



Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung  
(Pflanzliche Nahrungsmittel)

DGQ e.V.

**XXXI. Vortragstagung**

**Die Qualität**

**pflanzlicher Nahrungsmittel**

**als Grundlage richtiger Ernährung**

25./26. März 1996

in Kiel

XXXI. Vortragstagung,  
Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung,  
Pflanzliche Nahrungsmittel e.V.

ISBN 3-9805230-0-4  
ISSN 1431-3596

**Wissenschaftliche Leitung:**

Dr. D. Treutter, Weihenstephan (Präsident)  
Prof. Dr. W. Feldheim, Kiel  
Dr. J. Habben, Hannover  
Prof. Dr. T. Nilsson, Alnarp  
Dr. Uta Tietz, Bergholz-Rehbrücke  
Prof. Dr. B. Tauscher, Karlsruhe  
Prof. Dr. F. Venter, Hankensbüttel

Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung e.V.  
Geschäftsstelle c/o Lehrstuhl für Obstbau  
Technische Universität München  
85350 Freising-Weihenstephan  
Tel. 08161/713753 Fax: 08161/714499

## Inhaltsverzeichnis

Vorwort, <i>D. Treutter</i>	3
Prävention von Zivilisationskrankheiten durch bioaktive Inhaltsstoffe der Pflanzen, <i>W. Feldheim</i>	5
Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse, <i>E. Wisker</i>	15
Carotenoid content and composition of carrots cultivated in heavy-metal polluted soils, <i>P. Biacs, H. Daood, T. Huszka</i>	27
Carotinoide in Brokkoli und ihre Variabilität in Abhängigkeit von Sorte und Anbau zeitraum, <i>I. Schonhof und A. Krumbein</i>	37
Schnelle HPLC-Methode zur Bestimmung der Carotinoide und Chlorophyll in Brokkoli, <i>A. Krumbein</i>	41
Saponins - Biological Properties and Content in Different Plants, <i>Gunilla Önning</i>	45
Variabilität des Glucosinolatgehaltes als ein Aspekt bei der Züchtung neuartiger Brassica-Formen, <i>W. Schütze und E. Clauß</i>	53
Charakterisierung von Primitiv- und Kulturformen des Kohls <i>Brassica oleracea</i> <i>E. Hoberg, D. Ulrich, W. Schütze und E. Clauß</i>	63
Flavonoide als natürliche Inhaltsstoffe mit biologischer Wirkung, <i>H. Böhm, J. Hempel und R. Raab</i>	67
Flavane in pflanzlichen Lebensmitteln, <i>D. Treutter</i>	81
Phytoestrogens, Naturally Occuring, Hormonally Active Compounds in Food, <i>R. Santti</i>	91
Biosynthese und Gehalte von Phenylpropanen in Nahrungspflanzen bei zunehmender Umweltbelastung, <i>V. Leinhos und H. Bergmann</i>	103
Anthocyanins in Fruit and Juice, <i>C. Iversen, U. Kidmose und N. Poulsen</i>	109
Vorkommen und Gehalte von Flavanolen in Apfelfrüchten und -säften, <i>U. Mayr und D. Treutter</i>	113
Umweltöstrogene - Vorkommen, Wirkung, Chemie, Möglichkeiten der Entfernung, <i>P. Butz</i>	119
Biological Control of Postharvest Diseases of Fruit - Problems and Prospects, <i>E. Chalutz and S. Droby</i>	133
Einfluß des Kulturfiltrates von <i>Bacillus sp.</i> auf die Sporenceimung von <i>Penicillium digitatum</i> und <i>Botrytis cinerea</i> , <i>B. Trierweiler und B. Tauscher</i>	143
Sind Phenole und Polyacetylene der Karotten gegen Lagerfäule wirksam? <i>K. Olsson und R. Svensson</i>	147

Erhalt der antimutagenen Wirkung von Gemüse bei Ultra-Hochdruck- Behandlung, <i>P. Butz, R. Edenharder, H. Fister und B. Tauscher</i>	153
Veränderung von Mykotoxinen bei Destillation und Hochdruck- extraktion von Gewürzen, <i>U. Tietz und E. Mrowietz</i>	157
Fumonisingehalte in Getreide, <i>U. Meister und H. Dahlke</i>	161
Technologie der Pseudocerealien Amarant, Buchweizen und Reismelde, <i>M. Kuhn, S. Wagner, E. Neumann und M. Zacher</i>	167
Enzymatischer Abbau thermisch behandelter $\alpha$ -Glucane, <i>D. Schumacher und L. W. Kroh</i>	171
Charakterisierung der Zellwände des Knollengewebes unterschiedlicher Kartoffelsorten, <i>C. Wegener, G. Jansen und W. Flamme</i>	175
Vitamin C in Fruits and Vegetables, <i>U. Kidmose, A. S. Johansen und N. Poulsen</i>	181
Selenanreicherung in Gemüse, <i>B. Geyer, F. Haj-Bakri, D. Gawlik und K. W. Park</i>	185
Sulphur Supply and Alliin Content of <i>Allium</i> Species, <i>L. Hoppe, M. Bahadir, S. Haneklaus und E. Schnug</i>	189
Enrichment of Iodine in Vegetable Food by Fertilization with Caliche, <i>P. Jopke, M. Bahadir und E. Schnug</i>	193
Einfluß von Trockenheit und Salzstreß auf den Gehalt von Schwermetallen und Betainen in <i>Hordeum vulgare</i> L., <i>B. Machelett</i>	199
Produktion von Stilben-Phytoalexinen in Weinblättern, sowie den Blättern und Knollen transgener Kartoffeln nach Pilzinfektion, <i>D. Stahl, B. Lippmann, V. Leinhos, A. Mäser, J. Dettendorfer, S. Gunstheimer, S. Ernst, H. Bergmann und H. Hilscher</i>	203
Vergleich der Qualität von ökologisch und konventionell angebauten Kartoffeln der Ernte 1995, <i>J. Prugar, J. Storková und J. Petr</i>	207
Vergleich der Qualität von ökologisch und konventionell angebautem Weizen der Ernte 1995, <i>Storková, J., Prugar, J. und J. Skerik</i>	211
Leistungsfähige Sanddorn-Sorten. Voraussetzung für die Erzeugung hochwertiger Sanddorn-Produkte, <i>H.-J. Albrecht</i>	215
Gesundheitliche Bewertung von Anthocyanen/Anthocyanidinen, <i>G. Rechkemmer, B. L. Pool-Zobel</i>	219
Terpene - Mögliche Wirkmechanismen bei der Krebsprävention, <i>B. L. Pool-Zobel</i>	233

## **Vorwort**

Im 30. Jahr nach Gründung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. wurde als Tagungsort die Agrarwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ganz bewußt gewählt, denn mit dieser Universität ist die DGQ besonders verbunden.

5 Jahre wurde die DGQ von hier aus geleitet. Für diese Zeit lagen die Geschicke der Gesellschaft am Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde in den Händen von Prof. Dr. Feldheim. Er ist langjähriges Vorstandsmitglied und lenkte während seiner Amtszeit als dritter Präsident der DGQ die Aufmerksamkeit der Gesellschaft besonders auf die ernährungsphysiologischen Aspekte der Qualität.

Prof. Feldheim war auch an der Konzeption für diese Tagung maßgeblich beteiligt. Mit Kiel und mit der Landwirtschaftlichen Fakultät verbindet uns auch einer der Väter der DGQ, die diese Gesellschaft vor 30 Jahren ins Leben riefen, nämlich der Kieler Tierernährer Prof. Dr. M. Becker, der in diesem Jahr seinen 90. Geburtstag feierte.

Die Gründungsmitglieder hatten die Idee zu einer Gesellschaft, die als Bindeglied zwischen Praxis und Wissenschaft fungieren sollte. Dabei wurde aber besonderer Wert auf die wissenschaftliche Arbeit gelegt und außerwissenschaftliche Bereiche sollten keinen Einfluß auf die Gesellschaft nehmen können. Dieser Unabhängigkeit ist es sicher auch zu verdanken, daß sich die DGQ auf ihren Tagungen in der Regel mit Randgebieten der Qualitätsforschung befassen konnte.

Die nunmehr 30jährige Arbeit der DGQ ist gekennzeichnet vom Ringen um die Charakterisierung von Qualität. Der frühere Präsident Herr Prof. Schwerdtfeger hat das einmal folgendermaßen ausgedrückt: "Qualitätsforschung ist die Suche nach den **Ursache - Wirkungs - Zusammenhängen** in der Kette **Boden - Pflanze - Tier - Mensch**".

Es wurde von der DGQ bewußt vermieden, die Tagungsteilnehmer mit gängigen Lehrmeinungen zu langweilen. Davon zeugen auch die Themen, in denen es um "Neue Trends" geht, um "Spezielle biochemische Probleme", um "Neue Aufgaben" und um "Kritische Sicht". Es wurden immer wieder ernährungsphysiologische Fragen diskutiert und über erwünschte und unerwünschte Inhaltsstoffe pflanzlicher Nahrungsmittel informiert. Dabei sprach man oft über Substanzen, die **nicht** in aller Munde waren. So wurde beispielsweise schon über Phytoalexine referiert, als sich noch nicht einmal die Phytopathologen über deren Bedeutung einig waren. Als die DGQ zuletzt 1982 in Kiel tagte, stand der Kongreß unter dem Motto: "Plant foods

and human health (fiber and nutritionally active substances, excepting vitamins)". Damals wurden die allseits bekannten Vitamine ausgeschlossen.

An diese Tradition sollte das diesjährige Tagungsthema anschließen: "Die Qualität pflanzlicher Nahrungsmittel als Grundlage richtiger Ernährung". Wenn wir uns unter diesem Generalthema schwerpunktmäßig mit den bioaktiven Sekundärstoffen und ihrer ernährungsphysiologischen Bedeutung auseinandersetzen, so heißt das natürlich **nicht**, daß diese Substanzen **die einzigen oder gar die elementaren** Qualitätsmerkmale darstellen! Wir wollen damit vielmehr darauf aufmerksam machen, daß die Sekundärstoffe nicht übersehen werden dürfen, wenn es darum geht, sich richtig oder - wie man es umgangssprachlich ausdrückt - "gesund" zu ernähren.

In jüngster Zeit ist das Interesse der Ernährungsphysiologen an den Sekundärstoffen recht groß geworden. Das zeigt sich auch an der besonderen Nachfrage nach unserer Veröffentlichung von 1994 "Neue Aspekte der gesundheitlichen Wirkung pflanzlicher Nahrungsmittel", die sehr schnell vergriffen war.

Es werden gerade von Seiten der Ernährungswissenschaftler viele Fragen gestellt nach Vorkommen und Konzentration der Sekundärstoffe in unseren Kulturpflanzen. Deshalb haben wir für diese Tagung versucht, Redner zu gewinnen, die uns informieren über gesundheitliche Aspekte und darüber, welche Inhaltstoffe wir mit welchen Pflanzen zu uns nehmen. Denn bei all den biochemischen und ernährungsphysiologischen Beiträgen hat die DGQ niemals die Pflanze vergessen, die Nahrungspflanze, deren Qualität durch Züchtung und durch Kulturmaßnahmen sowie durch alle auf sie einwirkende Umweltfaktoren geprägt wird.

Ich hoffe, daß wir mit diesem Kongreß dem in unserer Satzung verankertem Ziel wieder etwas nähergekommen sind, das Wissen über Nahrungspflanzen, insbesondere über ihre biochemische Zusammensetzung, über ihren ernährungsphysiologischen und gesunderhaltenden Wert für Mensch und Tier zu fördern.

Freising-Weihenstephan, im Mai 1996

Dr. habil. D. Treutter

Präsident der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung  
(Pflanzliche Nahrungsmittel) DGQ e.V.



## Prävention von Zivilisationskrankheiten durch bioaktive Inhaltsstoffe der Pflanzen

*W. Feldheim*

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Universität Kiel

In seiner 1914 publizierten Schrift: "Die Vitamine, ihre Bedeutung für die Physiologie und Pathologie" stellt Casimir Funk, dem wir die Bezeichnung " Vitamine " verdanken, in den Schlußfolgerungen fest:

"Mit der Auffindung der Vitamine in unserer Nahrung eröffneten sich mit einem Schlage neue Gesichtspunkte, die unsere bisherigen Auffassungen über die Ernährung und Stoffwechsel sehr stark beeinflussen werden. Jetzt wissen wir sicher, daß die Bewertung der Nahrung auf Grund ihres Gehalts an Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten, sowie ihres Kalorienwertes nicht mehr ausreicht. Sahen wir doch, daß eine in dieser Beziehung tadellose Nahrung sich als vollständig unzureichend erweisen kann, wenn ihr die Vitamine fehlen" (1).

Heute, 80 Jahre später, stehen wir vielleicht erneut an einer Erweiterung unserer Auffassungen über die Ernährung. Inhaltsstoffe unserer Nahrung, die man bisher als überflüssig, ja zum Teil als antinutritiv wirksam oder toxisch angesehen und deshalb aus unserer Nahrung entfernt hat, erweisen sich in einigen Fällen als nützlich für unsere Gesundheit. Sie sind zwar keine Nährstoffe wie z.B. bestimmte Aminosäuren und Fettsäuren oder die Vitamine, deren Fehlen zu spezifischen Mangelerscheinungen, Krankheiten und zum Tode führt.

Trotzdem können die bioaktiven Stoffe unseren Gesundheitszustand positiv beeinflussen, deshalb sind sie wichtig für uns. Da unter dem Begriff der "Ernährung" nach C.A. Scheunert "die Gesamtheit aller Vorgänge verstanden wird, die dem Menschen Leistungsfähigkeit und Gesundheit bis ins hohe Alter

ermöglicht", sind die überwiegend in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommenden bioaktiven Stoffe als Komponenten unserer Ernährung anzusehen.

Hier eröffnet sich ein völlig neues Gebiet mit vielen speziellen Fragen und damit eine große Herausforderung an die Ernährungsforschung. Im Moment gibt es mehr offene Fragen als Antworten. Wie schwierig der Zugang zu einem neuen Gebiet sein kann, möchte ich am Beispiel der Ballaststoffe verdeutlichen, die eigentlich als bioaktive Stoffe ohne Nährwertcharakter ebenfalls zu dieser Gruppe zählen. Welche Argumente sprechen für eine Notwendigkeit der Ballaststoffaufnahme? Wie läßt sich beweisen, daß zwischen der Höhe der Ballaststoffaufnahme und bestimmten Zivilisationskrankheiten Zusammenhänge bestehen? Wegen der zur Verfügung stehenden Zeit möchte ich mich auf eine Krankheit beschränken, den Dickdarmkrebs.

Die Häufigkeit von Dickdarmkrebs hat in den letzten Jahrzehnten weltweit stark zugenommen. Diese Krebsart nimmt nach dem Lungenkrebs bei Männern und dem Brustkrebs bei Frauen die zweite Position in der Reihe der Krebserkrankungen ein. Von dem Anstieg der Krebshäufigkeit sind besonders Länder betroffen, die einen hohen Lebensstandard aufweisen und in denen eine Nahrung verzehrt wird, die einen reichlichen Anteil an energiereichen Lebensmitteln enthält (2).

Genetisch bedingte Unterschiede zwischen den Populationen sind von untergeordneter Bedeutung. Japaner mit niedrigem Risiko zeigen 1-2 Generationen nach Einwanderung in die Vereinigten Staaten die gleiche Krebshäufigkeit wie dort lebende Weiße, wenn die Immigranten amerikanische Ernährungsgewohnheiten übernehmen. In den Staaten lebende Lateinamerikaner behalten dagegen das niedrige Krebsrisiko ihres Heimatlandes, wenn sie ihren alten Ernährungstraditionen treu bleiben. Dies spricht für einen Zusammenhang zwischen Ernährungsweise und Krebshäufigkeit (3).

Die Entwicklung der Krankheit geht langsam vor sich, sie kann sich über Jahrzehnte hinziehen. Ganz allmählich verändern sich die Zellen der Darmwand. Zunächst bilden sich Polypen, danach gutartige Adenome und danach erst die bösartigen Tumoren. Die Entwicklung kann in jedem Stadium stehenbleiben (4).



Die Krankheit fördernde oder hemmende Substanzen haben einen entscheidenden Einfluß, daneben gibt es für den einzelnen Menschen einen Einfluß durch genetische Komponenten. Da diese Krankheiten erst im Alter auftreten, ist die gestiegene Lebenserwartung bei der Entwicklung der Häufigkeit ebenfalls zu bedenken.

		Viele Länder in Afrika, Asien, Südamerika	Westliche Industrie- länder
<b>Verzehr pflanzlicher Lebensmittel</b>		▲	▼
<b>Verzehr tierischer Lebensmittel</b>		▼	▲
<b>Aufnahme an</b>	<b>Energie</b>	▼	▲
	<b>Fett</b>	▼	▲
	<b>Protein</b>	▼	▲
	<b>Stärke</b>	▲	▼
	<b>Ballaststoffen</b>	▲	▼

▲ mehr    ▼ weniger

**Abbildung 1:** Prinzipielle Unterschiede in der Ernährung zwischen verschiedenen Ländern

Wie hat sich die Ernährung verändert? In den letzten 100 Jahren hat der Trend zur Verarbeitung von Rohstoffen zu haltbaren Nahrungsmitteln zugenommen. Dies war eine Notwendigkeit, um bei abnehmender Zahl der Selbstversorger die Ernährung der Bevölkerung zu sichern. Bei den Lebensmitteln führte die Steigerung der Kaufkraft zu einer Verschiebung in der Lebensmittelauswahl: der Verzehr an relativ billigen, meist pflanzlichen Primärprodukten der Landwirtschaft nahm ab, der Anteil der durch Veredlung erhaltenen, teureren Produkte erhöhte sich. Wie der Vergleich mit den Ländern der Dritten Welt zeigt, bedeutet das für uns einen Rückgang des Verbrauchs an pflanzlichen Lebensmitteln und damit weniger komplexen Kohlenhydraten und Ballaststoffen (Abb. 1) in der Kost. Mehr tierische Lebensmittel werden gegessen, damit steigt die Aufnahme an Fett und Protein, die

Energiedichte der Nahrung erhöht sich. Bei sinkendem Energiebedarf steigt damit die Gefahr der Überernährung.

Es besteht eine statistische Abhängigkeit zwischen Ballaststoffzufuhr und Krebs. In einer englischen Studie wird festgestellt, daß bei geringer Ballaststoffaufnahme mit der Kost das Risiko von Dickdarmkrebs höher ist als umgekehrt (5). Doch der festgestellte Zusammenhang könnte zufällig sein, die Kausalität müßte bewiesen werden. Welche Mechanismen könnten hierfür verantwortlich sein?

Bei einer fettreichen, ballaststoffarmen Kost gelangen mehr Gallensäuren in den Dickdarm, die durch Enzyme der Darmbakterien in sekundäre Gallensäuren umgewandelt werden als bei einer Normalkost. Sekundäre Gallensäuren gelten als krebsfördernd (6,7). Steigt der Ballaststoffanteil der Kost, so bewirken die bei der Fermentation der Ballaststoffe entstandenen kurzkettigen Fettsäuren eine Verschiebung des Milieus im Dickdarmlumen in den leicht sauren Bereich. Hierdurch wird die Aktivität bakterieller Enzyme beeinflusst, die Bildung sekundärer Gallensäuren nimmt ab. Unter diesen Bedingungen ist auch die Löslichkeit der sekundären Gallensäuren eingeschränkt. Durch die Ballaststoffe wird außerdem die Dickdarmperistaltik angeregt, d. h. die Nahrungsreste werden schneller weitertransportiert und die Möglichkeit der Einwirkung der sekundären Gallensäuren zeitlich eingeschränkt. Hiermit wären theoretisch Möglichkeiten zu einer Erklärung der Wirkung der Ballaststoffe gegeben.

Die bei der Fermentation der Ballaststoffe gebildete Buttersäure trägt mit zur Energieversorgung des Dickdarm-Epithels bei, außerdem ist sie an der Regulation der Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt (8). Es gibt also eine ganze Anzahl von Arbeitshypothesen, die die Verwendung von Ballaststoffen in der Prophylaxe gegen Dickdarmkrebs unterstützen.

Diese Hypothesen müßten experimentell bewiesen werden. Wegen der langen Entwicklungsphasen der Krebsformen kommen experimentelle Untersuchungen am Menschen nicht in Betracht, sie müßten lebenslang geführt werden. In Tierversuchen werden meist Mäuse oder Ratten eingesetzt, wobei sich bestimmte Stämme als besonders empfindlich erwiesen haben. Das Krebsgeschehen wird durch Gabe eines Carcinogens ausgelöst, die Tiere enthalten dann in zwei Gruppen

entweder Kontrollfutter oder das gleiche Futter mit dem zu prüfenden Zusatz (9,10).

Untersucht wird die Entwicklung des Tumors. Es wurde beobachtet, daß Ballaststoffe, die bei der Ratte (und auch beim Menschen) zu einer Erhöhung des Stuhlgewichts führen, vor der Ausbildung chemisch induzierter Tumoren schützen.

Es gibt allerdings verschiedene Gründe, die eine direkte Übertragbarkeit der Befunde auf die Situation beim Menschen nicht zulassen: die Carcinogene, die man im Tierversuch verwendet, sind für den Menschen ohne Bedeutung; das Tierfutter ist ganz gleichförmig zusammengesetzt und entspricht nicht der variablen Kost des Menschen, die ein veränderliches Angebot aus verschiedenen Nährstoffquellen enthält. Die in den Tierversuchen verwendete Ballaststoffkonzentration war sehr hoch, etwa 10-20 g Ballaststoffe/100g Futter. Um eine entsprechende Menge an Ballaststoffen aufzunehmen, etwa 50-100g Ballaststoffe am Tag, müßte der Mensch täglich 2 kg an Kohl oder Karotten verzehren (11).

Eine Möglichkeit für Untersuchungen am Menschen sind Fall-Kontroll-Studien. Hierbei werden einzelne Patienten mit Dickdarmkrebs und Kontrollpersonen, die in Alter, Geschlecht und anderem möglichst gut mit dem Patienten übereinstimmen, nach ihren Verzehrsgewohnheiten befragt. Die Befragung reicht weit in die Vergangenheit zurück, demzufolge sind die Angaben entsprechend unsicher, besonders wenn es um die Schätzung absoluter Mengen geht.

Von einer amerikanischen Arbeitsgruppe wurden 23 Fall-Studien mit über 6000 Patienten ausgewertet (12,13,14). In 9 Studien war eine deutliche, in 6 eine weniger deutliche Schutzwirkung der Ballaststoffe nachweisbar. Eine weitere Auswertung ergab, daß bei der höchsten Aufnahmemenge an Ballaststoffen das Risiko, Dickdarmkrebs zu bekommen, etwa halb so hoch war, wie bei der niedrigsten Aufnahme. Diese dosisabhängige Beziehung unterstützt die Hypothese, daß Ballaststoffe ein Schutzfaktor sind.

Trotz vieler plausibler Erklärungen und Zusammenhänge läßt sich aber nicht beweisen, daß Ballaststoffe die Bestandteile pflanzlicher Lebensmittel sind, die das

Darmkrebsrisiko vermindern. Vielleicht sind sie nur ein Faktor unter vielen oder ein Indikator für andere Pflanzeninhaltsstoffe. So lautet das magere Ergebnis einer jahrzehntelangen Tätigkeit vieler Arbeitsgruppen auf diesem Sektor der Ballaststoffforschung.

Die Ballaststoffe wurden hier als Beispiel für bioaktive Inhaltsstoffe der Nahrung ohne Nährstoffcharakter angeführt. Das Beispiel Ballaststoffe und Dickdarmkrebs macht deutlich, mit welchen Schwierigkeiten man bei der Untersuchung der neuen bioaktiven Stoffe rechnen muß, denn im Gegensatz zu den relativ harmlosen Ballaststoffen, die Stütz- und Strukturelemente pflanzlicher Zellen sind, haben viele andere bioaktive Inhaltsstoffe in der Pflanze Schutz- und Abwehrfunktionen, sie können deshalb beim Menschen nicht nur positiv, sondern auch als antinutritiv Stoffe, ja sogar toxisch wirken. Verglichen mit den Ballaststoffen, wird die Analyse z.B. der vielen phenolischen Naturstoffe mit ihren bei der Verarbeitung entstehenden Oxidations- und Polymerisationsprodukten keine leicht zu lösende Aufgabe sein.

Verbindungen mit antioxidativen Eigenschaften, die generell in viele oxidative Reaktionen im Körper eingreifen können, finden bereits seit einiger Zeit großes Interesse (15). Oxidative Vorgänge wie die Bildung von Peroxid-Radikalen und aktivem Sauerstoff können den ersten Schritt in einer Kette darstellen, an deren Ende schwere Störungen des Stoffwechsels und Beeinträchtigung der Gesundheit stehen. Als aktive Verbindungen in diesem Geschehen kommen natürlich auch einige Vitamine und Provitamine in Frage. Von der Ascorbinsäure ist bekannt, daß über die spezielle antiskorbutische Wirksamkeit hinaus (zur Verhinderung von Skorbut ist schon eine Aufnahme von 10 mg/Tag ausreichend) eine höhere Zufuhr eine positive Auswirkung auf die Gesundheit haben kann. Eine allgemein antioxidative Wirkung kann im Tierversuch demonstriert werden. Beim Meerschweinchen mit Vitamin C-freiem Futter kann das Auftreten von Vitamin C-Mangelsymptomen herausgeschoben werden, wenn das Futter nicht-antiskorbutisch wirksame Antioxidantien enthält. Durch diese Verbindungen wird der Bestand an Ascorbinsäure in den Geweben geschont und gestreckt. Von den Tocopherolen, die übrigens vor Jahren wegen ihrer Unspezifität aus der Liste der Vitamine gestrichen werden sollten, ist bekannt, daß gleichzeitig aufgenommenes

Retinol durch sie geschützt und bei der gleichen Dosis mehr Vitamin A in der Leber gespeichert wird als ohne Tocopherol. Die Austauschbarkeit von gewissen Funktionen zwischen Tocopherol und Selen ist lange bekannt. Von den Carotinoiden weiß man, daß pro-vitamin-A-wirksame und nicht-wirksame Carotinoide in vitro potente Antioxidantien sind (Abb. 2). Zu diesen Vitaminen sind nun weitere Verbindungen zu rechnen, die reine Antioxidantien ohne Vitaminwirkung sind.

**Bioaktive Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel  
mit antioxidativem Potential**

	Vitamin- Funktion	unspezifische antioxidative Wirkung
<b>Tocopherole</b>	+	+
<b>Ascorbinsäure</b>	+	+
<b>Carotinoide</b>	+	+
<b>Phenolische Verbindungen</b>	—	+
z.B. <b>Phenolsäuren</b>		
<b>Flavone</b>		
<b>Flavonoide</b>		

**Abbildung 2:** Bioaktive Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel mit antioxidativem Potential

Unter den weiteren bioaktiven Verbindungen befinden sich viele, deren Entfernung aus der Nahrung bisher als erforderlich angesehen wurde, da sie antinutritiv wirken. Einige Getreide- und Leguminosenarten enthalten Protease-Inhibitoren. Die bekanntesten sind die Kunitz- und Bowman-Birk-Inhibitoren aus der Sojabohne, die als Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitoren die Proteinverdauung beeinträchtigen. Diese Lagerproteine der Samen dienen der Pflanze nicht nur als Schutz vor Tierfraß, sie sind auch an der Abwehr von Insekten und Mikroorganismen beteiligt. Aus einer Reihe von Bakterien isolierte eiweißabbauende Enzyme (Serin- oder Metallo-Proteasen) wurden durch Zugabe dieser Inhibitoren in ihrer Aktivität gehemmt (16). Versuche an Mäusen mit

Dimethylhydrazin induzierter Carcinogenese des Colons ergaben eine vollständige Unterdrückung des Wachstums maligner Tumoren bei Gabe von Bowman-Birk-Inhibitor (17). Ähnlich angelegte Untersuchungen an Hamstern mit oraler Carcinogenese führten bei 61-86% zu einer Unterdrückung bei örtlicher Applikation des gleichen Inhibitors aus der Sojabohne (18).

Mit dem Beispiel Ballaststoffe-Dickdarmkrebs wollte ich Ihnen deutlich machen, wie der augenblickliche Stand der Forschung auf diesem Gebiet nach 25 Jahren Forschungsarbeit aussieht. Wenn man auf der einen Seite die Gruppen von Verbindungen zusammenstellt (Abb. 3), deren Bioaktivität bewiesen werden soll, mit all den Nebenaufgaben, die im Zusammenhang mit der Sicherheit der Dosis, den analytischen Problemen usw. bestehen und andererseits die vielfältigen Krankheitsgruppen anschaut, mit deren Häufigkeit ein Zusammenhang mit der Ernährung bewiesen werden soll, so läßt sich die Größe der Aufgabe abschätzen, die vor uns liegt. Wir werden weder heute noch morgen die Antworten finden, die alle Fragen beantworten.

### Bioaktive Verbindungen in Pflanzen

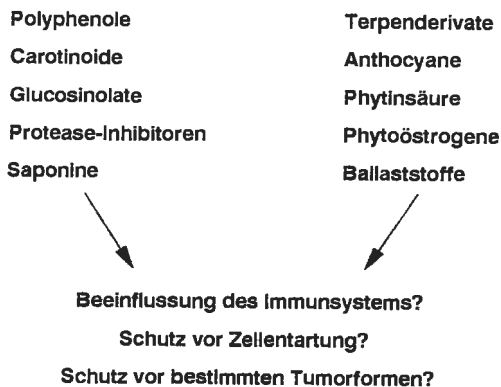


Abbildung 3: Bioaktive Verbindungen in Pflanzen

In den nachfolgenden Vorträgen werden wir die einzelnen Gruppen und ihr Vorkommen in den Lebensmitteln näher kennen lernen, so daß unsere Vorstellungen über die Verbreitung bioaktiver Substanzen verbessert werden. Das ist zunächst ein kleiner Schritt und unendlich viele solcher Schritte werden notwendig sein. Die Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung hat eine Arbeitsgruppe gegründet, die sich mit der Analytik der phenolischen bioaktiven Verbindungen beschäftigen will. Wenn ich an die Entwicklung der Analytik der Ballaststoffe denke, die von der Rohfaser über ADF und NDF hin zur brauchbaren Bestimmungsmethode für Gesamtballaststoffe geführt hat - hierfür waren Jahre erforderlich - dieses Vorgehen ist ein notwendiger Schritt in der richtigen Richtung.

### **Zusammenfassung**

Ein Zusammenhang zwischen Ernährung und Krankheit und Tod ist manchmal relativ einfach herzustellen: bei unzureichender Aufnahme von Energieträgern und/oder lebensnotwendigen Nährstoffen treten typische, biochemisch oder klinisch nachweisbare Gesundheitsstörungen auf. Es ist aber schwierig, bei genügender oder überschüssiger Energiezufuhr den Anteil der Ernährung an der Entwicklung bestimmter Krankheiten zu bestimmen, da das Geschehen sehr komplex ist. Die Höhe der Ballaststoffzufuhr auf die Krebsentstehung wird als Beispiel angeführt.

Mit den Ballaststoffen begann in der Ernährungsforschung die Zeit der bis dahin wenig beachteten, zum Teil sogar als antinutritiv bezeichneten Verbindungen, die heute im Blickpunkt des Interesses stehen. Sie wurden häufig bei der Verarbeitung der pflanzlichen Rohstoffe zu Lebensmitteln entfernt. Seit einigen Jahren weiß man, daß diese in der Pflanze zur Schutz- und Abwehrfunktion synthetisierten Stoffe auch für die Gesundheit des Menschen wichtig sind. In Anlehnung an Paracelsus gilt, daß dosisabhängig die Substanz in ihrem nutritiven oder antinutritiven (toxischen) Funktionsbereich vorliegen kann. \*

Antioxidative Eigenschaften sind von Polyphenolen oder Flavonolen und den nicht Provitamin A-wirksamen Carotinoiden bekannt und im Zusammenhang mit der Cancerogenese von Bedeutung. Außerdem wird ein anticancerogener Effekt von den in Leguminosen vorkommenden Protease-Inhibitoren, Saponinen und Inositolphosphaten (Phytat) angenommen. Einigen Substanzen wird eine Verbesserung der Immunfunktion nachgesagt. Der wissenschaftliche Nachweis einer positiven Wirkung ist nicht einfach, vielleicht sogar unmöglich, da meist mehrere Faktoren am Geschehen beteiligt sind.

## Literatur

- (1) Funk, C (1914) Die Vitamine, ihre Bedeutung für die Physiologie und die Pathologie. Wiebaden, J.F. Bergmann-Verlag.
- (2) The British Nutrition Foundation (1990) Complex Carbohydrates in Foods, London, Chapman and Hull.
- (3) Devesa, S., Silverman, P. (1978) Cancer incidents and mortality trends in the United States. *J. Natl. Cancer. Inst.* 60, 545.
- (4) Cummings, J.H., Branch, W.J. (1982) Postulated mechanisms whereby fibre may protect against large bowel cancer. In: *Dietary fiber in health and disease* (Vahouny, G.V., Kritchevsky, D., eds.) New York, Plenum Press. 313-325.
- (5) Bingham, S.A. (1990) Mechanisms and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch-polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 49, 153-171.
- (6) DeRubertis, F.R., Craven, P.A. (1987) Relationship of bile and stimulation of colonic epithelial phospholipid turnover and proliferation activity: role of activation of protein C kinase. *Prev. Med.* 16, 573-580.
- (7) DeRubertis, F.R., Craven, P.A., Salto, R. (1984) Bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation: evidence of involvement of lipoxygenase products. *J. Clin. Invest.* 74, 1614-1624.
- (8) Kruh, J. (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell. Biochem.* 42, 65-85.
- (9) Jacobs, L.R. (1990) Influence of soluble fibers on experimental colon carcinogenesis. In: *Dietary fiber. Chemistry, physiology, and health* (Kritchevsky, D., Bonfield, C., Anderson, J.W., eds.) New York, Plenum Press. 389-401.
- (10) Pilch, S. (1987) Physiological effects and health consequences of dietary fiber, Bethesda, USA. FASEB.
- (11) Wisker, E. (1994) Zusammenhang zwischen Ballaststoffzufuhr und Dickdarmkrebs? *Proc. XXIX, Vortragstagung DGQ, Quedlinburg*, 217-234.
- (12) Trock, B., Lanza, E., Greenwald, P. (1990) Dietary fiber, vegetables, and colon cancer. Critical review and meta-analysis of the epidemiologic evidence. *J. Natl. Canc. Inst.* 82, 650-661.
- (13) Mc Keown-Eyssen, G.E., Bright-See, E. (1985) Dietary factors in colon cancer: International relationships. An update. *Nutr. Cancer* 7, 251-253.
- (14) Greenwald, P., Lanza, E., Eddy, G.A. ((1987) Dietary fiber in the reduction of colon cancer risk. *J. Am. Diet. Ass.* 87, 1178-1188.
- (15) Haslam, E. (1981) Vegetable tannins. In: *The biochemistry of plants*, Vol. 7 (Stumpf, P.K., Conn, E.E. eds.) Academic Press, London. 527-556.
- (16) Kennedy, A.R. (1995) The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutr.* 125 (Suppl) 733S-743S.
- (17) Witschi, H., Kennedy, A.R. (1989) Modulation of lung cancer development in mice with the soybean-derived Bowman-Rirk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 10, 2275-2277.
- (18) Kennedy, A.R. (1993) Overview: Anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents.* (Troll, W. Kennedy A.R. eds.) New York, Plenum Press. 9-64.



## Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse

*Elisabeth Wisker*

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrechts-Universität Kiel

Carotinoide sind die am weitesten verbreiteten Farbstoffe in der Natur. Von einer isoprenoiden Grundstruktur leiten sich durch Hydrierung, Dehydrierung bzw. Oxidation und durch Cyclisierung verschiedene Verbindungen ab. Sie werden in 2 Hauptgruppen unterteilt, in die Carotine und die Xanthophylle. Carotine sind reine Kohlenwasserstoffverbindungen, Xanthophylle enthalten auch Sauerstoff (Abb. 1).

Pflanzen enthalten normalerweise komplex zusammengesetzte Carotinoidgemische. Zu den in Gemüse mengenmäßig vorherrschenden Carotinen gehören  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin sowie Lycopin, bei den Xanthophyllen überwiegt Lutein. In grünem Gemüse liegt Lutein in höheren Konzentrationen vor als  $\beta$ -Carotin. In Karotten dominieren  $\beta$ - und  $\alpha$ -Carotin, Tomaten enthalten vor allem Lycopin. Innerhalb der einzelnen Gemüsearten gibt es große, meist sortenbedingte Unterschiede im Gehalt der einzelnen Carotinoide (Tab. 1).

Die am längsten bekannte und vielleicht wichtigste Wirkung der Carotinoide ist, daß aus den Verbindungen, die einen  $\beta$ -Iononring besitzen (z.B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin), vom menschlichen Organismus enzymatisch Vitamin A gebildet werden kann. Dies geschieht größtenteils bereits in den Zellen der Dünndarmschleimhaut. Vitamin-A-wirksame Carotine haben vor allem für die Menschen eine große Bedeutung, die sich überwiegend von pflanzlichen Lebensmitteln ernähren. Weltweit gesehen werden schätzungsweise 60%, in Entwicklungsländern mehr als 80% des Vitamin A-Bedarfs über Carotine gedeckt.

Carotinoide werden vom Menschen aber auch intakt resorbiert, im Blut an Lipoproteine gebunden transportiert (Mathews-Roth a. Gulbrandsen 1974; Johnson

a. Russell 1992) und in verschiedenen Körpergeweben abgelagert (Parker 1989). Abhängig vom Verzehrsmuster kommen im Plasma die einzelnen Carotinoide in unterschiedlichen Verhältnissen vor (Brady et al. 1996).

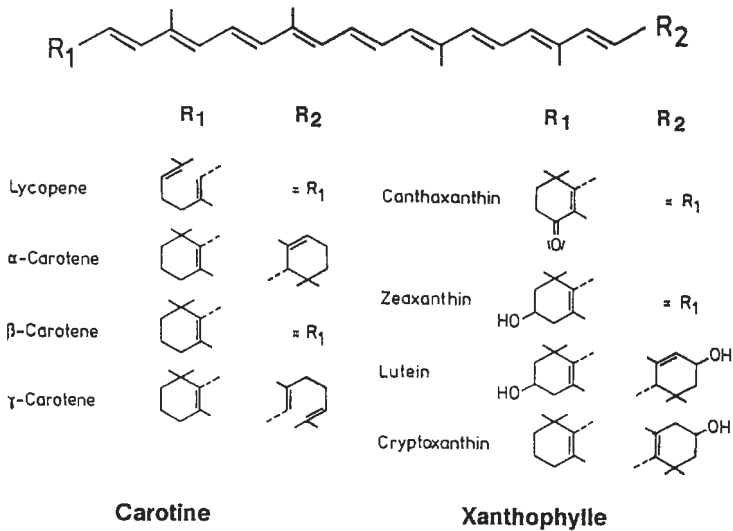


Abbildung 1: Formeln wichtiger Carotinoide

Tabelle 1: Carotinoidgehalte in rohem Gemüse (mg/100 g)

Gemüse	α-Carotin	β-Carotin	Lycopin	Lutein
Karotten	0.5-20.6	6.6-28.2		0.2- 0.6
Grünkohl		5.1-14.6		39.6
Spinat		1.5- 8.9		4.2-15.9
Broccoli		0.5- 2.3		1.8- 2.8
Rosenkohl		0.4-0.7		0.9- 1.6
Tomate		0.5- 0.7	3.1-6.7	

(Bushway 1986; Granado et al. 1992; Heinonen 1990; Heinonen et al. 1989; Khachik et al. 1986; Simon a. Wolff 1987)

In den letzten Jahren werden auch mögliche Wirkungen von Carotinoiden

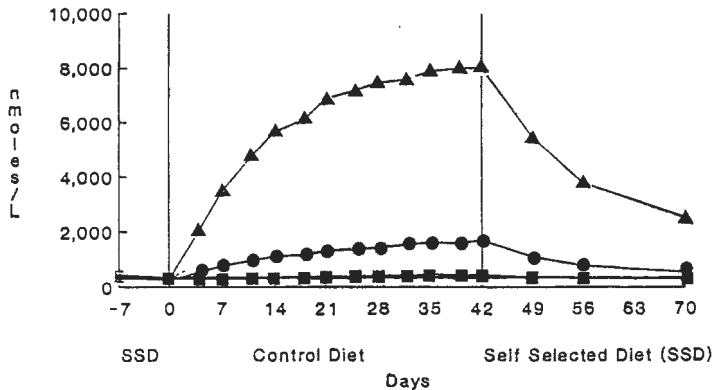
diskutiert, die nicht im Zusammenhang mit der Provitamin A-Funktion stehen. In zahlreichen epidemiologischen Untersuchungen zeigte sich, daß ein hoher Verzehr bestimmter Gemüse mit einem geringeren Risiko korreliert, an einigen Krebsformen, z.B. Lungenkrebs, zu erkranken (Ziegler 1991). Ähnliche Beziehungen wurden auch für arteriosklerotische Erkrankungen gefunden (Gey et al. 1993; Riemersma et al. 1991). Von den Inhaltsstoffen der Gemüse, die mit einer protektiven Wirkung in Verbindung gebracht werden, standen lange Zeit die Carotinoide im Vordergrund, vor allem  $\beta$ -Carotin (Connet et al. 1989; Peto et al. 1981).

Ausgehend von diesen epidemiologischen Studien und von Tierversuchen, in denen  $\beta$ -Carotin vor der Ausbildung von experimentell erzeugten Tumoren schützte (Epstein 1977; Mathews-Roth 1982), wurden Interventionsstudien angelegt, in denen untersucht werden sollte, ob sich durch gezielte Gabe von reinem  $\beta$ -Carotin die Häufigkeit z.B. von Lungenkrebs vermindern läßt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, soweit sie bisher vorliegen, zeigen allerdings, daß die Einnahme von reinem  $\beta$ -Carotin in hohen Dosen nicht den gewünschten Effekt hatte und z.T. sogar mit einem höheren Krebsrisiko korrelierte (ATBC 1994). Was im Vorfeld bzw. parallel zu diesen Studien relativ gut untersucht wurde, ist die Bioverfügbarkeit von reinem  $\beta$ -Carotin. Als Maß für die Bioverfügbarkeit wurde in den meisten Studien die Carotinplasmakonzentration gemessen, ein Parameter, der von der Höhe der Resorption abhängt und relativ einfach zu messen ist.

Im Gegensatz zu reinem  $\beta$ -Carotin ist über die Verfügbarkeit von Carotinoiden aus pflanzlichen Lebensmitteln, d.h. aus Gemüse und Obst, immer noch relativ wenig bekannt. Gemüse, in geringerem Maß auch Obst, sind aber die eigentlichen Quellen für die Carotinoidversorgung, wobei andere Carotinoide als  $\beta$ -Carotin oft eine größere Rolle spielen. Um ausreichende Plasmawerte an  $\beta$ -Carotin aufrecht zu erhalten, sieht die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (1991) eine Aufnahme von 2 mg  $\beta$ -Carotin pro Tag als notwendig an.

In der Höhe der Resorption scheinen sich Reinsubstanzen und in der Pflanzenzelle vorliegende Carotinoide zu unterscheiden. Pharmazeutische Präparate enthalten

Carotinoide normalerweise in reiner Form in Gelatinekapseln, die nach ihrer Auflösung im Verdauungstrakt ihren Inhalt freigeben. Bei Gemüse müssen die Carotinoide aus den Pflanzenzellen freigesetzt werden, ein Prozeß, der offenbar nicht so leicht abläuft. Das ist sicher ein Grund, warum unter sonst gleichen Bedingungen Carotinoide aus Gemüse schlechter resorbiert werden, d.h. eine geringere Wirkung auf die Plasmaspiegel haben als die entsprechenden Reinsubstanzen.



- ▲ Supplement: 30 mg  $\beta$ -Carotin/Tag
- 272 g Karotten: 29 mg  $\beta$ -Carotin/Tag
- 300 g Broccoli: 3 mg  $\beta$ -Carotin/Tag

**Abbildung 2:**  $\beta$ -Carotinkonzentration im Plasma nach Aufnahme von reinem  $\beta$ -Carotin, Karotten und Broccoli (modifiziert nach Micozzi et al. 1992)

Abb. 2 zeigt einen Vergleich der Serumspiegel nach der Aufnahme von 30 mg  $\beta$ -Carotin pro Tag für 6 Wochen aus einem pharmazeutischen Präparat oder von fast der gleichen Menge (29 mg) aus gekochten Karotten. Außerdem wurde die Wirkung von 3 mg  $\beta$ -Carotin aus Broccoli untersucht. Alle übrigen Ernährungsbedingungen waren gleich und streng kontrolliert (Micozzi et al. 1992). Bei gleicher Höhe der Carotinaufnahme wurden mit Karotten nur 18 % der Plasmakonzentrationen erreicht, die mit reinem  $\beta$ -Carotin gemessen wurden. Die geringere Aufnahme in Form von Broccoli, die mit 3 mg/Tag immerhin höher war als die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlene Zufuhr (DGE

1991), führte nicht zu einer Erhöhung der Plasmaspiegel.

**Tabelle 2:** Einfluß des Verzehrs von Gemüse auf die  $\beta$ -Carotinkonzentration im Plasma

Gemüse(produkt)	$\beta$ -Carotin- aufnahme (mg/Tag)	Dauer (Tage)	$\beta$ -Carotin- plasma- konzentration	Lit.
Karottensaft (450 ml/Tag)	n.b.	7	steigt	1
Karottensaft (zwischen 30 und 60 ml/Tag)	1.2 - 2.4	14	sinkt	2
Karotten (geraspelt) (zwischen 30 und 150 g/Tag)	1.7 - 8.4	14	sinkt	2
Spinat (gekocht) (150 g; 280 g/Tag)	6.4; 12.7	14	steigt	2

1: Kim et al. 1988; 2: Hussein a. El-Tohamy 1990

Die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse sind z.T. widersprüchlich. Untersucht wurden vor allem die Gemüse, die relativ viel  $\beta$ -Carotin enthalten (Karotten und Spinat). Tab. 2 zeigt die Ergebnisse von Studien zur Wirkung von Gemüse auf die Höhe der  $\beta$ -Carotinplasmaspiegel. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Verfügbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse auch nicht-dosisabhängigen Einflüssen unterliegt. Zu diesen Einflüssen gehören individuelle Unterschiede in der Höhe der Resorption, die Verarbeitung von Gemüse und der Fettgehalt der Begleitkost. Die Reihenfolge dieser Faktoren bedeutet keine Gewichtung.

### Individuelle Unterschiede

Wenn verschiedene Personen unter gleichen Ernährungsbedingungen die gleiche Menge an Carotinoiden aufnehmen, auch die gleiche Menge pro kg Körpergewicht, dann zeigen sich z.T. große Unterschiede in der Höhe der Plasmaspiegel. Das gilt sowohl für isolierte Verbindungen als auch für Carotinoide aus Lebensmitteln (Dimitrov et al. 1988; Micozzi et al. 1992; Stahl a. Sies 1992). In Bezug auf die Carotinoïdresorption scheint es Low- und High-Responder zu geben (Johnson a. Russell 1992; Stich et al. 1986). Welche Faktoren für diese Unterschiede verantwortlich sind, ist nicht sicher bekannt. Diskutiert wird, daß Low-Responder  $\beta$ -Carotin besonders effizient in der Dünndarmschleimhaut zu Vitamin A umwandeln (Vliet et al. 1995). Das kann aber nicht der einzige Grund sein, denn es

gibt auch sehr große individuelle Unterschiede in der Resorption von Carotinoiden ohne Vitamin A-Wirksamkeit (Stahl a. Sies 1992).

## Verarbeitung von Gemüse

### Erhitzen

Die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden kann durch die Verarbeitung, die die meisten Gemüse vor dem Verzehr erfahren, beeinflusst werden. Gemüse werden zerkleinert, mit verschiedenen Verfahren erhitzt, tiefgefroren, und bis zu diesen Maßnahmen oft auch noch gelagert. Jeder dieser Schritte kann sich zumindest theoretisch auf die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Carotinoide und damit möglicherweise auch auf ihre Bioverfügbarkeit auswirken. Carotinoide aus rohem Gemüse sollen schlecht resorbierbar sein, mildes Erhitzen soll dagegen die Bioverfügbarkeit verbessern (Van Zeben a. Hendriks 1948).

**Tabelle 3:**

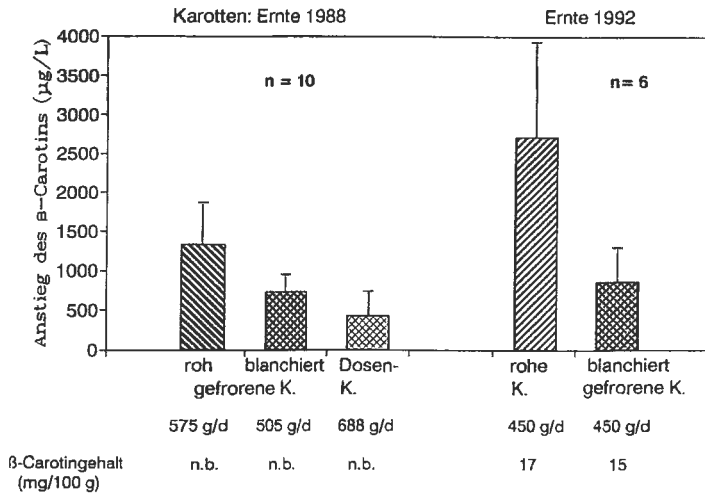
Einfluß des Erhitzens von Gemüse auf den Gehalt an Carotinoiden (mg/100 g eßbare Ware)

Gemüse	Hitze- behandlung	β-Carotin	Lutein	Lit.
Karotten	roh	6.6		1
	gekocht (33 min)	8.2		1
	roh	8.1		2
	blanchiert (Dampf)	8.2		2
	blanchiert (Wasser)	5.3		2
Grünkohl	roh	14.6	39.6	3
	gekocht	12.6	25.6	3
Spinat	roh	3.3	4.2	1
	gekocht	4.6	6.4	1
	roh	8.9	9.5	4
	gedämpft (5 min)	9.9	10.5	4
	Mikrowelle	9.1	8.7	4

1: Granado et al. 1992; 2: Dietz et al. 1988; 3: Micozzi et al. 1990; 4: Khachik et al. 1992

Erhitzen kann zumindest den analytisch erfaßbaren Gehalt an Carotinoiden beeinflussen (Tab. 3). Aus rohem Gemüse scheinen Carotinoide oft schlechter extrahierbar zu sein als aus erhitztem Gemüse. Viele Carotinoide sind in der Pflanze an Proteine gebunden (Dietz Bryant et al. 1992). Durch Erhitzen können diese Bindungen zerstört und die Zellwände aufgebrochen werden, was möglicherweise die chemische Extraktion verbessert. Die Wirkung des Erhitzens

auf die Carotinoidgehalte scheint aber nicht einheitlich zu sein; Erhitzen kann sowohl zu einer Erhöhung als auch zu einer Verminderung der Gehalte führen. Die Ursachen für diese Diskrepanzen sind schwer zu erklären. Eindeutig scheint aber zu sein, daß längeres bzw. intensiveres Erhitzen, wie z.B. Autoklavieren, zu Carotinoidealverlusten führt, die vor allem auf einer oxidativen Zerstörung der Carotinoide beruhen (Ogunlesi a. Lee 1979).



**Abbildung 3:** Anstieg der  $\beta$ -Carotinkonzentration im Plasma nach dem Verzehr unterschiedlich verarbeiteter Karotten (Wisker, Schweizer, Guigoz, Feldheim, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Es gibt nur wenige Untersuchungen zu der Frage, wie sich die Verarbeitung von Gemüse auf die Bioverfügbarkeit der Carotinoide beim Menschen auswirkt. Nur erhitzter Tomatensaft führte zu einem Anstieg der Lycopinkonzentration im Plasma, nicht erhitzter Saft hatte keinen Effekt (Stahl a. Sies 1992). Aus rohem Spinat wurden 45%, aus gekochtem 58% des  $\beta$ -Carotins resorbiert; aus rohen Karotten waren 1%, aus gekochten 19% des  $\beta$ -Carotins verfügbar (Erikson a. Hoygaard 1941). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Erhitzen die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden verbessert. In einer neueren Untersuchung wurde gefunden, daß nach dem Verzehr von rohen oder roh-gefrorenen Karotten

die  $\beta$ -Carotinplasmaspiegel stärker anstiegen als nach der Aufnahme von blanchiert-gefrorenen Karotten und Dosenkarotten (Abb. 3) (Wisker, Schweizer, Guigoz, Feldheim, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die Verzehrsmenge an Karotten in dieser Studie war unterschiedlich und so bemessen, daß sie jeweils 15g Ballaststoffe lieferten. Die blanchiert-gefrorenen Karotten schienen  $\beta$ -Carotin in einer Form zu enthalten, die schlechter verfügbar war als die in rohen Karotten.

**Tabelle 4:** Einfluß der Verarbeitung von Gemüse auf den Gehalt an geometrischen Isomeren von Carotinoiden

		Lutein		$\beta$ -Carotin		Lit
		all-trans	cis	all-trans	cis	
		% des Gesamtgehalts				
Spinat	roh	85	15			1
	gedämpft (5min)	86	14			
	Mikrowelle	84	16			
Broccoli	roh	85	15			
	gedämpft	87	13			
	Mikrowelle	85	15			
Karotten	roh			100	0	2
	autoklaviert (Dosen)			73	27	
Süßkartoffeln	roh			95	5	3
	blanchiert (2 min)			92	8	
	blanchiert (10 min)			85	15	
	autoklaviert			83	17	

1: Khachik et al. 1992; 2: ;3: Chandler a. Schwartz 1987; 1988

Carotinoide können infolge ihrer Doppelbindungen in mehreren isomeren Formen vorkommen. Tab. 4 zeigt den Einfluß der Verarbeitung von Gemüse auf die geometrischen Isomere von Lutein und  $\beta$ -Carotin. Lutein ist sehr stabil gegenüber hitzebedingten Isomerisierungen, bei  $\beta$ -Carotin erhöht sich dagegen der Anteil an cis-Formen mit dem Erhitzen. Die geometrische Form der Carotinoide scheint ihre Resorption zu beeinflussen, und zwar unterschiedlich für einzelne Carotinoide. Die cis-Isomere von Lycopin in erhitztem Tomatensaft wurden etwas besser resorbiert als all-trans-Lycopin. Im Plasma befanden sich dann entsprechend hohe Anteile an cis-Formen (Stahl a. Sies 1992). Beim  $\beta$ -Carotin dagegen scheint fast nur die all-trans-Form resorbiert zu werden. Im Plasma kommt fast ausschließlich all-trans- $\beta$ -



Carotin vor, auch wenn relativ hohe Anteile an cis-Isomeren zugeführt werden (Jensen et al. 1987; Stahl et al. 1993; 1995). Denkbar wäre auch eine Isomerisierung von cis-Formen in den Zellen der Dünndarmschleimhaut oder die bevorzugte Umwandlung von cis-Formen z.B. zu cis-Retinsäure. Hierfür gibt es aber keine Beweise. Wenn eine Hitzebehandlung zu Isomerisierungen von  $\beta$ -Carotin führt, ist die Resorption wahrscheinlich vermindert. Das ist möglicherweise die Erklärung dafür, daß in der Studie von Wisker, Schweizer, Guigoz & Feldheim (nicht veröffentlichte Ergebnisse) die blanchiert-gefrorenen Karotten zu niedrigeren  $\beta$ -Carotinplasmaspiegeln führte als die rohen bzw. roh-gefrorenen Karotten.

### *Partikelgröße*

Intakte Zellwände sollen die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Lebensmitteln beeinflussen. Die mechanische Zerstörung der Zellwände, z.B. durch Homogenisieren, soll die Bioverfügbarkeit, insbesondere die von  $\beta$ -Carotin aus Karotten, verbessern. Dafür sprechen die Ergebnisse zweier älterer Arbeiten (Van Zeben 1946; Van Zeben a. Hendriks 1948). In einer jüngeren Untersuchung spielte es keine Rolle für die Bioverfügbarkeit von  $\beta$ -Carotin aus rohen Karotten, ob sie als Würfel oder fein geraspelt verzehrt wurden. Bei blanchiert-gefrorenen, gewürfelten Karotten dagegen wurden nur 70% der  $\beta$ -Carotinplasmasiegel erreicht, die bei den gleichen Karotten in geraspelter Form gefunden wurden (Wisker, Schweizer, Guigoz, Feldheim, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die rohen Karotten, die in dieser Studie verzehrt wurden, waren sehr hart und wurden vor dem Abschlucken wahrscheinlich durch intensives Kauen so fein zerkleinert, daß im Mund die gleiche Partikelgröße erreicht wurde wie bei den geraspelten Karotten. Die blanchiert-gefrorenen Karotten dagegen hatte durch die Hitzeeinwirkung strukturelle Veränderungen der Zellwände erfahren und waren hierdurch wesentlich weicher. Das kann dazu geführt haben, daß sie weniger intensiv gekaut wurden. Diese Ergebnisse schließen nicht aus, daß die Partikelgröße die Carotinoidresorption beeinflusst; für die Zerkleinerung scheint aber gründliches Kauen zu genügen.

## **Fett**

Der Faktor, der von seiten der Nahrung den größten Einfluß auf die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden hat, ist Fett. Carotinoide sind fettlösliche Verbindungen, deren Resorption an die gleichzeitige Anwesenheit von Fett und an eine intakte Fettverdauung gebunden ist. Nach Gabe von reinem  $\beta$ -Carotin war der Anstieg der Carotinspiegel bei fettreicher Kost wesentlich höher als bei fettarmer Kost (Dimitrov et al. 1988). Das gleiche gilt natürlich auch für Carotinoide aus Gemüse. Gemüse wird meistens in Form von Mahlzeiten gegessen, die Fett enthalten. Insofern kann man davon ausgehen, daß zumindest bei westeuropäischen Ernährungsgewohnheiten ausreichende Mengen an Fett für die Resorption zur Verfügung stehen. Eine Ausnahme ist vielleicht die rohe Karotte, die zwischen- durch gegessen wird und deren Carotin dann u.U. wirklich nicht resorbiert wird.

## **Schlußfolgerungen**

Die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse hängt von vielen Faktoren ab. Verarbeitungsbedingte Einflüsse wie Veränderungen der Carotinoidgehalte und Isomerisierungen wirken sich auf die Resorption verschiedener Carotinoide unterschiedlich aus, sind aber auch für eine gegebene Verbindung, z.B.  $\beta$ -Carotin, nicht einheitlich. Hinzu kommt der Einfluß der Zusammensetzung der übrigen Kost, die mit den Carotinoiden aufgenommen wird. Das komplexe Zusammenwirken dieser einzelnen Faktoren macht es beim gegenwärtigen Kenntnisstand schwer, allgemeingültige Aussagen über die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Lebensmitteln zu treffen. Empfehlungen für die wünschenswerte Höhe der Zufuhr sind daher mit großen Unsicherheiten behaftet.

## **Literatur**

- ATBC (The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group) (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* 330: 1029-1035
- Brady, W.E., Mares-Perlman, J.A., Bowen, P. & Stacewicz-Sapuntzakis, M. (1996). Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors. *J. Nutr.* 126: 129-137
- Bushway, R.J. (1986). Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 409-412
- Chandler, L.A. & Schwartz, S. (1987). HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh

- and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 52: 669-672
- Chandler, L.A. & Schwartz, S. (1988). Isomerization and losses of trans- $\beta$ -carotene in sweet potatoes as affected by processing treatments. *J. Agric. Food Chem.* 36: 129-133
- Connet, J.E., Kuller, L.H., Kjelsberg, M.O., Polk, B.F. et al. (1989). Relationship between carotenoids and cancer. *Cancer* 64: 126-134
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung. (1991). Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr. 5. Überarbeitung; Frankfurt: Umschau-Verlag
- Dietz Bryant, J.M., McCord, J.D., Knight Unlu, L. & Erdman, J.W. Jr. (1992). Isolation and partial characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene-containing carotenoprotein from carrot (*Daucus carota* L.) root chromoplasts. *J. Agric. Food Chem.* 40: 545-549
- Dietz, J.M., Sri Kantha, S. & Erdman, J.W. Jr. (1988). Reversed phase HPLC analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene from selected raw and cooked vegetables. *Plant Foods Hum. Nutr.* 38: 333-341
- Dimitrov, N.V., Meyer, C., Ullrey, D.E., Chenoweth, W., Michelakis, A., Malone, W. & Boone, C. (1988). Bioavailability of  $\beta$ -carotene in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 298-304
- Epstein, J.H. (1977). The effects of beta-carotene on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin. *Phytochem. Photobiol.* 25: 211-213
- Gey, K.F., Stähelin, H.B. & Eichholzer, M. (1993). Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke: Basel Prospective Study. *Clin. Investig.* 71: 3-6
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. & Rojas-Hidalgo, E. (1992). Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2135-2140
- Heinonen, M.I. (1990). Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. *Agric. Food Chem.* 38: 609-612
- Heinonen, M.I., Ollilainen, V., Linkola, E.K., Varo, P.T. & Koivistoinen, P.E. (1989). Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37: 655-659
- Hussein, L. & El-Tohamy, M. (1990). Vitamin A potency of carrot and spinach carotenes in human metabolic studies. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 60: 229-235
- Jensen, C.D., Howes, T.W., Spiller, G.A., Pattison, T.S., Whittam, J.H. & Scala, J. (1987). Observations on the effects of ingesting cis- and trans-beta-carotene isomers on human serum concentrations. *Nutr. Rep. Internat.* 35: 413-422
- Johnson, E.J. & Russell, R.M. (1992). Distribution of orally administered  $\beta$ -carotene among lipoproteins in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56: 128-135
- Khachik, F., Goli, M.B., Beecher, G.R., Holden, J., Lusby, W.R., Tenorio, M.D. & Barrera, M.R. (1992). Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40: 390-398
- Kim (Jun), H., Simpson, K.L. & Gerber, L.E. (1988). Serum carotenoids and retinol of human subjects consuming carrot juice. *Nutr. Res.* 8: 1119-1127
- Mathews-Roth, M.M. (1982). Anti-tumor activity of beta-carotene, canthaxanthene and phytoene. *Oncology* 39: 33-37
- Mathews-Roth, M.M. & Gulbrandsen, C.L. (1974). Ztransport of beta-carotene in serum of individuals with carotenemia. *Clin. Chem.* 20: 1578-1579

- Micozzi, M.S., Beecher, G.R., Taylor, P.R., Khachik, F. (1990). Carotenoid analyses of selected raw and cooked foods associated with a lower risk for cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 282-285
- Micozzi, M.S., Brown, E.D., Edwards, B.K., Bieri, J.G., Taylor, P.R., Khachik, F., Beecher, R. & Smith, C.J. Jr. (1992). Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and  $\beta$ -carotene supplements in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 1120-1125
- Ogunlesi, A.T. & Lee, C. Y. (1979). Effect of thermal processing on the stereoisomerisation of major carotenoids and vitamin A value of carrots. *Food Chem.* 4: 311-318
- Parker, R.S. (1989). Carotenoids in human blood and tissues. *J. Nutr.* 119: 101-104
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. & Sporn, M.B. (1981). Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 290: 201-208
- Riemersma, R.A., Wood, D.A., Macintyre, C.C.A., Elton, R.A., Gey, K.F. & Oliver, M.F. (1991). Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet* 337: 1
- Simon, P.W. & Wolff, X.Y. (1987). Carotenes in typical and dark orange carrots. *J. Agric. Food Chem.* 35: 1017-1022
- Stahl, W. & Sies, H. (1992). Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J. Nutr.* 122: 2161-2166
- Stahl, W., Schwarz, W. & Sies, H. (1993). Human serum concentrations of all-trans  $\beta$ - and  $\alpha$ -carotene but not 9-cis  $\beta$ -carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). *J. Nutr.* 123: 847- 851
- Stahl, W., Schwarz, W., von Laar, J. & Sies, H. (1995). All-trans  $\beta$ -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cis geometrical isomer. *J. Nutr.* 125: 2128-2133
- Stich, H.F., Hornby, A.P., Dunn, B.P. (1986). Beta-carotene levels in exfoliated mucosa cells of population groups at low and elevated risk for oral cancer. *Int. J. Cancer* 37: 389-393
- Van Zeben, W. (1946). The absorption of carotene by man. *Int. Z. Vit. forsch.* 17: 74-84
- Van Zeben, W. & Hendriks, T.F. (1948). The absorption of carotene from cooked carrots. *Int. Z. Vit.forsch.* 19: 265-266
- Van Vliet, T., Schreurs, W.H.P. & Van den Berg, H. (1995). Intestinal  $\beta$ -carotene absorption and cleavage in men: response of  $\beta$ -carotene and retinyl esters in the triglyceride-rich lipoprotein fraction after a single oral dose of  $\beta$ -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 110-116
- Ziegler, R.G. (1991). Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 251S-259S



## Carotenoid Content and Composition of Carrot Cultivated in Heavy-Metal Polluted Soils

*Péter A. BIACS, Hussein G. DAOOD, \*Imre KÁDÁR*

Central Food Research Institute (KÉKI), Budapest, Hungary

\*Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, (MTA TAKI), Budapest, Hungary

### **Introduction**

The cycle of element in nature is limited on earth and life has adapted itself to it. The more mobile (partly harmful/toxic) fractions have disappeared from the soil, the concentration of undesired element both in the soil solution and in natural waters is low. This situation may change drastically when the content of available harmful element in soil is increased by some orders of magnitude in urban-industrial areas, or through adding to the soils sewage sludges with a high metal content. Composition and quality of the soils may be transferred and, as a consequence of this, a qualitative change may occur in the plant (growing of these soils) and in the organs of animals (eating up the plants by grazing or foraging). Soil contamination by toxic/harmful metals represent one form of chemical load on the environment, and its exerts numerous sanitary, economic and ecological after-effects.

