

Afslutningsrapport

Fremstilling af et nyt smørprodukt med
forbedrede ernæringsmæssige egenskaber

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2006-74

Marts 2006



mejeriforeningen

danish dairy board

AFSLUTNINGSRAPPORT

Smør, fremstilling af et nyt smørprodukt med forbedrede ernæringsmæssige egenskaber

Projektperiode: 15. oktober 2002 – 31. december 2005

Projektdeltagere:

Lektor, Ph.D. Huiling Mu, BioCentrum-DTU, Danmarks Tekniske Universitet
Professor Kirsten Jakobsen, Danmarks Jordbrugs Forskning
Seniorforsker Henry Jørgensen, Danmarks Jordbrugs Forskning
Lektor Xuebing Xu, BioCentrum-DTU, Danmarks Tekniske Universitet
Seniorforsker Charlotte Jakobsen, Danmarks Fiskeri Undersøgelse
Adjunkt Nina Skall Nielsen, Danmarks Fiskeri Undersøgelse
Laborant Jannie Agersten, BioCentrum-DTU, Danmarks Tekniske Universitet
Laborant Nina Kjeldsen, BioCentrum-DTU, Danmarks Tekniske Universitet
Ph.d. studerende Janni Brogaard Kristensen (DTU)

Finansieringskilder:

Mejeribrugets ForskningsFond
Direktoratet for FødevarerErhverv, Innovationsloven

Sammendrag

Baggrund. Forskningsresultater, opnået indenfor de sidste 10 år, har vist at indtagelse af en vegetabilsk olie med et højt indhold af diacylglyceroler (DAG) medfører et lavere postprandial niveau af triacylglyceroler (TAG) i serum. Studierne viser også en undertrykt akkumulering af depotfedt og mindre fedtaflejring i leveren sammenlignet med indtagelsen af konventionel vegetabilsk olie (TAG olie).

Mål. Projektets formål har været at udvikle metoder til fremstilling af nye smørprodukter, som har mindre tendens til aflejring i fedtvæv efter indtagelse. Produkterne er baseret på smør opblandet med DAG. Produkternes organoleptiske egenskaber og deres metabolisme undersøges, ligesom der foretages en optimering af sammensætningen baseret på produktionsbetingelser og ernæringsmæssige effekter.

Forsøg. I projektet blev en metode til enzymatisk fremstilling DAG olier udviklet og optimeret. DAG olierne blev brugt i nye smørblandingsprodukter. Produkternes oxidative stabilitet og sensoriske egenskaber blev undersøgt vha. et holdbarhedsstudie. Ligeledes blev den nye type smørblandingsprodukts fodringseffekter (7 uger) og metabolisme i rotter undersøgt, for at klarlægge hvorvidt de ernæringsmæssige egenskaber af DAG olie kan overføres til den nye type smørblandingsprodukt. Absorptionen til portvenen af den rene DAG olie blev undersøgt vha. bolusfodring i grise med henblik på at evaluere en hypotese for virkemåden bag de viste positive ernæringsmæssige egenskaber.

Resultater. Screening af forskellige lipaser samt optimeringen af den lipase-katalyserede glycerolyse til fremstilling af DAG olie viste at det med den kommercielle lipase, Novozym 435, er muligt at opnå et DAG udbytte på 60 vægt %. Desuden kunne glycerolysereaktionen opskaleres til pilotskala (ca. 20 kg olie) med samme DAG-udbytte. De to producerede DAG-olier blev oprenset til 93 vægt % renhed.

Resultaterne fra holdbarhedsstudiet af smørblandingerne viste, at kvaliteten af smørblandingsproduktet med DAG-olie produceret fra rapsolie var sammenlignelig med kvaliteten af en tilsvarende smørblending produceret med traditionel rapsolie. De sensoriske egenskaber skal dog forbedres med hensyn til salt- og smørsmag. Den ringe salt- og smørsmag i DAG smørblandingerne blev tilskrevet en mere stabil emulsion med små vanddråber. Pga. en dårlig oxidativ stabilitet var DAG-olie fra solsikkeolie ikke brugbar i smørblandinger.

Absorptionsstudiet viste, at den formodede forøgede portvenetransport af frie fedtsyrer efter indtagelsen af DAG-olie ikke fandt sted. Til gengæld blev der observeret en forøgelse i portvenetransporten af glycerol. Dette bekræfter, at de metaboliske processer i enterocyterne er anderledes efter indtagelse af DAG olie i forhold til efter indtagelse af den traditionelle TAG-olie. Endvidere blev der fundet et nedsat TAG-niveau i plasma i den sen-postprandiale periode, hvilket er i overensstemmelse med tidligere studier.

Fodring med DAG-olie sammenlignet med TAG-olie viste en signifikant lavere akkumulering af samlet legemsfedt i den endelige kropssammensætning i rotter. Modsat dette viste diæten med den nye DAG-smørblending et signifikant højere forhold i mængden af abdominalfedt ift. kropsvægt. Denne effekt skyldtes sandsynligvis en anderledes fordeling af transporten af mellemkædede fedtsyrer fra smørfedt mellem transport i chylomikroner og via portvenen. Balancestudierne kunne ikke bidrage til forklaringen af mekanismen bag de positive effekter af DAG-oliediæten, eller de observerede effekter af en diæt med DAG-smørblending.

Konklusion. DAG-olie kan produceres, både i laboratorieskala og i storskala med Novozym 435, med et tilfredsstillende udbytte. Kvaliteten af smørblendingen med DAG-olie fra raps er tilfredsstillende selvom salt- og smørsmag skal forbedres. Hypotesen om øget portvenetransport af frie fedtsyrer kan afvises, men et højere glycerolniveau blev fundet i portvenen. De formodede ernæringsmæssige effekter af den nye smørblending med DAG-olie fra raps kan ikke observeres, hvilket sandsynligvis skyldes en ændret metabolisme af smørfedt.

