



Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung
(Pflanzliche Nahrungsmittel)
DGQ e.V.

44. Vortragstagung

Pflanzenphenole
für die Gesundheit von Pflanze, Mensch und Tier

16.-17. März 2009
in Freising

44. Vortragstagung,
Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung
(Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V.

Wissenschaftliche Leitung:

Prof. Dr. H. Schulz, Quedlinburg, Präsident

Dr. U. Tietz, Potsdam

Prof. Dr. H. Bergmann, Jena

Dr. E. Höhn, Wädenswil

Prof. Dr. G. Rimbach, Kiel

Prof. Dr. B. Tauscher, Karlsruhe

Prof. Dr. D. Treutter, Freising

Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V.
Geschäftsstelle c/out Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz
Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesinstitut für Kulturpflanzen
Erwin-Baur-Str. 27
D-06484 Quedlinburg

Inhalt

Vorträge

	Seite
Vorwort, <i>D. Treutter</i>	1
Kinetik und Thermodynamik kooperativer Effekte bei der Interaktion phenolischer Antioxidanzien. <i>E.F. Elstner, J. Grassmann, M.A.J. Elstner</i>	2
Intestinal concentrations of polyphenols after apple juice consumption and their influence on cell permeability. <i>H. Bergmann, D. Rogoll, K. Kahle, W. Scheppach, R. Melcher, P. Schreier, E. Richling</i>	3
Beeinflussung der Flavonoid- und Hydroxycitronensäuregehalte in Gemüse und Kräutern durch Preharvest Maßnahmen. <i>E. M. Hubbermann, K. Bock, M. Schultze, B. Walter, B. Harbaum-Piayda, W. Bilger, K. Schworz</i>	5
Accumulation of phenolic compounds as influenced by N supply: a case study on catechins in green tea (<i>Camellia sinensis</i>). <i>J. Ruan, J. Gerendás</i>	7
Zusammensetzung der Flavonoide in Grünkohl (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i>) in Abhängigkeit vom Genotyp sowie den ökophysiologischen Faktoren Strahlung und Temperatur. <i>S. Schmidt, M. Zietz, M. Schreiner, S. Rohn, L.W. Kroh, A. Krumbein</i>	10
Trends in der Gewinnung und Fraktionierung phenolischer Antioxidanzien aus Reststoffen der Lebensmittelverarbeitung. <i>D. R. Kammerer, R. Carle</i>	13
Einfluss einer Anreicherung auf die Stabilität von Zwiebelflavonolglykosiden – Nutzen und Risiken <i>S. Rohn</i>	16
Degradation of flavonoids by intestinal microbiota studied in the pig cecum model <i>G. van 't Slot, H.-U. Humpf</i>	18
The re-invention of sainfoin: an example of a novel resource for sustainable agriculture <i>H. Halbwirth, K. Stich, I. Mueller-Harvey</i>	20
Anthelmintic effects of the so called tanniniferous forages <i>H. Hoste, F. Manolaraki, S. Brunet</i>	24

Effects of secondary metabolites on gut morphology and on the immunosystem in the gastro intestinal tract <i>M.W. Pfaffl</i>	26
Bioactive compounds of the plant and their role in a balanced diet <i>H. Heseker</i>	29
Impact of ApoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk – is there a role for natural antioxidants? <i>G. Rimbach</i>	31
Key inducers of oral astringency and bitter taste of plant-derived food products – What do we really know? <i>T. Hofmann</i>	33
Improvement of strawberry flavor through enhanced formation of phenylpropenes <i>W. Schwab</i>	35

Poster

No.	Seite
Phenolische Verbindungen in pflanzlichen Lebensmitteln /Analytische Chemie	
1 Determination of phenolic composition of different black chokeberry (<i>Aronia melanocarpa</i>) juices <i>T. Esatbeyoglu, S. Hillebrand, P. Winterhalter</i>	37
2 Preparative isolation of anthocyanins by countercurrent chromatography and application of the color activity concept to black carrot extract (<i>Daucus carota</i>) <i>E. Cuevas Montilla, S. Hillebrand, C. Dorau, P. Winterhalter</i>	40
3 Charakterisierung von Anthocyanen in Kulturpflanzen unter Einsatz der HPLC/MS-Kopplungstechnik <i>W. Schütze</i>	43
4 Bestimmung von Phenolcarbonsäuren in Nebenprodukten der Lebensmittel- und Agrarwirtschaft und ihrer antioxidativen Kapazität <i>J. Bauer, B. Harbaum-Piayda, K. Schwarz</i>	45
5 A new polyphenolic compound in refined rapeseed oil and its byproduct <i>B. Harbaum-Piayda, K. Oehlke, P. Zacchi, R. Eggers, K. Schwarz</i>	47
6 Phenolgehalte von Kakaoschalen unterschiedlicher Kakaotypen und Provenienzen und deren antioxidative Aktivität <i>C. Bruna, I. Eichholz, S. Huyskens-Keil, L.W. Kroh, S. Rohn</i>	49

- * 7 Characterisation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) condensed tannins by MALDI-TOF mass spectrometry 51
E. Stringano, A. Gea, R.K. Cramer, W.C. Hayes, I. Mueller-Harvey
- 8 Spotting Polyphenoles as Biomarkers: Spatial and temporal within plant distribution of selected polyphenolic compounds under controllend environment in two Pinot noir (*V. vinifera* L.) clones 55
K. Schödl, R. Schuhmacher, A. Forneck
- 9 Phenolanalyse in Früchten mit Hilfe zerstörungsfreier und zeitaufgelöster optischer Messmethoden 57
J.S. Wulf, S. Rühmann, D. Treutter, M. Zude
- 10 Phenolsäuren in alten Weizenarten (*Triticum*) - Vorstellung der Methode und erste Ergebnisse 58
N. Engert, R. Pätzold, B. Honermeier
- 11 Sainfoin phenolics: isolation, identification and their quantification in different plant organs 61
I. Regos, D. Treutter

Physiologie

- 12 Effects of pine pollen extracts on the proliferation of porcine ileal cell cultures 64
S. Masanetz, C. Kaufmann, T. Letzel, M. Pfaffl
- 13 Cellular uptake and localization of the flavonoid cyanidin in human keratinocytes in culture 68
I. Ernst, Wagner A.E., Lipinski S., Desel C., Rimbach G
- 14 Assessing the Effects of the Flavonoid Myricetin in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* 69
G. Grünf, B. Spanier and H. Daniel
- * 15 Effect of dietary genistein on phase II and antioxidant enzymes in rat liver 71
H. Wiegand, A.E. Wagner, C. Bösch-Saadatmandi, H.-P. Kruse, S. Kulling, G. Rimbach
- 16 Untersuchungen zum anti-inflammatorischen Potential von Quercetin in Makrophagen und im Modelltier Maus 72
C. Bösch-Saadatmandi, S. Wolfram, G. Rimbach

“Phytochemical Farming”, Umwelteffekte, Sorteneinfluss

- 17** Pflanzenschutzbehandlung oder Sortenwahl: Was beeinflusst den Polyphenolgehalt von Äpfeln? 73
M. Fischer, E. Arrigoni, M. Erzinger, H. Schärer, D. Baumgartner, A. Bozzi Nising, R.F. Hurrell
- 18** Bioverfügbarkeit und antioxidatives Potenzial von Polyphenolen aus ökologisch und konventionell angebauten Äpfeln in vitro und in vivo 76
C.E. Rüfer, B.A. Stracke, S. Häckel, F. Weibel, A. Bub, B. Watzl
- 19** Einfluss von elektrischem Strom auf die Phenolverteilung in Radieschen (*Raphanus sativus* L.) 79
D. Dannehl, S. Huyskens-Keil, U. Schmidt
- 20** Stimulation und Extraktion von bioaktiven, phenolischen Verbindungen aus pflanzlichen Zellkulturen 81
H. Riedel, M. Wiesner, O. Kütük, Z. Cai, I. Smetanska, I. Mewis, C. Ulrichs
- 21** Pre-Breeding and Development of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) 84
C. Hayot, I. Gadjev, G. Barbier, L. Smith
- 22** Polyphenole in der Artischocke (*Cynara cardunculus* ssp. *flavescens* WIKL.) – entwicklungsphysiologische und agronomische Einflussfaktoren 85
B. Honermeier, S. Ali, C. Matthes, S. Göttmann, F. Yan
- 23** Flavonoids and their formation in different sainfoin varieties (*Onobrychis viciifolia*) 88
J. Thill, H. Halbwirth, K. Schlangen, K. Stich, I. Regos, D. Treutter, C. Hayot, I. Gadjev, L. Smith
- 24** Managing Phenol Contents in Horticultural Crops. Why and How? 91
D. Treutter

Veränderung des Polyphenolgehaltes von Lebensmitteln durch Verarbeitung

- 25** Effect of thermal processing on phenolic content in a blue-fleshed potato (*Solanum tuberosum* L.) variety 93
S. Hillebrand, H. Storck, B. Hüsing, U. Schliephake, D. Trautz, M.-E. Herrmann, P. Winterhalter
- 26** Deglykosylierung von Flavonoidderivaten in Zwiebel (*Allium cepa* L.) während der Trocknung 96
B. Schulze, E. M. Hubbermann, K. Schwarz
- 27** Anreicherung von Polyphenolen in Buchweizen durch den Mälzungsprozess 98
M. Krahl, M. Zarnkow, W. Back, S. Kreis

 28	Technological Aspects of Anthocyanin Utilisation in Functional Foods M. Betz, A. Tolkach, U. Kulozik	100
--	---	-----

29	Effect of different conservation methods and maturity stages on peroxidase activity in sainfoin (<i>Onobrychis viciifolia</i>) A.F. Ahmad, K. Theodoridou, H. Halbwirth, J. Aufrère, K. Stich	104
----	--	-----

30	Effects of peroxidase und polyphenoloxidase on the color stability of strawberry nectar from puree H. Scherbichler, H. Halbwirth, M. Gössinger, K. Stich	107
----	---	-----

Verschiedenes

31	Einfluss des S-Angebots auf die Glutathion-Konzentration und die Qualität von Weizen D. Steinfurth, C. Zörb, M. Brockmann, K. H. Mühling	110
----	---	-----

32	Enhancing Fruit quality of sweet cherries (<i>P. avium</i>) through flower thinning K. Schoedel, P. Modl, A. Forneck	111
----	---	-----

33	Restoring the functionality of the <i>Vitis vinifera</i> L. anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by two site-directed point mutations L. Jánváry, T. Hoffmann, J. Pfeiffer, L. Hausmann, R. Töpfer, T. C. Fischer, W. Schwab	113
----	--	-----

34	Effect of different extraction methods on the volatile and non volatile phenol compounds of <i>Thymus pannonicus</i> All. and <i>Satureja montana</i> L. G. Kutta, Z. Pluhár, S. Sárosi, G. Sándor, G. Végyvári	115
----	--	-----

35	The effect of lack of water on the malondialdehyde (MDA) content, total antioxidant capacity and total phenol content of savory (<i>Satureja hortensis</i> L.) K. Inotai, P. Radácsi, S. Sárosi, P. Czövek, É. Németh, J. Bernáth	116
----	---	-----

36	Effect of the lack of water on the antioxidant capacity, total phenol content, essential oil content and essential oil quality of basil (<i>Ocimum basilicum</i> L.) P. Radácsi, K. Inotai, S. Sárosi, E. Kiss, É. Németh, J. Bernáth	118
----	---	-----

Autorenregister		120
------------------------	--	-----



Vorwort

Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe sind weit verbreitete Sekundärmetaboliten mit großer struktureller Diversität und vielfältigen Funktionen. Pflanzen mit der Fähigkeit, ein besonderes Spektrum an Sekundärstoffen anzureichern, konnten sich während der Evolution offenbar einen Selektionsvorteil verschaffen. Denn viele Eigenschaften der Pflanzenphenole sind nutzbringend für die Pflanzen selbst, wenn sie z.B. als Stressmetaboliten akkumulieren und die Resistenz gegen widrige Umwelteinflüsse sowie gegen Schädlinge und Pathogene unterstützen. Ebenso bedeutsam sind ihre Funktionen als Signalmoleküle und als Regulatoren von Pflanzenwachstum und Entwicklung. Diese beruhen auf vielfältigen biologischen Effekten, die z.B. durch Wechselwirkungen mit diversen Enzymen sowie durch antioxidative und genregulatorische Aktivitäten bedingt sind.

Aufgrund dessen zählen phenolische Verbindungen zu den prominenten bioaktiven Substanzen, die auch die Gesundheit von Mensch und Tier signifikant beeinflussen. Zahlreiche Studien weisen beispielsweise auf ihre Bedeutung bei der Prävention kardiovaskulärer Störungen und Tumorerkrankungen hin. Pflanzenphenole leisten somit einen nicht zu unterschätzenden Beitrag zur „inneren“ Qualität pflanzlicher Nahrungsmittel.

Relevante Auswahlkriterien für die Entwicklung unserer Nahrungs-, Heil- und Gewürzpflanzen sind in erster Linie Nahrungsqualität bzw. Heilwirkung aber auch optische Erscheinung und organoleptische Eigenschaften wie Geschmack, Aroma und Textur. Auch in diesen Bereichen sind phenolische Strukturen substantiell beteiligt wie z.B. die adstringierenden oder bitteren Tannine, süße Flavanoglycoside, das flüchtige Vanillin oder die farbgebenden Flavonole, Chalkone und Anthocyane.

Der Beitrag von Pflanzenphenolen zur Qualität pflanzlicher Nahrungs- und Futtermittel mit besonderem Fokus auf die Gesundheit und das allgemeine Wohlbefinden von Mensch und Tier ist Gegenstand der 44. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung.

Dieter Treutter, Freising



Kinetik und Thermodynamik kooperativer Effekte bei der Interaktion phenolischer Antioxidanzien

Erich F. Elstner¹, Johanna Grassmann¹ und Marcus A. J. Elstner²,

¹Techn. Univ. München, Freising – Weihenstephan, ²Techn. Univ. Braunschweig

Es ist vielfach gezeigt worden, dass Naturstoffe wie die Vitamine C, A, oder E mit bestimmten Naturstoffen wie Flavonoiden oder p-Chinonen als Antioxidanzien gegen *oxidativen Stress* synergistisch zusammenwirken. Meist wird aber bei der Bewertung von *in vitro* Daten nicht berücksichtigt, dass die entsprechenden Redox- Reaktionen in verschiedenen Kompartimenten, d. h. in der hydrophilen oder lipophilen Phase zellulärer Räume ablaufen. Von herausragender Bedeutung sind daher:

- 1) Kinetische Daten der Aufnahme, Verteilung und Funktion lipophiler Substanzen in hydrophilen Räumen und umgekehrt, sowie
- 2) Kinetik und Thermodynamik der Redox - Interaktion dieser Substanzen über die Kompartimentgrenzen hinweg.

Am Beispiel des antioxidativen Schutzes im LDL - Partikel wird die Interaktion von Flavonoiden wie Rutin und Vitamin C sowie Ubichinon mit alpha-Tocopherol und der alpha-Liponsäure anhand spektralphotometrischer, kinetischer Daten gezeigt. Darüber hinaus legen komplexe, quantenstatistische Berechnungen nahe, dass dieser Oxidationsschutz der ungesättigten Fettsäuren, der im LDL-Partikel durch das Vitamin E erfolgen kann, über eine Reaktionskaskade von alpha- Liponsäure - Ubichinon an die alpha - Ketosäure-Dehydrogenase (Pyruvat, Ketoglutarat) des intermediären Metabolismus angeknüpft und thermodynamisch begünstigt abläuft.



Intestinal concentrations of polyphenols after apple juice consumption and their influence on cell permeability

Hannah Bergmann¹, Dorothee Rogoll², Kathrin Kahle³, Wolfgang Scheppach^{2,4}, Ralph Melcher², Peter Schreier³, Elke Richling¹

¹ Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Toxicology, University of Kaiserslautern, Erwin-Schroedinger-Str. 52, 67663 Kaiserslautern, Germany;

² Department of Medicine II, Division of Gastroenterology, University of Wuerzburg, Grombuehlstr. 16, 97080 Wuerzburg, Germany; ³ Department of Food Chemistry, University of Wuerzburg, Am Hubland, 97074 Wuerzburg, Germany; ⁴ Juliusspital Wuerzburg, Juliuspromenade 16, 97070 Wuerzburg, Germany

Apple polyphenols show positive health effects that strongly depend on their bioavailability. Their colonic availability was investigated in subjects who have undergone colectomy at the terminal ileum. Subjects consumed one liter of cloudy apple juice with known polyphenol content. In the ileostomy fluids more than 40% of the ingested polyphenols - and corresponding metabolites - were detected. In order to assess the absorption and metabolism of these substances across the intestinal epithelium, monolayers of colon carcinoma cells (T84 cell line) mounted in Ussing-type chambers were incubated in the presence of physiological concentrations of various hydroxycinnamic acids (including ferulic, isoferulic, cinnamic, and hydrocinnamic acids) and flavonoids. Polyphenol concentrations on the apical, basolateral side and cell-associated were determined by HPLC-DAD. Depending on their polarity the studied compounds passed from the apical to the basolateral side of the monolayers. Metabolites, such as glucuronides and sulphates were detectable in the model system at supra-physiological concentrations. Additionally the status of tight junctions (TJ) – bonds between epithelial cells consisting of proteins providing a barrier for molecules and ions – was studied by measuring transepithelial resistance (TER) and expression of TJ proteins using real-time PCR. During incubation experiments with polyphenols TER of the monolayers was increasing whereas exposure to sodium caprate (C10), a tight TJ modulator, decreased TER, but was reversible by incubation with polyphenols. C10 did not promote fluxes of hydroxycinnamic acids across the monolayers. In parallel, a significant increase in expression of the TJ components ZO-1 and claudin-4, but reductions in occludin expression were observed using real-time PCR analysis.

Our results provide confirmation that T84 cells can be used as model system to simulate the intestinal mucosa, and that polyphenols are able to increase the TER of C10-treated and -untreated T84 monolayers.

The study was performed as a part of NutritionNet, supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF); projects 01EA0102 and 01EA0501.



Beeinflussung der Flavonoid- und Hydroxyzimtsäuregehalte in Gemüse und Kräutern durch Preharvest Maßnahmen

*Eva Maria Hubbermann¹, Katrin Bock¹, Matthias Schultze², Bettina Walter¹, Britta
Harbaum-Piayda¹, Wolfgang Bilger², Karin Schwarz¹*

¹Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Abteilung
Lebensmitteltechnologie

²Botanisches Institut, Abteilung Ökophysiologie der Pflanzen
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Epidemiologische Studien zeigen protektive Funktionen eines hohen Obst- und Gemüseverzehrs in Hinblick auf die Entstehung chronischer Erkrankungen. Insbesondere für Flavonole lässt sich eine protektive Wirkung auf Herz-Kreislaufkrankungen ableiten (Arts und Hollman, 2005). Bei der Produktion von pflanzlichen Lebensmitteln ist es daher wünschenswert, dass hohe Gehalte an diesen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen erzielt werden.

Der Pflanze dienen Polyphenole insbesondere Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren als Faktoren gegen unterschiedliche Stresssituationen, vor allem als Abschirmung vor schädigender UV-B Strahlung. Sie sind daher überwiegend in den Epidermiszellen der Pflanzen lokalisiert. Für *Arabidopsis thaliana* L., der üblichen Modellpflanze für klassische und molekulargenetische Studien, konnte gezeigt werden, dass unter anderem UV-B Strahlung sowie Kühle die Synthese von Polyphenolen induziert (Lois, 1994; Bilger et al., 2007). Die Akkumulation der phenolischen Verbindungen in der Epidermis lässt sich mittels UV-A PAM Messungen, einer nicht-invasiven Methode auf der Basis von Chlorophyllfluoreszenz, als epidermale Absorption bestimmen (Bilger et al.; 2001).

Ziel war es, den Einfluss von UV-B Strahlung und Kühle auf die Biosynthese von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäuren in Pflanzen zu untersuchen, deren Blätter der menschlichen Ernährung dienen. Aufgrund ihres signifikanten Polyphenolgehaltes wurden Pak Choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*), ein im asiatischen Raum stark konsumierter Kohl, sowie die Kräuter Dill (*Anethum graveolens*), Koriander (*Coriandrum sativum*) und Liebstöckel (*Levisticum officinale*) aus der Familie der Apiacea ausgewählt (Justesen und Knuthsen, 2001). Pak Choi ist reich an Triglykosiden des Flavonols Kämpferol, die mit unterschiedlichen

Hydroxyzimtsäuren verestert sind, sowie verschiedenen Malaten von Hydroxyzimtsäuren (Harbaum et al. 2007). In den Kräutern konnten mittels HPLC-MS die Flavonole Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin in Form unterschiedlicher Derivate sowie Chinasäureester von Hydroxyzimtsäuren, vor allem der Kaffeesäure, nachgewiesen werden.

Eine Kultivierung von Pak Choi bei 21 bzw. 9°C sowie mit bzw. ohne die Applikation von UV-B Strahlung zeigte, dass vor allem die Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der epidermalen Absorption der Pflanzen führte. Zusätzlich stieg die epidermale Absorption auch durch die Kultivierung bei Kühle an. Ähnliche Einflüsse konnten auch auf die epidermale Absorption der untersuchten Kräuter beobachtet werden.

Hinsichtlich des Polyphenolspektrums hatten sowohl der Faktor UV-B Strahlung als auch der Faktor Temperatur einen signifikanten Einfluss. Bei 9°C führte die Bestrahlung mit UV-B Licht zu einer Akkumulation von Hydroxyzimtsäuren, während diese sich bei 22°C zwischen mit oder ohne Bestrahlung in ihrer Konzentration nicht unterschieden. Bei 9°C kam es schon durch den Einfluss von Kühle zu einer Erhöhung des Flavonoidspiegels, welcher durch UV-B Einfluss nur noch geringfügig gesteigert werden konnte. Bei 22°C hingegen wurden ohne den Einfluss von UV-B Strahlung relativ wenig Flavonoide gebildet, dieser Gehalt ließ sich jedoch durch Bestrahlung deutlich steigern. Die Analyse handelsüblicher Topfware von Dill, Koriander und Liebstöckel zeigte, dass diese nur geringe Mengen an Polyphenolen aufwiesen. Dies lässt sich vermutlich auf die Produktionsweise dieser Pflanzen unter UV-B Licht armen Bedingungen in Gewächshäusern zurückführen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann abgeleitet werden, dass der Gehalt an bioaktiven Polyphenolen in Nutzpflanzen durch entsprechend gewählte Kultivierungsbedingungen, wie z.B. die Anwendung von UV-Strahlung oder die Freilandkultivierung, deutlich beeinflusst werden kann.

Literatur

- Arts, I.C, Hollman, P.C. (2005): Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 317S-325S.
- Bilger, W., Johnsen T., Schreiber, U. (2001): UV-excited chlorophyll fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants. *J. Exp. Bot.* 52, 2007-2014.
- Bilger, W., Rolland, M., Nybakken, L. (2007): UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 190-195.
- Harbaum, B., Hubbermann, E.M., Wolff, C., Herges, R., Zhu, Z., Schwarz, K. (2007): Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSⁿ and NMR and their quantification by HPLC-DAD. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8251-8260.
- Justesen, U., Knuthsen, P. (2001): Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem.* 73, 245-250.
- Lois, R. (1994): Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* 194, 498-503.



Accumulation of phenolic compounds as influenced by N supply: a case study on catechins in green tea (*Camellia sinensis*)

Jianyun Ruan¹, Józsa Gerendás²

¹ Tea Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou
310008, China.

² Institute for Plant Nutrition and Soil Science, Kiel University, Kiel, D-24098, Germany.

Background

Tea is amongst the most popular beverages in the world. In addition to the provision of phenolic compounds (mostly flavonoids of the catechin group), it is an important source of caffeine and trace elements. The quality of green tea (GT) in terms of commerce and trade is merely governed by the ratio of polyphenols (PP) to free amino acids (AA), in addition to numerous further compounds determining the flavour characteristics. The concentration of free AA is positively associated with GT quality and accounts for 10-50 mg g⁻¹ dry matter in marketed GT. Free AA principally contribute to the freshness and mellowness of the infusion and their profile is dominated by the rare amino acid theanine (N⁵-ethyl-glutamine). The flavonoids in GT, which comprise 20-40% of dry matter of young tea shoots are dominated by catechins (flavan-3-ol), accounting for 10-30 % of the dry matter.

Provision of nitrogen (N) has far-reaching consequences for the performance of plants at the biochemical, ecophysiological and ecosystem level. Nitrogen strongly affects the use of environmental resources (water, light), and in many cases a competition has been observed between N and carbon (C) allocation, which also led to the development of theoretical concepts, like the protein competition model and the carbon/nutrient balance model addressing the functional relationship between these pools. Green tea represents an ideal model system to study such interaction both from an ecophysiological and applied point of view.

Results and Interpretation

Increasing N supply significantly raised total biomass production and the yield of young shoots ('two and a bud'), although this was solely attributed to an increased number of young shoots. The level of N supply induced substantial alterations in the N and C economy of tea plants. Total N concentration increased and C/N ratio continuously decreased with increasing N supply. The concentrations of soluble carbohydrates in roots and mature leaves were significantly reduced in response to excessive N supply, due to the demand for assimilates for nutrient uptake, assimilation and growth.

The accumulation of AA in young shoots depended largely on the N status, and decreased significantly in plants supplied inadequately with N. Graphical vector analysis (GVA, Koricheva, 1999, *Oecologia* 119, 467-473), allowing the contribution of growth-induced dilution and concentration effects on phytochemical concentration to be elucidated, indicated that increasing provision of N led to a genuine increase of AA synthesis, and this relation was particularly explicit when analysed on a 'per shoot basis'. Theanine always remained the predominant free AA, supporting its importance in long-distance N transport in tea plants. However, while its molar share of the total AA contents initially increased from 24 to 47 % with increasing provision of N, under conditions of excessive N supply its share was reduced to 38 %. A concomitant raise of the relative contribution of glutamine and arginine that increased to 20 and 15 % of the total free AA concentration, respectively, accompanied this change, which has also been observed in previous experiments (Ruan et al., 2007, *J. Sci. Food Agric* 87, 1505-1516). The accumulation of these amino acids, characterised by lower C/N ratios (theanine [7/2], glutamine [5/2], arginine [6/4]), most likely stems from metabolic adjustments to improve the C economy, as frequently observed in other woody plants. The higher demand for C skeletons under such conditions is further supported by an increasing PEPC activity.

The major catechin was epigallocatechin gallate, followed by epigallocatechin, epicatechin gallate and epicatechin. Catechin was only present at low concentrations, similar to gallic acid (1-2 mg g⁻¹). Overall, individual catechins exhibited a uniform response to the N treatments imposed; hence their profile was not significantly affected. Highest concentrations of catechins were detected at intermediate N supply, while a strong reduction was noted at the highest level of N supply that also led to maximal N concentrations and lowest C/N ratios. This response has also been observed in other plant species and discussed in relation to the protein competition model (e.g. Strissel et al., 2005, *Plant Biol.* 7, 677-685) and the carbon/nutrient balance (e.g. Bryant et al., 1983, *Oikos* 40, 357-368). GVA clearly indicates that the total content of PP per plant increased regardless of declining PP concentrations under abundant N supply, suggesting that a dilution effect due to biomass growth is involved. Indeed, as the yield (number of shoots) was strongly increased at excessive N supply, the PP accumulation on a 'young shoot basis' was strongly diminished. With respect to

substrate availability and energy the C status has been discussed as a critical factor for the accumulation of phenolic compounds (Rühmann et al., 2002). Diverting the C flux to N metabolism is therefore an important factor contributing to the observed reduction in PP accumulation, and the declining availability of carbohydrates is also analogue to substantially increased concentrations of AA, which is further supported by enhanced activities of (anapleurotic) PEPC and glutamine synthetase (GS) under abundant N supply.

The precursor of the phenylpropanoid pathway, free phenylalanine (Phe), increased in young shoots in response to increasing N supply, but the magnitude of this increase was much smaller than that of the major amino acids mentioned above. Surprisingly, activity of leaf phenylalanine-ammonia lyase (PAL), the key enzyme of the phenylpropanoid pathway, increased with external N supply and plant N status, and the relation of polyphenols accumulation to the activity of PAL was negative (-0.60). In fact, activities of PAL and GS were highly correlated ($r^2 = 0.85$), which is interpreted as a positive influence of N supply on overall metabolic activity, rather than a mechanistic link between PAL activity and the accumulation of polyphenols. Nonetheless, elucidating the relationships among N supply, the accumulation of flavonoids, and the activity of enzymes involved in their biosynthesis in tea awaits further investigations.

The results indicate that the balance between growth and secondary metabolism in tea plants is shifted toward increasing synthesis of growth-related compounds such as amino acids and proteins, while investment of C into secondary metabolites is not changing proportionally. The quality index PP/AA decreased curvilinearly with increasing N status and the C/N ratio in young shoots. While a high GT quality is associated with a low PP/AA ratio, the accumulation of free arginine in response to excessive N supply needs particular attention due to the adverse taste notes attributed to this amino acid.



Zusammensetzung der Flavonoide in Grünkohl (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) in Abhängigkeit vom Genotyp sowie den ökophysiologischen Faktoren Strahlung und Temperatur

Schmidt, S.¹, Zietz, M.², Schreiner, M.¹, Rohn, S.², Kroh, L. W.², Krumbein, A.¹

¹Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Theodor-Echtermeyer-Weg 1, D-14979 Großbeeren; ²Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Fachgebiet Lebensmittelanalytik, TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin

Grünkohl ist reich an gesundheitsbeeinflussenden Flavonoiden. An Hand eines Sortenspektrums sollen Flavonoidglykoside in Grünkohl identifiziert werden, wobei zunächst die Ermittlung der Aglykone im Vordergrund stand. Der Einfluss des Genotyps und der ökophysiologischen Faktoren Strahlung und Temperatur auf die Flavonolaglykone wurde untersucht.

Zur Erfassung des genotypischen Einflusses auf die Bildung der Flavonoide wurden acht Grünkohlarten (drei traditionelle Herkünfte und Sorten: 'Altmärker Braunkohl' (mit grünen als auch rot gefärbten Blättern), 'Lerchenzunge', Halbhoher grüner Krauser' und vier Hybridsorten 'Winterbor', 'Redbor', 'Winnetou', 'Arsis' sowie die Sorte 'Frostara') auf Freilandflächen angebaut. Zur Untersuchung des Einflusses der ökophysiologischen Faktoren (durchschnittliche Tagesmitteltemperatur und durchschnittliche tägliche Globalstrahlung) wurden die Sorten im Abstand von vier Wochen an vier Terminen (Oktober 2007 (9,6 °C; 712 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), November 2007 (6,0 °C; 258 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Dezember 2007 (3,8 °C; 179 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und Januar 2008 (0,3 °C; 172 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)) geerntet.

Zur Untersuchung der Flavonoidaglykone in Grünkohl wurden methanolische Extrakte einer sauren Hydrolyse unterzogen (50% Methanol mit 1,6M HCl bei 100°C). Die Flavonoidaglykone wurden mittels HPLC-DAD-ESI-MS/MS an einer ODS 3 Säule (150 x 3mm, 5 μm) mit einem Wasser/ Acetonitrilgradienten getrennt. Als Trocknungsgas im MS bei negativem Modus diente Stickstoff bei einem Verneblungsdruck von 40 psi, einem Fluss von 12 L/min und 350 °C. Die Quantifizierung der Flavonolaglykone

erfolgte bei einer Wellenlänge von 370nm. Für die Flavonoidglykoside wurden methanolische Extrakte von Grünkohl mit HPLC-DAD-ESI-MS/MS und einem Wasser/Acetonitrilgradienten getrennt.

In den acht untersuchten Grünkohlarten konnten die Aglykone Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin mit Hilfe ihrer deprotonierten Molekülonen bei m/z 301 für Quercetin, m/z 285 für Kämpferol und m/z 315 für Isorhamnetin identifiziert werden. Zusätzlich wurden im MS² die Fragmentionen m/z 179 und 151 für Quercetin, m/z 151 für Kämpferol und m/z 300 für Isorhamnetin ermittelt.

Erste Untersuchungen zu den Flavonoidglykosiden (über 60 Peaks) zeigten, dass Glucose als Mono- bzw. Disaccharid sowohl eine 1→6-glykosidische Bindung aufweisen kann (Abspaltung von m/z 162 bzw. 324) aber auch eine 1→2-glykosidische Bindung (zusätzliche Abspaltung von m/z 180) haben kann. Ebenso waren Hinweise auf eine ein- bis mehrfache Veresterung der Flavonoidglykoside mit den Hydroxycarbonsäuren Ferulasäure (m/z 194 oder dehydriert m/z 176), Sinapinsäure (m/z 224 oder dehydriert m/z 206) und Kaffeesäure (m/z 180 oder dehydriert m/z 162) zu finden.

Als Hauptaglykon wurde für alle Sorten am ersten Erntetermin Kämpferol mit einem Gehalt von 56-201 mg/100g Frischmasse (FM) gefolgt von Quercetin (15-96 mg/100g FM) und Isorhamnetin (Spuren bis 74 mg/100g FM) gefunden. Als flavonoidreichste Sorte erwies sich der 'Altmärker Braunkohl'. Der Gesamt-flavonolgehalt in mg/g Trockenmasse (TM) veränderte sich in sechs von acht Sorten nicht signifikant über die vier Ernten. Interessant war jedoch, dass in fünf dieser sechs Sorten ('Winterbor', 'Redbor', 'Altmärker Braunkohl', 'Halbhoher grüner Krauser' und 'Lerchenzunge') über die vier Ernten der Quercetiningehalt signifikant anstieg, während der Kämpferolgehalt signifikant abnahm. In den Sorten 'Redbor', 'Altmärker Braunkohl' in grüner Ausfärbung sowie 'Lerchenzunge' wurde Quercetin am vierten Erntetermin zum Hauptflavonoid. Zusätzlich war in vier dieser fünf Sorten ('Winterbor', 'Redbor', 'Halbhoher grüner Krauser' und 'Lerchenzunge') auch ein signifikanter Anstieg des Isorhamnetingehaltes zu finden. Mit zunehmender Ernte nahmen die durchschnittliche Tagesmitteltemperatur und die durchschnittliche tägliche Globalstrahlung ab. Bei geringeren Temperaturen wird allgemein mit einer Erhöhung des Flavonoidgehaltes gerechnet, wie bei Quercetin zu finden war. Der Flavonoidgehalt sollte bei einer geringeren Strahlung jedoch sinken, was für Kämpferol gefunden wurde. Geringere Temperaturen senken die Aktivität der DNA-Reparaturenzyme¹. Es kann daher zu Imbalancen zwischen den durch die Strahlung noch verursachten DNA-Schäden und deren durch die niedrigen Temperaturen verringerter Reparatur kommen. Neben der Absorption schädlicher Wellenlängen der Strahlung spielen Flavonoide auch beim Quenchen reaktiver Sauerstoffspezies eine große Rolle. Zum Schutz der DNA kann eine

lichtabhängige Induktion der Enzyme Phenylalaninammoniumlyase und Chalconsynthase des Flavonoidbiosyntheseweges stattfinden.¹ Eine weitere Hydroxylierung des Kämpferols durch das Enzym Flavonol-3'-hydroxylase, welches unter anderem durch UV-B Strahlung induziert werden kann, führt zum Quercetin.² Das *ortho*-Dihydroxyphenol Quercetin ist in der Lage durch Abspaltung von 2 Wasserstoffatomen ein Chinon zu bilden und ist damit antioxidativ wirksamer als Kämpferol.² Die Ergebnisse zeigten, dass die Biosynthese der Flavonole durch eine Wechselwirkung von Temperatur und Strahlung beeinflusst wird.