Like all terrestrial animal, man is also dependent on food derived from the soil. Human metabolism is based on an enzyme systems which enable man to use up the essential elements (Fe, Mo, Cu, etc.), and to eliminate the toxic/harmful ones (As, Be, Cd, Hg, etc.). In an evolution sense, however, human organs are unprepared for the adaptation to the chemical load of the environment. The accumulating

harmful elements are rather stable and may cause irreversible changes. According to literature data (Purves, 1985, Fergusson, 1991), the concentration of some heavy metals have increased by orders of magnitude in the blood, urine, hair and other tissues of urban population.

Harmful elements can indirectly influence man's health by causing undesired changes on the vital micro- and macro-nutrients which should be available in the diet in a certain biological, active structures. Of these nutrients, carotenoids have aroused greater interest lately in connection with their provitamin A activity and, more recently, their anti-cancer effects (Moon and Micozzi, 1988). Therefore, it became increasingly important to investigate the carotenoid content and composition of plant products cultivated under different environmental conditions including soil pollution by different metals.

### Materials and methods

The soil of the experimental station (Nagyhörcsök-Hungary) is a calcareous loamy chernozem with about 25 % clay, developed on loess. In its ploughed layer it contains humus and  $\text{CaCO}_3$  in about 3 %, and 5 % respectively. To ensure a sufficient macro-nutrient supply in the hole experiment, 100 kg/ha N,  $\text{P}_2\text{O}_5$  and  $\text{K}_2\text{O}$  are given yearly. The 13 selected micro elements were applied to the soil in 1991 on 4 levels, and the  $13 \times 4 = 52$  treatments arranged in a split-plot design with 2 replications. Each plot has an area of 21 m<sup>2</sup>. Carrot was grown in the first experimental year with commonly used agrotechniques.

The seeds of carrot (var. vörös óriás) were planted in April 1992 with 2-3 cm depth, 36 cm between rows and 10 cm between plants distance. The cultivation depended on the rainfall which was under 500 mm in the growing season of 1992. Treatments and chemicals used in this study are summarised in Table 1. The plants were harvested by a plot combine-harvest between 6 and 8 of October 1992.

Soil and plant samples were taken to make composite samples consisting of 20 sub samples. Twenty plants were used to represent a composite sample per a plot.

Plant samples were digested in teflon bombs using cc.  $\text{HNO}_3$ , and their total element content was determined, while soil samples were extracted by  $\text{NH}_4\text{-Ac+EDTA}$  (Lakanen and Erviö 1971) and their available element content was measured by using the ICP technique.

Carotenoid extract of carrot roots was prepared by disintegrating 5 g samples of healthy roots in crucible mortar with quartz sand. The pigments were extracted by shaking the diced samples with 50 ml acetone for 15 min. The mixture was then filtered through filter paper and the residues were re-extracted twice with 50 ml acetone until permanent pale yellow colour remained on the residues. The acetone fractions were collected and the solvent was evaporated under vacuum by using rotatory evaporator. To the remaining liquor 10 ml of NaCl-saturated bidistilled water and 80 ml of 1:1 diethyl ether-benzene were added. The mixture was mixed thoroughly in a separatory funnel. The organic layer was separated, washed twice with water and dried on anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was then evaporated and the residues were re dissolved in 2 ml chloroform. The volume was brought to 10 ml with the HPLC eluent.

HPLC condition and procedure applied for analysis of the individual carotenoids were previously reported (Daood et al., 1989). Standard  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lutein were used

for the qualitative and quantitative analysis. Identification of carotenoids was based on comparison of spectral characteristics and retention times of the unknowns with those of the standard materials. Spectral characteristics were studied by using photodiode-array detector under the control of a chromatographic soft-ware.

**Tab. 1:** Treatments in the field experiment (Calcareous chernozem)

Sign of the elements	Treatment kg/ha. spring 1992					Chemicals used
	0	1	2	3	4'	
Mo	0	-	90	270	810	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$
Se	-	30	90	270	810	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$
Zn	0	-	90	270	810	$\text{ZnSO}_4$
Cr	0	-	90	270	810	$\text{K}_2\text{CrO}_4$
Cr+Se*	-	-	90	270	810	

Note: Basal dressing in the whole experiment was 100 kg/ha N,  $\text{P}_2\text{O}_5$  and  $\text{K}_2\text{O}$

\* the dose fixed represent the amount of each element

## Results and discussion

### Element uptake by carrot

As shown in Table 2 availability of different elements increased as the dose of treatment was raised up to 810 kg/ha. This of course, affects the element stress in the soil matrix around the roots and eventually increases uptake of each elements by the growing roots. Element availability in soil was in the order of  $\text{Zn} > \text{Mo} > \text{Se} > \text{Cr}$ . Of the applied elements Cr, Mo and Se were proved to be phytotoxic for the young plants with Cr, alone or with Se, being the most harmful one. It was remarkable that although small amounts of Cr were taken up by the roots, carrot plants died out at a treatment of 90 kg/ha, particularly when Cr was added together with Se. The high toxicity of this treatment manifested itself in the early appearance of necrosis and other toxicity symptoms on plants leaves.

Table 3. shows the available element content of carrot roots and leaves. As a consequence of element load in soil the Mo, Se and Zn content of both roots and leaves increased significantly. Maximum concentrations of 99.0, 62.9 and 34.3

mg/kg were estimated for Mo, Se and Zn respectively in the roots of treated plants. These levels are enough high to make the product absolutely unsafe for human and animal nutrition and to initial undesirable alterations in the physiological order of the agricultural products.

**Tab. 2:** Available element content (ppm) of the soils prior to harvest of carrot

Applied elements	Treatment doses kg/ha				
	0	30	90	270	810
Mo	1	NI	12	26	104
Se	0	2.5	7	22	122
Zn	2	NI	14	54	153
Cr	0	NI	2	6	30
Cr+Se	NI	NI	ND	ND	ND

NI: not included in the study; ND: not determined

**Tab. 3:** Available element content of roots and leaves of carrot plants grown in element-loaded soil (Treatments 1992)

Elements	0	1	2	3	4	LSD 5%	Mean	C.V.
Roots								
Mo	2.9	-	20.6	54.5	99.3	54.0*	44.3	38.3
Se	-	0.6	16.1	32.8	62.9	6.8**	37.2	4.3
Zn	18.2	-	19.5	23.3	34.3	10.1*	23.8	19.7
Cr	0.0	-	0.2	#	#	0.9NS	0.1	96.7
Cr+Se <sup>a</sup>	0.0	-	1.8	#	#	-	-	-
Leaves								
Mo	6.7	-	116.7	269.5	434.0	168.7*	206.7	25.7
Se	-	1.2	24.1	38.2	64.1	14.8*	42.2	8.2
Zn	31.8	-	26.8	30.5	83.3	71.5NS	43.1	52.2
Cr	0.8	-	3.9	#	#	5.8*	2.4	19.0
Cr+Se <sup>a</sup>	-	-	2.2	#	#	-	-	-

#, the plant died out; <sup>a</sup>, the values represent concentration of only Cr; NS, not significant



### Changes in the root yield

The different elements showed different effect on the yield of carrot. Data in Table 4. implied that Mo, Se and Zn treatments increased the yield when applied up to 270 kg/ha. With the highest dose. Se was extremely detrimental while Mo and Zn were of slight effect on the yield. These result indicated that carrot plants are capable to metabolise considerable amounts of Mo and Zn.

**Tab. 4:** Production of carrot as influenced by element treatments (1992)

Elements	0	1	2	3	4	LSD 5%	Mean
				Roots			
Mo	11.44	-	15.97	14.17	13.08		13.67
Se	-	12.76	13.94	14.42	7.22		12.08
Zn	11.91	-	14.30	16.02	15.55	3.36*	14.44
Cr	12.96	-	7.07	#	#		10.01
Cr+Se	-	-	17.63	#	#		17.63
LSD 5%				3.86*			2.77+

#, The plants died out

### Changes in the carotenoid content

Because of their increasing importance in human nutrition and diseases prevention, carotenoids aroused much interest in this work. As shown in Fig. 1 Mo treatment of 90 kg/ha increased carotenoid content of carrot roots from 96 to 110 µg/g edible portion. Further supplementation of soil with Mo resulted in a significant decrease in the carotenoid content. Similar trend of change was observed for the individual carotenoids indicating that Mo load in soil disturbs the whole pathway of carotenoid biosynthesis. Unlikely, Zn treatment increased the total carotenoid content of the roots even at the highest level of load (Fig. 2). The highest accumulation of Zn in soil and roots gave rise to an alteration in the ratio of alpha/beta form of carotene in favour of the former. Furthermore, slight decrease in β-carotene content was recorded in samples from the highest load treatment. Activation of some isomerases by high load of Zn is the probable cause of such a

type of chemical alteration.

By similar way Se influenced carotenoid content and composition of carrot roots. The only difference between Zn and Se in their effect on carotenoid formation was that the latter promoted alpha to beta conversion at lower level of element load in soil (270 kg/ha). Shown in Fig. 3 is the HPLC separation of carotenoids of carrot extracts. Despite the highly toxic effect of Se treatment on carrot plants, it promoted carotenoid formation in the roots, particularly, at the lower doses. It was found that no significant change took place in the carotenoid content of the survival roots, but the ratio of alpha/beta carotene has substantially increased (Fig. 4). Like  $\alpha$ -carotene, lutein di-hydroxy  $\alpha$ -carotene) tended to increase proportionally to the increasing element dose indicating the activation of isomerization reactions, which are catalyzed by element-dependent enzymic proteins.

The obviously mentioned changes are undesired from the nutritional point of view since  $\alpha$ -carotene has lower pro vitamin A activity than  $\beta$ -carotene of which one molecule provides two units of vitamin A after oxidation in the liver.

It is to be mentioned that samples from Cr and Cr+Se treatments were not available for chemical analysis due to the early death of plants. Therefore data on the effects of Cr on the carotenoid content of carrot are not found in the discussion.

As a conclusion, element load in soil, as a result of pollution even with essential ones, can unfavourably affect on production and chemical composition of our plant foods. Harmful accumulation of micro elements could be observed in the roots as well as in the vegetative parts. In accordance with an earlier investigation (Kádár, 1991), mainly the tuber and rooty crops, the leafy vegetables, and the fodder plants are endangered by the contaminants originating from traffic, industry and densely polluted urban areas.

## References

- Daood H.G. - Czinkotai B. - Hoschke Á. - Biacs P.: HPLC of chlorophylls and carotenoids from vegetables. *J. Chromatogr.* (1989) 472 293-302.
- Fergusson, J.E.: *The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects.* Pergamon Press. Oxford (1991).
- Kádár, I.: *Heavy metal content in soils and crops in Hungary. - környezet és természetvédelmi kutatások.* Akaprint. Budapest (1991).
- Lakanen, E. - Erviö, R.: A comparison of eight extractants for the determination of plant available micro nutrients in soil. *Acta Agr. Fenn.* (1971) 123. 223-232.

Moon, T.E. - Micozzi, M.S.: Nutrition and cancer prevention: Investigating the role of micro nutrients. Marcel Dekker . New York (1988).

Pais, I.: Criteria of essentiality, beneficiality and toxicity. What is too little and too much? In: Cycling of nutritive elements in Geo- and biosphere (Pais I. ed.) 59-77. Proc. IGBP Budapest (1991).

Purves; D.: Trace element contamination of the environment. Elsevier. Amsterdam (1985).

**Fig. 1:** Changes in the lutein,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and total carotenoid content of carrot roots as a function of Mo-treatment

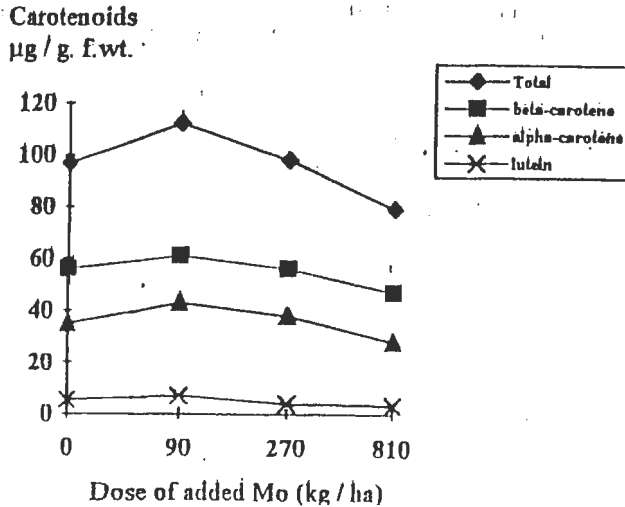
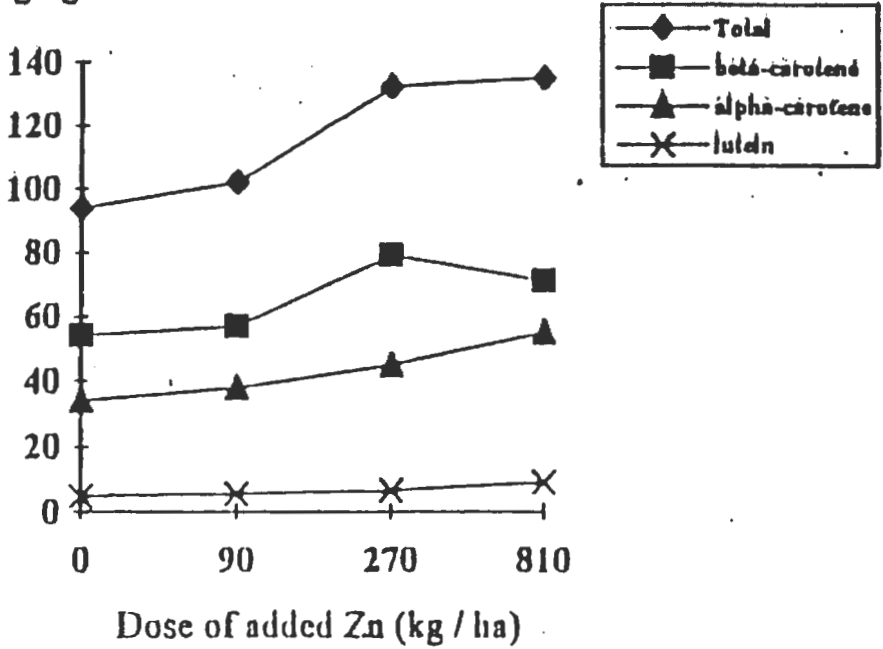


Fig. 2: Changes in the lutein,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and total carotenoid content of carrot roots as a function of Zn-treatment

**Carotenoids**  
 $\mu\text{g} / \text{g. f.wt.}$



**Fig. 3:** HPLC-profile of carotenoid extracts from Se-treated carrot plants

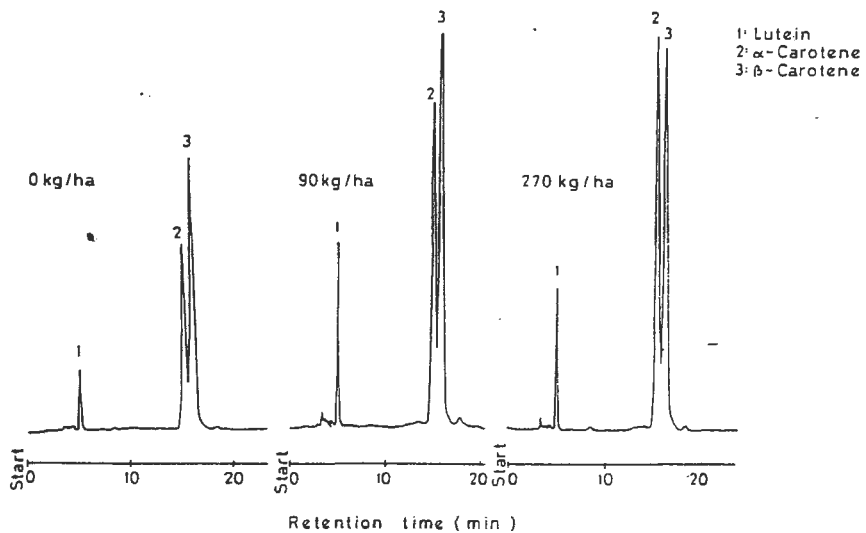
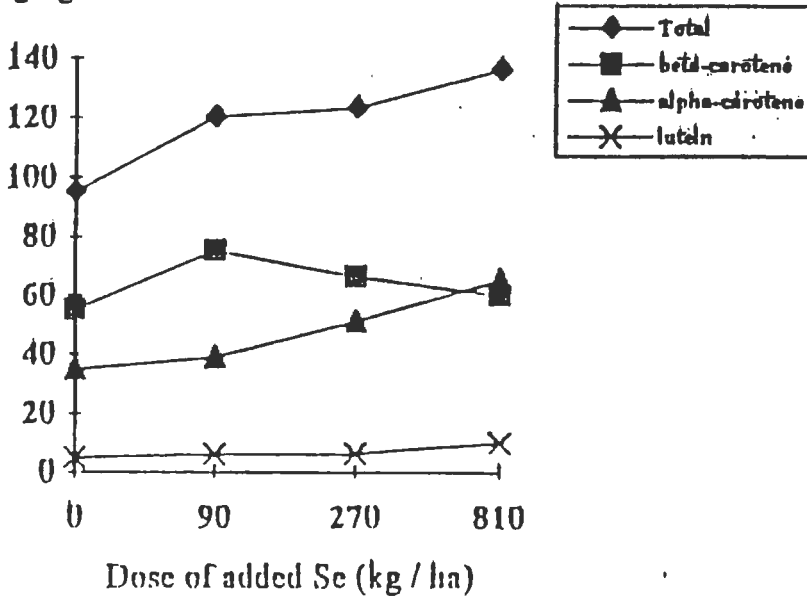


Fig. 4: Changes in the lutein,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and total carotenoid content of carrot roots as a function of Se-treatment

Carotenoids  
 $\mu\text{g} / \text{g. f.wt.}$



## Carotinoide in Brokkoli und ihre Variabilität in Abhängigkeit von Sorte und Anbauzeitraum

*Ilona Schonhof und Angelika Krumbain*

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Großbeeren/Erfurt e.V.,  
Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Großbeeren

### **EINLEITUNG**

Brokkoli ist ein Gemüse mit steigender Nachfrage bei den Verbrauchern. Ursache für die zunehmende Beliebtheit ist außer dem Geschmack der ernährungsphysiologische Wert mit unter anderem hohem Carotinoidgehalt. Die Carotinoide in Brokkoli bestehen zu etwa 60 % aus  $\beta$ -Carotin und Lutein (GROSS 1991). Außer der Provitamin A-Aktivität von  $\beta$ -Carotin werden beide Carotinoide auch als potente Antioxidantien bei einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen, an denen freie Radikale beteiligt sein können, eingeschätzt. Die Gehalte dieser Carotinoide variieren bei Brokkoli beträchtlich (HERMANN 1993). Deshalb sollte geklärt werden, ob die  $\beta$ -Carotin- und Luteingehalte durch die Sorten, die verschiedenen Typen zuzuordnen sind, und durch den Anbauzeitraum beeinflusst werden.

### **Material und Methoden**

Zum Einfluß der Sorte wurde 1994 ein Feldversuch mit acht Sorten durchgeführt. Die Sorten gehörten drei verschiedenen Brokkolitypen an:

1. kräftig grüner Speartyp mit den Sorten 'Emperor', 'Delicia', 'Barbados' und 'Claudia'
2. graugrüner Crowntyp mit den Sorten 'Marathon' und 'Lord'
3. violetter Typ mit den Sorten 'Viola' und 'Violett Queen'

Der Einfluß des Anbauzeitraumes wurde 1994 mit fünf und 1995 mit drei Anbauterminen im Frühjahr, Sommer und Herbst mit jeweils einer Sorte der drei Brokkolitypen geprüft.

Die Carotinoideanalyse erfolgte - je Sorte und Anbauzeitraum von drei pflanzenbau-lichen Wiederholungen - aus jeweils einer Mischprobe mit fünf Köpfen. Die Köpfe wurden in Röschen (Blütenknospen und zweite Verzweigung) sowie Stiel (Hauptstiel und erste Stielverzweigung) zerlegt. Die Proben wurden getrennt analysiert.

Die Bestimmung der Carotinoide wurde mit einer HPLC-Methode mit UV-VIS Detektion an einer RP-18 Phase (Lichrosphere 100, Fa. Merck) mit einem ternären isokratischen Eluenten aus

Acetonitril/Methanol/Dichlormethan (75 : 15 : 10) durch-geführt (KRUMBEIN 1996).

## **Ergebnisse**

### *Verteilung der Carotinoide im Brokkolikopf*

Die Analysen zeigten, daß beide Carotinoide im Brokkolikopf unterschiedlich verteilt sind. In den Röschen waren die Gehalte an  $\beta$ -Carotin und Lutein signifikant höher als in den Stielen mit sehr geringen Gehalten. Das Verhältnis betrug bei den Inhaltsstoffen 1 : 0,15 (Abb. 1, Abb. 2). Die Sorte und der Anbauzeitraum beein-flußten dieses Verhältnis nicht. Deshalb wurden bei weiteren Untersuchung nur die Röschen betrachtet.

### *Einfluß der Sorte auf den Carotinoidgehalt*

Die Gehalte an  $\beta$ -Carotin bewegten sich je nach Sorte zwischen 0,4 und 1,5 mg/100 g FM, die des Luteins zwischen 0,6 und 1,9 mg/100 g FM. Es wurde festgestellt, daß sich die jeweiligen Gehalte der Sorten, die zu einem Typ gehören, nicht unterschieden. Zwischen den Brokkolitypen bestanden signifikante Unterschiede. Der kräftig grüne Speartyp enthielt über 200 %  $\beta$ -Carotin und 175 % Lutein mehr als der violette Typ (Abb. 3). Diese Relation wurde zu jeder Jahreszeit gefunden.

### *Einfluß des Anbauzeitraumes auf den Carotinoidgehalt von Brokkoli*

Die Gehalte an  $\beta$ -Carotin und Lutein variierten im Jahresverlauf je nach Brokkolityp zwischen 0,40 und 1,53 mg/100 g FM  $\beta$ -Carotin sowie 0,58 und 2,20 mg/100 g FM Lutein. ie Veränderungen der Carotinoidgehalte wurden durch die Witterung und dabei vorrangig durch die Tagesmitteltemperatur im Zeitraum Pflanzung bis Ernte hervorgerufen. Niedrige Tagesmitteltemperaturen von 12 ° bis 16 °C führten zu hohen Carotinoidgehalten. Mit einem Anstieg der Tagesmitteltemperaturen um 4 bis 5 K reduzierten sich die Gehalte bei  $\beta$ -Carotin je nach Brokkolityp um 30 bis 60 % (Abb. 4). Gleiches traf für Lutein zu.

## **Zusammenfassung**

Sorten verschiedener Brokkolitypen unterscheiden sich in ihren Gehalten an  $\beta$ -Carotin und Lutein. Hohe Gehalte an  $\beta$ -Carotin und Lutein erreicht man durch



den Anbau von Sorten des Spertyps bei niedrigen Tagesmitteltemperaturen zwischen 12 ° und 16 °C.

### Literatur

- Gross, J. 1991: Pigments in Vegetables, Chlorophylls and Carotenoids. Van Nostrand Reinhold, New York  
 Hermann, K. 1993: Carotinoide in Obst und GemüÙe. Ernährungsumschau 40, 6, 253-258  
 Krumbein, A. 1996: Schnelle HPLC-Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle. Tagungsband XXX. Vortragstagung, DGQ, Kiel

Abb. 1: Prozentualer Anteil von Lutein in Röschen und Stielen bei acht Brokkolisorten

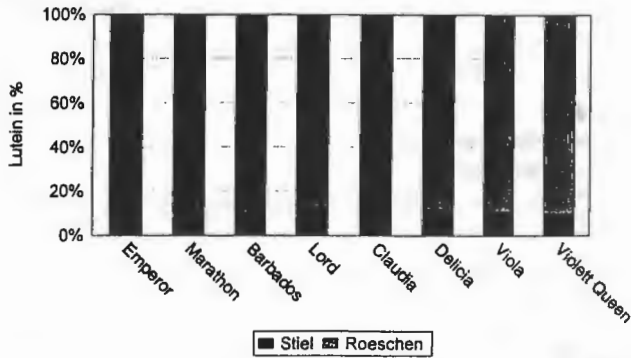


Abb. 2: Prozentualer Anteil von  $\beta$ -Carotin in Röschen und Stielen bei acht Brokkolisorten

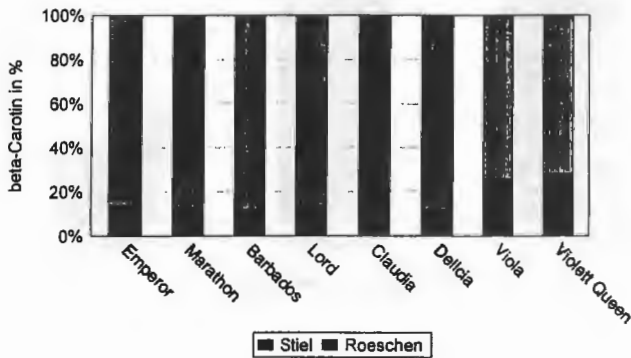


Abb. 3: Gehalt an Lutein und  $\beta$ -Carotin in den Röschen bei drei Brokkolitypen im Mittel der Sorten

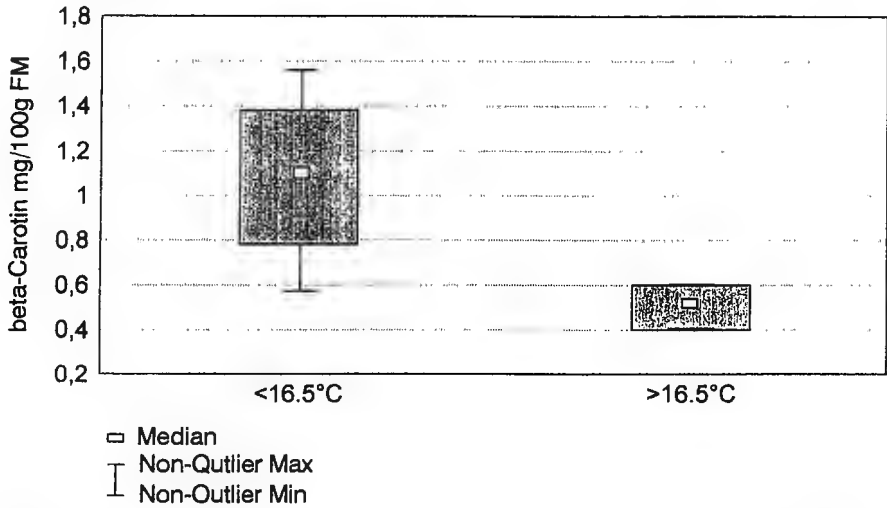
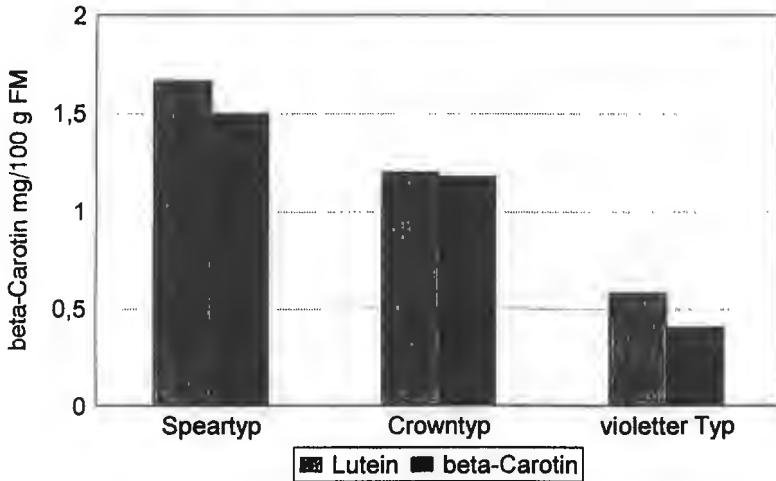


Abb. 4:  $\beta$ -Carotin-Gehalt der Sorte 'Emperor' bei unterschiedlichen Tagesmitteltemperaturen





## Schnelle HPLC-Methode zur Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle in Brokkoli

*Angelika Krumbein*

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Großbeeren/Erfurt e.V.,  
Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Großbeeren

Lutein und  $\beta$ -Carotin als Hauptcarotinoide in Brokkoli sind auf Grund ihrer antikanzerogenen Wirkung wichtige Inhaltsstoffe in Brokkoli. Als Farbstoffe interessieren Chlorophyll a und Chlorophyll b, die für die Beschreibung des Erntezeitpunktes eine wichtige Rolle spielen. Die beschriebenen HPLC-Methoden sind meist sehr arbeitsaufwendig in der Probenvorbereitung (Bushway 1986), führen zu einer Zerstörung der Chlorophylle bei Verseifung der Proben nach der Extraktion (Zakaria und Simson 1979, Heinonen et al. 1989) und erfordern bei Gradientenelution eine Gleichgewichtseinstellung der Säule (Khachik et al. 1986). Ziel dieser Arbeit war es, eine schnelle HPLC-Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Lutein,  $\beta$ -Carotin, Chlorophyll a und b mit einer einfachen Probenvorbereitung und einer einfachen isokratischen Elution der Inhaltsstoffe zu erarbeiten.

### **Material und Methoden**

#### **Probenvorbereitung**

Es zeigte sich, daß als einfacher Probenvorbereitungsschritt die Homogenisation und mehrmalige Extraktion mit Aceton ausreichte: 15 g Brokkolimischprobe wurde nach Zugabe von einer Spatelspitze Calciumcarbonat, 30 g Natriumsulfat und 30 ml Aceton 2 Minuten homogenisiert und filtriert. Das Extrahieren des Rückstandes mit Aceton wurde bis zum Erhalt eines weißen Homogenisats wiederholt. Nach Mikrofiltration wurden die Proben direkt mit der HPLC analysiert. Die Überführung der Extrakte in eine Petrolether-Phase verbunden mit einem Eindampfen der Proben brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

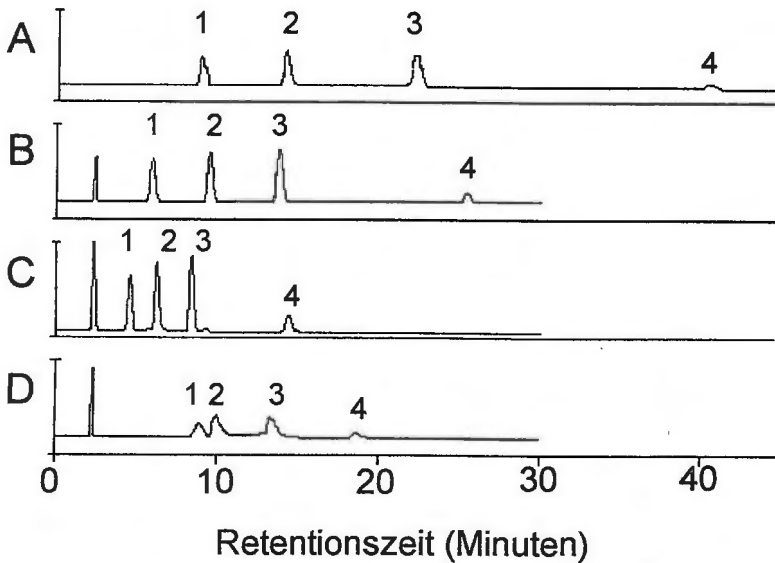
#### **HPLC-Bestimmung**

Eingesetzt wurde eine HPLC-Anlage der Firma Merck mit HPLC Pumpe 62000, variablem UV-VIS-Detektor L 4250, automatischem Probengeber Modell AS-2000 und der HPLC-Manager-Software D-6000. Als Säule wurde die RP-18 Phase Lichrosphere 100 (5µm, 250 x 4 mm) der Firma Merck in Verbindung mit einer Vorsäule gleichen Materials verwendet. Es wurde mit einem isokratischen ternären Eluent aus Acetonitril/Methanol/Dichlormethan (75:15:10), einer Flußrate von 1,0 ml/min und einem Probenvolumen von 20 µl gearbeitet.

### Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von Untersuchungen von Nelis und Leenhar (1983) zur Carotinoidbestimmung wurde ein Eluent aus Acetonitril/Methanol/Dichlormethan mit unterschiedlicher prozentualer Zusammensetzung getestet (Abb. 1).

**Abb. 1:** Einfluß der Eluentenzusammensetzung auf die HPLC-Bestimmung von Carotinoiden und Chlorophyll  
1, Lutein; 2, Chlorophyll b; 3, Chlorophyll a; 4, β-Carotin;  
Eluenten: Acetonitril:Methanol:Dichlormethan, 85:10:5 (A), 75:15:10 (B), 70:10:20 (C), 85:0:15 (D)



Mit steigender Dichlormethan-Konzentration von 5% auf 20% (Eluenten A bis C) verringerte sich die Retentionszeit von β-Carotin als zuletzt eluierende Substanz von 40,4 Minuten auf 14,4

Minuten. Aufgrund zusätzlicher Xanthophyllpeaks in Brokkoli wurde Eluent B mit Acetonitril(Methanol/Dichlormethan (75:15:10) für alle weiteren Untersuchungen gewählt. Der binäre Eluent ohne Methanol (Eluent D) führte zu unsymmetrischen Peaks. Aus den UV-VIS Spektren der Substanzen im verwendeten Eluent B wurden Wellenlängen der maximalen Absorption für Lutein von 448 nm, für Chlorophyll b von 464, für Chlorophyll a von 432 nm und für  $\beta$ -Carotin von 455 nm erhalten und zur HPLC-Analyse eingestellt. Für diese Analysenbedingungen betrug die kleinste bestimmbare Konzentration für Lutein  $0,005 \pm 0,0006$  mg/100ml, für  $\beta$ -Carotin  $0,005 \pm 0,0004$  mg/100ml, für Chlorophyll a  $0,005 \pm 0,001$  mg/100ml und für Chlorophyll b  $0,005 \pm 0,0006$  mg/100ml. Es lassen sich damit im Brokkoli Gehalte von 0,06 mg/100 g Frischmasse für die einzelnen Substanzen nachweisen.

**Abb. 2:** Chromatogramm von Brokkoli

1, Lutein; 2, Chlorophyll b; 3, Chlorophyll a; 4,  $\beta$ -Carotin;  
Eluent B, Acetonitril:Methanol:Dichlormethan (75:15:10)

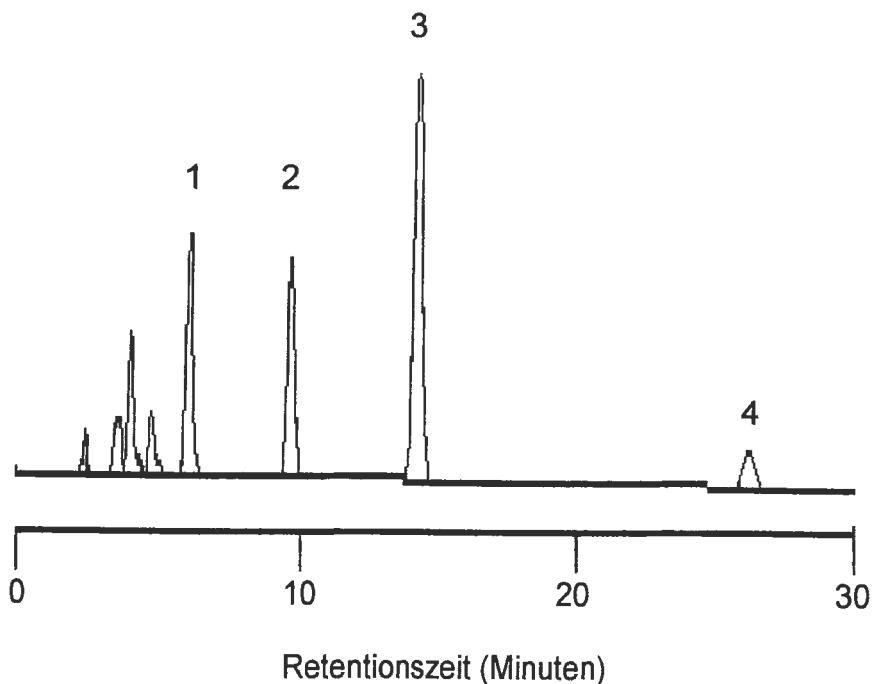


Abb. 2 zeigt ein typisches Chromatogramm der Analyse von Brokkoli. Nach Khachik et al. (1986) eluieren vor Lutein andere Xanthophylle wie z.B. Neoxanthin, Violaxanthin und Luteinopoxid, die nicht weiter bestimmt wurden. Die Wiederfindungsrate von Lutein betrug 104%, von  $\beta$ -Carotin 90%, von Chlorophyll a und Chlorophyll b jeweils 96%. Der Variationskoeffizient der chemischen Analyse (10 Messungen aus einer Einwaage) war 0,3% für Lutein, 0,8% für  $\beta$ -Carotin, 0,4% für Chlorophyll a und 1,9% für Chlorophyll b. Aufgrund der Heterogenität des Probenmaterials erhöhte sich der Variationskoeffizient der Gesamtanalyse (10 Einwaagen aus einer Mischprobe) auf 6,9% für Lutein, 8,0% für  $\beta$ -Carotin 7,8% für Chlorophyll a und 7,2% für Chlorophyll b.

Die vorgestellte Methode zeichnet sich durch eine einfache Probenvorbereitung, gleichzeitige Bestimmung von Lutein,  $\beta$ -Carotin, Chlorophyll a und b in einer Analysenzeit von 30 Minuten, gute Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit und eine geringe Nachweisgrenze aus, und ist damit gut für Routineanalysen geeignet.

## Literatur

- Bushway, R.J. 1986: Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in some raw fruits and vegetables by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 34, 409-412
- Heinonen, M.J.; V. Ollilainen; E.K. Linkola; P.T. Varo und P.E. Koivistoinen 1989: Carotenoids in finnish foods: vegetables, fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37, 655-659.
- Khachik, F.; G.R. Becher; N.F. Whittaker 1996: Separation, identification and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34, 603-616
- Nelis, H.J.C.F. und A.P. de Leenheer 1983: Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Anal. Chem.* 55, 270-275
- Zakaria, M. und K. Simpson 1979: Use of reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitaminA carotenes in tomatoes. *J. Chromatogr.* 176, 109-117



## Saponins - Biological Properties and Content in Different Plants.

*Gunilla Önning*

Department of Applied Nutrition and Food Chemistry, Lund University, Lund, Sweden.

### **Saponins in different plants**

Saponins are glycosides with triterpenoid or steroidal aglycones (Price et al. 1987). Monodesmosidic saponins have one sugar residue bound to the aglycone and bisdesmosidic saponins have two sugar residues bound at different positions of the aglycone. The sugar units could be pentoses, hexoses or uronic acids. In a plant both monodesmosidic and bisdesmosidic forms seems to exist. The dominating aglycones found so far have triterpenoid structures. The name saponins reflect one of the saponin properties, the ability to form stable foams in water solution. Other properties, that some but not all saponins have, are bitterness, membranolytic activity and cholesterol-binding capacity.

Saponins occur in a wide variety of plants where they are supposed to have antibiotic effects. For example, soybeans, alfalfa, chick peas, spinach, peanuts, asparagus, garlic and oats contain saponins. The saponin content in some food plants are presented in Table 1. Several different methods have been used for analysis of saponins. Chromatographic methods developed recently determines the content more specifically, than methods that measure the saponins ability to foam or to lyse erythrocytes. The saponins that have been studied most extensively are the one from soya and ginseng. Soya contain triterpenoid saponins, one group with soya sapogenol A as aglycon and one group with DDMP-conjugated soya sapogenol B as aglycon (Kudou et al. 1993). The

**Table 1.** *Saponin content in some food plants*

Plant	Content (%, dry weight)	Method	Reference
Soya	0.47	HPLC	Ireland <i>et al.</i> 1986
	0.44	TLC	Curl <i>et al.</i> 1985
	0.41	GC	Curl <i>et al.</i> 1985
Alfalfa	1.49	HPLC	Nowacka & Oleszek, 1994
Green pea	0.19	GC	Price <i>et al.</i> 1986
Lentils	0.11	GC	Price <i>et al.</i> 1986
Quinoa (different varieties)	0.62-2.37	TLC	Ng <i>et al.</i> 1994
Oats	0.10	TLC	Fenwick & Oakenfull, 1983
	0.05	HPLC	Önning <i>et al.</i> 1993

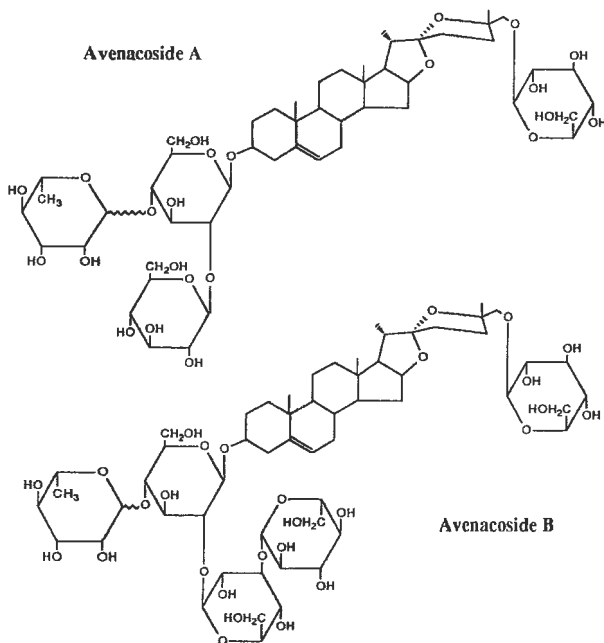
amount of saponins in soya is about 0.5% of the dry weight. Alfalfa also have triterpenoid saponins and the content in some varieties are high, about 1.5% (Nowacka & Oleszek 1994). Quinoa is a crop that has been grown in South America for centuries. Due to its high nutritional value the interest for this plant has increased in Europe. Saponins in quinoa have a triterpenoid aglycone and sugars are arabinose, galactose and glucose (Mizui *et al.* 1988; Ridout *et al.* 1991). The saponin content can be quite high (about 2%) and before the seeds can be used as food they are polished and soaked.

Oat kernels contain steroidal saponins named avenacosides (Tschesche & Schmidt 1966). The saponins are bisdesmosidic and sugars in the chains are glucose and rhamnose (Figure 1). The B-form contains one extra glucose.

We have analysed 16 oat cultivars for saponin content (Önning *et al.* 1993). Fourteen of these were grown in Sweden and two in New Zealand. We found a large variation in content, from 0.02 to 0.05% of the dry matter. The one that were grown in New Zealand contained lesser amounts than the varieties grown in Sweden. The content could be influenced by growing conditions but genetic factors are probably also important. We have also investigated where in the oat kernel the saponins are located (Önning *et al.* 1993). Oat kernels were milled and separated into fractions according to the particle size. The meal fractions with the smallest particle sizes had a higher saponin content than the fractions with coarser



particles. This indicates that the saponins are concentrated in the inner part of the kernel. A somewhat surprising result if the saponins should protect against attacks from bacteria and fungi.



**Figure 1.** *Avenacoside A and B*

### **Biological effects**

Saponins are often described as toxic compounds due the fact that they are haemolytic. Fed in high oral doses to rats (300 mg/kg body weight), they give diarrhoea, restlessness and histopathological changes (congestion, vacuolation, hypertrophy, necrosis) in liver and kidney, ultimately leading to death. A reduced growth has been observed in animals fed saponin-rich diets. The growth-inhibiting effects could in part be due to the bitter taste of the saponins that can lead to a decreased feed intake.

The structure of the saponins have influence on the physiological effects. It was

believed that saponins with several sugar chains had less biological effects than saponins with one sugar chain (Price et al. 1987). However, the biological activity also depends on the structure of the aglycone and on the spherical orientation of the chains. Thus, bisdesmosidic saponins from alfalfa have a lower activity against the fungus *Trichoderma viride* and have also a lower haemolytic activity than monodesmosidic alfalfa saponins, but the effects on the intestinal mucosa are similar (Oleszek 1990 a, b, Oleszek et al. 1992, Oleszek 1994).

Saponins in normal doses are probably not absorbed in mammals, but they might affect the absorption of other nutrients in the gut. Saponins are able to bind cholesterol *in vitro*, and *in vivo* studies have shown that some saponins have cholesterol lowering effects in rats, gerbils, hamster, chicken and man (Price et al. 1987). Oats have cholesterol lowering effects. These effects are related primarily to the soluble part of dietary fibre, the beta-glucans. We have investigated if the oat saponins also can be involved (Önning & Asp 1995). Rats were given oats with different saponin content: negligible (ethanol extracted oats), normal (unextracted oats) and twice normal (ethanol extracted oats + saponins). Control groups were given guar gum and cellulose. All diets had a dietary fibre content of 6.5% and a relatively high fat content. To increase the serum lipid levels cholesterol (0.5 %) was also added. After the feeding period of three weeks, blood and liver were collected and analysed for lipid content.

The results are presented in table 2. Total serum cholesterol did not differ between the oat groups. The fraction of cholesterol in HDL was lower for the cellulose group and for this group the liver cholesterol content was twice compared with the other groups. The amount of liver lipids was highest for the cellulose group, followed by the groups given oats with negligible saponin content and oats with a normal content. The lowest values was found in the groups given oats with added avenacosides and guar gum. Out from this study, the avenacosides seem to have only a minor effect on the lipid metabolism. The saponin levels in the diets were realistic compared with those found normally in oats. Earlier studies that have shown cholesterol lowering effects of saponins have used diets with much higher levels of saponins.

**Table 2.** Lipid values for the rats after the feeding period. Presented values are mean values for eight rats except for the group fed oats with 0.100% saponins that were five.

Diet	Plasma cholesterol, mmol/l	HDL cholesterol, mmol/l	Liver cholesterol, mg/g wet tissue	Liver lipids, mg/g wet tissue
Oats, 0% sap.	2.1	1.3	11.5	146
Oats, 0.049% sap.	2.1	1.2	12.3	150
Oats, 0.100% sap.	2.1	1.1	11.7	101 <sup>†</sup>
Cellulose	2.0	0.9 <sup>†</sup>	25.8 <sup>*</sup>	163
Guar gum	2.5 <sup>*</sup>	1.3	13.0	99 <sup>†</sup>

sap. = avenacoside A and B

\*= sign. higher (P<0.05), †= sign. lower (P<0.05)

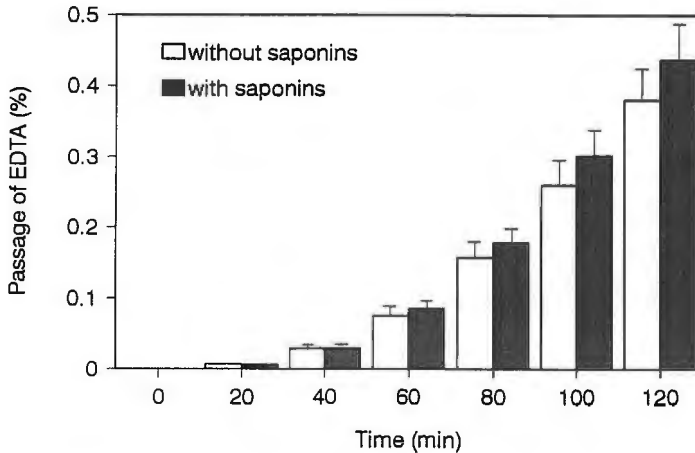
Minerals and vitamins can probably also form complexes with saponins. For example, iron absorption is inhibited in rats fed saponin rich diets (Southon et al. 1988) and in chicken the absorption of vitamin A and E is reduced when the animals are given diets containing saponins (Jenkins & Atwal 1994).

Saponins can also combine irreversibly with plasma membranes and thereby increase the permeability of cells. In the intestine, this could lead to an enhanced uptake of compounds. Saponins can also induce morphological changes in the intestine like increased villus and crypt lengths (Gee & Johnson 1988).

The avenacosides are membranolytic and we have studied if they also could affect the intestinal permeability. Small intestine were isolated from rats and mounted in Ussing chambers. A solution containing EDTA and ovalbumin were added to the mucosal compartment. In half of the chambers avenacosides were also added and the passage of the compounds to the serosal side was studied during 120 minutes.

The passage of EDTA is presented in figure 2. EDTA probably passes paracellularly via the tight junctions. In the presence of saponins there were no effects on this passage in the beginning of the time interval while there is an indication of an increased permeability after 100 minutes. There was a prominent effect on the permeability for ovalbumin when saponins were added. The passage in the distal part of the small intestine is presented in figure 3. Larger proteins have

been shown to pass both transcellularly and by endocytosis and paracellularly. An increased permeability to proteins can eventually lead to an allergic reaction. Increased sensitisation to food allergens in rats, probably due to an enhanced uptake of antigens, has been demonstrated (Atkinson et al. 1994).

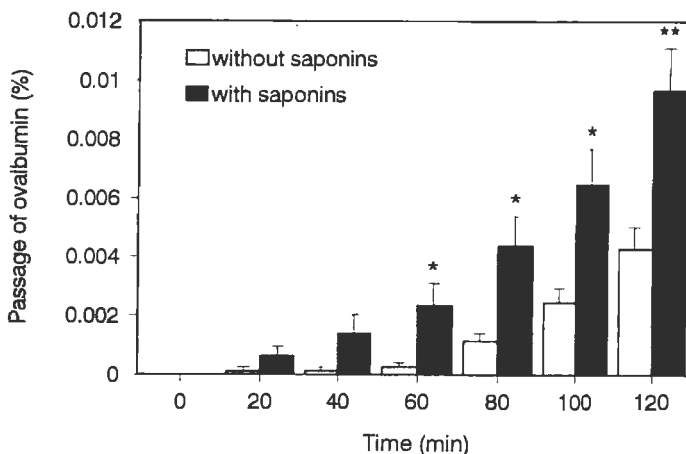


**Figure 2** *Passage (mean  $\pm$ SE) of EDTA from the mucosal to the serosal side of proximal rat intestine (n=11).*

### Concluding remarks

Our work have been focused on oat saponins in normal concentrations that are found in foods. The conclusion from our studies is that the avenacosides have a low biological activity and there are no reason for limiting the intake of oats due to the saponins.

The overall nutritional importance of reducing the saponin content in foods is an open question since saponins can have both positive (cholesterol binding capacity) and negative (increased intestinal permeability) effects. Further studies are needed to give a better understanding of the saponins.



**Figure 3.** Passage (mean  $\pm$ SE) of ovalbumin from the mucosal to the serosal side of distal rat intestine ( $n=8$ )

## Literature

- Atkinson, H.A.C., Grigoriadou, F. & Miller, K. (1994) Enhancement of oral sensitisation to food allergens by the bioactive plant constituent *Gypsophila* saponin in the brown Norway rat. *Biochemical biomarkers in environmental toxicology*, abstract booklet, University of Cambridge, Cambridge.
- Curl, C.L., Price, K.R. & Fenwick, G.R. (1985) The quantitative estimation of saponin in pea (*Pisum sativum* L.) and soya (*Glycine max*). *Food Chemistry* 18:241-250.
- Fenwick, D.E. & Oakenfull, D. (1983) Saponin content of food plants and some prepared foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34:186-191.
- Gee, J.M. & Johnson, I.T. (1988) Interactions between hemolytic saponins, bile salts and small intestinal mucosa in the rat. *Journal of Nutrition* 118:1391-1397.
- Ireland, P.A., Dziedzic, S.Z. & Kearsley, M.W. (1986) Saponin content of soya and some commercial soya products by means of high-performance liquid chromatography of the saponin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37:694-698.
- Jenkins, K.J. & Atwal, A.S. (1994) Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. *Journal of Nutritional Biochemistry* 5:134-137.
- Kudou, S., Tonomura, M., Tsukamoto, C., Uchida, T., Sakabe, T., Tamura, N. & Okubo, K. (1993) Isolation and structural elucidation of DDMD-conjugated soya saponins as genuine saponins from soybean seeds. *Bioscience Biotechnological Biochemistry* 57:546-550.
- Mizui, F., Kasai, R., Ohtani, K. & Tanaka, O. (1988) Saponins from brans of quinoa, *Chenopodium quinoa* Willd. I. *Chem Pharm Bull* 36:1415-1418.
- Ng, K. R., Price, K.R. & Fenwick, G.R. (1994) A TLC method for the analysis of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. *Food Chemistry* 49:311-315.

- Nowacka, J. & Oleszek, W. (1994) Determination of alfalfa (*Medicago sativa*) saponins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42:727-730.
- Oakenfull, D. & Sidhu, G.S. (1990) Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? *European Journal of Clinical Nutrition* 44:79-88.
- Oleszek, W. (1990a) Structural specificity of alfalfa (*Medicago sativa*) saponin haemolysis and its impact on two haemolysis-based quantification methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53:477-485.
- Oleszek, W., Price, K.R., Colquhoun, I.J., Jurzysta, M., Ploszynski, M. & Fenwick, G.R. (1990b) Isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) root saponins: their activity in relation to fungal bioassay. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38:1810-1817.
- Oleszek, W., Jurzysta, M., Ploszynski, M., Colquhoun, I.J., Price, K.R. & Fenwick, G.R. (1992) Zanic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) areal parts. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40:191-196.
- Oleszek, W., Nowacka, J., Gee, J.M., Wortley, G.M. & Johnson, I.T. (1994) Effects of some purified alfalfa (*Medicago sativa*) saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65:35-39.
- Önning, G. & Asp, N-G. (1993) Analysis of saponins in oat kernels. *Food Chemistry* 48:301-305.
- Önning, G., Asp, N-G. & Sivik, B. (1993) Saponin content in different oat varieties and in different fractions of oat grain. *Food Chemistry* 48:251-254.
- Önning, G. & Asp, N-G. (1995) Effect of oat saponins on plasma and liver lipids in gerbils and rats. *British Journal of Nutrition* 73:275-286.
- Price, K.R., Curl, C.L. & Fenwick, G.R. (1986) The saponin content and sapogenol composition of the seed of 13 varieties of legume. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37:1185-1191.
- Price, K.R., Johnson, I.T. & Fenwick, G.R. (1987) The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 26:27-135.
- Ridout, C.L., Price, K.R., DuPont, M.S., Parker, M.L. & Fenwick, G.R. (1991) Quinoa saponins - analysis and preliminary investigations into the effects of reduction by processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54:165-176.
- Southon, S., Wright, A.J.A., Price, K.R., Fairweather-Tait, S.J. & Fenwick, G.R. (1988b) The effect of three types of saponin on iron and zinc absorption from a single meal in the rat. *British Journal of Nutrition* 59:389-386.
- Tschesche, R. & Schmidt, W. (1966) Zwei neue Saponine der oberirdischen Teile des Hafers (*Avena sativa*) mit Nuatigenin als Aglykon. *Zeitung für Naturforschung* 21b:896-897.



## Variabilität des Glucosinolatgehaltes als ein Aspekt bei der Züchtung neuartiger Brassicaformen

*W. Schütze<sup>1</sup> und E. Clauß<sup>2</sup>*

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen Quedlinburg, <sup>1</sup>Institut für Qualitätsanalytik, <sup>2</sup>Institut für Züchtungsmethodik bei Gemüse, Neuer Weg 22/23, D-06484 Quedlinburg

Über Art- und Gattungsbastarde bei Brassicaceen, die u.a. als neue Gemüseformen mit guten Qualitätseigenschaften nutzbar sind, sowie über erste inhaltsstoffliche Analysen (Glucosinolate, Fettsäuren, Fruchtsäuren usw.) und sensorische Prüfungen an diesem Bastardmaterial wurde bereits berichtet (CLAUß 1993, CHAO et al. 1995; CLAUß, SCHÜTZE, ULRICH 1995). Dabei wurde auf die Notwendigkeit umfassender Kenntnis der Variabilität des Gehaltes an Glucosinolaten (GSL) im Zuchtmaterial als Voraussetzung für die selektive Veränderung des GSL-Musters zugunsten ernährungsphysiologisch wertvoller bzw. unbedenklicher Komponenten hingewiesen. Die unter diesem Aspekt empfehlenswerte Selektion auf geringen Gehalt an Sinigrin, Progoitrin und Gluconapin wirft allerdings die Frage auf, ob z.B. mit einer deutlichen Verminderung des Sinigringehaltes nicht auch ein Verlust an Resistenz gegenüber Schaderregern und Pathogenen einhergeht.

Unterdessen liegen neue allotetraploide Bastarde vor, die sich als interessante Objekte für die Untersuchung des Bastardierungseffektes auf das Glucosinolatmuster im Vergleich zu den Elternart-Genotypen anbieten. Es handelt sich um einen neuartigen, hoch nematodenresistenten Raphanosinapis-Bastard (Genome RRSS;  $2n=42$ ) aus der Kreuzung resistenter Genotypen von *Raphanus sativus* (Ölrettich) und *Sinapis alba* (Gelber Senf), bei dem sich Versuche der Züchtung einer neuen Zwischenfruchtform zur biologischen Nematodenbekämpfung anbieten. Desweiteren wurde ein Raphanobrassica-Bastard (RRAA;  $2n=38$ ) durch Kreuzung von *Raphanus sativus* (Radies) mit *Brassica rapa rapa* (Herbst-

/Stoppelrübe) unter dem Aspekt der Nutzung als neue Wurzelgemüseform erzeugt. Ziel der Glucosinolat-Analysen (Samen, Grünmasse) an den Bastarden ist es, am Beispiel *Raphanosinapis* Grundlagen für Untersuchungen zur Rolle der Glucosinolate als mögliche Nematodenresistenz-Ursache zu schaffen. An den Radies-Herbstrübenbastarden ist zu klären, in welchem Zusammenhang sensorische Eigenschaften und bastardierungsbedingte Veränderungen im Glucosinolatgehalt/-muster stehen.

Die Aufnahme von Glucosinolaten mit der Nahrung lag nach Untersuchungen von LANGE et al. (1994) z.B. im ehemaligen Bezirk Potsdam bei ca. 36mg bis 46mg/Kopf und Tag in Abhängigkeit von der Jahreszeit. Laut Statistischem Jahrbuch lag der Verzehr an Kohl 1993/94 in Deutschland pro Kopf bei 15,4 kg, einschließlich Rettich und Radies. Das sind rund 19,4% vom Gesamtverzehr an Gemüse. Der Hauptanteil wird gestellt durch Weiß- und Blumenkohl. In solchen Ländern wie China und Japan mit einem traditionellen Anbau und Verzehr von Kohlgemüse liegt die tägliche Aufnahme an Glucosinolaten mit der Nahrung noch weitaus höher. Die Glucosinolate sind deshalb von großer ernährungsphysiologischer Bedeutung (FENWICK & HEANEY 1983).

Bei der Spaltung dieser Verbindungen durch das Enzym Myrosinase entstehen neben jeweils einem Äquivalent Glucose und Sulfat in Parallelreaktion je nach Bedingung Isothiocyanate, Thiocyanate, Nitrile, Epithionitrile und Oxazolidinthione. Bei diesen als Aglucone bezeichneten Abbauprodukten der Glucosinolate handelt es sich um teilweise physiologisch hochwirksame Verbindungen, deren Bedeutung für die Pflanze als ein Baustein des Schutzmechanismus gegen Infektionen und Schädlingsbefall sich noch nicht umfassend beurteilen läßt. So ist z.B. die fungizide Wirkung des 2-Propenylisothiocyanats - Spaltprodukt des Sinigrins (GREENHALGH & MITCHELL, 1976) bekannt. Hohe Sinigringehalte können den Befall der Pflanze durch *Leptosphaeria maculans* deutlich reduzieren (MITHEN et al. 1986). Die GSL sind die chemisch stabilen Vorstufen der eigentlichen, physiologisch aktiven Wirkstoffe.

Das in der Vergangenheit verfolgte Ziel, Senkung des GSL - Gehaltes und damit aller Einzelkomponenten auf ein absolutes Minimum, läßt sich auf Grund der



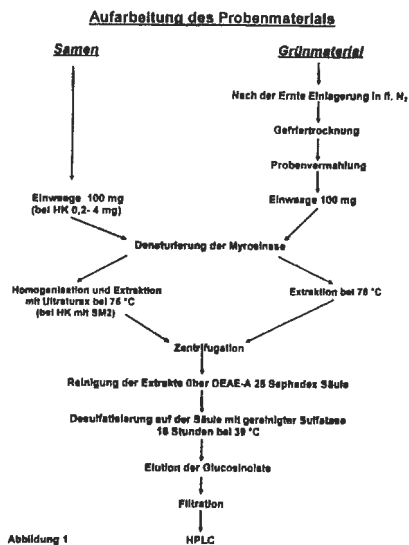
heutigen Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung der GSL in der bisherigen Form, speziell bei Kohlgemüse für die menschliche Ernährung, nicht mehr vertreten. Vielmehr kommt es darauf an, bei neu zu züchtenden Kohlformen den Aspekt der physiologischen Wirkung der Spaltprodukte einzelner Glucosinolate von vornherein mit zu berücksichtigen, um sowohl den Gesundheitswert als auch den Genußwert des angebotenen Gemüses zu erhöhen. Das Anliegen unserer Arbeiten ist es, neuartiges Basismaterial für die Züchtung auf der Grundlage neuer Erkenntnisse der Ernährungsphysiologie und Toxikologie von vornherein so zu selektieren, daß es den Anforderungen an eine gesunde Ernährung gerecht wird.

## Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial für die Glucosinolat-Analysen dienten Samen- bzw. Blattproben von folgenden Brassicaceen-Bastarden und Elternart-Genotypen:

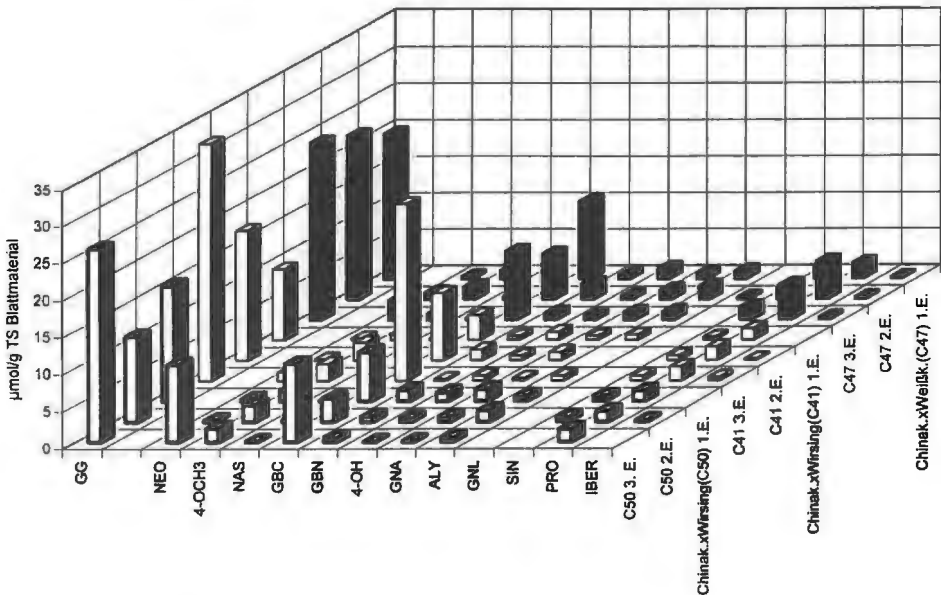
Gemüseraps (AACC, 2n=38); C 45): *B. pekinensis* Chinakohl x *B. oleracea* Kohlrabi 'Blauer Speck'; Raphanobrassica (RRCC, 2n=36), C 18): *R. sativus* Futterrettich St. 101/77 x *B. oleracea* Grünkohl 'Niedriger Grüner Feinstgekrauter'; Raphanosinapis (RRSS, 2n=42; C 151): *R. sativus* Ölrettich St. 2655 (A 24) x *S. alba* 'Condor' (A 21); Raphanobrassica (RRAA, 2n=38; 96/6, 96/9, 96/14); *R. sativus* Radies 'Certina' x *B. rapa rapa* Herbstrüben 'Goldwalze' und 'Vollend'.