English resume

Background. Recent studies in both animals and humans (healthy and overweight) have shown that intake of dietary oil with a high content of diacylglycerols (DAG) results in a lower postprandial level of serum triacylglycerols (TAG) and a suppressed accumulation of body- and liver fat as compared to intake of conventional TAG oil.

Aim. The purpose of this project was to develop methods to produce new butter products enriched with DAG, which might be accumulated less in the body, and to study the absorption properties of the products as well as their effects on energy and nitrogen balances in order to improve our understanding of the mechanism behind the reduced accumulation of fat in adipose tissue following intake of dietary DAG.

Experiments. In the present project an enzymatic method for the production of DAG oil was developed and optimized. The produced DAG oils were used in butter blend products. These butter blends were examined with respect to oxidative stability and sensory assessment in a storage study. The nutritional studies included studies of the effect of DAG oil on absorption pathway and on postprandial lipid parameters using catheterized pigs, and determination of energy balances in rats. Moreover, the nutritional effects of feeding the butter blend containing DAG oil were studied in a feeding study with rats.

Results. Screening of commercial available lipases and an optimization of the lipase-catalyzed glycerolysis for synthesis of DAG oil showed that with the lipase, Novozym 435, a DAG yield of 60 wt % was achievable. Up-scaling of the glycerolysis reaction to pilot plant scale (≈ 20 kg oil) was possible with a similar DAG yield. DAG oils were purified to 93 wt % purity.

The results from the butter blend storage study, revealed that the quality of butter blends with DAG oil, produced from rapeseed oil, was comparable to butter blends with traditional rapeseed oil. Though, the sensory properties need to be improved with respect to salt and butter flavour. The poor salt and butter flavour in the DAG butter blends were ascribed to a much more stable emulsion with small water droplets compared to TAG blends. DAG oil from sunflower oil was not suitable in a butter blend due to its poor oxidative stability.

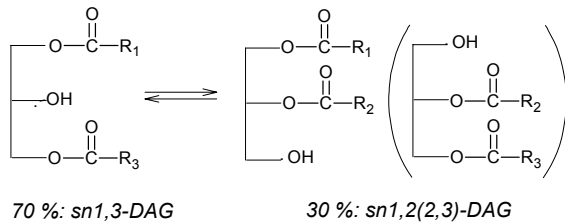
The absorption study revealed that the hypothesized increase in portal vein transport of free fatty acids in response to DAG oil intake did not occur. However, an increase in portal vein transport of glycerol was found, which confirms that metabolic processes in the enterocytes are differing when DAG oil is ingested as compared to traditional TAG oil. Moreover, a reduced TAG level in plasma was found in the late postprandial period, which is in accordance with previous studies.

The feeding study showed a significant less accumulation of total body fat in final body composition in response to feeding a DAG oil diet compared to a TAG oil diet. Contrary to these results, feeding of the novel DAG butter blend showed a significant higher abdominal fat weight to body weight ratio compared to the butter blend with conventional rapeseed oil. Divergence in the chylo-portal partitioning of medium chain fatty acids from butterfat may account for the observed unfortunate effects of DAG butter blend feeding. Results of the balance study could not provide information to clarify the mechanism behind the positive effects of the DAG oil diet or the observed effects of feeding the DAG butter blend diet.

Conclusions. DAG oil can be produced at a satisfactory yield by glycerolysis both in small scale and in a 20 kg-batch scale using Novozym 435. The quality of the novel butter blend with DAG oil from rapeseed oil is satisfactory, though salt and butter flavour need improvement. The hypothesis of increased portal vein transport of free fatty acids in response to DAG oil intake is rejected, but a higher level of free glycerol is observed in the portal plasma. The expected beneficial effects of the novel DAG butter are not found possibly because of a changed metabolic pathway of butterfat.

Projektets baggrund og formål

I Japan (1999) og i USA (2005) er der kommet en ny type af olie på markedet, til f.eks. stegebrug, som indeholder op til 80% diacylglyceroler (DAG). Denne olie har vundet meget store markedsandele på grund af en række ernæringsmæssigt relevante effekter. De væsentligste af disse effekter er, at DAG-olierne ikke giver anledning til vægtforøgelse ligesom de heller ikke giver anledning til fedtaflejring i leveren og forhøjet blodlipidniveau efter indtagelse. Strukturen af DAG ses i figur 1.



Figur 1: Struktur af DAG. DAG findes på to isomere former: 1,3-DAG (ca. 70 %) og 1,2(3)-DAG (ca. 30 %).

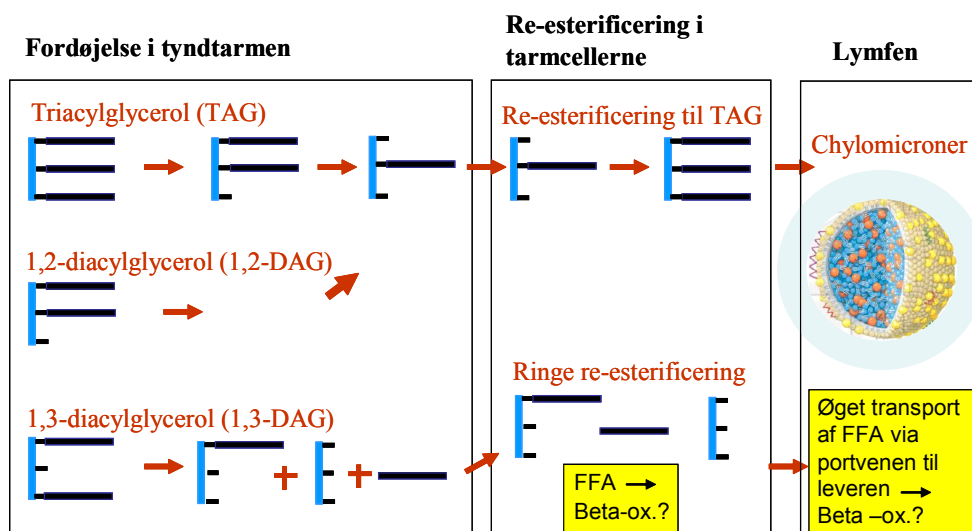
Forbruget af smørprodukter bestående af smørfedt blandet med sundere vegetabilsk fedt er steget kraftigt i de senere år. Idéen bag dette projekt var derfor at blande DAG-olie med smør i stedet for rapsolie, som i Kærgården, hvorved der muligvis kan opnås samme ernæringsmæssige fordele, som er vist for den rene DAG-olie.