Zur weiteren Aufklärung sollen Versuche unter definierten Temperatur- und Strahlungsbedingungen durchgeführt werden. Diese Versuche dienen auch der Ermittlung von Anbaustrategien im Sinne von *functional food*.

¹ Bilger et al., Photobiol. Sci., **2007**; 6: 190- 195, ² Edreva, Agriculture, Ecosystems and Environment **2005**; 106: 135- 146



Trends in der Gewinnung und Fraktionierung phenolischer Antioxidantien aus Reststoffen der Lebensmittelverarbeitung

Dietmar R. Kammerer, Reinhold Carle

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Lehrstuhl *Lebensmittel pflanzlicher Herkunft*, Universität Hohenheim, Garbenstrasse 25, 70599 Stuttgart

Ausgangssituation

Phenolische Verbindungen wurden in der Vergangenheit aufgrund nachteiliger Effekte bei der Verarbeitung pflanzlicher Rohwaren vielfach negativ bewertet. So sind sie z.B. für enzymatische Bräunungsreaktionen oder Trübungen bei der Lagerung von Fruchtsäften und Bier verantwortlich. Daneben wurden antinutritive Eigenschaften diskutiert, wie z.B. die Hemmung von Verdauungsenzymen oder eine Reduktion der Mineralstoffresorption. Diese Sichtweise hat sich signifikant geändert, nachdem eine Reihe potentiell gesundheitsfördernder Eigenschaften der Polyphenole beschrieben wurde, die möglicherweise für die positiven Effekte einer betont vegetabilen Ernährung verantwortlich sind [1]. Polyphenolreiche Extrakte werden deshalb zunehmend bei der Herstellung sog. funktioneller oder angereicherter Lebensmittel eingesetzt. Außerdem können phenolische Komponenten zu technologischen Zwecken als Alternative zu synthetischen Antioxidantien oder als natürliche Lebensmittelfarbstoffe bzw. färbende Lebensmittel verwendet werden, weshalb vermehrt Quellen für die Gewinnung dieser pflanzlichen Sekundärmetabolite gesucht werden.

Polyphenole sind hauptsächlich in den epidermalen und subepidermalen Zellschichten lokalisiert, die im Zuge der Lebensmittelverarbeitung, z.B. beim Schälen, entfernt werden oder bei der Saftgewinnung nur unvollständig extrahiert werden. Aus diesem Grund sind die Nebenprodukte der Verarbeitung pflanzlicher Lebensmittel i.a. besonders polyphenolreich und werden deshalb zur Gewinnung von Phenolextrakten eingesetzt [2]. Die Phenole werden üblicherweise durch wässrig-alkoholische Extraktion und anschließende Konzentrierung durch destillative Entfernung des Alkohols gewonnen. Aufgrund der Verwendung organischer Lösungsmittel sind derartige Verfahren mit erheblichen Nachteilen verbunden. Alternativ werden Antho-

cyane mit sulfitierten Lösungsmitteln zur Maximierung der Extraktausbeute gewonnen. Die Sulfite lassen sich allerdings nur unvollständig entfernen, was aufgrund pseudoallergischer Reaktionen nach dem Verzehr sulfitierter Lebensmittel zu Problemen führen kann.

Alternativen zu herkömmlichen Gewinnungsverfahren

Aufgrund dieser Nachteile konventioneller Extraktionsverfahren wurde eine Reihe innovativer Technologien für die kostengünstige und umweltfreundliche Gewinnung phenolischer Verbindungen entwickelt. Als Alternative zur Sulfitextraktion von Anthocyanen hat sich die enzymatische Hydrolyse pflanzlicher Zellwandpolysaccharide mittels Pektinasen, Cellulasen und Hemicellulasen zur Verbesserung der Extraktionsausbeute bereits mehrfach als vielversprechendes Verfahren erwiesen. Als weitere innovative Technologie wurde die Anwendung gepulster elektrischer Felder im Rahmen der Extraktgewinnung erprobt. Daneben ließe sich für die Extraktion von Reststoffen der Obst- und Gemüseverarbeitung auch die über- bzw. unterkritische Extraktion mit umweltfreundlichen Solventien wie CO₂, ggf. unter Zusatz organischer Modifier, bzw. reinem Wasser anwenden. Neuere Verfahren, wie die „Flash Release Treatment“, wurden zwar für einen derartigen Einsatzbereich noch nicht erprobt, zeigen aber vielversprechende Eigenschaften, die einen Praxisvergleich mit konventionellen Extraktionsmethoden rechtfertigen.

Für die Aufreinigung bzw. Konzentrierung der polyphenolhaltigen Rohextrakte stehen ebenfalls zahlreiche Verfahren zur Verfügung. Die Adsorbertechnologie hat bereits breiten Eingang in lebensmitteltechnologische Prozesse gefunden, u.a. zur Entbitterung von Zitrus Säften oder zur Stabilisierung und Standardisierung von Säften und Saftkonzentraten. Sie lässt sich darüber hinaus zur Gewinnung und schonenden Aufkonzentrierung phenolischer Verbindungen einsetzen. Prinzipiell sind auch Ultrafiltrationstechniken zur Fraktionierung der Extraktivstoffe gemäß ihrer Molekülgröße geeignet. Eine vielversprechende Möglichkeit zur Fraktionierung polyphenolhaltiger Extrakte bis hin zur Gewinnung hochreiner Einzelsubstanzen stellt die High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC) dar.

Aktuelle Anwendungsbeispiele

Für Traubentrester wurde ein Verfahren zur enzymgestützten wässrigen Extraktion phenolischer Komponenten etabliert [3,4]. Die Tresterrohextrakte wurden mittels eines Styrol-Divinylbenzol-Copolymers aufgearbeitet und die phenolischen Verbindungen nach alkoholischer Elution schonend aufkonzentriert [5]. Die aufgereinigten Präparate wurden in einer Bioverfügbarkeitsstudie eingesetzt bzw. mittels HSCCC weiter fraktioniert [6]. Daneben wurde aus den Pressrückständen der Sonnenblumenölgewinnung ein protein- und polyphenolhaltiger Rohextrakt

gewonnen. Aus diesem wurden unter Einsatz der Adsorbertechnologie aufgereinigte Polyphenolpräparate und zugleich ein für Lebensmittelapplikationen einsetzbares Protein gewonnen [7].

Literatur

- [1] P.C.H. Hollmann, M.B. Katan (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 937-942.
- [2] A. Schieber, F.C. Stintzing, R. Carle (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology* **12**, 401-413.
- [3] D. Kammerer, A. Claus, A. Schieber, R. Carle (2005) A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science* **70**, 157-163.
- [4] T. Maier, A. Göppert, D.R. Kammerer, A. Schieber, R. Carle (2008) Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *European Food Research and Technology* **227**, 267-275.
- [5] D. Kammerer, J. Gajdos Kljusuric, R. Carle, A. Schieber (2005) Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *European Food Research and Technology* **220**, 431-437.
- [6] T. Maier, S. Sanzenbacher, D.R. Kammerer, N. Berardini, J. Conrad, U. Beifuss, R. Carle, A. Schieber (2006) Isolation of hydroxycinnamoyltartaric acids from grape pomace by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1128**, 61-67.
- [7] G.M. Weisz, C. Pickardt, S. Neidhart, D.R. Kammerer, R. Carle (2008) Nachhaltige Lebensmittelproduktion – Gewinnung von Wertstoffen aus den Rückständen der Sonnenblumenölgewinnung. 66. FEI-Jahrestagung, 04.09.2008, Hohenheim, Tagungsband S. 43-60.



Einfluss einer Anreicherung auf die Stabilität von Zwiebelflavonolglykosiden – Nutzen und Risiken

Rohn, S.

Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie und
Lebensmittelchemie, Fachgebiet Lebensmittelanalytik, TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee
25, D- 13355 Berlin

Die zunehmenden Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen Ernährung und Gesundheit verstärken das Interesse der Verbraucher an gesunder Ernährung. Infolge dessen reagiert die Ernährungswirtschaft mit einer vermehrten Berücksichtigung gesundheitlicher Wirkungen bei der Produktentwicklung und der Verwendung von *Health Claims*. Im allgemeinen Sprachgebrauch werden derartige Lebensmittel als funktionelle Lebensmittel oder *Functional Food* bezeichnet. Die Diskussion um funktionelle Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel auf Basis von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wird seit Jahren kontrovers geführt, da die wissenschaftlichen Grundlagen für eine gesundheitsfördernde Wirkung in den meisten Fällen noch nicht hinreichend belegt sind. Dies betrifft nicht nur die physiologischen Wirkungen nach dem Konsum entsprechender Verbindungen, sondern beginnt eigentlich schon mit der Unkenntnis der Stabilität solcher Verbindungen in Lebensmitteln.

Neben Modelluntersuchungen konnte am Beispiel von Zwiebeln gezeigt werden, dass ausgewählte Einflussfaktoren zu einer Abnahme der Konzentration der phenolischen Verbindungen führen können[1/2]. Zu diesen Einflussfaktoren zählen vor allem die Struktur der phenolischen Verbindungen, der pH-Wert, aber auch die Temperatur, die bei der Be- und Verarbeitung der pflanzlichen Rohstoffe angewendet wird. Beim Kochen im wässrigen System entsteht aus den Flavonolen in Abhängigkeit von den genannten Faktoren eine Vielzahl oxidativ gebildeter, niedermolekularer Abbauprodukte. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Oxidation zu den entsprechenden Chinonen, die eine zentrale Rolle für die weiteren Reaktionen (auch solche mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen) spielen[1/3]. Flavonolglykoside zeigen unter Bedingungen der Trocknung oder Röstung eine Freisetzung der Aglykone, die keinem weiteren thermischen Abbauunterliegen[2].

In einem Anbauversuch konnte die Konzentration und das Profil der Flavonolglykoside in Zwiebeln durch ausgewählte Versorgungssituationen gezielt angereichert bzw. verändert werden[4]. Bei der anschließenden thermischen Behandlung erwies sich dabei ein Profil mit hohem Gehalt an Quercetin-3,4'-diglukosid als vorteilhaft, da das gebildete Intermediat Quercetin-4'-monoglucosid im weiteren Verlauf langsamer abgebaut wird[2/5] und sowohl eine erhöhte Bioverfügbarkeit verglichen mit dem Diglukosid[6], als auch eine geringere Cyto- bzw. Genotoxizität verglichen mit dem Aglykon Quercetin besitzt[7].

Diese Studien zeigen, dass in Kenntnis der Stabilität der phenolischen Verbindungen und den entsprechenden Einflussfaktoren, die Möglichkeit besteht eine optimale Zusammensetzung (Phenolprofil) in Nahrungspflanzen zu erzielen, die im weiteren Verlauf der Be- und Verarbeitung stabil bleibt und den ernährungsphysiologischen Aspekten wie Bioverfügbarkeit, *Risk/Benefit*-Bewertung o.ä. gerecht werden kann.

Literature

- [1] Buchner et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3229; [2] Rohn et al., *J. Agric.*
- [1] Buchner et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3229;
- [2] Rohn et al., *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1568;
- [3] Kroll et al., *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, *9*, 205;
- [4] Perner et al., *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3538;
- [5] Rohn et al., *eingereicht*; [6] Day et al., *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *65*, 1199;
- [7] Rohn et al., *Proc. German Nutr. Soc.* **2008**, *12*, 39.



Degradation of flavonoids by intestinal microbiota studied in the pig cecum model

Gordon van 't Slot, Hans-Ulrich Humpf

Institut für Lebensmittelchemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster,
Corrensstraße 45, 48149 Münster, email: humpf@uni-muenster.de

In our daily diet, we ingest flavonoids by consuming fruits, vegetables and any kind of plant-based foods and beverages (e.g. coffee, tea, wine and chocolate). Flavonoids are well known for their antioxidative properties and experimental studies using animals or cultured human cell lines support a role of polyphenols in the prevention of cardiovascular diseases, cancer, neurodegenerative diseases, diabetes or osteoporosis [1, 2].

However, the data on the bioavailability of polyphenols are very limited and mainly based on the analysis of blood, urine or more seldom fecal samples. Information of intestinal absorption and metabolic abilities of the gut microbiota is scarce. For this reason different *in-vitro* systems have been developed studying the metabolism by the intestinal microbiota. However, most *in-vitro* experiments are not comparable with the *in-vivo* conditions. Models using single bacterial species represent only a small section of the complex gut microbiota with its more than 400 bacterial species. Most of these species (~95 %) are fastidious anaerobes. During colon passage the oxygen amounts rises continuously discriminating most of the microorganisms existing in the upper parts of the intestine, what is critical for models working with microbiota isolated from fecal samples.

For a better reproducibility of the *in-vivo* conditions, we have recently developed a new *ex-vivo* model system [3, 4]. Here, the gut microbiota is directly isolated from the cecum and colon ascendens of freshly slaughtered pigs under strict anaerobic conditions. The pigs were bred in biodynamic farming, excluding the influence of drugs, especially antibiotics and having a more varied diet. The characterization of the pig cecal microbiota by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 16S rRNA-based

oligonucleotide probes confirmed that the pig cecum is an excellent model to mimic the human intestinal metabolism of flavonoids [5].

The isolated inoculum was suspended in a phosphate buffer containing a trace element solution. To maintain anaerobiosis, the buffer was supplemented with a reducing reagent and flushed with a mixture of nitrogen and carbon dioxide. The incubation of flavonoids with the cecal microbiota was performed on a microscale. Vitality and metabolic efficiency of the microbiota was investigated by microbial marker enzymes such as α -D-galactosidase and enzymes depending on the analyte type. Degradation and deglycosylation of the substances were identified and quantified during the incubation with HPLC-DAD and -FLD. Liberated phenolic metabolites were measured with GC-MS.

In this presentation the pig cecum model will be described in detail and the intestinal metabolism of flavonoids with different aglycones, sugar moieties, and types of glycosidic bonds will be presented [3-7]. Most of the tested compounds were metabolized by the gut microbiota and these results clearly indicate that the intestinal metabolism plays an important role in the metabolism of flavonoids.

Literature

- [1] C. Rice-Evans, J.P.E. Spencer, H. Schroeter, A.R. Rechner, Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo, *Drug Metab. Drug Interact.* 2000, 17, 291-310.
- [2] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45, 287-306.
- [3] W. Seefelder, Fumonisine und deren Reaktionsprodukte in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung, biologische Aktivität und Metabolismus, Dissertation, University of Würzburg, Germany, 2002.
- [4] K. Keppler, H.-U. Humpf, Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora, *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 5195-5205.
- [5] E. Hein, K. Rose, G. van 't Slot, A.W. Friedrich, H.-U. Humpf, Deconjugation and Degradation of Flavonol Glycosides by Pig Cecal Microbiota Characterized by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 2281-2290
- [6] K. Keppler, E. Hein, H.-U. Humpf, Metabolism of quercetin and rutin by the pig caecal microflora prepared by freeze preservation, *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 686-695.
- [7] G. van 't Slot, H.-U. Humpf, Degradation of flavan-3-ols and derivatives by intestinal microbiota in the pig-cecum-model, *submitted*.



The re-invention of sainfoin: an example of a novel resource for sustainable agriculture (HEALTHYHAY)

Heidi Halbwirth^a, Karl Stich^a, Irene Mueller-Harvey^b

^aInstitut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften,
Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9, A-1060 Vienna, Tel.: +43 1 58801
17320, fax.: +43 1 58801 17399, e-mail: kstich@mail.zserv.tuwien.ac.at

^b Agriculture, Nutritional Sciences Research Unit - Chemistry&Biochemistry
Laboratory, University Reading, Whiteknights, RG6 6AH Reading, U. K.

New or improved forage legumes are needed because of existing and predicted protein shortages in animal feeds [1]. As a result, home-grown protein sources are becoming of increasing importance in animal feeds. Global warming will furthermore increase the demand for legume species that are better adapted to seasonal drought conditions [2, 3]. The amino acid composition of plant proteins matches the requirements of animals for milk, meat and wool protein synthesis much better than microbial proteins [4, 5]. Legumes are important protein sources for animal feed and soybean is a classic example of the successful development and exploitation of plant proteins. The production of beans, peas, red clover and lupins is supported in the EU to reduce dependency on imported protein feed ingredients and each has its strengths and weaknesses in terms of protein provision [6, 7]. Lucerne, a common feed ingredient for ruminants, has benefited from intensive breeding programmes and, as a result, produces high agronomic yields. However, lucerne also suffers from several disadvantages: i) low protein utilisation by ruminants with concomitant high nitrogen losses into the environment [8], ii) high susceptibility to *Verticillium* wilt [9, 10] and iii) it is not suited to alkaline soils which cover much of Central and Southern Europe [11]. Farmers in these areas have to rely instead on either clover or imported protein sources for ruminants and horses. However, sainfoin is a traditional European fodder legume and does not suffer from these disadvantages; it has an excellent nutritive value and its protein is used much more efficiently because it contains tannins [12, 13].

Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) was grown in Europe before the widespread use of commercial fertilisers in the 1950s [14]. It is an excellent fodder legume with very high

voluntary intakes by cattle, sheep and horses [4, 8]. Moreover, ruminants utilise sainfoin protein much more efficiently than lucerne or soya protein (i.e. 50% improvement in net absorption of intestinal amino acids) [16]. Similarly, the efficiency with which the metabolisable energy (ME) in sainfoin is utilised is much higher than for grass of equal ME content [16]. More efficient nutrient utilisation from sainfoin leads to less environmental pollution in terms of nitrogen and methane emissions. This is important because ruminants, and especially dairy cows, are major contributors to environmental pollution. Research also suggests that because sainfoin possesses special natural products, i.e. tannins, it produces anti-parasitic effects. This could explain why it is such a good fodder for young livestock (lambs, calves). As sainfoin contains nutrients, that are used more efficiently, and natural compounds, that act against parasites, it is a fodder legume that is ideal for sustainable livestock farming systems.

The existing sainfoin germplasm varies in several important characteristics [12, 17, 18]. Although the early growth habit of sainfoin gives a higher forage yield in spring than Lucerne [19], sainfoin is not widely used due to its inferior agronomic performance compared to lucerne or clover [20]. Various breeding programmes have successfully improved the agronomic performance of both lucerne and clover varieties, but little research has been directed towards improving sainfoin varieties in Europe. Sainfoin has a deep taproot and thrives on well-drained, alkaline soils in many parts of Central and Southern Europe. Doyle et al. [21] outlined three targets for a sainfoin breeding programme: (1) a 35% increase in dry matter yield, (2) a lower seed requirement for good establishment, and (3) a higher yield of viable seed per unit area. A few trials have already shown that sainfoin yields can be increased significantly [22].

HEALTHYHAY - Main innovations and contribution

- Existing sainfoin varieties will be studied for good agronomic performance and optimum biological properties. The ideal combination is unlikely to occur within the same lines. HEALTHYHAY will discover essential information so that new sainfoin breeding programmes can be started in future.
- Very little sainfoin selection has occurred in Europe for many years and where it did the emphasis was on better agronomic yields. HEALTHYHAY will establish a unique germplasm collection in the EU, multiply seeds and conduct some pre-breeding trials. Agronomic trials will provide information on potentially promising sainfoin varieties for different EU regions. This will enable a brand-new approach for future plant breeding, where improved yield will be linked to useful biological effects (ruminant health, nutrient utilisation and environmental emissions).

- The proposed research will use novel methods to isolate tannins and apply state-of-the-art instruments to characterise the tannins and their interactions with proteins. The biological effects of different tannin types from contrasting sainfoin varieties will be assessed using a suite of techniques for measuring in vitro, in situ and in vivo digestibility. Quantitative molecular techniques will study rumen functioning and nutrient utilisation in response to sainfoin varieties and tannins.
- HEALTHYHAY will investigate the biochemical synthesis of tannins and polyphenols in sainfoin and describe its genetic status. It will for the first time attempt to elucidate the structure-function relationships between phenylpropanoid metabolism and beneficial nutritional and environmental effects. If this approach is successful, novel screening tools will result that can underpin breeding programmes for sainfoin and other tannin-containing plants in the future.

Literature

1. MAFF/MDC/MLC. Alternative sources of plant proteins. ENTEC UK Ltd & Genus Ltd. 1997, Rep. No. 32200
2. Martiniello & Ciola, *Grass For. Sci.* (1994) 49, 121
3. Mowrey & Volesky, *J. Range Man.* (1993) 46, 539
4. Waghorn et al., *Proc N Z Grassl Assoc* (1990), 51, 171
5. Mangan, *Nutr. Res. Rev.* (1988), 1, 209
6. Friedman et al., *Agric. Food Chem.* (2001), 49, 1069
7. Molvig et al., *Focus on Biotechnol.* (2003) 10B, 213
8. Karnezos et al., *Agron. J.* (1994), 86, 497
9. O' Rourke, *Diseases Grass. & For. Leg. in Ireland*, Oak Park Res. Centre, 1976
10. Dixon, *NIAB Fellows Conf. Report No.1*, 4-11, 1977
11. Oosterbaan on website: www.waterlog.info, Mar 2003
12. Hedqvist et al., *Anim. Feed. Sci. Technol.* (2000) 87, 41
13. Marais et al., *J. Agric. Food Chem.* (2000) 48, 3440
14. Koivisto and Lane, *FAO* (2001)
<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/AddInfo/sainfoin.pdf>
15. Griggs and Matches, *Crop Sci.* (1991), 31, 1267
16. Thomson, 'Future of Sainfoin in Brit. Agriculture'. *Grassl. Res. Inst., Hurley, UK* 1982
17. Krasnaya & Zinchenko, *Fiziol. Biokhim. Kul'turnykh Rastenii* (1975) 7, 199
18. Fraser et al., *Grass. & For. Sci.* (2000), 55, 271
19. Lu et al. *Science in China, Series C: Life Sciences* (2000) 43, 387

20. Thomson, 'Future of Sainfoin in Brit. Agriculture'. Grassl. Res. Inst., Hurley, UK 1982, p8
21. Doyle et al., Grass Forage Sci. (1984) 39, 43
22. <http://www.sainfoin.com/trials&ukyields.htm>

Acknowledgements: These investigations were supported by the European Commission (Project MRTN-CT-2006-035805).



Anthelmintic effects of the so called tanniniferous forages

H. Hoste, F. Manolaraki, S. Brunet

INRA, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France.

Université de Toulouse; ENVT; UMR 1225; F-31076 Toulouse, France

Trichostrongyle nematodes of the gastrointestinal tract remain one of the main constraints associated with the pasture based raising of small ruminants because of the major losses that they provoked in production. Over the last 50 years, the control of these parasites has been essentially performed through a quasi exclusive reliance on the repeated use of chemical anthelmintics (AHs). However, this approach of control is nowadays facing several serious limits. The use of chemical treatments in farm production is associated with the potential risks of residues in food products and in the environment and is a source of public concern, favouring a more sustainable agriculture. Moreover, the emergence and diffusion of AH resistance in nematode populations represents now a worldwide phenomenon which is particularly severe in sheep and goats.

These various reasons explain the strong impetus for the current research on alternative solutions. One of those novel options explores the use of bioactive plants, whose consumption has been associated with changes in the biology of various stages of parasitic nematodes. In particular, some results suggest that some tannin-containing forages and fodders might be used as nutraceuticals, with anthelmintic properties. As such, they represent a promising option for use in integrated nematode control within a variety of farm production systems.

The majority of the current published works have focused on forage legumes (Fabacea) including sulla (*Hedysarum coronarium*), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), big trefoil (*Lotus pedunculatus*), Sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) and sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Overall, two key stages of the nematode life cycle are affected when small ruminants ingest tanniniferous forages. First, the establishment of the infective third stage larvae is reduced and this disturbed the early step of host invasion. Second, the output of parasite eggs in the environment is decreased and this

contributes to reduce the pasture contamination. This later effect has been related either to a reduced number of adult worms or to a reduced fertility of female worms. In addition, the consumption of TR forages has usually been associated with a better resilience of the sheep or goats, i.e. a better ability to maintain homeostasis and production despite the parasite infections.

The mechanisms of action of bioactive forages on the parasitic nematodes remain largely unexplored. Several evidences support the hypothesis of a major role played by the condensed tannins present in the Legume forages. In addition, some results suggest that, within the condensed tannins, prodelphinidins might be more active than procyanidins. However, i) the exact nature of the active compounds remained unknown and ii) the possible implication of other polyphenolic compounds cannot be discarded.

Concerning the effects on the worm, most of the available data support the hypothesis of a direct mode of action, related to a pharmacological effect due to the exposure of the various parasitic stages/species to some plant secondary metabolites within the digestive lumen. Some recent *in vitro* and *in vivo* data acquired on the infective larvae support this so called “direct” hypothesis and have illustrated the functional and structural changes induced to these third stage larvae after contact with sainfoin, which was used as a model of tannin rich Legume.

Overall, the current results suggest that some plant secondary metabolites present in bioactive Legumes affect the biology of different stages and species of parasitic nematodes. At the molecular level, these consequences might relate to the well-known ability of tannins to bind to proteins; these interactions explaining the functional and structural changes observed on the worms. The studies which aim at gaining a better knowledge on the mode of action on nematodes of plant secondary metabolites from TR legume forage have to be carried on. A better knowledge of the interactions between bioactive plants and nematodes is an essential prerequisite to exploit in a pertinent way this innovative option of control. Because of the large geographical distribution of both parasitic nematodes of small ruminants and of the tannin rich plants, the field of potential application is worldwide.

Acknowledgements

This work received the financial support from the European Union as part of the Marie-Curie project “Healthy Hay” (Project number: MRTN_CT-2006-035805).



Effects of secondary plant metabolites on gut morphology and on the immune system in the gastro intestinal tract

Michael W. Pfaffl

Institute of Physiology, Center of Life and Food Sciences (ZIEL), Technical University of Munich, 85354 Freising, Germany michael.pfaffl@wzw.tum.de

In mammals the gastro intestinal tract (GIT) and the associated immune system have developed to provide effective digestion and simultaneously defence against ingested toxins and pathogens like bacteria or viruses. Most protection against potential pathogens occurs via a mucosal immune system involving mechanisms of innate immunity as well as a secondary lymphoid organ, the gut-associated lymphoid tissue (GALT). The ability of the mucosal immune system to distinguish between harmful and harmless antigens is essential to mount a protective immune response and to prevent the induction of mucosal pathology. As a result of a GIT dysbiosis, animals consume less milk, are predisposed to impaired intestinal morphology and intestinal function. The loss of efficiency and resistance may be afflicted with impaired immune functions, which result in high incidence of diarrhoea and finally growth depression.

For several decades, prophylactic doses of antibiotics and chemotherapeutics have been used in animal feed to improve animal welfare and to obtain economic benefits in terms of improved animal performance and reduced medication costs. However, there are increasing concerns about the risk of developing multiple antibiotic resistances in pathogenic bacteria and cross-resistance in livestock. With the ban on dietary antibiotics as growth promoters within the EU, animal nutritionists are seeking for natural and effective alternatives.

The beneficial effects of secondary plant metabolites on the immune system have been proposed as an alternative to antibiotics in improving animal health and protection against infectious agents; e.g. flavonoids exhibit anti-microbial, anti-oxidative, anti-thromboses, immune-modulated, anti-inflammatory, and showed blood-pressure reducing effects.

One major objective in our research group is to investigate the mode of action of secondary plant metabolites and fiber composition on the intestinal immune activation, immune system function, intestinal morphology and health of farm animals.

Effect of polyphenol rich pomace feeding

Different polyphenol rich pomaces have diverse effects in the gastrointestinal morphology. We discovered significant differences between apple and red wine pomaces, and significant changes during feeding time course. Red-wine pomace has an inhibitory effect on the jejunum villi growth, whereas apple and red-wine pomace they have stimulating effect on crypt size in piglet colon. Both pomace feedings can reduce the GALT activation via the peyer's patches in the ileum. The feeding regimens result in tissue individual regulation of mRNA gene expression in various pig organs, e.g. inflammatory, apoptotic and cell cycle markers. In GIT the treatment groups showed a inhibitory effects on gene expression mainly in stomach and jejunum (NFκB, IL-10, Cyclin D1 and Caspase 3). In jejunum and stomach the cell cycle turnover was reduced, whereas in liver the cell turnover was highly accelerate.

We presume that both flavanoid rich feeding regimens have beneficial effects on the animal health, and the potential to modulate the mRNA expressions of inflammatory, proliferation and apoptotic marker genes in GIT and piglet organs (1, 2, 3).

Effect of pine pollen and fibre rich feeding

Dietary fiber plays a preventive role in the etiology of several diseases in monogastric mammals and to support intestinal health. But there is still limited information on the mode of action of insoluble dietary fiber (e.g. insoluble polysaccharides and non-carbohydrate substances like lignin) on tissue morphology and the host's regulatory reactions related to gut health. Wheat bran and Chinese pine pollen were tested on different mode of actions in gut tissue morphology and mRNA expression of inflammatory, cell cycle activity, and growth marker genes in the young pigs. Both fiber sources increased villus height of mucosa in jejunum (+10%) and ileum (+16%). The observations demonstrated that the effects of insoluble fiber refer to the entire digestive tract rather than the colon alone. Additions of dietary fibre rich in lignin may significantly contribute to gastrointestinal stability of weaning piglets. Specific reactions on feed intake and tissue responses were found among the two types of added fiber, which were presumably related to different composition of the fiber fraction (e.g. lignin content) and physical structure (e.g. particle size, surface), with the primary mode of action still being unclear. Especially local expression profiles within the intestinal tissue are differing within the same sections.

Finally, an overall data comparison based on a hierarchical cluster analysis showed a close relation between gene regulation in different gut sections and organs, as well as between small intestine morphology and zootechnical performance (4).

Effects of pine pollen extracts

In this study the effect on cell proliferation of various pine pollen extracts was investigated in a porcine ileal cell culture (IPI-21). Cell proliferation of IPI-21 was investigated with an electric real-time cell-substrate impedance sensing device (ECIS 1600, Applied Biophysics). Furthermore a first attempt was made to identify pollen compounds via LC-ESI-ToF-MS responsible for regulatory effects observed. Compounds of pine pollen soluble in 50% ethanol/water seem to be effective to decrease cell proliferation *in vitro* and influence gene expression of inflammatory and cell cycle markers. A decrease of cell proliferation has already been found for a variety of polyphenols supporting the assumption that the bioactive compounds of the two effective extracts may also be of polyphenolic origin.

The regulations found in the present study hint to an increase of the inflammatory status of the cultured cells while in contrast polyphenols mostly have been found to have anti-inflammatory properties. Nevertheless there is evidence for some polyphenolic substances – e.g. *cis*-resveratrol – to increase expression of pro-inflammatory interleukins (5).

References

- 1) J. Sehm, J. Polster & M. W. Pfaffl (2005) Effects of varied EGCG and (+)-catechin concentrations on pro-inflammatory cytokines mRNA expression in ConA stimulated primary white blood cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17): 6907-6911
- 2) J. Sehm, H. Linder Mayer, H. H. D. Meyer and M. W. Pfaffl (2006) The influence of apple- and red-wine pomace rich diet on mRNA expression of inflammatory and apoptotic markers in different piglet organs. *Animal Science* 82(6): 877-887
- 3) J. Sehm, H. Linder Mayer, C. Dummer, D. Treutter, and M. W. Pfaffl (2007) The influence of apple pomace or red-wine pomace rich diet on the gut morphology in weaning piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2007 91(7-8): 289-296.
- 4) K. Schedle, M. W. Pfaffl, C. Plitzner, HHD. Meyer, W. Windisch (2008) Effect of insoluble fibre on intestinal morphology and mRNA expression pattern of inflammatory, cell cycle and growth marker genes in a piglet model using cluster analysis. *Archives of Animal Nutrition* 62 (6) 427-438
- 5) S. Masanetz, C. Kaufmann, T. Letzel, M. W. Pfaffl (2009) Effects of pine pollen extracts on the proliferation of porcine ileal cell cultures, DGE 2009.



Bioactive compounds of the plant and their role in a balanced diet

Helmut Heseke, Paderborn

In plant foodstuff many bioactive components are found in minor amounts, which may have significant metabolic and/or physiological effects, too. At the moment these dietary phytochemicals are extensively studied to evaluate their possible effects on health. The impetus sparking this scientific inquiry was the result of observational epidemiologic studies, showing consistently protective effects of plant-based food on cardiovascular disease and cancer. At present research is focussing on physiological effects, gene expression and regulation of detoxification enzyme systems, bioavailability and bioefficacy of these non-nutrient plant factors.