Die Extraktion der Glucosinolate erfolgt entsprechend dem nachfolgenden Aufarbeitungsschema (Abb. 1).



Die Festlegung des Zeitpunktes der Probenahme bereitet besonders bei dem zu untersuchenden Bastardmaterial Schwierigkeiten, wie die nachfolgende Abb.2 zur Probenahme von drei verschiedenen Bastarden zu drei Zeitpunkten verdeutlicht. Vergleichbarkeit und Interpretation der Ergebnisse hängen in hohem Maße von der Erkennbarkeit sich entsprechender physiologischer Entwicklungszustände bzw. Reifegrade ab.

**Abb. 2:** Glucosinolatgehalt von Chinakohlbastarden zu verschiedenen Erntezeitpunkten (Ernte 1995)

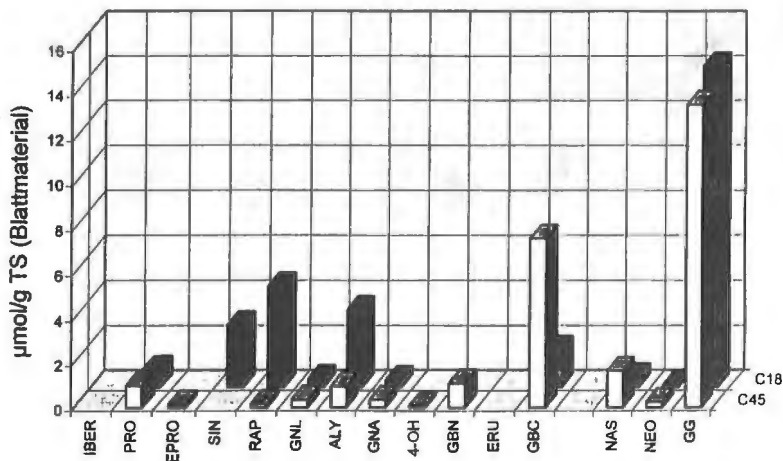


IBER, Iberin; PRO, Progoitrin; EPRO, Epiprogoitrin; SIN, Sinigrin; GNL, Gluconapoleiferin; ALY, Glucoalyssin; 4-OH, 4-Hydroxyglucobrassicin; GBN, Glucobrassicinapin; ERU, Glucoerucin; GBC, Glucobrassicin; NAS, Nasturtiin; 4-OCH3, 4-Methoxyglucobrassicin; NEO, Neoglucobrassicin; GG, Gesamtgehalt

Ein bemerkenswertes Beispiel für die Variabilität des Glucosinolatspektrums ist der Vergleich (Abb.3) eines Chinakohl-Kohlrabi-Bastards ( C 45) mit einem Futterrettich-Grünkohl-Bastard ( C 18). Bei nahezu gleichem Glucosinolat-Gesamtgehalt unterscheidet sich der Chinakohl-Kohlrabi-Bastard vom Futterrettich-Grünkohl-Bastard positiv durch das Fehlen von Sinigrin (SIN), den deutlich geringeren Glucoraphanin Gehalt (RAP) sowie durch seinen wesentlich höheren

Glucobrassicin Gehalt (GBC). Solche Formen bieten damit Ansatzpunkte für die Selektion von Basismaterial mit definierter Zusammensetzung des Glucosinolatgehaltes. Von Interesse sind weiterhin Kohlformen (*B. oleracea*), die sich durch einen insgesamt niedrigen Glucosinolatgehalt auszeichnen. Mit Gesamtgehalten zwischen 1,8 und 3,5  $\mu\text{mol/g}$  TS, Sinigrinwerten unter 1  $\mu\text{mol/g}$  sowie fehlendem Progoitrin bieten sich z.B. Futterkohlformen als geeignetes Ausgangsmaterial für die Herstellung von neuen Bastardtypen insbesondere für Futterzwecke an. (Abb.4)

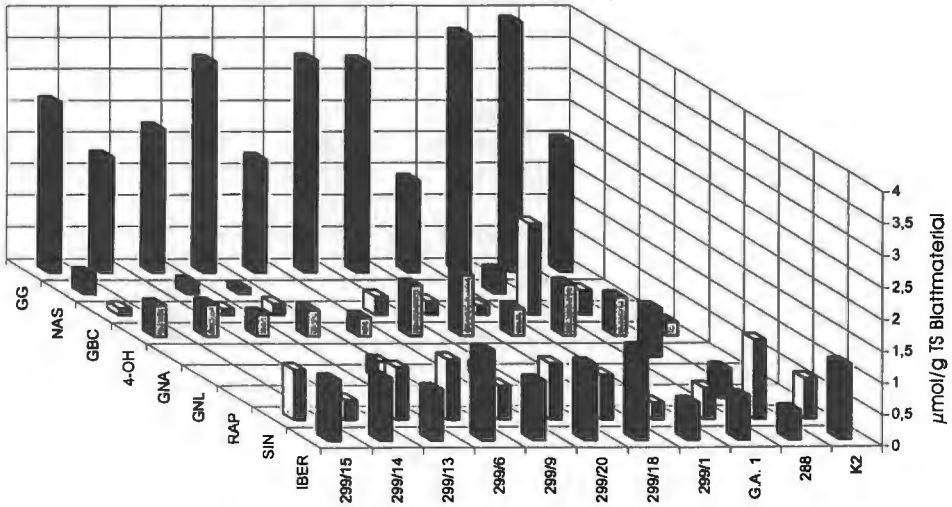
Abb.3: Vergleich des Glucosinolatgehaltes zwischen einem Chinakohl-Kohlrabi-Bastard (C45) und einem Futterrettich-Grünkohl-Bastard (C18), Gewächshausanbau



Von den eingangs erwähnten neuen Raphanosinapis- und Raphanobrassica (RRAA)-Bastarden liegen erste Untersuchungsergebnisse zur Variabilität des Glucosinolatgehaltes vor. Von Raphanosinapis existieren jetzt nach der Überwindung der anfangs hohen Bastardsterilität Nachzuchtgenerationen bis zur  $F_4$  mit bereits guter Fertilität. Dabei erwies sich auch die genetische Stabilität des morphologisch intermediären, weißblühenden Bastards. Außer für Versuche zur Entwicklung einer neuen verfütterbaren Zwischenfruchtform zur biologischen

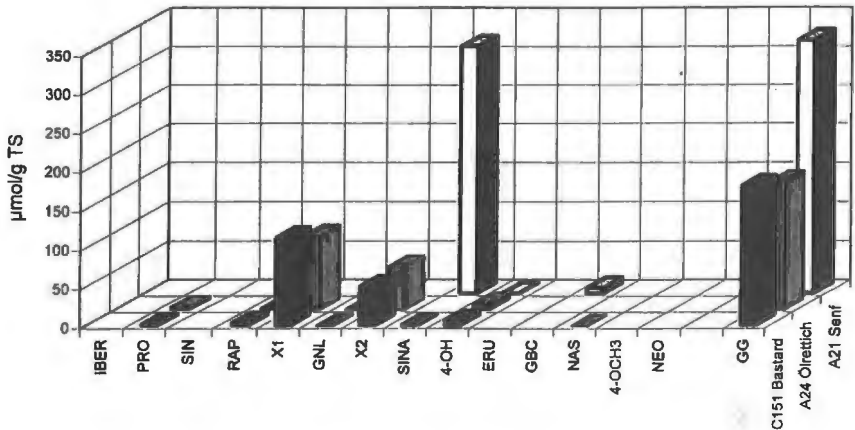
Nematodenbekämpfung bietet sich das Bastardmaterial für Kreuzungen mit Raps unter dem Aspekt der Übertragung der kombinierten Nematodenresistenz und für Rückkreuzungen mit Senf zur Übertragung der wirksameren Resistenzeigenschaft des Ölrettichs an.

Abb.4: Futterkohlformen mit niedrigen Glucosinolatgehalten



Ziel der Glucosinolat-Analysen an dem Raphanosinapis-Material ist zunächst die Ermittlung der bastardierungsbedingten Veränderungen im GSL-Gehalt/-Muster. Darüber hinaus ist die genaue Kenntnis der Inhaltsstoffe wichtig für züchterische Selektionen im Zusammenhang mit den genannten Kreuzungs-/Rückkreuzungsversuchen bzw. unter Verfütterungsaspekten und für Untersuchungen zur Rolle der Glucosinolate als mögliche Nematodenresistenzursache. Die ersten Analysen führten bereits zu dem interessanten Ergebnis, daß sowohl im Samen als auch im Blattmaterial von Raphanosinapis das GSL-Muster des mütterlichen Kreuzungseltern *R.sativus* dominiert. Die folgende Abbildung (Abb.5) zeigt das Glucosinolatmuster im Samen der Kreuzungseltern Ölrettich und Senf sowie des erzeugten Bastards. Diese Werte stellen Mittelwerte aus jeweils fünfzehn Einzelkornbestimmungen dar.

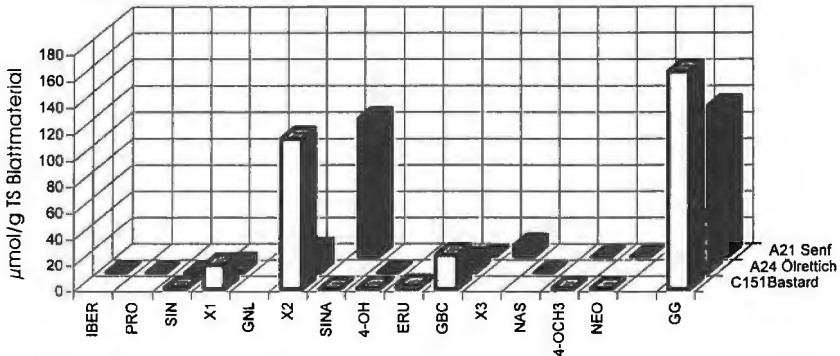
Abb. 5: Mittelwerte der Glucosinolatgehalte von Senf-, Ökrettich- und Senfökrettich-Samen (Halbkornanalysen, 1995)



Das Hauptglucosinolat des Senfs ist das p-Hydroxybenzylglucosinolat Sinalbin (SINA), dessen Anteil am Gesamtgehalt über 80% beträgt. Außer geringen Mengen an Glucobrassicin und 4-Hydroxyglucobrassicin waren keine weiteren Glucosinolate im Samen nachweisbar. Dagegen unterscheiden sich der mütterliche Ökrettich und der Bastard (C 151) in den Mittelwerten des Glucosinolatgehaltes kaum. Die Progoitrinwerte sind gering und Sinigrin fehlt gänzlich. Sinalbin ist im Bastard nur in Spuren, und auch nicht in jedem Samen nachweisbar. Weiterhin finden sich im Ökrettich und im Bastard noch geringe Mengen an Gluconapoleiferin (GNL) und 4-Hydroxyglucobrassicin (4-OH). Dominiert wird das Glucosinolatspektrum durch die beiden Verbindungen X1 und X2, deren Identifizierung noch aussteht. Bei der Verbindung X1 handelt es sich möglicherweise um das Glucoraphenin (Methylsulfinylbut-3-enyl-Glucosinolat). Abbildung 6 zeigt das Glucosinolatmuster im Blattmaterial der aus den untersuchten Samen erhaltenen Pflanzen. Das Hauptglucosinolat des Senfs ist im Blatt ebenfalls das Sinalbin mit einem Anteil von über 80% des Gesamtgehaltes. Außer geringen Mengen an Glucobrassicin, 4-Methoxyglucobrassicin (4-OCH<sub>3</sub>) und Neoglucobrassicin (NEO) wurde nur eine Komponente X3 (nach dem Spektrum möglicherweise ein Arylglucosinolat) gefunden, dessen Identifizierung

ebenfalls noch aussteht.

**Abb. 6:** Vergleich des Glucosinolatgehaltes zwischen einem Ölrettich-Senf-Bastard und einem der Elternformen (Ernte 1995)



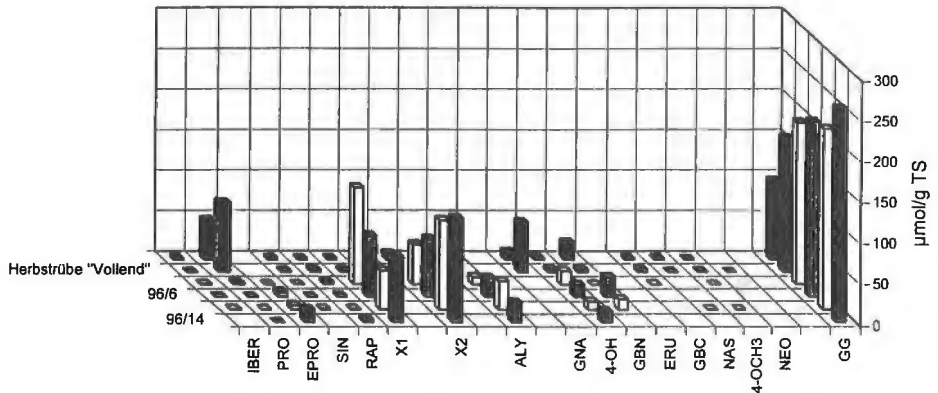
Der Ölrettich zeigt im Blatt neben geringen Mengen an Iberin, Progoitrin, Sinigrin größere Mengen der ebenfalls im Samen vorkommenden Verbindung X1 sowie der Komponente X2 und Glucobrassicin neben Spuren von 4-Hydroxyglucobrassicin und Nasturtiin (NAS). Im Blatt des Bastards spiegelt sich im wesentlichen das Glucosinolatmuster des Ölrettichs wider, dominiert durch die beiden Verbindungen X1 und X2, wobei X2 im Blatt des Bastards den Wert von X2 im Ölrettichblatt um den Faktor 6 übertraf. Das Konzentrationsverhältnis von X1 und X2 ist entgegengesetzt dem im Samen. Sinalbin war wie im Samen nur in Spuren und ebenfalls nicht in jeder Pflanze nachweisbar. Insgesamt zeigten die Werte der Einzelverbindungen in den Bastardpflanzen eine größere Variabilität als in den Pflanzen der Elternformen. Teilweise lag der Variationskoeffizient höher als 40%.

An den neuen Raphanobrassica-Bastarden aus der Kreuzung zwischen Radies und Herbstrüben wurde mit der Untersuchung des Glucosinolatgehaltes in den Samen begonnen. Abbildung 7 zeigt die Glucosinolatmuster und -gehalte in den Samen der drei untersuchten Bastardformen im Vergleich zu den eingekreuzten Elternart-Genotypen. Bereits in diesen ersten Ergebnissen wird deutlich, daß auch hier im Bastardmaterial im wesentlichen das Glucosinolatmuster des mütterlichen Raphanus-Kreuzungspartners dominiert. Es ist denkbar, daß dabei das Raphanus-Cytoplasma, das diese Bastarde wie die Raphanosinapis-Bastarde auf Grund der

gleichen Kreuzungsrichtung besitzen, eine gewisse Rolle spielt.

Die Glucosinolat-Analysen an den Radies-Herbstrüben-Bastarden werden an Blattmaterial und Rübengewebe fortgesetzt.

**Abb. 7:** Glucosinolatgehalt im Samen von Radies, Herbststoppelrübe sowie den daraus erzeugten Bastarden



## Zusammenfassung

Zum Stand der durchgeführten Untersuchungen und zur Zielstellung der weiteren vorgesehenen Arbeiten ist zusammenfassend festzustellen:

- Es liegen zahlreiche neuartige, züchterisch interessante Brassica- bzw. Brassicaceen-Bastardformen vor, die im Glucosinolatgehalt bzw. -muster eine bemerkenswert hohe Variabilität aufweisen.
- Das vorhandene Kohl- bzw. Bastardmaterial ist unter dem diskutierten Aspekt des Gesundheitswertes zugunsten von Formen mit möglichst niedrigen Alkenyl- und hohen Anteilen an Indolglucosinolaten zu selektieren.
- Bei der sensorischen Bewertung des Pflanzenmaterials spielt die Berücksichtigung des Glucosinolatgehaltes/-musters eine wichtige Rolle für die Selektion auf gute Geschmacksqualität.
- Die Kenntnis des Glucosinolatgehaltes/-musters der neuen, nematodenresistenten Raphano-sinapis-Bastarde ist eine wichtige Grundlage für Untersuchungen zur Bedeutung der Glucosinolate als mögliche Resistenzursache.

## LITERATUR

- CHAO, J., E. HOBERG, E. CLAUB, W. FELDHEIM, 1995: VitaminC-Gehalt und sensorische Eigenschaften neuer Gemüsepflanzen aus Art- und Gattungskreuzungen bei Brassicaceen, Zweite Mitteilung der Versuchsergebnisse -. 30. Tagungsber. DGQ (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., Heilbronn, 209-219
- CLAUB, E., 1993: Züchtung neuer Nahrungspflanzen am Beispiel Brassicaceae - Spielerei oder Möglichkeiten zur qualitativen Verbesserung der menschlichen Ernährung? 28. Tagungsber. DGQ (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., Trier, 231-243
- CLAUB, E., W. SCHÜTZE, D. ULRICH, 1995: Untersuchungen zu Qualitätsbewertung neuartiger Brassicaceen-Bastarde - charakterisiert durch Glucosinolat- und Fettsäurespektrum. 30. Tagungsber. DGQ (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., Heilbronn, 220-230
- LANGE, R., B. LUSHTAK, B. OZIERENSKI, G. PFAFF, 1994: Glucosinolate im Kohlgemüse: Natürliche Schadstoffe oder protektive Faktoren? - 29. Tagungsber. DGQ (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., Quedlinburg, 49-73
- FENWICK, G.R., R.K. HEANEY, 1983: Glucosinolates and their Breakdown Products in Cruciferous Crops, Foods and Feedingstuffs. Food Chemistry 11 (1983) 249-271
- GREENHALGH, J.R. & MITCHELL, N.D., 1976: The involvement of flavour volatiles in the resistance to downy mildew of wild and cultivated forms of *Brassica oleracea*. New Phytologist 77, 391-398
- MITHEN, R.F., B.G. LEWIS, G.R. FENWICK, 1986: In vitro activity of glucosinolates and their products against *Leptosphaeria maculans*. Trans. Br. mycol. Soc. 87 (3), (1986) 433-440
- Statistisches Jahrbuch über Ernährung Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland (1995), 221





## Charakterisierung von Primitiv- und Kulturformen des Kohls *Brassica oleracea*

E. Hoberg<sup>1)</sup>, W. Schütze<sup>1)</sup>, D. Ulrich<sup>1)</sup>, E. Clauß<sup>2)</sup>

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen  
<sup>1)</sup>Institut für Qualitätsanalytik und <sup>2)</sup>Institut für Züchtungsmethodik bei Gemüse,  
Neuer Weg 22-23, D - 06484 Quedlinburg, Deutschland

### Zielstellung

Primitivformen des Kohls (*Brassica oleracea*) zeichnen sich aufgrund ihres ursprünglichen und damit noch sehr breiten genetischen Hintergrundes durch eine hohe Variabilität aus. Diese wird in der Morphologie deutlich sichtbar, betrifft aber auch die Konzentration und Zusammensetzung der Inhaltsstoffe.

Typische Vertreter für derartige Kohlformen sind z. B. die Herkünfte von Madeira und den Kanarischen Inseln. Diese Kohltypen sind perennierend und damit für die Klärung der Abhängigkeit sensorischer Eigenschaften von Flavour bestimmenden Inhaltsstoffen (Glucosinolate, Zucker, Fruchtsäuren und Aromastoffe) besonders geeignet. Es können ausgewählte, evaluierte Einzelpflanzen mehrjährig erhalten und vermehrt werden, so daß damit für wiederholte chemische und sensorische Prüfungen genetisch identisches Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht. Das Ziel der Untersuchungen besteht in der Klärung der Zusammenhänge zwischen den stofflichen Grundlagen und den sensorischen Bewertungen. Durch die gleichzeitige Einbeziehung der verschiedenen Stoffgruppen in die Analyse von identischem Material kann deren Bedeutung für die gesamte Ausprägung des sensorischen Eindruckes erfaßt werden. Damit werden Grundlagen für die züchterische Selektion von Ausgangsmaterial mit wertvollen geschmacksbeeinflussenden und ernährungsphysiologisch wirksamen Inhaltsstoffen geschaffen.

### Material und Methoden

Die analytischen und die sensorischen Untersuchungen wurden an Blattmaterial von *Brassica oleracea* von jeweils 6 Einzelpflanzen durchgeführt. Die Primitivformen wurden aus je 3 Herkünften von Madeira (A 138/1, A140/1, A 141/1) und El Hierro/Kanarische Inseln (A 195/2, A198/1, A206/1) ausgewählt. Als Vergleichsmaterial dienten Wirsing (A 180 „Grüner

von Markee“) und Chinakohl (A 209 Landsorte von Taiwan). Der Anbau erfolgte 1995 (Quedlinburg, Stumpfsburger Garten), die Ernte im Herbst desselben Jahres.

Die Probenahme für alle Untersuchungen erfolgte so, daß auch tatsächlich identisches Material für alle Untersuchungen genutzt wurde. Die frischen Proben wurden zerkleinert und wie folgt untersucht:

1. Sensorische Prüfung mit einem Panel (15 geschulte Prüfer). Das Untersuchungsmaterial wurde nach dem Zerkleinern mit wenig Speiseöl versetzt und nach ca. 4 Std. geprüft. Ermittelt wurde die Häufigkeit der Merkmalsfeststellung. Die Auswahl der Parameter erfolgte nach Schrödter (1993).
2. Die Glucosinolatbestimmung erfolgte nach Gefriertrocknung (Clauß u.a. 1995) mittels RP-HPLC.
3. Die Fruchtsäuren wurden ebenfalls mit der RP-HPLC ermittelt (Hoberg 1994, Chao 1995).
4. Die Aromakomponenten wurden unter enzyminhibierenden Bedingungen mittels Freon extrahiert. GC/MS-Analyse: GC - HP 5890, Injektor 180°C, Split 1:5, INNO-Wax Säule, 60 m, 0.32 mm ID, 2 ml/min Helium. MS - HP 5972 Elektronenstoßionisation 70 keV. Die Quantifizierung erfolgte durch Bezug auf einen internen Standard (Ulrich u.a. 1995).
5. Aus demselben Homogenisat wie für die Aromabestimmung erfolgte die enzymatische Bestimmung der einzelnen Zucker mittels UV-Test nach Boehringer (Mannheim).

## Ergebnisse

Clauß (1993) und Chao (1995) beschrieben den potentiellen Wert von Brassicaceenbastarden für die Schaffung neuartiger Gemüsearten für den einheimischen Anbau. Wegen des hohen Vitamin C-Gehaltes einiger Genotypen ist insbesondere der Frischverzehr anzustreben. Die Einbeziehung von Formen in die züchterische Bearbeitung, mit denen im mitteleuropäischen Raum bisher keine Erfahrungen vorliegen, kann hinsichtlich der Qualität dann effektiv gestaltet werden, wenn die sensorische Bewertung frühzeitig erfolgt und die Ergebnisse mit solchen qualitätsbestimmenden Inhaltsstoffen in Verbindung gebracht werden, die für den Züchter während des Zuchtprozesses meßbar sind.

Die Charakterisierung der Primitivformen von *Brassica oleracea* erfolgte hinsichtlich der wichtigsten sensorisch erfaßbaren Geschmacks- und Aromakomponenten, des Glucosinolatmusters, der flüchtigen Aromastoffe, der Zucker- und der Fruchtsäurespektren. Als Vergleich wurden Chinakohl, der sich hoher Beliebtheit erfreut, und eine Wirsingkohlsorte einbezogen, welche eher für den Verzehr im gekochten Zustand geeignet ist.

Auffällig sind im Chinakohl die hervortretenden Geschmackskomponenten 'süß' und 'fruchtig', während im Wirsing 'kohltypisch', 'grasig' und 'scharf' überwiegen. 'Grasig' und 'scharf' sind auch in den Primitivformen die dominierenden Geschmacksrichtungen, hinzu kommt eine starke Bitternote.

Weniger ausgeprägt ist hingegen die Wahrnehmung, welche als kohltypisch gilt. Auch im Geruch werden diese Komponenten ähnlich registriert, so daß die Prüfer bei der Bewertung nach Beliebtheit insgesamt eine eher ablehnende Einstellung gegenüber den Primitivformen und dem rohen Wirsing einnahmen.

Im Aromamuster fallen die Primitivformen im Vergleich zu den Kultursorten durch die Vielfalt und hohe Variabilität der flüchtigen Inhaltsstoffe auf. Die Primitivformen besitzen sämtlich wesentlich höhere Gehalte an 'grünen' Komponenten, insbesondere (Z)-3-Hexenal. Wird der Beitrag dieser Substanzen zum Aroma mittels einer Aromaextrakt - Verdünnungsanalyse oder dem Aromawertkonzept bewertet (in diesem Poster nicht dargestellt), ist erkennbar, daß in den Primitivformen die grünen, grasigen Noten dominieren. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Aussagen der Sensorik. Die Beziehungen zwischen den sensorischen Wahrnehmungen und den anderen Analysendaten werden in der Folgezeit mit größerem Probenumfang ermittelt. Bei den Glucosinolaten sind die relativ hohen Gehalte von Wirsing und der Herkunft A138/1, bedingt durch die Anteile an Glucobrassicin sowie den Sinigrin- bzw. Progoitringehalt auffällig. Bemerkenswert ist weiterhin der deutlich höhere Gehalt an Gluconapin der Herkunft A138/1 gegenüber dem der anderen Genotypen sowie der hohe Glucoraphanin Gehalt der A198/1. Chinakohl zeigt einen deutlich niedrigeren Glucosinolat als die anderen untersuchten Formen. Die dominierenden Zucker sind die Fructose und die Glucose, welche im Wirsing und in 140/1 am höchsten liegen. Saccharose tritt nur im Wirsing und in 138/1 in nennenswerten Gehalten auf. Die Kulturformen besitzen die niedrigsten Fruchtsäuregehalte. Während in den Primitivformen das Verhältnis zwischen Äpfel- und Citronensäure zugunsten der Citronensäure verschoben ist, hat der Wirsing gleiche Anteile an diesen Säuren, im Chinakohl überwiegt die Äpfelsäure.

### Abstract

Primitive genotypes of *Brassica oleracea* from Canary Islands and from Madeira were cultivated in Quedlinburg (Germany). They were characterized by sensory (taste and odour), RP-HPLC (glucosinolates, fruit acids), GC-MS (volatile components) and enzymatical (sugars) methods. The instrumental results offer a

high variability in most of the investigated compounds. But the sensory perception is mainly influenced by the dominating 'green' / 'grassy' flavour.

## Literatur

- CLAUß, E.: Züchtung neuer Nahrungspflanzen am Beispiel Brassicaceae - Spielerei oder Möglichkeiten zur Qualitativen Verbesserung der menschlichen Ernährung. DGQ XXVIII. Vortragstagung, Trier, 1993, S.231 - 243
- CLAUß, E.; SCHÜTZE, W.; ULRICH, D.: Untersuchungen zur Qualitätsbewertung neuartiger Brassicaceen-Bastarde - charakterisiert durch Glucosinolat- und Fettsäurespektrum. DGQ XXX. Vortragstagung, Heilbronn, 1995, S.220 - 230
- CHAO, J.: Untersuchungen über den Vitamin C- und den  $\beta$ -Carotin-Gehalt und den Einfluß von Fruchtsäuren auf die sensorischen Eigenschaften von Gemüsepflanzen aus Art- und Gattungskreuzungen bei Brassicaceen. Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel, Diss. 1995
- HOBERG; E.: Analytik geschmacksbildender Inhaltsstoffe der Erdbeere 1. Nichtflüchtige Komponenten. DGQ XXIX. Vortragstagung, Quedlinburg 1994, S. 294 - 301
- D. ULRICH; A. RAPP; E. HOBERG: Analyse des Erdbeearomas - Quantifizierung der flüchtigen Komponenten in Kulturerdbeervarietäten und der Walderdbeere. Z Lebensm Unters Forsch (1995) 200: 217 - 220
- D. ULRICH; E. HOBERG: Aromaanalytik für die Züchtung von Obst und Gemüse. XXX. Vortragstagung der Gesellschaft für Qualitätsforschung zum Thema: Geschmacksstoffe in pflanzlichen Nahrungsmitteln. 27.- 28. 3. 1995, Heilbronn
- CHAO, J., HOBERG, E., CLAUß, E.; FELDHEIM, W.: Vitamin C-Gehalt und sensorische Eigenschaften neuer Gemüsepflanzen aus Art- und Gattungskreuzungen bei Brassicaceen. 2. Mitteilung der Versuchsergebnisse. XXX. Vortragstagung der Gesellschaft für Qualitätsforschung zum Thema: Geschmacksstoffe in pflanzlichen Nahrungsmitteln. 27.- 28. 3. 1995, Heilbronn
- SCHRÖDTER, R.: Sensorische Analyse - eine unverzichtbare Methode der Qualitätsbewertung pflanzlicher Nahrungsmittel. DGQ XXIIIV. Vortragstagung, Trier 1993, S. 108 - 125



Abb. 1: Häufigkeit der sensorischen Bewertung ausgewählter Geschmackskomponenten bei Primitiv- (links) und Kulturformen (rechts) von Kohl



## Flavonoide als natürliche Inhaltsstoffe mit biologischer Wirkung

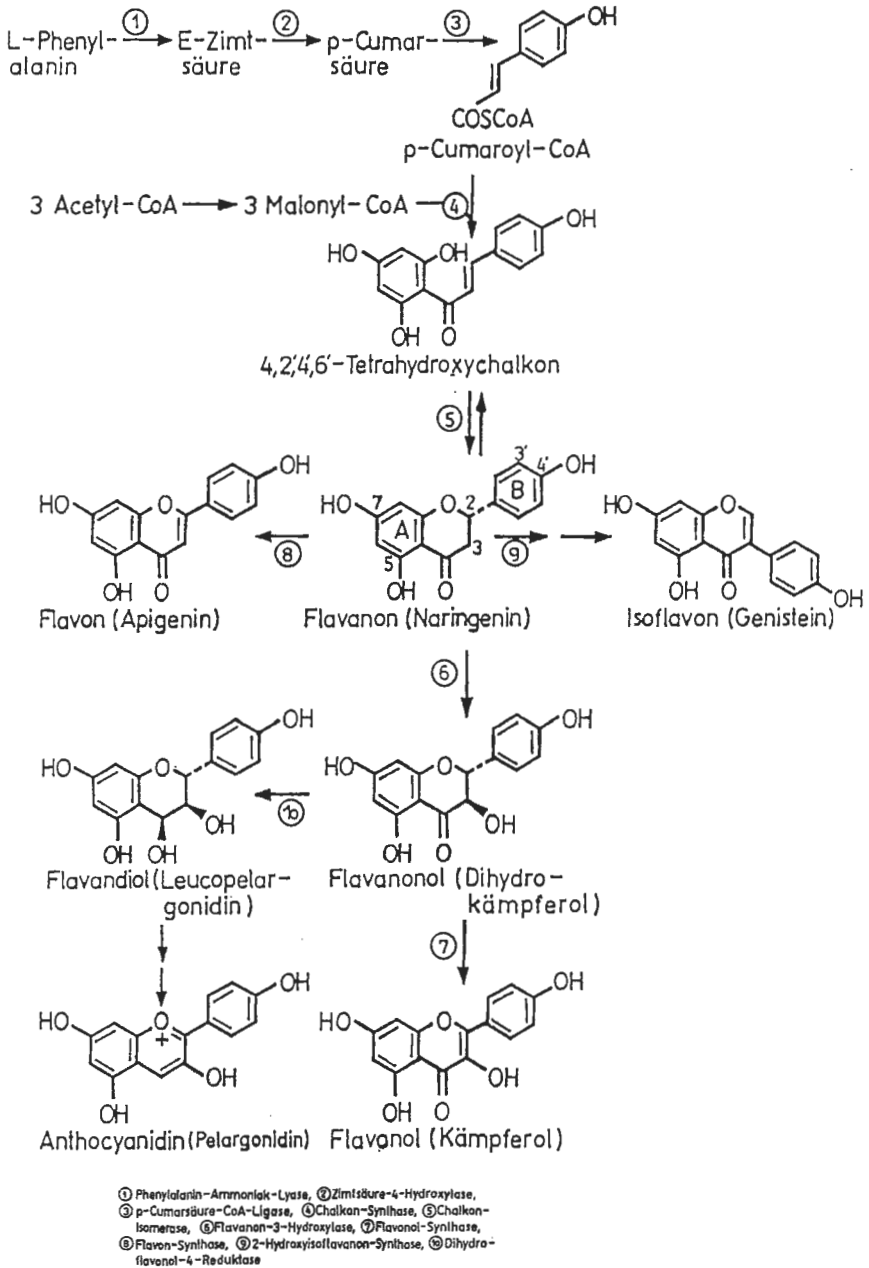
*H. Böhm, J. Hempel und B. Raab*

Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Arthur-Scheunert-Allee 114-116,  
14558 Bergholz-Rehbrücke

Die Flavonoide stellen mit etwa 4000 verschiedenen Substanzen eine der größten, aber auch am intensivsten bearbeiteten Klassen von Naturstoffen dar. Sie sind typische Sekundärmetaboliten höherer Pflanzen, in deren Familien, Gattungen und Arten weit verbreitet und daher regelmäßiger Bestandteil der menschlichen Nahrung. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß die meisten von ihnen freie phenolische Gruppen besitzen und antioxidative Eigenschaften erwarten lassen, die im Körper zur Prävention chronischer Erkrankungen beitragen könnten.

### **Grundstrukturen, ihre Bildung und Modifizierung**

Bezüglich ihrer Grundstrukturen sind die Flavonoide Abkömmlinge des  $\alpha$ -Pyrons oder Chromans und  $\gamma$ -Pyrons oder Chromons, je nachdem ob man ihren O-heterozyklischen Ring allein oder gemeinsam mit dem benachbarten aromatischen Ring betrachtet. Innerhalb der bereits auf dieser Ebene vorhandenen strukturellen Vielfalt besteht ein biogenetischer Zusammenhang, den Abbildung 1 im Prinzip darstellt. Durch die Vereinigung einer Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure, Kaffeesäure) mit drei  $C_2$ -Einheiten aus Malonyl-CoA wird ein  $C_{15}$ -Körper (Chalkon) gebildet, der durch weitere Zyklisierung in ein immer mit Hydroxylgruppen versehenes Flavanon übergeht. Von diesem führen biochemisch und genetisch überwiegend gut charakterisierte Biosyntheseschritte zu allen typischen Flavonoid-Grundstrukturen. Aus dem Isoflavon können Pterocarpan und Cumestan entstehen. Da die Zimtsäuren als wesentliche Vorstufen ein Phenylpropangerüst besitzen, werden die Flavonoide aus biochemischer Sicht zu den Phenylpropanoiden gezählt. Ihre Biosynthese verläuft von der Chalkonbildung ab nur unter Lichteinwirkung, wie sich besonders deutlich in Untersuchungen mit pflanzlichen Zellkulturen zeigen ließ (Grisebach und Hahlbrock 1977).



**Abb. 1:** Biosynthese-Schema der wesentlichen Grundstrukturen von Flavonoiden (nach Heller und Forkmann 1994)

An den entstandenen Strukturen können verschiedene Reaktionen erfolgen und zu der Vielzahl flavonoider Substanzen beitragen. Zu ihnen gehört die Einführung weiterer Hydroxylgruppen in den Ringen A und B durch teilweise recht substratspezifische Hydroxylasen. Methylierung, auch Sulfatierung, vor allem aber Glykosylierung von Hydroxylgruppen führen entsprechende Transferasen aus. Beispiele für hochgradige Hydroxylierung und durchgehende Methylierung geben die Flavone Tangeretin und Nobiletin mit fünf bzw. sechs Methoxylgruppen, davon jeweils vier am Ring A. Mit den besonders in den Positionen 3, 5 und 7 an Sauerstoff gebundenen Zuckern, unter denen Glucose vorherrscht, können weitere gleich- oder andersartige Kohlenhydrate, aber auch aromatische (z.B. Hydroxyzimtsäuren) oder aliphatische (z.B. Malonsäure) Säuren verknüpft werden. Bei Anthocyanidinen, die frei praktisch nicht vorkommen, ist eine 3-O-Glucosylierung offenbar Voraussetzung für die Stabilität des Moleküls. In der Regel nimmt die Wasserlöslichkeit der Flavonoide bei Vorhandensein von Zucker- und Säureresten zu.

Außer der Hydroxylierung sind Substitutionen an C-Atomen von Flavonoid-Grundstrukturen vergleichsweise selten. Es wurden aber zahlreiche C-Glykoside von Flavonen und Flavonolen bekannt, zu denen beispielsweise Vitexin, Apigenin-8-C-glucosid, gehört. Auch bei dieser Anbindung der Zucker können Di- und Triglykoside gebildet und Säuren angefügt werden. Erhebliche strukturelle Konsequenzen ergeben sich aus C-C-Bindungen zwischen Flavan-3-olen mit unterschiedlichen Hydroxylierungsmustern. Sie sind Grundlage einer teilweise hochgradigen Polymerisierung, die zu den sogenannten Proanthocyanidinen bzw. kondensierten Tanninen führt.

### **Flavonoide in Nahrungspflanzen**

Einzelne Substanzen, vor allem aber Gruppen mit gemeinsamer Grundstruktur treten in charakteristischer Weise in bestimmten Verwandtschaftskreisen der als Nahrung genutzten Pflanzen auf (Tab. 1). Etwa in der Reihenfolge ihrer Biosynthese (Abb. 1) betrachtet, sind zunächst Glykoside des Phloretins, eines Dihydrochalcon, zu nennen. Sie können geradezu als Indikatoren für Früchte europäischer Äpfel und deren Produkte betrachtet werden (Wald und Galensa 1989). Die zentrale Zwischenstufe Flavanon wird in *Citrus*-Arten vor allem als Naringin und

Hesperidin angereichert (Mouly et al. 1994). Während Flavone in einheimischem Obst und vielen Gemüsearten praktisch fehlen, sind Luteolin- und Apigenin-glykoside für Angehörige der Doldengewächse (Apiaceae) typisch (Herrmann 1991b). Isoflavone und andere isoflavonoide Strukturen treten im gesamten Pflanzenreich fast ausschließlich in der Unterfamilie Papilionoideae der Hülsenfruchtgewächse (Leguminosae) auf, zu der eine so wichtige Nahrungspflanze wie die Sojabohne gehört. Flavonole, und unter ihnen vor allem Quercetin mit seinen Glykosiden, sind dagegen in pflanzlichen Lebensmitteln so weit verbreitet, daß ein charakteristisches Auftreten nicht erkennbar ist.

**Tabelle 1:** Charakteristisches Vorkommen von Flavonoiden in pflanzlichen Lebensmitteln

Grundstruktur	Glykosid (Hauptkomponenten)	Lebensmittel
Chalkon	Phloretin-2'-O-glucosid Phloretin-2'-O-xylosylglucosid	Äpfel
Flavanon	Naringin (Naringenin-7-O-neohesperidosid) Eriocitrin (Eriodictyol-7-O-rutinosid) Hesperidin (Hesperetin-7-O-rutinosid)	Citrusfrüchte
Flavon	Apiin (Apigenin-7-O-apiosylglucosid) Luteolin-7-O-glucosid	Sellerie, Petersilie, Möhre
Isoflavon	Genistin (Genistein-7-O-glucosid) Daidzin (Daidzein-7-O-glucosid) Biochanin A-7-O-glucosid	Sojabohne, Kichererbse
Flavanol	(-) Epigallocatechin-3-O-gallat (-) Epigallocatechin	grüner Tee
Anthocyan	Cyanidin-3-glykoside	Beerenobst

Typische Inhaltsstoffe des grünen Tees sind Catechine als Vertreter der Flavanol (Hara 1994). Sie kommen in wesentlich geringerer Konzentration allerdings auch in einheimischem Kern-, Stein- und Beerenobst vor und werden dort von Proanthocyanidinen begleitet (Herrmann 1991a). Obwohl Anthocyanine, besonders als Blütenfarbstoffe, große Verbreitung in höheren Pflanzen besitzen, fällt innerhalb der Nahrungspflanzen ihr Vorkommen in Beerenobst auf. Während bei *Rubus*- und *Ribes*-Arten fast ausschließlich Cyanidin-3-O-glykoside vorhanden sind, herrschen in der Erdbeere Pelargonidin-3-O-glykoside und in der Blaubeere Glykoside des Delphinidins, Malvidins und Petunidins vor. Es ist interessant, daß



europäische Weintrauben (*Vitis vinifera*) reich an acylierten Anthocyaninen sind, in dem nordamerikanischen Wein *V. rotundifolia* Acylderivate aber bisher nicht gefunden wurden (Mazza und Miniati 1993).

### **Wirkung von Flavonoiden im Säugerorganismus**

Gerade vor 60 Jahren beschrieb der Arbeitskreis von Albert Szent-Györgyi die Normalisierung erhöhter Permeabilität von Blutgefäßwänden durch eine Flavonoidpräparation aus Zitronensaft, die als Vitamin betrachtet und „P“ genannt wurde (Rusznyak und Szent-Györgyi 1936, Bentsath et al. 1936). Der Vitaminstatus ließ sich nicht ausreichend für Flavonoide belegen, aber auf deren therapeutische Wirkung war wissenschaftlich aufmerksam gemacht und eine offensichtliche Wechselwirkung mit Vitamin C gezeigt worden (Gabor 1988). Inzwischen gibt es eine Fülle von Untersuchungen über den Einfluß der Flavonoide auf verschiedene pathophysiologische Prozesse, besonders Entzündungen, Herz-Kreislaufkrankungen, Immundefekte und Allergien, Cancerogenese, viröse Infektionen (Middleton und Kandaswami 1994, Das et al. 1994, Formica und Regelson 1995). Dabei wurden im wesentlichen Nager als Versuchstiere, Zellkulturen von Säugern und zellfreie Systeme zur Durchführung der Experimente benutzt. In vielen Fällen fand man gesundheitlich günstige Wirkungen der Flavonoide, was mit deren phenolischem Charakter, der antioxidative Eigenschaften und die Fähigkeit zur Chelatbildung bedingt, sowie mit deren Einfluß auf die Aktivität zahlreicher Enzyme erklärt werden kann. Es traten in den genannten Versuchsanordnungen aber auch krankheitsfördernde Flavonoidwirkungen auf, wofür zu hohe Konzentrationen der Sekundärmetaboliten und bestimmte Bedingungen im Reaktionsmilieu, etwa die Anwesenheit von Metallionen, ursächlich sein dürften. Besonders wurden mutagene und carcinogene Wirkungen für Flavonoide, voran Quercetin, beschrieben. In diese Richtung gingen auch mit dem Ames-Test gewonnene Befunde, für die es allerdings kaum eine Bestätigung *in vivo* gab. Jedenfalls hat Quercetin im Verlauf der letzten etwa 20 Jahre einen interessanten Rollenwandel durchgemacht vom mutagenen und cancerogenen Naturstoff zum Inhaltsstoff pflanzlicher Lebensmittel, von dem präventive Wirkung gegen chronische Erkrankungen erwartet wird (Das et al. 1994, Pool-Zobel 1990, Hertog und Hollman 1996).

Die Voraussetzungen und Möglichkeiten für eine biologische Wirkung von Flavonoiden, die mit der Nahrung in den menschlichen Körper gelangen, hat zuerst Kühnau (1976) in grundsätzlicher und noch weithin gültiger Weise behandelt. Er bewertete diese Inhaltsstoffe als semi-essentiell, während sie heute, wie andere Sekundärmetaboliten in Lebensmitteln, als nicht-nutritiv bezeichnet werden. Abgesehen von diesen Begriffsbestimmungen sind für eine Bewertung zwei Sachverhalte bisher ungenügend geklärt: das Schicksal der Flavonoide, zumeist als Glykoside vorliegend, während der Magen-Darm-Passage im Nahrungsbrei und die Absorption sowohl hinsichtlich des Ortes als auch der von ihr betroffenen Strukturen. Beide Vorgänge sind experimentell kaum voneinander zu trennen. Ihre Diskussion wird in wahrscheinlich unberechtigtem Maße von den Befunden zur Pharmakokinetik oral verabreichter reiner Flavonoide (Scheline 1991) beeinflusst. In jüngeren Untersuchungen dieser Fragen strebt man deshalb ernährungsrelevante Versuchsanordnungen an und sucht nach einer Lösung der damit verbundenen analytischen Probleme (Manach et al. 1995, Hollman et al. 1995, Pietta et al. 1995).

### **Flavonole und Flavone in Gemüse und Obst**

Herrmann und Mitarbeiter haben Qualität und Quantität von Flavonoiden in einheimischem Obst und Gemüse systematisch bearbeitet (Herrmann 1976, 1991a,b). Sie trugen damit wesentlich zur Kenntnis des Spektrums an Flavonolen und Flavonen in diesen Lebensmitteln bei. Gehaltsbestimmungen erfolgten vor allem durch dünnschichtchromatografische Auftrennung und spektrophotometrische Messung der Glykoside, wobei einerseits verschiedene Sorten einer Art, andererseits auch nicht verzehrbare Pflanzenteile analysiert wurden. Die erhaltenen Werte sind teilweise schwer vergleichbar mit denen, die Hochdruckflüssigchromatografie (HPLC) und UV-Detektion hydrolytisch freigesetzter Aglykone lieferten und wurden deshalb nicht in die Tabellen 2 und 3 aufgenommen. Die dortigen Angaben beziehen sich überwiegend auf verschiedene Sorten der jeweiligen Arten (Bilyk und Sapers 1985) oder auf Marktware ohne Sortenbezeichnung (außer Apfel und Birne), die für viele Arten mehrfach während eines Jahres zur Untersuchung beschafft wurde (Hertog et al. 1992, 1993). Es mag die Entwicklung in der Einschätzung der Flavonole kennzeichnen, daß die älteren

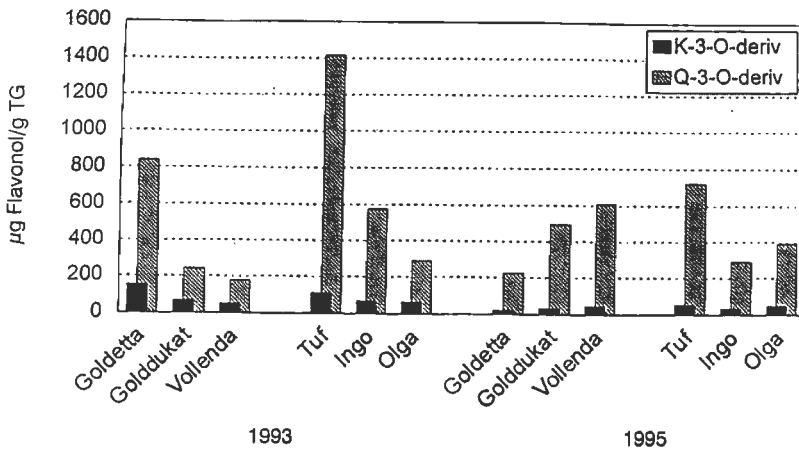
Untersuchungen im Hinblick auf deren mutagene Wirkung, die jüngeren wegen möglicher anticarcinogener Eigenschaften durchgeführt wurden.

**Tabelle 2:** Flavonol- und Flavongehalte > 5 mg/kg frischer essbarer Teile von Gemüse

Gemüse	Analysendaten nach Bilyk und Sapers 1985		Analysendaten nach Hertog et al. 1992			
	Quercetin	Kämpferol	Quercetin	Kämpferol	Luteolin	Apigenin
Grünkohl	7 ± 0,05 20 ± 0,44	30 ± 0,08 (1 Sorte) 13 ± 0,16 (2 Sorten)	110	211	—	—
Broccoli	—	—	30	72	—	—
Rosenkohl	—	—	—	7,4	—	—
Rotkohl	2 ± 0,09	—	4,6 ± 1,1	—	—	—
Zwiebel	—	—	347 ± 63	—	—	—
Porree	—	20 ± 0,01 (grüne Teile) — (weiße Teile)	—	30 ± 23	—	—
Knoblauch	4 ± 0,02	6 ± 0,02 (grüne Teile) — (weiße Teile)	—	—	—	—
Kopfsalat	18 ± 0,33	—	14 ± 14	—	—	—
Blattsalat	31 ± 0,35	—	—	—	—	—
Endivien	—	—	—	46 ± 42	—	—
Grüne Bohne	—	—	39 ± 6	12	—	—
Tomate	—	—	8 ± 3,1	—	—	—
Roter Pfeffer	—	—	—	—	11 ± 4	—
Sellerie	—	—	—	—	—	108
Wasserrübe	—	—	7,3	48	—	—
Radies	—	4 ± 0,62	—	6,2 ± 1,5	—	—
Meerrettich	—	6 ± 0,01	—	—	—	—

— = Nicht nachweisbar oder Nachweisgrenze; freie Felder = nicht untersucht; ohne SD = Einzelwert

Aus den Daten (Tab. 2 und 3) ist ersichtlich, daß es flavonolreiches Obst und Gemüse gibt. Flavonglykoside sind in diesem Rahmen nur bedingt zu nennen, da dem Apigenin-Wert für Sellerie eine wesentlich niedrigere Gehaltsangabe für anderes Knollenmaterial (Herrmann 1991b) gegenübersteht. Kämpferolglykoside können in Erdbeeren und Kohlarten überwiegen und machen in Porree und Endivien, auch nach früheren Befunden (Herrmann 1976), allein den Flavonoidgehalt aus. Dagegen wird in Apfel, Aprikose, Blatt- und Kopfsalat sowie der Zwiebel nur Quercetin als Aglykon gefunden. In den unreifen Früchten der grünen und auch der gelben Bohnen herrschen seine Glykoside gegenüber denen des Kämpferols vor, wie eigene Daten belegen (Hempel und Böhm 1996; Abb. 2).



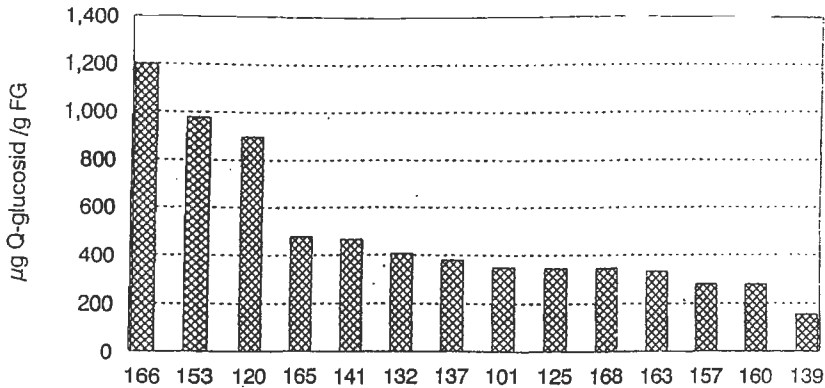
**Abb. 2:** Flavonolgehalte in gelben und grünen Bohnen, ermittelt durch Addition der entsprechenden HPLC-Peakflächen und ausgedrückt als Äquivalente der 3-O-Rutinoside von Quercetin (Q) und Kämpferol (K)

Die sehr hohe Flavonolkonzentration in der Zwiebel (Tab. 2) wird durch Gehaltsbestimmungen an mehreren Sorten mit einem Höchstwert von 62 mg Quercetin/kg Frischgewicht (Bilyk et al. 1984) in Frage gestellt, durch solche mit Maxima von 286 mg Quercetin (Patil et al. 1995) und mehr als 1000 mg Quercetinglykosid je kg frischer Zwiebeln (Leighton et al. 1992, Böhm et al. 1996) aber bestätigt. Allerdings zeigen auch diese Untersuchungen die bekannten Unterschiede im Flavonoidniveau verschiedener Sorten (Beispiel Abb. 3). Während in weißen Zwiebeln Flavonol praktisch fehlt (Patil et al. 1995) wurden für Sorten mit gefärbter Schale Mindest-werte von 155 mg, 60 mg und 54 mg/kg Frischgewicht, aber auch eine kaum nachweisbare Menge für „Red Hamburger“ mitgeteilt (Böhm et al. 1996, Patil et al. 1995, Leighton et al. 1992, Bilyk et al. 1984). Die letzte Angabe kann nicht für einen allgemein niedrigen Flavonolgehalt anthocyanbildender Zwiebeln sprechen, da die eigenen Analysen einen Höchstwert an Quercetinglykosid in „Red Baron“ ergaben und auch die anderen roten Zwiebelsorten („Piroska“, „Csardas“) nicht flavonolarm sind (Abb. 3).

Tabelle 3 Flavonolgehalt in Früchten mit Schalen (mg/kg FG) und in Fruchtsäften (mg/l) nach Hertog et al. 1992, 1993

Frucht/ Fruchtsaft	Kämpferol	Quercetin	Myricetin
Erdbeere	12	8,6	—
Apfel	—	36 ± 19	—
Birne	—	6,4 ± 3,4	—
Süßkirsche	—	15	—
Pflaume	—	9	—
Aprikose	—	25	—
Pfirsich	—	—	—
Rote Johannisbeere	—	13	—
Weintraube (grün, blau)	—	12 - 15	—
Traubensaft	—	4,4	6,2
Apfelsaft	—	2,5	< 0,5
Pampelmusensaft	—	4,9	< 0,5
Zitronensaft	—	7,4	< 0,5
Orangensaft	—	3,4	< 0,5

FG = Frischgewicht; — = nicht nachweisbar oder Nachweisgrenze; ohne SD = Einzelwert



Zwiebel-Sorten: 166 = Red Baron; 153 = Früka; 120 = Rijnsburger 4/Lagergold; 165 = Piroška; 141 = Clipper; 132 = Bronze Age; 137 = Doris; 101 = Bimförmige; 125 = Copra; 168 = Wolska; 163 = Csardas; 157 = Zittauer Gelbe; 160 = Stuttgarter Riesen; 139 = Alls Craig

Abb.3: Gehalte an Glucosiden von Quercetin (Q) in Zwiebelsorten, ermittelt durch Addition der HPLC-Peakflächen und ausgedrückt als Äquivalente von Quercetin-3-O-glucosid (Hempel et al. 1996)

Eine Bewertung einzelner Obst- und Gemüsesorten bezüglich ihres Gehaltes an Flavonol- oder Flavonglykosiden ist dadurch erschwert, daß die Ausprägung dieser quantitativen Merkmale erwartungsgemäß stark von Umweltbedingungen beeinflusst wird. So fanden wir in den Vegetationsperioden 1993 und 1995 entgegengesetzte Rangfolgen für den Flavonolgehalt ausgewählter gelber und grüner Bohnen mit Ausnahme der Sorte „Tuf“ (Abb. 2). Dieser Genotyp scheint bei unterschiedlichem Vegetationsverlauf vergleichsweise hohe Konzentrationen an Quercetin- und Kämpferolglykosiden zu besitzen und ist deshalb hinsichtlich der Flavonoidaufnahme in der Nahrung besonders interessant (Böhm et al. 1996). Bei Zwiebeln (Bilyk et al. 1984, Patil und Pike 1995), Salatköpfen (Herrmann 1976, Bilyk et al. 1985) und Äpfeln (Herrmann 1976) ist der Gehalt an Flavonoglykosiden im Innern dieser Pflanzenorgane teilweise erheblich geringer als in äußeren Schichten. Das wird mit der Lichtabhängigkeit der Flavonoidbiosynthese begründet. Da aber offensichtlich die äußere Epidermis einer Zwiebelschuppe einen höheren Flavonolgehalt besitzt als die innere der vorangehenden (Starke und Herrmann 1976) und für die Anthocyankonzentration im Rotkohl kein drastischer Abfall von außen nach innen beschrieben wurde (Mazza und Miniati 1993), spielt eine genetisch bedingte Enzymausstattung der Gewebe wahrscheinlich auch eine Rolle.

In Tabelle 2 fehlen Gemüsearten, die nach weitgehend übereinstimmenden Angaben von Herrmann (1991b) und Hertog et al. (1992) praktisch frei von Flavonol- und Flavonglykosiden sind, z. B. Weißkohl, Blumenkohl, Kohlrabi, Chicoree, Gurke, Erbse, Schwarzwurzel, Möhre.

### **Einzelne Gemüseflavonole und ihre antioxidative Wirkung**

Den sortenbedingten Unterschieden und vegetationsbedingten Schwankungen im Gehalt von Flavonoglykosiden stehen im allgemeinen eine große Einheitlichkeit und Konstanz des Spektrums dieser Inhaltsstoffe in den eßbaren Teilen von Pflanzen gegenüber. Das konnte auch für genußfähige, also unreife Früchte gelber und grüner Bohnen gezeigt werden, die von uns erstmalig untersucht wurden (Hempel und Böhm 1996). Elf unter insgesamt 12 Sorten besaßen als Hauptkomponenten die 3-O-Rutinoside und 3-O-Glucuronide von Quercetin und

Kämpferol (Abb. 4 A und C). Die beiden HPLC-Profile werden gefunden bei Vortrennung der Extrakte an einer Polyamidsäule (PA). Lediglich eine Bohnensorte weicht durch das bisher noch nicht identifizierte Flavonolspektrum im methanolischen Eluat (Abb. 4 B) von dem allgemeinen Bild ab. Diese Befunde wurden in den Vegetationsperioden 1993 und 1995 erhalten. Vierzehn Zwiebelsorten zeigten 1994 übereinstimmend Quercetin-3,4'-O-bisglucosid und -4'-O-glucosid als Hauptkomponenten (Abb. 5; Hempel et al. 1996).

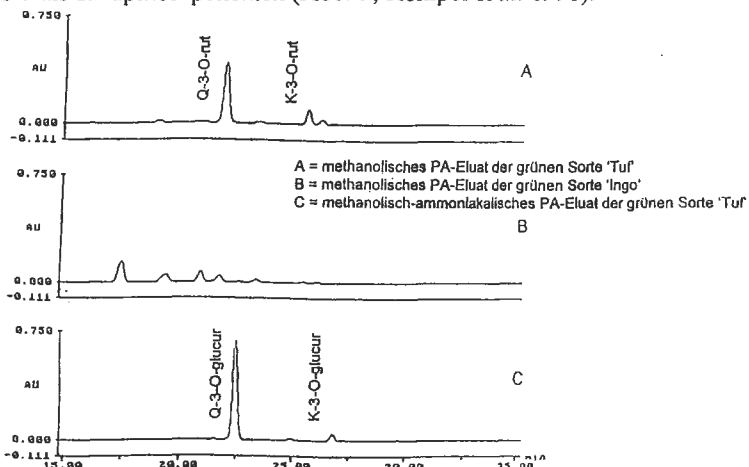


Abb. 4: Trennung der Bohnenflavonole durch RP-HPLC mit Acetonitril/2% Essigsäure-Gradient ( $\lambda = 354 \text{ nm}$ )

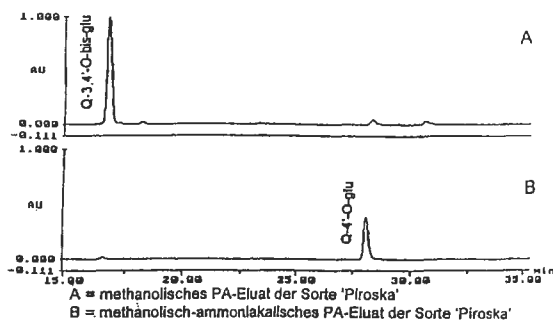


Abb. 5: Trennung der Zwiebelflavonole durch RP-HPLC mit Acetonitril/2% Essigsäure-Gradient ( $\lambda = 354 \text{ nm}$ )

Die antioxidative Wirkung der Flavonole wurde aus der Minderung oxidativ

erzeugter Chemolumineszenz bestimmt, die bei der ECL-Methode in einer Mischung von Natriumperborat, Meerrettichperoxidase, Luminol und p-Jodphenol (Whitehead et al. 1992) und bei der PCL-Methode durch Bestrahlung von Luminol (Popov und Lewin 1996) entsteht. Untersucht wurden bisher die Flavonolglykoside aus Bohnen und ihre Aglykone ergänzt durch Quercetin-3-O-glucosid im Hinblick auf die ähnlichen Flavonolglykoside der Zwiebel und Cyanidin als bereits identifiziertes Aglykon der Anthocyanine einiger Zwiebelsorten. Ausgedrückt in Troloxäquivalenten ergaben sich folgende Reihen für die antioxidativen Aktivitäten:

ECL (0,5  $\mu$ M wäßrige Lösungen)

2,4 (Q) > 1,8 (Q-3-O-gluc) > 1,6 (Q-3-O-rut) > 0,6 (K) > 0,1 (Q-3-O-glucur)  
> 0 (K-3-O-rut und K-3-O-glucur),

PCL (0,4  $\mu$ M methanolische Lösungen)

2 (Cy) > 1,6 (K) > 1,4 (Q und Q-3-O-rut) > 1,3 (Q-3-O-glucur) > 0,1 (K-3-O-glucur)  
> 0 (K-3-O-rut).

Mit beiden Methoden wurde eine sehr geringe antioxidative Wirkung der Kämpferolglykoside gefunden, aber eine unterschiedliche Position des Aglykons. Aus der mit der ECL-Methode ermittelten Sequenz ist ableitbar, daß im wäßrigen System die Hydroxylgruppen in Position 3 und in 3'- und 4'-Stellung sowie die Art des Substituenten am C-Atom 3 für die Radikalfängereigenschaften der Flavonole von Bedeutung sind. Unterschiede der Abfolge in beiden Reihen können durch die Erzeugung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies und die Polarität des Lösungsmittels im jeweiligen System bedingt sein (Raab et al. 1996).

### Schlußfolgerungen

Verbreitung, auftretende Konzentrationen und biologische Aktivitäten von Flavonoiden rechtfertigen die Untersuchung der Frage, ob diese pflanzlichen Sekundärmetaboliten eine stoffliche Grundlage für die epidemiologisch gefundene präventive Wirkung von Obst und Gemüse darstellen. Dabei sollte angesichts der strukturellen Vielfalt der Flavonoide die einzelne, natürlich vorkom-



mende Substanz immer mehr Beachtung finden und auch ihre Interaktion mit anderen Strukturen berücksichtigt werden. Synergistische Wirkungen sind durchaus zu erwarten. Bezüglich des Schicksals der Flavonoide als Nahrungsbestandteile im gastrointestinalen Raum besteht noch erheblicher Klärungsbedarf. Aus diesen und weiteren Gründen erscheinen Empfehlungen zum Verzehr bestimmter Flavonoidqualitäten und -quantitäten noch nicht vertretbar.

