil Soap*, 89-97.
- Xia, W., und S.M. Budge. 2017. „Techniques for the Analysis of Minor Lipid Oxidation Products Derived from Triacylglycerols: Epoxides, Alcohols, and Ketones.“ *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (16): 735-758.
- Xie, J., P. VanAlstyne, A. Uhler, und X. Yang. 2017. „A review on rosemary as a natural antioxidation solution.“ *European Journal of Lipid Science and Technology* 119 (6): 1600439.
- Yi, Jianhua, Wenbin Dong, Zhenbao Zhu, Ning Liu, Yong Ding, David Julian McClements, und Eric Andrew Decker. 2015. „Surfactant Concentrations, Antioxidants, and Chelators Influencing Oxidative Stability of Water-in-Walnut Oil Emulsions.“ *Journal of the American Oil Chemists' Society* (92): 1093-1102.
- Yuji, H., J. Weiss, P. Villeneuve, L.J. Lopez Giraldo, Figueroa-Eps, M. Figueroa-Espinoza, und E.A. Decker. 2007. „Ability of surface-active antioxidants to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsion.“ *Journal of the American Oil Chemists' Society* (55): 11052-11056.
- Zaeromali, M., Y. Maghsoudlou, und P. Aryaey. 2014. „The changes of table margarine characterization during storage time.“ *European Journal of Experimental Biology* (4): 185-187.
- Zeb, A., und M. Murkovic. 2013. „Pro-oxidant effects of beta-carotene during thermal oxidation of edible oils.“ *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90 (6): 881-889.

9. Anhang

Tabelle 12: MRM Qualifier- und Quantifier- Ionen (Grüneis et al. 2019).

oxTAG	precursor ions	quantifiers	qualifiers
	[M+NH ₄] ⁺	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
54:3 [OOH]			635.5
18:1/18:1/18:1 [OOH]	934.8	601.5	617.5
18:0/18:2/18:1 [OOH]			603.5
54:4 [OOH]			633.5
18:1/18:1/18:2 [OOH]	932.8	603.5	615.5
18:0/18:1/18:3 [OOH]			601.5
54:5 [OOH]			633.5
18:1/18:2/18:2 [OOH]			631.5
18:1/18:1/18:3 [OOH]	930.8	601.5	615.5
18:0/18:2/18:3 [OOH]			613.5
54:6 [OOH]			629.5
18:1/18:2/18:3 [OOH]			617.5
	928.8	601.5	613.5
18:2/18:2/18:2 [OOH]			611.5
54:0 [O]			621.5
18:0/18:0/18:0 [O]	922.8	603.5	605.5
54:1 [O]			621.5
18:0/18:0/18:1 [O]			619.5
	920.8	603.5	603.5
			601.5
			399.3
54:2 [O]			619.5
18:0/18:1/18:1 [O]	918.8	601.5	617.5
			603.5
54:3 [O]			617.5
18:1/18:1/18:1 [O]	916.8	599.5	603.5
18:0/18:2/18:1 [O]			601.5
54:4 [O]			617.5
18:1/18:1/18:2 [O]			615.5
18:0/18:1/18:3 [O]	914.8	597.5	601.5
18:0/18:2/18:2 [O]			599.5

Tabelle 13: Rezeptur der Lagermargarinen LP1-LP4. Bei allen enthaltenen Fetten und Ölen handelte es sich um raffinierte Rohstoffe.

	LP1	LP2	LP3	LP4
Fettphase	32% gehärtetes Kokosöl	51% Palmöl	57% Palmöl	32% gehärtetes Kokosöl
	22% Kokosöl	10% Palmöl – trans-FS frei, ungehärtet	12 % Palmstearin	24% Kokosöl
	13% Sonnenblumenöl	8% Butterschmalz	11% Rapsöl	14% Sonnenblumenöl
	10% Palmöl/Palmkernöl-Umesterung	7% Rapsöl		6% gehärtete Kokos/Rapsöl-Umesterung
	3% Rapsöl	4% Kokosöl		3% Rapsöl
Wasser	20%	20%	20%	20%
Zutaten	0.30% Emulgator E471, E475	1% Magermilch mit Joghurtkultur	0.18% Emulgator E471	0.30% Emulgator E471, E475
	0.10% unjodiertes Speisesalz	0.35% Emulgator E471	0.10% unjodiertes Speisesalz	0.10% unjodiertes Speisesalz
	0.01% Butteraroma	0.11% Butteraroma	0.08% Lecithin	0.01% Butteraroma
	0.01% Zitronensäure	0.10% unjodiertes Speisesalz	0.04% Butteraroma	0.01% Zitronensäure
	0.001% β -Carotin	0.08% Lecithin	0.01% Zitronensäure	0.001% β -Carotin
		0.06% Zitronensäure	0.001% β -Carotin	
		0.04% Kaliumsorbat		
		0.001% β -Carotin		