Phenolic compounds, including their subcategory flavonoids, are present in all plants and have been studied extensively in cereals, legumes, nuts, olive oil, vegetables, fruits, tea, and red wine. Many polyphenolic compounds have antioxidant properties and other promising properties. Some studies have demonstrated favourable effects on blood pressure, thrombosis and carcinogenesis. Although some epidemiologic studies have reported protective associations between flavonoids or other phenolics and CVD and cancer, other studies have not found these associations. Various phytoestrogens are present in soy, but also whole grains and some vegetables. They have antioxidant properties, too. Some studies have demonstrated favourable effects on CVD risk factors, and in animal and cell culture models of cancer. Resveratrol, found in nuts and red wine, has antioxidant, antithrombotic, and anti-inflammatory properties, and inhibits carcinogenesis in-vitro. Lycopene, a potent antioxidant carotenoid in tomatoes and few fruits, is thought to protect against prostate and other cancers, and inhibits tumor cell growth in animals. Organosulfur compounds in garlic and onions, isothiocyanates in cruciferous vegetables, and monoterpenes in citrus fruits, cherries, and herbs have anticarcinogenic actions in experimental models, as well as cardioprotective effects.

Overall the hypothesis, that non-nutrient plant factors have preventive effects, has matured to a level supported by experimental and epidemiological data, but it has not yet attained the status of a clinically validated hypothesis in the sense of evidence-based-medicine. Especially the lack of reliable biomarkers, lack of well controlled

human intervention studies and of long-term consumption studies are still limiting our knowledge. Therefore much scientific research needs to be conducted before nutrition committees can begin to make science-based dietary recommendations.

In view of these findings, the most prudent and scientifically supportable recommendation for the general population is to consume a balanced diet with emphasis on vegetables and fruits (e.g. campaign 5-a-day) and whole grains rather than the consumption of specific dietary supplements. This advice is consistent with the current dietary guidelines of the German Society of Nutrition and many other nutrition committees.



Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk – is there a case for natural antioxidants?

Gerald Rimbach

Institute of Human Nutrition and Food Science
Christian Albrechts University Kiel, Germany

In Westernised societies the apoE4 genotype it is associated with increased morbidity and mortality, and represents a significant risk factor for cardiovascular disease, late-onset Alzheimer's disease and other chronic disorders. ApoE is an important modulator of many stages of lipoprotein metabolism and traditionally the increased risk was attributed to higher lipid levels in E4 carriers. However, more recent evidence demonstrates the multifunctional nature of the apoE protein and the fact that the impact of genotype on disease risk may be in large part due to an impact on oxidative status or the immunomodulatory/anti-inflammatory properties of apoE. An increasing number of studies in cell lines^{1,2}, transgenic rodents³ and human volunteers^{4,5} indicate higher oxidative stress and a more pro-inflammatory state associated with the epsilon4 allele. Natural antioxidants including dietary vitamin E and flavonoids may counteract the adverse affect of the apoE4 genotype on oxidative stress and chronic inflammation.

- 1.) HUEBBE, P., JOFRE-MONSENY, L., BOESCH-SAADATMANDI, C., MINIHANE, A.M., RIMBACH, G. (2007): Effect of ApoE genotype and vitamin E on biomarkers of oxidative stress in cultured neuronal cells and the brain of targeted replacement mice. *Journal of Physiology and Pharmacology* **58**, 683-698.
- 2.) JOFRE-MONSENY, L., DE PASCUAL-TERESA, S., PLONKA, E., HUEBBE, P., BOESCH-SAADATMANDI, C., MINIHANE, A.M., RIMBACH, G. (2007): Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on markers of oxidative status in macrophages. *British Journal of Nutrition* **97**, 864-871.
- 3.) JOFRE-MONSENY, L., LOBODA, A., WAGNER, A.E., HUEBBE, P., BOESCH-SAADATMANDI, C., JOSKOWICZ, A., MINIHANE, A.M., DULAK, J. RIMBACH, G. (2007): Effects of apo E genotype on macrophage inflammation and heme-

- oxygenase-1 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**, 319-324
- 4.) DIETRICH, M., HU, Y., BLOCK, G., OLANO, E., PACKER, L., MORROW, J. D., HUDES, M., ABDUKEYUM, G., RIMBACH, G., MINIHANE, A.M. (2005): Associations between Apolipoprotein E genotype and circulating F2- isoprostane levels in humans. *Lipids* **40**: 329-334.
- 5.) MAJECWICZ, J., RIMBACH, G., PROTEGGENTE, A.R., LODGE, J.K., KRAEMER, K., MINIHANE, A.M. (2005): Dietary vitamin C down-regulates inflammatory gene expression in apoE4 smokers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 951-955.



Key inducers of oral astringency and bitter taste of plant-derived food products – What do we really know?

Thomas Hofmann

Chair of Food Chemistry and Molecular Sensory Science, Technische Universität München, Lise-Meitner-Strasse 34, 85354 Freising, Germany; thomas.hofmann@wzw.tum.de

Our sense of taste plays a decisive role in evaluating the quality of foods and beverages. Whereas sweet, salty, and umami tastes seem to be highly attractive, consumer studies showed that foods exhibiting a bitter and/or astringent taste often tend to be rejected. But what are the molecular stimuli inducing astringency and bitter tastes of our food? Astringency and bitterness are detectable in a plenty of traditional foods such as vegetables, fruits, herbs, and spices consumed already over centuries with our daily diet, but also in healthy food products with tailored nutrient and micronutrient profiles, as well as in so-called “functional foods”. Representing one of the newest frontiers in nutrition science, the key ingredients in “functional foods” are commonly defined as safe dietary substances that beneficially affect specific targets in the body beyond providing adequate nutrition. Although the primary function of food is to provide nutrients, its secondary function concerns sensory attributes such as taste and flavor. Applied in the concentrations required for exhibiting their specific physiological function, many phytochemical extracts induce bitterness and/or oral astringency and, in consequence, leads to low acceptance of such food products by the consumer. The instinctive rejection of intense astringency and bitterness may be immutable because it has long been crucial to survival, and it appears that it still affects our food choice.

In order to overcome such flavor challenges and to de-code genetic variations affecting the acceptance or rejection of certain food products, it is a necessary prerequisite to identify the key molecules which really contribute to the overall astringent and bitter perception of food products and, then, to deorphanize the corresponding taste receptors in the oral cavity. As most studies in the past focused primarily on quantitatively predominating compounds such as, e.g. flavan-3-ols, rather than selecting the target compounds to be identified with regard to taste activity, many

attempts failed to confirm any correlation between the results obtained from sensory panelists and the chemical species imparting the astringent and/or bitter sensation of food products. While this approach has led only to a rather limited understanding of what are the true molecular drivers of food taste quality, it seems that many of the key players still remain orphan and that yet unknown components evoke the astringency and/or bitter-taste of food products. In addition, the molecular structures of bitter compounds which are not present in raw materials *per se*, but are generated upon degradation of phytochemicals during food processing such as coffee roasting, remain mainly unknown.

Driven by the need to discover the key molecules inducing the astringent and/or bitter food tastes, the research area molecular sensory science made tremendous efforts in recent years to map and to identify the most intense taste-active molecules in fresh and processed foods. Using the sensory activity as the guide for determining the structure of a compound, natural product chemistry combined with analytical human psychophysics enabled the discovery of various previously not known molecules contributing to the bitter taste of foods. In order to de-code genetic variations affecting food choice and determining on whether to accept or to reject certain food products, these key bitter compounds in foods are valuable tools for the deorphanization of the taste receptor/ligand pairs. In response to consumer's demand for healthy but tasty foods, the knowledge of the underlying bitter taste receptors opens the avenue for the discovery of novel ingredients designed to overcome such flavor challenges associated with functional foods, e.g. by suppressing the perception of bitter off-tastes by means of "bitter inhibitors". The presentation will show recent studies on the identification of orphan key astringent and bitter phytochemicals in plant-derived food products and will summarize the first efforts in the deorphanization of bitter receptors activated by dietary phytochemicals.

Improvement of strawberry flavor through enhanced formation of phenylpropenes

W. Schwab

Biomolecular Food Technology, Technical University München, Hochfeldweg 1, 85354 Freising, Germany

Volatiles emitted by strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit have been extensively examined because strawberry is a favorite flavor of many people around the world and is heavily utilized in a wide range of food items. Although more than 350 compounds have been identified, only about 22 have been consistently reported as having aroma activity and thus contributing to the overall flavor. In recent years we and collaborators have investigated the process of fruit flavor biogenesis in ripening strawberry fruit and have investigated the carbon fluxes to enhance flavor. Wild strawberry (*Fragaria vesca*) fruit produces several important phenylpropene aroma compounds such as eugenol, but cultivated varieties are mostly devoid of them. Recently, it has been shown that eugenol is synthesized from coniferyl acetate by a novel eugenol synthase while we have detected the accumulation of *p*-coumaroyl acetate, a related phenylpropanoid ester in transgenic antisense-*CHS* strawberry lines. As a consequence we have redirected the carbon flux in cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit from anthocyanin pigment biosynthesis to the production of acetates of hydroxycinnamyl alcohols, which serve as the precursors of the phenylpropenes, by downregulating the strawberry chalcone synthase (*CHS*) via RNAi-mediated gene silencing and, alternatively, by an antisense *CHS* construct (Fig 1).

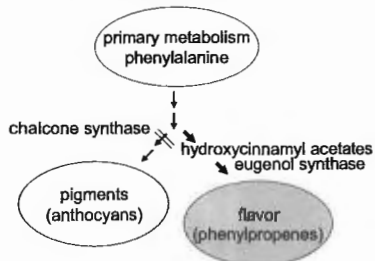


Fig. 1 Redirection of the anthocyanins pathway

Simultaneous heterologous overexpression of two recently identified eugenol (*EGS*) and isoeugenol synthase (*IGS*) genes in the same cultivated strawberry fruits boosted the formation of eugenol, isoeugenol, and the related phenylpropenes chavicol and anol to concentrations orders of magnitude greater than their odor thresholds. The results show that *Fragaria x ananassa* still bears a phenylpropene biosynthetic pathway but that carbon flux is primarily directed to the formation of pigments. Thus, partial reconstitution of wild strawberry flavor in cultivated varieties is feasible by diverting the flavonoid pathway to phenylpropene synthesis through metabolic engineering. These studies serve as foundation for genetic engineering of strawberry flavor.



Determination of phenolic composition of different black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juices

*Tuba Esatbeyoglu**, *Silke Hillebrand*, and *Peter Winterhalter*

Institute of Food Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Schleinitzstrasse 20,
DE-38106 Braunschweig, Germany;

*corresponding author: tuba.esatbeyoglu@tu-braunschweig.de

Introduction and Aims. Aronia or black chokeberry belongs to the Rosaceae family. Aronia fruits originate from the eastern parts of North America and came at the beginning of the 20th century to Europe. They are used for the production of e. g., syrup, juices, and soft spreads. Chokeberries are known to exhibit a wide range of biological and pharmacological properties, such as antioxidative, antiatherogenic, anti-inflammatory, and antidiabetic activity [1, 2].

Aronia berries are a rich source of polyphenols, like non-acylated cyanidin-based anthocyanins [3], procyanidins [1], chlorogenic acids [4], and different quercetin 3-glycosides [4]. The aim of this work was the determination of phenolic composition of commercially available chokeberry juices.

Results and Discussion. Total polyphenols (Folin-Ciocalteu) [5] ranged from 5288 to 5786 mg/L and the antioxidant activity (by modified TEAC method) [6] varied from 31.2 to 33.9 [mmol Trolox/L] in commercially aronia juices.

The monomeric index is a good measure for the estimation of the age of juices [7]. Juice A shows the lowest polymeric content with a monomeric index of 5.1. The polymeric content in juice B and juice C is higher than in juice A (3.2 and 2.6). According to the HPLC results it is apparent that juice A has the highest monomeric anthocyanin content (943 mg/L). The anthocyanin composition of all juices consists of the two major pigments cyanidin 3-galactoside and cyanidin 3-arabinoside, as well as the minor anthocyanins cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-xyloside, respectively. Chokeberry juices are also a rich source of hydroxycinnamic acid derivatives mainly represented by 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) and 3-caffeoylquinic acid

(neochlorogenic acid). The total content of chlorogenic acids ranged from 781 to 1149 mg/L.

Table 1. Concentrations of anthocyanins, chlorogenic acids, and quercetin glycosides in different chokeberry juices determined by HPLC-PDA

chokeberry juice	anthocyanins ¹ [mg/L]	chlorogenic acids ² [mg/L]	quercetin glycosides ³ [mg/L]
A	943	781	314
B	514	1149	217
C	341	1095	204

calculated as: ¹ cyanidin-3-glucoside, ² 5-caffeoylquinic acid, ³ quercetin-3-rutinoside

The main flavanol glycosides of chokeberry are quercetin 3-glycosides. The analyzed juices contain high contents of quercetin 3-galactoside, quercetin 3-glucoside, and quercetin 3-rutinoside. The total amount of quercetin 3-glycosides ranged from 204 mg/L (juice C) to 314 mg/L (juice A). **Table 1** summarizes the concentrations of anthocyanins, chlorogenic acids, and quercetin 3-glycosides in different chokeberry juices determined by HPLC-PDA analysis.

RP-HPLC of the chokeberry juices (Fig. 1) revealed an unresolved broad peak between 30-50 min that is due to polymeric procyanidins. The amount of polymeric procyanidins can be determined by butanolysis (Bate-Smith). High concentrations of polymeric procyanidins were found in juices B and C (approx. 6700 mg/L). With regard to the composition of the polymers, thiolytic degradation revealed that they almost exclusively consist of epicatechin units.

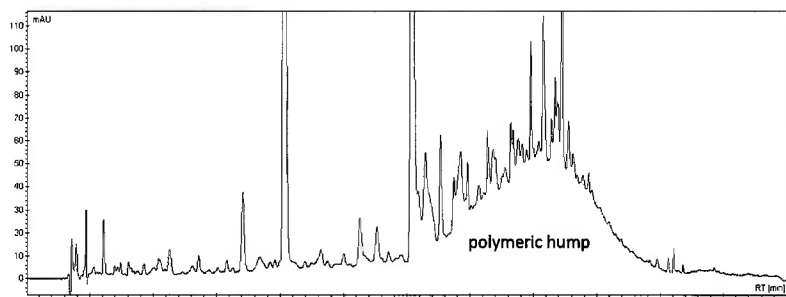


Figure 1: RP-HPLC analysis (detection wavelength 280 nm) of a chokeberry juice on an Aqua C-18 column

References

- [1] Kulling S. E., Rawel H. Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med*; 74: 1625-1634 (2008).
- [2] Wawer I. *Aronia melanocarpa*. The power of nature. 1st. edition. London: Nature`s Print Ltd; 2006.
- [3] Jakobek L., Seruga M., mevidovic-Kosanovic M., Novak I. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch*; 103: 58-64 (2007).
- [4] Oszmiański J., Wojdyło A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*; 221: 809-813 (2005).
- [5] Singleton V. L., Rossi J. A., Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*; 16: 144-158 (1965).
- [6] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*; 26: 1231-1237 (1999).
- [7] Bonerz D., Würth K., Patz C. -D., Dietrich H. Der Monomerindex: Eine schnelle und kostengünstige Methode zur Bestimmung von Anthocyanen und Anthocyanaddukten in Buntsäften, Nektaren, Konzentraten und Rotweinen. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch*; 102: 195-201 (2006).

Acknowledgement. This research project is part of a BMBF project 0313828A (Dietary Procyanidins – From a better understanding of human health effects to functionalised foods).

Preparative Isolation of Anthocyanins by Countercurrent Chromatography and Application of the Color Activity Concept to Black Carrot Extract (*Daucus carota*)

Elyana Cuevas Montilla*, Silke Hillebrand, Carolin Dorau, and Peter Winterhalter

Institute of Food Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Schleinitzstrasse 20,
DE-38106 Braunschweig, Germany, e.cuevas-montilla@tu-bs.de

Introduction and Aims

There is a trend in food industry to search for natural sources of colorants capable of replacing synthetic dyes used in food products. Black carrots offer an excellent source of acylated anthocyanins, which in addition to their color potential have been associated with various health benefits. Concentrates obtained from black carrots are gaining an increasing interest in industry, due to the high light and heat stability of their pigments in solution [1-2]. The chemical structures of individual anthocyanins have a noticeable influence on further parameters such as color tonality, antioxidant activity, and visual detection threshold.[3]

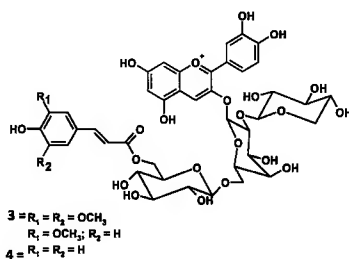
The aim of the current study was to identify key colorants in black carrot extracts by using the color activity concept [4]. In addition, an attempt was made to estimate the color contribution of monomeric and polymeric pigments.

For the isolation of pure pigments, High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) was used. HSCCC is an all-liquid chromatographic technique which has been used for the preparative isolation of numerous natural products because of the gentle isolation conditions and large yields of pure compounds [5].

Peak (HPLC)	Compound	[M ⁺] (m/z)	Fragment (m/z)
1	Cy-3-xyl-glc-gal	743	287/581
2	Cy-3-xyl-gal	581	287
3	Cy-3-sin-xyl-glc-gal	949	287/817
4	Cy-3-fer-xyl-glc-gal	919	455/625
5	Cy-3-cou-xyl-glc-gal	889	287/581

Abbreviations: Cy = cyanidin; cou = coumaroyl; fer = feruloyl;
gal = galactoside; glc = glucosyl; sin = sinapoyl; xyl = xylosyl

Fig.1 Structures of major anthocyanins from black carrot extract



Materials and Methods

Black carrot extract were cleaned-up on Amberlite XAD-7 in order to remove sugars and organic acids. After elution with acidified methanol and concentration, HSCCC separation was carried out with MTBE-*n*-butanol-acetonitrile-water (2/2/1/5, v/v/v, acidified with 0.1% TFA, less dense layer as stationary phase, flow rate: 4.0 mL/min) as solvent system. The composition of each fraction was monitored by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MSⁿ. HPLC separation was carried out on a Synergi RP-18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) at a flow rate of 0.5 mL/min. Two solvent systems were used. Solvent system A consisted of water/acetonitrile/formic acid 87/3/10 (v/v/v) and solvent system B contained water/acetonitrile/formic acid 40:50:10 (v:v:v). The gradient was as follows: 0 min 6% B, 20 min 20% B, 35 min 40% B, 40 min 60% B, 45 min 90% B and 55 min 6% B.

Results and Discussion

Figure 2 shows the HPLC and HSCCC chromatograms at 520 nm. By means of High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) it was possible to isolate the pigment cyanidin-3-coumaroyl-xylosylglucosyl-galactoside (5) in large yields and good purity. A 68 mg amount of this acylated anthocyanin with a purity of 80% could be isolated from HSCCC fraction 5. With the aid of preparative HPLC it was possible to isolate further pigments from different CCC fractions. Fraction 1 afforded 15 mg of the non-acylated cyanidin derivative cyanidin 3-xylosylgalactoside (2), and 10 mg of cyanidin 3-xylosylglucosylgalactoside (1). The major HSCCC fractions 2 (535 mg) and 3 (424 mg) consisted of a mixture of different acylated anthocyanins. Approximately 70 mg of cyanidin-3-feruloyl-xylosylglucosyl-galactoside (4) and 25 mg of cyanidin-3-sinapoyl-xylosylglucosyl-galactoside (3) were isolated by preparative HPLC from these fractions.

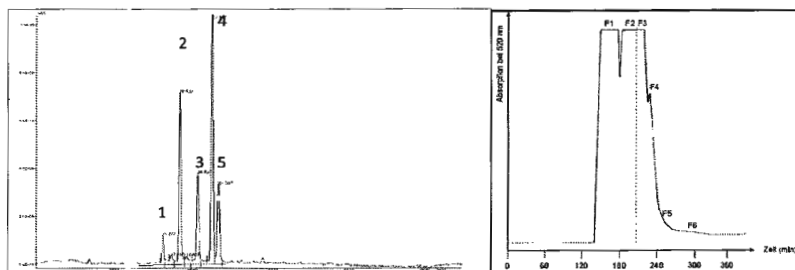


Fig. 2 HPLC (left) and HSCCC (right) chromatogram of black carrot extract at 520 nm (for numbering of compounds cf. Fig. 1)

The color activity concept was applied to acylated anthocyanins and polymeric pigments of black carrot extract. It was found that the original acylated pigments are

only minor contributors to the visually detected color of black carrot extract (~ 26%) and that the polymeric pigments have the highest contribution (~ 74%) to the overall color.

References

- [1] Malien-Aubert C, Dangles O, Amiot MJ. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 170.
- [2] Redus M, Baker DC, Dougall DK. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 3449
- [3] Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6172.
- [4] Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 3912-3917.
- [5] M. Schwarz, S. Hillebrand, S. Habben, A. Degenhardt, P. Winterhalter, *Biochem. Engineering J.* 2003; 14:179-189.



Charakterisierung von Anthocyanen in Kulturpflanzen unter Einsatz der HPLC/MS-Kopplungstechnik

Wolfgang Schütze

JKI, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, e-mail: wolfgang.schuetze@jki.bund.de

Die Pflanzenphenole umfassen eine große Zahl heterogen strukturierter Moleküle. Sie enthalten mindestens ein hydroxylsubstituiertes aromatisches Ringsystem und finden eine weite Verbreitung in der Pflanzenwelt.

Eine für die menschliche Ernährung bedeutsame Klasse phenolischer Verbindungen sind die Anthocyane. Sie kommen in nahezu allen höheren Pflanzen, überwiegend in den Blüten und Früchten, aber auch in den Blättern und Wurzeln vor und erhöhen mit ihrer Farbvielfalt die Attraktivität für Mensch und Tier. Dabei treten sie meist als Glycoside mit ein bis drei Zuckern (Glucose, Galactose, Rhamnose, Xylose, Arabinose) auf. Wichtige Grundstrukturen sind z. B. Cyanidin, Delphinidin, Malvidin oder Peonidin. Sie besitzen ein hohes antioxidatives Potential, so dass ihnen gesundheitsfördernde und präventive Wirkungen bei einer Reihe von Erkrankungen zugeschrieben werden.

Im Rahmen der Züchtung, z. B. neuer Sauerkirscharten, spielen das Anthocyanmuster sowie der Gehalt an einzelnen Verbindungen eine große Rolle. Ein Vergleich von Wild- und Kulturformen zeigt sowohl im Gehalt als auch im Anthocyanprofil eine Verarmung der Kulturformen. Bedeutsam ist das Anthocyanprofil z. B. für die Farbstabilität im Falle einer Weiterverarbeitung zu Saft bzw. zu Marmelade oder Gelees. Es werden typische Muster von Kultur und Wildformen dargestellt.

Anthocyane bestimmen mit die Qualität von Rotweinen. Ihre Zusammensetzung sowie ihr Gehalt haben Einfluss auf die Farbtintensität des Weins. Eine züchtungsbegleitende Analytik ist für die Züchtung farbstabiler und farbtintensiver Rotweinsorten unumgänglich. Die Vielfalt der auftretenden Verbindungen wird am Beispiel verschiedener Mostproben gezeigt.

Seit einiger Zeit erfreuen sich blau- bzw. rotfleischigen Kartoffelsorten einer zunehmenden Beliebtheit beim Verbraucher. Immer häufiger sind sie im Angebot auf Wochenmärkten und auch im Supermarkt sind sie mitunter zu finden. Verantwortlich für die rote, blaue oder violette Farbe der Knollen sind ebenfalls Anthocyane. In ihrem Anthocyangehalt können farbfleischige Kartoffeln durchaus mit anthocyanhaltigem Obst oder Gemüse konkurrieren. Auf Grund des teilweise hohen Anthocyangehaltes, der bei einigen Sorten im Wesentlichen durch eine einzige Verbindung charakterisiert wird, bestehen gute Chancen, diese Verbindung ggf. durch entsprechende technologische Verfahren in guter Ausbeute und Reinheit zu isolieren. Als Verbindung mit dem höchsten Anthocyangehalt in allen untersuchten Genotypen wurde Petunidin-3-cumarylrutinosid-5-glucosid gefunden. Am Beispiel eines Kartoffelzuchtstamm wird das Anthocyanverteilungsmuster von farbfleischigen Kartoffel gezeigt.

In Mais und Reis können ebenfalls Anthocyane in höherer Konzentration vorkommen und dort teilweise zu einer intensiven Färbung der Körner führen. „Purpurweizen“ sowie „schwarze Gerste“ werden z. B. in Österreich zur Herstellung von Brot und Nudeln eingesetzt. „Schwarzer Reis“ wird in China seit vielen Jahren als Lebensmittel verwendet. Über die Zusammensetzung der Anthocyan-Fraktion in den unterschiedlichen Getreide-Produkten ist bisher nur wenig bekannt. Auch diese Kulturpflanzen besitzen mit ihrem Anthocyangehalt ein beträchtliches antioxidatives Potential, das bisher nur wenig züchterisch genutzt wird.

Die Untersuchungen zum Anthocyangehalt wurden unter Einsatz der HPLC/MS-Kopplung durchgeführt. Die Detektion der Anthocyane erfolgte unter Einsatz des „HPLC-Systems 1100 bzw. 1200“ von Agilent mit DAD bei 518 nm, gekoppelt mit einem „Esquire3000“ (Bruker).



Bestimmung von Phenolcarbonsäuren in Nebenprodukten der Lebensmittel- und Agrarwirtschaft und ihrer antioxidativen Kapazität

J. Bauer, B. Harbaum-Piayda, K. Schwarz

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde,
Abteilung Lebensmitteltechnologie, Universität Kiel

Bei der industriellen Verarbeitung von Getreide entstehen beachtliche Mengen an ballaststoffreichen Nebenprodukten. Weizenkleie erzielt auf Grund fehlender Verwertungswege nur geringe Marktpreise und wird hauptsächlich in der Nutztierfütterung eingesetzt. Pflanzenzellwände enthalten an das Arabinoxylan-Netzwerk gebundene Phenolcarbonsäuren [1, 2]. Die am häufigsten vorkommende Hydroxymethylsäure in Weizenkleie ist die Ferulasäure (80% aller quantifizierten Phenolcarbonsäuren). Daneben sind unter Anderen auch p-Cumarsäure und Sinapinsäure enthalten [3]. Der Gehalt an Ferulasäure liegt dabei in Weizenkleie bei ca. 0,44% des Trockengewichts [4, 5]. Über einen radikalischen Mechanismus kann Ferulasäure dimerisieren und ist dadurch im Stande Arabinoxylane zu koppeln, was die mechanische Beanspruchbarkeit, Löslichkeit und Verdaubarkeit von Ballaststoffen beeinflusst. Der absolute Gehalt an dimeren Ferulasäuren in der unlöslichen Ballaststofffraktion liegt in Weizen bei 0,24% [6]. Ferulasäure kann ungepaarte Elektronen unter Abgabe eines Protons aufnehmen und selbst resonanzstabilisierte Formen annehmen. Eine Verknüpfung zu Diferulasäuren kann strukturabhängig zu einer Erhöhung des antioxidativen Potentials führen [7].

Ziel war es die Nebenprodukte Weizenkleie, Maiskleie und Biertreber auf ihre Gehalte an Phenolcarbonsäuren zu untersuchen, und eine optimierte Methode für die Freisetzung zu erhalten, um deren Eignung als Rohstoff für die Erzeugung von antioxidativ wirksamen Extrakten zu beurteilen.

Zur Extraktion wurde die alkalische Hydrolyse angewendet und die Parameter Konzentration der Natronlauge und Einwirkzeit variiert. Die Identifizierung und Quantifizierung der gesuchten Substanzen wurde mittels RP-HPLC (Acetonitril 100 % und Wasser, 0,1 % Ameisensäure) und HPLC-ESI-MS durchgeführt. Zur Beurteilung der

antioxidativen Kapazität der Extrakte wurde der TEAC-Test (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) durchgeführt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Menge der freigesetzten Phenolcarbonsäuren durch Änderung der NaOH Konzentration und Hydrolysezeit beeinflussen lässt. Die Gehalte der untersuchten Phenolcarbonsäuren variieren dabei je nach eingesetztem Rohstoff. Extrakte sowie Ferulasäure zeigen ein im Vergleich zum Referenzantioxidans Trolox hohes antioxidatives Potential im TEAC-Test. Aufgrund der Untersuchungen konnte die Methode zur alkalischen Hydrolyse optimiert werden. Eine Verwertung der drei eingesetzten Nebenprodukte als Quelle natürlicher Antioxidantien erscheint trotz unterschiedlicher Zusammensetzungen sinnvoll.

Literatur

1. Rhodes, D.I., et al., Hydroxycinnamic Acids in Walls of Wheat Aleurone Cells. *Journal of Cereal Science*, 2002. 36(1): 67-81.
2. Ralph, J., et al., Peroxidase-dependent cross-linking reactions of hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews*, 2004. 3: 79-96.
3. Kern, S.M., et al., Absorption of Hydroxycinnamates in Humans after High-Bran Cereal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(20): 6050-6055.
4. Liyana-Pathirana, C.M. and F. Shahidi, Importance of Insoluble-Bound Phenolics to Antioxidant Properties of Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(4): 1256-1264.
5. Lequart, C., et al., Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 1999. 319: 102-111.
6. Bunzel, M., et al., Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001. 81(7): 653-660.
7. Garcia Conesa, M.T., et al., Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-beta,beta'-bicycinnamic acid (8-8-diferulic acid, non-cyclic form). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999. 79(3): 379-384.



A New Polyphenolic Compound in Refined Rapeseed Oil and its Byproduct

Britta Harbaum-Piayda¹, Kathleen Dehlike¹, Pablo Zacchi², Rudolf Eggers², and Karin Schwarz¹

¹ Department of Food Technology, Institute of Human Nutrition and Food Science,
University of Kiel, Heinrich-Hecht-Platz 10, 24118 Kiel, Germany

² Technical University Hamburg-Harburg, Eißendorfer Straße 38, 21073 Hamburg,
Germany

Rapeseed oil is known as an important source of health-related compounds in the human diet. The antioxidants present in food oils such as rapeseed oil are endogenous phenolic derivatives which originally derive from the seed. The main phenolic acids in rapeseed are sinapic acid and its derivatives such as sinapine, a cholin ester of sinapic acid, or sinapoylglucose, which amount to approximately 8 mg/g in rapeseed [1]. High concentrations were found in the rapeseed meal after pressing whereas lower amounts are present in the oil fraction [2]. The further oil refining process entails the degradation or conversion of the phenols in the oil, or leads to the major transfer of the phenolic compounds into byproducts, which might therefore represent an important source for the extraction of bioactive polyphenols.

In the present study different phenolic compounds were identified in processed rapeseed oil and the deodistillate arising during refining. The reverse phase HPLC analysis and the successive fragmentation procedure by ESI-MSⁿ (electrospray ionisation mass spectrometry) showed a significant fragmentation pattern for a new compound, which was further clearly elucidated by NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy). Besides sinapic acid derivatives (SA) and its decarboxylated derivative vinylsyringol (VS), this new identified dimeric phenolic compound (VS-Dimer) of the vinylsyringol monomer was present in the deodistillate of processed rapeseed oil in significant amounts (SA, approx. 0.06%; VS, approx. 0.03% and VS-Dimer, 0.4%). Additionally, the dimeric phenolic compound was also detected in minor amounts in refined (5-400 ppm) but not in native rapeseed oils.

The identified phenolic compounds - the dimeric phenolic compound of vinylsyringol, in particular - may be important constituents of the byproducts of processed rapeseed

oil with respect to oil processing conditions and oxidation reactions. The high concentrations indicate the deodistillate as an important source for polyphenols. Further, the occurrence of the dimeric derivative of vinylsyringol may be interpreted as an indicator for processed rapeseed oils.

- [1] zum Felde, T.; Becker, H. C.; Möllers, C., (2006). Genotype x environment interactions, heritability, and trait correlations of sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Crop Breeding and Genetics*, 46, 2195-2199.
- [2] Vueroia, S.; Meyer, A.S.; Heinonen, M., (2003). Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. *European Food Research Technology*, 217, 517-523.



Phenolgehalte von Kakaoschalen unterschiedlicher Kakaotypen und Provenienzen und deren antioxidative Aktivität

Bruna, C.^{1/2}, Eichholz, I.¹, Huyskens-Keil, S.², Kroh, L.W.³, Rohn, S.³

^{1/2}Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften,

¹Arbeitsgruppe Obstbau,

Albrecht-Thaer-Weg 3, ²Arbeitsgruppe Produktqualität/Qualitätssicherung,

Lentzeallee 75, D-14195 Berlin; ³Technische Universität Berlin, Institut für

Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Fachgebiet Lebensmittelanalytik,

TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wie phenolische Verbindungen prägen sensorische Eigenschaften wie Geschmack, Geruch und auch die Farbe von Pflanzen und werden von Ihnen als Schutzsubstanzen gegen äußere Einflüsse synthetisiert. Im menschlichen Organismus vermögen sie „freie Radikale“, ausgelöst durch oxidativen Stress oder Kontaminanten der Umwelt, abzufangen. Dadurch können Schädigungen im Zellgewebe verhindert und so schweren Erkrankungen wie Krebs oder Herz-, Kreislaufbeschwerden vorgebeugt werden^[1].

Zahlreiche Studien belegen, dass Kakao und Kakaoerzeugnisse wie Schokolade diese Substanzen ebenfalls enthalten und dem Verzehr von Schokoladenprodukten ein gesundheitsfördernder Aspekt zugesprochen werden kann. Ziel dieser Studie war es, insbesondere Kakaoschalen auf das Vorhandensein jener Verbindungen zu prüfen, um die bei der Verarbeitung von Kakao in Massen anfallenden Schalen nutzbar zu machen. Zu untersuchen war, welche Provenienzen besonders hohe Phenolgehalte aufweisen, die in der Schokoladenproduktion zur Herstellung einer „Phenolreichen Schokolade“ einsetzbar wären. Dazu wurden Kakaoschalen verschiedener Kakaotypen und -herkünfte, wie dem Trinitariotyp (Madagaskar, Trinidad, Venezuela), dem Forastero (Ghana) und dem Nacional „Arriba“* (Ecuador) auf ihre Gehalte an Gesamtphenolen^[2] sowie auf deren antioxidative Aktivität (ESR^[3]) analysiert.

Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Kakaotypen und -herkünften, wobei die Provenienzen des Kakaotyps Trinitario ‚Madagaskar‘ und ‚Trinidad‘ die höchsten Gehalte an Gesamtphenolen und antioxidativer Aktivität aufwiesen. Die extrahierten Gesamtphenolgehalte variierten zwischen 2,56 bis 4,06

mg GAE/g TM, welche, nach deren Isolierung als pflanzeneigene Zusatzstoffe der Schokolade wieder zugesetzt werden könnten. Weitere Untersuchungen zum Einfluss dieser funktionellen Zusatzstoffe auf die Qualitätsparameter der so phenolangereicherten Schokolade sind vorgesehen.