Et af formålene med dette projekt har været at screene lipaser og herefter optimere den lipase-katalyserede fremstilling af DAG-olier. Efterfølgende opskaleredes processen til pilotskala med det mål at få produceret to forskellige DAG-olier med forskellig fedtsyreprofil. Disse DAG-olier blev så brugt til fremstilling af smørblandinger.

Kvaliteten af de nye smørblandingsprodukter med DAG-olie er af væsentlig betydning for en mulig fremtidig kommercialisering af produktet, da forbrugernes accept af produktet er afhængig af kvaliteten. Derfor var det også projektets formål at undersøge smørblandningernes oxidative stabilitet og sensoriske egenskaber.

En af hypoteserne til en forklaring på den reducerede fedtakkumulering af spisefedtstoffer baseret på DAG er, at der mangler 2-monoacylglyceroler (MAG) i tarmcellerne til re-syntese af TAG, fordi DAG-olien har et højt indhold af 1,3-DAG. Acylgrupperne i 1,3-DAG hydrolyseres til frie fedtsyrer og transporteres via portvenesystemet; se figur 2. Dette projekt havde derfor til mål at undersøge lipidsammensætningen i portveneblood efter indtagelse af henholdsvis DAG- og TAG-olie i grise for at teste den nævnte hypotese.

Fodringseffekter af de nye smørblandinger med DAG-olie sammenlignet både med en kontrol-smørblanding men også med den rene DAG-olie ønskedes undersøgt i rotter i dette projekt. Herved kunne det undersøges hvorvidt den nye type smørblandingsprodukt med DAG-olie iblandet har samme positive effekter på bl.a. fedtakkumuleringen som tidligere har været vist for ren DAG-olie. Endvidere ønskedes også balance og respirationsundersøgelser af både smørblandinger og rene olier udført. Hvis acylgrupperne i 1,3-DAG transporteres via portåresystemet til leveren i form af frie fedtsyrer og direkte bruges til oxidation, vil DAG muligvis have en nitrogenbesparende effekt og medvirke til en øget fedtforbrænding. Derfor blev nitrogenbalancen (nitrogenretention og nitrogenfordøjelighed) bestemt på basis af målinger af lipid- og proteinindtaget og koncentrationer af de samme komponenter i fæces og urinen af rotter. Forbrændingen af fedt og protein blev ligeledes bestemt ud fra balance og respirationsmålinger.



Figur 2: Smpel skematisk præsntation af fordøjelse og re-esterificering til TAG i tarmcellerne efter indtagelse af henholdsvis TAG, 1,2-DAG og 1,3-DAG.

Resultater

Procesoptimering og produktion af DAG olier

Seks kommercielle lipaser er blevet screenet for deres evne til at danne DAG i en glycerolyse reaktion (olie og glycerol). Acylglycerol-sammensætningen er fulgt i alle screeningsreaktioner over en periode på 28 timer. Screeningen viste at Novozym 435 og Lipase PS-D gav det højeste udbytte af DAG på 60 wt %. Desuden blev det fundet at i en glycerolyse reaktion foretrækkes en ikke-specifik lipase frem for en 1,3-specifik lipase, da de ikke-specifikke lipaser giver det højeste indhold af den sn-1,3 isomere form af DAG.

Efterfølgende er den kommercielle lipase, Novozym 435, brugt til et optimeringsforsøg (glycerolyse) i batch vha. Response Surface Methodology (RSM). Til dette er software programmet Modde 6.0 benyttet til generering og evaluering af det statistiske eksperimentelle design. Optimeringen viste at et udbytte på 72 vægt % DAG skulle være muligt med følgende optimale parametre: Reaktionsetid ca. 13-14 timer, enzym mængde ca. 9-10 wt % af olie massen, temperatur ca. 65°C, vandindhold ca. 2-3 vægt % af glycerol massen og olie/glycerol ratio ca. 2 mol/mol. Udbyttet var dog stadig ca. 60 vægt % DAG under de optimale reaktionsbetingelser. Dette skyldtes højst sandsynligt en ligevægt i reaktionen som det eksperimentelle design ikke er i stand til at tage højde for. Diverse forsøg på at rykke ligevægten i glycerolyse reaktionen mod et højere DAG udbytte var ikke nogen succes. Disse resultater viste samlet set at glycerolyse.reaktionen med Novozym 435 var meget stabil, da markante ændringer i reaktionsparametrene ikke medførte et markant fald i DAG-indholdet i reaktionsblandingen. Den stabile reaktion vil være en fordel industrielt, da variationen fra batch til batch herved vil være lav.

Et studenterprojekt viste, at det er muligt at fremstille DAG i en kontinuert proces med Novozym 435. Processen havde et udbytte på ca. 50 vægt % DAG. Glycerolmængden i den kontinuerte proces kunne nedsættes til et molært forhold af olie til glycerol på 3:1. Det er meget positivt, at glycerolyse-reaktionen kunne give så højt et DAG-udbytte med så lavt et

glycerol-indhold, da et lavt glycerol-indhold var ønskeligt pga. glycerols mulige negative indflydelse på en kontinuert proces.