Tabelle 14: Oxidative Stabilität der Margarinen während der Lagerung für 180 Tage bei 15°C, analysiert durch die POZ (meq O₂/kg Fettphase), CD und Ranzimat (h). Die Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zu Tag 0 (ANOVA, p<0,05, Holm-Sidak post-hoc Test).

Tag	LP1 (meq O ₂ /kg Fettphase)	Change (%)	LP2 (meq O ₂ /kg Fettphase)	Change (%)	LP3 (meq O ₂ /kg Fettphase)	Change (%)	LP4 (meq O ₂ /kg Fettphase)	Change (%)
POZ								
0	0.33 ± 0.02		1.10 ± 0.10		0.86 ± 0.06		0.40 ± 0.03	
1	0.36 ± 0.05	9.09	1.23 ± 0.10	11.8	0.89 ± 0.09	3.49	0.40 ± 0.04	0.00
7	0.41 ± 0.06	24.2	1.31 ± 0.14	19.1	0.94 ± 0.10	9.30	0.46 ± 0.05	15.0
14	0.43 ± 0.01	30.3	1.36 ± 0.23	23.6	0.97 ± 0.23	12.8	0.44 ± 0.03	10.0
28	0.56 ± 0.08	69.7	2.37 ± 0.22	115	1.24 ± 0.05	44.2	0.60 ± 0.05	50.0
56	0.82 ± 0.07	148	3.42 ± 0.28*	211	1.93 ± 0.38	124	0.99 ± 0.06	148
99	1.31 ± 0.21*	297	4.08 ± 0.26*	271	3.06 ± 0.34*	256	1.64 ± 0.28*	310
180	2.20 ± 0.67*	567	4.76 ± 0.92*	333	3.97 ± 0.51*	362	2.73 ± 0.27*	583
CD								
0	4.45 ± 0.21		11.2 ± 0.68		7.75 ± 0.42		5.42 ± 0.14	
1	4.66 ± 0.15	4.72	11.3 ± 0.25	0.89	7.69 ± 0.36	-0.77	3.75 ± 0.61*	-30.8
7	4.98 ± 0.40	11.9	11.3 ± 0.08	0.89	7.59 ± 0.19	-2.06	5.47 ± 0.27	0.92
14	5.70 ± 0.25*	28.1	10.7 ± 0.44	-4.46	8.14 ± 0.56	5.03	5.33 ± 0.62	-1.66
28	5.23 ± 0.71	17.5	12.2 ± 0.20	8.93	7.81 ± 0.48	0.77	5.29 ± 0.43	-2.40
56	5.80 ± 0.60*	30.3	12.6 ± 0.23	12.5	8.50 ± 0.47	9.68	6.31 ± 0.12	16.4
99	6.12 ± 0.90*	37.5	12.3 ± 0.42	9.82	9.96 ± 0.20*	28.5	5.60 ± 0.59	3.32
180	8.35 ± 0.59*	87.6	14.7 ± 0.49*	31.3	9.98 ± 0.73*	28.8	7.89 ± 0.71*	45.6
ISO								
0	10.3 ± 0.22		13.0 ± 0.23		11.7 ± 0.37		10.7 ± 0.09	
1	11.0 ± 0.88	6.80	13.2 ± 0.07	1.54	11.5 ± 0.11	-1.71	10.2 ± 0.07	-4.67
7	10.1 ± 0.23	-1.94	12.6 ± 0.15	-3.08	11.4 ± 0.15	-2.56	9.61 ± 0.09	-10.2
14	9.39 ± 0.02	-8.83	12.2 ± 0.39	-6.15	10.9 ± 0.20*	-6.84	8.99 ± 0.02	-16.0
28	9.64 ± 1.09	-6.41	11.1 ± 0.16	-14.6	10.5 ± 0.11*	-10.3	8.23 ± 0.37	-23.1
56	8.02 ± 0.02	-22.1	9.98 ± 0.19	-23.2	9.87 ± 0.10*	-15.6	7.44 ± 0.04	-30.5
99	6.83 ± 0.11	-33.7	9.79 ± 0.44*	-24.7	8.93 ± 0.17*	-23.7	6.50 ± 0.22*	-39.3
180	5.55 ± 0.01*	-46.1	7.96 ± 0.15*	-38.8	7.71 ± 0.20*	-34.1	5.25 ± 0.20*	-50.9