[1] Kris-Etherton et al., *Ann. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 511-538, [2] Jennings, *Anal. Biochem.* **1981**, *118*, 396-398, [3] Rösch et al., *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4233-4239

* eigener Kakaotyp (Edelkakao) unter den Forasteroprovenienzen (Kosumkakao)



Characterisation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) condensed tannins by MALDI-TOF mass spectrometry

Elisabetta Stringano¹, An Gea¹, Rainer K. Cramer^{2,3} Wayne C. Hayes³,
& Irene Mueller-Harvey^{1*}

¹ Chemistry & Biochemistry Laboratory, Department of Agriculture, University of Reading, Reading RG6 6AT, United Kingdom; ² Biocentre Facility, Reading RG6 6AS; ³ Department of Chemistry, Reading RG6 6AD; corresponding author: e.stringano@reading.ac.uk

Abstract. Tannins are polyphenolic oligomers and polymers. Plants produce these secondary metabolites which have traditionally been used to tan animal skins in order to produce leather. They possess interesting biological properties: antibacterial, anticancer, antiviral, nematocidal, chelate metal ions, are anti-oxidants, precipitate proteins, cause astringent tastes in drinks and fruits. Some condensed tannins exert important positive environmental and nutritional effects in livestock farming of ruminants.¹ In this paper, we describe the condensed tannins from sainfoin, which is a traditional, but potentially very useful, animal feed. Isolated tannin fractions were characterised by MALDI-TOF mass spectrometry and the advantages and disadvantages of different matrices are presented.

Introduction. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) was grown in Europe before the widespread use of commercial fertilisers in the 1950's. It is an excellent fodder legume and ruminants utilise sainfoin proteins much more efficiently than alfalfa or soya protein because sainfoin contains tannins. This means that sainfoin can lead to more efficient utilisation of proteins² and therefore to reduced nitrogen emissions. Interestingly, its tannins may also reduce methane emission, which is one of the most damaging greenhouse gases. Research also suggests that sainfoin possesses anthelmintic properties. All of these factors will be of interest to farmers, and sainfoin could contribute to more sustainable farming systems.

Hypothesis: Sainfoin condensed tannins are responsible for its beneficial nutritional and anthelmintic effects.

However, we need to elucidate which tannins are particularly beneficial. Therefore, detailed chemical analysis is required to characterise the complex mixtures of tannins in sainfoin.

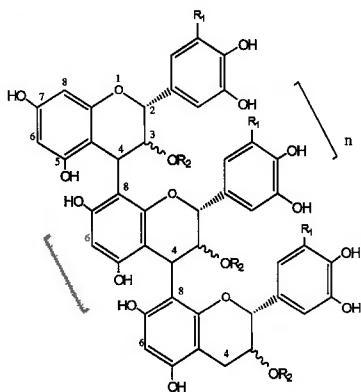


Figure 1: Structure of condensed tannins. R₁= H (procyanidins) or OH (prodelphinidins); R₂ = gallic acid

The general structure of condensed tannins is shown in Fig.1. They consist of flavan-3-ol monomer units linked either via a (4→8)- or a (4→6)-bond (B-type tannins), or a (2→7,4→8) double linkage (A-type tannins). Tannins exist in plants as complex mixtures of structurally closely related oligomers/polymers with molecular weights as high as 20kDa³. The chemical analysis of condensed tannins was carried out with matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Applications of MALDI-TOF for analysis of oligomeric polyphenols in food have been reported within the last 10 years. It has been applied to characterise tannins in sorghum⁴, *L. corniculatus*⁵ and grape seeds⁶.

Materials and Methods. MALDI-TOF spectra were collected on a Bruker Reflex III-TOF mass spectrometer (Daltonics) equipped with delay extraction and a N₂ laser set at 337 nm. In the positive reflectron mode an accelerating voltage of 25.0 KV and a reflectron voltage of 26.3 KV were used. All spectra were the sum of 200 shots. Spectra were calibrated with ClinProt Standards(Bruker). 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB); super-DHB; sinapinic acid (SA); α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) and β -cyano-4-chlorocinnamic acid (CCCA) were used as matrices. The matrix and the sample solutions were then mixed at 1/1 (v/v) ratio, spotted on the target and left to dry according to the dried droplet method⁷.

Results and Discussion. The best results have been achieved with s-DHB and CCCA as matrices. It was allowed to observe polymers consisting of 12 flavan-3-ol units (Fig.2). A further series of peaks differing by 16 m/z units was observed within each of these oligomers. These peaks correspond to homopolymers containing only catechin and epicatechin units (C) and heteropolymers containing C and gallicatechin and epigallocatechin units (G) in all possible combinations up to homopolymers containing only G units (Fig.3). Peaks with higher m/z values were observed in the range 3800-5040 m/z. They may correspond to polymers containing 13-16 units. Interestingly, low peaks corresponding to trimers galloylated and dimers glycosylated and galloylated were observed. However more studies need to be done in order to improve the resolution of higher m/z peaks.

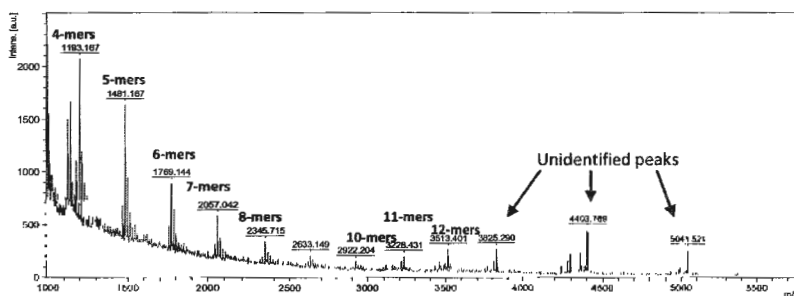


Figure 2: MALDI-TOF spectrum of condensed tannins in sainfoin.

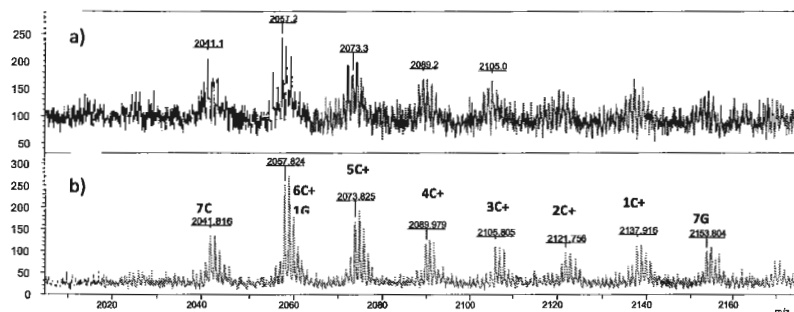


Figure 3: MALDI-TOF spectrum of 7-mers obtained using CCCA (a) and sDHB (b) as matrices. The peaks correspond to homo- and heteropolymeric 7-mers containing C and G units. (C = (epi)catechin; G = (epi)gallicatechin).

References.

- [¹] Mueller-Harvey, . *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2010-2037.
- [2] Molan, AL, Attwood, GT, Min, BR and McNabb WC, *Can. J. Microbiol*, **2001**, *47*, 626-633.
- [3] Jones, WT; Broadhurst, RB; Lyttleton, JW. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1407-1409
- [4] Gujer, R, Magnolato, D, Self, R, *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 1431-1436.
- [5] Hedqvist,H, Mueller-Harvey,I, Reed,JD, Krueger,CG, Murphy,M,. *Anim. Feed Sci. Technol*, **2000**, *87*, 41-56
- [6] Krueger, C.G.,Dopke, NC, Treichel, PM, Folts, J, Reed, JD, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 1663-1667.
- [7] Karas, M., Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.

Acknowledgements. These investigations were supported by the European Commission (Marie Curie Research Training Network, 'HealthyHay', MRTN-CT-2006-035805).



Spotting Polyphenols as Biomarkers: Spatial and temporal within plant distribution of selected polyphenolic compounds under controlled environment in two Pinot noir (*V. vinifera* L.) clones

Schoedel, K.¹, Schuhmocher, R.² and Forneck, A.^{1}*

¹ Institute of Horticulture and Viticulture, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna; A-1190 Vienna, Peter-Jordan-Straße 82; E-mail: astrid.forneck@boku.ac.at

² Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna; A-3430 Tulln, Konrad-Lorenz-Straße 20

Introduction

Polyphenols have several physiological functions in plants. They are involved in plant-pathogen interactions and physiological defense against pathogenic impact. Furthermore, plants have evolved a variety of mechanisms including “screening out” UV radiation by accumulating UV-absorbing phenolic compounds in the leaf epidermis. As a prerequisite for UV-B- research the constitution of polyphenols in *Vitis vinifera* plants (cv. *Pinot noir*) was monitored in leaves of different ages covering an experimental of 30 days under controlled environmental conditions.

Materials and Methods

Two clones of the cultivar ‘Pinot noir’ (18 Gm and 1-84 Gm) were used in this study. The plants were potted in 3 L pots in 2007 and grown under controlled conditions in greenhouses. For the experiment in June 2008 the set of test parameters to describe the physiological state of grapevine included chlorophyll fluorescence, gas exchange and thermal imagery. The physiological status of two plants per clone was monitored per date of measurement. Leaves of all insertion levels were harvested, weighted and the leaf area was measured. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C until polyphenol-analysis. Prior to analysis leaves were ground in a mill equipped with a grinding ball. Resulting powder was extracted using 80 % MeOH containing formic acid. After ultrasonication sample was centrifuged and the supernatant was collected. Extracts were analysed by HPLC-MS using an Agilent HPLC-System equipped with a Hypersil Gold column (2.1 x 50 mm, 1,9 µm) and a 4000 Q Trap-MS (Applied Biosystems). As a first set of phenolic compounds three phenolic

acids (caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid), one phenolic acid ester (caffeoyl tartaric acid), two flavonols (quercetin, kaempferol) and their 3-*O*-glucosides, three flavan-3-ols (catechin, epicatechin and epicatechin gallate), one anthocyanin (cyanidin-3-glucoside) and one stilbene (trans-resveratrol) serve as model compounds and are going to be checked on their potential to be used as stress indicators.

Results and Discussion

At the present the HPLC-MS method has been optimized concerning the pH value. To improve the separation and peak shapes of the test compounds, different amounts of formic acid (0.1, 0.27, 0.5 and 1 %) have been tested. In literature higher amounts of acid are used, in our study 0.5 % formic acid added to both solvents showed best performance of the standards. The time need for the separation for the chosen standards was reduced to 10 minutes, saving 33.5 minutes per run compared to other studies. For detection via MS standard optimization has been finished and the SRM-Method has been set up. First results show that all of the chosen standards can be detected with the developed method down to concentrations of 8 µg/L or lower. We expect to find data of polyphenols to differentiate among leaf insertions, leaf ages and possibly among plant clones. This first method testing provides information for the planning of further experiments and the interpretation of results of both greenhouse and field experiments.

References

- Burchard P, Pilger W, Weissenböck G, Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Environment* 23: 1373-1380 (2000).
- Kolb CA, Käser MA, Kopecký J, Zotz G, Riederer M, Pfündel EE, Effects of Natural Intensities of Visible and Ultraviolet Radiation on Epidermal Ultraviolet Screening and Photosynthesis in Grape Leaves. *Plant Physiology* 127: 863-875 (2001).
- Leinonen I and Jones HG, Combining thermal and visible imagery for estimating canopy temperature and identifying plant stress. *Journal of Experimental Botany* 55 (401): 1423-1431 (2004).
- Park H-J and Cha H-C, Flavonoids from Leaves and Exocarps of the Grape Kyoho. *Korean Journal of Biological Science* 7: 327-330 (2003).
- Sgarbi E, Fornasiero RB, Lins AP, Bonatti PM, Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Science* 165: 951-957 (2003)
- Souquet JM, Labarbe B, Le Guernevé C, Cheynier V, Moutounet M, Phenolic Composition of Grape Stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1076-1080 (2000).



Phenolanalyse in Früchten mit Hilfe zerstörungsfreier und zeitaufgelöster optischer Messmethoden

J.S. Wulf^{1}, S. Rühmann², D. Treutter² & M. Zude¹*

¹Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim, Abteilung Technik im Gartenbau, Potsdam; ²Technische Universität München, Fachgebiet Obstbau, Freising

Quantitative Analyseverfahren zur Bestimmung von gesundheitsfördernden Fruchthaltstoffen gewinnen im Rahmen einer auf ernährungsphysiologische Gesichtspunkte ausgerichtete Nachfrage der Verbraucher zunehmend an Bedeutung. Diffuse reflexionsspektroskopische Methoden wurden bereits für die Bewertung der Fruchtreifung und -qualität eingesetzt. Darüber hinaus bietet die Fluoreszenzspektroskopie die Möglichkeit auch geringe Mengen von wertgebenden Fruchthaltstoffen wie Vitaminen und Phenolen in Früchten zu detektieren. Allerdings wird das Fluoreszenzsignal der autofluoreszierenden Moleküle stark beeinflusst von der Quantenausbeute, Fluoreszenzabklingzeit sowie von Reabsorptions- und Löschungseffekten.

Mit Hilfe laser-induzierter, zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen (LF 401, IOM, Berlin) wurden Fluoreszenzspektren zerstörungsfrei an Erdbeeren mit einer Anregungswellenlänge von 337 nm in einem Wellenlängenbereich von 400-820 nm (1nm-Auflösung) aufgezeichnet. Zudem wurden Fluoreszenzabklingkurven in einem Bereich von 0-25 ns in 0,1ns-Schritten bei der maximalen Fluoreszenzemission von in den Spektren auftretenden Peaks gemessen. Zusätzlich wurden an den einzelnen Erdbeerfrüchten Reflexionsspektren aufgenommen, um die Fluoreszenzsignale hinsichtlich der texturspezifischen Absorptionseigenschaften korrigieren zu können. Als Referenzanalysen wurden Gehalte einzelner phenolischer Substanzen mittels HPLC bestimmt. Mit Hilfe multivariater Auswertalgorithmen wurden auf der Basis der Fluoreszenzspektren und der mittels HPLC bestimmten Gehalte der Phenole Kalibriermodelle errechnet und mit einem unabhängigen Test-Sets bewertet ($r^2 = 0.94$ and $rmsep = 15.03\%$). Zudem wurden unter Verwendung weiterer chemometrischer Verfahren Zusammenhänge zwischen den Fluoreszenzabklingkurven der Erdbeeren und den chromatographisch ermittelten Referenzdaten ausgewertet. Die Ergebnisse der Furchtfluoreszenzspektren und -abklingkurven wurden mit denen von Standards abgeglichen.



Phenolsäuren in alten Weizenarten (*Triticum*) – Vorstellung der Methode und erste Ergebnisse

Nadine Engert, Ralf Pätzold, Bernd Honermeier

Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung I, Ludwigstraße 23, 35390 Gießen

Einleitung

Phenolsäuren zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, die zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte besitzen. Sie kommen in vielen pflanzlichen Lebensmitteln, z. B. Obst, Gemüse und Getreidearten, vor. Beim Getreide werden den Phenolsäuren funktionelle Eigenschaften hinsichtlich der Beeinflussung der Gelstruktur der Pentosane zugesprochen (Piber & Köhler, 2004). Kenntnisse über den Gehalt und die Zusammensetzung von Phenolsäuren sind daher für die Charakterisierung der Qualität von Getreide sehr wichtig. Untersuchungen zum Vorkommen von Phenolsäuren in alten Weizenarten, die als Nischenprodukte eine gewisse Bedeutung besitzen, sind bisher nur wenig durchgeführt worden. Aus diesem Grund ist ein Sortiment unterschiedlicher Weizenarten hinsichtlich des Vorkommens von Phenolsäuren untersucht worden.

Material und Methoden

Im Jahr 2006 ist in der Versuchsstation Gießen ein Feldversuch (ohne Wiederholung) mit 20 Prüfgliedern (Weizenarten, -Varietäten bzw. Sorten) durchgeführt worden. Genutzt worden sind drei diploide, sieben tetraploide und zehn hexaploide *Triticum*-Arten bzw. -Varietäten. Zur Vorbereitung der Phenolsäure-Analyse des Weizens ist eine Extraktionsmethode und eine HPLC-Methode etabliert worden. Folgende Phenolsäuren sind mit der HPLC-Methode untersucht worden: Vanillinsäure (VS), Syringasäure (SYS), Kaffeesäure (KS), p-Coumarsäure (PCS), Ferulasäure (FS) und Sinapinsäure (SIS).

Extraktion: Auf der Grundlage der Methodenbeschreibungen von Adom & Liu (2002), Kohlhoff (2003) und Krygier et al. (1982) ist eine eigene Extraktionsmethode entwickelt worden. Das Korngut ist mit einer Cyclotec 1093 Sample Mill (Foss) auf 0,5 µm vermahlen worden. Das Vollkornmehl (1 g) ist mit einem Methanol/Aceton-Gemisch

(70 %/ 70 %) eine Stunde im Ultraschallbad extrahiert worden. Nach der Zentrifugation bei 2000 rpm entsteht ein Überstand (Rohextrakt) und ein Rückstand. Der Überstand (Rohextrakt) wird bei 40 °C eingengt und mit Reinstwasser auf 10 ml aufgefüllt. Aus diesem Rohextrakt entstehen Fraktion 1 (freie lösliche PS) und Fraktion 2 (lösliche veresterte PS). Der Rückstand bildet Fraktion 3 (zellwandveresterte PS). Zur Gewinnung der Fraktion 1 wird ein Aliquot des Rohextraktes mit Ethylacetat extrahiert. Die Organische Phase wird bei 40 °C eingengt und mit einem Wasser-/ Acetonitrilgemisch auf 10 ml aufgefüllt. Die Filtration vor der HPLC-Analyse erfolgt mit Chromafil GF/PET (0,45 µm) Membranfiltern. Für Fraktion 2 wird ein Aliquot des Rohextraktes mit 5 M NaOH für drei Stunden versetzt. Mit 5 M HCL wird die Reaktion abgebrochen. Danach erfolgt die Extraktion mit Ethylacetat und alle weiteren Schritte wie bei Fraktion 1 beschrieben. Der Rückstand, der neben dem Rohextrakt entstanden ist, wird mit Aceton, 5 M Harnstoff und Reinstwasser gewaschen. Danach erfolgt eine Lyophilisierung (Lyophilisator Alpha 1-2 LD plus, Christ). Das Lyophilisat wird mit 5 M NaOH für drei Stunden versetzt. Der Reaktionsabbruch erfolgt mit 5 M HCL. Die Extraktion erfolgt mit Ethylacetat und alle weiteren Schritte wie bei Fraktion 1 beschrieben.

HPLC-Methode: Die verwendete HPLC-Methode ist nach Zielinski et al. (2001) und Weidner et al. (2000) modifiziert. Das HPLC-DAD System der Firma Knauer wird mit der Trennsäule EC 250x4 Nucleodur Sphinx RP, 5 µm der Firma Macherey-Nagel betrieben. Die Säulentemperatur liegt bei 25 °C. Das Injektionsvolumen beträgt 100 µl. Die mobile Phase besteht aus A: Acetonitril (ACN) und B: 0,5 % Essigsäurepuffer, pH 4,5. Die Flussrate liegt bei 1 ml/min. Der Gradientenverlauf sieht von 0-14,5 Minuten 8 % ACN vor. Ab der 15. Minute erfolgt eine Steigerung auf 10 % ACN für 15 Minuten. Danach erfolgt eine Spülphase für 10 Minuten bei 80 % ACN. Daran schließen sich 5 Minuten mit 8 % ACN an. Der Lauf ist nach 45 Minuten beendet.

Ergebnisse

Die sechs Phenolsäuren (Vanillinsäure (VS), Syringasäure (SYS), Kaffeesäure (KS), p-Coumarsäure (PCS), Ferulasäure (FS) und Sinapinsäure (SIS) sind mit der beschriebenen Methode gut detektiert worden. Wie in den Abbildungen dargestellt, weisen alle drei Fraktionen unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Phenolsäuren auf.

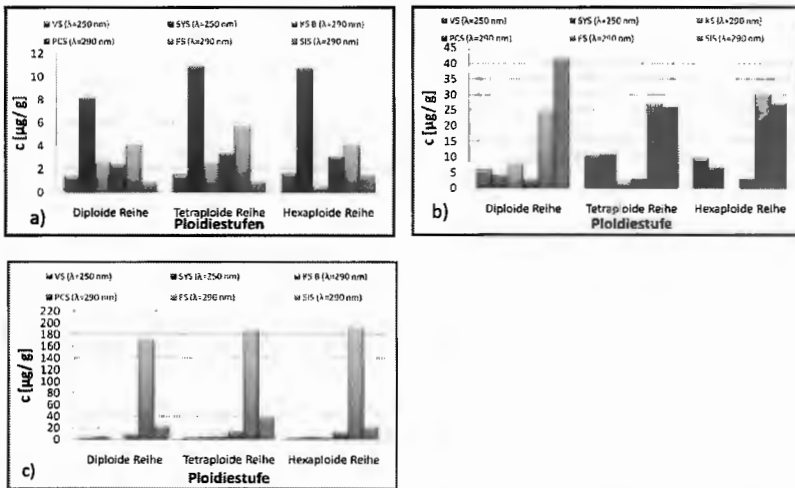


Abb.1: Phenolsäuregehalte in alten Weizenarten in Abhängigkeit von der Ploidiestufe und Fraktion. a) Fraktion 1, b) Fraktion 2, c) Fraktion 3

Insgesamt weist die tetraploide Reihe die höchsten Gehalte auf, gefolgt von der hexaploiden und der diploiden Reihe (Werte nicht dargestellt). Fraktionen 2 und 3 weisen höhere Konzentrationen an Phenolsäuren auf, als Fraktion 1. Aufgrund des hohen Gehaltes an Ferulasäure weist die Fraktion 3 insgesamt die höchsten Phenolsäuregehalte auf. In der Fraktion 1 stellt die Syringasäure, gefolgt von der Ferulasäure die dominierende Phenolsäure dar. Im Gegensatz dazu dominiert innerhalb der Fraktionen 2 und 3 die Ferulasäure, gefolgt von der Sinapinsäure. Mit Ausnahme der Kaffeesäure kommen alle Phenolsäuren in allen untersuchten Weizenarten vor. Die Ferulasäure wird im Weizen als die dominierende Phenolsäure beschrieben, was durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden kann.

Literatur

- Adom, K., Liu, R. (2002): Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem*, 50, 6182-6187
- Kohlhoff, M. (2003): Chitosan-Induzierte Abwehrreaktion des Weizens – histochemische, biochemische und kinetische Aspekte. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Krygier, K., Sosulski, F., Hogge, L. (1982): Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extraction and Purification Procedure. *J Agric Food Chem*, 30, 330-334
- Piber, M., Koehler, P. (2004): Untersuchungen zum Dimerisierungsgrad von Ferulasäure in Weizen- und Roggenmehl während der Brotherstellung. *Getreidetechnologie*, 58,207-210
- Weidner, S., Amarowicz, R., Karamać, M., Frćczek E. (2000): Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 595-602
- Zielinski, H., Kozłowska, H., Lewczuk, B. (2001): Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3), 159-169.



Sainfoin phenolics: isolation, identification and their quantification in different plant organs

Ionela Regos and Dieter Treutter

Technische Universität München, Fachgebiet Obstbau, Dürnast 2, 85354 Freising
regos@wzw.tum.de

Introduction

Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) is a traditional forage legume with excellent nutritional and veterinary properties, namely prevention of bloat and controlling nematode parasitism in ruminants. These beneficial effects are thought to be due to the particular tannin structure, characteristic of sainfoin but also other phenolic compounds such as flavonols may be involved in this beneficial property [Barrau E. *et al.*, (2005). *Parasitology*, 131(4): 531-538; Brunet S. *et al.*, (2008), manuscript submitted: "The sheath of infective nematode larvae is the target for flavonoids and condensed tannins from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*)"]. However, since the identification of interesting candidates for future breeding programmes is necessary, the purpose of this study was to isolate and identify the phenolic compounds from sainfoin and to investigate their distribution in the aerial plant parts with different ontogenetic stages.

Methods

An acetone/water (7:3) extract of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) was separated by Sephadex LH-20 column chromatography into forty-five fractions. All fractions were examined by TLC, HPLC and HPLC-ESI-MS/MS for their phenolic constituents.

The phenolic composition was investigated from the aerial parts at different ontogenetic stages (leaves, stems, flower stalks and flower buds) of six sainfoin plants (var. Cotswold Common) at the preflowering stage, and from the mature (open) flowers of one plant at flowering stage.

The new leaves (with still folded leaflets) were divided in young leaflets and petioles and the old leaves (with mature petioles) were divided in mature leaflets and petioles. The different phenolic compounds were quantified as described by Regos *et al.*, [manuscript in preparation: "Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin, (*Onobrychis viciifolia*)"].

Results and Discussion

Sixty-three aromatic constituents belonging to amino acids, alkaloids, phenolic acids, dihydroflavonols, flavone-C-glucosides and isoflavones were isolated and characterised.

Flavan-3-ol monomers as well as dimeric and trimeric condensed tannins were also selectively detected using HPLC with post column derivatisation [Treutter, D., (1989). *J. of Chromatog.* 467:185-193, Treutter, D., (1994). *J. of Chromatog.* 667:290-297]. In addition, preparative TLC using polyamide plates was used to isolate individual glycosides of the flavonols quercetin, kaempferol, myricetin and isorhamnetin from the partially purified ethyl acetate fractions. After hydrolysis of the glycosides, the position of the sugar moieties was investigated by spectral properties after addition of diagnostic reagents.

In sainfoin, all tested aerial parts contained polyphenolics but their locations were specific to the organ considered. Moreover, there were considerable variations among phenolic concentrations from diverse plant organs. The three most abundant polyphenols were found to be arbutin (predominant phenolic in petioles, 17.67mg/g DW), rutin (predominant in leaves, 19.94mg/g DW) and catechin (predominant flavanol in petioles 3.46mg/g DW). A perusal of the results obtained for each plant showed that there is a pattern to the distribution of phenolic compounds. For example, the young petioles of one plant contained no quercetin 3-arabinoside and isorhamnetin 3-rutinoside, but produce greater quantities of rutin (21.1mg/g DW) than the young petioles of other two plants which accumulate in addition to rutin (1.9 and 4.3mg/g DW) the other two flavanol glycosides (1.1mg/g DW Que 3-arab, 5.2mg/g DW Iso-3-rut in plant 2, and 1.1mg/g DW Que 3-arab, 5.2 mg/g DW Iso-3-rut in plant 3).

Table 1 shows the means of phenolic concentration of young leaves and petioles (n = 3), of stems, flower stalks and flower buds (n = 6) and the concentration of old flowers from one plant.

Acknowledgements

These investigations were supported by the European Commission (Project MRTN-CT-2006-035805).

Table 1: The composition of the sainfoin polyphenols and their concentration in diverse aerial plant organs in mg/g DW

label	compound	young lefls	young petioles	stems	flower stalks	flower buds	mature flowers
<i>simple phenolic acids</i>							
P1	arbutin	-	17.67	4.90	8.71	-	-
P2	8- β -glucopyranosyloxycinnamic acid	0.01	1.94	1.80	2.03	0.28	0.21
	other simple phenolic acids	2.59	3.31	0.72	1.26	3.08	2.19
	total simple phenolic acids	2.61	22.92	7.42	12.00	3.36	2.40
<i>hydroxybenzoic acids</i>							
B1	p-hydroxybenzoic acid	-	-	-	-	-	-
B2	protocatechuic acid	-	-	-	-	-	0.03
B4	vanillic acid 4-O-glucoside	-	-	0.07	0.09	0.07	0.06
	total hydroxybenzoic acids	-	-	0.07	0.09	0.07	0.09
<i>hydroxycinnamic acids</i>							
C2+C3	cis+trans p-coumaric acid 4-O-glucoside	0.38	0.37	0.11	0.28	0.34	0.15
C5	trans 3-p-coumaroylquinic acid	0.04	0.01	0.02	0.01	0.03	-
C13	trans caffeoylglucose	0.08	0.06	0.03	0.04	0.09	0.04
C16	trans neochlorogenic acid (trans 3-CQA)	0.97	0.37	0.14	0.23	0.39	0.10
C18	trans chlorogenic acid (trans 5-CQA)	0.66	0.25	0.03	0.08	0.28	-
	other hydroxycinnamic acids	1.32	0.82	0.25	0.58	1.25	0.21
	total hydroxycinnamic acids	3.45	1.87	0.58	1.22	2.39	0.50
<i>flavanols</i>							
F1	catechin	0.59	3.46	0.53	1.10	0.55	0.03
F2	epicatechin	0.22	1.23	0.29	0.41	0.07	0.02
F3	galloatecbin	0.72	0.28	0.07	0.05	0.19	0.16
F4	epigallocatechin	0.35	0.36	0.08	0.09	0.20	0.31
F5	procyanidin B2	0.03	0.30	0.09	0.10	0.01	-
F8	procyanidin B5	-	0.09	0.02	0.01	-	-
F10	procyanidin E-B5	-	0.03	0.01	-	-	-
	other flavanols	1.59	2.53	0.54	0.93	0.57	0.11
	total flavanols	3.50	8.26	1.60	2.69	1.58	0.63
<i>flavones</i>							
	flavone derivatives	1.22	1.86	0.53	1.41	1.14	0.09
	total flavone derivatives	1.22	1.87	0.53	1.41	1.14	0.09
<i>flavonols</i>							
G3	kaempferol 3-O-rhamnoglucoside	2.82	0.24	0.06	0.16	1.31	0.16
G7	quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin)	0.57	0.60	0.17	0.26	0.44	0.13
G8	quercetin 3-O-rhamnoglucoside (rutin)	19.94	9.14	2.57	6.63	5.78	2.02
G9	quercetin 3-O-rhamnosylrutinoside	2.14	1.52	0.78	1.19	0.58	0.40
G14	isorhamnetin 3-O-rhamnosylrutinoside	3.56	3.56	0.69	1.48	0.29	-
1	kaempferol	-	-	-	-	-	0.05
2	quercetin 3-arabinoside	0.79	0.72	0.43	-	0.10	-
	other flavonols	3.53	1.64	0.68	0.98	1.41	0.33
	total flavonols	33.34	17.43	5.37	10.90	9.91	3.09
<i>anthocyanins</i>							
3	cyanidin 3-O-glucoside	-	0.04	0.18	0.08	0.04	0.01
4	delphynidin 3-O-glucoside	-	-	-	-	-	0.16
	other anthocyanins	-	-	0.05	-	0.05	0.17
	total anthocyanins	-	0.04	0.23	0.08	0.09	0.34

† with letters and numbers were labeled the compounds previously identified in the acetone extract; with numbers (1 - 4) were labeled the compounds identified in the plants organs by co-chromatography with standards.

Effects of pine pollen extracts on the proliferation of porcine ileal cell cultures

S. Masanetz¹, C. Kaufmann¹, T. Letzel², M. Pfaffl¹

¹Institute of Physiology, Centre of Life and Food Sciences (ZIEL), Technical University of Munich

²Analytical Research Group, Chair of Biopolymer Chemistry, Technical University of Munich

Introduction

Pollen of *Pinus massoniana* has been used in traditional Chinese medicine for a long time to treat a variety of diseases including disorders of the digestive system. In modern times pine pollen and its health promoting effects are advertised worldwide, but only few studies have been performed to verify those claims. One of these found that addition of Masson Pine pollen to the feed modified mRNA expression levels of inflammatory, cell cycle and growth associated genes in colon of piglets (Schedle et al., 2008). Choi (2007) found that *Pinus densiflora* pollen extracts exhibited anti-nociceptive and anti-inflammatory activities in mice and attributed these effects to the content of polyphenolic compounds in the pollen.

The present study was performed to investigate the effects of different extracts obtained from pollen of *Pinus massoniana* on cell proliferation and expression profiles of selected genes in a porcine ileal cell culture (IPI-21). Furthermore a first attempt was made to identify pollen compounds responsible for effects observed during this work.

Material and Methods

Ground Masson Pine pollen was extracted with one of the following solvents: water, 50% ethanol, 100% ethanol or a mixture of hexane and 80% methanol (v/v=1:1). Hexane and 80% methanol formed distinct phases which were further processed individually. Extracts were dried using either vacuum centrifugation or lyophilization and residues were dissolved in PBS containing 20% (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Extracts were sterile filtered and stored at -20°C. For control treatments extracts were produced with the same solvents but without addition of pollen.

Cell proliferation of the porcine ileal cell line IPI-21 was investigated with an electric cell-substrate impedance sensing device (ECIS™ Model 1600, Applied Biophysics, Troy, New York). Cells were cultured at a density of 2.0×10^4 cells/well in 8-Well arrays (ECIS

Cultureware 8W10E, Applied Biophysics) fitted with 10 electrodes per well. Extracts were added to reach a final concentration equivalent to 1% pollen in the medium and control treatments were performed with equal amounts of corresponding control extracts. Impedance results were normalized to the first value obtained immediately after addition of cells.

After 48 h of cultivation total RNA was extracted using Nucleospin[®] RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol and qRT-PCR reactions were performed with Rotor-Gene 3000 (Corbett Live Science, Sydney, Australia) and the SuperScript[™] III Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen). Specific primer sets for all investigated genes are given in table 1. The run protocol consisted of reverse transcription (10 min at 50°C), denaturation (5 min at 95°C) and an amplification and quantification step consisting of 45 cycles (15 s at 95°C, 30 s at 60°C, 20 s at 68°C).