Produktionerne af DAG-olie i pilotskala (ca. 20 kg olie) gav et udbytte på mellem 50-60 vægt % DAG. Optimeringen af oprensningen på SPD-anlægget gav følgende resultat: Frie fedtsyrer og MAG kunne fjernes som destillat ved 175°C i første trin og DAG kunne opsamles som destillat ved 250-260°C i andet og tredje trin. Herved blev TAG tilbage som remanens.

Produktionen af to forskellige DAG-olier resulterede i to færdigoprensede olier med et indhold af DAG på 92 vægt %, hvor de resterende 8 vægt % er MAG. Den isomere ratio mellem *sn*-1,2(2,3)-DAG og *sn*-1,3-DAG i olierne er ca. 35:65. Fedtsyreprofilen af DAG-olierne sammenlignet med de to udgangsolier, rapsolie og solsikkeolie, var stort set ens, hvilket var vigtig i forbindelse med ernæringsforsøgene. Indholdet af frie fedtsyrer var ligeledes ens i DAG-olierne og udgangsolierne (0,04-0,05 %); se tabel 1. Det lave FFA-indhold var vigtigt for den sensoriske evaluering, da FFA smager dårligt.

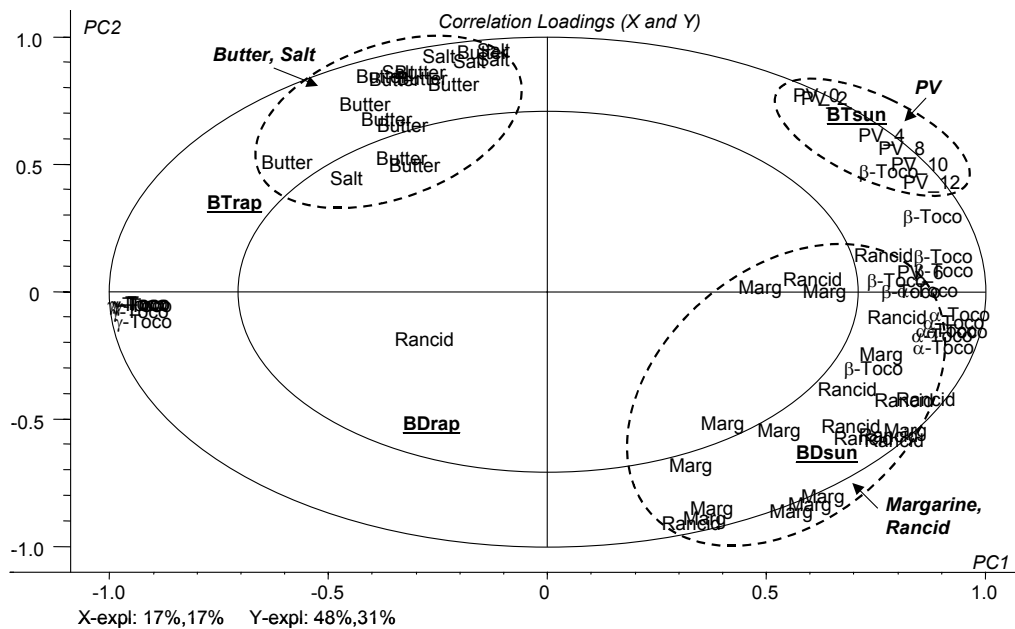
Tabel 1: Karakterisering af de oprensede DAG-olier og af de olier, de er produceret ud fra.

	Rapsolie	DAG olie (raps)	Solsikkeolie	DAG olie (solsikke)
Mængde oprenset olie (kg)	-	≈ 20	-	≈ 21
FFA (vægt %) ^a	0,04	0,05	0,04	0,05
α-TE (mg/kg) ^b	419	331	606	526
Acylglycerol sammensætning (vægt %):				
TAG	100	n.d.	100	n.d.
1,3-DAG	n.d. ^c	58	n.d.	57
1,2-DAG	n.d.	35	n.d.	35
MAG	n.d.	7	n.d.	8
FA-profil (vægt % FA):				
16:0	4,8	5,1	5,9	6,0
18:0	1,7	2,0	3,9	3,9
18:1 n-9	57,1	54,7	25,6	25,8
18:1 n-7	3,2	3,1	0,9	0,9
18:2 n-6	21,1	24,1	61,3	61,0
18:3 n-3	9,1	8,4	0,9	0,9
20:0	0,5	0,5	0,3	0,3
20:1 n-9	1,2	1,2	0,3	0,3
22:0	0,4	0,4	0,7	0,6
Andre	0,9	0,5	0,2	0,3

^a n=2, ^b α-TE = α-tocopherol ækvivalenter, n=2, ^c n.d. = not detected.

Oxidativ stabilitet og sensorisk evaluering af DAG-produkter

Data fra holdbarhedsstudiet med de 4 smørblandinger er blevet behandlet i softwareprogrammet Unscrambler. Resultaterne fra den multivariate databehandling er vist i figur 3 for parametrene: Peroxidtal, tocopherol-indhold og sensorisk evaluering.