## Literatur

- Bentsath, A., Rusznyak, St., Szent-Györgyi, A., 1936: Vitamine Nature of Flavones. Nature (Lond.) 138, 798.
- Bilyk, A., Cooper, P.L., Sapers, G.M., 1984: Varietal Differences in Distribution of Quercetin and Kaempferol in Onion (*Allium cepa* L.) Tissue. J. Agric. Food Chem. 32,274-276.
- Bilyk, A., Sapers, G.M., 1985: Distribution of Quercetin and Kaempferol in Lettuce, Kale, Chive, Garlic Chive, Leek, Horseradish, Red Radish, and Red Cabbage Tissues. J. Agric. Food Chem. 33, 226-228.
- Böhm, H., Hempel, J., Raab, B., 1996: Main flavonoids of vegetables and their antioxidative properties. Proc. Int. Symp. „Phytochemistry of Fruit and Vegetables“, Murcia 1995, in press.
- Das, A., Wang, J.H., Lien, E.J., 1994: Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure - system - activity relationship (SSAR) analysis. Progr. Drug Res. 42, 133-166
- Formica, J.V., Regelson, W., 1995: Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. Fd. Chem. Toxic. 33, 1061-1080.
- Gabor, M., 1988: Szent-Györgyi and the bioflavonoids: New results and perspectives of pharmacological research into benzo-pyrone derivatives. In: Plant Flavonoids in Biology and Medicine II (Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B., Beretz, A., eds.) Alan R. Liss, New York, S. 1-15.
- Grisebach, H., Hahlbrock, K., 1977: Pflanzliche Zellkulturen zur Aufklärung von Biosynthesewegen. Biol. in unserer Zeit 7, 170-177.
- Hara, Y., 1994: Prophylactic Functions of Tea Polyphenols. In: Food Phytochemicals for Cancer Prevention II (Ho, Ch.-T., Osawa, T., Huang, M.-T., Rosen,R.T., eds.) Amer. Chem. Soc., Washington, S. 34-50.
- Heller, W., Forkmann, G., 1994: Biosynthesis of flavonoids. In: The Flavonoids. Advances in Research Since 1986 (Harborne, J.B., ed.) Chapman and Hall, London, S. 499-535.
- Hempel, J., Böhm, H., 1996: Quality and Quantity of Prevailing Flavonoids of Yellow and Green French Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Agric. Food Chem., in press.
- Hempel, J., Raab, B., Böhm, H., 1996: Flavonoid status of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and onion (*Allium cepa* L.) varieties and antioxidative properties of main components. Proc. Intern. Bioflavonoid Symp., Wien 1995, 287-291.
- Herrmann, K., 1976: Flavonols and flavones in food plants: a review. J. Fd Technol. 11, 433-448.
- Herrmann, K., 1991a: Vorkommen, Gehalt und Bedeutung von Inhaltsstoffen des Obstes und Gemüses, II. Ind. Obst- u. Gemüseverw., 170-175.
- Herrmann, K., 1991b: Vorkommen, Gehalt und Bedeutung von Inhaltsstoffen des Obstes und Gemüses, III. Ind. Obst- u. Gemüseverw., 156-160.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., 1996: Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. Eur. J. Clin. Nutr. 50, 63-71.

- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1992: Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2379-2383.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., van de Putte, B., 1993: Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1242-1246.
- Hollman, P.C.H., Devries, J.H.M., Vanleeuwen, S.D., Mengelers, M.J.B., Katan, M.B., 1995: Absorption of Dietary Quercetin Glycosides and Quercetin in Healthy Ileostomy Volunteers. *Amer. J. Clin. Nutr.* **62**, 1276-1282.
- Kühnau, J., 1976: The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: Their Role in Human Nutrition. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* **24**, 117-191.
- Leighton, T., Ginther, Ch., Fluss, L., Harter, W.K., Cansad, J., Notario, V., 1992: Molecular Characterization of Quercetin Glycosides in *Allium* Vegetables. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II* (Huang, M.-T., Ho, Ch.-T., Lee, Ch., eds.) *Amer. Chem. Soc., Washington*, S. 220-238.
- Manach, C., Morand, Ch., Texier, O., Favier, M.-L., Agullo, G., Demigne, Ch., Regeat, F., Remesy, Ch., 1995: Quercetin Metabolites in Plasma of Rats Fed Diets Containing Rutin or Quercetin. *J. Nutr.* **125**, 1911-1922
- Mazza, G., Miniati, E., 1993: Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. CRC Press, Boca Raton.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1994: The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986* (Harborne, J.B., ed.) Chapman and Hall, London, S. 619-652.
- Mouly, P.P., Arzouyan, C.R., Gaydou, E.M., Estienne, J.M., 1994: Differentiation of Citrus Juices by Factorial Discriminant Analysis Using Liquid Chromatography of Flavanone Glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 70-79.
- Patil, B.S., Pike, L.M., 1995: Distribution of quercetin content in different rings of various coloured onion (*Allium cepa* L.) cultivars. *J. Horticult. Sci.* **70**, 643-650.
- Patil, B.S., Pike, L.M., Yoo, K.S., 1995: Variation in the Quercetin Content in Different Colored Onions (*Allium cepa* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **120**, 909-913.
- Pietta, P.G., Gardana, C., Mauri, P.L., Maffei-facino, R., Carini, M., 1995: Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a *Ginkgo biloba* extract. *J. Chromatogr. B* **673**, 75-80.
- Pool-Zobel, B.L., 1990: Mutagen and Carcinogen in Lebensmitteln. *Lebensm.-chem.* **44**, 133-139.
- Popov, I.N., Lewin, G., 1996: Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **31**, 1-8.
- Raab, B., Hempel, J., Böhm, H., 1996: Antioxidative and antigenotoxic properties of bean flavonoids. *Proc. Int. Conf. „Food Factors: Chemistry and Cancer Prevention“*, Hamamatsu 1995, in press.
- Rusznayk, St., Szent-Györgyi, A., 1936: Vitamin P: Flavonols as Vitamins. *Nature (Lond.)* **138**, 27.
- Scheline, R.R., 1991: *Handbook of Mammalian Metabolism of Plant Compounds*. CRC Press, Boca Raton, S. 267-305.
- Starke, H., Herrmann, K., 1976: Flavonole und Flavone der Gemüsearten VI. Über das Verhalten der Flavonole in der Zwiebel. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **161**, 137-142.
- Wald, B., Galensa, R., 1989: Nachweis von Fruchtsaftmanipulationen bei Apfel- und Birnensaft. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **188**, 107-114.
- Whitehead, P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., Hale, A., 1995: Effect of Red Wine Ingestion on the Antioxidant Capacity of Serum. *Clin. Chem.* **41**, 32-35.



## Flavane in pflanzlichen Lebensmitteln

*D. Treutter*

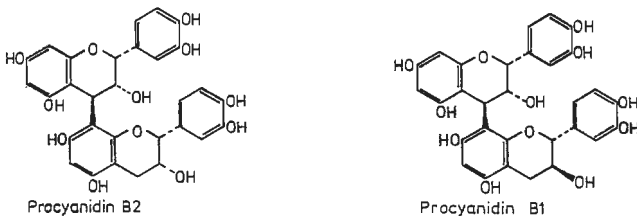
Lehrstuhl für Obstbau der Technischen Universität München, 85350 Freising-Weihenstephan

Die Flavane umfassen eine Klasse von phenolischen Verbindungen, deren prominenteste Vertreter die "Gerbstoffe" sein dürften. Dieser Terminus ist im Bezug auf Nahrungsmittel negativ belegt, weist er doch auf die in der Regel als unangenehm empfundene Adstringenz hin, die man assoziiert in Gedanken an unreife Kakifrüchte, an Schlehen, Speierling oder baumreife Walnüsse. Die genannte Geschmacksempfindung beruht auf der Fähigkeit der Gerbstoffe, Proteinmoleküle zu binden. Dieser Vorgang spielt sich einerseits im Mund ab, wo die Geschmacksrezeptoren beeinträchtigt werden; andererseits ist auch bekannt, daß tanninreiche Kost die Verdaulichkeit von Proteinen behindern kann. Dieser Effekt darf aber sicher nicht überbewertet werden, da der tierische Organismus gewisse Schutzmechanismen entwickelt hat, um negativen Auswirkungen vorzubeugen (Kolodziej 1994). Der vorliegende Aufsatz soll die strukturelle Vielfalt der Flavane in Beziehung setzen zu ihrer möglichen physiologischen Bedeutung. Das soll zunächst aus der Sicht des Pflanzenphysiologen versucht werden. Dem sollen einige neuere Erkenntnisse hinsichtlich der menschlichen Ernährung folgen.

Flavane bilden eine Klasse in der großen Gruppe der Flavonoide, die sich von den einfachen Phenylpropanen ableiten (Böhm 1996). Zur Biosynthese sei nur gesagt, daß eine Vielzahl von teilweise noch nicht genau charakterisierten Enzymen erforderlich ist, um diese Substanzen aufzubauen. Was die biologische Beurteilung der phenolischen Verbindungen betrifft, wäre es sehr schön einfach, wenn man jeder der Flavonoid-Gruppen jeweils eine bestimmte Eigenschaft zuordnen könnte. In diesem Fall wäre nicht innerhalb jeder Gruppe noch einmal zu differenzieren. Daß Letzteres aber notwendig ist, soll anhand der Flavane gezeigt werden.

Die prominentesten Vertreter dieser Klasse sind Catechin und Epicatechin, die sich nur in der räumlichen Anordnung der OH-Gruppe am asymmetrischen C3-Atom unterscheiden. Aus diesen beiden monomeren Strukturen bauen sich die entsprechenden Oligomeren auf, die man als Procyanidine bezeichnet. Die Vielfalt wird durch verschiedenartige Verknüpfungsmöglichkeiten noch erhöht. Dazu kommen die Procyanidine, die sich aus Catechin und Epicatechin-Bausteinen zusammensetzen (Porter et al. 1982, Santos-Buelga et al. 1995). Abb. 1 zeigt die Procyanidine B2 und B1, die sich aus zwei Epicatechin-Einheiten bzw. einer Epicatechin und einer Catechin-Einheit zusammensetzen.

**Abb. 1:** Beispiele für Procyanidine



In der Natur kommen außer Catechin und Epicatechin noch weitere Monomere vor, die sich in der Zahl der OH-Gruppen unterscheiden. Hier sind Gallocatechin und Epigallocatechin sowie Afzelechin zu nennen. In Analogie zu den Procyanidinen existieren auch die entsprechenden oligomeren Verbindungen, die man Prodelphinidine bzw. Propelargonidine nennt. Die Zahl der Oligomeren, die sich aus Mischungen der genannten monomeren Grundgerüsten aufbaut, ist bereits sehr unübersichtlich. Zusätzlich zu den freien Procyanidinen kann man sie acyliert (z.B. mit Gallussäure) und, seltener, glycosidiert finden.

Die biologische Bedeutung der Flavane und der Flavonoide generell ist seit langem bekannt. So findet man beispielsweise in zahlreichen Heilmitteln und Tees der traditionellen Volksmedizin Flavane als Wirkstoffe. Bereits 1936 wies der ungarische

Nobelpreisträger Szent-Györgii auf die Bedeutung der Flavonoide als Antiskorbut-Faktor in Nahrungsmitteln hin (Bensath et al. 1936). Er stellte die Flavonoide den Vitaminen in ihrer Bedeutung gleich. Das wurde allerdings von den Ernährungsphysiologen bis heute nicht akzeptiert. Wahrscheinlich liegt das daran, daß es quasi unmöglich ist, eine zwar vitaminreiche aber flavonoid-freie Diät zusammenzustellen (Regnault-Roger 1988).

Die Tatsache, daß Ernährungsphysiologen in jüngster Zeit Gefallen an diesen Sekundärstoffen finden, ist recht erstaunlich und wird Pflanzenphysiologen mit Genugtuung erfüllen. Denn in nahezu allen Bereichen der Biologie ist die medizinische Forschung der Botanik weit voraus. Doch die Bedeutung der Flavonoide hat die Pflanzenphysiologie zuerst begriffen. Aber auch bei den Botanikern war ein langwieriger Lernprozeß nötig. Noch Anfang der 70er Jahre herrschte auch in der botanischen Wissenschaft die Meinung vor, daß es sich bei den phenolischen Inhaltsstoffen um Abfallprodukte handle, deren strukturelle Vielfalt rein zufällig zustandekäme (Swain 1977). Inzwischen werden die Flavonoide von Pflanzenphysiologen und Phytopathologen sehr ernst genommen (Tab. 1). Man erkennt zunehmend, daß sich scheinbar geringfügige strukturelle Modifikationen des Grundgerüsts schon deutlich auf die biologische Aktivität auswirken können. Das gilt beispielsweise für den oft wenig beachteten Grad der Glykosidierung, der im Fall mancher Wirt-Parasit-Beziehungen darüber entscheidet, ob ein Flavonoid von bestimmten Mikroorganismen als Signal erkannt wird oder nicht (Mo et al. 1995).

**Tab. 1:** Bedeutung der Flavan-3-ole aus Sicht der Pflanzenphysiologie und Phytopathologie

Streußmetaboliten	Stabilisierung der Zellmembranen, UV-Schutz, Antioxidantien und Radikalfänger
Wachstumsregulatoren:	Cofaktoren der Peroxidasen (IES-Oxidase)
Fraßschutz:	Adstringenz, Fällung von Proteinen
Krankheitsresistenz:	physikalische Barriere, Hemmung lytischer Enzyme (Proteasen, Pektinasen, Cellulasen, Amylasen), antimikrobielle und antivirale Wirkung

Auf die biologische Bedeutung der Flavanole weist schon die Tatsache hin, daß sie von der Pflanze nur in speziell dafür vorgesehenen Zellen produziert bzw. einlagert

werden. Das sind in der Regel Abgrenzungs- bzw. Rindengewebe (Feucht und Treutter 1989, Treutter und Santos-Buelga 1995, Feucht et al. 1994a). Ein weiterer Hinweis auf die biologische Aktivität der Flavane leitet sich aus der Beobachtung ab, daß sie von Pflanzen in Streßsituationen sehr stark angereichert werden (Feucht et al. 1994b) Tab. 2 faßt Berichte zusammen, die die biologische Aktivität der Flavanole in Beziehung zu deren Struktur beschreiben. In der ersten Spalte (Tab. 2) ist das Radikalfängerpotential einiger Flavane in einem Testsystem mit Metmyoglobin und  $H_2O_2$  aufgelistet. Alle getesteten Flavane zeigten eine bessere Wirkung als die Vitamine C und E. Auch innerhalb der Flavane gibt es deutliche strukturbedingte Differenzen im Wirkungsgrad. Der beste Effekt wurde für Epicatechin-3-O-gallat ermittelt, der für den Vergleich auf 100% gesetzt wurde. Auch im System mit Xanthin/Xanthinoxidase als Radikale generierendes System (Tab. 2, Spalte 2) zeigen sich Abstufungen im Wirkungsgrad und alle Flavane waren effektiver als Vitamin C. Ein ähnliches Resultat erhielten wir in einem weiteren Test (Phenazinmethasulfat/NADH; Spalte 3), in dem Vitamin C sogar als Prooxidans wirkte.

Besonders interessant ist die Hemmung der LDL-Oxidation (Tab. 2, Spalte 4). Man nimmt an, daß Oxidationsprodukte der "Low-Density-Lipoproteins" für die Entstehung von Arthritis verantwortlich sind. In diesem Fall war ein trimeres Procyanidin Spitzenreiter und alle Flavane übertrafen die Wirkung von Vitamin E. Auch hinsichtlich der Hemmung der Tumorproduktion (Spalten 5 und 6) gibt es strukturbedingte Unterschiede in der Wirkung. Die aufgeführten Autoren arbeiteten mit Mäusen, an deren Nackenhaut die Tumorbildung induziert wurde. Als Promotor diente TPA, dessen Effekt auf die beiden biochemischen Marker der Tumorbildung "Ornithin-Decarboxylase" und "Hydroperoxid" wurde auf 100% gesetzt. In diesem Fall sind die oligomeren Verbindungen besonders wirkungsvoll. Bezüglich der Hemmung der Lipoxygenase (Tab. 2, Spalte 7) zeigte Epigallocatechin den besten Effekt. Hinsichtlich der Antimutagenität (Spalte 8), die im Salmonellen-Reversionstest untersucht wurde, entscheidet offenbar der Polymerisationsgrad über die Wirkung.

**Tab. 2:** Biologische Aktivität von Flavanolen in Beziehung zu deren Struktur

	Radikalfänger-Potential	Radikalfänger-Potential	Radikalfänger-Potential	Hemmung der LDL-Oxidation	Tumor-Promotion (Promotor TPA=100%) Ornithin-Decarboxylase	Hydroperoxid-Produktion	Hemmung der Lipoxigenase	Anti-Mutagenität, Salmonella-Reversions-Test gegen IQ
Literatur	1	2*	2**	3	4,5		6	2
Vitamin E	20			44				
Vitamin C	20	35	0					
Catechin	49	75	72	97	68	108	50	0
C(4,8)C		84	72	79				
C(4,6)C		90	65	43				
C(4,8)C(4,8)				77				
Epicatechin	51	80	76	97	65	102	10	0
E(4,8)E		93	79	93	44	64		20
E(4,6)E		94	50					
E(4,8;2,7)E		84	95					
E(4,8)E(4,8)E		92	67	<u>100</u>	10	59		45
E(4,6)E(4,6)E		99						
E(4,8;2,7)E(4,8)entE		99						
E(4,8)E(4,8;2,7)E		98						
tetramer		99						
polymer								96
C(4,8)E				59	36	61		
C(4,6)E				94				
E(4,8;2,7)C(4,8)E		98						
E(4,8)C					41	66		
Gallocatechin								
Epigallocatechin	77	96	85				100	
Epicatechin-3-O-gallat	<u>100</u>	82	<u>100</u>					
Epigallocatechin-3-O-gallat	96	<u>100</u>	88					

1, Rice-Evans et al. 1995; 2, Treutter et al. 1996; 3, Teissedre et al. 1995; 4, Perchellet et al. 1994; 5, Gali et al. 1995; 6, Hugues et al. 1994;

\*, Xanthin/Xanthin-Oxidase; \*\*, PMS/NADH; nähere Erklärung im Text

In Fütterungsversuchen mit Ratten (30 - 60 mg/kg Körpergewicht und Tag), denen ein Extrakt aus Traubenkernen verabreicht wurde, konnte eine signifikant entzündungshemmende Wirkung festgestellt werden sowie eine Abnahme der Kapillarpermeabilität. (Tebib et al. 1994). Außerdem konnte man feststellen, daß die Cholesterinwerte im Plasma und in der Leber abnahmen, wenn gleichzeitig mit cholesterinreicher Nahrung polymere Flavane verabreicht wurden.

Wie ist die mögliche biologische Wirkung von Flavanol-Mischungen unter Berücksichtigung der Aufnahmemenge zu beurteilen? Diese Frage ist sicher nicht abschließend zu beurteilen. Deshalb seien nur einige grundsätzliche Überlegungen angestellt. Wie bereits erwähnt, gibt es eine ganze Reihe pflanzlicher Heilmittel, Tees und Tinkturen, deren Wirksamkeit auf ihrem Flavanol-Gehalt beruht. Dazu gehört beispielsweise der Rhabarber, der in der fernöstlichen traditionellen Medizin zur Behandlung von Bluthochdruck, Nierenleiden, Nesselsucht und Verstopfung eingesetzt wird. Crataegus-Präparate sind hierzulande sehr bekannt und werden eingesetzt bei Erkrankungen der Blutgefäße, zur Verbesserung der Herzleistung, bei Kreislaufbeschwerden, bei Bluthochdruck. Sie wirken beruhigend, harntreibend und krampflösend. Die antioxidative Wirkung von Crataegus-Extrakten ist mit ihrem Gehalt an Catechinen und Proanthocyanidinen korreliert (Bahorun et al. 1994). Die bei der Anwendung verschiedener Crataegus-Präparate täglich verabreichte Dosis beläuft sich auf etwa 15 mg monomere und oligomere Flavane.

Über das Vorkommen von Flavanen in pflanzlichen Nahrungsmitteln ist insgesamt wenig bekannt. In Tab.3 ist zusammengestellt, welche Flavane in pflanzlichen Nahrungsmitteln und Getränken bisher gefunden wurden. Rotwein, grüner Tee und auch Bier weisen eine beachtliche Palette auf. Bei den meisten untersuchten Obstarten dominieren Catechin und Epicatechin und die von diesen abgeleiteten Oligomeren.

Die Frage, wieviel Obst und Gemüse man essen muß, um damit eine gesundheitsförderliche Dosis an Flavanen aufzunehmen, läßt sich selbstverständlich nicht einfach am Flavangehalt der Nahrungsmittel ausmachen.



**Tab. 3:** Vorkommen von Catechinen und Proanthocyanidinen in pflanzlichen Nahrungsmitteln

	Rotwein	Grüner Tee	Johannisbeere	Stachelbeere	Gerste	Hopfen	Bjler	Puffbohne	Preiselbeere	Heidelbeere	Erdbeere	Cherimoya	Walnuß	Apfel	Apfelsaft	Cider	Eberesche	Speierling	Mispel	Weißdorn	Himbeere	Brombeere	Kirsche	Avocado	Birne	Birnsaft
<b>Catechin</b>																										
C(4,8)C																										
C(4,6)C																										
C(4,8;2,7)C																										
C(4,8)C(4,8)C																										
<b>Epicatechin</b>																										
E(4,8)E																										
E(4,6)E																										
E(4,8;2,7)E																										
E(4,8)E(4,8)E																										
E(4,6)E(4,6)E																										
tetramer																										
pentamer																										
C(4,8)E																										
C(4,6)E																										
E(4,8)C																										
E(4,8)E(4,8)C																										
<b>Gallocatechin</b>																										
GC(4,8)GC																										
GC(4,8)GC(4,8)GC																										
<b>Epigallocatechin</b>																										
GC(4,8)C																										
GC-GC-C																										
GC-C-C																										
C-GC-C																										
GC(4,8)E																										
GC(4,8)EGC																										
<b>Epicatechin-3-O-gallat</b>																										
E(4,8)E-3-O-gallat																										
E(4,8)E-3'-O-gallat																										
E(4,8)C-3-O-gallat																										
<b>Epigallocatechin-3-O-gallat</b>																										
Literatur	1,2	3,4	5	5	6,7	7	8	9	10	11	10	12	13	10,14	15,16	17	10	13	18	10,13,	10	10	5,10	10	18,20	15

1, Treutter, Santos-Buelga, 1995; 2, Prize et al. 1995; 3, Prize, Spitzer, 1993; 4, Feldheim, 1994; 5, Stöhr, 1975; 6, Brandon et al., 1982; 7, McMurrrough, 1981; 8, McMurrrough, 1994; 9, Kolodziej, Helsper, 1993; 10, Thompson, 1972; 11, Brenneisen, 1981; 12, Weinges et al. 1969; 13, Treutter, 1995; 14, Mayr et al., 1995; 16, Mayr, Treutter, 1996; 17, Lea, Arnold, 1978; 18, Wagner, 1979; 19, Haslam, 1989; 20, Mosel, 1974.

Die Kenntnis um die in pflanzlichen Nahrungsmitteln auftretenden Konzentrationen (Tab. 4) ist nur eine Voraussetzung für eine mögliche Antwort. Die tatsächlich resorbierte Menge an Flavonen wird unter anderem vom Pflanzengewebe mitbestimmt, denn die Affinität besonders der oligomeren Proanthocyanidine zu pflanzlichen Zellwänden (Cellulose, Pektin) ist sehr hoch und beeinträchtigt ihre Löslichkeit (Ozawa et al. 1987). Nach oraler Verabreichung von Catechin fanden Girffiths und Barrow (1972) 2-3% der aufgenommenen Dosis im Blut wieder. 44% des verabreichten Catechins verließen nach 24 Stunden den Verdauungstrakt. A. Franke (1994, mdl. Mitteilung) stellte eine Catechin-Sorption von 11% und Waterhouse (1995) sogar von 50% fest.

Insgesamt kann man festhalten, daß Flavane das Potential zu gesundheitsfördernder Wirkung tragen. Für eine endgültige Beurteilung sind allerdings noch zahlreiche Untersuchungen erforderlich, die die Analytik, die Resorption und ernährungsphysiologische Aspekte umfassen.

**Tab. 4:**Flavanolgehalte von Früchten und Getränken

		Stichproben- umfang	Quelle
Apfel	1 - 3 mg/100g	27	Mayr/Treutter 1996
Birne	2 - 17 mg/100g	16	Amiot et al. 1995
Erdbeeren	4 - 50 mg/100g	23	Treutter et al. 1995
Apfelsaft (frisch gepreßt)	30 - 600 mg/l	10	Mayr/Treutter 1996
Apfelsaft	11 - 115 mg/l	35	Spanos et al. 1990
Apfelsaft (frisch gepreßt)	350 - 750 mg/l		Suárez-Vallés et al. 1994
Cider	2900 - 3500 mg/l	3	Lea/Arnold 1978
Traubensaft (rot)	150 - 170 mg/l		Jaworski/Lee 1987
Rotwein	250 - 280 mg/l	2	Ricardo-da-Silva 1992
Rotwein	60 - 190 mg/l	14	Treutter/Santos-Buelgal1995
Weißwein	1 - 5 mg/l	8	Treutter/Santos-Buelgal1995
Bier	0,6 - 1 mg/l		Hayes et al. 1987
Bier	4 - 9 mg/l	2	McMurrough/Beart 1994
Grüner Tee	8000 -12000 mg/100g	8	Price/Spitzer 1993

## Literaturverzeichnis

- AMIOT, M.J., M. TACCHINI, S.Y. AUBERT, W und OLESZEK (1995): Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1132-1137.
- BAHORUN, T., F. TROTIN, J. POMMERY, J. VASSEUR und M. PINKAS (1994): Antioxidant activities

- of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Med.* **60**, 323-328.
- BENSATH, A., T. RUYSNYAK und A. SZENT-GYÖRGII (1936): Vitamine nature of flavones. *Nature* **138**, 789-793.
- BÖHM, H., J. HEMPEL und R. RAAB (1996): Flavonoide als natürliche Inhaltsstoffe mit biologischer Wirkung. In: XXXI. Vortragstagung (Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel), Hrsg.), Kiel.
- BRANDON, M.J., L.Y. FOO, L.J. PORTER und P. MEREDITH (1982): Proanthocyanidins of barley and sorghum: composition as a function of maturity of barley ears. *Phytochemistry* **21**, 2953-2957.
- BRENNEISEN, R. und E. STEINEGGER (1981): Zur Analytik der Polyphenole der Früchte von *Vaccinium myrtillus* L. (Ericaceae). *Pharm. Acta Helv.* **56**, 180-185.
- FELDHEIM, W. (1994): Tee und Tee-Erzeugnisse. *Lebensmitteluntersuchung und Lebensmitteltechnologie*. Bd. 23., Berlin.
- FEUCHT, W. und D. TREUTTER (1989): Phenolische Naturstoffe. Ihre Bedeutung für Gartenbau, Land- und Forstwirtschaft. Obst- und Gartenbauverlag, München.
- FEUCHT, W., E. CHRIST und D. TREUTTER (1994a): Flavanols as defence barriers of the fruit surface. *Angew. Botanik* **68**, 122-126.
- FEUCHT, W., D. TREUTTER und E. CHRIST (1994b): Accumulation of flavanols in yellowing beech leaves from forest decline sites. *Tree Physiology* **14**, 403-412.
- GALI, H.U., E.M. PERCHELLET, X.M. GAO, J.J. LARCHESY und J.P. PERCHELLET (1993): Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric, and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis in vitro. *Planta Med.* **59**, 33-43.
- GRIFFITHS, L.A. und A. BARROW (1972): The fate of orally and parenterally administered flavonoids in the mammal. The significance of biliary excretion. *Symposia Angiologica Santoriana*. 4th int. Symp., Fribourg. *Angiologica* **9**, 162-174.
- HASLAM, E. (1989): *Plant Polyphenols. Vegetable tannins revisited.*, Cambridge University Press, Cambridge.
- HAYES, P.J., M.R. SMYTH und I. MCMURROUGH (1987b): Comparison of electrochemical and ultraviolet detection methods in high-performance liquid chromatography for the determination of phenolic compounds commonly found in beers. Part 2. Analysis of beers. *Analyst* **112**, 1205-1207.
- HUGUES, M., F. RIHARD-FORGET, J.M. THIRY, P. BOIVIN und J. NICOLAS (1995): Inhibition of horse bean (*Vicia faba* L.) lipoxygenase by some phenolic structures. In: *Polyphenols 94* (INRA, Hrsg.), Bd. 69, Paris, S. 169-170.
- JAWORSKI, A.W. und C.Y. LEE (1987): Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 257-259.
- KOŁODZIEJ, H. und J.P.F.G. HELSPER (1993): Proanthocyanidins from *Vicia faba* and their trypsin inhibitor activity. *Planta Med.* **59 Suppl.**, A689.
- KOŁODZIEJ, H. (1994): Gerbstoffe in Nahrungs- und Futtermitteln - Fluch oder Segen? In: XXIX. Vortragstagung. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel), Hrsg. Quedlinburg, 88-121.
- LEA, A.G.H. und G.M. ARNOLD (1978): The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.* **29**, 478-483.
- MAYR, U. und D. TREUTTER (1996): Vorkommen und Gehalte an Flavanolen in Apfelfrüchten und -säften. In: XXXI. Vortragstagung (Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel), Hrsg.), Kiel.
- MAYR, U., D. TREUTTER, C. SANTOS-BUELGA, H. BAUER und W. FEUCHT (1995): Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves. *Phytochemistry* **38**, 1151-1155.
- MCMURROUGH, I. (1981): High-performance liquid chromatography of flavonoids in barley and hops. *J. Chromatogr.* **218**, 683.
- MCMURROUGH, I. und T. BEART (1994): *J. Inst. Brew.* **100**, 409-416.
- MO, Y.-Y., M. GEIBEL, R.F. BONSAALL und D.C. GROSS (1995): Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) leaves for plant signal molecules that activate the *syfB* gene required for synthesis of the phytotoxin, syringomycin, by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* **107**, 603-612.
- MOSEL, H.D. und K. HERRMANN (1974): The phenolics of fruits. III. The contents of catechins and hydroxy-cinnamic acids in pome and stone fruits. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **154**, 6-11.

- of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* **26**, 2937-2942.
- PERCHELLET, J. P., X.M. GAO, E.M. PERCHELLET, H.U. GALI, L. RODRIGUEZ und R.W. HEMINGWAY (1994): Antitumor-promoting activity of loblolly pine bark condensed tannin in mouse epidermis in vivo. In: *Polyphenols 94*, Bd. 69, INRA (Hrsg.), Paris, S. 407-408.
- PRICE, W.E. und J.C. SPITZER (1993): Variations in the amounts of individual flavanols in a range of green teas. *Food Chem.* **47**, 271-276.
- REGNAULT-ROGER, C.R. (1988): The nutritional incidence of flavonoids: some physiological and metabolic considerations. *Experientia* **44**, 725-733.
- RICARDO-DA-SILVA, J.M., J.-P. ROSEC, M. BOURZEIX, J. MOURGUES und M. MOUTONNET (1992): Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre grapes and red wines. *Vitis* **31**, 55-63.
- RICE-EVANS, C. (1995): Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants?. *Biochem. Soc. Symp.* **61**, 103-116.
- SANTOS-BUELGA, C., H. KOLODZIEJ und D. TREUTTER (1995): Procyanidin trimers possessing a doubly linked structure from *Aesculus hippocastanum*. *Phytochemistry* **38**, 499-504.
- SPANOS, G. A. und R. E. WROLSTAD (1990): Influence of variety, maturity, processing, and storage on the phenolic composition of pear juice. *J. Agr. Food Chem.* **38**, 817.
- SPANOS, G.A., R.E. WROLSTAD und D.A. HEATHERBELL (1990): Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J. Agr. Food. Chem.* **38**, 1572.
- STÖHR, H. und K. HERRMANN (1975): Die phenolischen Inhaltsstoffe der Johannisbeeren, Stachelbeeren und Kultur Heidelbeeren. Veränderungen der Phenolsäuren und Catechine während Wachstum und Reife von Schwarzen Johannisbeeren. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **158**.
- SUAREZ-VALLES, B., J. SANTAMARIA-VICTORERO, J.J. MANGAS-ALONSO und D. BLANCO-GOMIS (1994): High-performance liquid chromatography of the neutral phenolic compounds of low molecular weight in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2732-2736.
- SWAIN, T. (1977): Secondary compounds as protective agents. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **28**, 479-501.
- TEBIB, K., L. BITRI, P. BESANCON und J.-M. ROUANET (1994): Polymeric grape seed tannins prevent plasma cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats. *Food Chemistry* **49**, 403-406.
- TEISSEDE, P.C., E.N. FRANKEL, A.L. WATERHOUSE, H. PELEG und J.B. GERMAN (1996): Inhibition of in vitro human LDL Oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* **70**, 55-61.
- THOMPSON, R.S., D. JACQUES, E. HASLAM und R.J.N. TANNER (1972): Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction: the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1387-1399.
- TREUTTER, D. (1995): Empfindlicher Nachweis von Catechinen und Proanthocyanidinen in Obst und Wein. In: XXX. Vortragstagung (Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel), Hrsg.), Heilbronn, S. 334-340.
- TREUTTER, D., R. EDENHARDER und C. SANTOS-BUELGA (1996): Antioxidative and antimutagenic procyanidins from horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). in Vorbereitung.
- TREUTTER, D., F. HOBERG und D. ULRICH (1995): Flavanole in Erdbeeren. unveröffentlicht.
- TREUTTER, D. und C. SANTOS-BUELGA (1995): Sensitive detection and identification of catechins and proanthocyanidins by HPLC and post-column-derivatization. In: *Flavonoids and Bioflavonoids 1995* (S. Antus, M. Gábor und K. Vetschera, Hrsg.), Budapest, S. 303-209.
- TREUTTER, D. und C. SANTOS-BUELGA (1995): Empfindlicher Nachweis von Catechinen und Proanthocyanidinen mit HPLC und Nachsäulenderivatisierung. In: *Innovationen in der Kellerwirtschaft. Neue Erkenntnisse über die Bedeutung der Polyphenole im Wein* (Deutscher Weinbauverband, Hrsg.), Bonn, S. 221-229.
- WAGNER, H. (1979): Phenolic compounds in plants of pharmaceutical interest. In: *Biochemistry of Plant Phenolics* (T. Swain, J.B. Harborne und C.F. VanSumere, Hrsg.), Bd. Vol. 12, Plenum Press, New York und London, S. 589-616.
- WATERHOUSE, A.L. (1995): The phenolic antioxidants in wine: Levels and effects. In: *Innovationen in der Kellerwirtschaft. Neue Erkenntnisse über die Bedeutung der Polyphenole im Wein* (Deutscher Weinbauverband, Hrsg.), Bonn, S. 240-243.
- WEINGES, K., W. KALTENHAUSER, H.-D. MARX, E. NADER, F. NADER, J. PERNER und D. SEILER (1968): Procyanidine aus Früchten. *Liebigs Annalen* **711**, 184.



## Phytoestrogens, Naturally Occuring, Hormonally Active Compounds

*Sannti, R.<sup>A</sup>, Mäkelä, S.<sup>B</sup>, Poutanen, M.<sup>C</sup>, Salo,  
L.<sup>A</sup>, Korkman, J.<sup>A</sup>, Kostian, M.-L.<sup>A</sup> and Vihko, R.<sup>C</sup>*

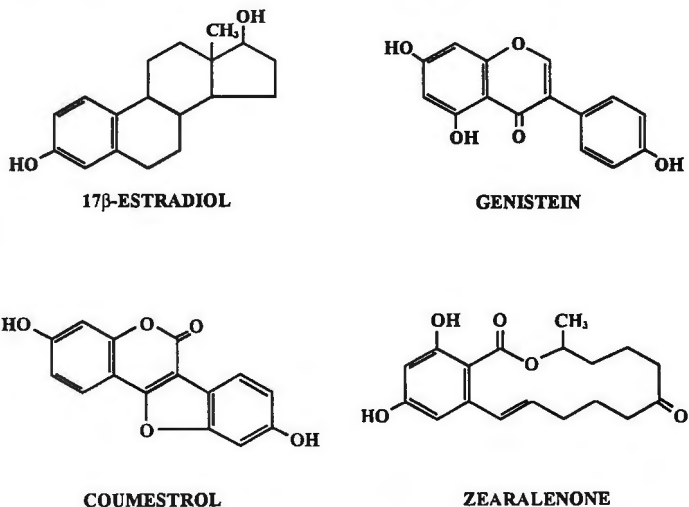
<sup>A</sup>University of Turku, Institute of Biomedicine and Medicity Research Laboratory, FIN-20520 Turku, Finland. <sup>B</sup>The University of Texas Medical School, Department of Pharmacology, Houston, Texas, U.S.A. <sup>C</sup>Biocenter and Department of Clinical Chemistry, University of Oulu, FIN-90220 Oulu, Finland.

Human diets are known to contain various plant-derived, nonsteroidal weakly estrogenic compounds. They are either produced by plants themselves (plant estrogens or phytoestrogens), or fungi which infect plants (mycoestrogens). Structurally, the phytoestrogens are divided in three main classes: isoflavonoids, coumestans and lignans (Fig. 1). Isoflavonoids (such as biochanin A, daidzein, equol, formonetin, genistein and O-desmethylangolensin) and coumestans (such as coumestrol) are formed in numerous plants, especially in soy and other leguminous plants. The richest sources of lignans (enterodiol, enterolactone, matairesinol and secoisolariciresinol) are unrefined grain and flaxseed. Trace amounts of the estrogenic mycotoxin, zearalenone are also found in human diets. Structurally it is resorcylic acid lactone.

The higher intake of phytoestrogens in Asian countries where the mortality rates of breast cancer are low (Wynder et al. 1991) suggest a chemopreventive action for the compounds (Adlercreutz et al. 1995). In a recent study, the highest levels of urinary isoflavonoids were found in Japanese women living in Japan, and the lowest values among the US-born subjects and Japanese immigrants (Adlercreutz et al. 1995). In contrast, the breast cancer rates of US-born residents and of Japanese immigrants in Los Angeles county are higher than the rates of the homeland population in Japan (Shimizu et al. 1991). The main source of isoflavonoid phytoestrogens in Japanese diets is soy which is widely used in Asian

diets and is rich in phytoestrogens. The significance of the soy-derived phytoestrogens could be explained by their ability to antagonize the action of more potent endogenous estrogens in initiation and/or promotion of estrogen-dependent breast carcinogenesis.

Fig. 1



### Dietary estrogens act through estrogen receptor-mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells

Dietary estrogens exert their effects in estrogen-responsive cells by interacting with nuclear estrogen receptor (Mayr et al. 1992; Mäkelä et al. 1994; Miksicek 1995): 1. They have high binding affinities for ER (Martin et al. 1978), and they increase the proliferation rate of ER-positive human breast cancer cells; 2. They also transactivate the reporter construct containing an estrogen responsive element (ERE) in cells which are transiently cotransfected with an expression vector for the estrogen receptor and the reporter construct. This transactivation is blocked by ICI 164 384, an effective antiestrogen, and it does not take place in ER-negative cells. 3. In MCF-7 breast cancer cells, coumestrol, genistein and zearalenone induce the expression of three estrogen-responsive genes, c-myc, pS2 and progesterin receptor (Salo et al., unpublished observations). Coumestrol, genistein and zearalenone, representing three structurally different phytoestrogen groups had additive effects

with  $17\beta$ -estradiol in the presence of the  $17\beta$ -estradiol concentration giving submaximal stimulation, and none of the phytoestrogens we studied (at concentrations below  $1\ \mu\text{M}$ ) reduced the estrogen-dependent proliferation of breast cancer cells i.e. had antiestrogenic effects in the presence of  $17\beta$ -estradiol. This means that the phytoestrogens are probably not able to efficiently compete with  $17\beta$ -estradiol for the binding sites of the receptor. The other possibility is that they replace  $17\beta$ -estradiol and exert their own estrogenic activity by estrogen receptor-mediated processes. Therefore, it is not easily conceivable how phytoestrogens could antagonize the estrogen action at the binding sites of the receptor.

### **Estrogen-specific $17\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase Type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens**

In addition to the interaction with ER, dietary estrogens or structurally related compounds, may compete with endogenous estrogens for the active sites of estrogen biosynthesizing and metabolizing enzymes and thus reduce the concentration of biologically active endogenous estrogens at the target cell level. We tested this hypothesis with the estrogen-specific  $17\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase enzyme ( $17\beta$ -HSOR type 1, E.C. 1.1.1.62). In cultured cells, this enzyme is a reductase converting the weak endogenous estrogen, estrone to the hormonally more potent estrogen,  $17\beta$ -estradiol. This estrogen-specific enzyme is found in steroidogenic tissues, placenta and ovary. Besides steroidogenic tissues the enzyme has been found also in cells considered to be estrogen sensitive. The antibodies against the purified enzyme were used to immunolocalize the enzyme protein in breast epithelium and endometrium. The antigen was also demonstrated in epithelium of prostatic urethra and collecting ducts adjacent to estrogen receptor positive stroma. Since  $17\beta$ -HSOR type 1 is involved in both endocrine and intracrine  $E_2$ -biosynthesis, inhibition of the enzyme would decrease the concentration of  $17\beta$ -estradiol in the target tissues.

The capability of phytoestrogens to inhibit  $17\beta$ -HSOR type 1 was tested by using the enzyme purified from human placenta. Coumestrol was the most potent inhibitor of the NADPH-dependent conversion of  $^3\text{H}$ -estrone to  $^3\text{H}$ -estradiol. It showed significant inhibition at the concentration of  $10^{-8}$  mol/L. The inhibition by coumestrol was competitive with  $K_i$  value of 120 nM. Genistein was weakly

inhibitory with  $K_i$  value of more than 1  $\mu\text{M}$ . Zearalenone was completely inactive at the concentration of  $1.2 \cdot 10^{-6}$   $\mu\text{mole/L}$  suggesting differences between the structural requirements of type 1 inhibition and estrogenicity.

The capability of coumestrol and genistein to inhibit estrone reduction in cells was tested by using wild-type and  $17\beta$ -HSOR type 1 transfected T-47D breast cancer cells. The ER-positive T-47D cells which contain some endogenous type 1 activity, were stably transfected with  $17\beta$ -HSOR type 1 cDNA. In transfected cells, over 95 % of the total enzyme activity resulted from the transfected recombinant enzyme. Experiments with  $^3\text{H}$ -estrone and  $^{14}\text{C}$ -estradiol showed that the reaction proceeded in both wild-type and transfected T-47D cells from estrone to  $17\beta$ -estradiol as expected. Both coumestrol and genistein inhibited estrone reduction but not  $17\beta$ -estradiol oxidation in both T-47D cell types but zearalenone (used as a negative control) was completely inactive. In MCF-7 cells in which type 1 enzyme is under the detection limit of the immunoassay, none of the three compounds tested affected the interconversion.

Coumestrol and genistein enhanced the proliferation of wild-type and transfected T-47D cells at serum concentrations which are achievable in countries where soy is widely used (Adlercreutz et al. 1993). At the same concentrations, they inhibited the reduction of estrone to  $17\beta$ -estradiol. However, the rate of cell proliferation was increased equally in the presence of estrone or coumestrol/genistein or both. The inhibition of estrone reduction may thus be without practical consequences when the inhibitor (coumestrol or genistein) was also a relatively potent estrogen *per se*, and probably replaced endogenous estrogen.

### **Inhibition of $17\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells**

Various isoflavonoids and flavonoids were tested in order to determine the structural properties discriminating between enzyme inhibition and estrogenicity. Absence of the hydroxyl group in position 5 of daidzein decreased the inhibition of  $17\beta$ -HSOR type 1 measured in T-47D, but not in assays with the purified type 1 enzyme (Fig. 1; Table 1). Biochanin A and formononetin, the 4'-methoxylated counterparts of genistein and daidzein, did not show any inhibition in the presence of the purified type 1 enzyme and were only slightly inhibitory in T-47D cells.



Knowing the estrogenicity and the relative binding affinities of the tested isoflavonoids (Miksicek 1995; Molteni et al. 1995) we conclude that the compounds with isoflavone structure are not capable of discriminating between the binding sites of the receptor and the active sites of type 1 enzyme.

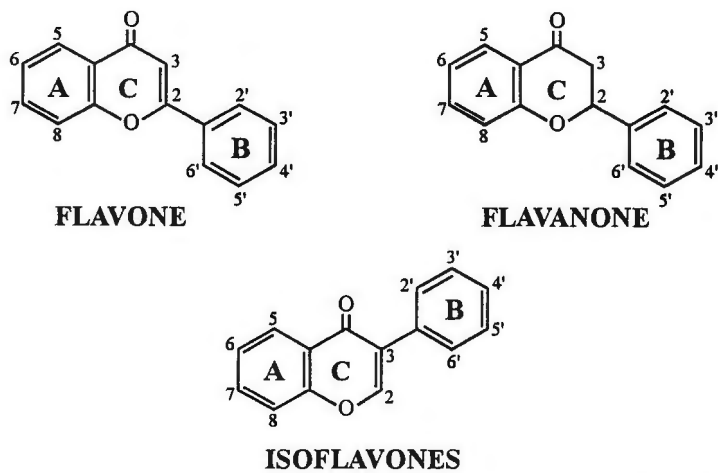
Table 1:

<b>Effect of isoflavones on 17<math>\beta</math>-oxidoreduction</b>				
Conversion of [ <sup>3</sup> H]Estrone to [ <sup>3</sup> H]Estradiol (mean $\pm$ SD, control=100)				
Compound	Trivial name	Concentration	Purified	
		( $\mu$ M)	17 $\beta$ -HSOR type 1	T-47D cells
<b>Isoflavones</b>				
4',7-dihydroxyisoflavone	Daidzein	1.2	68.1 $\pm$ 10.3**	65.6 $\pm$ 3.4***
		0.12	76.3 $\pm$ 11.2*	103.2 $\pm$ 5.1
		0.012	79.0 $\pm$ 19.1	110.3 $\pm$ 5.1
7-hydroxy-4'-methoxyflavone	Formononetin	1.2	97.2 $\pm$ 11.2	77.6 $\pm$ 2.2**
4',5,7-trihydroxyflavone	Genistein	1.2	62.8 $\pm$ 29.9***	39.4 $\pm$ 8.4 ***
		0.12	90.6 $\pm$ 38.2	88.8 $\pm$ 5.2
		0.012	n.d.	92.6 $\pm$ 10.3
5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone	Biochanin A	1.2	91.3 $\pm$ 28.2	85.4 $\pm$ 2.1
		0.12	n.d.	104.2 $\pm$ 2.1
		0.012	n.d.	104.2 $\pm$ 3.6

Flavonoids were tested next (Fig. 2; Tables 2-4). They occur widely in the plant kingdom. Vegetables, fruits, tea, and red wine are the major sources of flavonoids. Flavonoids are considered to be less estrogenic than isoflavonoids (Miksicek 1993). In general, micromolar concentrations of these compounds are needed for estrogenic effects. However, some of them (apigenin, kaempferol, 4',7-di-

hydroxyflavanone and naringenin) have hormonal potencies comparable to those of known phytoestrogens (Miksicek 1995).

Fig. 2



Several flavones and flavanones were found to inhibit estrone reduction catalyzed by the purified  $17\beta$ -HSOR type 1 enzyme. The most active compounds were those substituted at both rings A and B in positions 4',5 and 7, with or without a hydroxyl group at position 3 of ring C. Those compounds were apigenin, acacetin, fisetin, naringenin, kaempferol, kaempferide and galangin. Of all flavonoids tested, the 4'-methoxylated counterparts of apigenin and kaempferol, acacetin and kaempferide were the most potent inhibitors of the purified type 1 enzyme. Apigenin was shown to be a competitive inhibitor of the enzyme with  $K_i$  value of about 400 nM which is higher than that for coumestrol. Comparisons of the chemical requirements of the estrogenicity and the inhibitory capacity suggest some differences. Methoxylation of ring B in position 4' increases the inhibitory capacity of the 4',5,7-trihydroxyflavone with or without the hydroxyl group in position 3 (apigenin versus acacetin and kaempferol versus kaempferide) but decreases the estrogenicity (kaempferol versus kaempferide) (Miksicek 1995).

Table 2:

### Effect of flavone and flavanone derivatives on 17 $\beta$ -oxidoreduction

Compound	Trivial name	Concentration ( $\mu$ M)	Conversion of [ $^3$ H]Estrone to [ $^3$ H]Estradiol (mean $\pm$ SD, control=100)	
			Purified 17 $\beta$ -HSOR type 1	T-47D cells
<b>Flavone derivatives</b>				
Flavone	—	1.2	107.3 $\pm$ 19.6	111.6 $\pm$ 16.1
6-hydroxyflavone	—	1.2	95.6 $\pm$ 17.9	n.d.
7-hydroxyflavone	—	1.2	69.4 $\pm$ 5.2**	103.3 $\pm$ 25.2
5,7-dihydroxyflavone	Chrysin	1.2	96.0 $\pm$ 23.9	79.8 $\pm$ 1.4***
5-hydroxy-7-methoxyflavone	Pinostrobin	1.2	93.1 $\pm$ 11.0	77.9 $\pm$ 13.8
4',5,7-trihydroxyflavone	Apigenin	1.2	57.7 $\pm$ 18.4***	22.5 $\pm$ 5.1***
		0.12	54.2 $\pm$ 6.4**	84.4 $\pm$ 6.6*
		0.012	73.3 $\pm$ 1.2	105.0 $\pm$ 5.0

In cultured T-47D cells, apigenin was the most effective flavonoid showing a significant inhibition of the type 1 enzyme at both 1.2 and 0.12  $\mu$ M concentrations. An additional hydroxyl group at positions 3 of ring C (flavonol structure) present in kaempferol, kaempferide, galangin or in position 3' of ring B (luteolin) and methoxylation in position 4', reduced the inhibitory activity of the compounds in cultured T-47D cells. The flavanone structure (i.e. absence of the double bond between carbons 2 and 3), present in naringenin, inhibited the purified enzyme and also reduced estrone reduction in T-47D cells.

We cannot rule out the possibility that the tested compounds could also affect the activity of other enzymes involved in estrogen metabolism. In fact, there is evidence that flavones and isoflavones inhibit the 17 $\beta$ -oxidation of testosterone and estradiol by 17 $\beta$ -HSOR type 2 but the structural demands and kinetic properties for the inhibition of type 1 and 2 enzymes may be different (Mäkelä et al. Third International Conference on Phytoestrogens. Dec 3-6, 1995. Little Rock, Arkansas). As an evidence for that, hydroxyl group in position 3 of flavones (flavonol structure) markedly increased the inhibitory activity on 17 $\beta$ -estradiol oxidation by type 2 enzyme in PC-3 prostate cancer cells while it reduced the inhibitory activity in T-47D breast cancer cells. Thus, changes in the number and

location of hydroxy groups may discriminate between the inhibition of estrone reduction and estradiol oxidation.

Table 3:

### Effect of flavone and flavanone derivatives on 17 $\beta$ -oxidoreduction

Compound	Trivial name	Conversion of [ <sup>3</sup> H]Estrone to [ <sup>3</sup> H]Estradiol (mean $\pm$ SD, control=100)		
		Concentration	Purified	
		( $\mu$ M)	17 $\beta$ -HSOR type 1	T-47D cells
<b>Flavone derivatives</b>				
5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone	Acacetin	1.2	38.5 $\pm$ 3.8***	58.1 $\pm$ 7.2**
3,5,7-trihydroxyflavone	Galangin	1.2	59.1 $\pm$ 6.9***	109.7 $\pm$ 18.00
3',4',5,7-tetrahydroxyflavone	Luteolin	1.2	111.4 $\pm$ 14.6	59.8 $\pm$ 5.9***
3,4',5,7-tetrahydroxyflavone	Kaempferol	1.2	58.0 $\pm$ 20.8***	83.2 $\pm$ 10.5***
		0.12	79.2 $\pm$ 10.5**	98.4 $\pm$ 7.0
		0.012	137.8 $\pm$ 5.6	96.1 $\pm$ 7.2
3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone	Kaempferide	1.2	26.7 $\pm$ 7.6***	85.2 $\pm$ 14.3
3,3',4',7-tetrahydroxyflavone	Fisetin	1.2	47.2 $\pm$ 9.4***	86.4 $\pm$ 6.4*
3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone	Quercetin	1.2	123.0 $\pm$ 11.8	106.0 $\pm$ 2.6

Moreover, phytoestrogens inhibit human placental aromatase (unpublished data). The velocity measurements were based on the conversion of <sup>3</sup>H-androstenedione to <sup>3</sup>H-estradiol in microsomes. Coumestrol and zearalenone were both slightly inhibitory at the concentrations of 1.2  $\mu$ M while genistein was completely inactive. Placental aromatase is inhibited also by flavonoids (Kellis and Vickery 1984; Ibrahim and Abul-Hajj 1990). The structural demands for the inhibition of aromatase seem to differ considerably from those of 17 $\beta$ -HSOR type 1 and type 2. In conclusion, we have shown that several flavonoids found in human diets inhibit 17 $\beta$ -oxidoreduction of estrogens. Of the compounds tested so far in T-47D breast cancer cells, apigenin, acacetin and naringenin gave the most promising results. Because the effects of phytoestrogens and structurally related compounds *in vivo* cannot be predicted on the basis of the *in vitro* results, extensive further studies are needed to confirm the inhibition of estrone reduction *in vivo* and to characterize their other actions.

**Table 4:****Effect of flavone and flavanone derivatives on 17 $\beta$ -oxidoreduction**

Compound	Trivial name	Concentration ( $\mu$ M)	Conversion of [ $^3$ H]Estrone to [ $^3$ H]Estradiol (mean $\pm$ SD, control=100)	
			Purified 17 $\beta$ -HSOR type 1	T-47D cells
<b>Flavanone derivatives</b>				
<b>Flavanone</b>				
	—	1.2	103.9 $\pm$ 24.8	n.d.
4'-hydroxyflavanone	—	1.2	101.9 $\pm$ 17.3	n.d.
4',5,7-trihydroxyflavanone	Naringenin	1.2	53.0 $\pm$ 11.2***	67.5 $\pm$ 9.6***
3,3',4',5,7-flavan pentol	Catechin	1.2	120.6 $\pm$ 26.7	n.d.

**Naringenin: A weakly estrogenic flavonoid that exhibits antiestrogenic activity**

Recent studies have shown that naringenin has an antiestrogenic action in MCF-7 breast cancer cells (Ruh et al. 1995). Naringenin at the concentrations of 1-1000 nM did not affect cell proliferation. However, cotreatment of the cells with 1 nM 17 $\beta$ -estradiol and 1-1000 nM naringenin, significantly decreased the E<sub>2</sub>-induced cell proliferation. The effects of E<sub>2</sub>, naringenin and their combination were also determined in MCF-7 cells transiently transfected with the pS2-luciferase (LUC) reporter plasmid. Cotreatment of the cells with 1 nM E<sub>2</sub> and 1.0 or 0.1  $\mu$ M naringenin caused a significant decrease in pS2-LUC activity compared with that observed in cells treated with 1 nM E<sub>2</sub> alone. This antiestrogenic activity of naringenin (and possibly of other structurally related flavonoids) combined with its potential capability to inhibit enzymes in estrogen biosynthesis and metabolism may represent mechanisms associated with the chemopreventive action of flavonoids in breast carcinogenesis.

**Weak estrogen-like action of phytoestrogen-rich diets**

There is no data on effects of phytoestrogens (or structurally related compounds) given as pure compounds to humans, and all evidence currently available is indirect and based on experiments with phytoestrogen-rich diets to women. In

postmenopausal women, soy-based foods promoted vaginal cell maturation, which is a sensitive and specific indicator of estrogen exposure (Wilcox et al. 1990; Baird et al. 1995). The effect on vaginal cytology was weak, and no estrogenic effects were seen on the liver (serum SHBG level) or pituitary gland (serum FSH and LH levels). In premenopausal women, soy-diet was shown to lengthen the follicular phase of the menstrual cycle, and suppress the midcycle gonadotrophin surge (Cassidy et al. 1994). These latter effects may be due to the weak estrogenic effect of phytoestrogens in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. There is no evidence indicating that phytoestrogen-rich diets or phytoestrogens would have antiestrogenic capacity in human organism. The lack of the significant estrogenic effects of the phytoestrogen-rich diets suggests that more information about the metabolism of phytoestrogens compounds is needed, as well as more sensitive markers of estrogenic and antiestrogenic effects (Baird et al. 1995).

At high concentrations (more than 1  $\mu\text{M}$  concentrations) phytoestrogens may have effects which are not related to their capability to interact with ER (Adlercreutz et al. 1995). Isoflavonoids, particularly genistein, are potent inhibitors of the tyrosine protein kinase activity of several growth factor receptors and oncogenes. Genistein is also an inhibitor of angiogenesis and DNA topoisomerases associated with tumor growth. At present, there is no evidence that any of these mechanisms would be essential for the chemopreventive action of phytoestrogens in initiation and/or promotion of breast carcinogenesis.

### **The potential risk caused by phytoestrogens to human male reproductive health**

Exposure to exogenous estrogens during the fetal and early postnatal period when estrogens are probably most influential, may induce structural and functional alterations in developing reproductive tract of males. Many of these changes are permanent, and some appear later in life. Males exposed to diethylstilbestrol (DES) in utero or neonatally provide insight into extreme cases of this developmental estrogenization. The DES-induced lesions range from relatively minor structural alterations such as epidymal cysts to more marked changes such as testicular hypoplasia and cancer, cryptorchidism, hypospadias, microphallus and decline in sperm counts.

It is possible that estrogenic xenobiotics other than DES alter sexual differentiation of the males and account for the developmental disorders of the reproductive tract in men and wild life. Phytoestrogens and structurally related compounds have reported to be quantitatively the most important estrogens in human environment (Safe 1995). Their harmful effects in livestock and wild life are well-known (Kaldas and Highes 1989). They can compromise the reproductive success of females in susceptible species but there is very little data on effects of phytoestrogens in males.

In a recent study, Japanese men were shown to have considerably higher levels of isoflavonoids (daidzein and genistein) and lower levels of endogenous estrogens in serum than Finnish men (Adlercreutz et al. 1993). The fact that Finnish men have a higher risk of hypospadias, testicular and prostatic cancers makes it unlikely that isoflavonoid phytoestrogens in amounts present in Asian diets have DES-like actions and that they would contribute to the development of the male genital tract disorders.

### **Conclusions**

\* The intake of phytoestrogens is higher in countries where the incidence of breast, testicular and prostate cancers is low suggesting that these and structurally related plant-derived compounds may have a chemopreventive action. It is unlikely that isoflavonoid phytoestrogens in amounts present in Asian diets have DES-like actions and would contribute to the development of the male genital tract disorders.

\* Phytoestrogens (coumestrol, daizein and genistein) exert their estrogenic activity by interacting with estrogen receptors. There is very little evidence to support the theory that phytoestrogens would act as antiestrogens by competing with  $17\beta$ -estradiol for the bindings sites of the receptor or for the active site of the estrogen biosynthesizing and metabolizing enzymes such as estrogen-specific  $17\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase (type I).

\* Several weakly estrogenic flavonoids widely occurring in eatable plants may also compete with endogenous estrogens for the active site of the estrogen biosynthesizing and metabolizing enzymes such as estrogen-specific  $17\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase (type I) and they could reduce the concentration of biologically active endogenous estrogens at the target cell level. This inhibitory capacity combined with their potential antiestrogenic activity at the level of the

estrogen receptor may represent mechanisms associated with the chemopreventive action of flavonoids in breast carcinogenesis.

## References

- Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet* 342: 1209-10, 1993.
- Adlercreutz H. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Env Health Persp* 103 (Suppl 7): 103-112, 1995.
- Baird DD, Umbach DM, Lansdell L, Hughes CL, Setchell KD, Weinberg CR, Haney AF, Wilcox AJ, McLachlan JE: Dietary intervention study to assess of estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1685-1690, 1995.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell KDR. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 60: 333-340, 1994.
- Ibrahim A-R, Abul-Hajj YJ. Aromatase inhibition by flavonoids. *J Steroid Biochem Molec Biol* 37: 257-260, 1990.
- Kellis JT, Vickery LE. Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science* 225: 1032-1034, 1984.
- Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 103: 1860-1867, 1978.
- Mayr U, Butsch A, Schnieder S. Validation of two *in vitro* test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts. *Toxicology* 74: 135-149, 1992.
- Miksicsek RJ: Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol* 44: 37-43, 1993.
- Miksicsek RJ: Estrogenic flavonoids: Structural requirement for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 44-50, 1995.
- Molteni A, Brizio-Molteni L, Persky V: *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. *J Nutr* 125: 751S-756S, 1995.
- Mäkelä S, Davis VL, Tally WC, Korkman J, Salo L, Vihko R, Santti R, Korach K. Dietary estrogens act through estrogen receptor mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells. *Env Health Persp* 102: 572-578, 1994.
- Mäkelä S, Poutanen M, Lehtimäki J, Kostian M-L, Santti R, Vihko R. Estrogen-specific 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase type I (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 51-59, 1995a.
- Mäkelä S, Poutanen M, Kostian M-L, Lehtimäki N, Salo L, Santti R, Vihko R. Inhibition of 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. Third International Conference on Phytoestrogens. Dec 3-6, 1995b. Little Rock, Arkansas, U.S.A.
- Ruh MF, Zacharewski T, Connor K, Howell J, Chen I, Safe S. Naringenin: A weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochem Pharmacol* 50: 1485-1493, 1995.
- Safe S: Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Env Health Persp* 103: 346-351, 1995.
- Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63: 963-966, 1991.
- Wilcox G, Wahlqvist ML, Burger HG, Medley G. Oestrogenic effects of plant foods in postmenopausal women. *Br J Med* 301: 905-906, 1990.
- Wynder EL, Fujita Y, Harris RE, Hirayama T, Hiyama T. Comparative epidemiology of cancer between the United States and Japan. *Cancer* 67: 746-763, 1991.





## Biosynthese und Gehalte von Phenylpropanen in Nahrungspflanzen bei zunehmender Umweltbelastung

*Volker Leinhos und Hans Bergmann*

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Ernährung und Umwelt, Lehrbereich Lebensmittel pflanzlicher Herkunft/Pflanzenernährung, Naumburger Str. 98, 07743 Jena

### **Problemstellung**

Umwelt- und Klimabelastungen (biotischer und abiotischer Streß) verursachen Veränderungen im pflanzlichen Metabolismus. Dadurch können Ertragsminderungen und Beeinträchtigungen der Qualität entstehen. So synthetisieren Pflanzen im Verlaufe der Ontogenese und als Reaktion auf Streß eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten, die als Abwehr- und Schutzsubstanzen eine verbesserte Anpassung an Belastungssituationen und das Überleben erlauben (Abb. 1). Viele dieser Sekundärmetaboliten beeinträchtigen jedoch die Qualität (Geruch, Geschmack, Verdaulichkeit, Toxizität) pflanzlicher Ernteprodukte und besitzen teilweise antinutritive Wirkungen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Auswirkung von Trocken- und Schwermetallstreß auf den Gehalt qualitätsbestimmender Inhaltsstoffe der Stoffgruppe Phenylpropane sowie die Aktivität der Peroxidase (Enzymaktivität im Ligninbiosyntheseweg) untersucht. Darüber hinaus wurde geprüft, in welchem Umfang durch streßtoleranzinduzierende Substanzen (z.B. Aminoalkohole) die aufgetretenen Veränderungen wieder abgeschwächt werden können.

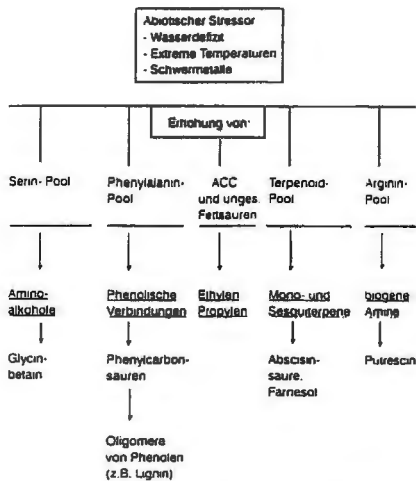


Abb.1 Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten im "Stress"-Metabolismus der Pflanze

## Material und Methoden

### Vegetationsbedingungen und Behandlung der Pflanzen

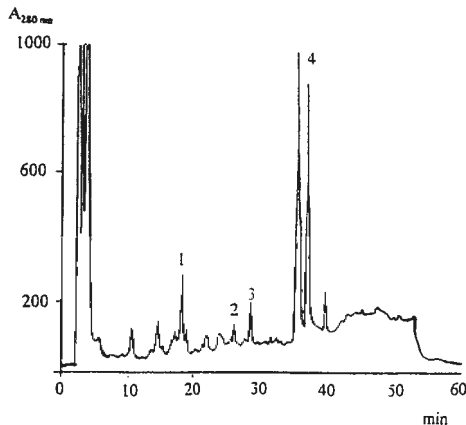
Die Kultivierung der Versuchspflanzen Sommergerste (*Hordeum vulgare* cv. Alexis), Salat (*Lactuca sativa* cv. Amerikanischer Brauner) und Soja (*Glycine max* cv. Dorado) erfolgte in Mitscherlichgefäßen (6 kg Bodensubstrat/Gefäß) bei ertragsbezogenem harmonischem Nährstoffangebot. Die Pflanzen wurden Trockenstressbedingungen (3 Perioden) durch Reduktion der nutzbaren Wasserkapazität (nWK) von 60 % auf 30 % nWK ausgesetzt (Referenzvariante bei 60 % nWK). Die Behandlung der Pflanzen mit dem Aminoalkohol Cholinchlorid (CC) erfolgte durch Sprühapplikation (9 mg CC/Gefäß in 6 mL Wasser) 4 d vor Beginn der ersten Trockenstressperiode (Bergmann et al., 1993). Zur Erzeugung von Schwermetallstress wurden dem Bodensubstrat der entsprechenden Versuchsgefäße 3ppm Cd/Gefäß vor der Aussaat (Salat) zugegeben. Nach der Ernte wurde das Pflanzenmaterial gefriergetrocknet (Frischmaterial, Blätter und Stengel) oder luftgetrocknet (Körner und Bohnen) und anschließend gemahlen.