Table 1: **Primer pairs for quantitative RT-PCR**

Gene	Primers		Gene	Primers
histon H3 (reference)	For	ACTGGCTACAAAAGCCGCTC	cyclin A (proliferation)	GCAGCAGCCTTTCATTTAGC
	Rev	ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC		TGAAGGTCCAGGAGACAAGG
ubiquitin (reference)	For	AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT	TGFβ (anti-inflammatory)	TACTACGCCAAGGAGGTCAC
	Rev	GCTCCACCTCCAGGGTAT		TCTGCCCGAGAGAGCAATACA
GAPDH (reference)	For	AGCAATGCCTCCTGTACCAC	IL-6 (pro-inflammatory)	AAGGTGATGCCACCTCAGAC
	Rev	AAGCAGGGATGATGTTCTGG		TCTGCCAGTACCTCCTTGCT
caspase 3 (pro-apoptotic)	For	TGTGTGCTTCTAAGCCATGG	IL-8 (pro-inflammatory)	GGCAGTTTTCTGCTTCTGCTGC
	Rev	AGTTCTGTGCCTCGGCAG		CAGTGGGGTCCACTCTCAAT

LC-ESI-ToF-MS was applied to achieve detailed information of compounds contained in the different extracts. The separation was performed with a Prontosil 120-3-C18 reversed-phase column (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany) and was coupled with electrospray ionization-mass spectrometry. The screening analysis was performed on simultaneous detection of positively and negatively charged ions with a high-resolution and high-accuracy time-of-flight mass spectrometer (6210 ToF LC/MS, Agilent, Santa Clara, CA). Further details can be found in a recently published study using a similar analytical set-up (Grosse and Letzel, 2007).

Statistical analysis of cell culture results was done with Student's t-test for each time point. Relative quantification and statistical analysis of gene expression results was performed with REST 2008 V.2.0.1 (Corbett Live Science). In both cases a significant difference between pollen and control extract treatment was declared at values of $p < 0.05$. Values represent the mean of four repetitions.

Results

Comparison of growth curves revealed that water and 50% ethanol extracts of Masson Pine pollen decreased impedance values significantly to 70% respectively 50% of the values of control treated wells ($p < 0.05$). Significant differences were visible after approximately 15 to 20 h after seeding. 100% ethanol, 80% methanol and hexane extracts had no significant effects on cell proliferation.

Only the 50% ethanol extract led to a significant up-regulation of mRNA expression levels of the pro-inflammatory genes IL-6 (factor 4.3, $p = 0.012$) and IL-8 (factor 2.3, $p = 0.024$) and to a down-regulation of the proliferation regulator cyclin A (factor 0.7, $p = 0.039$).

LC-ESI-MS was performed in order to characterize the compounds responsible for these effects and a number of distinct mass signals has been identified that can be found in the 50% ethanol extract but not in the aqueous extract. A detailed identification of these substances was not yet possible due to missing reference substances – with the exception of fisetin and naringenin. However, most compounds could be characterized via hydrophobicity (retention factor), ionization behavior and the molecular formula. A database containing the three independent parameters (Berkemeyer and Letzel, 2008) will identify these compounds very specific in forthcoming samples.

Conclusion

Compounds of pine pollen soluble in 50% ethanol and water seem to be effective to decrease cell proliferation of porcine ileal cells *in vitro*. But only substances in the 50% ethanol extract appear to influence mRNA expression of cyclin A as a possible explanation for the decrease of proliferation observed. It is to be expected that additional regulators of cell proliferation or death are also targeted by water soluble substances that may also be present in the 50% ethanol extract. A decrease of cell proliferation has already been found for a variety of polyphenols (e.g. Kaneuchi et al., 2003; Briviba et al., 2002) supporting the assumption that the bioactive compounds of the two effective extracts may also be of polyphenolic origin.

A modulation of the pro-inflammatory IL-6 and IL-8 suggests that pollen compounds present in the 50% ethanol extract are able to alter the fine tuning of the inflammatory status of ileal cells. The regulations found in the present study hint to an increase of the inflammatory status of the cultured cells while in contrast polyphenols mostly have been found to have anti-inflammatory properties. Nevertheless there is evidence for some polyphenolic substances – e.g. *cis-resveratrol* – to increase expression of pro-inflammatory interleukins such as IL-6 (Leiro et al., 2005). Down-regulation of cyclin A expression has been found before in vascular smooth muscle cells treated with red wine polyphenols (Iijima et al., 2000).

References

Berkemeyer C., Letzel T. (2008): LC-API-MS(/MS) for biological samples: Importance of hydrophobicity, molecular weight and structural development. LC-GC Eur. 21, 548-561.

- Briviba K., Pan L., Rechkemmer G. (2002): Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J. Nutr.* 132, 2814-2818
- Choi E. (2007): Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. *Phytother. Res.*, 21, 471-475
- Grosse S., Letzel T. (2007): Liquid chromatography / atmospheric pressure ionization mass spectrometry with post-column liquid mixing for the efficient determination of partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A*, 1139, 75-83
- Kaneuchi M., Sasaki M., Tanaka Y., Sakuragi N., Fujimoto S., Dahiya R. (2003): Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *Int. J. Oncol.* 22, 159-164
- Leiro J., Arranz J.A., Fraiz N., Sanmartin M.L., Quezada E., Orallo F. (2005): Effect of *cis*-resveratrol on genes involved in nuclear factor kappa B signaling. *Int Immunopharmacol.* 5, 393-406
- Schedle K., Pfaffl M.W., Plitzner C., Meyer H.H.D., Windisch W. (2008): Effect of insoluble fibre on intestinal morphology and mRNA expression pattern of inflammatory, cell cycle and growth marker genes in a piglet model. *Arch Anim Nutr.* 62 (6), 427-438



Cellular uptake and localization of the flavonoid cyanidin in human keratinocytes in culture

Ernst I.¹, Wagner A.E.¹, Lipinski S.², Desel C.³ and Rimbach G.¹

¹ Institute of Human Nutrition and Food Science, Christian-Albrechts-University Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 6, 24098 Kiel, Germany; ² Institute for Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University Kiel, Schittenhelmstr. 12, 24105 Kiel, Germany

³ Institute of Botany, Christian-Albrechts-University Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel

Anthocyanins are supposed to mediate health benefits including antioxidant, antiinflammatory and anticarcinogenic activity. Anthocyanins and the corresponding non-glycosylated anthocyanidins such as cyanidin, malvidin and delphinidin belong to the group of flavonoids and occur in various plants as coloring pigments. Especially red fruits, certain vegetables and red wine serve as dietary sources of anthocyanins.

Little is known regarding the cellular uptake and localization of anthocyanidins in mammalian cells. Therefore in the present study the uptake of the anthocyanidin cyanidin was examined via fluorescence activated cell-sorting (FACS) and its intracellular localization was determined by confocal laser-scanning microscopy in human keratinocytes (HaCaT).

HaCaT cells were incubated for 2, 4, 8 and 24 h with 100 µmol/L cyanidin chloride, a non-cytotoxic concentration. The cells were subsequently treated with Naturstoff reagent A (0.2 % 2-aminoethyl-diphenylborinate in PBS). Naturstoff reagent A forms a fluorescent complex with anthocyanidins that can be detected via FACS and confocal laser scanning microscopy at an excitation wavelength of 488 nm.

Following 2 h of incubation with 100 µmol/L cyanidin, the highest fluorescence signal of cyanidin and Naturstoff reagent A was measured by FACS. After 4, 8 and 24 h incubation with cyanidin this peak fluorescence was decreased by about 25%, 40% and 70% respectively.

Similar results were obtained by confocal laser scanning microscopy indicating the highest fluorescence signal after a 2 h incubation time. Irrespective of the incubation time the intracellular distribution of the fluorescence signal indicated that cyanidin mainly accumulated in the cytoplasm in proximity to the nucleus. Furthermore cyanidin also migrated into the nucleus to certain extent, which in turn may affect gene expression.



Assessing the Effects of the Flavonoid Myricetin in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*

G. Grünz, B. Spanier and H. Daniel

Molecular Nutrition Unit, Technical University of Munich, Am Forum 5, D-85350 Freising,
Germany; gregor.gruenz@wzw.tum.de

Flavonoids, representing a major group of secondary plant compounds, are abundant in many plant foods and beverages, such as tea, berries and fruits. Although, these polyphenolic compounds were shown to have numerous effects on human health, the underlying molecular mechanisms remain mostly unknown. Additionally, the majority of such studies are done *in vitro* in cell culture systems while the effects of flavonoids in more complex organism are poorly understood. We use the nematode *C. elegans*, which has been shown to be a suitable model for cell biology and developmental studies to gain insights into the various effects of the naturally occurring flavonol myricetin (3, 3', 4', 5, 5', 7-Hexahydroxyflavone). Especially antioxidative properties are described for this plant compound but several studies also demonstrated prooxidative activity. Furthermore, effects on cell-signal cascades and enzymatic systems such as MAP-kinase-cascade, JAK/STAT-cascade, ABC-transporters and xanthinoxidase were shown as well.

We could show that myricetin (100 μ M) increases the heat-stress tolerance in the genetically modified *C. elegans* strain TK22 (*mev-1*) but not in wild-type animals. As this mutant strain is carrying a genetic defect in complex II of the respiratory chain leading to an endogenously increased ROS-level and a markedly reduced life-span, we tested whether myricetin can protect the animals against exogenous challenge by reactive oxygen species (ROS). A pre-incubation with myricetin (100 μ M) did not alter the resistance towards oxidative stress neither in wild-type nor in ROS-sensitive *mev-1* animals. Surprisingly, co-exposure of both worm strains to myricetin (100 μ M) in the presence of the ROS-generating compound paraquat (1.6 mM) resulted in a drastically reduced stress resistance compared to worms treated with paraquat alone. Even at a lower concentration of myricetin (50 μ M) a significantly reduced ROS-stress resistance in *mev-1* and also, yet to a lower extend, in wild-type animals was found. Based on these findings we postulate that myricetin alone might induce a mild stress condition in worms resulting in an activation of stress-defence mechanisms which increases the overall stress resistance (hormesis effect). However, overloading the system with the strong ROS-generator paraquat leads to a drastically diminished overall stress resistance.

To investigate the underlying mechanisms of myricetin's actions in *C. elegans*, we use GFP-reporter strains (GFP = green fluorescent protein) expressing fusion proteins of GFP coupled to certain stress-defence enzymes (e.g. heat-shock proteins, superoxide dismutases) allowing their expression rate to be studied. The heat-shock protein hsp-16.2 was shown to act as chaperone protecting macromolecules in *C. elegans* after heat shock. Pre-incubation of a hsp16.2::GFP harbouring strain with 100 μ M myricetin moderately reduced the hsp16.2::GFP fluorescence suggesting myricetin to reduce hsp16.2 expression. The insulin-like signalling cascade (ILS) plays a prominent role in lifespan control and stress resistance in *C. elegans*. The endpoint of this cascade is the transcription factor DAF16 that regulates the transcription of several enzymatic ROS-defence systems such as SOD's and catalases as well as enzymes of the GSH synthesis pathway. We used a GFP-reporter strain expressing a DAF16::GFP fusion protein to investigate the effects of myricetin on this signalling process. Recently studies using the flavonol quercetin showed a translocation of this transcription factor into the nucleus suggesting the protective effects of this flavonoid to arise from DAF16 dependent processes (Kampkoetter *et al.* 2008 & 2007) despite the fact that doubts have been raised whether DAF16 is the sole regulator of the quercetin-dependent activities (Saul *et al.* 2008). However, myricetin did not alter the translocation of DAF16 in our system, supporting the hypothesis of a DAF16-independent action in *C. elegans*. We are currently assessing with quantitative PCR the transcription levels of selected enzymatic defence systems and employing RNA-interference techniques to down-regulate these key enzymes to gain further insights into myricetin effects.

Literature:

- Kampkötter, A., Nkwonkam, C.G., Zurawski, R.F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen W., Kahl, R., 2007. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 234, 113–123.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W., 2008. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 149, 314–323.
- Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CE, 2008, Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mech Ageing Dev.* 129(10):611-613.



Effect of dietary genistein on phase II and antioxidant enzymes in rat liver

*H. Wiegand (1), A.E. Wagner (1), C.Bösch-Saadatmandi (1), Hans-Peter Kruse (2),
S. Kulling (2), G. Rimbach (1)*

(1) Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrechts-Universität,
24118 Kiel

(2) Institut für Ernährungswissenschaft, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität
Potsdam, 14558 Nuthetal

Isoflavones are thought to be one biologically active components in soy that play a role in the prevention of chronic diseases. Mechanisms to explain how isoflavones may mediate beneficial effects have yet not been fully established. Potential mechanisms of cellular action of isoflavones may include their ability to modulate gene expression and activity levels of enzymes involved in antioxidant defence and the metabolism of xenobiotics including NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione-S transferase (GST). Although there is increasing evidence from cell culture studies that genistein, the major isoflavone present in soy, may regulate expression of genes encoding for phase II and antioxidant enzymes, little is known about its effect in vivo. Feeding rats over 3 weeks with semi-synthetic diets enriched with genistein (2 g/kg diet each) significantly increased both hepatic mRNA and activity levels of NQO1. The total GST activity did not change in response to dietary genistein supplementation, whereas the mRNA levels of individual GST isoenzymes were differentially modulated. The hepatic mRNA level of *Gsta2* was significantly increased whereas the mRNA levels of *Gstm2* and *Gstp1* were significantly lowered due to genistein supplementation. Protein level of Nrf2, a transcription factor involved in the regulation of phase II enzyme gene expression, were not altered by dietary genistein. Furthermore genistein did not affect the hepatic enzyme activity of the antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase as well as liver lipid peroxidation and glutathione levels. The induction of NQO1, as observed in the present study, may be one mechanism by which dietary genistein improves the capacity of the liver to detoxify xenobiotics.

Untersuchungen zum anti-inflammatorischen Potential von Quercetin in Makrophagen und im Modelltier Maus

Christine Bösch-Saadatmandi¹, Siegfried Wolffram², Gerald Rimbach¹

¹ Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde; ² Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie, Christian-Albrechts-Universität Kiel

Das Flavonol Quercetin unterliegt nach Ingestion einer raschen Metabolisierung, so dass in der Zirkulation überwiegend methylierte, glucuronidierte und sulfatierte Metabolite nachgewiesen werden. Bisher liegen kaum Studien vor, welche eine potentiell anti-inflammatorische Wirkung einer Supplementierung mit Quercetin *in vivo* dokumentieren.

Die vorliegende Studie hatte daher zum Ziel, den Einfluss von diätetisch verabreichtem Quercetin auf inflammatorische Marker im Modelltier Maus zu untersuchen. Ergänzend hierzu wurde das anti-inflammatorische Potential von Quercetin sowie ausgewählter Metaboliten des Quercetins in einem Makrophagen-Stimulationsmodell vergleichend untersucht.

Weibliche Mäuse (C57BL/6) wurden über einen Zeitraum von 6 Wochen mit Quercetin-angereicherten Diäten gefüttert (0,05 - 2 mg Quercetin je g Diät). Als Kontrolle der Quercetinaufnahme wurde der Quercetiningehalt im Plasma (HPLC) ermittelt. Weiterhin wurden basale Zytokinspiegel (TNF α , IL1 β , MIP1 α , IL6) sowie die Zytokinsekretion nach *ex vivo* Stimulation des Vollblutes mit Lipopolysaccharid (LPS) im Vollblut (Immunoassay) erfasst. Es wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Konzentration an Quercetin- und seinem 3'-methylierten Metaboliten Isorhamnetin im Plasma nachgewiesen. Darüber hinaus konnte eine Reduktion der basalen TNF α -Spiegel durch Quercetin gezeigt werden.

Um anti-inflammatorische Effekte des Quercetin-Aglykons und seiner Metabolite zu untersuchen, wurden murine RAW264.7 Makrophagen mit Quercetin, Isorhamnetin sowie Quercetin-3- β -O-glucuronid inkubiert (0,25-10 μ mol/l; 6-24 h), mit LPS stimuliert und die Expression (real time PCR) sowie Sekretion (Immunoassay) von TNF α , IL1 β und IL6 erfasst. Die Inkubation der Makrophagen mit Quercetin und Isorhamnetin resultierte in einer deutlichen dosisabhängigen Abnahme der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung; Quercetin-3- β -O-glucuronid hatte hingegen keinen Einfluss.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass eine Supplementierung von Quercetin über die Diät zu einem deutlichen Anstieg an Quercetin und seiner Metabolite im Plasma führt und gleichzeitig zur Reduktion basaler TNF α -Spiegel beitragen kann. Die beobachteten anti-inflammatorischen Effekte von Quercetin *in vivo* lassen sich auch im Makrophagenmodell abbilden.

Pflanzenschutzbehandlung oder Sortenwahl: Was beeinflusst den Polyphenolgehalt von Äpfeln?

Maria Fischer¹, Eva Arrigoni¹, Melanie Erzinger¹, Hans Schärer¹, Daniel Baumgartner¹, Anna Bozzi Nising¹, Richard F. Hurrell²

¹Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW, Wädenswil, CH

²Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften, ETHZ, Zürich, CH

Einleitung

Äpfel sind die in der Schweiz am häufigsten konsumierten Früchte und nicht nur bei diesen nimmt die Bedeutung von Bioprodukten zu. Der Einfluss der Pflanzenschutzbehandlung auf den Gehalt der gesundheitlich bedeutenden Polyphenole ist nicht eindeutig geklärt. So konnte zwar gezeigt werden, dass deren Gehalt im Fruchtfleisch von Bio-Äpfeln gegenüber solchen aus konventioneller bzw. integrierter Produktion höher ist [1-3], wobei aber unterschiedliche Sorten verglichen wurden. Vergleiche innerhalb einer Sorte zeigten weder einen signifikanten Einfluss der Behandlung auf den Polyphenolgehalt [4,5] noch auf gesundheitliche Parameter [5]. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der Sorte demjenigen der Pflanzenschutzbehandlung gegenüber zu stellen.

Versuchsaufbau

Äpfel der Sorten Ariane, Golden Delicious, Otava und Topaz wurden am gleichen Standort, aber mit unterschiedlicher Behandlung produziert. Von jeder Sorte wurden Bäume ohne Pflanzenschutz (Kontrolle), biologisch (Bio), mit wenig Pflanzenschutz (LowInput) und mit üblichem kurativem, integriertem Pflanzenschutz (IP) behandelt. Aus den sich daraus ergebenden 16 Varianten wurden zur Ernte jeweils 20 Früchte mit einem Apfelfeiler geteilt, je zwei Schnitze davon in Flüssigstickstoff eingefroren, gemahlen und bei -20°C gelagert. 2,5 g des gefrorenen Apfelpulvers wurden mit 50 ml Methanol (+1 % Ameisensäure) extrahiert und in den Extrakten wurden der Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Polyphenolmuster mit UPLC-MS bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Gesamtpolyphenolgehalte der untersuchten Äpfel wiesen signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzenschutzmethoden auf (Abb. 1). Bei der Sorte Ariane zeigt die Variante „IP“ den signifikant höchsten Gehalt, wohingegen bei Golden Delicious und Topaz „Bio“ höher ist. Bei der Sorte Otava wurde der höchste Gehalt bei der unbehandelten Variante gemessen. Die Polyphenolmuster unterscheiden sich deutlich (Abb. 2). In Ariane

und Golden Delicious dominiert Chlorogensäure, in den Sorten Otava und Topaz dagegen Epicatechin und Procyanidin B2.

Ein Vergleich der 16 Varianten lässt keinen eindeutigen Schluss zu, welche der vier Pflanzenschutzbehandlungen den höchsten Polyphenolgehalt hervorbringt. Vielmehr scheint die Sortenfrage von grösserer Bedeutung zu sein, was die Aussage von Lamperi et al [4] bestätigt.

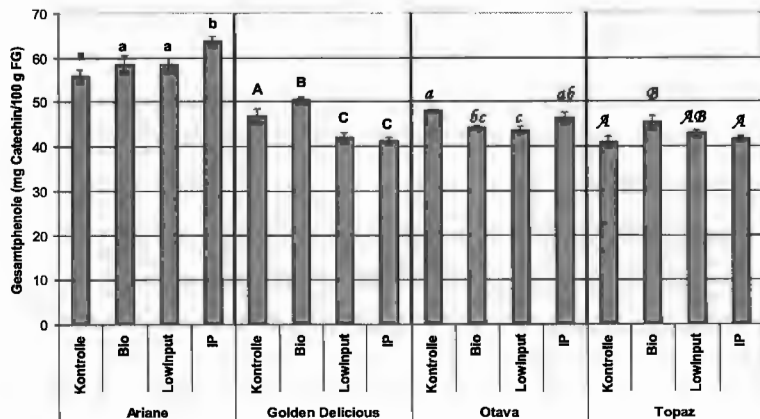


Abb. 1: Gesamtphenolgehalte (Folin-Ciocalteu) der verschiedenen Varianten; Signifikanzniveau 5%

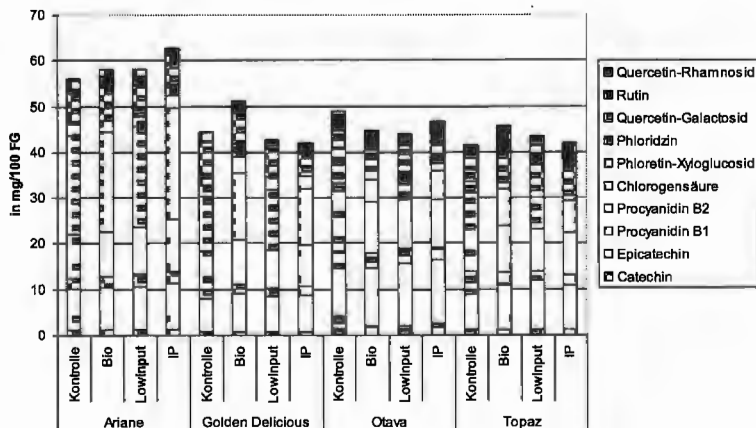


Abb. 2: Polyphenolmuster der verschiedenen Varianten bestimmt mit UPLC-MS

Literatur

- [1] Veberic, R. and F. Stampar (2005). Conference Proceedings of Frutic 05, Montpellier.
- [2] Veberic, R., M. Trobec, K. Herbinger, M. Hofer, D. Grill and F. Stampar (2005). J Sci Food Agric 85: 1687-1694.
- [3] Hecke, K., K. Herbinger, R. Veberic, M. Trobec, H. Toplak, F. Stampar, H. Keppel and D. Grill (2006). Eur J Clin Nutr 60: 1136-1140.
- [4] Lamperi, L., U. Chiuminatto, A. Cincinelli, P. Galvan, E. Giordani, L. Lepri and M. Del Bubba (2008). J Agric Food Chem 56: 6536-6546.
- [5] Briviba, K., B. A. Stracke, C. E. Rüfer, B. Watzl, F. P. Weibel and A. Bub (2007). J Agric Food Chem 55: 7716-7721.

Bioverfügbarkeit und antioxidatives Potenzial von Polyphenolen aus ökologisch und konventionell angebauten Äpfeln *in vitro* und *in vivo*

*Corinna E. Rüfer¹, Berenike A. Stracke², Sabine Häckel¹, Franco Weibel³, Achim Bub²,
Bernhard Watzl²*

¹Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse, Karlsruhe, Deutschland; ²Max Rubner-Institut, Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Karlsruhe, Deutschland; ³Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Fachgruppe Anbautechnik Pflanzenbau; Frick, Schweiz

Hintergrund:

Die Diskussionen über sichere Lebensmittel (u.a. Rückstände von Pestiziden) im letzten Jahrzehnt hat das Verbraucherverhalten verändert. Viele Verbraucher bevorzugen ökologisch erzeugte Lebensmittel. Allerdings gibt es bis heute noch nicht ausreichend wissenschaftliche Daten, ob ökologisch produzierte Lebensmittel tatsächlich ernährungsphysiologisch hochwertiger sind als konventionell erzeugte. Zur ernährungsphysiologischen Charakterisierung von Lebensmitteln können z.B. der Polyphenolgehalt und das antioxidative Potential herangezogen werden.

Polyphenole gehören zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe und werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt: den Phenolsäuren und Flavonoiden. Ihre in der Literatur beschriebenen protektiven Effekte auf entzündliche, atherosklerotische und tumorigene Prozesse werden u.a. auf ihr antioxidatives Potenzial zurückgeführt. Erhebungen in Deutschland zeigen, dass pro Tag durchschnittlich 200 mg Phenolsäuren und 54 mg Flavonoide mit der Nahrung aufgenommen werden. Eine wichtige Quelle für Flavonoide sind - neben schwarzem Tee, Rotwein, dunkler Schokolade und Zwiebeln - Äpfel. Sie enthalten im Schnitt insgesamt mehr als 2 g/kg Polyphenole, wobei Flavonoide den Hauptanteil ausmachen.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob sich ökologisch und konventionell angebaute Äpfel hinsichtlich ihres Gehalts an Polyphenolen und ihres antioxidativen Potenzials unterscheiden. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Anbauweise die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen sowie den antioxidativen Status im Menschen unterschiedlich beeinflusst.

Methoden:

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Äpfel der Sorte Golden Delicious über drei Jahre (2004 - 2006) verwendet, die aus fünf benachbarten konventionell bzw. ökologisch bewirtschafteten Betrieben stammten. Die Äpfel wurden vom Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL) in der Schweiz zur Verfügung gestellt. Nach Extraktion der

Phenolsäuren und Flavonoide aus den Äpfeln wurde die antioxidative Kapazität der Apfelproben mit drei unterschiedlichen Testsystemen, dem FRAP-, ORAC-, sowie dem TEAC-Test, gemessen. Mittels HPLC/DAD/MS wurden die einzelnen Polyphenole identifiziert und quantifiziert.

Weiterhin wurde eine humane Interventionsstudie durchgeführt. 43 gesunde Nichtraucher verzehrten ökologisch (n=16) oder konventionell (n=16) angebaute Äpfel (4 Wochen, täglich 500 g) der Sorte Golden Delicious. Eine dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt keine Äpfel (n=11). Zu Beginn der vierwöchigen Interventionsphase und am Ende wurde Blut abgenommen und Urin gesammelt.

Das antioxidative Potenzial im Plasma der Studienteilnehmer wurde mittels der drei antioxidativen Testsysteme bestimmt (FRAP-, ORAC-, und TEAC-Test). Als Summenparameter für die Bioverfügbarkeit der Polyphenole im Urin wurde der Folin-Ciocalteu Test durchgeführt. Zusätzlich dazu wurden die einzelnen Polyphenole (phenolische Säuren und Flavonoide) in Plasma und Urin der Studienteilnehmer mittels HPLC/MS identifiziert und quantifiziert.

Ergebnisse:

Die antioxidative Kapazität in den ökologischen Äpfeln war 2005 und 2006 15% höher ($p < 0,05$) als in den konventionell angebauten. Weiterhin wurden 2005 signifikant höhere Polyphenolkonzentrationen in den ökologischen Äpfeln gefunden, während 2004 und 2006 keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten (in $\mu\text{g/g}$ FG: 2004: 304 ± 68 öko. vs. 283 ± 69 konv., $p = 0,18$; 2005: 302 ± 58 öko. vs. 253 ± 41 konv., $p = 0,002$; 2006: 402 ± 100 öko. vs. 364 ± 58 konv., $p = 0,17$). Die Jahresunterschiede sowohl bei der antioxidativen Kapazität als auch in der Polyphenolkonzentration mit ca. 20% hatten hingegen einen größeren Einfluss als die Anbauweise.

Durch einen vierwöchigen Verzehr von Äpfeln kam es zu keiner Änderung des antioxidativen Status im Plasma. Darüber hinaus wurden keine signifikanten Unterschiede im Gesamtpolyphenolgehalt (Folin-Ciocalteu Test) gefunden. Die Ergebnisse zur Urinkonzentration einzelner phenolischer Säuren und Flavonoiden (HPLC/MS) werden derzeit ausgewertet.

Fazit: Es zeigte sich, dass hinsichtlich des Polyphenolgehalts und des antioxidativen Potenzials in Äpfeln bei der Sorte Golden Delicious keine nennenswerten Unterschiede zwischen der konventionellen und der ökologischen Anbauweise existierten. Die Anbauweise wirkt sich also offensichtlich wesentlich weniger auf die ernährungsphysiologische Qualität der Äpfel aus als andere Faktoren, wie zum Beispiel das Klima.

Der Verzehr von 500 g Äpfeln pro Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen wirkte sich nicht auf den antioxidativen Status der Studienteilnehmer aus. Persistierende Änderung des Polyphenolgehalts (Folin-Ciocalteu Test) konnten nicht gefunden werden. Der Einfluss auf den antioxidativen Status im Menschen war aus konventionellen oder ökologisch angebauten Äpfeln identisch. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Polyphenole aus Äpfeln

nur gering absorbiert, bzw. in erheblichem Maße metabolisiert werden. Da die Analysen der phenolischen Säuren und Flavonoide noch ausstehen, kann dies allerdings noch nicht abschließend beurteilt werden.

Literatur:

Stracke BA, Rüfer CE, Weibel FP, Bub A, Watzl B, Three-Year Comparison of the Polyphenol Content and the Antioxidant Capacity in Organically and Conventionally produced Apples (*Malus domestica* Bork., cultivar Golden Delicious), *J Agric. Food Chem.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

Briviba K, Stracke BA, Rüfer CE, Watzl W, Weibel F, Bub A, Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidant activity and DNA damage in humans. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55: 7716-7721.

Stracke BA, Briviba K, Bub A, Rüfer CE, Watzl W, Sind Bio-Äpfel gesünder? *For-schungsreport*, 2006, 2: 4-6.

Förderung „Bundesprogramm ökologischer Landbau



Einfluss von elektrischem Strom auf die Phenolverteilung in Radieschen (*Raphanus sativus* L.)

D. Dannehl¹, S. Huyskens-Keil², U. Schmidt¹

Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, ¹FG
Gartenbautechnik, ²AG Produktqualität und Qualitätssicherung, Lentzeallee 57, D-14195
Berlin

[Dennis.Dannehl@agrار.hu-berlin.de]

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (z.B. Phenole, Carotinoide) gewinnen immer mehr an Bedeutung, da ihnen durch klinische belegte Studien anti-cancerogene Wirkungen und Prävention koronarer Herzerkrankungen zugesprochen werden. Im pflanzlichen Stoffwechsel werden sekundäre Inhaltsstoffe, unter anderem phenolische Verbindungen, zur Abwehr gegen Stress vermehrt gebildet und übernehmen eine Schutzfunktion des pflanzlichen Organismus. Sie regulieren Stresssituationen biotischen und abiotischen Ursprungs, dienen als Fraßschutz gegen Herbivore und besitzen fungizide Eigenschaften. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass viele abiotische Faktoren im Extrem die Phenolsynthese stimulieren können. Neuere Studien befassen sich mit dem Einfluss von Strom auf den Sekundärmetabolismus in Pflanzen. Die bekannteste und schon weitgehend erforschte Methode für den Bereich in der Lebensmitteltechnologie ist die *pulsed-electric-field-Technologie* (PEF). YE et al. (2004) beobachtete, dass unter Verwendung der PEF-Technologie (50 Hz, 10 V/m, 30 min) der Sekundärmetabolismus von Zellkulturen in *Taxus chinensis* stimuliert wurde. Darüber hinaus führte die Kombination von PEF-Behandlung und Saccharose-Verabreichung zu einer Anreicherung von Taxuyunnamine C, von reaktiven Sauerstoffspezies, und phenolischen Verbindungen, deren Bildung allgemein als Stressantwort auf oxidativen Stress gilt.

In eigenen Untersuchungen sollte in einer Wachstumsphase von 16 Tagen der Einfluss von elektrischem Strom auf die Gesamtphenolverteilung in verschiedenen Radieschenkompartimenten untersucht werden. Dazu wurden in einer Klimakammer 5 Hochdruck-Natriumdampflampen (je 400 W) als Assimilationslicht verwendet, die in einer Höhe von 100 cm über den Pflanzenbestand installiert wurden. Kultiviert wurden Radieschen in 2 separaten Substratreihen (je n=30), mit jeweils 3 Steinwollplatten (100 cm x 20 cm x 8 cm) und Tropfbewässerung, die während der Belichtungszeit (16 h/d) zu jeder Stunde für eine Minute zugeschaltet wurde. Eine der beiden Substratreihen wurde zusätzlich links und

rechts mit jeweils einer Edelstahlplatte versehen, die mit Hilfe von verschraubten Kunststoffstäben fest an dem Substrat anlagen, als Elektroden fungierten sowie mit dem Medium Steinwolle und der zirkulierenden Nährlösung in Wechselwirkung standen. Die Stromstärke wurde im ersten Versuch auf 200 mA (Spannung ca. 3,8 V), im zweiten Versuch auf 600 mA (Spannung ca. 6 V) festgelegt und täglich für eine Stunde in Form von Gleichstrom induziert, um den Pflanzen nach dem Stromfluss eine Adaptionszeit zu gewährleisten (2-fache Versuchswiederholung). Nach einer Wachstumsphase von 16 Tagen wurden die Radieschen randomisiert geerntet. Da auch die Blätter des Radieschens wie Spinat verwendet werden können und somit die gesamte Gemüsepflanze essbar ist, wurden die Pflanzen in Spross, Knolle und Wurzel zerlegt, um in den jeweiligen Pflanzenteilen die Gesamtphenole zu untersuchen.

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass bei einer Stromstärke von 200 mA der Phenolgehalt im Wurzelbereich gegenüber der Kontrolle signifikant anstieg, wobei sich der Phenolgehalt in Knolle und Spross nicht veränderte. Bei einer Erhöhung der Stromstärke auf 600 mA konnte dagegen nicht nur eine signifikante Erhöhung des Phenolgehaltes im Wurzelbereich, sondern auch in den Knollen der Radieschen gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Im Spross wurden keine Veränderungen in Bezug auf den Phenolgehalt beobachtet. Schlussfolgernd wurde aus den Resultaten die Vermutung aufgestellt, dass der elektrische Strom einen stressinduzierten Abwehrmechanismus in den strombehandelten Pflanzenbestandteilen der Radieschen auslöste, der in weiterführenden Untersuchungen näher betrachtet werden soll.

YE, H., L. Huang, S. Chen and J. Zhong (2004): Pulsed electric field stimulates plant secondary metabolism in suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 8, 788-795.