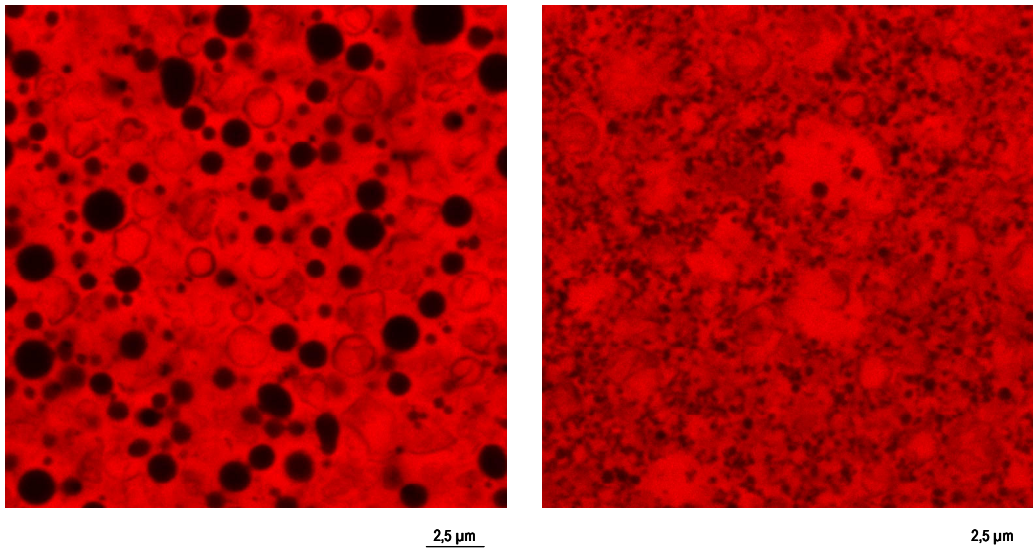
Figur 3: Correlation loading plot af APLSR analysen for holdbarhedsstudiet af smørblandinger (model = PC3). X-data er: smørblandinger med solsikkeolie (BTsun), med DAG-olie af solsikkeolie (BDsun), med rapsolie (BTrap) og med DAG-olie af rapsolie (BDráp). Y-data er peroxid-tal (PV), tocopherol-indhold (toco) og sensoriske residualer (butter, salt, rancid, marg). Den inderste ellipse indikerer at 50 % af variationen i data er forklaret og den ydre ellipse at 100 % af variansen i data er forklaret.

Loading plottet i figur 3 viser, at BTrap (smørblanding med rapsolie) var positivt korreleret med salt og smørsmag, BDSol (smørblanding med DAG-olie (af solsikke)) var positivt korreleret med harsk og margarine, BTsun (smørblanding med solsikkeolie) korrelerede positivt med peroxid tal og BDráp (smørblanding med DAG-olie (af rapsolie)) var fint beskrevet af modellen, men korrelerede ikke positivt med noget men negativt med peroxid-tal.

Forsøgene har vist, at DAG-olie fremstillet ud fra rapsolie kan bruges i smørblandinger, da holdbarheden var magen til smørblandinger med almindelig rapsolie. Peroxid-værdierne (PV) samt udviklingen af flygtige stoffer med ubehagelig lugt/smag var minimal og ligner udviklingen i smørblandinger med almindelig rapsolie. Mht. den sensoriske bedømmelse smagte smørblandingerne med DAG-olie af rapsolie meget neutralt. Hermed forstås, at de smagte mindre salt og herved også mindre af ”smør”. Smagsegenskaberne skal derfor optimeres, hvis der skal foretages udvikling til markedet.

På baggrund af de sensoriske resultater blev det derfor besluttet at undersøge vanddråbestørrelsen i smørblandingerne vha. confocal laser scanning microscopy (CLSM), da det har indflydelse på saltsmagen. Figur 4 viser, at vanddråbestørrelsen var meget mindre i smørblandingen med DAG-olie af rapsolie sammenlignet med smørblandingen med rapsolie. De små vanddråber skyldtes, at denne smørblanding havde en meget høj

emulsionsstabilitet. De mindre vanddråber bevirker, at den smag, som er i vandfasen (bl.a. salt) bliver langsommere frigivet i munden og derfor ikke opfattes som værende særlig kraftig. Større vanddråber kunne sandsynligvis fås ved at tilsætte emulgatorer med en høj HLB-værdi (hydrofil lipofil balance) eller evt. hydrolyseret valleprotein til smørblandingerne. En anden mulighed er at ændre på procesparametrene for smørblandingsfremstillingen.



Figur 4: Konfokal laser scanning mikroskopibilleder af smørblanding med rapsolie (til venstre) og med DAG-olie (af rapsolie) (til højre). De sorte områder er vanddråber og de røde er fedtfasen.

Smørblandinger med DAG-olie fremstillet ud fra solsikkeolie samt med almindelig solsikkeolie blev hurtigere harske end smørblandinger med rapsolie. Dette var formentlig forårsaget af det højere indhold af flerumættede fedtsyrer i solsikkeolie, da disse har lettere ved at blive oxideret. Solsikkeolie var derfor ikke egnet i smørblandinger - hverken som almindelig olie eller som DAG-olie.