### Extraktion des Pflanzenmaterials und Analysen

- Phenole: Extraktion des Pflanzenmaterials in 80 %igem Aceton. Bestimmung durch Reversed-Phase HPLC, Gradientenelution (Eluent A: 2 %ige Essigsäure, Eluent B: Methanol), Detektion bei 280 nm (Leinhos and Bergmann, 1995).
- Protein: Homogenisation des Pflanzenmaterials in 10 %iger Trichloressigsäure, Lösung des Proteins mit 1 N NaOH, Proteinbestimmung mittels Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Lowry et al., 1951).
- Peroxidase: Extraktion des Pflanzenmaterials mit 0.05 M Citrat/Phosphat-Puffer pH 5.0. Bestimmung der Peroxidaseaktivität in 0.5 M Citrat/Phosphat-Puffer, pH 5.0, 20 mM Guaiacol, 12.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 470 nm (Lagrimini, 1991).

## Ergebnisse und Diskussion

Der Stoffwechsel von Gerste, Salat und Soja wurde durch Trockenstreß und Schwermetallbelastung beeinflusst und führte zu Veränderungen des Gehaltes von Phenylpropanen. Die Reversed-Phase-HPLC (Gradientenelution) erwies sich als eine geeignete Methode zur Reinigung der Extrakte aus vegetativen und generativen Pflanzenteilen der hier untersuchten Nutzpflanzen sowie zur quantitativen Bestimmung der Phenylpropane Zimtsäure, Cumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure in den Extrakten (Abb. 2)



**Abbildung 2:** HPLC-Chromatogramm phenolischer Verbindungen extrahiert aus Blättern von Salat (*Lactuca sativa* cv. Amerikanischer Brauner). 1: Kaffeesäure, 2: Cumarsäure, 3: Ferulasäure, 4: Zimtsäure. Die Trennung der Extrakte erfolgte mittels Reversed Phase HPLC, detektiert wurde bei 280 nm und 0.02 AUFS.

Wasserdefizit und Schwermetallbelastung während des Wachstums der Pflanzen führte zur Erhöhung des Phenylpropan-Gehaltes im Sproß-Gewebe (Tab. 1). Auffällig war der Anstieg im Kaffeesäuregehalt im Sproß der Gerste (+95 %) und in Blättern von Salat (+67 % bis +154 %) nach Trocken- bzw. Schwermetallstreß gegenüber unbehandelten Kontrollen. Kaffeesäure ist von toxikologischem Interesse, da sie in der Literatur sowohl als Verbindung mit carcinogenem (Gold

et al., 1992) als auch mit anticarcinogenem (Shahrazad and Bitsch, 1995) Potential für Menschen und Tier diskutiert wird. Im Gerstenkorn (generativem Pflanzenteil) betragen die gefundenen Mengen an Phenylpropanen nur etwa 1-2 % der Gehalte, die im Sproß-Gewebe (vegetative Pflanzenteile) beobachtet wurden und waren nach Trockenstreß nur geringfügig verändert. Die Sojabohne (generatives Pflanzenteil der Sojapflanze), hingegen enthielt höhere Kaffee-, Zimt- und Ferulasäure-Gehalte (20-200 µg/g TM) als das Sproß-Gewebe (Tab. 1). In Sojabohnen von gestreßten Pflanzen wurde ein signifikant höherer Ferulasäure-Gehalt (+42 %) gegenüber dem unbehandelten Kontrollen gefunden. Unsere Daten zeigten weiterhin, daß der Proteingehalt negativ und die Aktivität von Peroxidase (Enzymaktivität im Biosyntheseweg des Lignins) positiv mit der Belastungssituation korrelierten (Tab. 2). Die streßinduzierte Erhöhung der Peroxidaseaktivität, sowie die damit auch korrelierenden erhöhten Gehalte von Phenolpropanen (Ligninprekursoren) könnten Teil eines aktiven „Streß“-Abwehrmechanismus der Pflanze sein (vgl. auch Abb. 1). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Literaturdaten (De Jaegher et al., 1985), die zeigten, daß Peroxidaseaktivität und der Gehalt an Phenylpropanen geeignete Indikatoren für Streß sind und auf alterndes stärker lignifizierendes Gewebe hindeuten.

Der in den Experimenten eingesetzte Aminoalkohol Cholinchlorid wirkte streßabschwächend. So wurden in den mit Cholinchlorid vorbehandelten Pflanzen (Gerste und Salat) nach Trockenstreß geringere Gehalte an Kaffee-, Cumar-, Zimt- und Ferulasäure, geringere Peroxidaseaktivität und erhöhter Proteingehalt gefunden als in den unbehandelten, gestreßten Pflanzen (Tab. 1 und 2). Die Wirkstoffanwendung konnte jedoch die Wirkung des Wassermangels nicht vollständig und die der Schwermetallbelastung nur teilweise kompensieren. Unterschiedliche Mechanismen der Reaktion der Pflanze auf die Stressoren Wassermangel und Schwermetallbelastung könnten mögliche Ursachen für die unterschiedliche (streßabschwächende) Wirkung der Aminoalkohole sein. Weitere Untersuchung der Wirkprinzipien von Streß- und Streßabschwächung unter Einbeziehung von streßinduzierten Proteinen und Enzymaktivitäten sind vorgesehen.

## Literaturverzeichnis

- Bergmann, H., Eckert, H. and Leinhos, V., 1993: Resistance to drought in cereal plants. In: Abstracts of the Indo-German Conference on Impact of Modern Agriculture on Environment, pp 127-130, Hisar, India.
- De Jaegher, G., Boyer, N. and Gaspar, T., 1985: Thigmorphogenesis in *Bryonia dioica*: Changes in soluble and wall peroxidases, phenylalanin ammonia-lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. Plant Growth Reg. 3, 133-148.
- Gold, L.S., Slone, T.E., Stern, B.R., Manley, N.B. and Ames, B.N., 1992: Rodent carcinogens. Setting priorities. Science 258, 261-265.
- Lagrimini, L.M., 1991: Wound induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. Plant Physiol. 96, 577-583.
- Leinhos, V. and Bergmann, H., 1995: Effect of amino alcohol application, rhizobacteria and mycorrhiza inoculation on the growth, th content of protein and phenolics and the protein pattern of drought stressed lettuce (*Lactuca sativa* cv. „Amerikanischer Brauner“). Angew. Bot. 69, 153-156 (1995).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L.J., 1951: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Shahrzad, S. und Bitsch, I., 1995: Anticarcinogen wirksame Penolcarbonsäuren in Kirschsafft. In: Abstracts des 5. Symposiums über Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 28.-29.9.1995, Jena/Thüringen.

**Tabelle 1:** Einfluß von Trockenstreß (TS), Schwermetallbelastung (Cd, 3 ppm/Gefäß) und Cholinchlorid (CC) auf den Gehalt an Phenylpropanen in Gerste, Soja und Salat.

Pflanzenspezies	Pflanzenorgan	Behandlung	Gehalte (µg/g TM)					
			Kaffeensäure	Cumarsäure	Zimtsäure	Ferulasäure	Phenylpropane <sup>7</sup>	Phenylpropane relativ (Kontr.=100%)
Gerste	Sproß <sup>1</sup>	Kontrolle <sup>4</sup>	8,7	180,0	28,9	685,5	945,6	100
		TS	18,6(*)	275,5(*)	31,5	783,3	1087,1(*)	114,4(*)
		TS+CC	14,8	242,7	40,4	708,2	1033,9	108,2
	Korn <sup>2</sup>	Kontrolle	6,1	1,1	0,5	9,5	17,2	100
		TS	4,9	1,3	0,6	9,6	18,4	95,3
		TS+CC	5,9	1,4	0,7	9,7	17,7	102,9
Salat	Blatt <sup>3</sup>	Kontr. (K)	35,1	18,2	33,3	19,4	106,0	100
		TS	57,3(*)	12,4	26,2	26,4	122,4	115,5(*)
		TS+CC	55,7	8,3	31,8	15,0	110,8	104,5
	K+Cd	Kontrolle	66,4(*)	50,6(*)	74,5*	25,5	217,0*	204,7*
		TS	89,5*	62,7*	71,2(*)	8,3(*)	231,7*	218,5*
		TS+CC	89,5*	62,7*	71,2(*)	8,3(*)	231,7*	218,5*
Soja	Sproß <sup>5</sup>	Kontrolle	16,8	n.n.	n.n.	19,8	36,6	100
		TS	13,2	20,2*	n.n.	67,9(*)	101,1*	278,2*
	Bohne <sup>6</sup>	Kontrolle	20,8	n.n.	23,1	187,9	211,9	100
		TS	18,4	n.n.	28,9	238,1(*)	285,4(*)	134,7(*)

<sup>1</sup> Ernte von Blatt und Stengel vor der Anthese (DC 49); <sup>2</sup> Ernte zur Totreife (DC 92);

<sup>3</sup> Ernte der vollentwickelten Blätter; <sup>4</sup> Kontrolle - Pflanzen optimal mit Wasser versorgt;

<sup>5</sup> Ernte von Blatt und Stengel 4 Wochen vor Vollreife der Bohnen; <sup>6</sup> Ernte der vollreifen Bohnen; <sup>7</sup> Summe (Kaffeensäure+Cumarsäure+Zimtsäure+Ferulasäure) Gehalte in den Pflanzenorganen;

\* signifikanter Unterschied bei  $\alpha \leq 0.05$  bzw. (\*) bei  $\alpha \leq 0.1$ ;

n.n., nicht nachweisbar, TM, Trockenmasse

**Tabelle 2:** Einfluß von Trockenstreß (TS), Schwermetallbelastung (Cd, 3 ppm/Gefäß) und Cholinchlorid (CC) auf Proteingehalt und Peroxidaseaktivität in Gerste, Salat und Soja.

Pflanzenart	Pflanzenorgan	Behandlung	Proteingehalt (mg/gTM)	Peroxidaseaktivität (Unit/mg protein)
Gerste	Spross	Kontrolle <sup>1</sup>	100 (182.2)	100 (0.98)
		TS	81.7*	186.2*
		TS+CC	82.1	87.5
	Korn	Kontrolle	100 (134)	100 (6.1)
		TS	86.8	140.8 (*)
		TS+CC	83.8	83.4
Salat	Blatt	Kontrolle	100 (0.17 g/Pflanze)	100 (0.008)
		TS	99.4	47.1*
		TS+CC	96.5	104.7
		Kontrolle+CC	100.3	141.4*
		Korn + Cd + CC	99.7	88.2
		Kontrolle	100 (21.1)	100 (0.08)
Soja	Blatt	TS	83.8(*)	318.0*
		Kontrolle	100 (31.7)	100 (0.08)
Bohne	Blatt	Kontrolle	100 (31.7)	100 (0.08)
		TS	87.7	87.5

<sup>1</sup> Die Zahlen in den Klammern entsprechen den absoluten Mengen und Aktivitäten.  
 TM Trockenmasse; \* signifikanter Unterschied bei  $\alpha \leq 0.05$ ; (\*) signifikanter Unterschied bei  $\alpha \leq 0.1$ ; Behandlungen und Erntetermine der Pflanzen siehe Erläuterungen zu Tab. 1

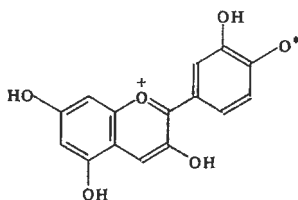
## Anthocyanins in Fruit and Juice

*C. Iversen, Ulla Kidmose and N. Poulsen*

Danish Institute of Plant and Soil Science, Department of Food Science and Technology,  
Kirstinebjergvej 12, 5792Aarslev, Denmark

### Nutritional aspects of anthocyanins

Anthocyanins are natural occurring food colors with the ability to act as antioxidants in foods and after ingestion. Red/blue berries contains anthocyanins in high amounts for example blackcurrants and strawberries. They occur naturally as glycosides. Anthocyanins are able to react with oxygen radicals and form stabilized radicals, and in that way break the radical chain reaction. Epidemiological studies have shown that groups with high flavonoid (including anthocyanins) intake has reduced risk of cancer compared to groups with low intake of flavonoids. The antimutagenic effect has also been verified in cell cultures. The hypothesis is that the antimutagenic effect is directly correlated to the antioxidant capacity of the flavonoids. Both flavonols, anthocyanins and phenolic acids act as powerful antioxidants in in vitro model systems with LDL particles.



Cyanidinradikal

Figure 1 Anthocyaninradikal

### Anthocyanins in strawberry cultivars

At the Department of Food Science and Technology some work have been done on nutritional and sensory quality of strawberries. Some of the results of anthocyanin in strawberries are shown below.

In collaboration with the Department of Fruit and Vegetables, Danish Institute of Plant and Soil Science, which carried out the field experiments, twelve cultivars of strawberries were analysed for the content of anthocyanins. The content of anthocyanins was measured spectrophotometrically using a pH-differential method and calculated as mg cyanidin-3-glucoside in 100 g fresh fruit. In figure 2 the content of anthocyanins in the different cultivars is shown. The content of anthocyanins varied significantly among cultivars in 1990 and 1991. 'Douglas' had the highest content in both years whereas 'Elsanta' had the lowest content.

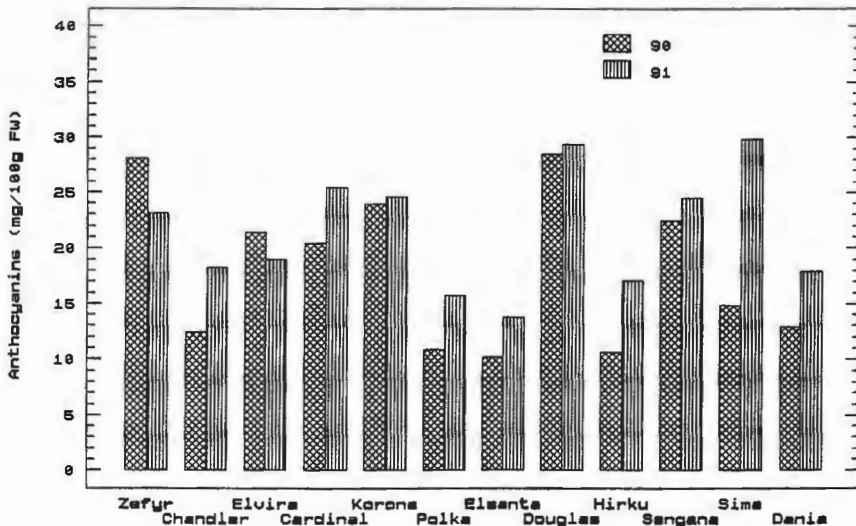


Figure 2 Anthocyanin in different strawberry cultivars.



In another experiment ripe and red berries with green tips of four cultivars of strawberry were harvested. The aim of the experiment was to study the keeping quality of fruits at different maturity stages. At increased storage time an increased content of anthocyanins was found. As seen in table 1 significant differences between the cultivars were found. The cultivar Elsanta, which kept much better than the three other cultivars, had a very low anthocyanin content, and in this case nearly all colour was found near the surface of the fruits. The fruits with green tips had a lower anthocyanin content as might be expected (Table 2).

**Table 1** Cultivar differences. Average of maturity.

<i>Cultivar</i>	Anthocyanin (mg/100 g)
Dania	24
Elsanta	15
Senga Sengana	41
Zefyr	24
LSD	2

**Table 2** Effect of maturity. Average of cultivars and storage time.

	Anthocyanin (mg/100 g)
Green tip	19
Red berries	34
LSD	8

### **Anthocyanins in blackcurrants**

The anthocyanins were characterized by HPLC. The anthocyanins in blackcurrant juice are extracted with a solution of 6% acetonitrile, 10% formic acid and 86% water (solution A). Separation of anthocyanins was performed on a RP-18 column with solution A as eluent. Anthocyanins was detected at 535 nm. Blackcurrants contain 4 anthocyanins: Delpinidin-3-glucosid, Delphinidin-3-rutinosid, Cyanidin-3-glucosid and Cyanidin-3-rutinosid. The anthocyanins are most stable in their natural form as glycosides. If the anthocyanins are hydrolysed (for example by enzymatic hydrolysis) into their aglycone form they will have very short half life. Cyanidin 3-rutinoside has a half-life of 65 days, Cyanidin aglycon has a half-life of only 0.5 days. Results have been calculated from Lambert-Beers law with the following molar absorbances:  $E$  (dpd) = 38905 l/mol/cm and  $E$  (cyd) = 29600 l/mol/cm.

Anthocyanin distribution in blackcurrant juice (Ben Lomond):

anthocyanin	dpd-glu	dpd-rut	cyd-glu	cyd-rut
	9,9 %	54,0 %	2,7 %	33,3 %

The distribution among the anthocyanins was not changed during storage. This means that the four anthocyanins have the same degradation rate. Figure 3 shows the breakdown of total anthocyanins in blackcurrant juice during storage at 20° C, pH = 3,0. There is only little difference between the deaerated juice and the juice without treatment. Anthocyanin half-life is 97 days under these conditions.

storage of juice at 20 C

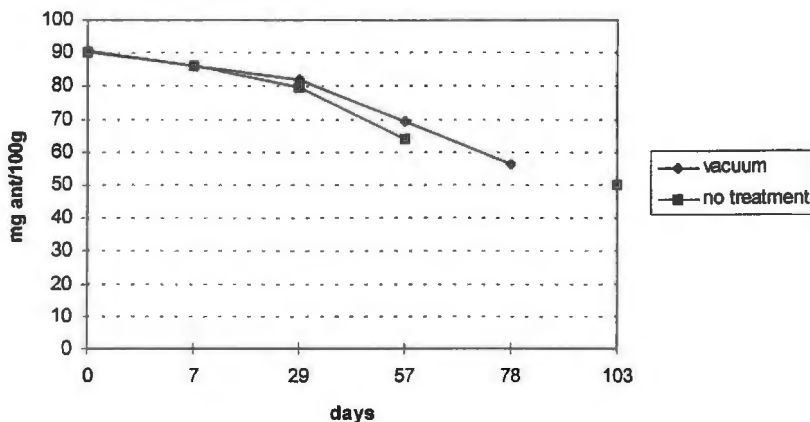


Figure 3 Anthocyanins during storage.

Reference

Poulsen, N. 1992. Keeping quality of strawberry cultivars during ice bank cooling. Tidsskr. Planteavl 96: 45-50.



## Vorkommen und Gehalte von Flavanolen in Apfelfrüchten und -säften

*U. Mayr und D. Treutter*

Lehrstuhl für Obstbau, Technische Universität München, 85350 Freising-Weihenstephan

Aufgrund zahlreicher Hinweise über die positive Wirkung phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe auf Gesundheit und Gesunderhaltung des Menschen, ist das Interesse an Daten über deren Vorkommen und Gehalte im Obst von seiten der Ernährungswissenschaft sehr groß. Das verleitet dazu, überstürzt und mit unvollständig ausgearbeiteten Methoden Analysedaten zu produzieren. So entsteht beispielsweise aufgrund der Publikationen von Hertog et al (1992, 1993) der Eindruck, in Apfelfrüchten stellten die Quercetinglykoside die phenolischen Hauptkomponenten dar. Andere Autoren wiesen aber schon früher auf das Vorkommen von Catechinen und Proanthocyanidinen im Apfel hin (Mosel und Herrmann 1974, Lea and Arnold 1978). Aufgrund fehlender analytischer Methoden war es aber bisher nur schwer möglich, diese Phenolgruppe im Apfel genauer zu erfassen. Mit Hilfe einer am Lehrstuhl für Obstbau der Technischen Universität München entwickelten Methode (Treutter 1989, Treutter et al. 1994, Mayr et al. 1994) wurden die phenolischen Inhaltsstoffe, insbesondere die Flavanole, in Apfelfrüchten und -säften qualitativ und quantitativ bestimmt ( Tab. 1 und 2).

Vergleicht man die einzelnen Gewebepartien reifer Äpfel, so fällt auf, daß Flavonole und Flavanole ihre höchsten Konzentrationen in der Fruchtschale erreichen (Tab 3). Chlorogensäure ist im Fruchtfleisch am höchsten konzentriert, während dort die Flavonole nicht nachweisbar sind. Extrem hohe Dihydrochalkon-Werte finden sich in den Kernen. In frisch Apfelsäften liegen demnach niedrige

Dihydrochalkon-Gehalte vor und Flavonole fehlen (Tab. 5). Auch Sortenunterschiede lassen sich nachweisen (Tab. 4 und 5). Hierbei läßt sich ein Zusammenhang zwischen dem Geschmack einiger Sorten und deren Flavanolgehalt feststellen. Die würzig bis adstringierend schmeckenden Sorten 'Bohnapfel', 'Kaiser Wilhelm' und 'Boskoop' ergaben die höchsten Werte während milde bis leer schmeckende Apfelsorten, wie 'Gloster' und 'Brettacher' nur wenig Flavanole produzierten. Die Sorte 'Landsberger' war zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits überreif, was den extrem niedrigen Flavanolgehalt erklären könnte.

### Literatur

- HERTOG, M.G.L.P., P.C.H. HOLLMANN und M.B. KATAN (2379-2383): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**.
- HERTOG, M.G.L.P., P.C.H. HOLLMANN und B. VANDEPUTTE (1242-1246): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* **41**.
- LEA, A.G.H. und G.M. ARNOLD (1978): The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.* **29**, 478-483.
- MAYR, U., D. TREUTTER, C. SANTOS-BUELGA, H. BAUER und W. FEUCHT (1995): Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves. *Phytochemistry* **38**, 1151-1155.
- MOSEL, H.D. und K. HERRMANN (1974): The phenolics of fruits. III. The contents of catechins and hydroxy-cinnamic acids in pome and stone fruits. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **154**, 6-11.
- TREUTTER, D. (1989): Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr.* **467**, 185-193.
- TREUTTER, D., C. SANTOS-BUELGA, M. GUTMANN und H. KOLODZIEJ (1994): Identification of flavan-3-ols and procyanidins by HPLC and chemical reaction detection. *J. Chromatogr. A* **667**, 290-297.

Tab. 1 Liste der identifizierten Hydroxyzimtsäuren, Dihydrochalcone und Flavonole

Substanz		Absorptions- maximum [nm]	Reten- tionszeit [min]
Trivialname	Struktur		
Chlorogensäure	5'-Caffeoylchinasäure	324	45,1
	Phloretin-2'-xylosylglucosid	282	125,7
Phloridzin	Phloretin-2'-glucosid	284	129,3
Hyperin	Quercetin-3-O-galactosid	354	137,1
Isoquercitrin	Quercetin-3-O-glucosid	354	141,2
Rutin	Quercetin-3-O-rutinosid	354	144,5
Reynoutrin	Quercetin-3-O-xylosid <sup>*</sup>	354	146,7
Avicularin	Quercetin-3-O-arabinosid	350	150,0
Quercitrin	Quercetin-3-O-rhamnosid	346	153,2

<sup>\*</sup>)vermutliche Struktur

Tab. 2 Liste der identifizierten Flavonole

Substanz		Ratio <sup>*</sup> ) 640/280	Reten- tionszeit [min]
Trivialname	Struktur		
Procyanidin B1	Epicatechin-(4 $\beta$ )8)-Catechin	9,7	29,3
Catechin	2,3 trans-Flavan-3-ol	12,4	33,5
Procyanidin B2	Epicatechin-(4 $\beta$ )8)-Epicatechin	10,9	46,2
Epicatechin	2,3 cis-Flavan-3-ol	20,9	60,4
Procyanidin C1	Epicatechin-(4 $\beta$ )8)-Epicatechin-(4 $\beta$ )8)-Epicatechin	7,7	71,1
Procyanidin B5	Epicatechin-(4 $\beta$ )6)-Epicatechin	14,5	120,8
Procyanidin E-B5	Epicatechin-(4 $\beta$ )8)-Epicatechin-(4 $\beta$ )6)-Epicatechin	9,2	139,2

<sup>\*</sup>) charakterisiert die Struktur und gibt Aufschluß über den Polymerisationsgrad (TREUTTER et al. 1994)

Tab. 3 Phenolgehalt der einzelnen Fruchtpartien reifer Früchte verschiedener Sorten

	Fruchtschale				Fruchtfleisch			Kernhausbereich			Kerne		
	Summe Flavanole <sup>1)</sup>	Summe Dihydrochalcone <sup>2)</sup>	Summe Flavonole <sup>3)</sup>	Chlorogensäure	Summe Flavanole	Summe Dihydrochalcone	Chlorogensäure	Summe Flavanole	Summe Dihydrochalcone	Chlorogensäure	Summe Flavanole	Summe Dihydrochalcone	Chlorogensäure
	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS	mg/g TS
Golden	13,00 ± 2,46	3,70 ± 0,26	13,67 ± 2,27	0,37 ± 0,06	2,13 ± 0,08	0,31 ± 0,22	1,06 ± 0,13	3,10 ± 0,72	2,63 ± 1,19	2,38 ± 0,61	0,49 ± 0,09	9,10 ± 1,11	0,58 ± 0,29
Elstar	10,59 ± 3,63	1,78 ± 0,53	8,31 ± 3,27	0,33 ± 0,17	1,39 ± 0,33	0,26 ± 0,20	0,16 ± 0,09	2,28 ± 0,68	1,41 ± 0,64	1,08 ± 0,18	0,78 ± 0,28	14,41 ± 1,91	0,42 ± 0,22
Gloster	11,61 ± 0,88	3,12 ± 0,26	20,48 ± 6,75	0,23 ± 0,06	2,42 ± 1,03	0,21 ± 0,03	2,35 ± 0,59	2,42 ± 0,89	1,05 ± 0,47	3,29 ± 0,14	0,31 ± 0,04	14,90 ± 0,94	0,45 ± 0,10
Ionagold	17,70 ± 1,22	4,66 ± 1,13	7,65 ± 2,29	0,25 ± 0,13	2,76 ± 0,31	0,16 ± 0,05	0,99 ± 0,08	4,35 ± 1,18	2,99 ± 1,30	2,89 ± 0,53	0,37	8,20	0,21
Boskoop	15,83 ± 1,46	10,32 ± 0,83	3,07 ± 1,44	0,50 ± 0,03	5,78 ± 1,24	0,30 ± 0,09	2,98 ± 0,14	4,07 ± 1,00	3,12 ± 0,64	3,51 ± 0,62	2,06	35,46	1,25
Idared	18,16 ± 1,33	2,73 ± 0,68	15,95 ± 4,32	0,74 ± 0,26	2,42 ± 0,13	0,15 ± 0,02	1,78 ± 0,19	3,11 ± 1,76	1,88 ± 0,68	2,48 ± 1,06	0,53 ± 0,07	15,19 ± 2,66	0,39 ± 0,02
Cox	12,11 ± 1,01	1,75 ± 0,54	11,36 ± 5,44	0,06 ± 0,03	1,93 ± 0,22	0,09 ± 0,02	1,30 ± 0,27	2,16 ± 0,29	2,12 ± 0,93	2,39 ± 0,27	1,34	24,60	0,80
Prima	10,42 ± 0,28	1,33 ± 0,37	15,75 ± 1,75	0,58 ± 0,12	1,71 ± 0,33	0,31 ± 0,24	2,08 ± 0,33	2,78 ± 0,44	3,43 ± 2,16	4,02 ± 0,07	0,45	9,80	0,38
Gala	13,96 ± 1,51	1,46 ± 0,17	12,38 ± 2,43	0,15 ± 0,09	1,45 ± 0,45	0,21 ± 0,10	0,68 ± 0,13	2,08 ± 0,21	1,61 ± 0,81	1,41 ± 0,16	0,37 ± 0,01	7,67 ± 0,30	0,49 ± 0,09

1) Catechin, Epicatechin, Procyanidin B1, B2, B5, C1, E-B5

2) Phloretin glucosid, -xylosyl glucosid

3) Quercetingalactosid, -glucosid, -rutinosid, -arabinosid, -rhamnosid

Tab. 4 Phenolgehalt reifer Früchte verschiedener Sorten

	Pc B1	Catechin	Pc B2	Epicatechin	Pc C1	Pc B5	Pc E-B5	Summe Flavane <sup>*)</sup>	Summe Dihydro <sup>**)</sup> chalcone <sup>*)</sup>	Summe Flavone <sup>***)</sup>	Chlorogen- säure
	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel	mg/Apfel
Golden	0,15 ± 0,02	0,04 ± 0,005	1,10 ± 0,02	0,51 ± 0,06	0,57 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,003	2,50 ± 0,10	0,55 ± 0,27	0,40 ± 0,06	1,12 ± 0,13
Elstar	0,11 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,67 ± 0,14	0,52 ± 0,14	0,33 ± 0,08	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,01	1,76 ± 0,40	0,78 ± 0,86	0,27 ± 0,12	0,24 ± 0,06
Gloster	0,31 ± 0,13	0,10 ± 0,04	1,05 ± 0,38	0,57 ± 0,21	0,58 ± 0,21	0,10 ± 0,03	0,02 ± 0,005	2,72 ± 1,01	0,38 ± 0,06	0,65 ± 0,20	2,37 ± 0,51
Ionagold	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,005	1,49 ± 0,18	0,65 ± 0,06	0,89 ± 0,13	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,01	3,32 ± 0,40	0,49 ± 0,13	0,23 ± 0,08	1,09 ± 0,10
Boskoop	0,42 ± 0,10	0,11 ± 0,02	2,50 ± 0,43	1,35 ± 0,20	1,29 ± 0,27	0,22 ± 0,03	0,05 ± 0,01	5,95 ± 1,02	0,82 ± 0,14	0,09 ± 0,03	2,95 ± 0,17
Idared	0,32 ± 0,03	0,09 ± 0,01	1,15 ± 0,16	0,57 ± 0,03	0,70 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,005	2,95 ± 0,22	0,36 ± 0,09	0,47 ± 0,11	1,81 ± 0,12
Cox	0,12 ± 0,02	0,05 ± 0,003	0,95 ± 0,08	0,59 ± 0,08	0,48 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01	2,32 ± 0,22	0,32 ± 0,07	0,43 ± 0,29	1,36 ± 0,22
Prima	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,005	0,91 ± 0,16	0,47 ± 0,07	0,49 ± 0,08	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,005	2,06 ± 0,33	0,63 ± 0,45	0,47 ± 0,03	2,21 ± 0,28
Gala	0,17 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,67 ± 0,11	0,57 ± 0,07	0,43 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,005	1,99 ± 0,34	1,23 ± 1,61	0,48 ± 0,12	0,72 ± 0,11

<sup>\*)</sup> Catechin, Epicatechin, Procyanidin (Pc) B1, B2, B5, C1, E-B5

<sup>\*\*)</sup> Phloretin glucosid, -xylosyl glucosid

<sup>\*\*\*)</sup> Quercetin galactosid, -glucosid, -rutinosid, -arabinosid, -rhamnosid

Tab. 5 Phenolgehalte frisch gepreßter Apfelsäfte (mg/l)

	Pc B1	Catechin	Pc B2	Epicat.	Pc C1	Pc B5	Flavanole	5'-CQ	Ph 2'-xylglu	Ph 2'-glu
Berlepsch	53,65	9,30	36,43	23,74	16,47	2,76	142,35	414,01	3,84	75,12
Boskoop	65,63	16,36	64,86	37,87	38,82	5,92	229,45	225,34	3,12	17,04
Landsberger	8,33	1,55	6,14	11,23	1,18	1,32	29,75	67,83	1,44	14,40
Bohnapfel	179,69	19,46	221,71	111,56	79,02	15,13	626,57	282,91	5,28	47,52
Kaiser Wilhelm	237,50	38,29	144,71	73,41	59,8	10,00	563,73	217,36	1,92	18,00
Jonagold	33,85	2,48	75,86	34,17	43,14	4,47	193,97	170,43	3,36	36,00
Blenheim	51,56	18,14	20,29	25,55	5,69	1,97	123,19	77,33	2,64	12,24
Brettacher	18,75	3,72	19,86	14,83	11,37	1,71	70,25	171,95	2,40	37,20
Melrose	48,44	4,73	58,71	48,48	19,80	6,45	186,62	118,56	1,68	18,48
Gloster	18,23	1,78	11,43	14,88	2,94	1,32	50,58	3,80	2,16	18,24

Pc B1, B2, C1, B5 = Procyanidin B1, B2, C1, B5; Cat = Catechin; Epi = Epicatechin; 5'- CQ = 5'- Caffeoylchinasäure (Chlorogensäure); Ph 2'-xylglu = Phloretin-2'-xylosylglucosid; Ph 2'-glu = Phloretin 2'-glucosid (Phloridzin)





## Umweltöstrogene - Vorkommen, Wirkung, Chemie, Möglichkeiten der Entfernung

*P. Butz*

Institut für Chemie und Biologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung,  
Engesserstr. 20, D-76131 Karlsruhe

Es wird gehäuft über Beobachtungen berichtet, die auf eine Abnahme der männlichen Fertilität im Verlauf der letzten 50 Jahre und die Zunahme von Störungen des männlichen Reproduktionssystems (Verminderung der Spermienproduktion und -qualität [6], vermehrtes Auftreten von Hodenkrebs[28], Kryptorchidismus [13]) hindeuten. Bei Söhnen von Frauen, die während der Schwangerschaft mit DES (Diethylstilböstrol, synthetisches Östrogen, von 1945-1971 verwendet) behandelt wurden, sind dieselben Symptome gehäuft aufgetreten. Auch im Tierversuch können sie durch kurze pränatale Östrogen-gabe erzeugt werden. Man vermutet daher als Ursache eine zunehmende Exposition der Menschen gegenüber Östrogenen oder östrogenartig wirkenden Substanzen.

Es kommen verschiedene Quellen der erhöhten Exposition in Betracht. Veränderte Ernährungsgewohnheiten, wie zum Beispiel die Bevorzugung ballaststoffarmer Nahrung kann zu einer Art "Recycling" endogen gebildeter Östrogene beigetragen haben[1]. Über die Galle ausgeschiedene endogene Östrogene werden im Darm in erhöhtem Maß metabolisiert und wieder aufgenommen, wenn nur wenig Ballaststoffe vorhanden sind. Dieses Phänomen könnte das geringe Auftreten von Brustkrebs (an dessen Entstehung endogene Östrogene beteiligt sind) in Japan und China erklären, wo traditionell ballaststoffreich und fettarm gegessen wird. Im gleichen Zeitraum nahm auch die Belastung mit exogenen Östrogenen zu. In der Tierzucht wurden über Jahrzehnte oral wirk-

same synthetische Östrogene als Anabolika eingesetzt, bis man die Risiken für den Menschen erkannte[24,26,35]. Auch die Anwendung von DES in der Gynäkologie wurde nach Auftreten von Mißbildungen bei Säuglingen modifiziert [38]. Zugenommen hat jedoch der Gebrauch oraler Kontrazeptiva wie z.B. Ethinyl-Östradiol, das, wie DES, nicht an SHBG bindet (Sex-hormone-binding globulin, an welches Östrogen im Blut gewöhnlich gebunden vorliegt). Hinweise auf ein Recycling dieses Hormons über das Trinkwasser liegen bereits vor [34]. Mit der rasanten Verbreitung von Soja-Produkten u.a. als Substitution für tierisches Protein ist die Aufnahme von Phytoöstrogenen[1,20,43], an denen Soja reich ist, ebenfalls stark gestiegen. Kuhmilch enthält ebenfalls beträchtliche Mengen Östrogene- hauptsächlich Östronsulfat -als Folge der Tatsache, daß bei der modernen Viehzucht stets ein größerer Teil der Milchkühe tragend ist bei fortdauernder Laktation[18]. Der Hormongehalt geht glücklicherweise bei der Formulierung von Milchpulver für Säuglingsnahrung verloren, über den Verbleib in anderen Milchprodukten und die mögliche Aufnahme durch den menschlichen Darm ist wenig bekannt. Hormonartig wirken auch bestimmte Mykotoxine wie das Fusarientoxin Zearalenon und das von Penicillien gebildete Ochratoxin A, die in kontaminierten Getreideerzeugnissen vorkommen können[46]. Der wahrscheinlich wichtigste Faktor ist jedoch in der Kontamination der Biosphäre mit Östrogen- mimetischen Umweltchemikalien zu sehen [8,10]. Bei einigen der Chemikalien, die in den letzten 50 Jahren in die Umwelt gelangt sind, wurden östrogene Wirkungen festgestellt. Die Stoffe sind in der Regel biologisch schlecht abbaubar und können sich daher in der Nahrungskette anreichern.

Wenn man sich vorstellt, daß in der Bundesrepublik jährlich etwa 30 000 Tonnen Pflanzenschutzmittelwirkstoffe ausgebracht werden, daß von den weltweit bisher hergestellten über 2 Millionen Tonnen PCB (Polychlorierte Biphenyle) ein großer Teil ubiquitär verteilt ist und jährlich in der Bundesrepublik kg Toxizitätsäquivalente von Dioxinen und Furanen entstehen, ist es verwunderlich, wie wenig davon tatsächlich in die menschliche Nahrung gelangt: Aus einer kürzlich veröffentlichten Gesamternährungsstudie der FDA [17] (Food and Drug Administration, USA) geht hervor, daß von den dort untersuchten 110 Substanzen ein 30-jähriger Mann mit 75 kg Körpergewicht

pro Jahr insgesamt nur 34 Milligramm mit der Nahrung aufnimmt (das entspricht 93  $\mu\text{g}/\text{Tag}$ ). Nimmt man jedoch an, diese 93  $\mu\text{g}$  hätten die gleiche hormonelle Wirksamkeit wie der Wirkstoff eines oralen Kontrazeptivums (z.B. Mikrolut, Schering, 30  $\mu\text{g}$  tägliche Dosis) so entspräche das einem "worst case" von einer Belastung mit 3 Antibaby-Pillen pro Tag.

Mit der Nahrung aufgenommene hormonähnliche Umweltkontaminanten haben verschiedene mögliche Angriffspunkte. Rezeptoren können durch sie blockiert werden, sie können den Rezeptor jedoch auch induzieren. Transportproteine können durch Hormonanaloga blockiert werden und die eigentlich vorgesehenen Hormone nicht zu ihrem Wirkort bringen. Drüsensysteme können gehemmt oder stimuliert werden, was z.B. zur Verschiebung des Androgen-Östrogen-Gleichgewichts führen kann. Im folgenden sind Beispiele für experimentell gefundene östrogene Eigenschaften einiger Umweltkontaminanten zusammengestellt.

### **Pflanzenschutzmittel**

Es ist seit vielen Jahren bekannt, daß **Organochlor-Verbindungen** wie DDT und seine Analoga, wie z.B. Methoxychlor[5,15,27,29,44] bei Versuchstieren östrogene Wirkungen zeigen können. DDT gehört zu den am häufigsten in menschlichem Gewebe nachgewiesenen Umweltchemikalien. Technisches DDT enthält bis zu 30 % das isomere o, p'-DDT als Verunreinigung. Dies ist die eigentlich hormonähnlich wirksame Substanz. Werden weibliche Ratten oder Mäuse im frühen Entwicklungsstadium Organochlor-Pestiziden wie DDT oder Methoxychlor ausgesetzt, werden ähnliche Effekte beobachtet wie bei fötaler oder neonataler Einwirkung des synthetischen Hormons DES (verfrühte erste Ovulation, verfrühte Unfruchtbarkeit)[14,44]. Aber auch bei männlichen Nagetieren und anderen Säugern kann frühe DDT-Belastung zu deutlichen Fertilitätsstörungen und reduziertem Gewicht von Samenblasen und Prostata führen [12]. Vom Saal et al. zeigten kürzlich [31], daß pränatale Einwirkung von o, p'-DDT bei Mäusen das Sozialverhalten der erwachsenen männlichen Tiere beträchtlich verändern kann. Zunächst untersuchten sie, in welchem Maß o, p'-DDT kompetitiv zu Östrogen an Östrogenrezeptoren in MCF-7 Zellen (auf Östrogen ansprechende Zelllinie, aus menschlichem Brustkrebsgewebe

stammend) binden kann. Die relative Bindungsaffinität entsprach mit 0.013 % derjenigen des Phytoöstrogens Equol. Bei der anschließenden *in vivo* Untersuchung wurde das Sozialverhalten (hier die Häufigkeit des Markierens eines neuen Territoriums mit Urin) erwachsener männlicher Mäuse untersucht. Die Mütter dieser Tiere waren vom 11. bis zum 17. Schwangerschaftstag mit jeweils *o*, *p'*-DDT-Mengen von 1, 100, 1000 und 500  $\mu\text{g}/30\mu\text{l}$  Öl gefüttert worden. Schon die geringste Dosis von 1  $\mu\text{g}$  bewirkte eine signifikante Erhöhung der Markierungsfrequenz von 150 auf 250 pro Stunde. Derartige Verhaltensstudien können als hochempfindliche Biomonitore für Belastungen mit östrogenähnlichen Kontaminanten eingesetzt werden. Analoge Experimente mit DES zeigten schon bei täglichen Dosen von 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht Verhaltensänderungen, während physiologische Effekte erst bei 5000-fach höheren Dosen erkennbar waren [2]. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß in Deutschland pflanzliche Lebensmittel bis zu 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  DDT und Isomere enthalten dürfen[30]. Bei einer Untersuchung von 122 Humanmilch-Proben durch die Chemische Landesuntersuchungsanstalt Karlsruhe aus dem Jahr 1994 wurde im Fett für Gesamt-DDT ein Median von 240  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ermittelt [19].

Methoxychlor (ein DDT-Analogen; gesetzl. Rückstandshöchstmenge in Obst und Gemüse 10  $\text{mg}/\text{kg}$ ) bewirkte bei den oben geschilderten Verhaltensstudien gleiche Effekte wie *o*, *p'*-DDT, allerdings bei zehnfach höherer Konzentration. Bei Nagetieren wirkt es schädlich auf Fruchtbarkeit und Uterusfunktionen. Der östrogenartig wirkende Faktor ist 2,2-bis-(*p*-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichlorethan (HPTE), das in der Rattenleber durch Demethylierung entsteht. Versuche von Cummings und Metcalf [7] zeigten, daß Methoxychlor wie Östrogen die Bildung des estrogen-induced protein (IP, ein wohldefinierter Marker für Östrogenwirkung im Rattenuterus) induzieren und regeln kann. Die wirksamen Konzentrationen lagen allerdings mit 125-500  $\text{mg}/\text{kg}$  recht hoch, meßbare Wirkungen waren schon zwei Stunden nach Anwendung feststellbar.

Negative Effekte auf das männliche Reproduktionssystem können auch durch Substanzen mit antiandrogener Wirkung hervorgerufen werden. So konnten Kelce et al. [22] kürzlich in Rezeptorstudien und *in-vivo*-Versuchen an Ratten zeigen, daß der im menschlichen Körper aus DDT gebildete, persistente Hauptmetabolit *p*, *p'*-DDE deutlich antiandrogene Wirkung hat. Kompetitive Bin-

dungsstudien ergaben für p, p'-DDE etwa gleiche Affinität zum Androgenrezeptor (AR) wie für das synthetische Östrogen DES und etwa 30fach schwächere Bindung im Vergleich zu natürlichem Östrogen. Östrogene sind als Antagonisten für die Bindung von Androgenen an den Androgenrezeptor bekannt. Als Resultat der Blockade des Androgenrezeptors kommt es zur Inhibierung der Androgen-vermittelten Transkriptionsaktivität (und damit zu Entwicklungsstörungen). In Zellkultur reichten zur Inhibierung der AR-Transkriptionsaktivität p, p'-DDE-Konzentrationen von 0,2µM bzw. 64 ppb aus. Bei Südafrikanern aus Malariagebieten finden sich mittlere Blutserumwerte von 140 ppb DDT/DDE, noch höhere Werte wurden in den 60er Jahren in den USA gemessen. In neugeborenen Ratten wurden höhere p, p'-DDE-Konzentrationen gefunden als im Serum ihrer Mütter, die während der Schwangerschaft mit DDT-haltigem Pflanzenöl gefüttert wurden. Offenbar ist die Plazentaschranke kein Hindernis. In Humanmilch wurden im Mittel ca. 10 ppb DDE gefunden[6,19].

Neben den bisher genannten stehen noch **weitere Pflanzenschutzmittel** im Verdacht, auf das Reproduktions- und endokrine System Einfluß nehmen zu können[40]. So unter anderem die Herbizide Atrazin und Aminotriazol, Fungizide wie Benomyl, Maneb, Zineb, Hexachlorbenzol und Vinclozolin [21,48] sowie die Pestizide Clordecone, Lindan, β-Hexachlorcyclohexan und Pyrethroide [40].

### **Umweltkontaminanten**

Neben Rückständen von Stoffen, die absichtlich zum Zweck des Pflanzenschutzes eingesetzt wurden, finden sich auf pflanzlichen Lebensmitteln oft auch unerwünschte Stoffe, die unbeabsichtigt in die Lebensmittel oder ihre Rohstoffe gelangen und die häufig aus der Umwelt stammen. Hierzu zählen z.B. die Schwermetalle, Polychlorierte Biphenyle (PCB), polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Dioxine und Furane. Einige dieser Umweltkontaminanten stehen ebenfalls im Verdacht, das Hormonsystem beeinflussen zu können.

Es gibt 209 verschiedene **Polychlorierte Biphenyle**, sie unterscheiden sich in Art und Ausmaß der Chlorierung, 36 davon sind umweltrelevant. Technische

PCB sind Gemische aus zahlreichen Kongeneren, sie finden Verwendung als Isolier- und Kühlflüssigkeit in Transformatoren, als Hydrauliköle, Weichmacher, Schmier- und Stabilisierungsmittel usw. Da PCB heute als Umweltkontaminanten nahezu ubiquitär verteilt sind, unterscheidet sich die Belastung von Gemüse und Gemüseprodukten aus ökologischem und konventionellen Anbau erwartungsgemäß nicht [47]. Die Belastung pflanzlicher Nahrungsmittel beträgt etwa 0,01 mg pro kg Frischgewicht. In Fleisch und Milch sind PCB im Fettanteil angereichert mit ca 0.1 mg/kg Fett, die Konzentrationen in Muttermilch liegen noch einmal zehnfach höher. Nach einer WHO-Schätzung nehmen Erwachsene mit der Nahrung täglich etwa 0,2 µg/kg Körpergewicht an PCB auf. Ein Säugling nimmt mit der Muttermilch täglich etwa 4 µg/kg Körpergewicht auf, die zwanzigfache Menge. Statistisch signifikant östrogenartige Wirkung (Auswirkung auf die Geschlechtsdifferenzierung bei Schildkröten) wurde bisher nur bei zwei PCB gefunden, und zwar handelte es sich dabei um in 4-Stellung hydroxylierte Metaboliten von PCB, die zur Gruppe der nicht umweltrelevanten PCB gehören [3], die wirksamen Konzentrationen lagen im Bereich der Belastung von Humanmilch. Durch chronische Gabe können bei Nagern Reproduktionsstörungen und Mißbildungen der Nachkommenschaft ausgelöst werden. Eine kürzlich erschienene Bestandsaufnahme über mögliche Gefahren für die menschliche Gesundheit durch PCB sieht aufgrund der derzeitigen Datenlage keine gesicherten Hinweise auf Krebserzeugung oder Reproduktionsstörungen [23]. In Tierversuchen an subhumanen Primaten wurden an deren Nachwuchs eindeutige klinische Symptome gefunden bei Anwendung von Dosen, die beträchtlich niedriger lagen als beispielsweise die Belastung von Arbeiterinnen bei der Produktion von Kondensatoren in den 60er Jahren. Die Untersuchung der Nachkommen dieser hochbelasteten Frauen in verschiedenen Studien erstreckte sich nur auf den Zeitraum bis zum 8. Lebensjahr und ergab inkonsistente Ergebnisse [39].

Zu den bisher identifizierten Umweltkontaminanten mit hormonähnlicher Wirkung gehören auch **Dioxine und Furane**, darunter auch das bekannte Seveso-Gift 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-1,4-dioxin (2,3,7,8-TCDD). Sie gelangen mit Rauchgasen, Verbrennungs- und Produktionsrückständen nahezu ubiquitär in die Umwelt und weisen hohe Bioakkumulation auf. Die un-

erwünschte Wirkung von Dioxin läuft rezeptorvermittelt auf molekularer Ebene ab: Ins Gewebe aufgenommenes Dioxin bindet an den Ah-Rezeptor (Ah=Arylhydrocarbon), der gebildete Komplex bindet an DNA und führt zur Genregulierung mit resultierender Bildung von m-RNA. Als Folge führt die ausgelöste Proteinproduktion zu biochemischen Veränderungen, die im Frühstadium zu Stimulation von Zellwachstum und als irreversible Spätantwort zu Krebs oder Terata führen kann. Kürzlich ist der Entwurf einer Studie zur Neubewertung der Dioxinproblematik durch die US-Umweltbehörde (EPA) bekannt geworden [41]. Es wird festgestellt, daß - in allerdings einer noch begrenzten Anzahl verfügbarer Studien - in Menschen bei Dioxinexposition subtile Veränderungen biochemischer oder physiologischer Art festgestellt worden sind, wie z.B. Enzyminduktion, veränderte Geschlechtshormonspiegel oder verminderte Glukosetoleranz. Zusammen mit Ergebnissen aus Tierversuchen lassen diese Befunde einen schädlichen Einfluß von Dioxin auf die Fortpflanzungsbiologie des Menschen und vielleicht noch andere Effekte schon bei der zur Zeit bestehenden Belastung (die Untergrundbelastung mit 3-6 pg Toxizitätsäquivalenten pro Tag und kg Körpergewicht bzw. eine 'Körperbürde' von 40-600 ppt im Fettgewebe) möglich erscheinen. Sicher sei, daß der Spielraum zwischen der derzeit herrschenden Untergrundbelastung und Konzentrationen, bei denen Effekte beim Menschen manifest werden können, bedeutend schmaler ist als bisher angenommen.

Ähnliche Entstehungsmechanismen und Verbreitungswege wie Dioxine und Furane haben **polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe** (PAK, PAH engl.). Hauptquellen für die Aufnahme von PAK sind Gemüse (besonders Grünkohl, Petersilie), Obst, Getreideerzeugnisse sowie Fette und Öle, sie entstehen auch beim Räuchern und Grillen. Es sind mutagene und karzinogene Effekte bekannt geworden, über eventuelle hormonähnliche Wirkungen ist wenig bekannt.

### **Industriechemikalien**

In den letzten Jahrzehnten sind in sehr großem Maßstab Kunststoffadditive (z.B. Weichmacher) und grenzflächenaktive Stoffe (Detergenzien, Tenside) produziert worden und in die Umwelt gelangt. Bei einigen dieser Stoffe bzw. Abbau-

produkten davon sind inzwischen östrogenartige Wirkungen festgestellt worden. Es handelt sich hierbei um **Alkylphenole** als Abbauprodukte von nichtionischen oberflächenaktiven Stoffen, die Detergenzien, Toilettenartikeln oder Herbiziden zugesetzt werden und um **Phtalate**, die als Weichmacher für Kunststoffe aber auch als Trägerflüssigkeit für Pestizide, Kosmetika etc. verwendet werden. Die Fähigkeit von Alkylphenolen, hormonartig zu wirken, wurde zufällig bei Laborarbeiten mit menschlichen östrogensensitiven MCF-7 Brustkrebszellen entdeckt, die unerwarteterweise in Plastikzentrifugenröhrchen ohne Östrogenzugabe proliferierten[37]. Der vom Plastikmaterial ("modified" Polystyrol) an das Medium abgegebene, hormonartig wirkende Stoff wurde als p-Nonylphenol identifiziert. White et al. [45] untersuchten eine Reihe umweltrelevanter 4-Alkylphenole auf östrogenartige Wirkungen. 4-Octylphenol war die wirksamste Substanz, allerdings waren im Vergleich zu 17 $\beta$ -Östradiol 1000-fach höhere Konzentrationen nötig. Alkylphenolische Substanzen stimulieren nach diesen Untersuchungen die Genexpression von Vitellogenin (Anzeichen für Östrogenwirkung) in Hepatozyten von Forellen, stimulieren das Wachstum von Brustkrebszellen (z.B. MCF-7) sowie die Transkriptionsaktivität des Östrogenrezeptors. Alkylphenol ahmt die Bindung von 17b-Östradiol an den Östrogenrezeptor nach und bindet direkt an diesen Rezeptor. Phtalate führten bei sehr jungen männlichen Ratten zu Entwicklungsstörungen der Gonaden, ältere Tiere wurden anscheinend nicht beeinflusst [16]. Datenmaterial über die Belastung von Nahrungsmitteln (denkbar wäre z.B. eine Aufnahme von Alkylphenolen über den Fischverzehr oder die Kontamination von Nahrungsmitteln mit Phtalaten über Plastikverpackungsmaterial) lag dem Autor nicht vor. In diesem Zusammenhang sei ein Bericht über Östrogenwirkung in Gemüseprodukten aus kunststoffbeschichteten Dosen erwähnt [4], nachgewiesen durch Proliferation einer Brustkrebszellkultur, als Agens wurde Bisphenol A identifiziert, das Strukturanalogien zu synthetischen Hormonen aufweist.

### **Thema Umwelthormone kontrovers diskutiert**

Wenn auch inzwischen die östrogenartige Wirkung verschiedenster Umweltchemikalien allgemein akzeptiert wird, so ist die Hypothese, sie seien ursächlich für zunehmende Beeinträchtigungen des männlichen Reproduktions-



systems, Gegenstand heftiger Diskussion. Selbst der Tatbestand der Existenz solcher Beeinträchtigungen wird teilweise nicht als gesichert angesehen. So wurden Zweifel laut, ob das gesammelte Datenmaterial über sinkende Samenqualität innerhalb der letzten 50 Jahre mit adäquaten statistischen Methoden ausgewertet wurde [32]. Eine Reanalyse des Datenmaterials findet keine Anzeichen für signifikante Veränderungen, während eine andere Reanalyse durch das Robert Koch Institut, Berlin, nur im Zeitraum vor 1960 starke Qualitätsabnahmen erkennt [40]. Dem widersprechen Daten einer Studie aus Paris, in der im Zeitraum von 1973-1992 sowohl deutliche quantitative als auch qualitative Abnahmen gefunden wurden. Die Zunahme von Hodenkrebs und Brustkrebserkrankungen wird u.a. auch von Datenmaterial aus dem ehemaligen Krebsregister der früheren DDR belegt [34], umstritten ist jedoch der mögliche Zusammenhang mit der Belastung an Umwelthormonen. So seien beispielsweise bei Brustkrebspatientinnen nicht konsistent erhöhte PCB-Werte festgestellt worden. Skeptiker fragen, auch aus welchem Grund die in noch stärkerem Maße mit der Nahrung aufgenommenen Phytoöstrogene weniger wirksam sein sollten als die industriell hergestellten Stoffe mit östrogenartiger Wirkung. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, daß Phytoöstrogene im Körper schnell abgebaut und nicht angereichert werden, und daß die Evolution Millionen von Jahren Zeit hatte, sich auf diese Stoffe einzustellen, während die synthetischen Stoffe erst seit wenigen Jahrzehnten in der Biosphäre auftreten. International ist man sich einig, daß auf diesem Gebiet großer Forschungsbedarf herrscht, damit bei Bestätigung eines Kausalzusammenhangs zwischen Umweltbelastung durch Östrogene/Analoga und Veränderungen im Reproduktionssystem geeignete Interventionsmaßnahmen entwickelt werden können.

### **Entfernung von Umweltkontaminanten aus Nahrungsmitteln**

Ziel solcher Interventionsmaßnahmen wird sein, das Vorhandensein derartiger Substanzen in der Umwelt bis auf das unvermeidbare Maß zu reduzieren. Kurzfristig wird das aufgrund der Persistenz vieler dieser Stoffe nicht gelingen können. So werden nach wie vor Stoffe in Nahrungsmitteln gefunden, die aufgrund von Verboten seit Jahrzehnten keine Anwendung mehr finden. Auch die Belastung mit PCB, PAK, Dioxinen und Furanen wird nur langsam zurück-

gehen. Daher erscheint es mittelfristig sinnvoll, nach Wegen zu suchen, jene noch unvermeidbaren Kontaminanten von Lebensmitteln zu entfernen. Da die pränatale und frühe Exposition als besonders kritisch anzusehen ist [34], rückt insbesondere die Nahrung für Schwangere und Kleinstkinder ins Blickfeld. Im Hinblick auf die Anreicherung in der Nahrungskette wäre allerdings auch über die Behandlung von Futtermitteln nachzudenken.

Bei den ubiquitär vorkommenden Umweltkontaminanten handelt es sich in der Regel um lipophile Substanzen, die über die Atmosphäre die oberirdischen Pflanzenteile und den Oberboden erreichen und sich in der wachsartigen Oberflächenschicht (Cuticula) von Obst und Gemüse anreichern. Ein Übergang aus dem Boden in die Wurzel von Futter- und Nahrungspflanzen ist selten zu beobachten. Bei Früchten mit glatter Oberfläche (Äpfel, Tomaten...) kann versucht werden, durch Abwischen die Oberfläche zu dekontaminieren. Zu Zeiten, als noch Bleiarsenat als Insektizid verwandt wurde, kamen zur Entfernung von Sprayrückständen mit zufriedenstellenden Ergebnissen Wisch-, Wasch- und Bürstmaschinen zum Einsatz, als Waschflüssigkeiten dienten u.a. verdünnte Säuren, die auch erhitzt wurden [11]. Für weiche Früchte, Beeren und Gemüse waren die Verfahren mit hoher mechanischer Beanspruchung naturgemäß nicht anwendbar. Vor dem Anwendungsverbot von DDT wurden z.B. in den USA Äpfel zur Entfernung von Rückständen dieses Insektizides vor dem Verkauf maschinell gewaschen. Im Durchschnitt konnten so allerdings nur 45 % der DDT-Belastung entfernt werden, auch beim Kochen oder Sterilisieren werden DDT-Rückstände nicht oder nur zum Teil entfernt [25]. Bei der modernen industriellen Verarbeitung von Obst und Gemüse gehen verschiedene Verfahrensschritte oft mit einer Reduzierung der Kontamination einher. Ein großer Teil der Schadstoffe wird entfernt, wenn Früchte vor der Weiterverarbeitung geschält werden müssen. Viele Produkte durchlaufen nach Anlieferung in der Fabrik mehrere Waschvorgänge, teils getaucht oder im Sprayverfahren, auch unter Einsatz von Detergenzien. Waschen und Blanchieren können zu starker Reduktion der Kontamination führen. Das Insektizid Carbaryl läßt sich z.B. mit Wasser gut von Tomaten (97%), Spinat (87%) und Broccoli (77%) entfernen. Dagegen läßt sich das Insektizid Parathion praktisch nicht von Spinat und Broccoli abwaschen. Es ist bekannt, daß Parathion

aufgrund seiner Lipophilie in die Cuticula eindiffundiert und sich dort verteilt, ohne die Pflanzenepidermis zu penetrieren. Der Abbau geschieht hauptsächlich photochemisch [33]. Auch unter Zusatz von Detergenzien sind lediglich 25 % entfernbar. Nach Waschen, Blanchieren und Dosenkonservierung verbleiben in Spinat noch 34 % des ursprünglichen Parathion-Gehaltes, während Broccoli sogar noch 90 % enthält [9]. In den geschilderten Beispielen handelt es sich um vergleichsweise polare Verbindungen. Zur Entfernung der relevanten, in der Regel apolaren, Umweltkontaminanten sind die Verfahren ungeeignet. Denkbar wäre hier die Extraktion mit organischen Lösemitteln, wie es z.B. auf Basis von Aceton oder Alkoholen zur Entfernung von Aflatoxinen aus Lebensmitteln vorgeschlagen wurde [36]. Nachteilig bei diesem Verfahren sind Verluste an wasserlöslichen Nahrungsbestandteilen, Veränderungen organoleptischer Eigenschaften und die problematische Entsorgung der toxischen Lösungsmittelreste. In unserem Labor wird gegenwärtig die Eignung von überkritischem Kohlendioxid - das ist Kohlendioxid mit einer Temperatur über 31 °C und einem Druck oberhalb von 74 bar - zur Entfernung derartiger Kontaminanten von Oberflächen von Obst und Gemüse überprüft. Je nach Kombination von Druck- und Temperaturwerten, lassen sich Dichten zwischen 0,3 und 0,8 g/ccm einstellen. Parallel zur Dichte ändert sich auch die Polarität von überkritischem CO<sub>2</sub> und damit die Lösungseigenschaften. Auf einer Lösungsmittelpolaritätsskala von den Alkanen bis zu den niedrigen Fettsäuren wäre überkritisches CO<sub>2</sub> qualitativ in den Bereich zwischen Methylenchlorid und Essigester einzuordnen. Quantitativ ist die Lösungskraft allerdings etwas geringer als die der genannten Lösungsmittel. Bei 50 °C und 200 MPa hat es z.B. hervorragendes Lösevermögen für z.B. Organochlorverbindungen und PCB [42], die Extraktionsausbeuten liegen bei schwererflüchtigen Verbindungen um 100 % mit Standardabweichungen von 1 bis 4 %. Nach der Behandlung entweicht das Kohlendioxid rückstandsfrei als Gas. Wir verwendeten Blumenkohl (einzelne Röschen, ca. 30g, gespickt mit p, p'-DDT, Vinclozolin oder Pyren durch Eintauchen und anschließendes Abspülen und Trocknen). In ersten Versuchsreihen konnte durch überkritische CO<sub>2</sub>-Behandlung die z.T. recht hohe Kontamination wirkungsvoll, teilweise bis unterhalb der Nachweisempfindlichkeit, reduziert werden. (Analytik: GC, modifiziertes Verfahren

nach EPA Methode Nr. 625 bzw. HPLC bei Pyren). Aussehen, Farbe, Geruch und Geschmack der behandelten Blumenkohlstücke blieben unverändert, wie auch der Mineralstoffgehalt.