Stimulation und Extraktion von bioaktiven, phenolischen Verbindungen aus pflanzlichen Zellkulturen

*Heidi Riedel, Melanie Wiesner, Onur Kütük, Zhenzhen Cai, Iryna Smetanska,
Inga Mewis & Christian Ulrichs*

Institute of Food Biotechnology and Food Chemistry, Berlin University of Technology,
Koenigin-Luise-Str. 22, D-14195 Berlin

1. Einleitung

Im Laufe der Evolution haben sich Pflanzen dem Selektionsdruck angepasst und Strategien zum Überleben entwickelt (HARBORNE, 1967). Pflanzen können bei Bedrohungen im Gegensatz zu anderen Lebewesen nicht fliehen, daher mussten sie einzigartige Schutzmechanismen zur Abwehr entwickeln. Sie haben eine große genetische und metabolische Entwicklung durchlaufen, um sich vor abiotischen und biotischen Stressfaktoren zu schützen. Das Pflanzenreich beherbergt eine enorme Biodiversität sowohl an Spezies als auch an phytochemischen Verbindungen. Biologisch aktive Abwehrstoffe ermöglichen Pflanzen, sich vor Infektionen und Schäden zu schützen, die durch Mikroorganismen oder Insekten verursacht werden. Die Produktion von Sekundärmetaboliten korreliert dabei häufig mit Stress (DANIEL et. al, 1999). Polyphenole bilden die größte in der Natur vorkommende Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe. Man unterscheidet dabei zwischen Phenolsäuren, welche sich weiter in Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren unterscheiden sowie Flavonoiden, zu denen unter anderem die Anthocyane zählen (RAMACHANDRA, 1998). Phenolischen Verbindungen wird nach langjährigen Untersuchungen eine antikanzerogene, immunmodulierende, antithrombotische, antioxidative und antibiotische Wirkung zugeschrieben, weswegen die Pharma- und Lebensmittelindustrie zunehmendes Interesse an dieser Stoffgruppe zeigt (NAMDEO, 2007). Zellkulturen bieten eine Alternative zur Pflanze, um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im großen Maßstab industriell zu produzieren (DISCOMO et. al, 1995). Pflanzliche *in-vitro* Kulturen sind keinen klimatischen und ökologischen Bedingungen ausgesetzt und können ganzjährig Sekundärmetabolite im großen Maßstab produzieren (ZHONG et. al, 2001). Im Rahmen der Untersuchungen dient *Vitis vinifera* als Modellpflanze in der *in-vitro* Kultivierung, an welcher verschiedene Stressfaktoren (Elicitoren) und Präkursoren zur Stimulation der Sekundärmetabolitproduktion getestet werden.

2. Material und Methoden

Zur Bestimmung des Phenolsäuregehaltes werden 40 mg gefriergetrocknetes und gemahlene Probenmaterial im eisgekühlten Ultraschallbad in 70 % Methanol (pH 4.0)

extrahiert und nach erfolgter Zentrifugation wird das Pellet zwei Mal re-extrahiert. Der vereinigte Überstand wird im Vakuumkonzentrator auf ein definiertes Volumen eingengt und in 40 % Acetonitril wieder aufgenommen und der Eluent bei 290, 330 und 254 nm mit Hilfe der HPLC analysiert. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgt mittels interner Standards. Die Anthocyane werden mit einer Lösung aus 79 % Ethanol / 1 % Essigsäure (v/v) bei 85°C extrahiert. Nach zwei re- Extraktionen werden die Überstände vereinigt und mit HCL versetzt. Die Anthocyane werden photometrisch bei 535 nm vermessen.

3. Ergebnisse

V. vinifera ist eine erfolgreich etablierte Zellsuspensionskultur mit hohen Gehalten an bioaktiven, phenolischen Verbindungen. Zur Steigerung der Sekundärmetabolitproduktion werden verschiedene Stressoren eingesetzt. So wurde die *V. vinifera* Zellkultur mit Hochspannungsimpulsen (HSI) behandelt sowie als chemischer Elicitor- Ethephon-dazugegeben. Es zeigten sich erste positive Reaktionen in der Anthocyanproduktion durch die Zugabe von Ethephon. Ab dem 9ten Tag führen sowohl Ethephon, als auch HSI oder die Kombination von beiden zu einer erhöhten Anthocyanproduktion (Abb. 1).

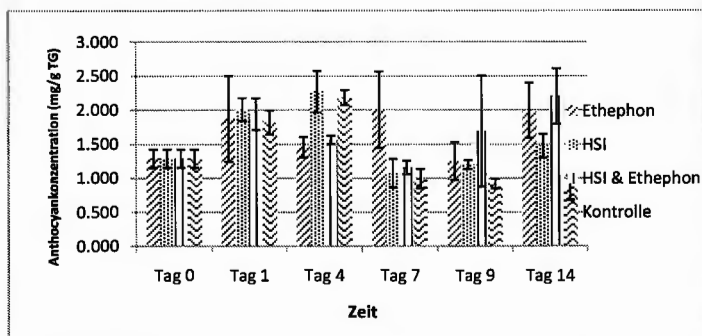


Abb.1:Anthocyanproduktion der Zellsuspensionskultur *Vitis vinifera*

In den Abb. 2 und 3 sind die Phenolsäurenprofile von *V. vinifera* nach der Behandlung mit Ethephon und Jasmonsäure dargestellt. Schon 2 Tage nach Zugabe der Elicitoren wurden sehr hohe Konzentrationen an Resveratrol analysiert, was auf eine schnelle Reaktion des Biosyntheseweges hinweist.

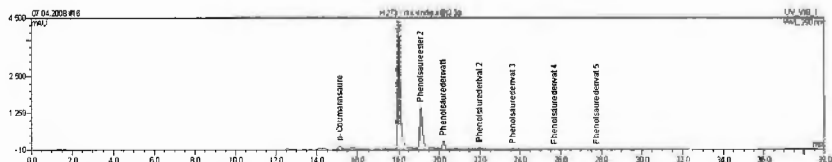


Abb. 2 Phenolsäurenprofil von *Vitis vinifera* nach der Behandlung mit Ethephon

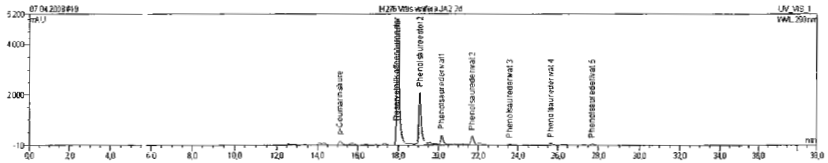


Abb.3 Phenolsäurenprofil von *Vitis vinifera* nach der Behandlung mit Jasmonsäure

4. Zusammenfassung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Suspensionskultur *V. vinifera* auf die eingesetzten Stressfaktoren durch eine verstärkte Anthocyanproduktion reagierte. In weiterführenden Experimenten werden diese Stressoren mit zusätzlichen physikalischen und chemischen Elicitorstressoren kombiniert, um die Ausbeute an Polyphenolen zu steigern.

5. Literatur

- DANIEL, O., MEIER, S. M., SCHLATTER, J. and FRISCHKNECHT, P. (1999): Selected Phenolic Compounds in Cultivated Plants: Ecologic Functions, Health Implications, and Modulation by Pesticides. *Environmental Health Perspectives Supplements*. Vol 107: 1
- DISCOMO, F. and MISAWA, M. (1995): Plant cell and tissue culture; alternatives for metabolite production. *Biotechnol Adv* 13: 245-435
- HARBORNE, J. B. (1967): Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press, London, New York
- NAMDEO, A. G (2007): Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacocnosy reviews* . Vol 1: 1: 69- 79
- RAMACHANDRA R., SARADA, S. and RAVISSHANKAR, G. A. (1998): Phycocyanin, a new elicitor for capsaicin and anthocyanin accumulation in plant cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 46, Numbers 5-6, 619- 621
- ZHONG, J.-J., XU, G.- R. and YOSHIDA, T. (2001): Effects of initial sucrose concentration on excretion of anthocyanin pigments in suspended cultures of *Perilla frutescens* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Netherlands Vol 10, Numbers 5, 590- 592



Pre-Breeding and Development of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*)

Christine Hayot, Ilya Gadjev, Guillaume Barbier, Lydia Smith

National Institute of Agricultural Botany, Huntingdon Road, Cambridge CB3 0LE, UK,
lydia.smith@niab.com

This project forms part of a multi-disciplinary EU funded project entitled 'Healthy Hay' which aims to re-examine the cultivation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). It is a fodder crop that was important up until the middle of the last century, but is now rarely cultivated in modern agriculture. It is known that *O. viciifolia* possesses highly interesting biological and biochemical properties, but despite its reputation for good palatability, it has been replaced in the last century by other higher yielding legume species. The long term goal is to gain a deeper and fuller understanding of the beneficial properties of this crop and find ways to improve the performance and the ability of *O. viciifolia* to compete through development of modern cultivars. This work will concentrate on elucidating the morphological and genetic diversity within the *O. viciifolia* germplasm collection that has been amassed. The collection was sourced from all over the world, and has been established in small plot field trials at NIAB in Cambridge. Preliminary morphological evaluation of various traits was conducted and seed production activities undertaken to keep the germplasm diversity available for future breeding programmes. Traits evaluated so far indicate that there is high variability between but also within accessions. Future priorities will be to determine the ploidy levels of different *O. viciifolia* accessions and apply AFLP markers to explore the phylogenetic diversity of the germplasm. More specific long-term evaluations will take place to strengthen the morphological characterisations. Genetic and morphological findings will be compared and linked to other results obtained by the other project members. All combined these results will form a strong basis for *O. viciifolia* breeding programs.

Polyphenole in der Artischocke (*Cynara cardunculus* ssp. *flavescens* WIKL.) – entwicklungsphysiologische und agronomische Einflussfaktoren

Bernd Honermeier, Sajid Ali, Christian Matthes, Silke Göttmann, Feng Yan

Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung, Justus-Liebig-Universität Gießen, Ludwigstr. 23,
35390 Gießen

Einleitung

Die Artischocke (*Cynara cardunculus* ssp. *flavescens* WIKL.) wird sowohl als Gemüse wie auch zur Herstellung von Phytopharmaka und Nahrungsergänzungsmitteln genutzt. Im Ergebnis mehrerer Studien wurden für Artischocken gesundheitsfördernde Wirkungen, wie choleretische und hepatoprotektive Effekte sowie eine Wirksamkeit bei dyspeptischen Beschwerden nachgewiesen (Fintelman 1999, Gerhard 2002). Diese Effekte werden auf drei Inhaltsstoffgruppen zurückgeführt: Caffeoylchinasäuren (CCS), Flavonoide und Sesquiterpenlactone. Die Konzentration dieser Wirkstoffe unterliegt deutlichen Einflüssen durch die Entwicklungsphysiologie der Pflanze sowie durch Genotyp und agronomische Maßnahmen. Dieser Effekt wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen mit Gemüseartischocken nachgewiesen. Über den Einfluss dieser Faktoren auf die Wirkstoffgehalte in den Blättern der Artischocke liegen demgegenüber nur wenige Ergebnisse vor. In Feld- und Gefäßversuchen sollte deshalb ein ausgewähltes Artischocken-Sortiment hinsichtlich Blattertrag, Blattmorphologie und Wirkstoffgehalt der Blätter untersucht werden.

Material und Methoden

Vorgelegt werden ausgewählte Ergebnisse aus Gefäß- und Feldversuchen, die in Versuchstationen der JLU Gießen an den Standorten Gießen, Rauschholzhausen und Groß-Gerau (Feldversuche) bzw. im Phytotron Rauschholzhausen (Gefäßversuch) durchgeführt wurden. Die Bedingungen der Versuchsdurchführung werden ausführlich bei Göttmann (2006) beschrieben. Der Gefäßversuch wurde mit den Sorten „Green Globe“ und „White Giant“ mit Mitscherlich-Gefäßen (Volumen: 6 l, Bodensubstrat, standardisierte Nährstoff- und Wasserversorgung, 1 Pflanze/Gefäß, 8 Wiederholungen) unter Freilandbedingungen durchgeführt. Die randomisierten Feldversuche (4 Wiederholungen, Parzellengröße: 21 m², Reihenweite: 75 cm, 4 Pflanzen/m², 40 kg N/ha) wurden gegen Ende der Blattneubildung der Pflanzen manuell beerntet (Schnitthöhe: 10 – 15 cm).

Aus allen Parzellen wurden jeweils 4 Einzelpflanzen entnommen, bei maximal 40° C getrocknet, gemahlen und mittels HPLC auf die Gehalte an Caffeoylchinasäuren (CCS) und

Flavonoiden nach einer modifizierten Methode von Brandt & Weschta (1991) analysiert. Die Probenvorbereitung und -analyse war durch folgende Bedingungen gekennzeichnet: Extraktion mit Methanol, HPLC-Hauptsäule 250 x 4,6 mm, mobile Phase 0,5 % H₃PO₄, Säulentemperatur 30 °C, detektierte Wellenlänge 200-400 nm.

Ergebnisse

Die Gehalte an Caffeoylchinasäuren (CCS) und Flavonoiden in den Blättern der Artischocke unterlagen einer Einflussnahme durch die Blattmorphologie und Wachstumsdauer der Pflanzen. Die höchsten Wirkstoffgehalte (Chlorogensäure, Cynarosid) weisen die Blattspreiten (Blattmitte und Blattspitze) der grünen Rosettenblätter auf. Die Blattachsen besitzen dagegen die geringsten Gehalte an CCS-Verbindungen. Eine Abtrennung der qualitativ geringwertigen Blattachsen von den Blattspreiten während der Aufbereitung der Blätter nach der Ernte kann die CCS-Gehalte der verarbeiteten Blattdrogen deutlich verbessern. Innerhalb der Pflanze besitzen physiologisch jüngere Blätter (Zentrum der Blattrosette) deutlich höhere Wirkstoffgehalte als ältere Blätter (basale und periphere Rosettenblätter). Innerhalb der Wachstumsperiode konnten mit dem ersten Aufwuchs (Ernte: Ende Juli, Anfang August) in der Regel höhere CCS-Gehalte als mit späteren Aufwüchsen erzielt werden.

Die höchsten Gehalte an CCS-Verbindungen wurden in den Blattproben der auf pharmazeutische Nutzung selektierten Zuchtsorten Cynamed, Lichtwer 1 und Saluschocke sowie in den Gemüsesorten White Giant, Violet Chiogga, Violet Romagna und Silverleaf gemessen. Cynarin und Cynarosid werden als wichtige Leitverbindungen innerhalb der phenolischen Verbindungen, die sich in den Artischockenblättern befinden, angesehen. Die Gehalte an Cynarin (1,3-O-Di-CCS) lagen in den durchgeführten Sortenversuchen bei < 0,10 % TM. Die höchsten Anteile in der Spanne von etwa 0,05 bis 0,08 % wurden in Proben der Sorten Violet Romagna, Green Globe und Lichtwer 1 und Cynamed gemessen. Der Gehalt des Flavonoids Luteolin-7-O-glucosid (Cynarosid) lag in den meisten Proben in der Spanne von 0,10 bis 0,20 % TM. Zwischen den CCS-Verbindungen und den Flavonoidgehalten besteht eine positive Korrelation.

Die N-Düngung führte bei höherer Dosierung zu einer Verringerung der CCS- und Flavonoid-Gehalte in den Blättern, was als „Verdünnungseffekt“ durch die Zunahme der Blatt-TM interpretiert wird. Auch in dem durchgeführten Gefäßversuch wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der N-Konzentration unabhängig von der N-Düngerform zu einer signifikanten Abnahme der Gehalte an phenolischen Verbindungen (CCS + Flavonoide) führte. Beregnungseffekte oder Wechselwirkungen Beregnung x N-Düngung wurden hinsichtlich der Wirkstoffgehalte nicht beobachtet.

Literatur

Brand, N. & H. Weschta (1991): Die analytische Bewertung der Artischocke und ihrer Präparate, Z. für Phytotherapie 12, 15-21.

- Fintelmann V. (1999): Artischockenblätterextrakt. Deutsche Apotheker Zeitung 136, 63-74.
- Gebhardt R. Prevention of tauroolithocholate-induced hepatic bile canalicular distortions by HPLC-characterized extracts of artichoke (*Cynara scolymus*) leaves. *Planta Medica* 2002;68(9):776-779.
- Göttmann S. Einfluss von Sorte, Saatzeit und Standraum auf Blattertrag und Wirkstoffgehalt der Artischocke (*Cynara cardunculus* ssp. *flavescens* WIKL.) Dissertation. Gießen: Justus-Liebig-Univ; 2006.

Flavonoids and their formation in different sainfoin varieties *(Onobrychis viciifolia)*

*Jona Thill¹, Heidi Halbwirth¹, Karin Schlangen¹, Karl Stich^{*1}, Ionela Regos², Dieter Treutter²,
Christine Hayot³, Ilya Gadjev³, Lydia Smith³*

¹Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, 1060 Wien, Austria, *corresponding author:
kstich@mail.zserv.tuwien.ac.at

²Technische Universität München, Fachgebiet für Obstbau, 85354 Freising, Germany

³National Institute of Agricultural Botany, Cambridge CB3 0LE, UK

Introduction

Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) is a valuable fodder legume with high contents of flavonoids, especially tannins [Xie *et al.* (2003) *Science* 5605: 396-399]. These secondary metabolites have key physiological importance for the plants. Furthermore positive influences of sainfoin on ruminants, such as the well documented antibloating and antiparasitic effects it exerts in combination with increased amino acid absorption and protein utilisation, can also be ascribed to its inherent tannins. Therefore we investigate the flavonoid metabolism in sainfoin. Currently a screening of different sainfoin varieties and species is performed to identify interesting candidates for future breeding programmes.

Methods

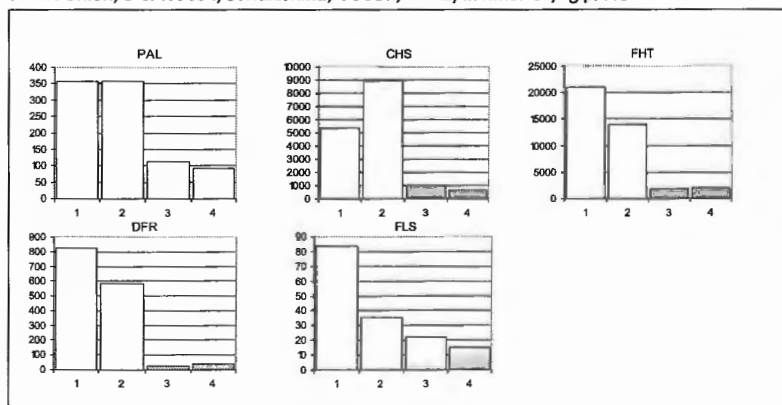
Young (still folded) leaves were taken from 40 different varieties, grown at the National Institute of Agricultural Botany in Cambridge. The samples were shock frozen in liquid nitrogen immediately and kept at -80°C. For the preparation of the enzymes protocols suitable for polyphenol rich tissues were used [Dellus *et al.* (1997) *Phytochemistry* 45: 1415-1418]. The enzymatic assays were carried out using (¹⁴C)-labelled substrates [Halbwirth *et al.* (1997) *Plant Science* 122: 125-131]. Protein values were measured by a modified Lowry method and used for the calculation of specific enzymatic activities. For selected enzymes and varieties real-time PCR was carried out. The different phenolic compounds were identified and quantified as described by Regos *et al.*, [manuscript in preparation: (Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin, *Onobrychis viciifolia*)].

Results and Discussion

Due to the high content of polyphenols in sainfoin the enzyme preparation proved to be difficult with standard methods. Therefore protocols optimized for polyphenol rich tissues were adapted. Since the use of those protocols resulted in better values for all tested enzymes except the flavonol synthase (FLS), they were used for the screening of the enzymatic activities. Young leaves of the sainfoin varieties were tested for the following enzymes: phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase/chalcone isomerase (CHS/CHI), flavanone 3-hydroxylase (FHT), dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and FLS. The enzymatic activities were calculated both in specific and volumetric activities, but both results showed a similar pattern. Clear differences could be observed between the enzymatic activities and the phenolic amount of the different varieties. Figure 1 and 2 gives an overview on the specific enzymatic activity, and the polyphenol concentration of those varieties with the most distinctive results. Nearly in all varieties either high or low enzymatic activity did not only correspond to one enzyme, but could be observed for all enzymes.

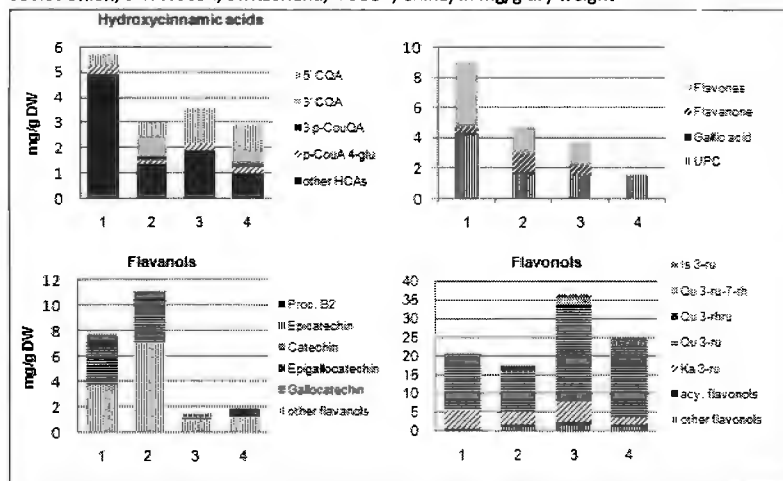
In general all the tested sainfoin varieties showed a very high activity of FHT, while FLS was difficult to demonstrate and showed a very low activity. However, all enzymes could be demonstrated in all the tested varieties, with the exception of DFR, which in one single variety showed no activity. The evaluation of additional material from plants with white and very pale blooming flowers showed different results. While in one pale blooming plant nearly no DFR and FHT activity could be observed, which can be an explanation for the missing formation of anthocyanins, the other plant showed high activities in all the five tested enzymes, which leads to the presumption that the reason for the blockage of the anthocyanin formation in that case lies in the anthocyanidin synthase (ANS).

Fig. 1 specific enzymatic activities of four sainfoin varieties (1 Bivolari, Romania; 2 CPI63840, former Soviet Union; 3 CPI63854, Switzerland; 4 SCOP, China) in $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}/\text{kg}$ protein



The screening on a genetic level via real-time PCR required cDNA and therefore mRNA. A method based on magnetic beads (μ MACS (TM) mRNA isolation Kit, Milteny Biotech, Germany) did not result in suitable mRNA, when applied directly on sainfoin material. Therefore the kit was applied on total RNA, which was prepared by using a method optimized for pine trees [Chang et al., PMB Reporter 1993;11: 113-116]. The resulting mRNA was suitable for the synthesis of cDNA.

Fig. 2 Polyphenols concentration of four sainfoin varieties (1 Bivolari, Romania; 2 CPI63840, former Soviet Union; 3 CPI63854, Switzerland; 4 SCOP, China) in mg/g dry weight



CQA: caffeoylquinic acid; p-CouQA: p-coumaroylquinic acid; p-CouA 4-glu: p-coumaric acid 4-O-glucoside; HCAs: hydroxycinnamic acids; UPC: unknown phenolic compounds; Is.: isorhamnetin; Qu.: Quercetin; Ka.: Kaempferol; acy.: acylated; ru: rutinoside; rh: rhamnoside.

Acknowledgements

These investigations were supported by the European Commission (Project MRTN-CT-2006-035805).



Managing Phenol Contents in Horticultural Crops. Why and How?

Dieter Treutter

Unit Fruit Science, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan,
Technische Universität München, Dürnst 2, D-85354 Freising, Germany

Phenolic compounds occur widely in plants and are a biological important and chemical diverse group of secondary metabolites. By contrast to earlier assessments, these compounds are no longer judged as waste products or as evolutionary remnants without current functions, nor as mere metabolic end products that are toxic to the plant and are therefore stored away in vacuoles. The beneficial effects of phenolics in protecting plants from pests and pathogens or for human health, provokes the idea of actively stimulating their biosynthesis and accumulation.

Agricultural Practices and Breeding. It is suggested that pathogens induce the biosynthesis of resistance related metabolites but non-pathogenic strains are also capable of eliciting secondary metabolites. Furthermore, the phenylpropanoid and flavonoid synthesis varies and is induced by factors such as UV-light, hydric stress, temperature or ozone. Agricultural practices have been evaluated in this context. Enhancing the colour of flowers of ornamental plants and of fruits such as apples is obviously a subject of plant breeders. The aim of creating a cultivar with a particular phenolic fingerprint is not easily attained since there are many enzymes and therefore many genes involved. Recently, test crossing made with buckwheat species revealed that breeding for increased flavonoid content may be successful. Alongside conventional breeding, genetic engineering may be a valuable tool for introducing new phenolics.

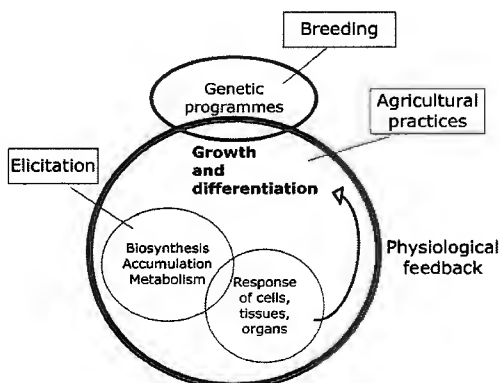
Constraints. Biosynthesis and accumulation of phenolic compounds are mostly restricted to specialized cells and tissues and moreover at a subcellular level. The secondary metabolism is integrated into programmes of growth and differentiation which means that relevant enzymes are not always present and active. This is known for instance for fruits, such as apples, pears, and strawberries. This complex integration is responsible for the fact that the responses of plant tissues to eliciting agents are highly variable and sometimes weaker than expected. The directed induction of both phenol biosynthesis and accumulation may be limited by ontogenetic constraints and, by limited substrate availability, this means carbon supply and energy which growth and secondary metabolism are competing for.

The outcome of all those treatments which are targeted on the biosynthesis and accumulation of particular phenolics can only be predicted if the metabolism is fully understood. An attempt to introduce red pigmentation in forsythia flowers by introducing genes encoding for dihydroflavonol-reductase and anthocyanidin-synthase resulted only in a rather weak anthocyanin accumulation. At that time, the existence of an anthocyanidin-reductase converting anthocyanidins to epicatechin was still unknown. Even despite of exact knowledge of pathways, the quantitative availability of metabolic precursors may result in unpredicted events.

When the goal of increasing the content of specific phenolic compounds in the target tissues is reached, possible feedbacks need to be considered since phenolics are potentially physiologically active. Interaction with plant hormones may explain the observed growth promotion of callus cultures by chlorogenic acid on auxin-free media. It is obvious that flavonoids may regulate auxin transport in plants. Inhibition of growth and xylogenesis and promotion of vacuolation in *Prunus* callus by the flavanone prunin was observed. Phenolics can alter membrane properties thus increasing leaching and tissue browning. Some phenolics are described as leaf-movement factors.

Conclusions. There are many instruments available to increase the content of phenolic compounds in plants. If there is success in reaching the goal enhancing the agronomic value of a given plant and increasing its stress resistance, this mainly depends on the integration of biosynthesis into growth and differentiation programmes (Fig. 1). Therefore, breeding or genetic engineering may set the basis but success requires exact knowledge of the mechanisms of biosynthesis. The response of tissues to elicitation and induction of biosynthesis depends on the actual stage of growing and differentiation which can be influenced by various agricultural practices. A once induced accumulation of physiologically active phenolics may influence growth and differentiation processes as a feed back.

Fig. 1: Simplified scheme showing the integration of secondary metabolism (biosynthesis, accumulation) into growth and differentiation programmes and possible physiological feedback



Effect of thermal processing on phenolic content in a blue-fleshed potato (*Solanum tuberosum* L.) variety

Silke Hillebrand^{1}, Hella Storck¹, Bianka Hüsing², Ulrike Schliephake², Dieter Trautz², Maria-E. Herrmann², and Peter Winterhalter¹*

¹Institute of Food Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Schleinitzstrasse 20, DE-38106 Braunschweig, Germany; silke.hillebrand@tu-bs.de

²Faculty of Agricultural and Landscape Architecture, University of Applied Sciences Osnabrück, Oldenburger Landstrasse 24, 49090 Osnabrück, Germany

Introduction and Aims

Phenolic compounds originating from fruits and vegetables have been linked to health preventive effects and reduced risks of e.g., cancer or cardiovascular disorders. A high content of phenolic compounds and antioxidant capacity was found in pigmented potatoes based on the presence of phenolic acids and anthocyanins. The predominant phenolic acid of potato tubers is the chlorogenic acid, followed by ferulic acid, caffeic acid, and *p*-coumaric acid [1-3]. The anthocyanin composition of pigmented potatoes shows differences depending on colour and cultivar. It was found that red-fleshed potatoes predominantly contain the acylated pelargonidin 3-*p*-coumaroylrutinoside-5-glucoside [4], while blue-fleshed varieties show a complex composition of 3-*p*-coumaroylrutinoside-5-glucosides of petunidin, malvidin, and peonidin [5], respectively. The aim of our studies was to determine the contents of total phenolics, monomeric anthocyanins, chlorogenic acids, and antioxidant capacity in the blue-fleshed potato variety Blue Salad Potato and to investigate the effect of processing on phenolic content and composition.

Results and Discussion

A portion of 200 grams of unpeeled potato tubers was boiled or steamed for 25 minutes. Uncooked, boiled and steamed potato portions were analyzed including potato peel. The content of monomeric anthocyanins and chlorogenic acids was determined by HPLC method, whereas the content of total phenolics and antioxidant capacity were investigated by using the Folin-Ciocalteu reagent [6] and the TEAC assay [7], respectively.

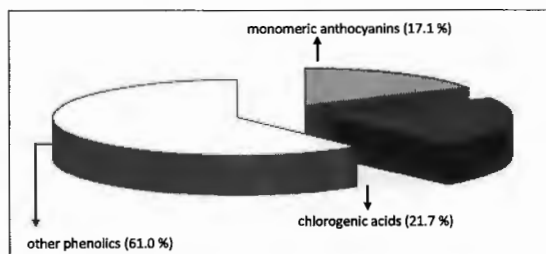


Figure 1. Percentage composition of phenolics in uncooked potato tubers of the cultivar Blue Salad Potato

The percentage composition of phenolics in uncooked potato tubers of the cultivar Blue Salad Potato is shown in **Figure 1** and amounts as follows: 17.1 % monomeric anthocyanins (mainly represented by the major pigment petunidin 3-*p*-coumaroylrutinoside-5-glucoside), 21.7 % chlorogenic acids (mainly represented by 5-caffeoylquinic acid), and 61.0 % of other phenolics, such as ferulic acid and feruloylquinic acid. The percentage composition of boiled and steamed potato tubers is similar, but it was noticed a significantly higher value of anthocyanins, chlorogenic acids and total phenolics associated with an increase in antioxidant activity. Nara et al. [8] reported the presence of two different types of phenolics in potatoes, so called free and bound-form phenolics, respectively. The identification and content of free phenolics (such as chlorogenic acid and caffeic acid) has been reported in several papers [1-3]. Bound-form phenolics such as ferulic acid and *p*-coumaric acid are ester-linked to the cell wall polysaccharides and predominantly localized in potato peel [8]. So far, there is no detailed information about changes of free and bound-form phenolic contents in potatoes caused by thermal treatment. This is the first report which shows a remarkable increase of free-form phenolics in potato tubers after boiling and steaming. **Table 1** summarizes the changes in antioxidant activity, contents of total phenolics, anthocyanins, and chlorogenic acids.

Table 1. Antioxidant capacity, contents of total phenolics, anthocyanins, and chlorogenic acids in uncooked, boiled and steamed potato tubers (incl. peel) of the variety Blue Salad Potato

	TEAC [μ mol TE/100g]	total phenolics [mg GAE ² /100g]	anthocyanins ³ [mg/100g]	chlorogenic acids ⁴ [mg/100 g]
uncooked	443	75	13,0	16,3
boiled	1860	178	35,0	26,4
steamed	1055	175	39,0	31,7

calculated as: ¹trolox equivalents, ²gallic acid equivalents, ³cyanidin 3-glucoside, ⁴5-caffeoylquinic acid

Acknowledgement. This research project is part of the FAEN project (Forschungsverbund Agar- und Ernährungswissenschaft Niedersachsen), and is supported by the Ministry of Science and Culture of Lower Saxony.

References

- [1] Brown, C. R. Antioxidants in Potato. *Am. J. Potato Res.* 82, 163-172 (2005).
- [2] Del Mar Verde Méndez, C.; Rodríguez Delgado, M. Á.; Rodríguez Rodríguez, E. M.; Díaz Romero, C. Content of free phenolic compounds in cultivars of potatoes harvested in Tenerife (Canary Islands). *J. Agric. Food Chem.* 52, 1323-1327 (2004).
- [3] Lachman, J.; Hamouz, K. Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition – a review. *Plant Soil Environ.* 51, 477-482 (2005).
- [4] Naito K.; Umemura Y.; Mori M.; Sumida T.; Okada T.; Takamatsu N.; Okawa Y.; Hayashi K.; Saito N.; Honda T. Acylated pelargonidin glycosides from a red potato. *Phytochemistry* 47, 109-112 (1998).
- [5] Eichhorn S.; Winterhalter P. Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Food Res. Int.* 38, 943-948 (2005).
- [6] Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158 (1965).
- [7] Re, R., Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237 (1999).
- [8] Nara, K.; Miyoshi, T.; Honma, T.; Koga, H. Antioxidative activity of bound-form phenolics in potato peel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1489-1491 (2006).



Deglykosilierung von Flavonoidderivaten in Zwiebel (*Allium cepa* L.) während der Trocknung

B. Schulze, E. M. Hubbermann, K. Schwarz

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde,
Abteilung Lebensmitteltechnologie, Universität Kiel

Zwiebeln (*Allium cepa* L.) gehören zur botanischen Familie der Liliaceae und weisen besonders hohe Konzentrationen an Flavonoiden auf. Diese werden den Polyphenolen zugeordnet, die in höheren Pflanzen in Form von Sekundärmetaboliten synthetisiert werden (Marotti, Piccaglia, 2002). Aufgrund epidemiologischer Studien wird diskutiert, ob eine hohe Flavonoidaufnahme vorbeugend zum Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt werden kann (Hollman et al, 1996; Hertog et al, 1993)

Der Verzehr von Zwiebeln leistet einen erheblichen Beitrag zur Flavonoidzufuhr in Europa und ist vor allem auf den hohen Gehalt an Quercetin zurückzuführen. In Dänemark beispielsweise beträgt der Verzehr von Zwiebeln 16% der gesamten Flavonoidaufnahme auf (Justesen et al, 2000). Während die trockenen Zwiebelschalen reich am Quercetin-Aglykon sind, enthält der essbare Anteil vorwiegend glykosylierte Quercetin- und Isorhamnetinderivate, wobei Quercetin-3,4'-O-diglucosid und Quercetin-4'-O-glucosid 90 % des Gesamtflavonoidgehaltes ausmachen (Bonaccorsi et al, 2008; Lee et al, 2008). Neben dem rohen Verzehr, werden Zwiebeln in der Lebensmittelindustrie und in Privathaushalten bei der Lebensmittelzubereitung weiterverarbeitet und erhitzt. Je nach Art und Weise der thermischen Behandlung kommt es zu Veränderungen der Flavonoidgehalte und Verschiebungen zwischen den Derivaten (Lombard et al, 2005).