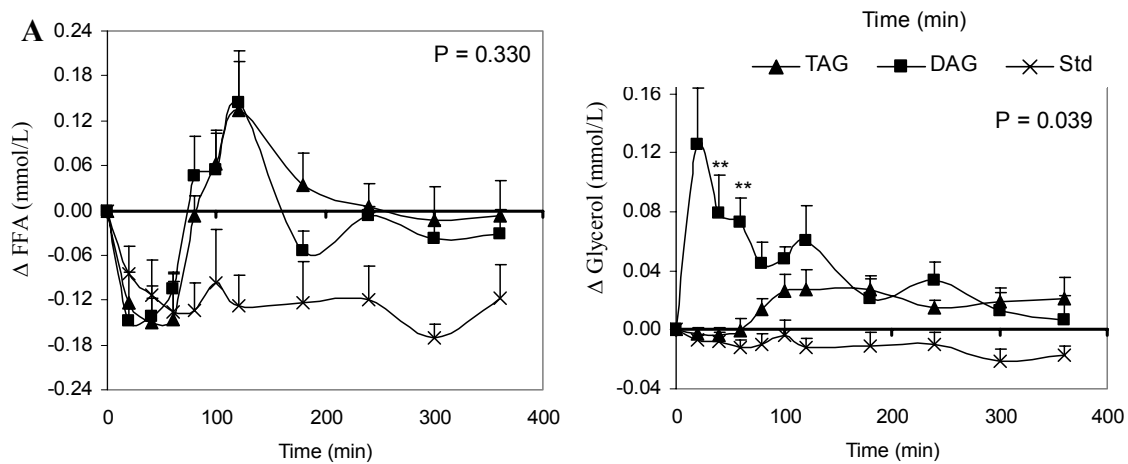
Der er også blevet målt sekundære flygtige stoffer i prøverne fra holdbarhedsstudiet med smørblandingerne. Resultaterne af den multivariate dataanalyse af disse data støtter de konklusioner, der er præsenteret ovenfor på baggrund PV og de sensoriske resultater.

Absorption og metabolisme af DAG-holdige produkter

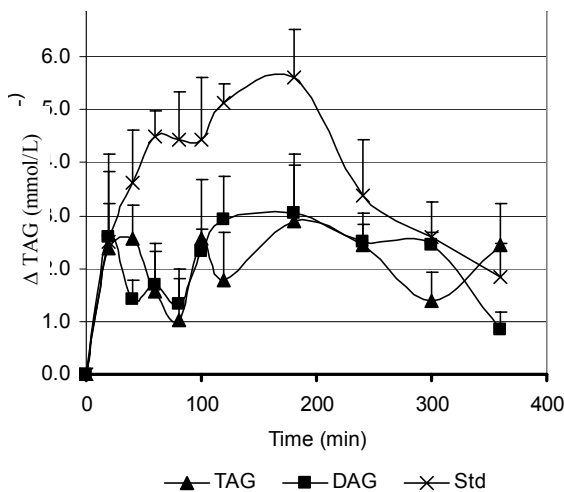
Absorptionen til portvenen efter bolusfodring af grise med enten DAG-olie, TAG-olie (hér rapsolie) eller med standard grisefoder er blevet undersøgt. Resultaterne viste, at der ikke er en målbar forskel på niveauet af frie fedtsyrer i portvenen efter bolusfodring med enten TAG-olie eller DAG-olie af raps; se figur 5. På den baggrund kunne hypotesen om øget transport af frie fedtsyrer via portvenen efter indtagelse af DAG-olier forkastes. Til gengæld var der et signifikant højere niveau af glycerol i portvenen den første time efter bolusfodring med DAG-olie sammenlignet med almindelig TAG-olie og standard grisefoder; se figur 5. Dette er et nyt resultat inden for DAG-forskningsområdet. At mere glycerol blev transporteret via portvenen indikerer at fordøjelsen i tarmen samt

metabolismen i tarmcellerne er anderledes efter indtag af DAG-olie sammenlignet med almindelig TAG-olie, da frit glycerol bliver syntetiseret til en højere grad.

Desuden viste resultaterne fra griseforsøget, at det sen-postprandiale niveau af triacylglycerol (TAG) i arterieplasma var lavere efter bolusfodring med DAG-olie sammenlignet med niveauet efter fodring med almindelig TAG-olie (af rapsolie); se figur 6. Dette resultat er blevet bekræftet af analyse af individuelle fedtsyrer samt af total fedtsyre-niveau i arterieplasma, hvor det også blev fundet, at niveauet var lavere efter indtagelse af DAG-olie. Disse observationer er i overensstemmelse med tidligere resultater fra forsøg med DAG-olie.



Figur 5: Ændring fra fastende niveau (Δ) af plasma frie fedtsyrer (NEFA) (A) og glycerol (B) i portvenen efter bolusfodring med TAG, DAG og standard grisefoder. Gennemsnit + SEM, n=6 for DAG og TAG og n=3 for standard grisefoder. #P < 0.05, ** P < 0.001, *** P < 0.0001.



Figur 6: Ændring fra fastende niveau (Δ) af plasma-TAG i arterieplasma efter bolusfodring med TAG, DAG og standardfoder. Gennemsnit + SEM, n=6 for DAG og TAG og n=3 for standardfoder. #P < 0.05

Et fodrings- og balancestudie i rotter blev udført med fire forskellige diæter baseret på rapsolie: DAG- hhv. TAG-olie, smørblanding med DAG- hhv. TAG-olie.

De fire diæter havde ingen indflydelse på kropsvægten efter de 7 ugers fodring. Undersøgelse af den endelige kropssammensætning viste, at diæten med DAG-olie medførte et signifikant lavere akkumulering af legemsfedt sammenlignet med kontrolgruppen, som havde fået almindelig rapsolie (TAG-olie) i foderet. Modsat blev det fundet, at det nye smørblandsingsprodukt med DAG-olie medførte et højere forhold i mængden af abdominalfedt i forhold til kropsvægt sammenlignet med kontrolgruppen, der havde fået smørblanding med rapsolie (TAG-olie); se tabel 2. Årsagen til den øgede fedtaflejring ved fodring med den DAG-olieholdige smørblanding skyldtes formodentlig en ændret metabolisme af fedtsyrerne fra smørfedt. Normalt vil en del af de mellemkædede fedtsyrer fra smørfedt efter absorption til tarmcellerne blive transporteret via portvenen til leveren, hvor de forbrændes til energi. Når smørfedt indgives sammen med DAG-olie, sker der sandsynligvis en ændret metabolisme i tarmcellerne, som formindsker transporten af de mellemkædede fedtsyrer via portvenen. I stedet bliver de inkorporerede i chylomicroner, som transporteres via lymfen til blodbanen, hvorefter fedtet hovedsageligt aflejres i fedtvæv.