Tabelle 15: Zusammenfassung der flüchtigen Substanzen, die während der Lagerdauer anstiegen ($FC < 0$) oder abnahmen ($FC > 0$). Der p-Wert ist ein Ergebnis des moderated t-Tests (0 Tage vs. 99 Tage) und wurde durch Benjamini Hochberg Korr. korrigiert. Verbindungen, welche keine signifikanten Änderungen zwischen T0 und T99 zeigten wurden als „nicht signifikant“, beschrieben.

Compounds	LP 1					LP 2					LP 3					LP 4																	
	Area EIC T0, RSD, n=6	Area EIC T99, RSD, n=6	corr. P (t- test)	FC	conc. TS6 FID (ppb)	Area EIC T0, RSD, n=6	Area EIC T99, RSD, n=6	corr. P (t- test)	FC	conc. TS6 FID (ppb)	Area EIC T0, RSD, n=6	Area EIC T99, RSD, n=6	corr. P (t-test)	FC	conc. TS6 FID (ppb)	Area EIC T0, RSD, n=6	Area EIC T99, RSD, n=6	corr. P (t-test)	FC	conc. TS6 FID (ppb)													
2,3-Butanedione	5014	11%	4400	10%	N.S.	N.S.					7127864	4%				7980	6%	3124	6%	7.47E-04	2.23	4400	5%	4440	3%	N.S.	N.S.						
2,3-Pentanedione	42464	15%	20843	4%	1.27E-03	1.75	0	N.S.	N.S.			0	0	N.S.	N.S.		32706	5%	15480	2%	1.04E-08	2.11											
2-Butenal, (E)-	1851	13%	1540	8%	N.S.	N.S.	15000	5%	26873	25%	3.88E-04	-1.75				2596	13%	2578	6%	N.S.	N.S.	907	11%	990	5%	N.S.	N.S.						
2-Heptenal, (E)-	0	0	N.S.	N.S.			1996	11%	3992	8%	1.27E-05	-2.00				303	34%	840	17%	N.S.	N.S.	0	0	0	0	N.S.	N.S.						
2-Hexenal, (E)-	0	0	N.S.	N.S.			33317	9%	42914	6%	9.00E-03	-1.29				0	151	64%	1.82E-03	-78.34		0	0	0	0	N.S.	N.S.						
2-Pentanone, 5-hydroxy-	0	0	N.S.	N.S.			2395	9%	7165	40%	5.17E-05	-2.86				0	0	N.S.	N.S.			0	0	0	0	N.S.	N.S.						
ACETIC ACID	1600	59%	2359	119%	N.S.	N.S.	54533	20%	154069	11%	8.28E-11	-23.60	58234	±	20468	2420	191%	0	N.S.	N.S.	1060	29%	842	17%	N.S.	N.S.							
Acetone	7043	15%	20058	12%	1.51E-05	-3.35	75182	8%	97099	7%	6.73E-03	-1.29	772	±	311	1790	18%	54370	22%	1.38E-05	-3.21	222	±	75	7819	5%	22481	13%	4.21E-08	-2.86	81	±	33
Benzene, methyl-	7877	16%	2739	10%	2.96E-06	2.51	21480	13%	9673	35%	1.61E-04	2.30				23881	20%	4035	8%	2.24E-07	4.51			11179	14%	3112	15%	1.04E-08	3.60				
Butanethiolic acid, S-methyl ester	0	0	N.S.	N.S.			93335	6%	118014	5%	9.04E-03	-1.24				0	0	N.S.	N.S.			0	0	0	0	N.S.	N.S.						
Butanoic acid, propyl ester	0	0	N.S.	N.S.			4469	7%	48172	4%	5.58E-12	-10.78				0	0	N.S.	N.S.			0	0	0	0	N.S.	N.S.						
Ethanol	23821	32%	31621	15%	N.S.	N.S.	144515	11%	283460	6%	3.52E-07	-1.97	5041	±	1600	25415	23%	7318	23%	1.75E-04	3.23			50757	10%	11288	17%	1.04E-08	4.53				
Furan, 2-pentyl-	883	13%	701	10%	N.S.	N.S.	3981	9%	7778	7%	1.31E-05	-1.83				3107	14%	4010	7%	N.S.	N.S.	320	17%	261	31%	N.S.	N.S.						
Heptanal	1837	10%	2374	3%	N.S.	N.S.	8087	2%	15535	16%	1.37E-05	-1.80				2433	7%	3703	11%	1.82E-03	-1.83			1380	5%	1516	8%	N.S.	N.S.				
Heptane	2644	12%	2124	10%	N.S.	N.S.	965	8%	2659	37%	4.75E-05	-2.59				4400	11%	3884	7%	N.S.	N.S.	1698	7%	1465	10%	N.S.	N.S.						
Hexanal	18687	8%	2476	5%	N.S.	N.S.	87305	9%	337029	5%	4.59E-10	-1.87	1487	±	300	72539	6%	597301	9%	6.89E-10	-8.77	437	±	88	14119	4%	22378	5%	2.03E-07	-1.50	76	±	18
Nonanal	0	0	N.S.	N.S.			6180	30%	16830	12%	6.14E-05	-3.33	1077	±	422	969	13%	918	12%	N.S.	N.S.	0	0	0	0	N.S.	N.S.						
Octane	11199	15%	9300	15%	N.S.	N.S.	2721	16%	5518	25%	1.42E-04	-2.00				11507	5%	11146	6%	N.S.	N.S.	10041	8%	8159	11%	N.S.	N.S.						
Pentanal	18883	12%	10115	17%	N.S.	N.S.	21699	10%	47827	19%	1.00E-05	-2.18	83	±	64	20005	8%	33822	15%	4.31E-04	-1.79	42	±	15	9064	14%	10452	10%	N.S.	N.S.			
Sorbic Acid	0	0	N.S.	N.S.			1079540	56%	3957566	11%	2.88E-03	-4.55				0	0	N.S.	N.S.			0	0	0	0	N.S.	N.S.						