## Literatur

- [1] Adlercreutz H., 1990: Diet, breast cancer and sex hormone metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.* 595: 281-290
- [2] Beckman W.C., Newbold R.R., Teng C.T., McLachlan J.A., 1994: Molecular feminization of mouse seminal vesicle by prenatal exposure to diethylstilbestrol: altered expression of messenger RNA. *J. Urol.* 151: 1370-1378
- [3] Bergeron O., Crews O., McLachlan J.A., 1994 : PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomaker of environmental contamination. *Env. Health Persp.* 102: 780-781
- [4] Brotons J.A., Olea-Serrano M.F., Villalobos M., Pedraza V., Olea N., 1995: Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Env. Health Persp.* 103: 608-612
- [5] Bulger W.H., Kupfer D., 1983: Estrogenic activity of DDT analogs. *Am. J. Ind. Med.* 4: 163-173
- [6] Carlsen E., Giwerman A., Keiding N., Skakkebaek N.E., 1992: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit. Med. J.* 305: 609-613
- [7] Cummings A.M., Metcalf J.L., 1995: Methoxychlor regulates rat uterine estrogen-induced protein<sup>1,2</sup>. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130: 154-160
- [8] Colborn T., Clement C., eds. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Princeton: Princeton Scientific Publishing, 1992
- [9] Elkins E.R., 1989: Effect of commercial processing on pesticide residues in selected fruits and vegetables. *J. AOAC* 72 (3): 533-535
- [10] Field B., Selub M., Hughes C.L., 1990: Reproductive effects of environmental agents. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 8: 44-54
- [11] Frear D.E.H., ed.: Chemistry of Insecticides, Fungicides and Herbicides, D. Van Nostrand Company, Inc. 1949: pp.293-301
- [12] Gellert R., Heinrichs W., Swerdloff R., 1974: Effects of neonatally-administered DDT homology on reproductive function in male and female rats. *Neuroendocrinology* 16: 84-94
- [13] Giwerman A., Skakkebaek N.E., 1992 : The human testis - an organ at risk? *Int. J. Androl.* 15: 373-375
- [14] Gray L.E., 1992: Compound-induced alterations of sexual differentiation: a review of effects in humans and rodents. In: T. Colborn and C. Clement (Eds.), *Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife-human Connection, Vol.21*, Princeton Scientific Pub., Princeton, NJ, pp. 203-230
- [15] Gray L.E. jr., Ferrell J., Ostby J., 1986: Methoxychlor-induced (M) alterations of reproductive development in rats. *Toxicologist* 6(1): 295
- [16] Gray T.J.B., Gangolli S.D., 1986: Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Env. Health Persp.* 65: 229-235
- [17] Gunderson E.L., 1995: Dietary intakes of pesticides, selected elements, and other chemicals: FDA Total Diet Study, June 1984-April 1986. *J. AOAC Int.* 78

(4): 910-921

- [18] Hamon M., Fleet I.R., Heap R.B., 1990: Comparison of oestrone sulphate concentrations in mammary sections during lactogenesis and lactation in dairy ruminants. *J. Dairy Res.* 57: 419-422
- [19] Jahresbericht 1994 der Chemischen Landesuntersuchungsanstalt (CLUA) Karlsruhe
- [20] Kaldas R.S., Hughes C.L. jr., 1989: reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod. Toxicol.* 3: 81-89
- [21] Kelce W.R., Monosson E., Gray L.E.jr., 1995: An environmental antiandrogen. *Recent Progress In Hormone Research* 50: 449-453
- [22] Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M., 1995: Persistent DDT metabolite p, p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375: 581-585
- [23] Kimbough R.D., 1995: Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Critical rev. Toxicol.* 25 (2): 133-163
- [24] Lamming G.E., 1984: Report of the scientific group on anabolic agents in animal production. *Commission European Commun. Rep. Eur.* 8913: 4-25
- [25] Maier-Bode H., ed.: *Pflanzenschutzmittel-Rückstände*, Verlag Eugen Ulmer, 1965: pp.287-296
- [26] McLachlan J.A. ed. *Estrogens in the environment II*. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- [27] Nelson J.A., 1974. *Biochem. Pharmacol.* 23: 447-451
- [28] Osterlind A., 1986 : Diverging trends in incidence and mortality of testicular cancer in Denmark, 1943-1982. *Br. J. Cancer* 53: 501-505
- [29] Robinson A.K., Schmidt W.A., Stancel G.M., 1985. *J. Tox. Envir. Hlth.* 16: 493-508
- [30] Rückstands-Höchstmengenverordnung, 1994. Anlagen I bis 7 zur Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen. *Bundesgesetzblatt Teil I Nr.60*
- [31] Saal vom F.S., Nagel S.C., Palanza P., Boechler M., Parmigiani S., Welshons W.V., 1995: Estrogenic pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicology Letters* 77: 343-350
- [32] Safe S.H., 1995: Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Env. Health Persp.* 103: 346-351
- [33] Schwack W., Andlauer W., Armbrust W., 1994: Photochemistry of parathion in the plant cuticle environment: model reactions in the presence of 2-propanol and methyl 12-hydroxystearate. *Pestic. Sci.* 40: 279-284
- [34] Sharpe R.M., Skakkebaek N.E., 1993: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet* 341: 1392-1395
- [35] Sheehan D.M., Young M., 1979: Diethylstilbestrol and estradiol binding to serum albumin and pregnancy plasma of rat and human. *Endocrinology* 104: 1442-1446
- [36] Smith J.E., Solomons G.L., eds.: *Mycotoxins in Human Nutrition and Health*. *Commission European Commun. Rep. Eur.* 16048 EN , 1994: pp. 94-101
- [37] Soto A.M., Justicia H., Wray J.W., Sonnenschein C., 1991: p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Env. Health Persp.* 92: 167-173
- [38] Stillman R.J., 1982: In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the

- reproductive tract and reproductive performance in male and female offspring. Am. J. Obstet. Gynecol. 142: 905-921
- [39] Taylor P.R., Lawrence C.E., Hwang H.L., Paulson A.S., 1984: Polychlorinated biphenyls: influence on the birth weight and gestation. Am. J. Public Health 74: 1153
- [40] Thierfelder W., Mehnert W.H., Laußmann D., Arndt D., Reineke H.H., 1995: der Einfluß umweltrelevanter östrogenen oder östrogenartiger Substanzen auf das Reproduktionssystem. Bundesgesundheitsblatt 9: 337-341
- [41] U.S. Environmental Protection Agency (EPA ; 8601) , 1994: Dioxin risk characterization Vol.III
- [42] van der Velde E.G., de Haan W., Liem A.K.D., 1992: Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls and pesticides from soil. J. Chrom. 626: 135-143
- [43] Verdeal K., Ryan D.S., 1979: Naturally-occurring oestrogens in plant foodstuffs - a review. J. Food Protect. 7: 577-583
- [44] Welch R.M., Levin W., Conney A.H., 1969: Estrogenic action of DDT and its analogs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 14: 358-367
- [45] White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G., 1994: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology 135 (1): 175-182
- [46] Wicke I., Stähr B., Retzlaff A., 1995: Untersuchungen zum Einfluß von Ochra-toxin A und Deoxynivalenol auf die Fortpflanzungsleistung von Besamungsebern ( 1.Mitteilung ). Proceedings 17.Mykotoxin-Workshop in der Bundesforschungs-anstalt für Landwirtschaft (FAL), Braunschweig-Völkenrode 15.-17. Mai 1995 , S.39-48
- [47] Woese K., Lange D., Boess C., Bögl K.W., 1995: Produkte des ökologischen Landbaus. Bundesgesundheitsblatt 7: 265-273
- [48] Wong C., Kelce W.R., Sar M., Wilson E.M., 1995: Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. J. Biol. Chem. 270 (34): 19998-20003



## Biological Control of Postharvest Diseases of Fruit - Problems and Prospects

*E. Chalutz, S. Droby, L. Cohen, B. Wiess and A. Daus*

Department of Postharvest Science, Agricultural Research Organization The Volcani Center,  
P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel

### **Introduction**

Postharvest diseases of fresh fruits and vegetables traditionally have been controlled by synthetic chemical fungicides (Eckert and Ogawa, 1985). However, mounting concerns of consumers and health authorities regarding the use of these fungicides, particularly on food products, have increased in recent years. Several important fungicides were banned from use by the U.S. Environmental Protection Agency or voluntarily withdrawn from the market. Postharvest treatments of fresh fruits and vegetables with chemical pesticides have already been banned altogether by some European countries. Obviously, there has been an urgent need to develop new effective methods for disease control that are considered safe for human health and the environment. Biological control of postharvest diseases may be one promising approach to cope with this new challenge (Wilson et al., 1991).

Although a relatively new research area, the surge of activity in this field during the past 10 years has resulted in considerable new information which has been followed by research and development activity by the private industrial sector. Numerous research reports, a book (Wilson and Wisniewski, 1994) and several reviews (Wilson and Pusey, 1985; Janisiewicz, 1988; Wilson and Wisniewski, 1989; Chalutz and Wilson, 1990a; Jeffries and Jeger, 1990; Droby et al., 1991; Wilson et al., 1991; Wisniewski and Wilson, 1992; Droby et al., 1996) were published on the subject. In addition, at least two workshops in recent years focused on this emerging technology (Wilson and Chalutz, 1991a; Fokkema et al., 1993):

The development of the concept, and the problems and prospects involved in its application, will be discussed here.

The postharvest environment presents a unique challenge for biological control of postharvest diseases. On the one hand, several factors suggest that chances to succeed in the development of biological control measures may be high: the partially controlled environment, particularly temperature and humidity and the restricted site of application of the biocontrol product, are likely to increase the chances of success. On the other hand, the required very high level of disease control, food safety considerations, and the small size of the potential market are difficulties to be overcome. Nonetheless, expectations are high that the surge in activity in this field in recent years will result in viable products.

### **The Search for Antagonists**

The use of naturally occurring microorganisms to combat postharvest diseases of fruits was first suggested in the early 1950s (Gutter and Littauer, 1953). Since then, considerable work has been conducted to study the mode of action and evaluate the efficacy mostly of the antibiotic-producing bacterium *Bacillus subtilis*, both in the laboratory and under semi-commercial conditions (Pusey and Wilson, 1984; Pusey et al., 1986; Singh and Deverall, 1986; Utkhede and Sholberg, 1986; Korsten et al., 1991; Arras, 1993). The assumption that application of such antagonists to fruits may not be readily approved, led Wilson and Chalutz (1989) in the mid 1980's to embark on a search for effective antagonists that combat postharvest diseases by means other than antibiotic production. One of the most effective antagonists found was the US-7 isolate of the yeast *Pichia guilliermondii*, initially identified as *Debaryomyces hansenii* (McLaughlin et al., 1990a), which exhibited efficacy against several postharvest diseases under a range of environmental conditions (Chalutz and Wilson, 1990a; McLaughlin, et al., 1991; Paster, et al., 1993). The use of this antagonist as a biocontrol agent of postharvest diseases was subsequently patented (Wilson and Chalutz, 1991b; Wilson et al., 1993a; Wilson et al., 1994b).

In recent years, screening for antagonists has been practised in many laboratories. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents have been discussed (Smilanick, 1994), and improved screening procedures developed (Wilson et al.,



1993b). This has resulted in many published reports, recently summarized by Droby and Chalutz (1994a), and in the application and granting of additional patents (i.g. Wilson et al., 1993a).

### **Mode of Action of Antagonists**

The mode of action of most known biocontrol agents of postharvest diseases is poorly understood. Our limited understanding may be attributed to the difficulties in studying the complex interactions that take place between the host, the pathogen, the antagonist, and possibly other microorganisms present at the site of interaction. It is generally assumed (Droby and Chalutz, 1994a) that the mode of action of many biocontrol agents of postharvest diseases involves one or more of the following processes; antibiosis, nutrient competition, site exclusion, induced host resistance, and direct interactions between the antagonist and the pathogen. Since our first attempt to summarize the available information on the mode of action of postharvest biocontrol agents (Chalutz et al., 1988), additional information has been gathered on this topic. A recent study by Smilanick and Denis-Arrue (1992), for example, questions the sole involvement of the antibiotic substance pyrrolnitrin, produced by *Pseudomonas cepacia*, in the control of *Penicillium digitatum* on lemon fruit. Following the development of antibiotic-resistant isolates of *P. digitatum*, they demonstrated that the pathogen was still inhibited by the antagonist. Although effective in the control of many diseases, antibiotic-producing antagonists are not likely to be registered for postharvest use on food products.

Successful competition of the antagonist with the pathogens for nutrients and space has been suggested as a mode of action of antagonists by numerous investigators (Droby et al., 1989; Wilson and Wisniewski, 1989; Wisniewski et al., 1989; Roberts, 1990, 1991; Mercier and Wilson, 1994). This hypothesis is supported by several lines of evidence: nutrient competition was demonstrated by *P. guilliermondii* in culture when both the antagonist and the pathogen were co-cultured in a minimal synthetic medium (Droby et al., 1989); rapid multiplication and colonization of the antagonist cells at the wound site, compared with that of the pathogen, has been demonstrated in several interactions (Janisiewicz and Roitman, 1988; Droby et al., 1989; Smilanick and Denis-Arrue, 1992); exogenous

addition of nutrients to the interaction site has resulted in decreased efficacy of the antagonist (Droby et al., 1989); the enhanced efficacy of the biocontrol agent at low temperatures at which the antagonists grows faster than the pathogen, which was demonstrated in both laboratory (Droby and Chalutz, 1994b) and large-scale tests (Droby et al., 1993b), also supports this notion. Indeed, most successful non-antibiotic-producing antagonists grow rapidly at the wound site and are better adapted than the pathogens to extreme nutritional and environmental conditions such as temperature and osmotic conditions. However, no direct evidence have yet been presented to prove the direct involvement of nutrient competition in the interactions between the pathogen and the antagonist.

The role of specific host resistance mechanisms against postharvest pathogens of fruits and vegetables has been studied to only a limited extent. It is generally assumed, however, that the senescence of the detached fruit is associated with reduced resistance responses. The finding that citrus and other fruits and vegetables responded to the application of the antagonist cells by increased ethylene production and phenylalanine ammonia-lyase activity (Droby and Chalutz, 1994b), has suggested the induction of resistance processes in the host tissue. Subsequently, accumulation of the antifungal compounds scoparone and scopoletine was identified in the yeast antagonist-treated citrus tissue (Rodov et al., 1994). Similarly, the yeast antagonist *Candida saitoana* was found to induce the enzyme chitinase, postulated to play a role in the defense of plants against pathogens (Wilson et al., 1994a).

The antagonist and the pathogen may directly interact in several different ways, the most extensively studied of which is direct parasitism, well documented in biological control by *Trichoderma* sp. of soilborne and foliar diseases (Elad et al., 1982; Elad, 1995). The information available on direct interactions between antagonists and pathogens of postharvest diseases is meager. Wisniewski et al. (1991) have reported the *in vitro* attachment of cells of the yeast antagonist *P. guilliermondii* to the mycelium of *Botrytis cinerea*. This attachment, which may involve lectin-type binding, was blocked by exposure to compounds that affect protein integrity and respiration. In addition, *P. guilliermondii* exhibited high activity of  $\beta$ -1, 3-glucanase, which may be associated with its attachment and with the resulting degradation of the cell walls of the pathogen (Wisniewski et al., 1991;

Droby et al., 1993c). This enzyme and its possible role in the antagonist-pathogen interaction has been further characterized (Avraham, 1994). We have recently observed that an extracellular polysaccharide extracted from the surface of the cells of the yeast *P. guilliermondii*, exhibited antifungal activity in culture and on the fruit against postharvest pathogens (Droby et al., 1993c), suggesting its possible involvement in the antagonist mode of action.

### **Enhancement of the Biocontrol Activity**

Unlike soilborne or field diseases, in which control of 50 % of the disease may be satisfactory, the control of postharvest diseases of fresh fruit and vegetables requires a very high efficacy. However, even when considering the most successful results reported to date, a highly effective biocontrol antagonist rarely matches the levels of disease control attained by synthetic chemical fungicides, particularly against latent infections. Thus, enhancement of the efficacy of biocontrol agents may still be required for successful use (Pusey, 1994).

Rapid, efficient and cost-effective mass production of the antagonist, usually by fermentation, is a key issue (Hofstein et al., 1994). This is because the efficacy of many antagonists of wound pathogens is directly related to the number of antagonist propagules applied (Chalutz and Wilson, 1990b; Hofstein et al., 1994). Thus, one way to enhance efficacy is simply by applying a larger number of antagonist cells. Other important considerations are the timing, mode and medium of delivery of the antagonist to the commodity. Each of these factors may profoundly influence efficacy. For example, we have noticed in our investigations that application of the yeast antagonist in a water suspension prior to waxing results in a much higher efficacy than application of the antagonist in the wax. Enhancement of biocontrol agents can be achieved also by the addition of nutrients that are efficiently utilized by the antagonist and poorly so by the pathogen (Janisiewicz, 1988; Janisiewicz and Roitman, 1988; Janisiewicz et al., 1994). We have found (McLaughlin et al., 1990b; 1991; Chalutz et al., 1992a) that the addition of calcium salts enhanced the activity of several yeast antagonists against different postharvest diseases. This phenomenon is currently under investigation to elucidate its mechanism (Wisniewski et al., 1995).

The most obvious and readily available way to enhance the activity of biocontrol

antagonists is to adopt an integrated control approach and combine the biocontrol procedure with other chemical or physical methods of disease control. For example, the biocontrol efficacy of the yeast antagonists we have tested against citrus mold rots in laboratory and semi-commercial tests, was enhanced by the addition to the yeast preparation of small concentrations of imazalil or TBZ, the commercially used chemical fungicides (Droby et al., 1993b; Hofstein et al., 1994). Similarly, *B. subtilis* was compatible with dichloran used to control *Rhizopus* rot (Pusey et al., 1986). Other possibilities to enhance biocontrol activity are offered by the integration of the procedure with such physical methods as curing or heat treatments (Barkai-Golan and Douglas, 1991) ultraviolet light (Chalutz et al., 1992b; Droby et al., 1993a; Wilson et al., 1994a) or natural products (Aharoni et al., 1993; Wilson et al., 1994a). Another readily applicable way to enhance efficacy is to combine the biocontrol treatment with modified or controlled atmosphere (CA) and cold storage (Sugar et al., 1994). We have recently tested the compatibility of yeast antagonist with CA storage against post-harvest diseases of nectarines (Lurie et al., 1995).

With the advance of molecular biology techniques, the prospects for enhancing biocontrol agents through genetic manipulations become feasible. However, in order to exploit this avenue, we must first have a thorough understanding of the mode of action of the antagonist. As yet, this has been achieved for only a few antibiotic-producing antagonists.

Based on the information available to date, it seems that for biocontrol antagonists to be used successfully to control postharvest diseases, their activity has to be enhanced through integration with other disease control measures. The postharvest arena seems to provide the most suitable environment to achieve such integration.

### **Industrial Production and Commercial Use of Biocontrol Antagonists**

From an industry point of view, a successful antagonist should have the following characteristics (Hofstein et al., 1994; Whitesides et al., 1994): Genetically stable; exhibits high and consistent efficacy against a wide range of pathogens; able to survive under adverse environmental conditions; amenable to rapid fermentation on inexpensive media; capable of being formulated into a stable product; compatible with chemical and physical treatments of the commodity; safe to

humans and to non-target organisms.

Registration of a biocontrol product is required before it can be tested on a large scale. Although this registration is not as expensive and time consuming as is the registration of a chemical fungicide (Whiteside et al., 1994), this requirement hinders the development process. To overcome this difficulty in part, semi-commercial pilot tests are to be conducted using relatively large quantities of naturally-infected fruit, treated under conditions that resemble commercial conditions as closely as possible. The final step would be the testing of the product in the packinghouse. All in all, registration, large-scale production and formulation of a biocontrol product, and its semi-commercial and commercial testing, are costly operations that can be conducted only by or in association with a private company. Indeed, in recent years, several private firms have been involved in the development of biocontrol product aimed at controlling postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. It is hoped that their efforts will result in commercial products that will be available in the near future. A significant first step in this direction occurred in February 1995, when the US Environmental Protection Agency approved Ecogen's Aspire™ biofungicide for control of postharvest decay of citrus and apple.

In spite of the considerable efforts invested in research and development and the progress achieved in the past 5 years, the industry still does not use a commercial biofungicide for the control of postharvest diseases. However, such products are expected to become available in the very near future. Whether or not they will be widely used will depend not only on their performance under commercial conditions but also on their acceptance by the consumer as safe alternatives to synthetic chemical fungicides.

## References

- Arras, G. (1993). Inhibition of postharvest fungal pathogens by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit, *Adv. Hortic. Sci.* 7: 123.
- Avraham, A. (1994). Isolation and biochemical characterization of exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Pichia guilliermondii*, M.Sc. thesis, submitted to the Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.
- Barkai-Golan, R., and Douglas, J. P. (1991). Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control, *Plant Dis.* 75: 1085.
- Chalutz, E., Droby, S., and Wilson, C. L. (1988). Mechanisms of action of postharvest biocontrol agents,

*Proc. 5th. Int. Congr. Plant Pathology*, p. 422.

- Chalutz, E., and Wilson C. L. (1990a). Biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus by *Debaryomyces hansenii*, *Plant Dis.* 74: 134.
- Chalutz, E., and Wilson, C. L. (1990b). Biocontrol of postharvest diseases of fruits and vegetables through manipulating epiphytic plant microflora, *Proc. 2nd Int. Symp. on Biotechnology and Food Safety*, Butterworth-Heinemann, Boston, MA. p. 255.
- Chalutz, E., Droby, S., Cohen, L., Wiess, B., Daus, A., Wilson, C. L., and Wisniewski, M. (1992a). Calcium-enhanced biocontrol activity of two yeast antagonists of citrus postharvest diseases, *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3: 1066.
- Chalutz, E., Droby, S., Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E. (1992b). UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit, *Phytochem. Phytobiol. B: Biol.*, 15: 367.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., and Wisniewski, M. (1989). Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35: 794.
- Droby, S., Chalutz, E., and Wilson, C. L. (1991). Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables, *Postharvest News Inf.* 2: 169.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, L., Gaba, V., Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E. (1993a). Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathol.* 42: 418.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., Fridlender, B., Cohen, L., Wiess, B., Timar, D., and Chalutz, E. (1993b). Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: A biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit, *Biol. Control* 3: 47.
- Droby, S., Robin, D., Chalutz, E., and Chet, I. (1993c). Possible role of glucanase and extracellular polymers in the mode of action of yeast antagonists of postharvest diseases. *Phytoparasitica* 21: 167.
- Droby, S., and Chalutz, E. (1994a). Successful biocontrol of postharvest pathogens of fruits and vegetables, *Proc. Brighton Crop Protection Conf. - Pests and Diseases - 1994*, p. 1265.
- Droby, S., and Chalutz, E. (1994b). Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases, in: *Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice*. (C. L. Wilson and M. Wisniewski, Eds.). CRC Press Inc., Boca Raton, Fl, p. 63.
- Droby, S., Cohen, L., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L., and Chalutz, E. (1996). Are biological antagonists a viable alternative to synthetic fungicides used today for prevention of postharvest diseases of fruits and vegetables? *Rev. Environ. Health* (in press).
- Eckert, J. W., and Ogawa, J. M. (1985). The chemical control of postharvest diseases: Subtropical and tropical fruits, *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 421.
- Elad, Y. (1995). Mycoparasitism. In. *Pathogenesis and Host-Parasite Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Basis*, (K. Kohmoto, R. P. Singh, U. S. Singh, and R. Zeigler, Eds.). Pergamon Press, Oxford, UK (in press).
- Elad, Y., Chet, I., and Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*, *Can. J. Microbiol.* 28: 719.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., and Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruit. *Phytopathology* 82: 398.
- Fokkema, N. J., Kohl, J., and Elad, Y. (1993). Biological control of foliar and postharvest diseases, *Bull. Int. Org. Biol. Integr. Control. OILB/SROP* 16: 246.
- Gutter Y., and Littauer, F. (1953). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* against citrus fruit pathogens, *Bull. Res. Counc. Israel*, 33: 192.
- Hofstein, R., Fridlender, B., Chalutz, E., and Droby, S. (1994). Large scale production and pilot testing of biocontrol agents of postharvest diseases, in: *Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice*, (C. L. Wilson and M. Wisniewski, Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, Fl., p. 89.
- Janisiewicz, W. J. (1988). Biological control of diseases of fruits, in: *Biocontrol of Plant Diseases* (K.G. Mukerji, and K.L. Grag, Eds.), CRC Press, Boca Raton, Fl., p. 153.
- Janisiewicz, W. J., Peterson, D. L., and Bors, R. (1994). Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseum*, *Plant Dis.* 78: 466.
- Janisiewicz, W. J., and Roitman, J. (1988). Biological control of blue and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*, *Phytopathology* 78: 1697.

- Jeffries, P., and Jeger, M. J. (1990). The biological control of postharvest diseases of fruits, *Postharvest News Inf.* 1: 365.
- Korsten, L., Villiers, E. E., Jeger, E. S., Cook, N., and Kotze, J. M. (1991). Biological control of avocado postharvest diseases. *S. Afr. Avocado Growers' Assoc. Yearb.* 14: 57.
- Lurie, S., Droby, S., Chalupowicz, L., and Chalutz, E. (1995). Efficacy of *Candida oleophila* strain 182 in preventing *Penicillium expansum* infection of nectarine fruits. *Phytoparasitica* 23(3): 231.
- McLaughlin, R. J., Wilson, C. L., Chalutz, E., Kurtzmann, C. P., Fett, W. F., and Osman, S. F. (1990a). Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables, *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3583.
- McLaughlin, R. J., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L., and Chalutz, E. (1990b). Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp, *Phytopathology* 80: 456.
- McLaughlin, R. J., Wilson, C. L., Droby, S., Ben-Arie, R., and Chalutz, E. (1991). Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*, *Plant Dis.* 76: 470.
- Mercier, J., and Wilson, C. L. (1994). Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage, *Biol. Control* 4: 138.
- Paster, N., Droby, S., Chalutz, E., Menasherov, M., Nitzan, R., and Wilson, C. L. (1993). Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against fungi of stored grains, *Mycol. Res.* 97: 1201.
- Pusey, P. L., and Wilson, C. L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*, *Plant Dis.* 68: 753.
- Pusey, P. L., Wilson, C. L., Hotchkiss, M. W., and Franklin, J. D. (1986). Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dichloran, and cold-storage conditions, *Plant Dis* 70: 587.
- Pusey, P. L. (1994). Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies, in: *Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice*, (C.L. Wilson, and M. Wisniewski, Eds.) CRC Press Inc., Boca Raton, FL, p. 77.
- Roberts, R. G. (1990). Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*, *Phytopathology* 80: 526.
- Roberts, R. G. (1991). Characterization of postharvest biological control of deciduous fruit diseases by *Cryptococcus spp.*, in: *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits Vegetables. USDA Publ., ARS-92: 32.*
- Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., D'hallewin, G., Castina, T., and Farg, D. (1994). Accumulation of the phytoalexins scoparone and scopoletine in citrus fruit subjected to various postharvest treatments, *Int. Symp. Natural Phenols in Plant Resistance, Acta Hort.* 381: 517.
- Sholberg, P. L., and Shimizu, B. N. (1991). Use of natural plant products, hinokitiol, to extend the shelf-life of peaches, *Can Inst. Food Sci. Technol. J.* 24: 273.
- Singh, V., and Deverall, B. J. (1986). *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83: 487.
- Smilanick, J. L., and Denis-Arue, R. (1992). Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species, *Plant Dis.* 76: 481.
- Smilanick, J. L. (1994). Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents, in: *Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice*, (C.L. Wilson, and M. Wisniewski, Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, p. 25.
- Stevens, C., Khan, V. A., Tang, A. Y., and Lu, J. Y. (1990). The effect of ultraviolet irradiation on mold rots and nutrients of stored sweet potatoes, *J. Food Prot.* 53: 223.
- Sugar, D., Roberts, R. G., Hilton, R. J., Reghetti, T. L., and Sanchez, E. E. (1994). Integration of cultural methods with yeast treatment for control of postharvest fruit decay in pear, *Plant Dis.* 78: 791.
- Utkhede, R. S., and Sholberg, P. L. (1986). *In vitro* inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and *in vitro* control of two postharvest cherry diseases, *Can. J. Microbiol.* 32: 963.
- Whitesides, S. K., Daoust, R. S., and Gouger, R. J. (1994). Commercialization of biological control

- agents: An industry perspective, in: *Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice*. (C.L. Wilson and M. Wisniewski, Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, Fl, p. 107.
- Wilson, C. L. and Pusey, P. L. (1985). Potential for biological control of postharvest plant diseases, *Plant Dis.* 69: 375.
- Wilson, C. L. and Chalutz, E. (1989). Postharvest biological control of Penicillium rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria, *Sci. Hortic.* 40: 105.
- Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology, *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 425.
- Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., Biles, C. L., McLaughlin, R., Chalutz, E. and Droby, S. (1991). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides, *Crop Prot.* 10: 172.
- Wilson, C. L. and Chalutz, E. (Eds.) (1991a). International Workshop on Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits, *USDA Publ., ARS-92*, 320 pp.
- Wilson, C. L. and Chalutz, E. (1991b). *Pichia guilliermondii* (Anamorph *Candida guilliermondii*) useful for the biological control of postharvest rots of fruits, *U.S. Patent No. 5,041,384*.
- Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. and Chalutz, E. (1993a) Biological control of diseases of harvest agricultural commodities using strains of the yeast *Candida oleophila*, *U.S Patent Appl. No. 077745,796*.
- Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., Droby, S. and Chalutz, E. (1993b). A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables, *Sci. Hortic.* 53: 183.
- Wilson, C. L. and Wisniewski, M. (Eds.). (1994). *Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice*, CRC Press Inc., Boca Raton, Fl, 182 pp.
- Wilson, C. L., El Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J., Khan, V., and Arul, J. (1994a). Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables, *Plant Dis.* 78:837.
- Wilson, C. L., McLaughlin, R. and Chalutz, E. (1994b). Inhibiting plant pathogens with nonantibiotic antagonistic microorganism(s). *U.S. Patent Appl. No. 07395,681*. Revised version filed in 1994; No. S.N. 08/297,088.
- Wisniewski, M. E., Wilson, C. L. and Hershberger, W. (1989). Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*, *Can. J. Bot.* 67:2317.
- Wisniewski, M. E., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. L. and Chalutz, E. (1991). Mode of action of the biocontrol yeast *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:245.
- Wisniewski, M. E. and Wilson, C. L. (1992). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances, *Hort Science* 27: 94.
- Wisniewski, M. E., Droby, S., Chalutz, E. and Eliam, Y. (1995). Effect of Ca<sup>+2</sup> and Mg<sup>+2</sup> on *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* in vitro and the biocontrol activity of *Candida oleophila*, *Plant Pathol.* (in press).





## Einfluß des Kulturfiltrates von *Bacillus sp.* auf die Sporenkeimung von *Penicillium digitatum* und *Botrytis cinerea*

Trierweiler B., Tauscher B.

Institut für Chemie und Biologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung,  
Engesserstr. 20, D-76131 Karlsruhe

### Einleitung

Frisches Obst und Gemüse ist nach der Ernte für den Befall durch pathogene Pilze und Bakterien sehr empfänglich, da es reich an Wasser und Nährstoffen ist und innere Resistenzen verloren hat, die es während der Entwicklung schützen (Droby S. 1992). Die pathogenen Pilze und Bakterien führen zu einem Nachernteverlust von ca. 24% (Wilson C.L. 1989). Um eine Reduzierung der Nachernteschäden zu erreichen, werden in hohem Maße Fungizide eingesetzt. Der enorme Fungizideinsatz führte jedoch in jüngster Zeit zu resistenten Stämmen von Schadorganismen, wie z.B. bei *Penicillium digitatum* (Droby S. 1989), *Botrytis cinerea* (Washington W.S. 1992). Auf Grund der entstehenden Resistenzen und des öffentlichen Drucks besteht die Notwendigkeit, die Verwendung synthetischer Fungizide zu reduzieren, und gleichzeitig sichere und effektive Alternativen zu finden (Wilson C.L. 1993). Daher wurde in den letzten Jahren die Suche nach biologischen Antagonisten intensiviert. Dies führte zur Isolierung von Organismen, die eine hemmende Wirkung auf die Sporenkeimung verschiedener Schadpilze, wie z.B. *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea* (Janisiewicz W.J. 1988) aufwiesen.

## Material und Methode

### Anzucht von *Bacillus* sp. und Gewinnung des zellfreien Kulturfiltrates

Der Mikroorganismus wurde 14 Tage in 500mL Malzextraktbouillon (E.Merck, Darmstadt) in 1L Erlenmeyerkolben bei 30°C im Dunkeln kultiviert. Der pH-Wert des Malzextraktbouillon betrug 4,8. Die Wachstumsansätze wurden in regelmäßigen Abständen leicht geschüttelt. Anschließend zentrifugierten wir die Zellen in einer Heraeus-Christ Labofuge III bei 4302g für 30 Min. ab. Um jegliche Kontamination mit Zellen zu vermeiden, wurde das Kulturfiltrat nach der Zentrifugation über einen Cellulose-Acetat-Filter (Sartorius, Porengröße 0,2µm) gegeben. Zur Isolierung der hemmenden Substanz wurde eine Größentrennung mit Hilfe einer Ultrafiltrationsmembran (Amicon-Zelle, Filtertyp YM3, 43mm, Ausschlußgröße 3000 Da) durchgeführt.

### In vitro Aktivitätstest

Die antagonistische Wirkung gegen *Penicillium digitatum* Sacc. und *Botrytis cinerea* Persoon:Fries wurde in einem in vitro-Test (nach Droby et al. 1993 verändert) geprüft. Dazu wurde die Sporenceimung der beiden Pilze in Gegenwart des Kulturfiltrates bzw. des weiter bearbeiteten Kulturfiltrates getestet. In Abweichung von Droby S. et al. 1993 verwendeten wir 90µL Sporensuspension ( $5 \times 10^4$  Sporen/mL) und 10µL Kulturfiltrat bzw. weiter bearbeitetes Kulturfiltrat. Diese Änderung ist nötig, da für den in vitro-Test keine großen Mengen an Testsubstanz zur Verfügung stehen. Von diesen Ansätzen wurden 20µL auf Diagnostica-Objektträger gegeben und nach 24h Inkubation bei 30°C die Sporenceimung mikroskopisch ausgewertet. Dabei galt eine Spore als gekeimt, wenn der Keimschlauch länger als der Durchmesser der Spore war.

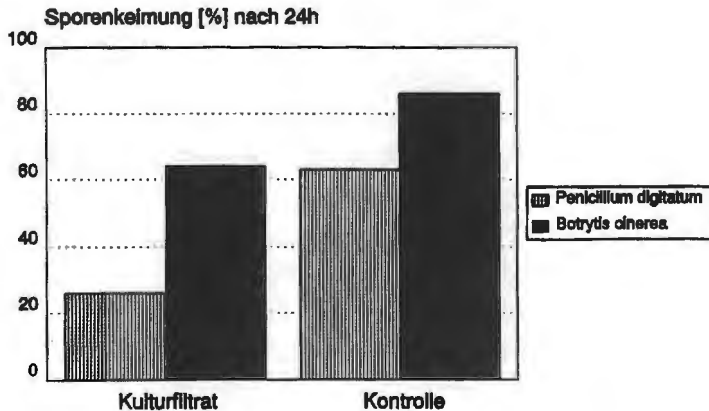
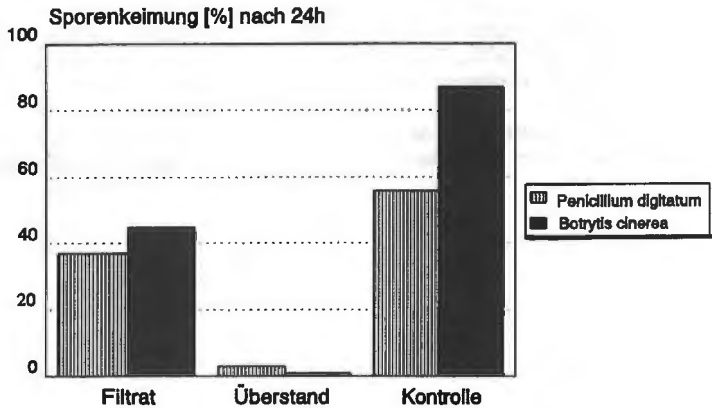


Abb.1: Einfluß des Kulturfiltrates von auf die Sporenceimung von *Penicillium digitatum* und *Botrytis cinerea*.



**Abb.2:** Einfluß des Überstandes der Ultrafiltrationsmembran des Kulturfiltrates auf die Sporenceimung von *Penicillium digitatum* und *Botrytis cinerea*.

## Ergebnis

Das gewonnene Kulturfiltrat zeigte eine deutliche Hemmung der Sporenceimung von *Penicillium digitatum* und *Botrytis cinerea* (Abb.1) im in vitro Aktivitätstest. Die Bearbeitung des Kulturfiltrates mittels Ultrafiltrationsmembran ergab eine Anreicherung der hemmenden Wirkstoffe im Überstand (Abb.2).

Weitergehende Untersuchungen zur Charakterisierung der biologisch aktiven Verbindungen führten zur Isolierung zweier Verbindungen mit Molekulargewichten größer 50 kDa (Helbig J. et al).

## Literatur

- Droby S., Chalutz E., Wilson C.L. and Wisniewski M.E., Biological control of postharvest diseases: A promising alternative to the use of synthetic fungicides, *Phytoparasitica*, 20 (Suppl.) 1992, 149-153 /1992/
- Droby S., Hofstein R., Wilson C.L., Wisniewski M., Fridlender B., Cohen L., Weiss B., Daus A., Timar D., and Chalutz E.; Pilot Testing of *Pichia guilliermondii*; A Biocontrol Agent of Postharvest Diseases of citrus Fruit; *Biological control* 3, 47-52 (1993)
- Janisiewicz W.J., 1988, Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures, *Phytopathology* 78:194-198

- Washington W.S., Shanmuganathan N., Forbes C., Fungicide control of strawberry fruit rots, and the field occurrence of resistance of *Botrytis cinerea* to Iprodione, Benomyl and Dichlofluanid Crop Protection, 1992, Vol. 11, Iss 4, pp 355-360
- Wilson C.L. and Wisniewski M.E., Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology, Annu. Rev. Phytopathol. 1989, 27:425- 41
- Wilson C.L., Wisniewski M.E., Droby S. and Chalutz E., A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables, Scientia Horticulturae, 53 (1993) 183-189
- Helbig J., Schulz A., Tauscher B. und Trierweiler B., Characterization of the biocontrol activity of *Bacillus sp.* in the control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum*, in Vorbereitung 1996



## Sind Phenole und Polyacetylene der Karotten gegen Lagerfäule wirksam?

*Kerstin Olsson und Rita Svensson*

Svalöf Weibull AB, S-268 81 Svalöv, Schweden

### **Einleitung**

Die Möhrenfliege (*Psila rosae*) ist ein ernster Schädling für den Karottenanbau in vielen Ländern. Es gibt keine vollständig resistente Sorten, aber eine Sorte mit recht guter Widerstandskraft ist jetzt auf dem Markt. Die verbesserte Resistenz beruht unter anderem auf dem niedrigen Gehalt des Hauptphenols in der Karotte, nämlich der Chlorogensäure. Dieser Stoff ist vor allem in den äußeren Geweben der Wurzel enthalten, und lockt die Fliegenlarven an (Cole, 1985).

Falls sich die Züchtung auf Resistenz gegen die Möhrenfliege auf der Auswahl von Genotypen mit niedrigem Chlorogensäuregehalt basiert, kann dies wahrscheinlich Probleme mit den Pilzkrankheiten verursachen. Die Bedeutung der Phenole im Resistenzmechanismus ist unklar, aber *in vitro* Versuche haben gezeigt, daß mehrere Verbindungen, Chlorogensäure einbegriffen, antimikrobielle Wirkung haben (Davies & Lewis, 1981; Garrod & Lewis, 1982; Koch *et al.*, 1990).

Falcarindiol (heptadeca-1,9(Z)-dien-4,6-diyn-3,8-diol) ist ein Polyacetylen, das auch in den äußeren Geweben der Karottenwurzel vorhanden ist. Auch lockt diese Substanz die Möhrenfliege dazu an, Eier zu legen und lockt die Larven an (Maki *et al.*, 1989). Ähnlich wie die phenolischen Stoffe hat Falcarindiol die Eigenschaft, das Pilzwachstum zu hemmen (Davies & Lewis, 1981; Garrod & Lewis, 1982). Falcarinol (heptadeca-1,9(Z)-dien-4,6-diyn-3-ol) ist eine nahe verwandte Substanz, die auch Mikroorganismen hemmt (Hansen & Boll, 1986).

Bevor eine Züchtungsarbeit auf Resistenz gegen die Möhrenfliege begonnen wird, ist es wichtig zu klären, wie weit Chlorogensäure, andere phenolische Stoffe

und/oder Polyacetylene in der Karotte die Widerstandskraft gegen Pilzbefall beeinflussen. Eine Karotte mit niederem Gehalt von z. B. Chlorogensäure oder Falcarindiol und der damit verbundenen Widerstandskraft gegen Insekten, darf ja auf keinen Fall besonders empfänglich für Pilz werden.

Zu den wichtigsten Lagerkrankheiten der Karotte in vielen Ländern mit gemäßigttem Klima gehört die Kraterfäule (*Rhizoctonia carotae*), der Becherpilz (*Sclerotinia sclerotiorum*) und die Lakritzenfäule (*Mycocentrospora acerina*). Es gibt dafür keine vollkommen resistente Sorten, und das Verlangen nach verbesserten Sorten ist groß.

Der Zweck des Projektes war, zu klären, ob es Sortenunterschiede bezüglich der Empfindlichkeit für diese Lagerungsfäulen gibt, und ob die Sortenunterschiede vom Gehalt an phenolischen Stoffen oder Polyacetylenen in der Karotte hergeleitet werden können.

## Material und Methoden

16 Sorten wurden in drei Wiederholungen angebaut, und die geernteten Karottenwurzeln wurden bis Dezember-Januar bei einer Temperatur von 0-3°C gelagert. Die chemischen Analysen wurden an den äußersten Geweben von 10 frischen Wurzeln per Wiederholung durchgeführt. Die Resistenztests wurden an 8-12 Wurzeln per Test nach Oberflächensterilisierung gemacht.

### Chemische Analysen

Die Chlorogensäure wurde mit Hilfe von siedendem Ethanol extrahiert, der Extrakt durch ein Millipore Filter filtriert, und der Gehalt nach Chromatographie (HPLC, C<sub>18</sub>-Säule) bestimmt. Die Karottenproben wurden auch mit Natriumhydroxid unter Stickstoffgas behandelt, um die Phenolester zu hydrolysieren, und der Extrakt wurde danach mit Salzsäure gesäuert, um die Glykoside zu hydrolysieren. Der Extrakt wurde auf Millipore Filter gereinigt, bevor der Gehalt von den verschiedenen Phenolsäuren nach HPLC bestimmt werden konnte. Als interner Standard wurde Resorcylsäure verwendet.

Polyacetylene, Falcarinol und Falcarindiol, wurden mit Ethylacetat und mit Zusatz eines Antioxidants extrahiert. Der Extrakt wurde über Nacht eingedampft, der Rest in Hexan gelöst und auf einer Kieselsäule gereinigt. Die Polyacetylene wurden in Äther:Hexan gesammelt, und Stearylacetat als internen Standard hinzugefügt. Der Extrakt wurde eingedampft, und die Reste in Ethylacetat gelöst. Die Gehalte wurden dann nach GC bestimmt.

### Resistenztests

*Rhizoctonia carotae* (Kraterfäule): Zwei Agarpfropfen mit Myzelium von zwei Pilzisolaten wurden mit Zahnstochern auf der Oberfläche jeder Wurzel angebracht. Die Wurzeln legte man in Plastikkisten mit hoher Luftfeuchtigkeit, sie wurden im Dunkeln bei 20°C

während der ersten 12 Tage der Ansteckung ausgesetzt und danach bei 2°C noch weitere 12 Wochen. Die Empfindlichkeit der Karottensorten konnte dann bestimmt und beurteilt werden, um festzustellen wieviel die Wurzeloberfläche von der Kraterfäule befallen war. Ein Index wurde berechnet.

*Sclerotinia sclerotiorum* (Becherpilz): Die Ansteckung erfolgte auf die gleiche Art wie bei *R. carotae*. Die Wurzeln wurden im Dunkeln bei 10°C während der Zeit von 3 Wochen der Ansteckung ausgesetzt. Die Empfindlichkeit für den Pilzangriff wurde als Gewichtsverlust angegeben, nachdem die angegriffenen Gewebe entfernt wurden.

*Mycocentrospora acerina* (Lakritzenfäule): Zwei 25 mm dicke Scheiben wurden aus der Mitte jeder Karottenwurzel geschnitten und mit der Schneidefläche nach oben in eine Plastikkiste gelegt. Auf die Schneidefläche der einen Scheibe wurde ein Isolat des Pilzes gepinselt, und auf die andere Scheibe ein anderes Isolat. Das Inokulum bestand aus Myzel und Chlamydosporen gemischt mit Agar-Agar und Wasser. Die Wurzeln wurden bei 4°C während der Zeit von 8 Wochen der Ansteckung ausgesetzt. Die Scheiben schnitt man in die Hälfte, und der Fäuleangriff wurde als Anzahl mm des mit Fäule befallenen Gewebes in den verschiedenen Geweben abgelesen.

## Resultat und Diskussion

In der Karotte kommen die phenolischen Stoffe entweder als Glykoside, Ester oder freie Phenolsäuren vor. Der Gehalt des gewöhnlichsten Stoffes, Chlorogensäure, war sehr unterschiedlich in den verschiedenen Sorten vorhanden. Nach der Hydrolyse des Karottenextraktes wurden folgende Phenolsäuren in abnehmenden Konzentrationen festgestellt: Kaffeesäure > p-Hydroxybenzoesäure > Ferulasäure > Vanillinsäure > p-Cumarsäure. In allen Fällen gab es signifikante Sortenunterschiede. Die Gehalte nahmen von der Wurzeloberfläche und im Richtung nach innen ab. Damit war der Chlorogensäuregehalt der Haut (Periderm und pericyklisches Parenchym) ungefähr sechsmal höher als der Gehalt im Bereich von 1 mm innerhalb der Haut, und 60 mal höher als im Bereich von 2 mm des dahinter gelegenen Gewebes ("Phloem" = Phloemparenchym).

Der Falcarindiolgehalt in den äußersten Millimetern der Karottenwurzel ist unter den Sorten sehr mannigfaltig. Der Mittelwert in diesem Gewebe war für die 16 Sorten fünfmal höher als in dem Gewebe, das 1 mm innerhalb der Haut liegt. Der Falcarinolgehalt war bedeutend niedriger als der Diolgehalt sowohl in der Haut wie auch im Phloem.

Die Ergebnisse von den Testen mit *R. carotae*, wo der Fäuleangriff an der Oberfläche der Wurzel abgelesen wurde, zeigten bedeutende Sortenunterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit. Das Gleiche galt für die Empfindlichkeit von *S. sclerotiorum*, wo das Gewicht der naßen Fäule bestimmt wurde. Es gab auch große

Sortenunterschiede bei der Empfindlichkeit für Angriffe der beiden Isolate von *M. acerina*. Hier war die Ausbreitung der Fäule bedeutend geringer in den äußeren Geweben der Karotte als in den inneren.

Falls die phenolischen Stoffe oder Polyacetylene den Pilzzuwachs zu hemmen vermögen, so kann eine hohe Konzentration im Außengewebe der Karotte ein chemisches Hindernis für den Pilzangriff von außen ausmachen. Es ist unterdessen schwierig festzustellen, welche Substanz oder welche von diesen Substanzen der Karotte eine höhere Widerstandskraft gegen *M. acerina* in der Haut als in den inneren Geweben geben.

Die Unterschiede des Gehaltes von phenolischen Stoffen bzw. Polyacetylenen wurden mit den Unterschieden der Empfindlichkeit für die verschiedenen Pilzkrankheiten zwischen den Sorten verglichen. Korrelationsanalysen zeigen, daß es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Phenolsäuren einerseits und der Empfindlichkeit für die drei Fäulepilze gibt.

Die Polyacetylene scheinen die Empfindlichkeit für *R. carotae* nicht zu beeinflussen. Es gab einen schwachen negativen Zusammenhang zwischen dem Gehalt von Falcarindiol in der Haut und der Empfindlichkeit für *S. sclerotiorum* ( $r=-0.50$ ;  $P<0.05$ ); aber dagegen nicht zwischen dem Gehalt von Falcarinol und der Empfindlichkeit.

Die Analysen zeigen auch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Polyacetylenen einerseits und *M. acerina*. Bei der Untersuchung der einzelnen Ergebnisse findet man, daß zwei Sorten relativ geringe Falcarindiolgehalte in der Haut haben, aber eine recht gute Widerstandskraft gegen den Pilz (Fig. 1).

Wenn man diese zwei Sorten von den Korrelationsberechnungen ausschließt, so wird der Koeffizient signifikant ( $r=-0.84$ ;  $P<0.001$ ). Eine Sorte mit niedrigerem Falcarindiolgehalt in der Haut könnte dadurch mehr empfindlich für die Lakritzenfäule werden, als eine Sorte mit höherem Gehalt in der Haut.



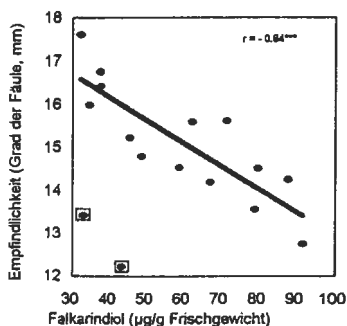


Fig. 1. Zusammenhang zwischen Falcarindiolgehalt in der Haut der Karotte und Empfindlichkeit für *Mycocentrospora acerina* in 16 Sorten.

Die Resistenzmechanismen sowohl gegen Insekten wie Pilze sind komplex. Oft ist es nicht eine einzelne Substanz, die die Widerstandskraft bestimmt, sondern sowohl chemische wie auch strukturelle Komponenten beeinflussen die Mechanismen. Die zwei Ausnahmen in der Abbildung 1 zeigen dies unter anderem. Es kann auch ein Zusammenwirken zwischen zwei oder mehreren Komponenten vorhanden sein. Der Gehalt von Chlorogensäure scheint die Widerstandskraft gegen die Lagerfäulepilze nicht zu beeinflussen. Die Resistenz gegen die Möhrenfliege, die durch Auswahl von niederem Gehalt der Chlorogensäure in der Karottenwurzel basiert ist, dürfte daher die Widerstandskraft gegen die Lagerfäule nicht negativ beeinflussen.

Der negative Zusammenhang zwischen dem Gehalt von Falcarindiol und der Empfindlichkeit für *M. acerina* kann aber für die Züchter ein Problem werden, wenn man sowohl verbesserte Resistenz gegen die Möhrenfliege (niederer Falcarindiolgehalt in den Wurzeln) wie auch Resistenz gegen die Lakritzenfäule (hoher Gehalt von Falcarindiol) erzielen will.

Die hier vorgelegten Untersuchungen wurden vom staatlichen schwedischen Forschungsrat für Land- und Forstwirtschaft unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen wollen. Dr. Udda Lundqvist sei für ihre Hilfe bei der Übersetzung ins Deutsche bestens gedankt.

## Literatur

- Cole, R.A., 1985. Relationship between the concentration of chlorogenic acid in carrot roots and the incidence of carrot fly damage. *Annals of Applied Biology*, 106, 211-217.
- Davies, W.P. & B.G. Lewis, 1981. Antifungal activity in carrot roots in relation to storage infection by *Mycocentrospora acerina* (Hartig) Deighton. *New Phytologist*, 88, 109-119.
- Garrod, B. & B.G. Lewis, 1982. Effect of falcarindiol on hyphal growth of *Mycocentrospora acerina*. *Transactions of the British mycological Society*, 78, 533-536.
- Hansen, L. & P.M. Boll, 1986. Polyacetylenes in Araliaceae: Their chemistry, biosynthesis and biological significance. *Phytochemistry*, 25, 285-293.
- Koch, U., T. Kühnl, W. Conradt & E. Wellmann, 1990. Differential effects of light and fungal elicitor on chlorogenic acid and caffeoylshikimic acid metabolism. *Plant Science (Limerick)*, 70, 167-174.
- Maki, A., J. Kitajima, F. Abe, G. Stewart & M.F. Ryan, 1989. Isolation, identification, and bioassay of chemicals affecting nonpreference carrot-root resistance to carrot-fly. *Journal of Chemical Ecology*, 15, 1883-1897.

## Erhalt der antimutagenen Wirkung von Gemüse bei Ultra-Hochdruck-Behandlung

*P. Butz, R. Edenharder\*, H. Fister und B. Tauscher*

Institut für Chemie und Biologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstr. 20, D-76131 Karlsruhe, \*Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Johannes-Gutenberg-Universität, D-55101 Mainz

### **Einleitung**

Die Eignung der Ultra-Hochdruck-Methode als schonende Alternative zur thermischen Behandlung von Lebensmitteln wird seit einigen Jahren intensiv untersucht (Butz et al., 1994; Tauscher, 1995). Ziel ist neben der Entkeimung bei gleichzeitigem Erhalt des natürlichen Frischezustandes auch die Herstellung von Lebensmitteln mit gänzlich neuen Eigenschaften. In Japan sind bereits verschiedene hochdruckbehandelte Produkte auf dem Markt. Vorteilhaft gegenüber der Hitzebehandlung ist, daß niedermolekulare Verbindungen wie z.B. Vitamine oder Farbstoffe in der Regel unverändert bleiben. Von Interesse ist, inwieweit das auch für die in Obst und Gemüse enthaltenen, antimutagen wirkenden Substanzen (Edenharder et al., 1995) gilt, insbesondere unter dem Aspekt der Thermolabilität einiger dieser Substanzen (Edenharder, 1994). Untersucht wurden mögliche druckbedingte Veränderungen der antimutagenen Wirkung von Gemüsepreßsäften gegenüber dem "Cooked Food Mutagen" 2-Amino-3-methylimidazo(4,5-f)chinolin (IQ).

### **Material und Methoden**

**Hochdruckbehandlung:** Die Experimente wurden in einer Serie thermostatisierbarer Micro-Autoklaven (ID 16 mm, ca. 10 mL, max. 800 MPa), die über Ventile miteinander verbunden waren, durchgeführt. Druckübertragendes Medium war Wasser. Die mit einem Haushaltsensafter hergestellten Proben wurden zur Druckbehandlung in Polyethylenbeutel eingesiegelt. Behandlungsparameter siehe Abbildungen.

**Test auf antimutagene Wirkung:** Eingesetzt wurde der Salmonella/Reversionstest nach Maron und Ames (1983), der darauf beruht, daß Histidinmangelmutanten von *Salmonella typhimurium* durch Einwirkung von Mutagenen zum Wildtyp revertieren und dann auf histidinfreiem Nährboden wachsen können. Aus Dosis-Wirkungskurven (s. Abb.1) wurde die Änderung der mutagenen Aktivität von IQ in *S. typhimurium* TA 98 in Abhängigkeit vom Preßsaftvolumen quantitativ bestimmt. Die Dosis, die erforderlich ist, die vorgegebene Aktivität des Mutagens um 50 % zu reduzieren, stellt den ID<sub>50</sub>- Wert dar ("inhibitory dose 50 %").

## Ergebnisse

Aus Abb. 1 erkennt man, daß durch zehnmünütige Hitzebehandlung die antimuta-

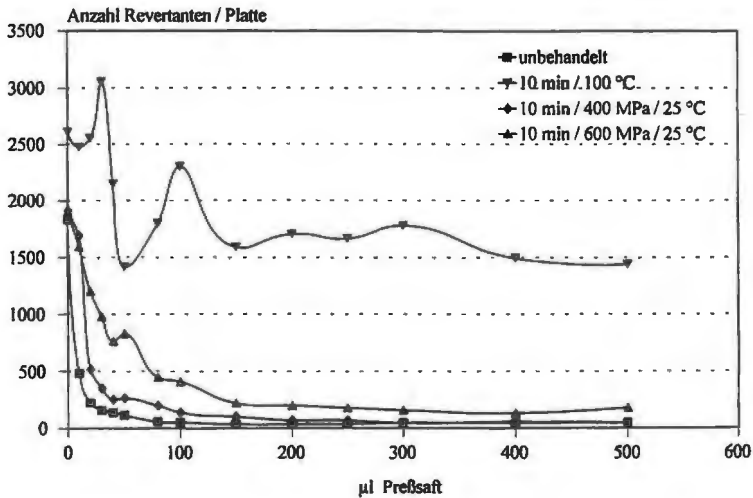


Abb. 1: Hochdruckbehandlung von Blumenkohl-Preßsaft

gene Aktivität von Blumenkohlpreßsaft stark beeinträchtigt wird. Die druckbehandelten Proben behielten im Gegensatz dazu ihre protektiven Eigenschaften fast ohne Veränderung. Ein ähnliches Bild liefert auch Tab.1: Alle Gemüsesorten - ausgenommen Porree - zeigten deutliche Aktivitätsverluste bei Hitzebehandlung. Durch Druckbehandlung wurden lediglich bei Tomaten Aktivitätsverluste hervorgerufen, allerdings nur ab 600 MPa und bei Temperaturen über 25 °C. Für eine

Pasteurisierung sind in der Regel schon 400 MPa bei Raumtemperatur ausreichend.

**Tabelle 1: Einfluß der Hochdruckpasteurisierung auf die Antimutagenität von Preßsäften aus Gemüse gegenüber der durch 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f] chinolin (IQ) in *S. typhimurium* TA 98 induzierten Mutagenität**

Gemüse	un-behandelt	10 min gekocht	10 min 50 °C	ID <sub>50</sub> - Werte [µl/Test]			
				10 min 400 MPa 25 °C	10 min 600 MPa 25 °C	10 min 600 MPa 50 °C	10 min 800 MPa 35 °C
Kohlrabi <sub>I</sub>	46	-	-	-	-	-	66
Kohlrabi <sub>II</sub>	ca. 100-200	- <sup>b</sup>	+ <sup>a</sup>	ca. 250	175-250	ca. 175	50,5
Porree <sub>I</sub>	35	-	-	-	-	-	-
Porree <sub>II</sub>	98	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	150
Rote Beete	80	217	-	-	-	-	-
Rote Beete <sub>n</sub>	19,5	ca. 40 <sup>c</sup>	55	28	32	18	-
Spinat <sub>I</sub>	n.b.	160	-	-	-	-	101 ; 112
Spinat <sub>II</sub>	37	118	77	88	70	55	- <sup>d</sup>
Tomaten <sub>I</sub>	140	-	-	-	-	-	-
Tomaten <sub>II</sub>	62	ca. 240	63	61	66	148	-
Karotten	98	-	-	-	-	-	157 ; 113

ID<sub>50</sub> : Dosis für 50 % Hemmung der Aktivität [µl/Test]

n.b. : nicht bestimmt

a : Restaktivität ca. 60 % bei 300 µl

b : Restaktivität ca. 170 % bei 200 µl

c : Restaktivität ca. 40 % bei 100 µl

d : Restaktivität ca. 90 % bei 300 µl

## Literatur

- Butz, P., Koller, W.D., Tauscher, B. and Wolf, S., Ultra-High Pressure Processing of Onions: Chemical and Sensory Changes. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 27, 463-467 (1994)
- Edenharder, R., Antimutagene Wirkung von Gemüse und Obst. XXIX. Vortrags tagung DGQ, Quedlinburg, 21./22. März 1994
- Edenharder, R., Speth, C., Decker, M., Kolodziej, H., Kayser, O., Platt, K.L. Inhibition of mutagenesis of 2-amino-3-methylimidazo[quinoline (IQ) by coumarines and furanocoumarines, chromanones and furano chromanones. *Mutation Research* 345, 57-71 (1995)
- Maron, D.M., Ames B.N. Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 113, 173-215 (1983)
- Tauscher, B., Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Z. Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 200, 3-13 (1995)





## Veränderung von Mykotoxinen bei Destillation und Hochdruckextraktion von Gewürzen

*Tietz, U. und E. Mrowietz*

IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Arthur-Scheunert-Allee 40/41,  
14558 Bergholz-Rehbrücke

Aus Routineuntersuchungen und Literatur ist die Belastung von Gewürzen mit Mykotoxinen bekannt. Eigene Untersuchungen ausgewählter Importgewürze zeigten hohe Belastungen mit Aflatoxinen und Ochratoxin A.

**Tab. 1:** Aflatoxingehalte in Gewürzen und Kräutern,  
Untersuchungen 1995 -1996 an Stichproben aus der Gewürzindustrie

Probenart	Anzahl	dav. pos.	Aflatoxingehalt in µg/kg			
			Afl. B1	Afl. G1	Afl. B2	Afl. G2
1995:						
Paprika	13	10	0,6 - 7,1	0,4 - 4,0	0,1 - 0,4	0,1 - 0,2
Chilly	2	0	-	-	-	-
Chillysaat	1	1	4,8	-	0,5	-
Chilly-Paprika- Gewürzm.	3	3	0,1 - 4,2	-	0,2	-
Pfeffer	2	1	0,7	-	-	-
Curry	1	0	-	-	-	-
Ingwer	1	0	-	-	-	-
Muskat	4	4	0,5 - 34,6	0,4 - 5,7	0,1 - 2,8	1,9 - 5,2
versch. Kräuter	31	0	-	-	-	-
1996:						
Paprika	3	3	2,0 - 2,9	0,6 - 1,0	0,2	0,1
Chilly	1	1	3,4	-	0,2	-
Muskat	1	1	03,3	1,2	0,6	-
versch. Kräuter	2	2	-	-	-	-

" - " = nicht nachweisbar, < 0,1 µg/kg

Bei der Herstellung von Gewürzextrakten, Oleoresinen und ätherischen Ölen durch Extraktions- und Destillationsprozesse können diese Schadstoffe aufgrund ihrer

lipophilen Eigenschaften in das Endprodukt übertragen werden.

Es wurden deshalb Versuche zum Verhalten von Mykotoxinen bei destillativen und extraktiven Prozessen durchgeführt.

Die Hochdruckextraktion mit überkritischen Gasen bietet sich durch die Variabilität der Lösungseigenschaften des fluiden Kohlendioxids zur gezielten Beeinflussung der Mykotoxingehalte an.

Das Projekt wird vom Bundesministerium für Wirtschaft gefördert; Reg.-Nr. 203/95.

**Tab. 2:** Prozeßparameter der Hochdruckextraktion von Muskat gemahlen, dotiert

Versuchs-Nr.	Extraktor		Abscheider		Produkt-Menge g	Extrakt-Menge g	Extrakt-Ausbeute %
	Druck bar	Temperatur °C	Druck bar	Temperatur °C			
1	150	40	50	40	700	222	31,7
2	400	40	50	40	350	120	34,3
3	205	40	50	40	350	137	39,1
4	300	57	50	40	350	139	39,7
5	100	40	55	40	350	45	12,7

### **Hochdruckextraktion mit Kohlendioxid**

Für die Versuche wurden die Gewürze Muskat und Paprika ausgewählt. Natürlich kontaminierte und mit Standardmaterialien dotierte Proben wurden unter den in obiger Tabelle aufgeführten Verfahrensparametern extrahiert. Die Extrakte wiesen deutlich reduzierte Mykotoxingehalte auf, so daß die Anforderungen der Aflatoxin-Verordnung eingehalten werden können.

Die optimalen Extraktionsbedingungen sind gewürzspezifisch zu bestimmen. Hierbei ist ein Kompromiß zwischen maximaler Mykotoxinanreicherung und



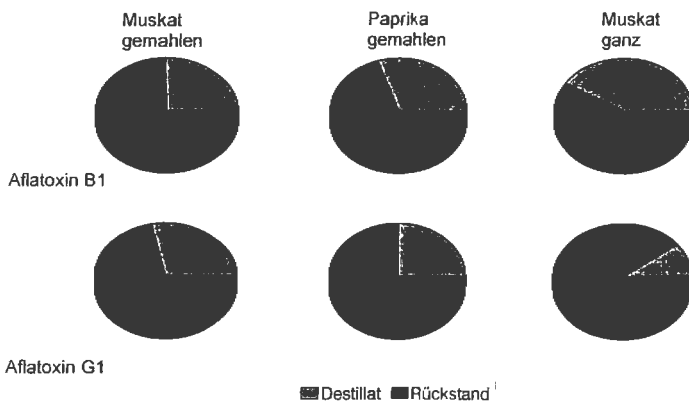
wirtschaftlichen Extraktausbeuten einzugehen. Im Gegensatz zur Wasserdampfdestillation eignet sich die Hochdruckextraktion zur Verarbeitung mykotoxinbelasteter Gewürzpartien.

### Gewinnung ätherischer Öle mittels Wasserdampfdestillation

Bei der Destillation von Gewürzen kommt es zu einem erheblichen Übergang von Mykotoxinen in das ätherische Öl. Bis zu 50 % des Ausgangsgehaltes an Aflatoxin B1 sind im Destillat nachweisbar. Die Wasserdampfdestillation eignet sich deshalb nicht zur Verarbeitung mykotoxinbelasteter Rohstoffe.

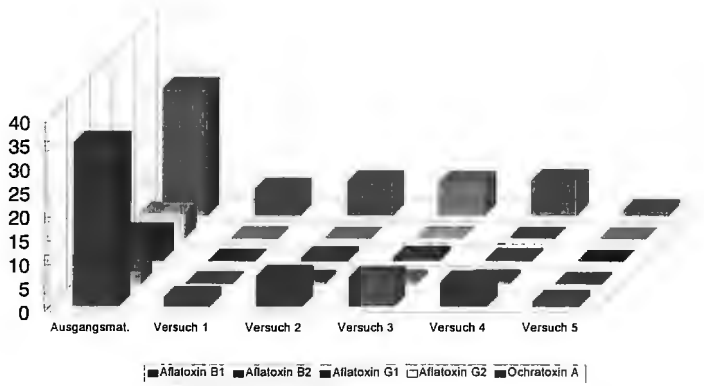
## Wasserdampfdestillation

Verteilung der Aflatoxingehalte



# Hochdruckextraktion (Muskat gem. dot.)

Toxingehalte im Extrakt ( $\mu\text{g/g}$ )

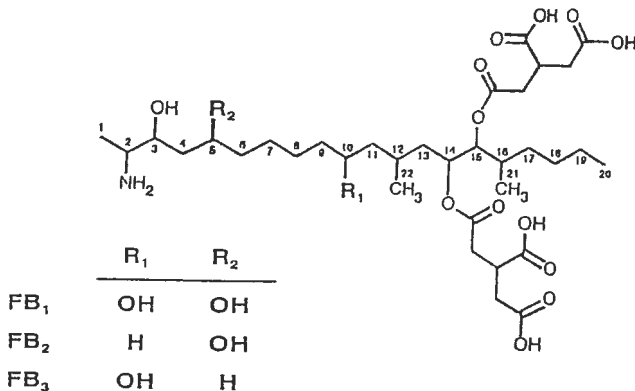


## Fumonisingehalte im Getreide

*U. Meister und H. Dahlke*

Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Arthur-Scheunert-Allee 40-41,  
14558 Bergholz-Rehbrücke

Fumonisine, eine neue Gruppe von Mykotoxinen, die 1988 erstmals identifiziert worden sind, werden hauptsächlich in Ländern wärmerer Klimazonen Amerikas, Afrikas und Asiens in Mais gebildet. Inzwischen sind 7 verschiedene Fumonisine bekannt, von denen 3 unter natürlichen Bedingungen gebildet werden.