Es war das Ziel, die Parameter Temperatur und Zeit für industrielle Trocknungsprozesse im Hinblick auf die Produktentwicklung von flavonolreichen funktionellen Lebensmitteln zu untersuchen. Im Rahmen des BMBF Projektes „Funktionelle Lebensmittel für die Gefäßgesundheit - vom Nutraceutical zur personalisierten Ernährung“ wurden unterschiedliche Trocknungsversuche an Zwiebeln durchgeführt und die fünf Flavonole Quercetin-7,4'-O-diglucosid, Quercetin-3,4'-O-diglucosid, Quercetin-4'-O-glucosid, Isorhamnetin-3,4'-O-diglucosid und Isorhamnetin-4'-O-glucosid mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS analysiert.

Die unterschiedlichen Temperaturstufen und Zeitspannen, welchen die Zwiebelviertel ausgesetzt waren, führten zu einer Verschiebung der Verhältnisse unter den Derivaten. Die

Diglucoside Quercetin-7,4'-*O*-diglucosid, Quercetin-3,4'-*O*-diglucosid und Isorhamnetin-3,4'-*O*-diglucosid unterliegen einem starken Abbau, so dass sich das Verhältnis zugunsten der Monoglucoside verschiebt. Die Konzentration von Quercetin-4'-*O*-glucosid erhöht sich, wogegen eine Gehaltssteigerung der Aglykone Quercetin und Isorhamnetin nicht beobachtet werden konnte. Beide Formen waren nur in Spuren nachweisbar. Die Veränderungen der Flavonoidgehalte sind strukturell begründet und werden durch die Position und die Anzahl der gebundenen Glucoside beeinflusst. Zudem konnten Unterschiede zwischen den Isorhamnetinderivaten und den Quercetinmetaboliten im Abbau beobachtet werden.

Literatur:

- Marotti, M. and R. Piccaglia, Characterization of flavonoids in different cultivars of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Food Science*, 2002. 67(3): p. 1229-1232.
- Hollman, P.C.H., J.M.P.v. Trijp, and M.N.C.P. Buysman, Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminium. *Analytical Chemistry*, 1996. 68(19): p. 3511-3515.
- Hertog, M.G.L., et al., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 1993. 342(8878): p. 1007-1011.
- Bonaccorsi, P., et al., Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chemistry*, 2008: p. 1668-1673.
- Lee, S.U., et al., Flavonoid content in fresh, home-processed, and light-exposed onions and in dehydrated commercial onion products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008. 56(18): p. 8541-8548.
- Lombard, K., et al., Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005. 18(6): p. 571-581.



Anreicherung von Polyphenolen in Buchweizen durch de Mälzungsprozess

Moritz Krahl¹, Martin Zarnkow¹, Werner Back¹, Stefan Kreis²

¹Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I. Technische Universität München-Weihenstephan,
Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising, Deutschland

²Novozymes AS, Bagsvaerd, Kopenhagen, Dänemark

Mit Anfang des 21. Jahrhunderts haben sich zwei grundlegende Probleme in der weltweiten Ernährung herauskristallisiert. Dies ist zum einen die altbekannte Problematik der unzureichenden Versorgung mit Makronährstoffen wie Kohlenhydraten, Proteinen und Fett in Schwellen- und Entwicklungsländern, zum anderen die immer drängendere, gegen Ende des letzten Jahrhunderts aufgekommene Problematik von fehlernährungsbedingten Folgeerscheinungen wie Übergewicht, Diabetes Typ II und Nahrungsmittelunverträglichkeiten. Heutzutage basiert die Weltstärkeversorgung zu 75 % auf lediglich drei Getreidearten, Mais, Reis und Weizen. Insbesondere gegenüber Weizen hat sich eine Anzahl von Unverträglichkeiten und Allergien entwickelt. Vor diesem Hintergrund hat sich ein zunehmendes Interesse an alternativen Getreidearten und Pseudogetreidearten entwickelt. Parallel dazu sind Nahrungsmittel mit einem ernährungsphysiologisch positiven Effekt auf die Gesundheit des Verbrauchers, über die alleinige Bereitstellung der erwähnten Makronährstoffe hinaus, sogenannte funktionelle Lebensmittel erfolgreich am Markt etabliert worden. Ein Trend der bereits in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts in Japan seinen Ursprung hatte.

Buchweizen, eine zur Gruppe der Pseudogetreide zählende alte Kulturpflanze mit asiatischem Ursprung, ist eine mögliche alternative Stärkequelle und findet bereits heute in glutenfreien Nahrungsmitteln für Zöliakieerkrankte zunehmend Verwendung. Die ausgeprägte Schädlingsresistenz des Buchweizens, sowie die Tatsache, dass es für den Buchweizenanbau keinerlei Unkrautvernichtungsmittel auf dem Markt gibt, haben ihm vor allem im sogenannten „Bio-Segment“ in den letzten Jahren zu einer Renaissance verholfen. Neben der Abwesenheit von Gluten in der Eiweißfraktion des Buchweizens hat insbesondere der hohe Gehalt an Rutin Buchweizen als potentielles funktionelles Lebensmittel interessant gemacht. Verschiedene internationale Studien haben eine Vielzahl von ernährungsphysiologisch positiven Wirkungen von Rutin gezeigt. So besitzt Rutin unter anderem eine schützende Wirkung vor DNA-Schädigungen und kann antikanzerogen wirken. Weitere positive Effekte von Rutin sind antioxidative, blutdrucksenkende und entzündungshemmende Eigenschaften. Andere wertvolle und positive Polyphenole in der Buchweizenpflanze sind Quercetin, Orientin, Homoorientin, Vitexin und Isovitexin.

Der Mälzungsprozess ist einer der ältesten durch die Menschheit genutzten biotechnologischen Prozesse. Wurde Getreide jedoch früher ausschließlich künstlich zum Keimen gebracht, um eine ausreichende Enzymausstattung des Malzes zur Bierbereitung zu erhalten, so gilt das heutige Interesse in steigendem Masse auch der Anreicherung funktioneller Nahrungskomponenten, wie löslichen Ballaststoffen, Vitaminen und ausgewählten Polyphenolen.

In dieser Arbeit wurde geschälter Buchweizen mit dem Ziel der Anreicherung von Rutin und den anderen erwähnten Polyphenolen vermälzt. Die Keimungsparameter Keimzeit, Temperatur und Weichgrad wurden hierbei nach einem mittels Software zur statistischen Versuchsplanung (DesignExpert 7.0, StateEase) ermittelten Zentralpunktdesign variiert. Der Gehalt an den untersuchten Polyphenolen wurde durch den Mälzungsprozess signifikant gesteigert. Der Rutingehalt des Buchweizens konnte durch die aus dem Modell erhaltenen optimalen Keimungsparameter auf mehr als das Zehnfache gesteigert werden. Auch konnten im Gegensatz zu geschältem Buchweizen alle sechs untersuchten Polyphenole im fertigen Malz in erheblichen Mengen gemessen werden, während im unvermälzten Material lediglich Rutin und Isovitexin nachgewiesen werden konnten. Auf den Gehalt an Catechin und Epicatechin zeigte der Mälzungsprozess keine nennenswerten Auswirkungen.

Buchweizenmalz hat sich in bisherigen Versuchen einer Verwendung zur Herstellung von Würzen und somit von alkoholhaltigen, wie auch alternativen, alkoholfreien Fermentationsgetränken als ungeeignet erwiesen. Jedoch könnte Buchweizenmalz mit seinem charakteristischen nussartigen Eindruck eine geschmackliche Bereicherung für Müsliprodukte darstellen und durch seinen hohen Polyphenolgehalt zu einer gesünderen Ernährung beitragen. Auch können alle bisher bekannten Buchweizenprodukte ebenso als Malz zubereitet werden.



Technological Aspects of Anthocyanin Utilisation in Functional Foods

M. Betz, A. Tolkach & U. Kulozik

Technische Universität München, Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology
Nutrition and Food Research Center (ZIEL)

Background

Plant phenolics, such as anthocyanins, are increasingly gaining in importance for use in functional foods because of their bioactivity. Bilberries (*Vaccinium myrtillus*) are known to contain high amounts of anthocyanins whose strong antioxidative potential is related to numerous health effects. The low molecular hydrophilic anthocyanins show highest stability inside their natural environment and in their flavylium-form at very acidic environment (pH < 3). At elevated pH-conditions as prevalent in most foods they degrade quickly (Cabrita et al, 2000). After oral administration anthocyanins are rapidly metabolised and resorbed. At the same time they are characterised by a low bioavailability and recovery rate (Clifford, 2000). Regarding this basic conditions the encapsulation of anthocyanins appears expedient in two aspects. On the one hand encapsulation stabilises sensitive anthocyanins and allows food application in form of microcapsules. On the other hand, the quick intestinal metabolisation of anthocyanins and their low bioavailability indicate the need for increasing the resistance towards environmental conditions in the gut. Whey proteins are widely used in food industry and are capable of building up a thermally induced gel matrix at strong acidic conditions (Liu et al, 1994). The insolubility of the gel network in aqueous environment makes them a suitable matrix material for (micro-)encapsulation. Thus, one objective of this research was to investigate the use of acidic whey protein gels for encapsulation of bilberry extract (BBE) by evaluating stability of differently encapsulated anthocyanins. Targeted release of encapsulated anthocyanins in the gut requires prevention of predestination release in the stomach. For this reason a further objective was the investigation of shellac as enteric coating for the whey protein hydrogel based encapsulation system.

Encapsulation and Stabilisation

Anthocyanins are most stable at very acidic conditions, thus whey protein gels with pH 1,5 and pH 3 were investigated in terms of their encapsulation applicability. Whey protein isolate was dissolved in water to generate solutions with 20 % protein content and 5 % of BBE (53,5 % anthocyanins) was added. The mixture was poured in steel tubes and heated to 80 °C for 10 minutes to induce gelation. Aqueous solutions of BBE were treated equally. Heated solutions and generated gel samples were stored in the dark at 4 °C and 20 °C.

During storage anthocyanin content was determined spectrophotometrically at 520 nm and via HPLC. Fig. 1 shows anthocyanin content in gel and solution during storage.

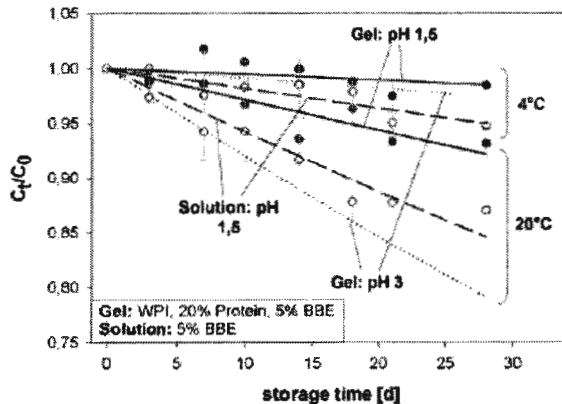


Fig. 1. Degradation of anthocyanins encapsulated in whey protein gels and in solution with pH 1,5 and pH 3 under different storage conditions

Three main effects are inversely related to anthocyanin stability, namely pH, temperature and water activity (a_w). Regardless of storage temperature, encapsulation of BBE in gels with pH 1,5 lead to lesser degradation of anthocyanins in comparison to BBE-solution. This effect was attributed to the lower a_w value of the gels which diminished rate of anthocyanin degradation. Additionally, the difference between anthocyanin degradation in gel and solution was more distinctive at 20 °C than at 4 °C because the increased temperature enhanced the a_w -effect. At 4°C no significant difference between anthocyanin degradation in pH 1,5 and pH 3 gels was observable. The low temperature superimposed the effect of pH. However, at ambient temperature the anthocyanin stability increases with decreasing pH because isomeric equilibrium is shifted towards stable flavylium form of anthocyanins. The results show that acidic whey protein gels are suitable matrix material for encapsulation of anthocyanin-rich BBE and gels provide a stabilising environment for anthocyanins.

Targeted and Sustained Release

Shellac is the purified product of the resinous secretion of the insect *Kerria lacca*. It is approved for food applications and has been used as an enteric coating material in pharmaceutical applications since 1930. Furthermore shellac disintegrates at intestinal pH (Penning, 1996). In this study whey protein gels with 5% BBE content were cut to gel cylinders ($\varnothing = 4\text{mm}$; $l = 4\text{mm}$) and coated with shellac. Therefore the gel cylinders were dipped into aqueous shellac solution at ambient temperature and then dried under fluidized bed conditions at 80°C for 5 min. Coated gel cylinders were exposed to simulated gastric

fluid without pepsin at pH 1,2 (SGF) and anthocyanin concentration in SGF was followed to determine gastric stability of coated gels as depicted in figure 2.

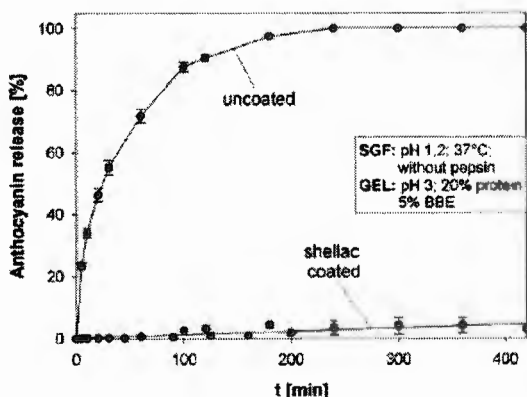


Fig. 2. Influence of shellac coating on anthocyanin release from whey protein gel cylinders in simulated gastric fluid at pH 1,2

Release of anthocyanins from uncoated gel cylinders was diffusion-controlled and could be described by a first order reaction. Release from shellac coated cylinders was less than 10 % after 420 min of exposition to SGF. Therefore it can be concluded, that shellac is a possible food-grade enteric coating material which allows targeting of BBE-loaded protein gels to the gut, where shellac degrades. Sustained release is realisable due to diffusion-controlled release characteristics of uncoated gels.

Conclusion and Perspectives

Encapsulation of bilberry extract in whey protein gels improved stability of contained anthocyanins. Thereby, the stabilising effect of WPI-gels is more distinctive at suboptimal storage conditions. The generated whey protein gels are stable in SGF without enzyme at pH 1,2 and sustained release of anthocyanins is realisable due to diffusion-controlled release mechanism. Targeting of anthocyanins to gut is possible by means of SGF-stable shellac coating. The next step includes transfer of gel systems to production of microcapsules by emulsification-heat gelation process, which was successfully applied, yet.

Literature

- Cabrita, L., Fossen, T. and Andersen, Ø.M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68, 1, 101–107.
- Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 7, 1063-1072.

- Liu, T.X., Relkin, P. and Launay, B. (1994). Thermal-Denaturation and Heat-Induced Gelation Properties of Beta-Lactoglobulin -Effects of Some Chemical-Parameters. *Thermochimica Acta*, 246, 2, 387-403.
- Penning, M. (1996). Aqueous shellac solutions for controlled release coatings. In: *Chemical Aspects of Drug Delivery Sytems*. (Karsa, D.R., Stphenson, R.A. (Ed.)), 146-154. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Acknowledgements: This research project is supported by the FEI, the AiF and the Ministry of Economics and Technology, Project No.:AiF 15611 N



Effect of different conservation methods and maturity stages on peroxidase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*)

*Asma Faqir Ahmad*¹, *Katerina Theodoridou*², *Heidi Halbwirth*¹, *Jocelyne Aufrère*², *Karl Stich*^{1*}

¹Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften,
Technische Universität Wien, 1060 Wien, Austria, *corresponding author:

kstich@mail.zserv.tuwien.ac.at

²INRA Centre de Clermont Ferrand/Theix URH-RAPA 63122 Sant Genès Chmpanelle, France

Introduction

Forage is the major part of the diet for ruminant animals and provides energy, proteins and minerals. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) is a perennial forage legume with a deep taproot which is often grown in conjunction with forage grasses to reduce bloat hazard. In addition, it shows anthelmintic properties and improves soil fertility by nitrogen fixing [1]. Sainfoin contains high amounts of secondary metabolites like polyphenols. Particularly proanthocyanidins have an effect on the protein metabolism by decreasing the concentration of ammonia in the rumen [2] that could increase the nitrogen value for the ruminants. Peroxidases are widely distributed enzymes in the plant kingdom and they have a variety of functions. They are involved in cell wall modifications, phytochrome metabolism, play a role as producers of reactive oxygen species, regulators of H₂O₂ signalling and defence mechanism [3]. Peroxidase (POD) and polyphenol oxidase are enzymes involved in the formation of quinoid structures and could therefore influence the interaction between polyphenols and protein. To investigate whether these enzymes contribute towards the beneficial effects of sainfoin, activity measurements and investigations into the isoenzyme patterns were performed.

Methods

Sainfoin cvs. Ambra and Sepial (Caussade Semences, France) were cultivated in 2007 at two different locations, Blars (Lot) and Réalville (Tarn et Garonne) in France. The plant material was cut on May and June at four different harvesting times and either used as fresh forage or processed to silage and hay. The fresh forage was ensiled in experimental silos of 15 kg without additive. The hay was made from the fresh forage and was cured under good weather conditions. Sainfoin cv. Perly (commercial, France), was grown in Clermont Ferrand/Theix France and was harvested in summer 2008 at two stages in the first growth cycle (end of flowering and green seeds) and in the second cycle at 5 week regrowth after

the end of flowering. Stems were separated manually, cut in order to mimic the mastication of the sheep, placed in nylon bags and were incubated for 4 hours in the rumen of fistulated sheep. Six sheep received 60 g/day of polyethylene glycol (PEG) which was infused 2 times per day by the ruminal cannula, six sheep were given 200 ml of water (without PEG). POD activity was determined as described [4] with *o*-dianisidine as artificial substrate by measuring the changes in the light extinction at 460 nm. Native acryl amide gel electrophoresis for 10 hours was used to separate the isoenzymes.

Results and Discussion

In contrast to many other enzyme activities, POD was still active in freeze dried material. Sainfoin tissues showed a very low polyphenol oxidase activity, but a high POD activity. POD activity, however, was dependent on variety and harvesting time. Cv. Sepial generally showed lower POD activity whereas cv. Ambra showed much higher activities. A comparison of fresh forage, hay and silage showed that POD activity is clearly present in all three plant materials but is affected by plant material processing. The activities in hay were drastically higher than in the fresh forage (Figure 1). In contrast, conservation as silage led to a decrease of POD activities (Figure 1) Thus it maybe assumed that the polyphenol spectrum is modified during processing and storage.

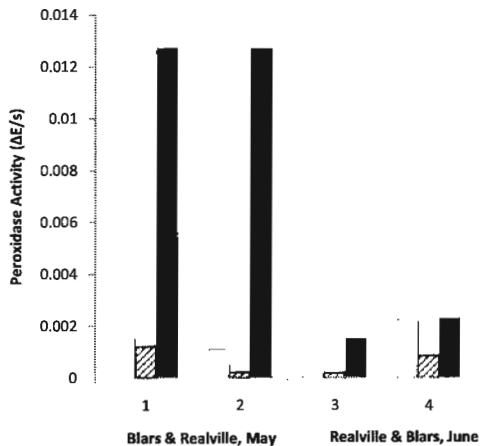


Figure 1: Comparison of the POD activity in fresh forage (white), silage (striped) and hay (black) produced from *Onobrychis viciifolia* cv. Sepial grown in two different locations

Most surprisingly, POD activity was still present after 4 hours incubation in rumen of sheep (Figure 2). POD showed an increased activity in case of sainfoin stem incubated in the rumen of sheep receiving polyethylene glycol (PEG).

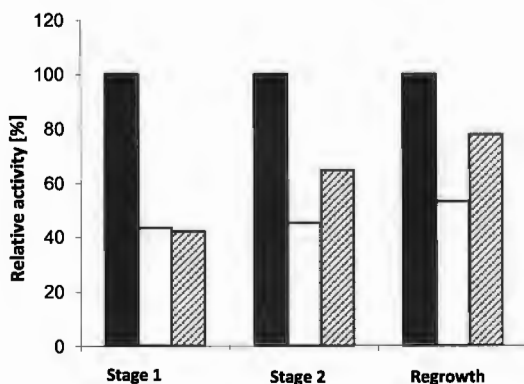


Figure 2: POD activity in sainfoin cv. Perly stem after 4 hours incubation in the sheep rumen in the absence (white) or presence (striped) of PEG compared to the fresh forage stem (black). Relative activities were calculated in comparison with the activities measured before incubation.

Results observed by electrophoresis showed a quite similar pattern for all investigated samples. The only exceptions were the silage samples which showed additional bands. However up to now it is still unclear if these additional enzymes are derived from the plant or from microorganism involved in the silage process. Work on this topic is in progress.

References

- [1] Clark and Reid, (1974) *J. Dairy Sciences* 53: 432-434.
- [2] Lu *et al.* (2000) *Phytochem.*55: 67-75.
- [3] Mika *et al.* (2004) *Phytochem.Rev.* 3: 173-193.
- [4] Goessinger *et al.* (2009) *Journal of Food Engineering.* 90: 171-178.

Acknowledgements: These investigations were supported by the European Commission (Project MRTN-CT-2006-035805).

Effects of peroxidase und polyphenoloxidase on the color stability of strawberry nectar from puree

Hannes Scherbichler¹, Heidi Halbwirth¹, Manfred Gössinger², Karl Stich^{1}*

¹Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften,
Technische Universität Wien, 1060 Wien, Austria, *corresponding author:

kstich@mail.zserv.tuwien.ac.at

²Department of Fruit Processing, Federal College and Institute for Viticulture and Pomology,
A-3400 Klosterneuburg, Austria

Introduction

During the processing of strawberries to different products, a dramatic loss of desired metabolites is observed [1]. The colour of strawberry juices is unstable and easily susceptible to degradation leading to a dull and weak juice colour [2]. The rigorous pigment decay is caused by enzyme mediated browning reactions, which also lead to noticeable decreases of vitamins and polyphenols [3-5]. In addition, processing and storage drastically reduces aroma [6, 7]. The quality of raw material and process control determine the quality of strawberry products. Increases of natural colour intensity and colour stability may be achieved by enzymic processing [8], fortification with anthocyanins and enrichment with phenolic acid or natural copigmentation [9]. However, cultivar choice is the most important factor for determining fruit quality, post-harvest quality, extended shelf-life and processability. We optimised the measurement of peroxidase and polyphenol oxidase activities in strawberry fruits and investigated the activit changes during different technological stages of nectar production.

Methods

Field-run strawberries (*Fragaria x ananassa*, cultivar Elsanta) were grown in Rust (Austria) in June 2005 and June 2006. Fruits were harvested at commercial ripeness each day in the morning. They were either processed immediately or packed for freezing within two hours. Strawberries were milled with a roller crusher (Wottle, Austria), sieved (sieving machine, Wiesböck, Austria) and milled again with a colloid mill (Fryma, Switzerland). The puree was mixed with water, citric acid and sugar in order to achieve nectar (20 or 40 liter for each variant, 40 % puree, 14°Brix, 7,0 g/l titrable acidity). The nectar was degassed in a vacuum tank at -0.6 bar for 15 min. Subsequently, the nectar was filled in 0.2 litre white glass bottles using a vacuum filler (Rapf &Co, Austria), pasteurized (85°C, 10 min) in a tunnel pasteurizer

(Balik, Austria) and stored at 4°C or 20°C in the dark. PPO activity was performed by a spectrometric method as described in Serradell et al. [10] and POD activity was carried out according to the Worthington manual [11]). The activities were calculated as delta A per minute and 1 mg protein. Protein content was determined by a modified Lowry procedure [12] using BSA as standard.

Results and Discussion

Peroxidase activities are usually quantified at the photometer measuring the changes in light extinction with an artificial substrate in the presence of H₂O₂. Measurements with phenylene diamine as substrate did not deliver reliable data as substrate oxidation could be observed in the presence and absence of enzyme preparations from strawberry fruits. Best results could be achieved with *o*-dianisidine in the presence of 0.003% H₂O₂. Tyrosine or DOPA are frequently used for the measurement of polyphenol oxidase activity. In our investigations however, no linear correlation between enzyme activity and changes in the light absorbance could be detected. In contrast, pyrocatechol showed reliable results and only a minimal chemical oxidation in the absence of enzyme preparations. Using the optimized methods we investigated the two enzyme activities at different technological stages of nectar production. Peroxidase activity drastically decreased during fruit milling with a roller crusher and subsequently continuously decreased during the further processing steps (Figure 1). In contrast, polyphenol oxidase revealed to be quite recalcitrant to different technological steps and could be even detected after the pasteurization step, although the activity decreased about 50 %. From our results it is supposed that polyphenol oxidase plays a more important role in color degradation in strawberry nectars from puree during storage than peroxidase. Further investigations are necessary in order to determine the effect of several pasteurization regimes on color stability.

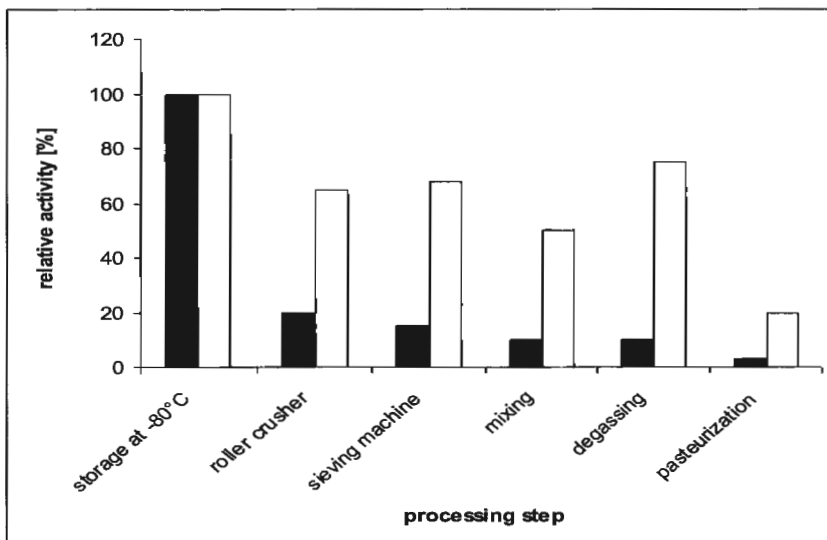


Figure 1: Relative activities of peroxidase (black) and polyphenol oxidase (white) during nectar production. Relative activities were calculated in comparison with the activities measured in the ripe, frozen fruits.

References

- [1] Rein M. et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3106-3114 (2004)
- [2] Garcia-Viguera C. et al., *Journal of Food Science* 64: 243-247 (1999)
- [3] Wang S. et al., *Shipin Kexue (Beijing)* 22: 56-58 (2001)
- [4] Lopez-Serrano M., et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1218-1224 (2002)
- [5] Lopez-Serrano M., et al., *Food Chemistry* 55: 133-137 (1996)
- [6] Cordenunsi B. R. et al., *Food Chemistry* 83: 167-173 (2003)
- [7] Rein M. et al., *European Food Research and Technology* 220: 239-244 (2005)
- [8] Pelayo-Zaldivar C. et al., *Journal of Food Quality* 28: 78-97 (2005);
- [9] Wicklund T. et al. *Food Science and Technology* 38: 387-391 (2005)
- [10] Serradell, et al, *J Sci Food Agric*, 80: 1421 – 1427 (2000)
- [11] *Worthington Manual*, Freehold, New York, p. 1943 (1972)
- [12] Sandermann and Strominger, *J. Biol. Chem.* 247: 5123-5131 (1972)

Acknowledgements: These investigations were supported by the Austrian Federal Ministry of Agriculture, Forestry, Environment and Water Management (Project 100042, BMLFUW-LE.1.3.2/0019-II/1/2006)



Einfluss des S-Angebots auf die Glutathion-Konzentration und die Qualität von Weizen

D. Steinfurth, C. Zörb, M. Brockmann und K. H. Mühling

Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Hermann-Rodewald-Str. 2, 24118 Kiel

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid mit einer Thiolgruppe, welches für seine Funktionen als Transporter von reduziertem Schwefel (S), als Modulator von Enzymaktivitäten und der antioxidativen Wirkung in der Pflanze bekannt ist. Die GSH-Konzentration im Blatt ist ebenso ein verlässlicher Marker für den S-Versorgungsgrad von Nutzpflanzen wie z.B. Weizen. Auch für die Qualität von Weizen ist GSH entscheidend. In Weizenmehl führt GSH durch eine Reaktion mit intermolekularen Disulfidgruppen im Kleber zu einer Klebererweichung und beeinflusst somit die Backqualität. Es stellt sich deshalb die Frage, welchen Einfluss ein gesteigertes S-Angebot auf die GSH-Konzentration im Spross und letztendlich auch im Weizenkorn hat. Des Weiteren ist zu klären wie sich eine gesteigerte S-Düngung während der Pflanzenentwicklung auf die S-haltigen Aminosäuren Cystein und Methionin auswirkt und wie diese Verbindungen verlagert bzw. in welchen Organen diese gespeichert werden. Welche Rolle spielt somit der GSH-Pool der Weizenpflanze in Bezug auf die spätere Backqualität des Weizenmehls?

Hierzu wurde ein Gefäßversuch mit den beiden A-Winterweizensorten Batis und Türkis mit einer gestaffelten S-Düngung zur Aussaat (0 g, 0,1 g und 0,2 g S pro Gefäß) und einer S-Spät-düngungsvariante (0,1 g S pro Gefäß zur Aussaat und 0,1 g S zum Zeitpunkt des Ährenschiebens) durchgeführt. GSH-Konzentration und Konzentrationen von Cystein und Methionin wurden in verschiedenen Organen des Weizensprosses zu unterschiedlichen Terminen während des Wachstumsprozesses und zusätzlich in Weizenvollkornmehl analysiert.

Mit einem gesteigerten S-Angebot konnte eine Erhöhung der GSH-Konzentration im Weizenvollkornmehl ermittelt werden. Anhand eines Vollkorn-Mikrobackversuchs konnte auch eine Steigerung der Backqualität durch die S-Düngung bei beiden A-Weizensorten festgestellt werden.



Enhancing Fruit quality of sweet cherries (*P. avium*) through flower thinning

Schoedl, K., Modl, P. and Forneck, A.

Institute of Horticulture and Viticulture, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna; A-1190 Vienna, Peter-Jordan-Straße 82; astrid.forneck@boku.ac.at

Introduction

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) production has been greatly advanced by the availability of dwarfing rootstocks like the GiSelA-series (e.g. 5, 6, 7), which have facilitated the setup of efficient orchard systems with trees smaller than 4 m in height. Intensive horticultural management has become possible including strategies like thinning. The aims of our sweet cherry thinning studies were to analyze (1) if ammonium thiosulfate (ATS) has an effect on flowers of sweet cherry and (2) if thinning through ATS affects sweet cherry fruit quality parameters of three respectively four sweet cherry cultivars.

Materials and Methods

Thinning experiments were performed in an uniform sweet cherry plantation employing a flower thinning strategy using the chemical flower thinning agent ammonium thiosulfate (ATS). The experiment was performed in 2006 and repeated in advanced experimental setup in 2007. In 2006 three cultivars 'Blaze Star', 'Samba' and 'Techlovan' were employed, in 2007 additionally the cultivar 'Merchant' (all grafted on 'GiSelA 5'- rootstocks). The trees were planted in 2003 and trained in a spindle system with shifted centre line with distances between rows of 4.5 m and distances between trees of 2.5 m. Thinning treatments included applications at different concentrations of the thinning agent and at different stages of flower development. Fruit analyses covered the numbers of fruits, fruit sizes and weights, content of soluble solids, pH-values and the total content of anthocyanins according to Schoedl et al.¹⁵ In 2007 the flesh and stone weight and the content of titratable acids were assessed too. Statistical analyses were conducted with SPSS 16.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results and Discussion

By analyzing the data of 2006 and 2007 a significant influence ($p < 0.01$) of the treatment, the cultivar and the year on the amount of fruit harvested was demonstrated (Table 4). Consequently, hypothesis (1) can be accepted – ATS has an effect on flowers of sweet cherry. On the other hand, flower thinning with ATS did neither affect fruit sizes nor fruit

weights in all treatments. Therefore the main aims of thinning in sweet cherry, increasing the size and weight of the fruits, were not achieved within the range of cultivars studied. Consequently the hypothesis that ATS affects sweet cherry fruit quality parameters had to be rejected. The cultivar was identified as the main factor affecting fruit size and weight ($p < 0.01$), demonstrated by 'Techlovan' which produced the biggest fruits of all cultivars in two consecutive years. Fruit weights were also affected by the year ($p < 0.01$), documented in higher weights in 2006 than in 2007 in the three cultivars 'Blaze Star', 'Samba' and 'Techlovan' with 'Samba' showing the greatest differences. The pH-values were significantly affected by cultivar and treatments ($p < 0.05$). Between the two years of experiment no significant difference could be observed among the pH-values ranging among 3.73 to 4.24. The other determined parameters (flesh:stone – ratio, content of soluble solids, content of titratable acids, content of anthocyanins) showed to be cultivar but not treatment dependent.

Conclusion

Flower thinning was achieved in this study but the hypothesis concerning quality enhancement has to be rejected, since no fruit size and weight improvement was induced. The reasons for this may be manifold including timing of thinning, ATS-induced leaf damages or balancing effects between the trial branches and branches located close to them.