Tabelle 16: Gehalt an oxidierten Triglyceriden (oxTAGs) in den Lagermargarinen LP2 und LP3 und der Mustermargarine MUGe T0 (=unerhitzt) und erhitzt für 1h bei 80°C. Darstellung der Daten als MW $\pm$ SW (n=4).

Epoxide	Lagertag	LP2 (μM)	LP3 (μM)		MUGe (μM)
54:1 [O]	0	0,620 $\pm$ 0,033	1,122 $\pm$ 0,105	T0	2,297 $\pm$ 0,911
	180	0,257 $\pm$ 0,069	1,687 $\pm$ 0,349	erhitzt	3,120 $\pm$ 0,120
54:2 [O]	0	0,204 $\pm$ 0,007	0,818 $\pm$ 0,119	T0	2,107 $\pm$ 1,006
	180	0,081 $\pm$ 0,068	1,404 $\pm$ 0,348	erhitzt	3,234 $\pm$ 0,238
54:3 [O]	0	n.d. < LOD	0,072 $\pm$ 0,049	T0	0,594 $\pm$ 0,359
	180	n.d. < LOD	0,283 $\pm$ 0,170	erhitzt	1,053 $\pm$ 0,075

Tabelle 17: pH, T_R , Fe und Cu Konzentration (mg/kg) der Mustermargarinen MU1-MU19 und MUGe. * zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu MU14, ** zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu MU1 (ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post-hoc Test).