Die Toxinbildner kommen vorrangig in tropischen und subtropischen Gebieten auf Mais vor, wurden jedoch - wenn auch wesentlich seltener - ebenfalls im mittel- und südeuropäischen Raum aus Mais sowie Weizen, Gerste, Hafer und Roggen isoliert. Ihre Fähigkeit, unter geeigneten Bedingungen Fumonisine zu bilden, ist unter Kulturbedingungen nachgewiesen worden.

Toxinbildner: *Fusarium moniliforme* ( = *F.verticillioides* ), - *Fusarium proliferatum*; seltener: *Fusarium anthophilum* (nur südliche Hemisphäre), *Fusarium dlamini*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium nygamai*

Vorkommen der Toxinbildner in Süd- und Mitteleuropa:

Italien: - *Fusarium moniliforme* ( Mais )

Spanien: - *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* ( Mais / Weizen / Gerste / Sorghum )

Frankreich: - *Fusarium moniliforme* ( Mais )

Österreich: - *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* ( Mais / Weizen / Hafer )

Polen : - *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* ( Mais / Weizen / Gerste / Roggen / Hafer )

Fumonisine rufen bei Tieren vielfältige Krankheitsbilder hervor und zeigen möglicherweise auch im mensch-lichen Organismus canzerogene Wirkung (Speiseröhrenkrebs):

Ratten: - Leberkrebs

Pferde: - Hirnschäden (ELEM)

- Leberschäden

Schweine: - Lungenödeme (PPE), Hydrothorax

- Leberschäden

Rinder: - Veränderung der Leber- und Immunfunktionen bei Kälbern

Unter natürlichen Bedingungen werden Fumonisine hauptsächlich in Ländern wärmerer Klimazonen in Mais gebildet. Aber auch in Süd- und Mitteleuropa muß - je nach Witterungsbedingungen - mit einer teilweise erheblichen Fumonisininkontamination bei Mais gerechnet werden.

Bei Importmais aus Argentinien, der in der Lebensmittelindustrie der Bundesrepublik Deutschland zu Früh-stückscerealien verarbeitet worden ist, waren alle 1993 und 1994 untersuchten Proben mit Fumonisin B1 und B2 (in Höhe von 14 - 1036 ng/g) sowie teilweise mit Fumonisin B3 kontaminiert. Der mittlere Fumonisengehalt lag bei ca. 155 ng/g (Fumonisin B1 und B2). Die hohe Kontaminationsrate von Importmais wird durch Literatur-angaben bestätigt, wobei von anderen Arbeitsgruppen noch höhere Fumonisengehalte festgestellt wurden. In einheimischem Körnermais wurde 1993 nur bei wenigen Proben Fumonisin B1 festgestellt. Diese Proben stammten aus landwirtschaftlichen Betrieben

Mitteldeutschlands und enthielten Fumonisin B1 in Höhe von 10-33 ng/g (nachgewiesener Toxinbildner: *F. moniliforme*). In einheimischem Körnermais aus Landessortenversuchen wurden 1993 keine Fumonisine oberhalb der Nachweisgrenze von 7 ng/g festgestellt.

1994 wurden in deutschem Körnermais - vermutlich auf Grund der außergewöhnlich warmen Witterung während der Sommermonate - in einigen Proben wesentlich höhere Fumonisinegehalte festgestellt als 1993. Bei Körnermaisproben aus der BEE des Landes Baden-Württemberg waren 14 % der Proben mit Fumonisinen kontaminiert. Neben Fumonisin B1 waren auch Fumonisin B2 und B3 nachweisbar. Der Gesamtfumonisingehalt der positiven Proben bewegte sich im Bereich von 12 - 806 ng/g; der mittlere Gesamtfumonisingehalt lag bei 206 ng/g. Körnermais von landwirtschaftlichen Erzeugern Mitteldeutschlands war zu 44 % mit Fumonisinen kontaminiert. Der mittlere Gesamtfumonisingehalt der positiven Proben lag bei 186 ng/g. Neben Fumonisin B1 waren in einigen Proben auch die Fumonisine B2 und B3 enthalten. In 2 von den 4 aus der Futtermittelindustrie stammenden Körnermaisproben (Herkunft Land Brandenburg) waren Fumonisine in Höhe von 18 - 384 ng/g nachweisbar. In Proben aus Landessortenversuchen wurden an einigen Standorten mit beobachtetem Maiszünslerbefall und / oder ausgeprägtem Trockenstreß Fumonisinegehalte bis in den ppm-Bereich festgestellt. Einzelne Proben enthielten Toxinmengen, die in den USA herausgegebene Warnwerte für Futtermittel (5 ppm in Futter für Pferde, 10 ppm in Futter für Schweine) überschritten. Die mittlere Gesamtfumonisininkontamination aller untersuchten positiven Körnermaisproben der Ernte 1994 lag - ohne Berücksichtigung der Extremwerte von 2 Standorten in Brandenburg und Thüringen - bei ca. 150 ng/g, unter Einbeziehung dieser Werte (im ppm-Bereich) bei ca. 300 ng/g.

Die Untersuchung von insgesamt ca. 550 statistisch ausgewählten Weizen- und Roggenproben (410 Weizen-, 140 Roggenproben) aus der BEE der Bundesrepublik Deutschland über 2 Erntejahre (1993, 1994) auf Fumonisin B1 und B2 ergab einen negativen Befund. Die Untersuchung von 21 Gersten- und 5 Haferproben aus der BEE 1993 des Landes Brandenburg ergab ebenfalls einen negativen Fumonisinbefund.

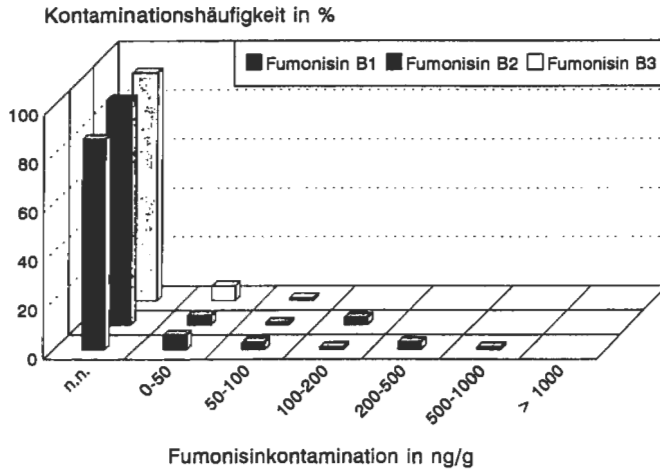
Aus der Häufigkeit und der Höhe der festgestellten Fumonisingehalte in deutschem Mais läßt sich die Schlußfolgerung ableiten, daß nach den bisherigen Erkenntnissen zu Toxizität und Canzerogenität der Fumonisine eine Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier durch einheimischen Mais eher unwahrscheinlich ist, da bei den üblicherweise in Deutschland vorherrschenden Witterungsbedingungen von einer relativ niedrigen und nicht sehr häufigen Fumonisinbildung ausgegangen werden kann. Fumonisin B1 wird derzeit als nicht gentoxisches Carzinogen angesehen, dessen Wirkung an einen Schwellenwert gebunden ist. Die Höhe dieses Schwellenwertes läßt sich nach dem derzeitigen Kenntnisstand allerdings noch nicht abschätzen.

Anders ist die Situation bei Importmais einzuschätzen. Hier muß mit hohen Kontaminationsraten und - je nach Herkunft des Importmaises - mit teilweise erheblichen Fumonisininkontaminationen im ppm-Bereich gerechnet werden.

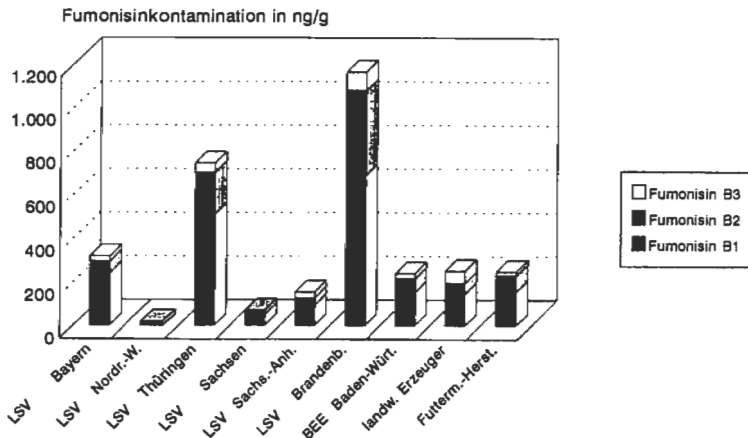
Da in letzter Zeit öfter Literaturhinweise zu finden sind, die die niedrigen Fumonisinbefunde bei verarbeiteten Lebensmitteln auf Maisbasis (Frühstückscerealien, Cornflakes, Maisextrudate usw.) im Vergleich zu den hohen Fumonisingehalten in den Rohstoffen in Frage stellen, sind verstärkte Untersuchungen zur Stabilität der Fumonisine in technologischen Prozessen sowie eine stärkere Kontrolle von Importmais erforderlich, um den Verbraucher vor einer hohen Fumonisinbelastung zu schützen.

Das Forschungsprojekt wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten gefördert.

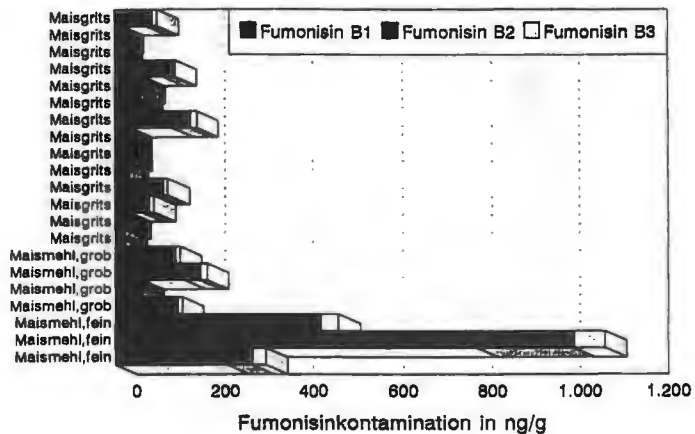
## Fumonisine in Körnermais aus der BEE des Landes Baden-Württemberg



## Fumonisin kontamination von einheimischem Körnermais (mittlere Gehalte der positiven Proben, Ernte 1994)



## Fumonisininkontamination von Plata-Yellow-Mais-Proben (Import Argentinien, 1992-1994)







## Technologie der Pseudocerealien Amarant, Buchweizen und Reismelde

*M. Kuhn, S. Wagner, E. Neumann und M. Zacher*

Universität Hohenheim, Institut für Lebensmitteltechnologie,  
Fachgebiet Getreidetechnologie, 70593 Stuttgart

### **Einführung**

Aufgrund des gestiegenen Ernährungs- und Gesundheitsbewußtseins der Bevölkerung in den entwickelten Ländern besteht großes Interesse an ernährungsphysiologisch wertvollen, technologisch aber bisher wenig beachteten Nutzpflanzenarten. Zu diesen sogenannten Pseudogetreidearten zählen Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench), Reismelde (*Chenopodium quinoa* Willd.) und Amarant (*Amaranthus spp.*). Buchweizen gelangte im 13. Jahrhundert aus Zentralasien nach Mitteleuropa. In Deutschland wurde er jedoch nach dem Zweiten Weltkrieg durch andere Getreidearten, vor allem Weizen, verdrängt, erlebt aber neuerdings eine gewisse Renaissance. Reismelde und Amarant sind Jahrtausende alte Kulturpflanzen, die aus der Andenregion Südamerikas stammen und bei uns bis vor einigen Jahren nahezu unbekannt waren. Amarant und Reismelde zeichnen sich durch genügend hohe Anteile essentieller Aminosäuren und ungesättigter Fettsäuren aus. Wegen des praktisch gliadinfreien Endosperms der Pseudogetreidearten sind sie als verträgliche Nahrungsmittelbasis für Zöliakie-krankte geeignet. Das Fehlen von herkömmlichem Klebereiweiß schränkt ihre technologische Verwendbarkeit z.B. bei der Herstellung von Brot und Kleingebäck ein. Es wird deshalb auf die Eignung der Pseudocerealien, sowohl in technologischer als auch sensorischer Hinsicht, für die Herstellung verschiedener Produkte eingegangen: Vollkornmehle, Flocken oder Brühstücke von Amarant, Reismelde und Buchweizen können bei Hefelockerung nur Anteile von Weizenmehl (T 550) z.B. bei der Herstellung von Brötchen substituieren. Einige Amarantsorten sind "pop-fähig". Dieser gepuffte Amarant kann z.B. für die Herstellung von

Mürbteigkeksen oder Müsliriegeln eingesetzt werden. Mischungen aus Reismelde- und Buchweizen sind zur Herstellung von Biskuitgebäcken verwendbar. Mahlprodukte der Pseudocerealien eignen sich für die Erzeugung physikalisch gelockerter blätterteigähnlicher Gebäcke; vgl. (7) und (9).

### **Technologie**

ist die möglichst schonende Umformung von Lebensmittelrohstoffen zu Halbfabrikaten oder verzehrfertigen Lebensmitteln

Anwendungsbeispiele:

- mechanische Verfahren (Sortieren, Schälen, Zerschneiden, Vermahlen, Kneten)
- thermische Verfahren (Pasteurisieren, Hitzesterilisieren, Backen, Rösten)
- mechanische und thermische Verfahren (Extrudieren)
- hydrothermische und mechanische Verfahren (Flockieren)

### **Vorteile einer schonenden Technologie der Pseudocerealien**

- Umformung der Rohstoffe durch thermische und hydrothermische Behandlung
- Entfernung von Bitterstoffen, Saponinen und Lectinen durch Extraktion
- Sauberes Schälen von Buchweizen zum Ausschluß von photosensibilisierendem Fagopyrin
- Puffen von Amarant führt zum Aufplatzen der Fruchtschale, desgl. Quellen von Reismelde zur Dextrinierung, Verkleisterung und Freilegen des Keimlings.
- Farbverbesserung von Gebäcken und Nährmitteln.

### **Äußere Form und Inhaltsstoffe**

#### **<sup>1)</sup> Amarant <sup>2)</sup> Buchweizen <sup>3)</sup> und Reismelde <sup>4)</sup>**

- Amarant und Reismelde haben eine kugelige Form (1-2 bzw. 2-4 mm Durchmesser).
- Buchweizen ist ungefähr tetraedisch (Seitenlänge ca. 5 mm).
- Ballaststoffe sind analytisch bestimmbar wie bei Cerealien.
- Enzyme wie Amylasen, Phosphatasen, Phospholipasen u.a. sind wie üblich pH- und temperaturabhängig.
- Körner bzw. Kerne sind in Wasser quellbar, dadurch Volumenzunahme unter Sprengung der äußeren Schale, partielle oder vollständige Dextrinierung. (Verkleisterung) des Endosperms und Freilegung des Keimlings.

- Entwicklung des Wurzelkeims schon nach 12-24 h.
- Mahlprodukte sind zu Teig und zu Teigförmlingen verarbeitbar; beim Kochen erfolgt Denaturierung der Proteine und Inaktivierung von Enzymen; unerwünschte Stoffe, z.B. Saponine, gehen in Lösung.

### **Brötchen-Backversuche**

- Bei Hefelockerung ist normalerweise eine Kombination mit Weizenmehl notwendig. Die Verwendung von 30 % Pseudocerealien ist möglich.
- Teiglinge können mit gepufften Amarantkernen, Buchweizengrütze, -flocken, geweichten Reismeldekernen oder Reismeldeflocken, Mohn oder Sesam bestreut werden.
- Hefegelockerte glutenfreie Backwaren unter Mitverwendung von Pseudocerealien können für diätetische Anwendungen hergestellt werden. Dazu eignen sich folgende Kombinationen: Pseudocerealien mit Reis, Mais, Hirse, Sorghum als Mehl bzw. als andere Nährmittelarten. Die Mitverwendung von Maisstärke und Hydrokolloiden ist zweckmäßig aber nicht in jedem Fall notwendig.

### **Feine Backwaren aus 100 % Pseudocerealien - Mahlprodukten**

- Gestüßte Mürbteigkekse, Zutaten: Zucker, Vollei, Fett, Aromastoffe
- Gewürzte, ungesalzene Mürbteigkekse (Kräcker), Zutaten: Fett, Vollei, Gewürze

### **Biskuitgebäcke aus 100 % Pseudocerealien <sup>5)</sup>**

Nach dem "All-in-Verfahren" werden Buchweizen- und Reismeldemehle (1 : 1), Zucker, Vollei, Aufschlagemulgator und native hybridisierte Wachsmaisstärke zu einer homogenen Masse aufgeschlagen. Überraschend ist, daß gerade Mischungen aus Buchweizen und Reismelde (1 : 1) zur Biskuitherstellung am besten geeignet sind. Diese Biskuits sind auch für Zöliakieerkrankte geeignet.

### **Blätterteigähnliche Backwaren aus reinen Pseudocerealien <sup>7)</sup>**

können unter Verwendung von Ziehfett durch Variation der Touriervorgänge hergestellt werden. Bestimmte Gebäckformen bieten Vorteile.

### **Müsli und Getreideriegel**

Pseudocerealien können in den Varianten gepufft, gequollen, gemälzt, geröstet, frittiert, flockiert und/oder extrudiert sowohl einzeln, als auch in Mischungen untereinander sowie unter Zusatz von gepufftem Reis und/oder Mais bzw.

Samenfrüchten (Nüsse, Mandeln) verarbeitet werden.

Auf dem Markt wird eine große Vielzahl an Müslis und Getreideriegeln angeboten<sup>6)</sup> jedoch nur selten mit Pseudocerealien.

### **Nutritive Eigenschaften der Pseudocerealien**

- Gliadin und Glutenin bilden kein Gluten (Klebereiweiß).
- dennoch sind Pseudocerealien reich an anderen Proteinen und weisen kein Lysindefizit auf.
- sie sind deutlich reicher an Mineralstoffen als andere Cerealien (3% gegenüber 2% Gesamtmineralstoffe)
- interessante Mengenelementverhältnisse, z.B. K: Mg : Ca <sup>8)</sup>
- Spurenelemente sind z.B. Fe, Zn, Mn, Cu, Ni <sup>8)</sup>
- der Lipidgehalt von Amaranth ist vergleichbar mit Hafer, z.B. *Amaranthus reflexus* 6,4% i.T. <sup>2)</sup>
- die Fettsäureanalyse von Amaranth liefert mehr als 80% ungesättigte Fettsäuren<sup>2)</sup>

### **Literatur**

- (1) W. Aufhammer, J.H. Lee, E. Kübler, S. Wagner: Anbau und Nutzung oder Pseudocerealien Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench), Reismelde (*Chenopodium quinoa* Willd.) und Amaranth (*Amaranthus* ssp.L.) als Körnerfruchtarten, *Die Bodenkultur* 46 (2), 125-140 (1995)
- (2) Pomeranz (ed.), *Adv. Cer. Sci and Technol.*, Vol VI, *Amaranthus*, AACC St. Paul, Minnesota/USA, 357-397 (1984)
- (3) Diplomarbeit R. Klumpp, (1992) Universität Hohenheim, Institut für Lebensmitteltechnologie (150) Fachgebiet Getreidetechnologie
- (4) Diplomarbeit K. Spory, (1992) Universität Hohenheim, Fachgebiet Spezieller Pflanzenbau (340)
- (5) M. Kuhn, B. Noll und H. Götz: Optimierungsversuche mit Biskuitmassen und -gebäcken, *Getreide Mehl und Brot* 48 (1), 56-59 (1994)
- (6) *test3/1995*, 92-102 (lfd. S. 328-334)
- (7) Diplomarbeit E. Neumann (1995), Universität Hohenheim, Institut für Lebensmitteltechnologie (150), Fachgebiet Getreidetechnologie
- (8) M. Kuhn, S. Wagner, W. Aufhammer, J.-H. Lee, E. Kübler, H. Schreiber: Einfluß pflanzenbaulicher Maßnahmen auf die Mineralstoffgehalte von Amaranth, Buchweizen Reismelde und Hafer, *Deutsche Lebensm. - Rdsch.* 92 (1996), im Druck



## Zum enzymatischen Abbau thermisch behandelte $\alpha$ -Glucane

*Dörte Schumacher und L. W. Kroh*

Technische Universität, Institut für Lebensmittelchemie, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin

### **Einleitung**

Stärke und stärkehaltige Produkte werden nach ihrer ernährungsphysiologischen Bedeutung in die Kategorien schnellverdauliche (rapidly digestible starch, SDS), langsamverdauliche (slowly digestible starch, SDS) und resistente Stärke klassifiziert und üben einen unterschiedlichen Einfluß auf die Verdauung sowie den Blutzucker- und Insulinspiegel aus. Resistente Stärke Typ IV entsteht durch thermische bzw. chemische Modifizierung von Stärken und stärkehaltigen Produkten. Struktur und Eigenschaften von thermisch behandelten  $\alpha$ -Glucanen sind von ihrer Herkunft, von den zur Verfügung stehenden Reaktionspartnern und dem Reaktionsmilieu abhängig. Wichtige Faktoren des Reaktionsmilieus sind Temperatur, Feuchtigkeitsgehalt und Erhitzungszeit. Die enzymatische Abbaubarkeit von Dextrin, löslicher Stärke und Amylose wird durch die Struktur dieser Substrate sowie durch die eingesetzten Enzyme determiniert.

Die enzymatische Abbaubarkeit von thermisch behandelten  $\alpha$ -Glucanen wird in Abhängigkeit von der Temperatur, dem Anfangsfeuchtigkeitsgehalt, der Behandlungszeit und dem Zusatz einer Aminoverbindung (Glycin) untersucht.

### **Material und Methoden**

- $\alpha$ -Glucane: Dextrin 10 aus Maisstärke, lösliche Stärke und Amylose aus Kartoffelstärke
- Carbohydrolasen: Glucoamylase [E.C.3.2.1.3],  $\alpha$ -Amylase [E.C.3.2.1.1]
- Thermische Behandlung

Definierte Mengen an  $\alpha$ -Glucanen werden in eine Ampulle eingewogen und anschließend zugeschmolzen. Bei Glycinzusatz werden die  $\alpha$ -Glucane mit der Aminosäure vor der Einwaage vorsichtig gleichmäßig verteilt. Die Ampullen werden im Trockenschrank bei 160°C, 180 °C und 200 °C zwischen 0,5 h und 8 h erhitzt.

- Bestimmung der enzymatischen Verdaulichkeit

Zur Bestimmung der schnellverdaulichen  $\alpha$ -Glucane wird die Zunahme der Glucose für die Wirkung der Glucoamylase und die Zunahme der reduzierenden Substanzen für die Wirkung

der  $\alpha$ -Amylase nach 20 Minuten Inkubationszeit der Enzyme gemessen. Analog dazu werden nach 120 Minuten die langsamverdaulichen  $\alpha$ -Glucane bestimmt, die dem Endabbau gleichgesetzt wird.

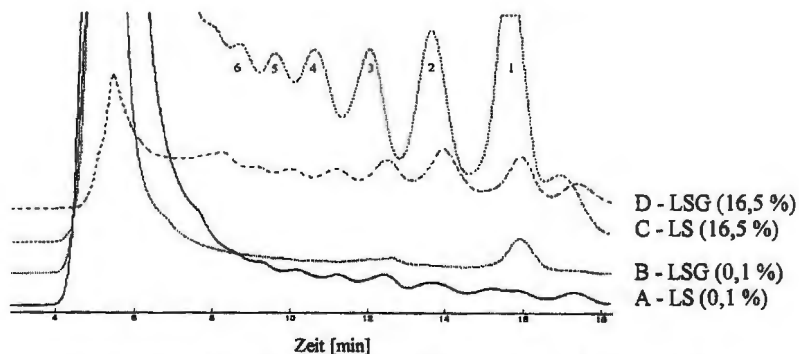
## Ergebnisse und Diskussion

### *Eigenschaften von thermisch behandelten $\alpha$ -Glucanen mit und ohne Aminosäurekomponente*

Mit Verlängerung der Erhitzungszeit, Temperaturerhöhung und steigendem Feuchtigkeitsgehalt nimmt die Bräunung zu. Je kürzer die Kettenlänge der  $\alpha$ -Glucane desto intensiver ist die Bräunung. Bei hohem Feuchtigkeitsgehalt werden durch Hydrolysereaktionen mehr Oligosaccharide gebildet. Der Zusatz von Glycin in den Thermolysegemischen bewirkt gegenüber ohne Aminosäurekomponentenzusatz:

- eine intensivere Bräunung verursacht durch die Maillard-Reaktion
- allgemein eine stärkere Abnahme bzw. geringere Zunahme der reduzierenden Substanzen
- die Bildung von wasserunlöslichen braunen Farbstoffen (Melanoidinen) schon bei kürzeren Erhitzungszeiten
- die Bildung von weniger Oligosaccharide bzw. die schnellere Umsetzung im Sinne der Maillard-Reaktion (Abb. 1)

Abb. 1: Oligosaccharidbereich für thermisch behandelte lösliche Stärke; Temperatur 180 °C; Zeit 4 h;



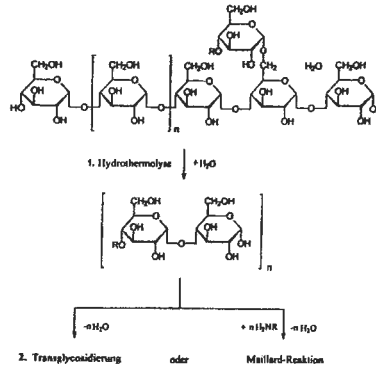
LS - lösliche Stärke; LSG - lösliche Stärke mit Glycinzusatz; in Klammern sind die Feuchtigkeitsgehalte angegeben; die Zahlen 1-6 im Chromatogramm C entsprechen den DP der Malttooligosaccharide

### *Enzymatische Abbaubarkeit von thermisch behandelten $\alpha$ -Glucanen*

Allgemein nimmt die enzymatische Abbaubarkeit von  $\alpha$ -Glucanen mit Steigerung der Erhitzungszeit, der Temperatur und des Feuchtigkeitsgehaltes ab und wird mit

dem milieuhängigen Ablauf von Transglycosidierungsreaktionen und der Maillard-Reaktion erklärt. Durch Transglycosidierungen entstehen auch  $\beta$ -Verknüpfungen, die durch Amylasen nicht hydrolysiert werden (Abb. 2).

**Abb. 2:** Reaktionsverhalten von oligomeren  $\alpha$ -Glucanen nach Hydrothermolyse, Transglycosidierung und Maillard-Reaktion



Die enzymatische Abbaubarkeit von Dextrinthermolysaten ist bei geringen Erhitzungszeiten mit und ohne Glycinzusatz annähernd gleich. Dagegen ist nach längerem thermischen Behandeln des Dextrins mit Glycinzusatz die Abbaubarkeit durch  $\alpha$ -Amylase oder Glucoamylase bedeutend besser als ohne Glycinzusatz (Abb. 3). Es läßt sich verallgemeinern, daß bei höheren Thermolysotemperaturen, längeren Erhitzungszeiten und höheren Feuchtigkeitsgehalt die enzymatische Abbaubarkeit der Thermolysate mit Glycinzusatz höher ist als ohne Glycinzusatz. Die Ursachen sehen wir in der Reaktion der reduzierenden Endgruppe mit der Aminofunktion und die damit verbundene Hemmung von Transglyco-sidierungsreaktionen.

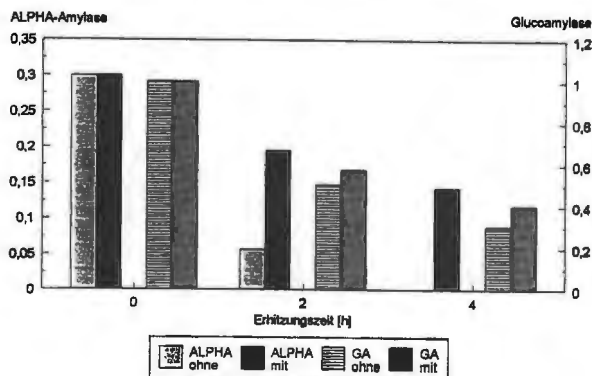
### Schlußfolgerungen

- > Durch thermische Behandlung von  $\alpha$ -Glucanen reagieren vorrangig die reaktiven reduzierenden Endgruppen. Als Folge- und Parallelreaktionen treten Hydrolyse und Transglycosidierungen auf.
- > Durch einen Glycinzusatz reagieren die Carbonylgruppen mit der Aminosäure im Sinne der Maillard-Reaktion und stehen damit nicht für

## Transglycosidierungsreaktionen zur Verfügung.

- Die Verringerung der enzymatischen Abbaubarkeit von thermisch behandelten  $\alpha$ -Glucanen wird wesentlich durch die Bildung von Transglycosidierungsprodukten beeinflusst.

**Abb. 3:** Vergleich der enzymatischen Abbaubarkeit (SDS) von thermisch behandeltem Dextrin mit und ohne Glycinzusatz durch  $\alpha$ -Amylase und Glucoamylase (160 °C, Feuchtigkeitsgehalt:6,1 %)



## Literatur:

- Schumacher D, Kroh LW (1994) Untersuchungen zum Abbau von Maillard-Reaktionsprodukten durch amyolytische Enzyme. Z Lebensm Unters Forsch. 199:270-274
- Kroh LW, Schumacher D; Untersuchungen zum Abbau von Maillard-Reaktionsprodukten durch amyolytische Enzyme; 2. Zum enzymatischen Abbau von thermisch behandelten  $\alpha$ -Glucanen mit und ohne Aminosäurekomponente, Z Lebensm Unters Forsch, im Druck
- Schumacher D, Hirsch D, Cämmerer C, Kroh LW, Untersuchungen zum Abbau von Maillard-Reaktionsprodukten durch amyolytische Enzyme; 3. Zur Inhibierung von  $\alpha$ - und Glucoamylase sowie  $\alpha$ -Glucosidase durch thermisch behandelte  $\alpha$ -Glucane und Melanoidine. Z Lebensm Unters Forsch, im Druck
- Schumacher D, Kroh LW, Zum Einfluß von Maillard-Reaktionsprodukten auf Enzymreaktionen. Ernährungswissenschaft, eingereicht
- Tomasik P, Wiejak S, Palasinski M, (1989), The thermal decomposition of carbohydrates. Adv. Carb. Chem. and Biochem. Vol. 47 S.279ff
- MacGregor EA (1993) Relationships between structure and activity in the  $\alpha$ -amylase family of starch-metabolising enzymes. Stärke 45:232-237
- Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. Eur J Clin Nutr 46(Suppl 2):S33-S50
- Kingman SM, Englyst HN (1994) The influence of food preparation methods on the in-vitro digestibility of starch in potatoes. Food Chem. 49:181-186





## Charakterisierung der Zellwände des Knollengewebes unterschiedlicher Kartoffelsorten

*C. Wegener, G. Jansen, W. Flamme*

Institut für Streßphysiologie und Rohstoffqualität, BAZ, Quedlinburg - Standort Groß Lüsewitz

### **Einleitung**

Die Kartoffel ist ein wertvolles Nahrungsmittel und ein wichtiger Rohstoff für die industrielle Verarbeitung. Etwa 1-2% der Frischmasse des Knollengewebes werden von der Zellwand gebildet (Weber 1976). Sie hat im Gewebe Gerüstfunktion und schützt die Zelle gegen äußere Einflüsse und phytopathogene Mikroorganismen. In der Ernährung ist sie ein wichtiger Ballaststoff. Von der Struktur und Stabilität der Gewebezellwände hängen Textureigenschaften der Kartoffeln sowie auch Schwarzfleckigkeits- und Verfärbungsneigung während der Lagerung und Verarbeitung ab. So führt eine Zerstörung der Zellwände in der Kartoffelveredlungsindustrie durch Freisetzung der Zellinhaltsstoffe zu erheblichen Qualitätseinbußen. Die Verkleisterung der freien Stärke verursacht eine klebrige Konsistenz der Endprodukte. Polyphenoloxidasen bewirken mit der Oxydation von phenolischen Verbindungen wie Kaffee- und Chlorogensäure eine Verfärbung der Produkte. Ähnlich wirkt die sog. Maillard-Reaktion, die darüber hinaus mit dem Abbau von essentiellen Aminosäuren zu einer Entwertung der pflanzlichen Eiweiße führt.

Zur Verbesserung der Resistenz und Verarbeitungseignung sollte die 'Stabilität' der Gewebezellwände in der Kartoffelsortenzüchtung verstärkt berücksichtigt werden. Aufwendige Zellwandanalysen sind jedoch bei der züchterischen Selektion aufgrund des großen Probendurchsatzes kaum möglich. Daher ist eine biochemische Methode etabliert worden, die eine komplexe Charakterisierung der Zellwände gestattet. Sie basiert auf einer partiellen Hydrolyse der Zellwände mit

einem Enzymgemisch aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *Erwinia carotovora* (*Ec*). *Ec* Bakterien sind als Erreger der Schwarzbeinigkeit und Knollenaßfäule der Kartoffeln bekannt. Durch eine natürliche Adaptation ist ihr Enzymspektrum optimal auf die Zusammensetzung der Zellwände des Kartoffelknollengewebes eingestellt (Tab. 1).

Mit dieser enzymatischen Methode sind 14 anerkannte Sorten und 17 Stämme aus der Züchtung im Hinblick auf die Abbaubarkeit der Zellwände untersucht worden. In dem eigens dazu angelegten Anbauversuch wurde die N-Düngung variiert, um den Einfluß des Stickstoffs auf die Zellwandstabilität zu betrachten.

## **Material und Methoden**

### *Untersuchungsmaterial*

Die Kartoffeln wurden im Parzellen-Feldversuch angebaut. Das Saatgut ist von den privaten Züchtern und vom Institut für Züchtung der BAZ zur Verfügung gestellt worden. Die N-Düngung (Kalkammonsalpeter) erfolgte in zwei Gaben, nach der Pflanzung und kurz vor dem Auflaufen. Die Düngergabe je Hektar Anbaufläche wurde wie folgt variiert: 1. 40kg N; 2. 60 kg N; 3. 80 kg N - mit je zwei Wiederholungen. Die Kartoffeln wurden ansonsten unter gleichen Bedingungen angebaut und gelagert.

### *Enzym-Präparat*

Ein *Erwinia carotovora* Stamm wurde im Fermentor (3m<sup>3</sup>) zur Enzymproduktion kultiviert (Wegener *et al.* 1989 ). Nach Steril- und Ultrafiltration wurden die Enzymproteine mit 75 % Ethanol ausgefällt und anschließend lyophilisiert.

### *Messung der Zell-Lyse*

In die Interzellularen des Gewebes von je 20 Scheiben (ø 10 mm und 2 mm dick) aus dem Speichergewebe der Kartoffelknollen wurde die Enzymlyse (Pektatlyase-Aktivität: 0,2 U/ml) mittels Vakuum (200 mbar) infiltriert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 25°C wurden die Scheiben in 20 ml Wasser 1 h geschüttelt und anschließend 90 min in einer Neutralrot-Lösung (50mg Farbstoff/ml 0,2 M Phosphat-Puffer, pH7,5 + 0,8 M KNO<sub>3</sub>) gefärbt. Der absorbierte Farbstoff wurde zweimal mit 96% Ethanol extrahiert, das Volumen mit 0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 50 ml eingestellt und danach wurde die OD<sub>535</sub> gemessen nach Weber & Wegener 1986; (SD < 2%; bei n= 20). Je 20 Knollen bildeten eine Durchschnittsprobe.

## **Ergebnisse und Diskussion**

### *Zellwand und Ec-Enzymgemisch*

Pektinpolysaccharide machen den Hauptanteil in der Zellwand des Gewebes der Kartoffelknollen aus (Tab. 1). Die Einlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in die Pektin-Matrix, der Veresterungsgrad der Pektine und deren Vernetzung mit anderen Zellwandkomponenten sind für die Widerstandsfähigkeit der Zellwand bei mechanischer Belastung, thermischer Behandlung (Keijbets 1974) und Pathogenbefall (Weber 1986, Flego *et al.* 1994) von Bedeutung.

Die *Ec*-Enzyme sind auf eine vollständige Lyse der pflanzlichen Zellwände programmiert. Die Pektatlyase (PL) als Hauptkomponente des Enzymgemisches baut bevorzugt Pektine der Mittellamelle ab. Ihr Effekt, die Gewebestruktur zu lockern und danach die Zellen aus dem Gewebeverband herauszulösen, ist der Wirkung einer thermischen Behandlung ähnlich. Mit den Enzymen werden daher sowohl Fragen der Resistenz als auch der Verarbeitungseignung von Kartoffeln berührt.

### *Zell-Lyse*

Sorten wie auch Stämme unterscheiden sich in der Widerstandsfähigkeit ihrer Zellwände gegenüber *Ec*-Enzymen (Abb. 1A und B). Sortenbedingte Unterschiede im Zellwandgehalt des Gewebes und in der inhaltsstofflichen Zusammensetzung der Zellwände (Weber 1976) werden die Ursache dafür sein. Zwischen enzymatischer Zell-Lyse und dem Zellwandgehalt besteht eine Korrelation (Berechnung: Sorten + Stämme in allen drei N-Düngungsstufen). Diese muß in weiteren Feldversuchen bestätigt werden.

Die Unterschiede hinsichtlich des enzymatischen Zellwandabbaus sind innerhalb der Sorten besonders stark ausgeprägt. Sie variieren von nur 10% Zell-Lyse bei der Sorte Maxilla bis zu max. 40% (N2) bzw. 46% (N3) bei der Sorte Arnika (Abb.1A). Innerhalb der Zuchtstämme sind sie weniger gravierend (Abb.1B). Hier ergeben sich folgende Schwankungsbreiten (N2): 19% bis 43% = Sortiment Thiemann und 17,2% bis 26,1% = Sortiment Darsow.

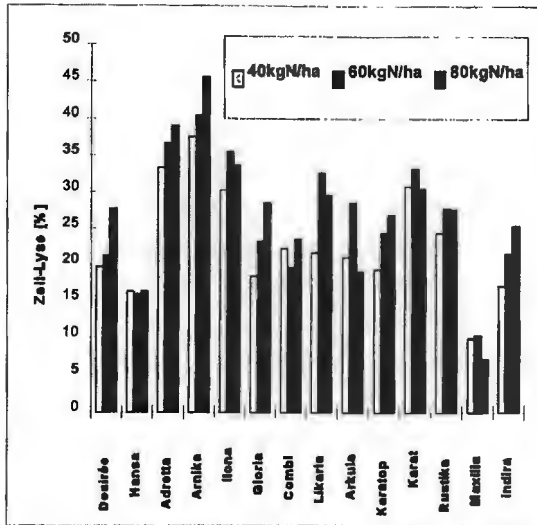


Abb. 1 A : Zell-Lyse durch enzymatischen Zellwandabbau unterschiedlicher Kartoffelsorten

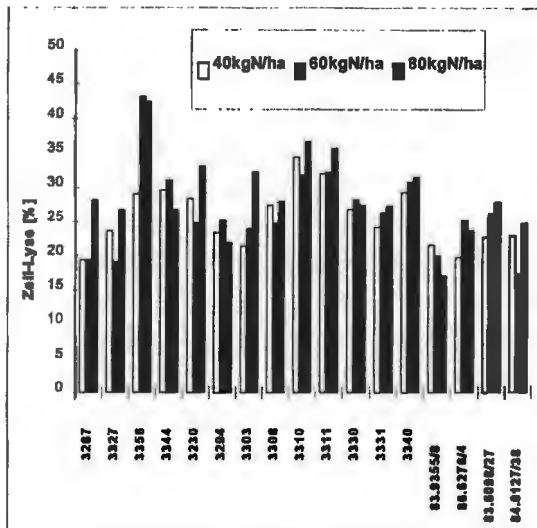


Abb. 1 B : Zell-Lyse durch enzymatischen Zellwandabbau unterschiedlicher Kartoffelzuchtstämme

Eine Erhöhung der N-Düngung führte bei den meisten Sorten (u.a. Desiree, Adretta, Arnika, Gloria, Karatop, Indira) zu einer verstärkten Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber den *Ec*-Enzymen, ersichtlich durch einen nahezu linearen Anstieg des Zell-Lyse Effektes (Abb.1A). Bei Verrechnung aller Daten (Paarvergleichstest, Abb.1A+Abb.1B) zeigte sich insgesamt, daß die Zell-Lyse Empfindlichkeit bei einer Steigerung der N-Gabe signifikant zunimmt (Varianten N1: N2 und N1 : N3). An der Klärung der Ursachen wird gearbeitet.

**TABELLE 1.** Zusammensetzung der Zellwand im Kartoffelknollengewebe und des *Ec*-Enzymgemisches. \* nach Hoff & Castro 1969.

Komponenten der Zellwand	*Anteil in der Zellwand (%)	Komponenten des Komplexenzym	Aktivitäten U/mg
<b>Pektin</b>	<b>55,0</b>	<b>Pektatylase</b>	<b>7,0</b>
		Polygalacturonase	0,5
		Pektinmethylesterase	Spuren
Cellulose/Lignin	6,8	Endo-1,4- $\beta$ -glucanase	2,9
Hemicellulose	27,5	Hemicellulasen	Spuren
Protein	9,8	Protease	0,6

### Ausblick

Mit diesem Enzymtest könnten Genotypen selektiert werden, die über eine erhöhte Geweberesistenz gegenüber *Erwinia*-Enzyme verfügen. Darüber hinaus dürfte eine Selektion von Kartoffelsorten mit stabilen Zellwänden, welche u.a. Koch- und Trocknungsprozesse in der industriellen Verarbeitung ohne Zell-Lyse überstehen, von wirtschaftlichem Interesse sein.

### Literaturverzeichnis

1. Flego D, Pirhonen M, Palva TK, Palva ET. 1994. Calcium regulation of virulence gene expression in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Abstract 7th International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions*, June 26-July 1st, University of Edinburgh. UK. 190.
2. Hoff JE & Castro MD. 1969. Chemical composition of potato cell walls. *J. agric. Fd Chem.* 17: 1328-1331.
3. Keijbets MJH. 1974. Pectic substances in the cell wall and the intercellular cohesion of potato tuber tissue during cooking. *Agricultural Research Report* 827.

Wageningen, the Netherlands. 1-161.

4. Weber J .1976. Untersuchungen über Zellwandgehalt und -zusammensetzung der Kartoffelknollen. *Biochem Physiol Pflanzen* 169: 589-594.
5. Weber J. 1986. Die Naßfäule der Kartoffel Ökologie und Physiologie der Wirt-Pathogen-Beziehungen. *Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR. ILID-Druck*. 1-95.
6. Weber & Wegener .1986. Virulence and enzyme production of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* on potato tuber tissue. *Journal of Phytopathology*. 117: 97-106
7. Wegener C, Henniger H, Wesenberg J, Laube K. 1989. Verfahren zur Herstellung einer Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase aus *Erwinia carotovora*. *Wirtschaftspatent* WP C 12 N / 316 921 7. 1-5.



## Vitamin C in Fruits and Vegetables

*Ulla Kidmose and Niels Poulsen*

Danish Institute of Plant and Soil Science<sup>1</sup>, Department of Food Science and Technology,  
Kirstinebjergvej 12, DK-5792 Aarslev, Denmark

### The nutritional importance of vitamin C

The principal source of vitamin C in the human diet is fruits and vegetables. Almost all fruits contain significant amount of vitamin C, and some are very rich (citrus and some berries as seen in table 1). In vegetables especially some types of kale are good sources of vitamin C (table 1).

**Table 1:** Vitamin C content in fruits and vegetables

Food	Vitamin C (mg/100g)
Rose hips	1000
Black currant	181
Kiwi	98
Orange	53
Brussels sprouts	119
Broccoli	115
White cabbage	44

Ref 1.

A high content of vitamin C is desirable, because vitamin C acts as a vitamin which prevents scurvy. Beyond that, it also acts as an antioxidant. The antioxidants, including vitamin C, are believed to act by counteracting the oxidative processes that contribute to the causation of these chronic diseases (2). Strong

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology

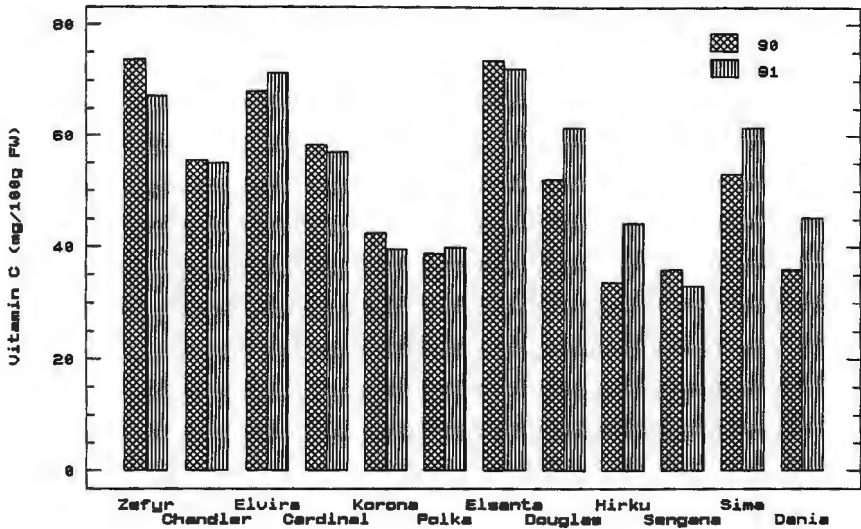
- is placed at Research Center Aarslev, which is a research center under Danish Institute of Plant and Soil Science. There are 25 people employed at the department (scientists, laboratory technicians, administration staff). At the department there are three research groups: Research group for Aroma and Flavours, Research group for Texture and Research group for Nutritional Quality. The research group for Nutritional Quality is working with changes in nutritional compounds seen in relation to cultivation, storage and processing.

evidences indicate that the antioxidant nutrients, among other things vitamin C, play crucial roles in preventing or delaying the onset of different diseases, including some types of cancer. The antioxidants also seem to play a role in preventing cardiovascular diseases, but for vitamin C these evidences are not so strong as for other antioxidants (1).

### Vitamin C in strawberries

Strawberries are an excellent source of ascorbic acid. At the Department of Food Science and Technology some work have been done on nutritional and sensory quality of strawberries. Some of the result are shown below. In collaboration with the Department of Fruit and Vegetables, Danish Institute of Plant and Soil Science, which carried out the field experiments, twelve different cultivars of strawberries were tested for yield and different quality attributes, including vitamin C. The results shows, that highly significant differences in vitamin C content were found between the cultivars in both years (Figure 1).

Fig. 1: Vitamin C in different strawberry cultivars





There are more than twice as much vitamin C in the cultivars with the highest content compared to the cultivars with the lowest content. 'Elsanta', 'Zefyr' and 'Elvira' had the highest content whereas 'Senga Sengana', 'Korona' and 'Polka' had low content in both years. It is possible to get a high vitamin C content by selecting the right cultivar; but other important parameters like yield have to be considered then selecting cultivars for growing. In another experiment four cultivars were tested, and vitamin C content was compared for berries with green tips and ripe berries. The cultivar 'Elsanta', which has only been grown in Denmark for few years, has as high vitamin C content as the "old" cultivar 'Zefyr' (Table 2). No differences were found between berries with green tips or ripe berries (Table 3).

**Table 2** Vitamin C contents in four cultivars of strawberry

<i>Cultivar</i>	Vitamin C (mg/100 g FW)
Dania	53
Elsanta	100
Senga Sengana	58
Zefyr	92

**Table 3** Vitamin C contents in fruits with green tips and in ripe fruits

<i>Maturity level</i>	Vitamin C (mg/100 g FW)
Green tip	76
Red berries	76
LSD	n.s.

### **Vitamin C in lettuce**

Crisphead lettuce was planted three times during the season 1990 and harvested with 3 or 4 days difference in harvest date. A decreasing vitamin C concentration per fresh weight was found when delaying the harvest date during all the season. An increasing nitrogen supply also decreased the vitamin C content. During storage the vitamin C content also decreased at increasing storage time, this might be due to decrease of the content in the particular leaf, but also due to trimming loss because crisphead lettuce has a higher content of vitamin C in the outer leaves than in the inner leaves (table 4 and table 5).

**Table 4**

Vitamin C (mg/100 g fresh matter) in crisphead lettuce at increasing nitrogen supply in a storage experiment. Average of cultivars (cv. Saladin and cv. Marius)

Nitrogen supply (kg N/hectare)	Storage time (days)		LSD
	0	7 14	
50	5.95	5.55 4.80	1.00
100	5.30	4.80 4.15	0.75
150	4.95	4.55 4.10	0.80
200	4.80	4.50 4.05	0.65
LSD	0.85	0.60 0.60	-

**Table 5**

Vitamin C content in crisphead lettuce depending on the head fraction in the cv. Saladin grown with 150 kg N/hectare

Head fraction	Vitamin C (mg/100 g FW)
Outer	6.15
Middle	5.70
Inner	5.45
LSD	0.60

## References

1. Ernæringsrådet 1994. Den sundhedsmæssige betydning af antioxidanter i levnedsmidler og som kosttilskud. Publikation nr.3.
2. Blok, G. And Langseth, L. 1994. Antioxidant Vitamins and Disease Prevention. Food Technology 80-84.
3. Poulsen, N. 1992. Keeping quality of strawberry cultivars during ice bank cooling. Tidsskr. Planteavl 96: 45-50.
4. Poulsen, N.; Johansen, A.S.; Sørensen, J.N. 1995. Influence of growth conditions on the value of crisphead lettuce. 4. Quality changes during storage. Plant Foods for Human Nutrition 47: 157-162.
5. Sørensen, J.N.; Johansen, A.S.; Poulsen, N. 1995. Influence of growth conditions on the value of crisphead lettuce. 1. Marketable and nutritional quality as affected by nitrogen supply, cultivar and plant age. Plant Foods for Human Nutrition 46: 1-11.

## Selenanreicherung in Gemüse

B. Geyer<sup>1</sup>, F. Haj-Bakri<sup>1</sup>, D. Gawlik<sup>2</sup>, K. W. Park<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut für Gärtnerischen Pflanzenbau, Humboldt-Universität Berlin, Abteilung Spurenelemente in Gesundheit und Ernährung, Hahn-Meitner-Institut Berlin GmbH,  
<sup>2</sup>Department of Horticulture, Korea University Seoul

### Einleitung

Gemüse gehören zu den selenarmen Nahrungsmitteln. Die Se-Gehalte in Gemüse in Deutschland betragen im Mittel nur 55 µg/kg TM (1). Dagegen konnten in Wildpilzen, insbesondere in Steinpilzen (*Boletus edulis*) mit 30180 µg/kg TM (2) und 44449 µg/kg TM (3), weit höhere natürliche Selengehalte gefunden werden. Für den Menschen zählt Selen zu den essentiellen Elementen. Die empfohlene tägliche Aufnahme von 1 µg Se/kg Körpergewicht kann in Selenmangelgebieten über die in dieser Region erzeugte Nahrung nicht gesichert werden. In diesen Gebieten werden deshalb auch Nahrungspflanzen mit Selen gedüngt (4). Selenangereichertes Gemüse schützt in Versuchen mit Ratten auch besser gegen Krebs als die gleiche Dosis der chemischen Verbindung (5). Die Selenanreicherung über eine Boden- und Substratdüngung mit Selensalzen oder selenhaltigen Abfallstoffen, wie z.B. Flugasche, Komposte, Seeschlamm, oder durch eine Blattdüngung ist aber schwer zu steuern und nicht risikofrei. Es sind deshalb andere Verfahren zur Selenanreicherung untersucht worden, um Selen gezielt, unter weitestgehender Schonung der Umwelt in Gemüse anzureichern.

### Material und Methode

Pflanzenbauliche Untersuchungen:

Als geeignete Kulturmethoden wurden solche, wie die substratlose Wasserkultur mit stehender, belüfteter Nährlösung oder die Substratkultur mit einem inerten Quarzkiessubstrat angesehen. Die Selenkonzentration (als Natriumselenat) in den Nährlösungen war mit 0, 0.1, 1.0, 10, 100, 1000 und 5000 µg Se/l Nährlösung so gewählt, daß bisher nicht untersuchte sehr niedrige Konzentrationen (<100 µg/l) als auch phytotoxische Konzentrationen (>1000 µg/l) erfaßt

wurden. Gemüsebohne (*Phaseolus vulgaris* L.) wurde in stehender Nährlösung mit einmaliger Selenzugabe zu Kulturbeginn und Kopfsalat (*Lactuca sativa* L.) sowie Pak-Choy (*Brassica campestris* L.) in Quarzkies mit rezirkulierender Nährlösung und Selenzusatz auch beim einmaligen Nährlösungswechsel über 7 Wochen im Gewächshaus kultiviert.

#### Analytische Untersuchungen:

Der Selengehalt der Pflanzenteile und der Nährlösungsrückstände wurde mit "Instrumenteller Neutronen-Aktivierungsanalyse" (INNA) gemessen. Das Verfahren beruht auf der kernchemischen Umwandlung stabiler Isotope des untersuchten Elementes in Radionuklide und anschließender Messung der emittierten Strahlung. Es erfordert praktisch keine präanalytische Behandlung der Proben. Nur 20-30 mg des bei <55°C schonend getrockneten Probenmaterials werden in eine Ampulle aus hochreinem Quarzglas eingeschmolzen. Als Vergleich dienen 50µl eines Multielement-Standards mit einer Selenkonzentration von 10 mg/l, die in gleiche Ampullen pipettiert und vor dem Abschmelzen getrocknet werden. Bestrahlt wurde in einer Kernposition des Forschungsreaktors BER II des Hahn-Meitner-Instituts Berlin über 16 h bei einer neutronenflußdichte von  $1,5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Nach einer Wartezeit von 7-10 Tagen wurden die Gamma-Spektren von Proben und Standards gemeinsam mit den ungeöffneten Ampullen gemessen. Die Selengehalte wurden aus den Fotolinien des Radionuklids Se-75 berechnet. Die Bestimmungsgrenze für Selen war unter diesen Bedingungen  $10^{-9}\text{g}$ .

#### Ergebnisse

Ab  $10 \mu\text{g Se/l}$  Nährlösung konnte bei allen einbezogenen Gemüsearten eine deutliche Zunahme des Selengehaltes beobachtet werden. Bei  $100 \mu\text{g Se/l}$  Nährlösung wurden in allen untersuchten Pflanzenteilen Selengehalte gefunden, wie sie für Se-Akkumulatorpflanzen typisch sind. Sie lagen zwischen 1240 (junge Bohnenhülsen), 2326 (Kopfsalat) und  $5150 \mu\text{g Se/kg TM}$  (Pak-Choy). Auch  $1000 \mu\text{g Se/l}$  Nährlösung waren bei den beschriebenen Untersuchungen nicht phytotoxisch, bewirkten aber hohe Selengehalte, die von 22000 (Bohnenhülsen) über 39313 (Kopfsalat) bis zu  $108000 \mu\text{g/kg TM}$  in Pak-Choy reichten. Gehalte in dieser Größenordnung kamen aber auch natürlich in Steinpilzen vor. Bei mehr als  $1000 \mu\text{g Se/l}$  Nährlösung wurden zunehmend Pflanzenschäden beobachtet. Die Selengehalte in den Pflanzen korrelierten insgesamt gut mit den Selenkonzentrationen in den Nährlösungen (Tab.1, Abb. 2). Die bei der Buschbohne untersuchte Verteilung des Se ergab die in Abb.1 dargestellten Ergebnisse. Die größte Menge war in den Blättern enthalten. Junge Hülsen enthielten höhere Gehalte als ausgewachsene. Selenverluste wurden in den Versuchen mit stehender Nährlösung nicht nachgewiesen (6). Die Selenanreicherung hatte positive Auswirkungen auf den Nitratgehalt bei Kopfsalat und den Blattlausbefall bei Pak-Choy.

## Schlußfolgerungen

Durch Selenzusätze zu Nährlösungen konnte auf einfache Weise Selen in Gemüse angereichert werden. Eine deutliche Erhöhung der Selengehalte war bereits ab 10 µg Se/l Nährlösung, das entspricht dem Selengrenzwert für Trinkwasser in vielen Ländern, gegeben. Unklar sind die rechtlichen Voraussetzungen zur Anreicherung von Selen in Gemüse. Künftige Arbeiten sollen die Auswirkung der Selenanreicherung auf die sensorische Qualität von Gemüse und die günstigen Applikationszeitpunkte untersuchen.

## Literatur

- (1) Hartfiel, W.; Schulte, W. 1988: Selenmangel in der Bundesrepublik (II). Akt. Ernähr. (13) 75-82
- (2) Vetter, J. 1993: Selenium content of some higher fungi. Acta Alimentaria (22) 383-387
- (3) Geyer, B.; Haj-Bakri, F.; Gawlik, D. 1995: Selen in Gemüse. Wissenschaftl. Arbeitstagung DGG, BDGL-Schriftenreihe 13, 67
- (4) Vuori, E.; Väärkoski, J.; Hartikainen, H.; Kumpulainen, J.; Aarnio, T.; Niinivaara, K. 1994: A long-term study of selenate sorption in Finnish cultivated soils. Agr. Ecosys. Environ. (48) 91-98
- (5) Ip, C.; Lisk, D. J.; Stoewsand, G. S. 1992: Mammary cancer prevention by regular garlic and selenium-enriched garlic. Nutrition and Cancer (17) 279-286
- (6) Haj-Bakri, F. 1996: Wirkung von Selen auf Wachstum, Selengehalt und Salzstreß bei der Buschbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) in Hydrokultur. Diss. Humboldt Univ. Berlin, Shaker Verlag Aachen

**Tab. 1** Korrelation zwischen dem Selenzusatz in der Nährlösung und den Se-Gehalten in der Buschbohne

Se Zusatz µg/l	Se-gehalte in µg/kg TM			
	Wurzel	Stengel	Blatt	Hülse
0	<76	<56	67-71	<289
0,1	<293	<79	<65	<79
1	<270	<79	<73	<74
10	849	246	284	170-232
100	4700	1860	2160	1240-2410
1000	39100	17900	21300	16800-22000

Abb. 1: Se-Verteilung in der Buschbohne

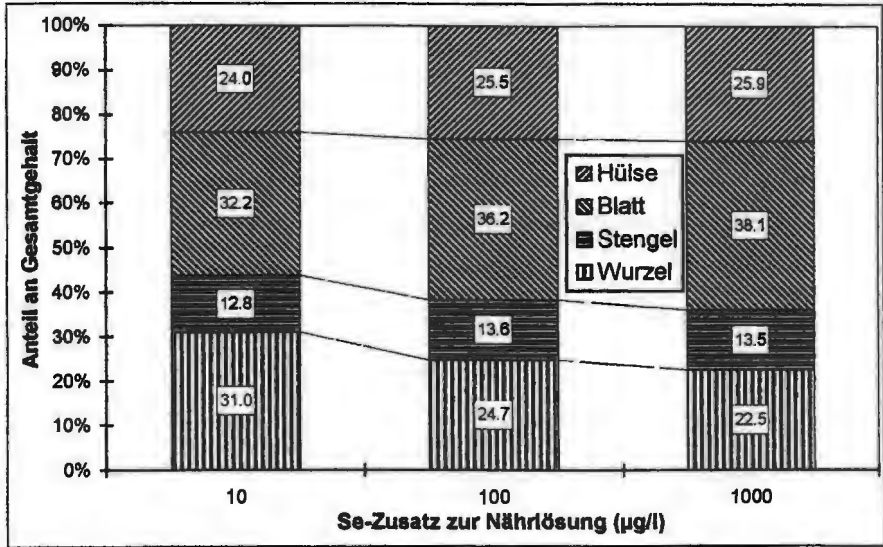
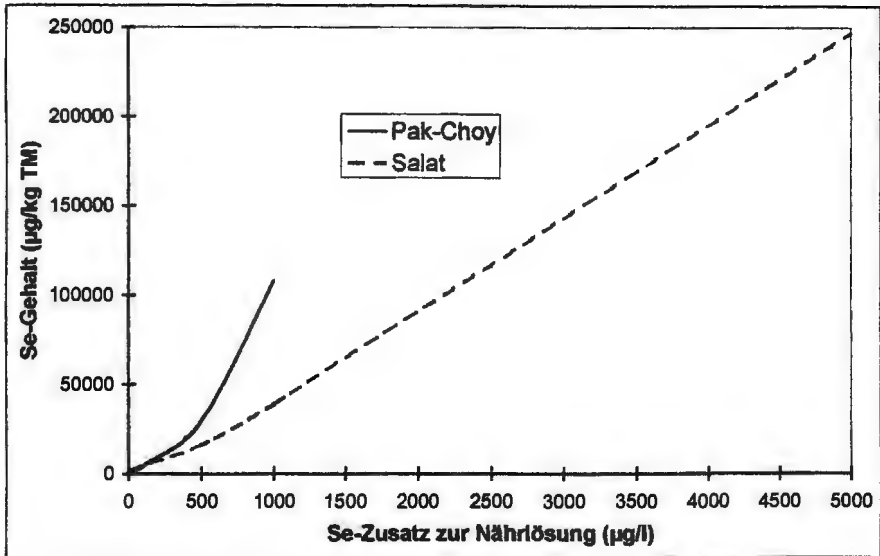


Abb. 2: Einfluß der Se-Düngung auf den Se-Gehalt von Pak-Choy und Kopfsalat





## Sulphur Supply and Alliin Content of *Allium* Species

Hoppe, L.<sup>1,2</sup>, Bahadir, M.<sup>2</sup>, Haneklaus, S.<sup>1</sup> and Schnug, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany; <sup>2</sup>Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis, Technical University Braunschweig, Hagenring 30, 38106 Braunschweig, Germany

### Introduction

Garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) were among the earliest cultivated crops and have been popular for centuries in folk medicine. The odour, taste and biological activity of garlic and onion is based on the synthesis of sulphur containing amino acids (alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) as precursors of a variety of bioactive degradation and conversion products. Due to reduced inputs sulphur deficiency has become the most important nutritional disorder in European plant production. Relationships between sulphur nutrition and crop yield have been shown for agricultural crops such as cereals and oilseed rape (Schnug & Haneklaus, 1994). The sulphur nutrition of garlic and onion will be an important aspect with view to the increasing relevance of the nutritional value of these plants which primarily contribute to the taste and quality of a diet rather than its energy. The real relationship between sulphur status and alliin synthesis should be reflected in the alliin concentrations of the photosynthetically active vegetative tissue because the bulbs are storage organs which integrate nutritional effects over time (cp. Cho et al., 1994).

In the present study the influence of the sulphur supply on the alliin (3-(2-propenylsulfinyl)-L-alanine) concentration in the leaf tissue of garlic and the isoalliin (3-(1-propenylsulfinyl)-L-alanine) concentration in onions was determined at different growth stages.

## Material and Methods

In a greenhouse experiment 8 onion and 4 garlic plants were grown in 10 kg Kick-Brauckmann pots with sand as substrate. The nitrogen and sulphur treatments were applied in factorial combination in amounts of 0, 50 and 250 mg/pot S and 250, 500 and 1000 mg/pot N. The basal nutrient supply was maintained sufficiently for optimum growth. The first sampling of leaves was carried out after full development of leaves and start of bulb sprouting 66 days after sowing and subsequently carried out weekly with in total 4 harvests.

### *Sample preparation*

Directly after cutting the leaf tissue was freeze-dried and homogenised in liquid nitrogen by means of a mortar and subsequently freeze-dried. 400 mg of the plant material was extracted with 50 ml of a methanol/water/formic acid solution (1/1/0,002) for fifteen minutes. After filtration the solution was centrifuged.

The reagent for the precolumn derivatization of the (iso)-alliin was prepared as follows: 28 mg o-phthalaldehyde (OPA) in 1 ml MeOH and 20 µl 2-Methyl-2-propanthiol (t-BuSH) were diluted to 10 ml in a volumetric flask with 0.1 M aqueous sodium phosphate buffer (pH 9.50). OPA and t-BuSH react selectively with the primary amino group of the (iso)-alliin and an isoindol derivate is formed.

HPLC analysis of OPA/t-BuSH derivates was performed with a Merck-Hitachi apparatus equipped with a EcoCART-cartridge (125-3 mm) filled with LiChrospher® 100, (RP-18, 5µm) and an UV detector operating at  $\lambda = 337$  nm. Two solvent systems were used: system A consisted of tetrahydrofuran/acetonitril/0.1M sodium acetate buffer at pH 7.2 (0.5/9.5/90) and system B was a mixture of acetonitril and water (1:4). The flow rate was 0.5 ml/min.