Resultaterne viste også, at DAG-olie-gruppen havde et højere indhold af protein i den endelige kropssammensætning (se tabel 2), hvilket er i god overensstemmelse med det lavere legemsfedtindhold. For DAG-smørblandsingsgruppen gør det modsatte sig gældende: Et signifikant lavere proteinindhold i den endelige kropssammensætning blev observeret. Dette stemmer også overens med at højt forhold mellem mængden af abdominalfedt i forhold til kropsvægt.

Tabel 2: Effekter af fodring med de fire diæter på kropsvægt, endelig kropssammensætning, levervægt og – fedtindhold og vægt af abdominalt fedtvæv.

	<u>Smørblandinger</u>		<u>Olier</u>		<u>P-værdi</u>	
	<u>TAG</u>	<u>DAG</u>	<u>TAG</u>	<u>DAG</u>	<u>Over-ordnet</u>	<u>TAG vs. DAG*</u>
Kropsvægt, start (g)	66,6	67,1	67,0	66,3	0,94	0,91
Kropsvægt, slut (g)	294,2	287,5	284,6	268,9	0,21	0,20
Daglig vægtforøgelse (g)	5,4	5,2	5,2	4,8	0,29	0,23
<u>Endelig kropssammensætning</u>						
Protein (N x 6.25), g/kg DM	610 ^a	561 ^b	584 ^b	648 ^a	0,014	0,67
Fedt, g/kg DM	318 ^{ab}	357 ^a	348 ^a	273 ^b	0,029	0,39
Aske, g/kg DM	122	89	106	99	0,10	0,036
Energi, MJ/kg DM	26,04 ^a	26,41 ^a	26,39 ^a	24,68 ^b	0,012	0,084
<u>Lever og abdominalt fedt**:</u>						
Lever vægt (g)	8,46	8,19	8,08	7,55	0,152	0,160
Lever vægt /kropsvægt (%)	2,90	2,86	2,86	2,86	0,972	0,951
Fedtindhold i lever (% FA)	7,28	7,85	6,38	6,28	0,089	0,627
Abd. fedt vægt (g)	13,52 ^{ab}	17,42 ^a	14,86 ^{ab}	10,97 ^b	0,030	0,997
Abd. fedt vægt/ kropsvægt (%)	4,63 ^a	6,09 ^b	5,25 ^{ab}	4,16 ^a	0,017	0,753

Middelværdier i samme række der ikke har ens bogstav er forskellige $P < 0.05$. DM = tørstof. *Kontrast P-værdi for analysen af TAG data (olie + smør) versus DAG data (olie+ smør). ** Abd. fedt = abdominal fedt.

Beregning af protein-, fedt-, og energibalancer fra det kombinerede fodrings- og balancestudie viste, at der stort set ikke var nogen signifikante forskelle mellem rene DAG- og TAG-oliediæter eller for DAG- og TAG-smørblandingsdiæter. Den eneste forskel som blev observeret var, at mere protein blev forbrændt efter indtagelse af DAG-smørblending sammenlignet med kontroldiæten med TAG-smørblending. Dette var i god overensstemmelse med resultaterne af den endelige kropssammensætning, hvor et lavere proteinniveau blev målt for denne gruppe.

Overordnet set kunne balancestudiet ikke forklare den lavere fedtaflejring efter fodring med DAG-olie. Desuden viste balanceresultaterne, at effekterne af fodring med DAG-smørblending ikke var forårsaget af forskelle i foderindtag, fordøjelighed, formindsket varmeproduktion eller en øget energiflejring.

Konklusion

DAG-olie kan syntetiseres via lipase-katalyseret glycerolyse med den kommercielle lipase Novozym 435 med et udbytte på 60 vægt %. Denne proces er meget stabil, da samme DAG-udbytte opnås under varierende reaktionsbetingelser. Det er muligt at opskalere glycerolysereaktionen til pilotskala (20 kg olie) og få samme udbytte som i laboratorieskala.

Smørblandingsprodukter indeholdende 40 vægt % DAG-olie, der er produceret ud fra rapsolie, har en sammenlignelig oxidativ stabilitet med smørblandinger med almindelig rapsolie og smagen er neutral. Smagen af salt og smør mangler dog i den nye type smørblending. Dette skyldes højst sandsynligvis, at vanddråberne i smørblandinger med DAG-olie er meget mindre end i smørblandinger med almindelig olie, og frigivelsen af vandopløselige smagskomponenter derfor sker langsommere. En optimering af saltsmagen vil derfor være en nødvendighed.

Absorptionsstudiet i grise viste at der ikke er en øget transport af frie fedtsyrer efter indtagelse af DAG-olie, hvorfor denne hypotese kan forkastes. I stedet blev der observeret en signifikant højere transport af glycerol i portveneplasma som respons til bolusfodring af grise med DAG-olie. Dette bekræfter, at fordøjelse i tarmen og metabolismen i tarmcellerne er anderledes efter indtagelse af DAG-olie.

Fodringsstudiet i rotter viste, at mindre fedt blev aflejret i fedtvæv efter fodring i 7 uger med DAG-olie sammenlignet med TAG-olie. Modsat viste det sig, at mere fedt blev aflejret, når foderet indeholdt smørblending med DAG-olie sammenlignet med smørblending med almindelig TAG-olie. Kombinationen af mellemkædede fedtsyrer fra smørfedt og DAG-olie i DAG-smørblandingen er muligvis årsagen til den øgede fedtaflejring efter fodring med DAG-smørblandingen. Resultaterne fra balancestudiet kan ikke hjælpe med at forklare de observerede effekter af olie hhv. smørblandinger med DAG.

Publikationer mm.