Mustermargarinen	Zutat	pH n=4	T_R n=1	Fe (mg/kg) n=3	Cu (mg/kg) n=3
MU1	E1 Std.	$7,82 \pm 0,01$	2,67	$2,88 \pm 0,85$	$0,097 \pm 0,013$
MU2	E1 -20%	$7,82 \pm 0,00$	1,27	$5,30 \pm 0,19^{**}$	$0,056 \pm 0,001$
MU3	E1 +20%	$7,91 \pm 0,01$	1,38	$3,73 \pm 1,21$	$0,106 \pm 0,033$
MU4	E2 Std.	$7,90 \pm 0,00$	0,66	$2,60 \pm 0,48$	$0,058 \pm 0,005$
MU5	E2 -20%	$7,86 \pm 0,01$	n.b.	$2,73 \pm 0,51$	$0,080 \pm 0,041$
MU6	E2 +20%	$7,88 \pm 0,01$	6,69	$4,57 \pm 1,78$	$0,098 \pm 0,051$
MU7	aTA Std.	$7,89 \pm 0,01$	5,52	$2,47 \pm 0,47$	$0,129 \pm 0,007$
MU8	aTA -20%	$7,90 \pm 0,02$	1,47	$3,08 \pm 0,56$	$0,062 \pm 0,012$
MU9	aTA +20%	$7,89 \pm 0,01$	0,67	$3,23 \pm 0,25$	$0,066 \pm 0,000$
MU10	RE Std.	$7,91 \pm 0,03$	1,38	$2,54 \pm 0,17$	$0,109 \pm 0,002$
MU11	RE -20%	$7,91 \pm 0,03$	3,81	$4,64 \pm 0,31$	$0,061 \pm 0,013$
MU12	RE+20%	$7,92 \pm 0,02$	1,04	$2,34 \pm 0,52$	$0,065 \pm 0,012$
MU13	GTE Std.	$4,31 \pm 0,00$	1,79	$2,62 \pm 0,36$	$0,099 \pm 0,006$
MU14	GTE -20%	$4,30 \pm 0,00$	33,2	$2,22 \pm 0,26$	$0,091 \pm 0,008$
MU15	GTE +20%	$4,12 \pm 0,00$	n.b.	$1,73 \pm 0,01$	$0,107 \pm 0,001$
MU16	Zitronensäure	$3,77 \pm 0,00^*$	2,02	$2,41 \pm 0,43$	$0,066 \pm 0,020$
MU17	Beta-Carotin	$4,45 \pm 0,00$	n.b.	$1,78 \pm 0,06$	$0,061 \pm 0,019$
MU18	Aroma	$4,54 \pm 0,00$	1,14	$2,50 \pm 0,80$	$0,061 \pm 0,009$
MU19	NaCl	$4,34 \pm 0,00$	n.b.	$2,31 \pm 0,00$	$0,053 \pm 0,000$
MUGe	Gesamt	$3,58 \pm 0,00^*$	1,25	$3,42 \pm 0,33$	$0,061 \pm 0,014$

Tabelle 18: Ergebnisse der Peroxidzahl (meq O₂/kg Fettphase) und der Oxidationsstabilität (h) der Mustermargarinen. Darstellung der Daten in MW ± SD (n=4). Sterne zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zu MU1 (ANOVA, p<0,05, Holm-Sidak bzw. Dunn's post-hoc Test).

Mustermargarinen	Zutat	POZ (meq O ₂ /kg Fettphase) n=4	OSI (h) n=4
MU1	E1 Std.	1,64 ± 0,14	7,86 ± 0,09
MU2	E1 -20%	1,52 ± 0,17	8,38 ± 0,46
MU3	E1 +20%	1,97 ± 0,17	8,13 ± 0,10
MU4	E2 Std.	3,33 ± 0,51*	7,47 ± 0,30
MU5	E2 -20%	3,38 ± 0,48*	7,64 ± 0,14
MU6	E2 +20%	1,97 ± 0,17*	8,64 ± 0,12
MU7	aTA Std.	3,95 ± 0,67*	6,23 ± 0,10*
MU8	aTA -20%	3,79 ± 0,41*	8,84 ± 0,10*
MU9	aTA +20%	3,68 ± 0,44*	8,75 ± 0,41*
MU10	RE Std.	1,93 ± 0,08	8,02 ± 0,36
MU11	RE -20%	1,06 ± 0,13*	8,76 ± 0,09*
MU12	RE+20%	0,86 ± 0,04*	10,23 ± 0,30*
MU13	GTE Std.	0,59 ± 0,02*	11,62 ± 0,29*
MU14	GTE -20%	0,59 ± 0,04*	11,99 ± 0,72*
MU15	GTE +20%	4,41 ± 0,44*	11,54 ± 0,44*
MU16	Zitronensäure	1,21 ± 0,10	11,58 ± 0,74*
MU17	Beta-Carotin	1,33 ± 0,10	11,01 ± 0,30*
MU18	Aroma	0,81 ± 0,03*	10,40 ± 1,00*
MU19	NaCl	0,85 ± 0,03*	12,21 ± 0,54*
MUGe	Gesamt	0,59 ± 0,07*	12,53 ± 0,89*

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle aus ungedruckten Quellen, gedruckter Literatur oder aus dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen und Konzepte gemäß den Richtlinien wissenschaftlicher Arbeiten mit genauer Quellenangabe zitiert habe.

Wien, Oktober 2020