References

- Bangerth F, Abscission and thinning of young fruit and their regulation by plant hormones and bioregulators. *Plant Growth Regulation* 31: 43-59 (2000).
- Gao L and Mazza G, Characterization, Quantitation, and Distribution of Anthocyanins and Colorless Phenolics in Sweet Cherries. *J. Agric.Food Chem.*43: 343-346 (1995).
- Girard B and Kopp TG, Physicochemical Characteristics of Selected Sweet Cherry Cultivars. *J. Agric.Food Chem.* 46: 471-476 (1998).
- Link H, Significance of flower and fruit thinning on fruit quality. *Plant Growth Regulation* 31: 17-26 (2000).
- Schoedl K, Modl P and Forneck A, Flower thinning with sweet cherry (*Prunus avium* L.): A first year field study. *Mitteilungen Klosterneuburg* 57: 176-179 (2007).
- Schoedl K, Denk A, Hummelbrunner S, Modl P, Forneck A, No raise of fruit quality through chemical flower thinning in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* – submitted (2009).
- Vursavus K, Kelebek H, and Selli S, A study on some chemical and physicomchanic properties of three sweet cherry varieties (*Prunus avium* L.) in Turkey. *Journal of Food Engineering* 74: 568 – 575 (2006).
- Whiting MD and Ophardt D, Comparing Novel Sweet Cherry Crop Load Management Strategies. *HortScience* 40(5): 1271-1275 (2005).

Restoring the functionality of the *Vitis vinifera* L. anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase by two site-directed point mutations

László Jánváry¹, Thomas Hoffmann¹, Judith Pfeiffer², Ludger Hausmann³, Reinhard Töpfer³, Thilo C. Fischer², Wilfried Schwab¹

¹Biomolecular Food Technology, Technische Universität München, Hochfeldweg 1, 85354 Freising, Germany, ²Ornamental Plants and Horticultural Plant Breeding, Technische Universität München, Am Hochanger 4, 85354 Freising, Germany, ³JKI Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Germany

The anthocyanin pigments of European grapevines (*Vitis vinifera* L.) are anthocyanidin 3-*O*-glucosides while other *Vitis* species (*V. labrusca*, *V. riparia*, *rotundifolia* and *V. rupestris*) can also produce anthocyanidin 3,5-di-*O*-glucosides. Wine quality of the early interspecific hybrids bred to introduce resistances into the susceptible *V. vinifera* was inferior to that of the traditional cultivars. Furthermore, as the presence of undesired compounds responsible for the 'foxy' flavour in the wine of *V. labrusca* off springs tends to co-occur with the diglucoside pattern, this characteristic difference in the pigment composition has been exploited as a simple diagnostic tool for the classification of wines according to their varietal origin and to assist maintaining high quality standards.

A molecular mapping approach has recently led to the identification and cloning of the functional anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase (5GT) gene and a nonfunctional allele from the heterozygous cultivar 'Regent'. Protein sequence comparison revealed only five amino acid substitutions and a truncation at the C-terminus in the inactive enzyme. Restoration of the complete C-terminus in the European allele alone proved insufficient for the reversal to a functional 5GT. A protein modelling approach allowed the identification of an additional significant amino acid exchange located in close spatial vicinity of the catalytically active histidine in the active site of the enzyme. The reversion of this Leucine to Valine transition in the non-functional full length protein was also essential to recover 5GT activity. Thus, two deleterious mutations render the *V. vinifera* 5GT allele inactive and explain why revertants for this mutant allele have not been observed in breeding programs.

The molecular knowledge about the 5GT locus has a significant impact for the classification and breeding of *Vitis* varieties and the evaluation of derived products. Anthocyanidin 3,5-di-*O*-glucosides positively influence the colour characteristics of red wines. The identification of a putative homolog of the *V. labrusca* anthraniloyl-CoA:methanol acyltransferase, which is

responsible for the production of the 'foxy' flavour, on the same chromosome as the 5GT, the presented results can specifically help the separation of the two traits in marker-assisted breeding programs to improve wine quality.

Effect of different extraction methods on the volatile and non volatile phenol compounds of *Thymus pannonicus* All. and *Satureja montana* L.

Kutta, Gabriella¹; Pluhár, Zsuzsanna¹; Sárosi, Szilvia¹; Sándor, Gergely²; Végvári, György²

¹Department of Medicinal and Aromatic Plants, Corvinus University of Budapest, Villányi út 29-43., Budapest, H-1118, Hungary (gabriella.kutta@uni-corvinus.hu)

²Department of Pomology, Corvinus University of Budapest, Villányi út 29-43., Budapest, H-1118, Hungary

In our work the effectiveness of supercritical carbon dioxide extraction was studied on volatile and non-volatile components of *Lamiaceae* herbs. The aim of our investigations was to determine the optimal extraction parameters yielding high amount of volatiles and non-volatiles in a desirable composition. As plant materials, dried and powdered crude drugs of *Satureja montana* and *Thymus pannonicus* were chosen. Pressure (8-50 MPa), temperature (35-60 °C), time (5-60 min) and the ratio of modifier (5-50% methanol) of extraction were regulated. Results obtained by supercritical fluid extraction (SFE) were compared to that of the conventional extraction procedure, hydrodistillation (HD). In the case of *Satureja montana* and *Thymus pannonicus* extract yield of SFE was comparable to the essential oil amount obtained by hydrodistillation from the same drug. Essential oil rich extracts were analysed by GC-FID, while extracts rich in non-volatile compounds were analysed by HPLC. We have found that yield and quality of SFE extracts highly depend on the conditions of extraction.

The extracts obtained by SFE contained less percentage of the phenol compounds – thymol and carvacrol – in the *Thymus pannonicus* samples than the hydrodistilled (HD) essential oil. In the case of *Satureja montana* the main component of the essential oil was carvacrol. In some cases the percentage of it was higher in the SFE extracts, than in the HD sample. In our research work not only volatile, but non-volatile phenol compounds (flavonoids, rosmarinic acid) were also investigated. The different parameters of the SFE (temperature, pressure, and extraction time) resulted in significantly different amounts of the non-volatile phenol compounds analysed by HPLC.



**The effect of lack of water on the malondialdehyde (MDA) content,
total antioxidant capacity and total phenol content of savory (*Satureja
hortensis* L.)**

Katalin Inotai¹, Péter Radácsi¹, Szilvia Sárossi¹, Pálma Czövek², Éva Németh¹, Jenő Bernáth¹

¹ Department of Medicinal and Aromatic Plants, Corvinus University of Budapest,
1118 Budapest, Villányi Str. 29-43. Hungary (katalin.inotai@uni-corvinus.hu)

² Department of Plant Physiology and Molecular Plant Biology, Eötvös Loránd University,
1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, Hungary (nat.sciences@gmail.com)

In our research work the effect of drought stress was investigated on savory (*Satureja hortensis* L.) plants cultivated on different soil water capacity (Control=70%, Stress1=50%, Stress2=30%) in climate chambers.

Changes of the amount of malondialdehyde (MDA) was observed in the top of the stems. As the amount of MDA is strongly connected to the lipid-peroxidation, it can be used as an indicator of stress effects causing damage in the membrane of the cells. The samples were collected in full bloom period. The determination of MDA was done by the method of Dhindsa et al. (1981). The highest level of MDA (16nmol/g fresh weight) was detected on the strongest drought stress, while on higher soil water capacity the lipid-peroxidation was lower (11 nmol/g fresh weight), especially compared to the control plants (7nmol/g fresh weight).

For the determination of the total antioxidant capacity water extracts were made, the measurements were done by following the method of Benzie and Strain (1996). The results are expressed in ascorbic acid equivalence (AAE). Despite of the lipidperoxidation the total antioxidant capacity was slightly decreased on the lower soil water capacities (C= 0.330 AAE mg/ml; S1= 0.314 AAE mg/ml; S2= 0.292 AAE mg/ml).

The total phenol content was measured by the method of Singleton and Rossi (1965). The results are expressed in gallic acid equivalence (GAE). In accordance with the total antioxidant capacity the lower soil water capacity resulted in a decrease of the total phenol content (C=0.474 GAE mg/ml; S1=0.444 GAE mg/ml; S2= 0.413 GAE mg/ml).

In the future our measurements will be repeated and compared to samples collected from open field.

Literature

- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol Vitic.*, 16: 144-158.
- Benzie, I. I. F., Strain, J. J. (1996): The Ferric Reduction Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power”: the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A. (1981): Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32: 93-101.

The project was supported by the OTKA K68550.

Effect of the lack of water on the antioxidant capacity, total phenol content, essential oil content and essential oil quality of basil (*Ocimum basilicum* L.)

Péter Radácsi Katalin Inotai, Szilvia Sárosi, Eszter Kiss, Éva Németh, Jenő Bernáth

Department of Medicinal and Aromatic Plants, Corvinus University of Budapest,
1118 Budapest, Villányi Str. 29-43. Hungary (peter.radacsi@uni-corvinus.hu)

In our research work the effect of drought stress was investigated on some plant species of the *Lamiaceae* family. The investigations were done in a climate chamber using a Hungarian basil cultivar 'Keskenylevelű'. The plants were grown on different soil water capacity (Control=70%, Stress1=50%, Stress2=30%). The samples were collected in full bloom period, and dried on room temperature.

The essential oil content was measured by hydrodistillation, the main components were determined by GC-MS method. The different soil water capacity neither had effect on the essential oil amount (0.442-0.479 ml/100g dry material) nor on the quality of the essential oil; in all cases the main component was linalool (93.6-96.7%).

For the characterisation of the total antioxidant capacity and total phenol content water extracts were made. The total antioxidant capacity was measured by FRAP method (Benzie and Strain, 1996), the results are expressed in ascorbic acid equivalence (AAE). As the effect of the lower soil water capacity the total antioxidant capacity of the extracts decreased (C=0.735 AAE mg/ml; S1=0.663 AAE mg/ml; S2= 0.540 AAE mg/ml).

In the case of the total phenol content the method of Singleton and Rossi (1965) was used, the results are expressed in gallic acid equivalence (GAE). Similar to the total antioxidant capacity the lower soil water capacity resulted in a decrease of the total phenol content (C=0.814 GAE mg/ml; S1=0.766 GAE mg/ml; S2= 0.702 GAE mg/ml).

Literature

Singleton, V.L., Rossi, J.A.. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol Vitic.*, 16: 144-158.

Benzie, I. I. F., Strain, J. J. (1996): The Ferric Reduction Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power”: the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76.

The project was supported by the OTKA K68 550.

Autor	Seite	Autor	Seite
Ahmad	104	Harbaum-Piayda	5, 45, 47
Ali	85	Hausmann	113
Arrigoni	73	Hayes	51
Aufrère	104	Hayot	84, 88
Back	98	Herrmann	93
Barbier	84	Heseker	29
Bauer	45	Hillebrand	37, 40, 93
Baumgartner	73	Hoffmann	113
Bergmann	3	Hofmann	33
Bernáth	116, 118	Honermeier	58, 85
Betz	100	Hoste	24
Bilger	5	Hubermann	5, 96
Bock	5	Humpf	18
Bösch-Saadatmandi	71, 72	Hurrell	73
Bozzi Nising	73	Hüsing	93
Brockmann	110	Huyskens-Keil	49, 79
Bruna	49	Inotai	116, 118
Brunet	24	Jánváry	113
Bub	76	Kahle	3
Cai	81	Kammerer	13
Carle	13	Kaufmann	64
Cramer	51	Kiss	118
Cuevas Montilla	40	Krahl	98
Czövek	116	Kreis	98
Daniel	69	Kroh	10, 49
Dannehl	79	Krumbein	10
Desel	68	Kruse	71
Dorau	40	Kulling	71
Eggers	47	Kulozik	100
Eichholz	49	Kütük	81
Elstner, E.F.	2	Kutta	115
Elstner, M.A.J.	2	Letzel	64
Engert	58	Lipinski	68
Ernst	68	Manolaraki	24
Erzinger	73	Masanetz	64
Esatbeyoglu	37	Matthes	85
Fischer	73, 113	Melcher	3
Forneck	55, 111	Mewis	81
Gadjev	84, 88	Modi	111
Gea	51	Mueller-Harvey	20, 51
Gerendás	7	Mühling	110
Gössinger	107	Németh	116, 118
Göttmann	85	Oehlke	47
Grassmann	2	Pätzold	58
Grünz	69	Pfaffl	26, 64
Häckel	76	Pfeiffer	113
Halbwirth	20, 88, 104, 107	Pluhár	115

Autor	Seite	Autor	Seite
<i>Radácsi</i>	116,118	<i>Watzl</i>	76
<i>Regos</i>	61, 88	<i>Weibel</i>	76
<i>Richling</i>	3	<i>Wiegand</i>	71
<i>Riedel</i>	81	<i>Wiesner</i>	81
<i>Rimbach</i>	31, 68, 71, 72	<i>Winterhalter</i>	37, 40, 93
<i>Rogoll</i>	3	<i>Wolffram</i>	72
<i>Rohn</i>	10, 16, 49	<i>Wulf</i>	57
<i>Ruan</i>	7	<i>Yon</i>	85
<i>Rüfer</i>	76	<i>Zacchi</i>	47
<i>Rühmann</i>	57	<i>Zarnkow</i>	98
<i>Sándor</i>	115	<i>Zietz</i>	10
<i>Sárosi</i>	115, 116, 118	<i>Zörb</i>	110
<i>Schärer</i>	73	<i>Zude</i>	57
<i>Scheppach</i>	3		
<i>Scherbichler</i>	107		
<i>Schlangen</i>	88		
<i>Schliephake</i>	93		
<i>Schmidt</i>	10, 79		
<i>Schödl</i>	55, 111		
<i>Schreier</i>	3		
<i>Schreiner</i>	10		
<i>Schuhmacher</i>	55		
<i>Schultze</i>	5		
<i>Schulze</i>	96		
<i>Schütze</i>	43		
<i>Schwab</i>	35, 113		
<i>Schwarz</i>	5, 45, 47, 96		
<i>Smetanska</i>	81		
<i>Smith</i>	84, 88		
<i>Spanier</i>	69		
<i>Steinfurth</i>	110		
<i>Stich</i>	20		
<i>Stich</i>	88, 104, 107		
<i>Storck</i>	93		
<i>Stracke</i>	76		
<i>Stringano</i>	51		
<i>Theodoridou</i>	104		
<i>Thill</i>	88		
<i>Tolkach</i>	100		
<i>Töpfer</i>	113		
<i>Troutz</i>	93		
<i>Treutter</i>	1, 57, 61, 88, 91		
<i>Ulrichs</i>	81		
<i>van 't Slot</i>	18		
<i>Végyvári</i>	115		
<i>Wagner</i>	68, 71		
<i>Walter</i>	5		



Effects of flavonoids on basal and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in adipocytes

Melina Claussnitzer

Else Kröner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin, Technische Universität
München,

Am Forum 5, 85350 Freising-Weißenstephan, melina.claussnitzer@wzw.tum.de

Adipocytes are a major site of insulin action, being thereby contributors to the regulation of glucose homeostasis. This process is mainly mediated by translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. An impaired GLUT4 translocation plays a crucial role in the pathogenesis of insulin resistance as one of the earliest events during the development of type 2 diabetes mellitus. An inhibitory effect of certain flavonoids on glucose transport has been previously described *in vitro* in different cell types. However, the impact of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes is a largely unexplored field at present. Accordingly, the direct interaction of several flavonoids with the glucose transporters GLUT1 and GLUT4, both present in the plasma membrane of adipocytes in the basal and the insulin-stimulated state, respectively, was analyzed in this work. For this purpose, the method of the 2-deoxyglucose uptake was firstly established and validated in differentiated 3T3-L1 adipocytes as well as in primary mature human adipocytes. The optimized assay was used for kinetic analysis of basal and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in the mentioned cell systems, which were presently not adequately characterized for kinetics of glucose uptake. Thereby kinetic parameters were calculated which correspond to data known from experiments with rat adipocytes and *Xenopus laevis* oocytes expressing isolated glucose transporters. This thorough characterization provided the basis for the investigation of selected flavonoids concerning their effect on 2-deoxyglucose uptake in adipocytes.

It could be shown that certain flavonoids including flavone, naringenin and the isoflavonoids genistein and daidzein inhibited the 2-deoxyglucose uptake in both unstimulated and insulin-stimulated differentiated 3T3-L1 adipocytes in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect on the transport process in the murine system was approved in the human system using isolated mature

human adipocytes. Based on the experimental setting, this effect could be ascribed to a direct interaction with the glucose transporters GLUT1 and GLUT4 rather than to an influence on intracellular signalling events. Experiments with differentiated 3T3-L1 adipocytes as well as mature human adipocytes evinced that supraphysiological concentrations of the particular flavonoids are required for this inhibitory effect. At physiological concentrations, a reproducible but not statistically significant effect was observed in both cell systems. These findings shed light on the interactions between polyphenolic compounds and the glucose transporters GLUT1 and GLUT4, thereby pointing to the need of subsequent human studies in order to assess the *in vivo* relevance.



Metabolism of soy isoflavones *in vitro* and *in vivo*: Key to a better understanding of their biological effects

Sabine E. Kulling

Chair of Food Chemistry, Institute of Nutritional Science, University of Potsdam,
Arthur-Scheunert-Allee 114-116, D-14558 Nuthetal. E-Mail: kulling@uni-potsdam.de

In recent years dietary isoflavones were claimed to be responsible for a number of health benefits against chronic diseases associated with the intake of soy foods. However, the exact role that isoflavones play in the health-related effects of soy foods and their potential role for adverse effects especially when ingested via supplements have been controversial and difficult to discern. Particularly, clinical studies which were conducted to clarify the preventive role of isoflavones for example in cardiovascular diseases or osteoporosis, often lead to inconclusive or apparently conflicting results. This may be, on one hand, due to the lack of basic knowledge and, on the other hand, due to the insufficient consideration of the biotransformation of isoflavones and the factors, diet as well as host-related, which influences them.

The major soy isoflavones genistein and daidzein were extensively metabolised by the human microbiota as well as by the phase I and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes. For example, daidzein is reduced to dihydrodaidzein which could be further metabolised to the isoflavan S-equol and/or to the C-ring opened derivative O-demethylangolensin. Equol is an interesting metabolite because only ~30-50% of the humans are capable of producing it. Furthermore daidzein is converted in a minor oxidative pathway by the action of cytochrome-P450-enzymes to its 6-, 8- and 3'-hydroxylated derivatives. In addition, all these compounds are largely conjugated to β -glucuronides and sulfate esters so that in the circulation normally at least 90% of the isoflavones and their metabolite derivatives exist in their phase-II-conjugated form. Which of these metabolites are formed to which quantity depends on several factors e.g. the composition of the gut microbiota, the chemical form and composition of the isoflavones ingested, the food matrix. Moreover, host-related factors like gender and age but also genetic polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and transporter proteins are likely to have an influence. In consequence, large inter-individual variations in the metabolism of isoflavones in humans occur. Therefore, a comprehensive analysis of isoflavones and their metabolites in biofluids (plasma and urine) might be a key in better understanding the biological effects of isoflavones *in vivo*. Based on our own data from a study with seven healthy German men, who ingested daidzein and daidzein-glucoside as

pure compounds under standardized conditions, we found variations in the qualitative and quantitative daidzein metabolite profile, which will be illustrated here as an example.

References:

1. CE Rüfer, SE Kulling, J Möseneder, P Winterhalter, A Bub, Role of plasma lipoproteins in the transport of the soybean isoflavones daidzein and daidzein-7-O-D-glucoside. *British Journal of Nutrition*, in press.
2. A Mortensen, SE Kulling, I Rowland, G Rimbach, A Cassidy et al. (2009) Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*. Published Online: 20 Jan 2009.
3. CE Rüfer, J Möseneder, A Bub, P Winterhalter, M Stürtz, SE Kulling (2008) Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, cross-over study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87:1314-23.
4. R Maul, NH Schepp, SE Kulling (2008) Application of LC and GC hyphenated to mass spectrometry as tool for characterization of unknown derivatives of isoflavonoids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391:239-250.
5. SE Kulling, DM Honig, M Metzler (2001) The oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:3024-3033.



44. Vortragstagung



Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung
(Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V.
und
Vereinigung für Angewandte Botanik

„Pflanzenphenole
für die Gesundheit von Pflanze, Mensch und Tier“

„Plant Phenolics
for the Health of Plants, Humans and Livestock“

16.-17. März 2009
am Wissenschaftszentrum Weihenstephan
in Freising
Hörsaal 16, Zentrales Hörsaalgebäude, TUM Campus



Allianz Bayern Innovativ Eine Initiative des
Bayerischen Staatsministeriums für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

Montag, 16. März 2009

Ort: Hörsaal 16, Zentrales Hörsaalgebäude,
TUM Campus Weihenstephan

8:00 Registrierung

8:30 Posterschau

9:00 Begrüßung

Präsident der DGQ, *Prof. Dr. H. Schulz*

Dekan der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan, TUM, *Prof. Dr. G. Wenzel*

Moderation: *Ernst Höhn*, Wädenswil

9:30 *Erich F. Elstner*, *J. Grassmann*, *M.A.J. Elstner*, TU München, TU Braunschweig

Kinetik und Thermodynamik kooperativer Effekte bei der Interaktion phenolischer Antioxidanzien

10:00 *H. Bergmann*, *D. Rogoll*, *K. Kahle*, *W. Scheppach*, *R. Melcher*, *P. Schreier*, *Elke Richling*,
Univ. Kaiserslautern, Univ. Würzburg, Juliusspital Würzburg

Intestinal concentrations of polyphenols after apple juice consumption and their influence on cell permeability

10:30 Pause

11:00 *Lothar Kabelitz*, Phytolab Vestenbergsgreuth

Die Bedeutung von Phenylpropanoiden, Flavonoiden und Gerbstoffen in Heilpflanzen und Teedrogen

11:30 *Eva Maria Hubbermann*, *K. Bock*, *M. Schultze*, *B. Walter*, *B. Harbaum-Playda*, *W. Bilger*, *K. Schwarz*, Universität Kiel

Beeinflussung der Flavonoid- und Hydroxyzimtsäuregehalte in Gemüse und Kräutern durch Preharvest Maßnahmen

12:00 *J. Ruan*, *Jóska Gerendás*, Acad. Agric. Sci. China, Universität Kiel

Accumulation of phenolic compounds as influenced by N supply: a case study on catechins in green tea (*Camellia sinensis*)

12:30 Mittagspause/Posterschau

Moderation: *Uta Tietz*, Potsdam

13:30 *Susanne Schmidt, M. Zietz, M. Schreiner, S. Rohn, L.W. Kroh, A. Krumbein*,
Leibnitz-Inst. Großbeeren, TU Berlin
**Zusammensetzung der Flavonoide in Grünkohl (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) in
Abhängigkeit vom Genotyp sowie den ökophysiologischen Faktoren Strahlung und
Temperatur**

14:00 *Dietmar R. Kammerer, R. Carle*, Universität Hohenheim
**Trends in der Gewinnung und Fraktionierung phenolischer Antioxidantien aus Reststoffe
der Lebensmittelverarbeitung**

14:30 *Sascha Rohn*, TU Berlin
**Einfluss einer Anreicherung auf die Stabilität von Zwiebelflavonolglykosiden – Nutzen und
Risiken**

15:00 *Gordon van 't Slot, H.-U. Humpf*, Universität Münster
Degradation of flavonoids by intestinal microbiota studied in the pig cecum model

15:30 Pause

Moderation: *Bernhard Tauscher*, Karlsruhe

16:00 *Heidi Halbwirth, K. Stich, I. Müller-Harvey*, TU Wien, University Reading
The re-invention of sainfoin: an example of a novel resource for sustainable agriculture

16:30 *Hervé Hoste, F. Manolaraki, S. Brunet*, Université Toulouse
Anthelmintic effects of the so called tanniniferous forages

17:00 *Michael W. Pfaffl*, TU München
**Effects of secondary metabolites on gut morphology and on the immunosystem in the
gastro intestinal tract**

17:30 *Irene Mueller-Harvey*, University Reading
Tannins for control of bacterial pathogens

18:00 *Roman Lang*, DGQ Förderpreis
Quantitative Studien zu bioaktiven Abbauprodukten von Trigonellin in Kaffegetränken

18:45 Mitgliederversammlung DGQ **Ort:** Hörsaal 16

19:45 **Abfahrt Bus zum "Geselligen Abend"** (Haltestelle Weihenstephan)
Weitere Haltestelle „Kriegerdenkmal“ (19:50h)

20:00 **Geselliger Abend**
Musik: "Gaudi Quattro" **Ort:** Ristorante Pizzeria Portofino, Landshuter Str. 31

Dienstag, 17. März 2009

Ort: Hörsaal 16, Zentrales Hörsaalgebäude,
TUM Campus Weihenstephan

Moderation: *Gerald Rimbach*, Kiel

8:00 *Helmut Hesecker*, Universität Paderborn
Bioactive compounds of the plant and their role in a balanced diet

8:30 *Kurt Widhalm*, Universität Wien
Effect of soya-substituted diet in children and adolescents with familial and polygenic hypercholesterolemia

9:00 *Sabine Kulling*, Universität Potsdam
In vitro and in vivo metabolism of the soy isoflavones

9:30 *Pause*

Moderation: *Hartwig Schulz*, Quedlinburg

9:45 *Gerald Rimbach*, Universität Kiel, *Institute for Human Nutrition & Food Sci*
Impact of ApoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk – is there a role for natural antioxidants?

10:15 *Hannelore Daniel*, TU München, *Molecular Nutrition Unit*
Significance of secondary plant metabolites in human nutrition

10:45 *Melina Claußnitzer*, ALPRO Foundation Förderpreis
Effects of flavonoids on basal and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in adipocytes

11:15 *Prof. Hesecker from Alpro Foundation*
Sektempfang der ALPRO Foundation

Posterschau

11:45 *Thomas Hofmann*, TU München, *Chair of Food Chemistry and Molecular Sens*
Key inducers of oral astringency and bitter taste of plant-derived food products – What do we really know?

12:15 *Wilfried Schwab*, TU München, *Biomolecular Food Technology*
Improvement of strawberry flavor through enhanced formation of phenylpropenes

12:45 Schlusswort des Präsidenten der DGQ

→ *Felicitas 13.15*

Phenolische Verbindungen in pflanzlichen Lebensmitteln /Analytik

- 1 *T. Esatbeyoglu, S. Hillebrand, P. Winterhalter*
Determination of phenolic composition of different black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juices
- 2 *E. Cuevas Montilla, S. Hillebrand, C. Dorau, P. Winterhalter*
Preparative isolation of anthocyanins by countercurrent chromatography and application of the color activity concept to black carrot extract (*Daucus carota*)
- 3 *W. Schütze*
Charakterisierung von Anthocyanen in Kulturpflanzen unter Einsatz der HPLC/MS-Kopplungstechnik
- 4 *J. Bauer, B. Harbaum-Piayda, K. Schwarz*
Bestimmung von Phenolcarbonsäuren in Nebenprodukten der Lebensmittel- und Agrarwirtschaft und ihrer antioxidativen Kapazität
- 5 *B. Harbaum-Piayda, K. Oehlke, P. Zacchi, R. Eggers, K. Schwarz*
A new polyphenolic compound in refined rapeseed oil and its byproduct
- 6 *C. Bruna, I. Eichholz, S. Huyskens-Keil, L.W. Kroh, S. Rohn*
Phenolgehalte von Kakaoshalen unterschiedlicher Kakaotypen und Provenienzen und deren antioxidative Aktivität
- 7 *E. Stringano, A. Gea, R.K. Cramer, W.C. Hayes, I. Mueller-Harvey*
Characterisation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) condensed tannins by MALDI-TOF mass spectrometry
- 8 *K. Schödl, R. Schuhmacher, A. Forneck*
**Spotting Polyphenoles as Biomarkers:
Spatial and temporal within plant distribution of selected polyphenolic compounds under controllable environment in two Pinot noir (*V. vinifera* L.) clones**
- 9 *J.S. Wulf, S. Rühmann, D. Treutter, M. Zude*
Phenolanalyse in Früchten mit Hilfe zerstörungsfreier und zeitaufgelöster optischer Messmethoden
- 10 *N. Engert, R. Pätzold, B. Honermeier*
Phenolsäuren in alten Weizenarten (*Triticum*) - Vorstellung der Methode und erste Ergebnisse
- 11 *I. Regos, D. Treutter*
Sainfoin phenolics: isolation, identification and their quantification in different plant organs

cue

11a C. Wegener, G. Jansen

Plant phenols and antioxidant capacity of wild potato species

Physiologie

12 S. Masanetz, C. Kaufmann, T. Letzel, M. Pfaffl

Effects of pine pollen extracts on the proliferation of porcine ileal cell cultures

13 I. Ernst, A.E. Wagner, S. Lipinski, C. Desel, G. Rimbach

Cellular uptake and localization of the flavonoid cyanidin in human keratinocytes in culture

14 G. Grünz, B. Spanier, H. Daniel

Assessing the Effects of the Flavonoid Myricetin in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*

15 H. Wiegand, A.E. Wagner, C. Bösch-Saadatmandi, H.-P. Kruse, S. Kulling, G. Rimbach

Effect of dietary genistein on phase II and antioxidant enzymes in rat liver

16 C. Bösch-Saadatmandi, S. Wolffram, G. Rimbach

Untersuchungen zum anti-inflammatorischen Potential von Quercetin in Makrophagen und im Modelltier Maus

“Phytochemical Farming”, Umwelteffekte, Sorteneinfluss

17 M. Fischer, E. Arrigoni, M. Erzinger, H. Schärer, D. Baumgartner, A. Bozzi Nising, R.F. Hurrell

Pflanzenschutzbehandlung oder Sortenwahl: Was beeinflusst den Polyphenolgehalt von Äpfeln?

18 C.E. Rüfer, B.A. Stracke, S. Häckel, F. Weibel, A. Bub, B. Watzl

Bioverfügbarkeit und antioxidatives Potenzial von Polyphenolen aus ökologisch und konventionell angebauten Äpfeln *in vitro* und *in vivo*

19 D. Dannehl, S. Huyskens-Keil, U. Schmidt

Einfluss von elektrischem Strom auf die Phenolverteilung in Radieschen (*Raphanus sativus* L.)

20 H. Riedel, M. Wiesner, O. Kütük, Z. Cai, I. Smetanska, I. Mewis, C. Ulrichs

Stimulation und Extraktion von bioaktiven, phenolischen Verbindungen aus pflanzlichen Zellkulturen

21 C. Hayot, I. Gadjev, G. Barbier, L. Smith

Pre-Breeding and Development of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*)

22 B. Honermeier, S. Ali, C. Matthes, S. Göttmann, F. Yan

Polyphenole in der Artischocke (*Cynara cardunculus* ssp. *flavescens* WIKL.) – entwicklungsphysiologische und agronomische Einflussfaktoren

23 J. Thill, H. Halbwirth, K. Schlangen, K. Stich, I. Regos, D. Treutter, C. Hayot, I. Gadjev, L. Smith
Flavonoids and their formation in different sainfoin varieties (*Onobrychis viciifolia*)

24 D. Treutter
Managing Phenol Contents in Horticultural Crops. Why and How?

Veränderung des Polyphenolgehaltes durch Verarbeitung

25 S. Hillebrand, H. Storck, B. Hüsing, U. Schliephake, D. Trautz, M.-E. Herrmann, P. Winterhalter
Effect of thermal processing on phenolic content in a blue-fleshed potato (*Solanum tuberosum* L.) variety

26 B. Schulze, E.M. Hubbermann, K. Schwarz
Deglykosilierung von Flavonoidderivaten in Zwiebel (*Allium cepa* L.) während der Trocknung

27 M. Krahl, M. Zarnkow, W. Back, S. Kreis
Anreicherung von Polyphenolen in Buchweizen durch den Mälzungsprozess

28 M. Betz, A. Tolkach, U. Kulozik
Technological Aspects of Anthocyanin Utilisation in Functional Foods

29 A.F. Ahmad, K. Theodoridou, H. Halbwirth, J. Aufrère, K. Stich
Effect of different conservation methods and maturity stages on peroxidase activity in sainfoi (*Onobrychis viciifolia*)

30 H. Scherbichler, H. Halbwirth, M. Gössinger, K. Stich
Effects of peroxidase und polyphenoloxidase on the color stability of strawberry nectar from puree

Verschiedenes

31 D. Steinfurth, C. Zörb, M. Brockmann, K.H. Mühling
Einfluss des S-Angebots auf die Glutathion-Konzentration und die Qualität von Weizen

32 K. Schoedl, P. Modl, A. Forneck
Enhancing Fruit quality of sweet cherries (*P. avium*) through flower thinning

33 L. Jánváry, T. Hoffmann, J. Pfeiffer, L. Hausmann, R. Töpfer, T.C. Fischer, W. Schwab
Restoring the functionality of the *Vitis vinifera* L. anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by two site-directed point mutations

34 G. Kutta, Z. Pluhár, S. Sárosi, G. Sándor, G. Végvári
Effect of different extraction methods on the volatile and non volatile phenol compounds of *Thymus pannonicus* All. and *Satureja montana* L.

35 K. Inotai, P. Radácsi, S. Sárosi, P. Czövek, É. Németh, J. Bernáth
The effect of lack of water on the malondialdehyde (MDA) content, total antioxidant capacity and total phenol content of savory (*Satureja hortensis* L.)

36 P. Radácsi, K. Inotai, S. Sárosi, E. Kiss, É. Németh, J. Bernáth
Effect of the lack of water on the antioxidant capacity, total phenol content, essential oil content and essential oil quality of basil (*Ocimum basilicum* L.)

Organisation:

Prof. Dr. D. Treutter
FG für Obstbau, Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weißenstephan
Dürnst 2, 85354 Freising
Tel.: +49.8161.713753; Fax: +49.8161.715385
E-Mail: dieter.treutter@wzw.tum.de

Wissenschaftliche Leitung:

Prof. Dr. H. Schulz, Quedlinburg, Präsident
Dr. U. Tietz, Potsdam
Prof. Dr. H. Bergmann, Jena
Dr. E. Höhn, Wädenswil
Prof. Dr. G. Rimbach, Kiel
Prof. Dr. B. Tauscher, Karlsruhe
Prof. Dr. D. Treutter, Freising

Danksagung

Die Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. und die Fakultät Wissenschaftszentrum Weißenstephan der Technischen Universität München bedanken sich für die Kooperation bei den Partnern:

Bayerisches Staatsministerium für Ernährung,
Landwirtschaft und Forsten



Alpro Foundation vzw,
Wevelgem, Belgium

Marie Curie Research Training Network
RTN: FP6-035805



Herzlichen Dank für das Sponsoring durch

Flughafen München GmbH



Molkerei Weißenstephan GmbH & Co. KG