Afhandling:

J. B. Kristensen, Production, Stability, and Nutritional Aspects of Diacylglycerol Oil and Butter Enriched with Diacylglycerols, Ph.d. thesis (Afleveret 2. december 2005)

Internationale tidsskrifter:

J. B. Kristensen, Xu, X., and Mu, H., Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis, *J. Agric. Food Chem.* Vol 53, pp 7059-7066 (2005).

J. B. Kristensen, Xu, X., and Mu, H., "Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercial available lipases", *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol 82 (5), pp 329-334 (2005).

J. B. Kristensen, Nielsen, N. S., Jacobsen, C., and Mu, H., "Oxidative stability and sensory evaluation of diacylglycerol oil and butter blends containing diacylglycerols", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (Accepteret Nov. 2005).

J. B. Kristensen, Jørgensen, H., Mu, H. "Portal vein absorption and postprandial effects of diacylglycerol oil catheterised pigs" *J. Nutr.* (Submitted Nov. 2005)

J. B. Kristensen, Jørgensen, H., and Mu, H., "Metabolism and feeding effects of diacylglycerol oil and butter blends containing diacylglycerol oil in rats", (Under udarbejdelse).

Indlæg til BioCentrums hjemmeside:

J. B. Kristensen, "Et smørprodukt tilsat en olie, som ikke feder – er det muligt?"
BioCentrums hjemmeside (juni 2005):
http://www.biocentrum.dtu.dk/studievalg_forside/historier/17_smoer.aspx

Studenter rapporter:

Sarah Linderstrøm-Lang, The effect of diacylglycerol on plasma lipids, Bachelor rapport (Afleveret 2. januar 2006)

Carlos León Canseco, Enzymatic production of diglycerides in a packed bed reactor, 15 ECTS point studenterrapport (Afleveret Maj 2004).

Faglige konference- og seminarpræsentationer

Mundtlig præsentation ved 23rd Nordic lipid symposium -Lipid Forum, Reykjavik, Island, juni 2005, J. B. Kristensen, Jørgensen, H., Jacobsen, K., Xu, X., and Mu, H., "Production of diacylglycerol oil and absorption study of diacylglycerols in piglets".

Mundtlig præsentation ved 96th AOCS Annual Meeting and Expo, Salt Lake City, Utah, USA, maj 2005, J. B. Kristensen, Nielsen, N. S., Jacobsen, C., Xu, X., and Mu, H., *"Enzymatic production of dietary diacylglycerols and stability and sensory evaluation of butter products containing diacylglycerols"*.

Posterpræsentation ved LMC Kongressen, DTU, Danmark, marts 2005, J. B. Kristensen, Nielsen, N. S., Jacobsen, C., and Mu, H., *"Stability and sensory evaluation of butter products containing diacylglycerols"*.

Posterpræsentation ved Enzymes in Lipid Technology - Lipid Forum, DTU, Danmark, januar 2005, J. B. Kristensen, Nielsen, N. S., Jacobsen, C., and Mu, H., *"Stability and sensory evaluation of butter products containing diacylglycerols"*.

Posterpræsentation ved 95th AOCS Annual Meeting and Expo, Cincinnati, Ohio, USA, maj 2004, J. B. Kristensen, Xu, X., and Mu, H., *"Process optimization for production of dietary diacylglycerols"*.

Posterpræsentation ved LMC Kongressen, DTU, Danmark, marts 2004, J. B. Kristensen, Xu, X., and Mu, H., *"Process optimization for production of dietary diacylglycerols"*.

Posterpræsentation ved 22nd Nordic lipid symposium - Lipid Forum, Naantali, Finland, juni 2003, J. B. Kristensen, Xu, X., and Mu, H., *"Lipase catalysed synthesis of diacylglycerols"*.

Samarbejdsrelationer

I forbindelse med den enzymatiske fremstilling af DAG olierne blev der etableret kontakt med Hans Christian Holm og Tommy Lykke Rasmussen fra Novozymes A/S. De har doneret forskellige lipaser samt immobiliseringsmateriale til screenings- og optimeringsforsøgene samt til stor-skala fremstillingen af DAG-olierne.

I forbindelse med fremstillingen af smørblandingsprodukter til stabilitets- og ernæringsforsøg blev der etableret samarbejde med Henrik K. Frederiksen fra Arla Foods amba, Holstebro. Arla Foods amba donerede smør mm. til fremstillingen af smørblandingsprodukterne og var ligeledes behjælpelige med selve fremstillingen i deres pilot udstyr.

Ulf Andersen fra Arla Foods amba i Brabrand har været behjælpelig med at måle vanddråbestørrelse i smørblandingsprodukterne. Disse analyseresultater var af stor betydning for tolkningen af den lave saltsmag i smørblandingsprodukterne med DAG-olie.

Videnskabelig betydning af projektet

Dette projekt har demonstreret, at det er muligt at producere DAG i storskala ved hjælp af en lipase-katalyseret glycerolyse reaktion, hvilket er et nyt resultat inden for produktion af DAG-olie. Herved fremlægges en ny enzym-katalyseret proces til storskala produktion af DAG-olie. Projektet viser ydermere, at frie fedtsyrer fra DAG-olie ikke transporteres via portvenen, men at glyceroltransporten via portvenen øget signifikant. Dette er nye videnskabelige beviser, som er meget vigtige for at forstå og klarlægge de metaboliske processer for DAG. Projektet bidrager også med yderligere information angående de ernæringsmæssige positive effekter forbundet med indtag og DAG-olie.

Indtagelse af en kombination af DAG-olie og smørfedt resulterede i en øget akkumulering af legemsfedt, hvilket indikerer at absorptionen af smørfedt bliver påvirket af DAG-olien. Vi bør derfor være opmærksomme overfor kommende DAG-produkter.