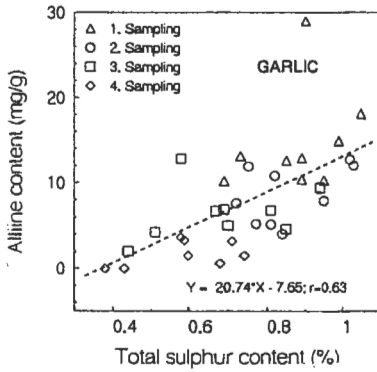
The standard deviation for the determination of the (iso)-alliin content ( $\phi$  48.6 mg g<sup>-1</sup>) varied between 1.5 and 6.2 %. The average recovery rate was 98.8% so that a confident reproducibility of the method was given.

## Results and Discussion

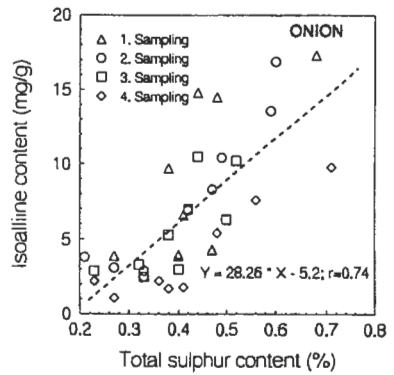
The influence of the sulphur supply on the (iso)-alliin content in the leaf tissue of garlic and onions within the main growth development has been studied because the alliin content is an important quality parameter especially with view to organoleptic features and therefore relevant not only in generative but also vegetative plant parts when used in human nutrition (e.g. leek, chives and spring onion).

An increasing sulphur supply was related to an increasing total sulphur and (iso)-alliin content in both garlic and onions with distinctively higher sulphur concentrations in garlic. However, the amount of sulphur bound in (iso)-alliins is approximately two times higher in onions. The relationships between total sulphur and alliin respectively isoalliin contents in garlic and onions for all nitrogen and sulphur treatments are presented in Fig. 1 & 2. For both crops a significant positive relationship between both parameters was determined.

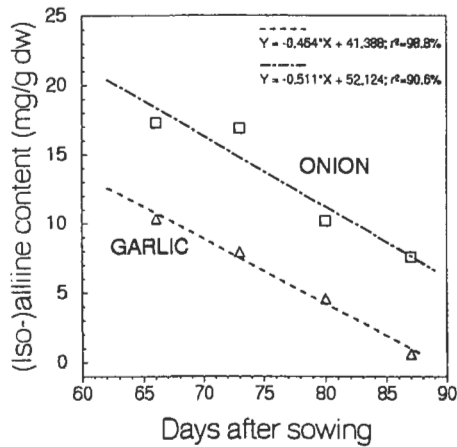




**Fig. 1:** Relationship between total sulphur and alliin content in the leaf tissue of garlic



**Fig. 2:** Relationship between total sulphur and isoalliin content in the leaf tissue of onion



**Fig. 3:** Relationship between growth and (iso-)alliin content in the leaf tissue of garlic and onion (N-supply: 1000 mg/pot; S-supply: 250 mg/pot)

The (iso-)alliin content continuously decreased from the first to the last sampling date in both garlic and onion (Fig. 3). According to Muetsch-Eckner (1991) and Cho & Lee (1974) this continuous decrease in the alliin content of garlic leaves reflects the translocation of alliin to the bulbs.

### Conclusions

There is a significant relationship the total sulphur and (iso-)alliin concentration in the leaf tissue of garlic and onion. Onions in comparison with garlic bound about the double amount of S in isoalliins. With the beginning of bulb sprouting a continuous decrease in the (iso-)alliin content of the leaf tissue of garlic and onion could be determined.

### References

- Cho, S.-Y. and Lee, S. W. 1974. Studies on changes in the composition of garlic during growth. I. Changes in the alliin and amino acid contents in various parts. J. Korean Soc. Hort. Sci. 15 (1), 1-6
- Cho, K.-R., Park, C.-K., Kang, C.-S., Yang, J.-S. and Kwun, K.-C. 1994. Effects of organic matter and lime materials on quality improvement of tissue cultured garlic (*Allium sativum* L.) RDA J. Agric. Sci. 36 (2), 282-288
- Muetsch-Eckner, M. 1991. Isolierung, Analytik und biologische Aktivität von Aminosäuren von Dipeptiden aus *Allium sativum* L. Diss. ETH Zürich Nr. 9465
- Schnug, E. and Haneklaus, S. 1994. Sulphur deficiency in *Brassica napus* (Biochemistry, Symptomatology, Morphogenesis). Landbauforschung Völknerode, SH144



## Enrichment of Iodine in Vegetable Food by Fertilization with Caliche

*P. Jopke<sup>1,2</sup>, M. Bahadir<sup>2</sup>, E. Schnug<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, <sup>2</sup> Institut für Ökologische Chemie und Abfall-analytik, Technische Universität Braunschweig, Hagenring 30, D- 38102 Braunschweig

### **Introduction**

Iodine is an essential trace element for the synthesis of different hormones in the thyroid gland of man. Because of the low iodine contents in food products, iodine deficiency is the most widespread nutrient deficiency disease in man all over the world, and particularly in Germany [1]. The iodine intake with the daily food of the German population only comes to one third of the recommended allowance by "Deutsche Gesellschaft für Ernährung" (DGE). The consequences of iodine deficiency are developmental disturbances of babies and children, formation of a goitre, shortness of breath and malfunction of the thyroid gland possible with tumor formation [1, 2]. For plants iodine is not an essential element, but they are able to absorb it from the soil and the atmosphere [3, 4, 5]. Therefore, it is of interest to know, whether it is possible to increase the iodine concentration of vegetable food by using an iodine-containing fertilizer and to improve the iodine supply of the population in a natural way. This work presents results of research work conducted on the influence of iodine fertilization on the iodine concentration of cress (*Lepidium sativum*).

### **Experimental**

In order to examine the influence of iodine fertilization on the iodine concentration of plants, cress (*Lepidium sativum*) was fertilized in a pot experiment with different amounts of iodine. The iodine source used was Caliche, the raw rock of Chile salpêtre. Caliche is the only natural ore with significant concentrations of iodine, between 0.05

and 0.3 % [6]. The elemental composition of Caliche is shown in Tab. 1.

**Tab. 1:** Elemental composition of Caliche

Element	Conc. [g kg <sup>-1</sup> ]	Element	Conc. [g kg <sup>-1</sup> ]	Element	Conc. [g kg <sup>-1</sup> ]
I	0.3	S	79.0	Ba	0.650
Na	78.0	N	25.0	La	0.020
Mg	17.8	P	4.1	Dy	0.005
Al	39.6	Ti	2.4	Sr	0.100
Cl	33.9	V	0.086	B	1.259
K	21.5	Mn	0.540	Cd	1.8 · 10 <sup>-4</sup>

The cress was sown in pots containing 2 kg sand and fertilized with four different amounts of iodine (Tab. 2). The amount of other important plant nutrients in the Caliche like Na, S, P, K and Mg were balanced with a corresponding nutrient solution.

**Tab. 2:** Caliche treatments and iodine concentration in the substrate

Treatment	Preparation of the fertilizer solution	Iodine conc. [mg kg <sup>-1</sup> ]
A	32 g L <sup>-1</sup> Caliche	1.2
B	Treatment A dilutes 1:2	0.6
C	Treatment A dilutes 1:4	0.3
D	Treatment A dilutes 1:8	0.15
Control	dionized water	0

After three weeks the cress was harvested, dried for 72 h at 70° C and ground to 0,7 mm. The iodine determination followed after the photometric method based on the SANDELL-KOLTHOFF-reaction with brucine. As digestion method of the plant samples the alkaline dry ashing method by adding KOH and ZnSO<sub>4</sub> was chosen, because it is a reliable digestion method of iodine for use in conjunction with photometric analytical techniques.

SANDELL and KOLTHOFF found in 1934 that iodine catalyzes the reduction of Ce(IV) by As(III) [7]:



After 15 min at 40° C the reduction of Ce(IV) was interrupted by addition of brucine (C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O), which forms an oxidation product of red-orange colour in the presence of Ce(IV). The reaction depends on time, temperature and can be affected by elements and ions like [8, 9]:

- a) Cl<sup>-</sup>, Os, Ru, Ir, which have also a catalytic effect
- b) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, Fe(II), which reduce Ce(IV)
- c) BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>, MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>, which oxidize As(III)
- d) Ag<sup>+</sup>, CN<sup>-</sup>, Hg<sup>+</sup>, which react with iodide.

Fig. 1 shows the flow chart of the method.

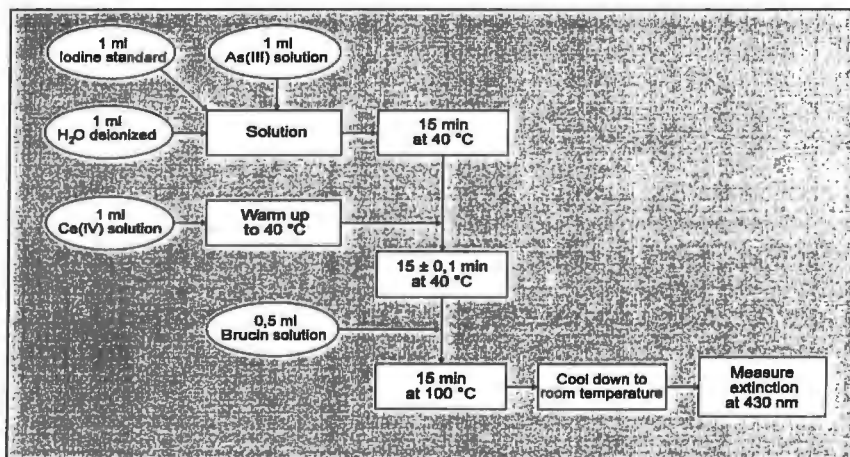


Fig. 1: Photometric determination of iodine with brucine

### Results and discussion

Application of Caliche nearly doubled the yield of cress. This was due to its unique composition of plant nutrients including N which was supplied by Caliche at a rate of 800 mg N per pot. High amounts of Caliche, however, reduced yield most likely due to salt stress on particular toxicities from elements like borone. Tab. 3 shows the yields of fertilized cress.

**Tab. 3: Yields of the cress fertilization experiment**

Treatment	Yield in g/pot or g/2 kg soil	
	fresh matter [F.M.]	dry matter [D.M.]
A	70.2	5.8
B	71.9	5.6
C	79.4	6.7
D	75.9	6.8
Control	40.9	3.5
LSD 5%	5.9	0.5

The results in Tab. 4 show an increase of the iodine concentration in the cress in the mg/g range. The higher the iodine supply per pot the higher was the iodine intake.

*Tab. 4: Iodine concentration in the fertilized cress*

Variant	Iodine fertiliza- tion [mg kg <sup>-1</sup> ]	Iodine conc. [mg kg <sup>-1</sup> D.M.]	Iodine conc. [µg/100 g F.M.]
A	1.2	38.3	320
B	0.6	31.3	240
C	0.3	19.4	160
D	0.15	6.6	60
Control	0	0.5	4
LSD 5%	-	3.5	41

Iodine concentration in cress was closely correlated to the supply by Caliche (Fig. 2). The treatment C (0.3 mg kg<sup>-1</sup> I) showed the best ratio of supply to intake. At higher amounts uptake seemed to be suppressed which might be due to concurrence with other anions rather than a specific effect.

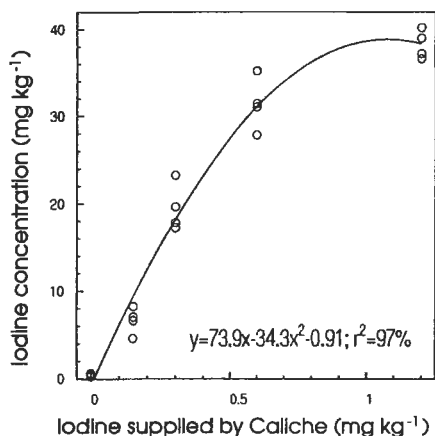


Fig. 2: Iodine concentration in the cress by different iodine supply

## Conclusion

Fertilization with Caliche is a suitable and natural method to increase the iodine concentration in vegetables. In the example with cress (*Lepidium sativum*) a fertilization of 0.3 mg kg<sup>-1</sup> iodine yielded a iodine concentration in fresh matter which should be high enough to supply enough iodine to cover the deficit in the daily diet of humans. Especially people who don't eat fish can suffer from iodine deficiency. Therefore, it could be important to offer the consumer iodized vegetables as prophylactic against iodine deficiency besides iodized salt.

## References

- [1] Manz F. (1991): Jodmangelgebiet Deutschland, In: Kruse-Jarres D. (Hrsg.) Kongreßband, IV. Stuttgarter Mineralstoffsymposium
- [2] Organisationsstelle des Arbeitskreises Jodmangel (1992): Broschüre "Jod und Gesundheit", Groß-Gerau
- [3] Anke M., Groppel B., Bauch K.H. (1993): Iodine in the food chain, In: Delange F. (edit.), Iodine Deficiency in Europe, Plenum Press, New York
- [4] Gaus W., Grießbach R. (1929): Jodfrage und Landwirtschaft, Zeitschrift f. Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, Dung (A), 13, 321-425
- [5] Macnicol R.D., Beckett P.H.T. (1985): Critical tissue concentrations of potentially elements, Plant and Soil, 85, 107-123
- [6] Ullmann (1977): Encyklopädie der technischen Chemie, Band 13, 4. Auflage

- [7] Sandell E. B., Kolthoff I. M. (1934): Chronometric catalytic method for the determination of micro quantities of iodine, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 1426
- [8] Knapp G., Spitzky H. (1969): Untersuchungen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen für die katalytische Jodwirkung, *Talanta* **16**, 1353-1360
- [9] Štolc V. (1961): Interference of certain ions with the catalytic action of iodine, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **183**, 262-267
- [10] Jopke, P. [1995]: Methodenvergleich zur Spurenanalytik von Jod in Böden und Pflanzen, Diplomarbeit, TU Braunschweig, Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik





## Zur Wirkung von Trockenheit und Salzstreß auf den Gehalt von Schwermetallen und Betainen in *Hordeum vulgare* L.

*B. Machelett, Nicole Hindenberg, H. Bergmann*

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Ernährung und Umwelt,  
Naumburger Str. 98, 07743 Jena

### **Einführung**

Der Gehalt an Schwermetallen ist ein wesentliches Qualitätsmerkmal pflanzlicher Lebensmittel. Die Elemente gelangen bevorzugt aus dem Boden in die Ernteprodukte. Der Schwermetalltransfer wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Gegenüber den gut untersuchten Veränderungen durch die Bodenfaktoren pH-Wert, Ton- und Humusgehalt ist bisher vergleichsweise wenig bekannt zum Einfluß von Trockenheit und Neutralsalzen im Boden auf die Schwermetallaufnahme von Pflanzen. Betaine können antinutritive Wirkungen entfalten. Sie werden im Sekundärmetabolismus von Pflanzen besonders dann gebildet, wenn diese unter Streßbedingungen geraten. Diese Fragestellungen sind hinsichtlich der versalzten Böden in den Ländern der „Dritten Welt“ und der dort deutlich ansteigenden Umweltkontamination von erheblicher Bedeutung. Ziel der Arbeit ist es, die Auswirkungen von Salz- und Trockenstreß auf die Schwermetallaufnahme und den Pflanzenmetabolismus an der Testpflanze Sommergerste *Hordeum vulgare* L. zu studieren.

### **Material und Methoden**

Versuchsdurchführung

Mitscherlichversuch: Bodeneinwaage: 6000 g; Boden: anlehmiger Sand (Großbeeren); Ton- und Schluffgehalt: 7 %, pH-Wert: 6,2, C<sub>r</sub>-Gehalt: 0,65 %;

Schwermetallzugabe: Cd, 1,5 mg/kg; Cu, 20 mg/kg; Ni, 7 mg/kg; Pb, 40 mg/kg; Zn, 40 mg/kg;

Versuchspflanze: Sommergerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Alexis), 16 Pflanzen/Gefäß;

Trockenheit: während der Produktbildung 4 x 5 Tage bei < 30 % der nutzbaren Wasserkapazität des Bodens (nWK), Referenzvarianten bei 60 % nWK; 3 Wiederholungen pro Variante

#### Analytik

Schwermetallbestimmung (nach GRÜN u.a. 1987): Trockenveraschung, Messung mittels Flammen-AAS mit Untergrundkompensation (Deuteriumlampe);

Bestimmung Glycinbetain- und Trigonellin Gehalt (nach MÜLLER u. ECKERT 1989): Extraktion mit Methanol/Chloroform/Wasser (70/20/10); Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie; HPLC-Messung (Säule: Kontron Partisil 10 µm SCX), isokratische Elution

Statistische Auswertung: SPSS/PC<sup>+</sup>, ANOVA-Modell; F- und LSD-Test<sub>9%</sub> (lowest significant differences)

### Diskussion

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Zu den Untersuchungsgrößen Ertragswirkung, Schwermetall- und Sekundärmetabolitengehalt ergeben sich folgende Aussagen:

#### Ertragswirkung

Die Schwermetallgabe führt unter den Versuchsbedingungen zu keiner signifikanten Ertragsreduktion. Eine Applikation von 0,1 % NaCl zum Boden bewirkt einen gesicherten Ertragsanstieg. Erklärbar ist dies möglicherweise durch eine Verfügbarkeitserhöhung der Nährstoffe im Boden. Erhöhte Salzgaben (> 0,1 %) verursachen gabenabhängige Ertragsdepressionen. Signifikante Ertragserniedrigungen durch zusätzliche Trockenheit treten unter den Versuchsbedingungen erst oberhalb von 0,3 % Salzgehalt im Boden auf. Veränderte Stoffproduktion beeinflusst die Schwermetall- und Sekundärmetabolitengehalte im Pflanzenmaterial.

#### Schwermetallgehalte

Steigende Salzgehalte im Boden bewirken zunehmende Schwermetallgehalte in den Pflanzen. Der Cd-Pflanzengehalt wird schon durch 0,1 % Salz im Boden signifikant erhöht. Zu erklären sind diese Effekte durch höhere Schwermetallkonzentrationen in der Bodenlösung infolge verstärkter Ionenkonkurrenz am Ton-Humuskomplex. Trockenheit beeinflusst die Pflanzenschwermetallgehalte unter den Versuchsbedingungen nicht, wenn die Salzgehalte im Boden unter 0,4 % liegen. Bei Gehalten > 0,4 % bewirkt Wassermangel dagegen deutlich gesteigerte Schwermetallgehalte.

## **Gehalte der Sekundärmetaboliten Glycinbetain und Trigonellin**

Bereits die Schwermetallkontamination führt zu einer Erhöhung des Sekundärmetabolitengehaltes im Pflanzenmaterial (Trockenvariante, Signifikanzniveau 10 %). Steigender Salzgehalt im Boden erhöht den Glycinbetaintiter signifikant. Trockenheit bewirkt ein weiteres gesichertes Ansteigen des Glycinbetaingehaltes.

## **Schlußfolgerungen**

Steigende Salzgehalte im Boden führen zu einer Erhöhung des Schwermetallgehaltes in der Pflanzensubstanz. Trockenheit verstärkt diesen Prozeß bei hohen Salzkonzentrationen im Boden erheblich (unter den Versuchsbedingungen > 0,4 %). Bei niedrigem Salzgehalt im Boden bewirkt Trockenstreß einen Anstieg der Schwermetallgehalte. Unter Salz- und Trockenstreßbedingungen werden erhöhte Sekundärmetabolitetiter beobachtet.

## **Literatur**

- Müller, H., H. Eckert, 1989: Simultaneous determination of monoethanolamine und glycine betaine in plants. *J. Chromatogr.* 479, 452-458.
- Grün, M., H. Eschke, B. Machelett, I. Kulick, W. Podlesak, 1987: Schwermetallbestimmung in Klärschlamm, Boden und Pflanze mittels AAS. Kolloquien des Institutes für Pflanzenernährung Jena, November 1987, 92-102.

**Tabelle 1: Einfluß von Trockenheit, Schwermetall- und Salzgaben auf Pflanzenwachstum und den Gehalt von Schwermetallen und Betainen im Pflanzenmaterial (Stroh, Hordeum vulgare L.)**

Variante			Ertrag (g TS/Gef.)	Gehalt (mg/kg TS, für GB und TG mg/kg FS)					
Salz (%)	SM	Wasser		Stroh	Cd	Cu	Ni	Pb	GB
0	-	+	21,5	0,1	3,3	0,2	1,8	140	4,6
0	+	+	26,7	1,4	4,7	0,8	2,5	197	6,5
0,1	+	+	29,3	2,6	4,8	0,8	2,6	421	3,8
0,2	+	+	23,5	3,4	4,8	0,8	2,4	452	2,0
0,3	+	+	24,4	4,3	6,1	1,6	3,0	541	1,5
0,4	+	+	20,6	4,9	6,5	1,4	3,4	n.b.	n.b.
0,5	+	+	18,8	5,2	7,3	1,3	3,7	n.b.	n.b.
0,6	+	+	14,5	5,7	7,6	1,9	6,5	n.b.	n.b.
0	-	-	21,6	0,1	3,4	0,2	1,4	n.b.	n.b.
0	+	-	23,9	1,2	5,1	0,6	3,5	271	5,0
0,1	+	-	28,4	2,6	4,8	0,5	2,6	389	5,0
0,2	+	-	23,9	4,3	5,8	1,2	2,4	701	3,4
0,3	+	-	22,5	4,1	6,4	1,4	3,1	917	3,2
0,4	+	-	14,9	5,0	7,8	1,3	4,7	1100	3,0
0,5	+	-	12,1	8,1	9,1	2,3	5,4	n.b.	n.b.
0,6	+	-	7,3	9,0	10,5	2,7	6,2	n.b.	n.b.
<b>Grenzdifferenz LSD-Test 5%</b>			4,6	1,6	1,4	0,7	1,4	148	1,6

## Produktion von Stilben-Phytoalexinen in Weinblättern, sowie den Blättern und Knollen transgener Kartoffeln nach Pilzinfektion

D. Stahl<sup>1</sup>, B. Lippmann, V. Leinhos, A. Mäser<sup>1</sup>, J. Dettendorfer<sup>1</sup>,  
S. Gunstheimer, S. Ernst, H. Bergmann und H. Hilscher<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Planta GmbH, 37574 Einbeck, Grimsehlstraße 31, <sup>2</sup>KWS AG, 37574 Einbeck, Grimsehlstraße 31, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Ernährung und Umwelt, Naumburger Straße 98, 07743 Jena

### Einleitung

Die Gruppe der Stilbene besitzt eine hohe fungitoxische bzw. fungistatische Wirksamkeit. Einige Verbindungen dieser Gruppe werden als Phytoalexine in der Pflanze bei Pilzbefall induziert. Ein im Pflanzenbereich weit verbreitetes Stilben ist das trans-Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-Stilben). Es wurde 1940 erstmals von Takaoka in den Wurzeln des Germers *Veratrum album ssp. grandiflorum* gefunden. Neben den Liliaceen ist es seither in 11 weiteren Pflanzenfamilien nachgewiesen worden. Übersichten dazu finden sich bei Gorham (1980) und Hoos (1988). Bildung und Wirkmechanismus der Stilben-Phytoalexine wurden am intensivsten bei den Vitaceen untersucht (Langcake and Pryce 1976, 1977; Langcake and McCarthy, 1979; Pezet et al., 1977; Fritzemayer und Kindl, 1981; Pool et al., 1981; Dercks and Creasy, 1989). Sowohl 3,5,4'-trihydroxy-Stilben als auch Pterostilben und „Viniferine“ (oligomere Stilbene, die sich vom Resveratrol ableiten) werden in den Blättern von *Vitis vinifera* als Antwortreaktion auf Pilzinfektionen gebildet. Bei *Vitis vinifera* und anderen *Vitis*-Arten existiert eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Stilben-Phytoalexinen und der Resistenz gegenüber pathogenen Pilzen, wie *Botrytis cinerea* u.a. (Langcake, 1981; Pool et al., 1981; Stein und Blauch, 1985; Dercks et al., 1995). Schon Langcake und Pryce (1977) fanden jedoch, daß eine Induktion der Stilben-Biosynthese beim Wein nicht nur durch eine Pilzinfektion, sondern auch durch abiotische Stressoren

(z.B. UV-Licht) induziert werden kann.

Die Biosynthese von Resveratrol erfolgt in der Pflanze über den Shikimat-Polymalonat-Weg. Das Schlüsselenzym für die Resveratrolsynthese ist bei Wein und Erdnuß die Stilben-Synthase. Sie katalysiert die Kondensation von p-coumaryl CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu 3,5,4'-trihydroxy-Stilben. Drei unterschiedliche cDNAs, die für die Stilben-Synthase aus *Vitis vinifera* codieren, wurden 1991 erstmals von Melchior und Kindl isoliert und sequenziert. Gegenwärtig sind in den *Vitis*-Arten mindestens 7 Stilbensynthase (STS)-Gene identifiziert worden (Wiese, 1994). Die Bedeutung der Stilben-Phytoalexin-Biosynthese für die Resistenz von Nutzpflanzen gegenüber pilzlichen Pathogenen prädestiniert sie für Gen-Transfer-Projekte mit dem Ziel, über einen Transfer der Stilben-Synthase-Gene die Resistenz in der Empfänger-Pflanze zu erhöhen. Hain und Mitarbeiter haben 1990 erstmals die Übertragung von STS-Genen der Erdnuß in das Tabak-Genom beschrieben. 1993 gelang es, über einen Transfer der STS-Gene aus dem Wein, die Resistenz von Tabak gegenüber *Botrytis cinerea* zu erhöhen (Hain et al., 1993).

In der KWS Einbeck wurden Stilbensynthase-Gene des Weins in das Genom der Kartoffel übertragen. Im Rahmen der Posterpräsentation werden Experimente zur Untersuchung der Stilben-Phytoalexin-Produktion einer solchen transgenen Kartoffellinie vorgestellt. Gezeigt wird auch die Stilben-Phytoalexin-Produktion in den Blättern der Rebsorte, die als Gendonor fungierte.

### **Material und Methoden**

Die Erzeugung der transgenen Linie BIG-13 erfolgte mittels einer an die leaf-disk-Technik angelehnten Methode: Internodiensegmente der Kartoffel wurden mit *Agrobacterium tumefaciens* inkubiert, wobei T-DNA mit dem Fremdgen aus dem Wein (Vst1, entspricht dem STS1-Gen des Weins) in Zellen an den Wundrändern der Segmente übertragen wurde. Die Infektion der Blätter wurde durch Inkubation mit Sporensuspensionen der getesteten Erreger (*Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*) bzw. mit einer wasserlöslichen Zellwandfraktion aus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Pmg) vorgenommen.

Die durch Extraktion mit Methanol und nachfolgende Fraktionierung mit Ether/A. bidest gewonnenen Extrakte wurden mittels HPLC (Methode modifiziert nach Hain et al., 1990; Säule: Eurospher 100-C 18, 5 µm, Elutionsmittel: Acetonitril/0,5 % Phosphorsäure) analysiert, wobei die Authentizität der Stilbene über einen Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren mit Standard-Substanzen nachgewiesen wurde.

## Ergebnisse

In den Extrakten mit *Botrytis cinerea* infizierter Blätter der Rebsorte *Optima* wurden in unseren Versuchen mittels HPLC die Stilbene trans-Resveratrol und  $\epsilon$ -Viniferin nachgewiesen. Die  $\epsilon$ -Viniferin-Gehalte waren dabei höher als die Gehalte an trans-Resveratrol. Ihren maximalen trans-Resveratrol-Gehalt erreichten die Rebblätter mit 1,36  $\mu\text{g/g}$  FM 3 Tage nach Induktion der Stilbenbildung.

In den Blatt- und Knollenextrakten mit *Phytophthora infestans* infizierter Kartoffeln (Kartoffelsorte *Desiree*, transgene Kartoffel-Linie B1G-13) konnte über HPLC trans-Resveratrol identifiziert werden. In den HPLC-Chromatogrammen der Kartoffelextrakte wurden dabei stets 2 eng benachbarte Peaks mit Retentionszeiten von 11.12 und 11.35 min beobachtet, von denen die 2. mit der von trans-Resveratrol übereinstimmte. In den Extrakten aus Rebblättern wurde nur der 2. Peak gefunden (Abb. 1). Wie beim Wein stiegen die trans-Resveratrol-Gehalte in den Blättern und Knollen der Kartoffel nach Infektion mit dem Pathogen zunächst an, um nach Erreichen eines Maximums wieder abzufallen. In unseren Versuchen wurden in den Blättern der transgenen Kartoffellinie B1G-13 Maximalgehalte von 2,0  $\mu\text{g/g}$  FM an trans-Resveratrol ermittelt. Die aus der Zellwand von *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* präparierte Pmg-Fraktion induzierte als Elicitor die Resveratrolsynthese bei der transgenen Kartoffellinie B1G-13. Wie im Falle der Infektion mit einem Erreger führte die Inokulation mit dem Elicitor zu einem von der Inkubationszeit abhängigen Verhalten der Resveratrolgehalte im Blatt der transgenen Linie.

## Diskussion

In unseren Versuchen konnten wir sowohl bei transgenen Kartoffel-Linien (wie der Linie B1G-13), die mit STS-Genen aus dem Wein transformiert wurden, als auch bei der Kartoffelsorte *Desiree* selbst, nach Infektion mit *Phytophthora infestans* bzw. einem Elicitor aus *P. megasperma f. sp. glycinea* eine Produktion des Stilben-Phytoalexins Resveratrol induzieren. In weiteren Versuchen muß geklärt werden, inwieweit Geschwindigkeit und Höhe der Resveratrolproduktion der transgenen Linien die endogene Produktion der Ausgangssorte übersteigen.

## Literatur

- Dercks, W., Creasy, L.L. and C.J. Luczka-Bayles, In: Handbook of phytoalexin metabolism, p. 287-315, M. Daniel and R.P. Purkayastha (eds), Marcel Dekker, Inc., 1995.
- Dercks, W. and Creasy, L.L. (1989): *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 189-202.
- Fritzenmayer, K. H. and Kindl, H. (1981): *Planta* 151: 48-52.
- Gorham, J. (1980): *Progr. Phytochem.* 6: 203-252.
- Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schröder, G. and Stöcker, R. (1990): *Plant Mol. Biol.* 15: 325-335.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stöcker, R.H. and Stenzel, K. (1993). *Nature* 361: 153-156.
- Hoos (1988): Diss. Universität Karlsruhe, Fak. Bio- und Geowiss.
- Langcake, P. (1981): *Physiol. Plant Pathol.* 18: 213-226.
- Langcake, P. and McCarthy, W.V. (1979): *Vitis* 18: 244-253.
- Langcake, P. and Pryce, R.J. (1976): *Physiol. Plant Pathol.* 9: 77-86.
- Langcake, P. and Pryce, R.J. (1977): *Phytochemistry* 16: 1193-1196.
- Pool, R.M., Creasy, L.L. and Frackelton, A.S. (1981): *Vitis* 20: 136-145.
- Melchior, F. and Kindl, H. (1991): *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 552-557.
- Stein, U. and Blaich, R. (1985): *Vitis* 24: 75-87.
- Takaoka, M. (1940): *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ.* 31.
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E., Kindl, H. (1994): *Plant Mol. Biol.* 26: 667-677.





## Vergleich der Qualität von ökologisch und konventionell angebauten Kartoffeln der Ernte 1995

*J. Prugar, J. Štorková, J. Petr*

Forschungsinstitut für Pflanzenproduktion, Prag

### **Ziel der Arbeit**

Vergleich der technologischen, ernährungsphysiologischen und sensorischen Qualität von Kartoffelsorten aus der ökologischen und konventionellen Anbauweise (Ernte 1995).

### **Zusammenfassung**

Aus den bisherigen Ergebnissen zeigen sich folgende qualitative Unterschiede zwischen ökologisch und konventionell angebauten Kartoffeln: Ökologische Varianten bieten Knollen mit signifikant höherer Trockensubstanz und höherem Stärkegehalt, niedrigerem Nitratgehalt und höherem Ascorbinsäuregehalt. Die sensorische Bewertung ist größtenteils auch etwas besser bei den ökologisch erzeugten Produkten. Die Erträge sind bei den Bio-Kartoffeln bedeutend niedriger.

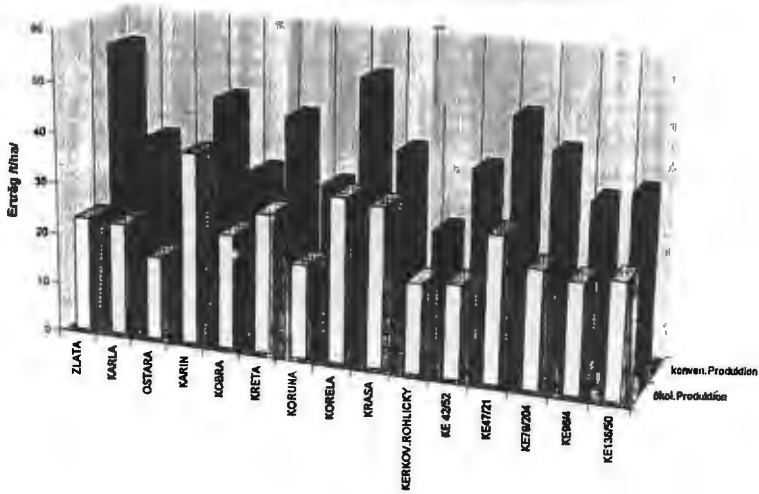
Charakteristik des Versuchsortes Lukavec:

Region	Böhmisch-mährische Hochebene
Produktionstyp	Kartoffelbau
Überseehöhe	620m
Bodentyp	Braunerde
Bodenart	Sandlehm Boden
Durchschnittl. Niederschläge	657 mm
Jahresdurchschnittstemperatur	6,8°C

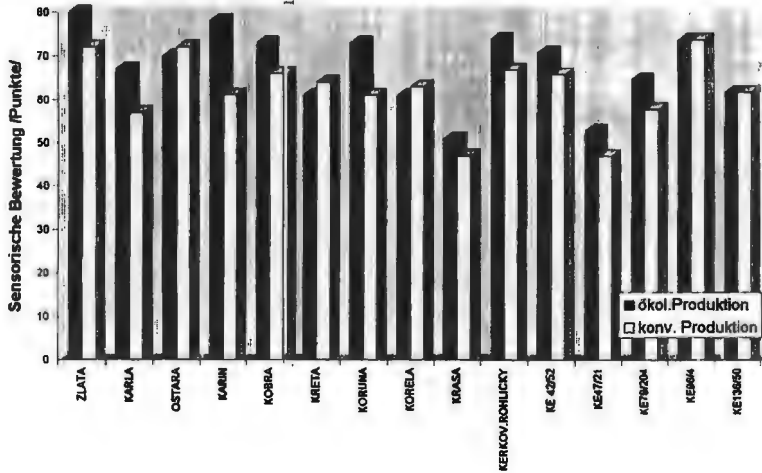
Klimatischen Bedingungen: gleich auf beiden Varianten

Düngung: organisch und Ca auf beiden, NPK-mineral. auf der konventionellen Variante.

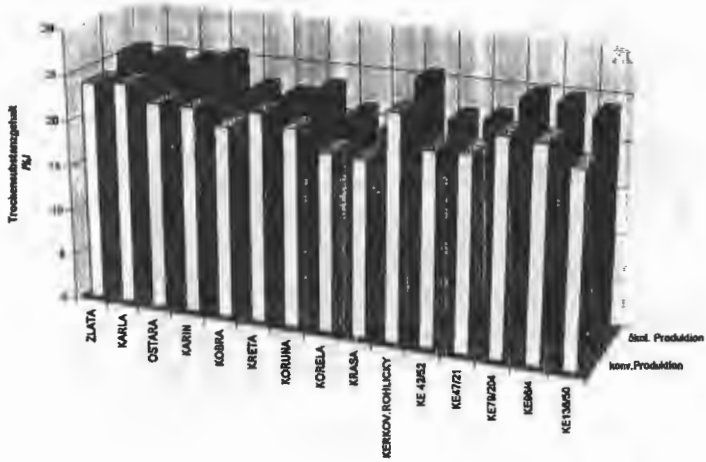
## Vergleich der Erträge bei der ökol. und konven. Produktion /1995/



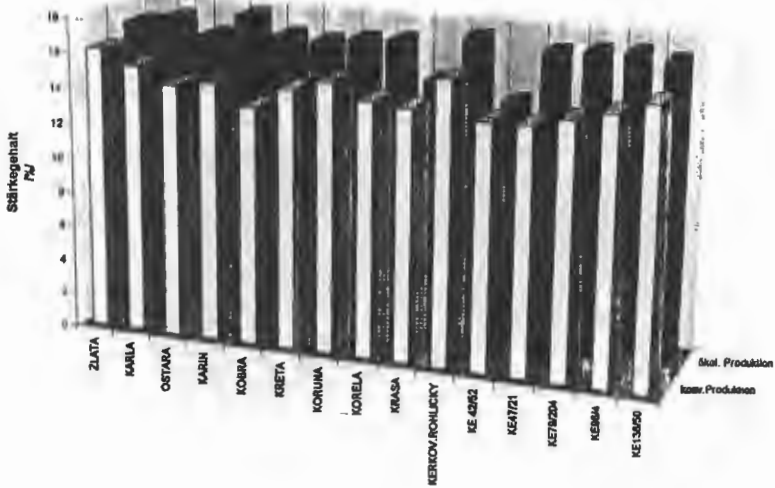
## Vergleich der sensorischen Eigenschaften bei der ökol. und konven. Produktion /1995/



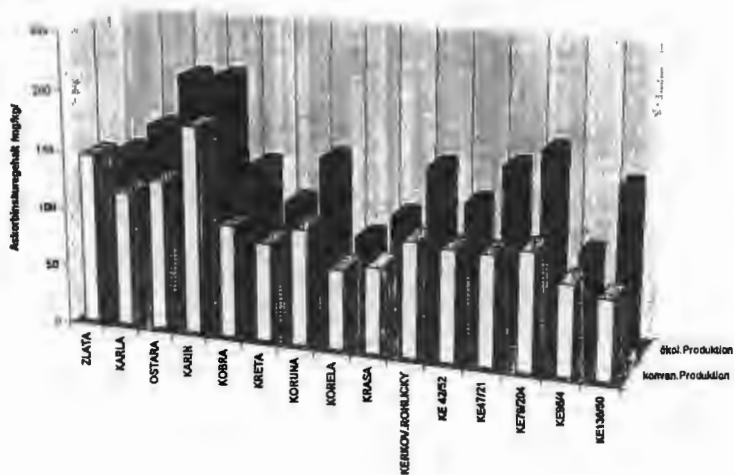
## Vergleich des Trockensubstanzgehaltes bei der $\delta$ kol. und konven. Produktion /1995/



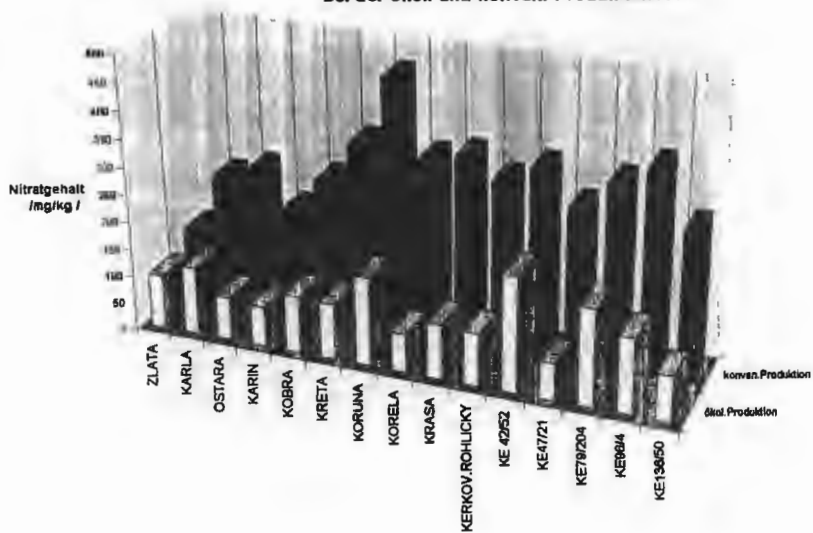
## Vergleich der Stärkegehalte bei der $\delta$ kol. und konven. Produktion /1995/



## Vergleich der Ascorbinsäuregehalte bei der ökol. und konven. Produktion /1995/



## Vergleich der Nitratgehalte bei der ökol. und konven. Produktion /1995/





## Vergleich der Qualität von ökologisch und konventionell angebautem Weizen der Ernte 1995

*J. Petr (Jun.)<sup>1</sup>, J. Štorková<sup>1</sup>, J. Prugar<sup>1</sup>, J. Petr (Sen.)<sup>2</sup>, J. Škeřík<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Forschungsinstitut für Pflanzenproduktion, Prag

<sup>2</sup> Tschechische Landwirtschaftliche Universität, Prag

### Ziel der Arbeit

Vergleich der technologischen Qualität von Winterweizensorten aus der ökologischen und konventionellen Anbauweise.

### Zusammenfassung

Aus den bisherigen Ergebnissen zeigen sich folgende qualitative Unterschiede zwischen ökologisch und konventionell angebauten Winterweizen: Ökologische Variante bietet Korn mit niedrigerem Hektolitergewicht, während das Tausendkorngewicht vergleichbar mit der konventionellen Variante ist. Der Protein- und Klebergehalt sind auf der ökologischen Variante in der Regel niedriger, was sich auf die rheologischen Eigenschaften des Teiges und auf den Volumen und sensorische Qualität des Gebäcks negativ ausprägt. Die Erträge des ökologisch angebauten Weizens sind bedeutend niedriger.

### Charakteristik der Versuchsorte

Versuchsorte	UHRÍNĚVES	STUPICE
Produktionstyp	Zuckerrübenbau	Zuckerrübenbau
Überseehöhe	295 m	270-305 m
Bodentyp	Braunerde	Braunerde
Niederschläge	624 mm	650 mm
Durchschnittliche Jahrestemperatur	9,2° C	9,3° C

**Bewertete Winterweizensorten****Qualitätsgruppe**

---

1. ASTELLA	(B-5)
2. HANA	(A-9)
3. SAMANTA	(A-7)
4. INA	(A-6)
5. ALKA	(A-7)
6. TRANE	(C-1)
7. SIRIA	(B-5)
8. ASTA	(A-6)
9. TORYSA	(B-4)
10. REGINA	(A-7)

---

**Vorfrucht auf beiden Varianten : Erbse**

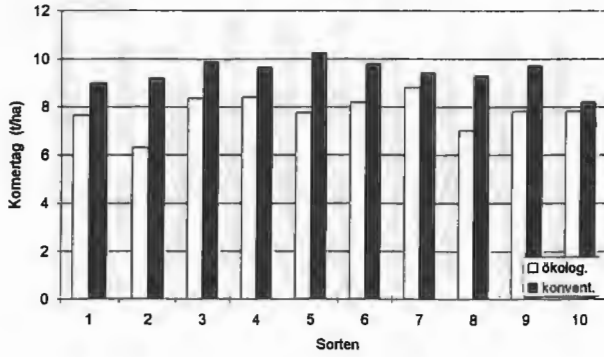
**Die konventionelle Variante wird pro Hektar mineral gedüngt :**

**N - 127 kg , P<sub>2</sub> O<sub>5</sub> - 87 kg , K<sub>2</sub>O - 73 kg**

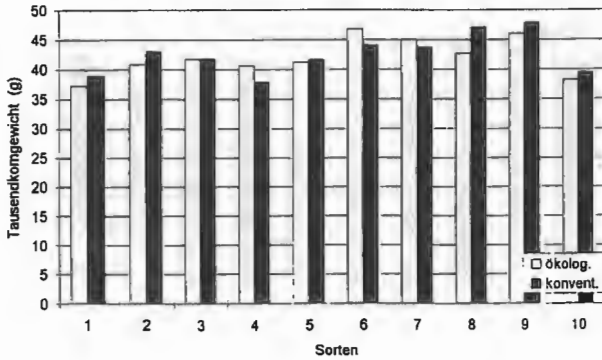
**Applikation von Herbiziden, Fungiziden, Insektiziden und  
Wachstumsregulatoren**

**Auf der ökologischen Variante : keine Düngemittel und Pestizide.**

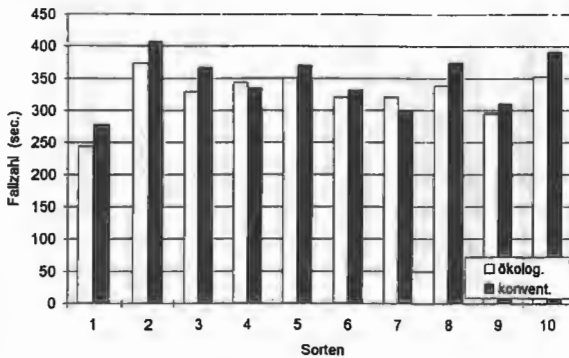
### KORNERTRAG 1995



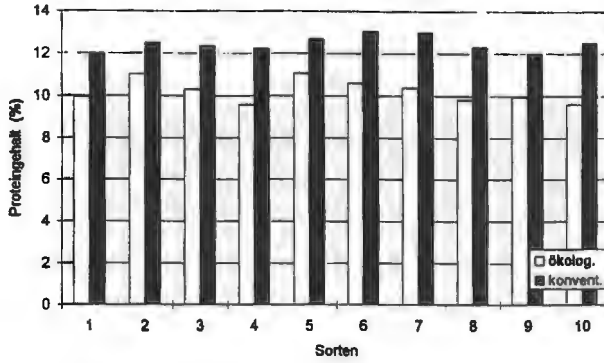
### TAUSENDKORNGEWICHT 1995



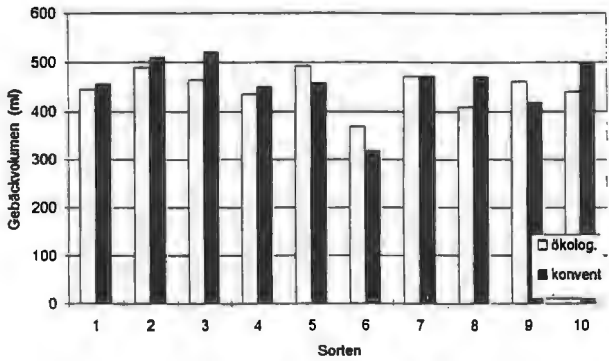
### FALLZAHL 1995



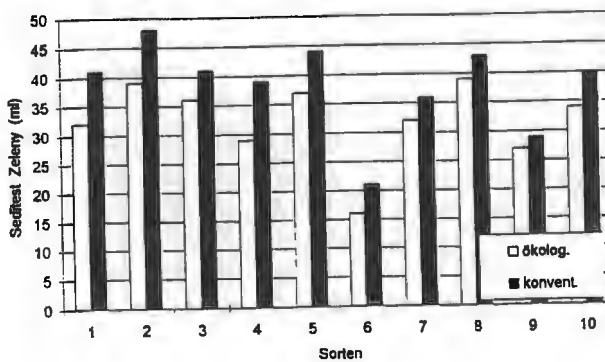
PROTEINGEHALT 1995



GEBÄCKVOLUMEN 1995



SEDIMENT ZELENY 1995







## Leistungsfähige Sanddornsorten - Voraussetzung für die Erzeugung hochwertiger Sanddornprodukte

*H.J. Albrecht*

Zuchtstation Berlin, Baumschulenweg GmbH, Späthstraße 80/81, 12437 Berlin

Bis in die 40er Jahre war der Sanddorn *Hippophae rhamnoides* L. in Mitteleuropa ein Ziergehölz, das wegen seiner starken Wurzel ausläuferbildung auch zur Festlegung rutschgefährdeter Hanglagen Verwendung fand. Erst als durch Griebel und Hess (1940) und danach auch durch andere in den Früchten ein hoher Vitamin-C-Gehalt entdeckt wurde, begann die Nutzung für Nahrungszwecke. In der Folgezeit wurden durch verschiedene Arbeiten, besonders auch die von Feldheim und Jarmatz (1956) weitere Vitamine in den Sanddornfrüchten nachgewiesen, u.a. Beta-Carotin, Vitamin B1, Vitamin B2, Vitamin B9 und Vitamin E, so daß sie als Multivitaminspender angesehen werden können. Schon damals wurde auf den hohen gesundheitlichen Wert der Sanddornfrüchte hingewiesen. Über mehrere Jahrzehnte wurden nur Wildbestände, besonders im Alpenraum und an der Ostseeküste und zur Hangverbauung angepflanzte Sträucher beerntet, oft in konträrer Stellung zum Naturschutz. Nachteilig war dabei auch die Uneinheitlichkeit des Erntegutes. Der Sanddorn hat ein riesiges natürliches Verbreitungsgebiet von der Westküste Europas bis nach Nordost-China, in dem sich Sippen mit unterschiedlichen Eigenschaften herausgebildet haben, die heute taxonomisch als Unterarten (Subspecies) eingestuft werden. Das bemerkenswerte ist jedoch, daß der Sanddorn auch innerhalb einer Unterart oft auf kleinstem Areal eine große Variabilität zeigt. Dies betrifft den Wuchs, die Laubmerkmale, ganz besonders aber die Frucht. So können Fruchtgröße, -form, -farbe, -reifezeit und auch der Gehalt an Inhaltsstoffen, wie Zucker, Fruchtsäure, Ascorbinsäure, Carotin und Tocopherol stark voneinander abweichen. Zur Nutzung dieser Genressourcen waren Selektionsarbeiten und die autovegetative Vermehrung wertvoller Individuen notwendig. Auf

der Grundlage der Arbeiten von Darmer und Eichholz, die Anfang der fünfziger Jahre durchgeführt wurden, begannen unter Leitung des Autors ab 1970 in der Zuchtstation für Gehölze in Berlin-Baumschulenweg Züchtungsarbeiten beim Sanddorn.

In der ersten Phase wurden die in der damaligen DDR vorhandenen Bestände von der Ostseeküste bis zum Leipziger Raum gesichtet und die den damaligen Zuchtzielen entsprechenden Individuen ausgelesen, verklont und im Zuchtgarten geprüft. Im Ergebnis wurden die Sorten 'Leikora', 'Hergo', 'Frugana', 'Dorana' und 'Askola' in den Handel gebracht, dazu 4 männliche Bestäuberklone unter der Bezeichnung 'Pollmix'. Diese Sorten bilden heute die Grundlage für den plantagenmäßigen Anbau. Gegenüber dem Erntegut aus heterogenen Sämlingsbeständen hat das dieser Klonsorten den Vorteil einer weit größeren Einheitlichkeit. Dies betrifft besonders den Gehalt an Inhaltsstoffen und die gleichmäßigere Ausreife. Dazu kommt bei den Sorten ein wesentlich höherer Flächenertrag und die Verringerung des Arbeitsaufwandes bei der Beerntung, die Voraussetzungen für einen wirtschaftlichen Anbau sind. Beim bisherigen Anbau dieser Sorten wurde die Effektivität nachgewiesen, zumal zur Pflanzung leichte stickstoffarme Böden und Spätfrostlagen genutzt werden konnten.

Da sich der Sanddorn über eine Strahlenpilz-Symbiose selbst mit freiem Luftstickstoff versorgt, kann auf N-Düngungen verzichtet werden. Bedeutsame Krankheiten und Schädlinge sind bisher kaum aufgetreten. Dadurch ist es möglich, Sanddornfrüchte ohne Einsatz chemischer Mittel nach ökologischen Gesichtspunkten zu produzieren.

Bei den in der zweiten Phase eingeleiteten Züchtungsarbeiten, bei denen über Hybridisation auch Sorten aus dem asiatischen Verbreitungsgebiet einbezogen wurden, wird eine weitere Verbesserung des Gehaltes an wertgebenden Inhaltsstoffen, besonders an Beta-Carotin, Tocopherol und Ascorbinsäure angestrebt.

Im Hinblick auf die Nutzung des in den Kernen und im Fruchtfleisch enthaltenen Öls ist auch eine Steigerung des Ölgehaltes notwendig. Dabei ist zu prüfen, wie weit die Fettsäurezusammensetzung bei Früchten ausgewählter Individuen voneinander abweicht. daraus können sich neue Zuchtziele ergeben. Gleichzeitig

müssen sich die Sorten durch hohe stabile Erträge auszeichnen. Dies wird erreicht durch Selektion von Individuen mit hoher genetisch bedingter Ertragspotenz und geeigneter männliche Klone, die eine Befruchtung garantieren. Eine weitere Forderung ist die Reduzierung des derzeit noch recht hohen Ernteaufwandes. Dieser ist bedingt durch die außergewöhnlich hohen Fruchthaltekräfte des Sanddorns. Dadurch ist eine Beerntung durch Rütteln am Strauch, wie sie bei anderen Obstarten durchgeführt wird, nicht möglich. Untersuchungen und praktische Erfahrungen zeigten jedoch, daß beim Sanddorn auch die Fruchthaltekräfte sehr unterschiedlich ausgeprägt sind. Bei dem derzeit möglichen Ernteverfahren, dem Abrütteln der Früchte von etwa 1 m langen geschnittenen Zweigen in einer eigens dafür konstruierten Maschine, läßt sich bei der Sorte 'Hergo' in guter Qualität und sehr guter Ausbeute abernten. Bei der Sorte 'Leikora' ist hingegen diese Erntemethode nicht durchführbar. Bei 'Leikora' löst sich der Fruchtstiel sehr schwer vom Holz, häufig wird das Fruchtfleisch aus der Fruchthaut gerissen, was zu einer erheblichen Qualitätsminderung des Erntegutes führt. Bei den Selektionsarbeiten gilt es, durch systematische Testung Genotypen mit verminderten Haltekräften herauszufinden, ohne dabei die anderen Zuchtziele zu vernachlässigen. Die Ausweitung der Erntezeit durch Selektion besonders früh- und spätreifender Sorten ist ein weiteres Anliegen, das für die Auslastung der Ernte- und Verarbeitungstechnik von Bedeutung ist.

Die derzeit laufenden Züchtungsarbeiten werden von der Zuchtstation der Baumschulen Berlin-Baumschulenweg GmbH und der Sanddorn-Storchennest GmbH, Ludwigslust, in Gemeinschaftsarbeit durchgeführt.



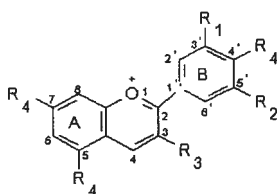
## Gesundheitliche Bewertung von Anthocyaninen/Anthocyanidinen

G. Rechkemmer und B.L. Pool-Zobel

*Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe*

Anthocyanidine sind eine Gruppe von chemisch verwandten, in der Pflanzenwelt sehr verbreiteten Farbstoffen. Anthocyanine sind 3-Glykoside oder 3,5-Diglykoside der entsprechenden Anthocyanidin-Chromophoren. Die häufigsten Vertreter sind Glykoside der Cyanidine, Delphinidine, Malvidine und Pelargonidine. (Abbildung 1)..

**Abbildung 1:** Chemische Strukturformel der Anthocyanidine



Substitution	3	5	6	7	3'	4'	5'
Cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Malvidin	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H

Die Verbindungen gehören zur Gruppe der Flavonoide. Es gibt viele Hinweise in der Literatur, daß Flavonoide (insbesondere Flavone und Flavonole) antioxidative, antimutagene und antikanzerogene Eigenschaften ausüben können. Auf Grund der chemischen Strukturverwandtschaft mit den Flavonen und Flavonolen werden auch den Anthocyanen protektive Wirkungen bei Oxidations-Reduktions Prozessen zugeschrieben (1). Im Gegensatz zur Literaturfülle zu den biochemischen und anderen biologischen Wirkungen von Flavonolen und Flavonen, sind Anthocyanine und Anthocyanidine, jedoch, nur wenig untersucht worden (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Biochemische, molekularbiologische und pharmakologische Wirkungen der Flavone und Flavonole (2), im Vergleich zur Datenlage über Anthocyanine und Anthocyanidine (3-7).

BERICHTETE WIRKUNGEN VERSCHIEDENER FLAVONE UND FLAVONOLE	ANALOGE EFFEKTE DURCH ANTHOCYANIDINE ?	HINWEISE HIERFÜR SIND ZU FINDEN BEI
<b>Parameter der Krebs(prävention)</b>		
Antimutagenität Antigenotoxizität	Trauben-Anthocyane	Abbildung 2,3
Modulation der Cytochrom-p450-Monooxygenasen	-	
TPA Tumor-Promotion	-	
Verminderung oxidiertes DNA Basen	Trauben-Anthocyane an Dickdarmzellen der Ratten	Abbildung 3,4
Induktion von GST-Isomeren	-	
Hemmung induzierter Tumore durch verschiedene Kanzerogene	-	
<b>Parameter der Herz-Kreislauf-Prävention</b>		
Antioxidative Wirkungen	versch. Anthocyanine und Anthocyanidine	(3)
Abfangen von Superoxiden	Anthocyanide der <i>Vaccinium myrtillus</i>	Salvayre et al in (4)
Abfangen von OH-Radikalen	-	
Abfangen von Lipidperoxidradikalen	-	
Inhibition der Lipidperoxidation	Cyanidin und Cyanin	(5)
Bildung von Liganden mit Schwermetallen	Verschiedene Verbindungen	(3, 6)
Inhibition der LDL-Oxidation	Phenole des Rotweins	(7)
Verhinderung der Zytotoxizität von LDL	-	
Inhibition der Cu-katalysierten Oxidation der LDL	-	
Inhibition der Platelet-Aggregation <i>in vivo</i>	-	
Inhibition der Platelet-Adhäsion an die Gefäßwände	-	
Inhibition der Lipoxigenasen	-	
Binden an Platelet-Membranen	-	
Vasodilatatorische Aktivität	-	

Herz-Kreislauf-erkrankungen, Krebs, und viele andere sog. Zivilisationserkrankungen sind ernährungsbedingt und wahrscheinlich vom Antioxidantienstatus abhängig. Dieser sollte positiv durch die Aufnahme von Obst und Gemüse beeinflusst werden. Zu den Pflanzenstoffen, die eine erhöhte Abwehr gegen oxidativen Stress bewirken, gehören neben den Vitaminen A, C, und E auch Flavonoide und damit Anthocyanine. Obwohl die neueren Befunde zeigen, daß die Verbindungsklasse der Flavonoide zum antioxidativen Status beitragen können und das Risiko für Herz-Kreislauf-erkrankungen verringern, ist es noch nicht möglich für die gut untersuchten Flavonole und Flavone eine Aussage zutreffen, inwiefern sie gesundheitliche Auswirkungen haben. Dies gilt deshalb umso mehr für die weniger gut untersuchten Anthocyanine und Anthocyanidine. Um derartige gesundheitliche Behauptungen aufzustellen sind weitere Laboruntersuchungen sowie epidemiologische und Ernährungsinterventions-Studien notwendig.

Im Folgenden wird ein Überblick zum derzeitigen Stand des Wissens an Hand von Literaturdaten und einigen eigenen Untersuchungen dargestellt.

### **Antioxidative Wirkungen:**

In wäßrigem Medium sind die Oxidations-Reduktionsreaktionen komplex und abhängig von den Reaktionsbedingungen (8). Neben der Struktur ist auch der pH-Wert entscheidend. Bei pH 3 reagiert z.B. Malvidin mit  $H_2O_2$  unter Öffnung des Pyranrings zur Bildung von Malvon, wohingegen die entsprechende Reaktion bei pH 7 zur Abspaltung des Benzolrings und Bildung eines Coumarinderivats führt (8). Wir haben die Stabilität einer komplexen Anthocyan-haltigen Fraktion aus roten Weintrauben (TAC) und aus der Aronia-Frucht (AAC) in physiologischer NaCl-Lösung, in Puffer und in Zellkultur-Medium untersucht. Diese Versuche wurden in Vorbereitung auf unsere *in vitro* Untersuchungen zur Ermittlung der zellphysiologischen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse vorgenommen (s.u.).

Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß die Verbindungen in physiologischer NaCl-Lösung und in Puffer stabil sind. In NaCl und in Wasser betragen die  $\lambda_{max}$  522 und 279 nm (pH 4.5). Die Inkubation von 1.56  $\mu$ l des TAC / ml Lösung mit oder ohne 500  $\mu$ M  $H_2O_2$  für 30-60 Minuten führt zu keiner Verschiebung des Spektrums. Dagegen ist in der Tabelle 2 deutlich zu erkennen, daß im Zellkulturmedium (RPMI 1640) ein Abfall der Absorptionsmaxima nach 30 minütiger Inkubation vorhanden ist. Der

Zerfall der TAC wird durch  $H_2O_2$  in diesem Medium deutlich beschleunigt. Im diesem Medium, daß zwar  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  frei ist, befinden sich andere Transitionsmetalle, die zum Zerfall von  $H_2O_2$  führen. Das entstehende OH-Radikal kann die TAC oxidieren und damit deren Absorptionsverhalten ändern. Des weiteren könnten die TAC in diesem Medium mit Metallen komplexieren (z.B. mit Kupfer), wodurch die Absorption der TAC ebenfalls verändert wird. Auch dieser Weg ist ein diskutierter Mechanismus antioxidativer Wirkungen, weil durch die Metallkomplexierung die Bildung freier Radikale vermindert werden sollte (1).

**Tabelle 2:** Stabilität einer Anthocyanidin Fraktion aus roten Trauben in RPMI-Zellkulturmedium, pH 7.41, mit und ohne Anwesenheit von  $H_2O_2$  (Treptow van Lishaut, unveröffentlichte Ergebnisse)

Behandlung	Behandlung	Zeit min	$\lambda_{max}$ 278nm	$\lambda_{max}$ 447nm	$\lambda_{max}$ 568nm
TAC		3	0.627 ± 0.003	0.152 ± 0.003	0.186 ± 0.010
TAC		30	0.630 ± 0.001	0.141 ± 0.004	0.178 ± 0.003
TAC		60	0.636 ± 0.001	0.133 ± 0.003	0.170 ± 0.018
TAC	$H_2O_2$	3	0.615 ± 0.011	0.142 ± 0.001	0.175 ± 0.004
TAC	$H_2O_2$	30	0.610 ± 0.011	0.116 ± 0.001	0.142 ± 0.003
TAC	$H_2O_2$	60	0.610 ± 0.011	0	0.113 ± 0.004

Für die physiologische Beurteilung der Verbindungen, sind Reaktionen an Zellorganellen oder Zellen aussagekräftiger als die gerade beschriebene *in vitro* Reaktionen. Cyanidin 3-O-B-D-Glukosid (C3G) und Cyanidin (Cy) wurden von Tsuda et al. (1994) auf antioxidative Wirkungen untersucht. Die Autooxidation der Linolsäure wurde durch 10-100  $\mu M$  C3G und Cy effizient gehemmt (5). Die durch 2 mM 2,2'-Azobis(2-aminopropan)hydrochlorid oder 1  $\mu M$   $CuSO_4$  induzierte Lipidperoxidation wurden von 50-100  $\mu M$  Cy und C3G gehemmt. Ähnliche antioxidative Eigenschaften der beiden Verbindungen wurden schließlich bei der Hemmung der Lipidperoxidation an Erythrozytenmembranen und in einem System mit Rattenlebermikrosomen beobachtet. In den meisten Fällen war das Aglykon effektiver als das Glykosid, und die Stärke der antioxidativen Wirkung war mit der des Tocopherols vergleichbar. Inwiefern diese im Reagenzglas ermittelten Reaktionen im menschlichen Organismus ablaufen und in der Folge zu protektiven Wirkungen in den Zielzellen führen könnten, muß mit anderen Techniken ermittelt werden (s.u.)



Am Beispiel des Dickdarmkrebses zeigen unsere Untersuchungen einen möglichen Schutzmechanismus auf (s.u.)

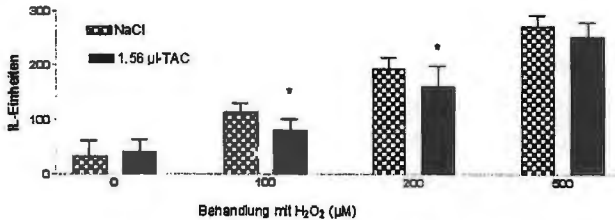
### **Zellphysiologische Wirkungen**

Um die Anthocyanine und Anthocyanidine hinsichtlich protektiver (antioxidativer, antikanzerogener) Eigenschaften zu charakterisieren, untersuchten wir Extrakte aus roten Früchten, daraus isolierte anthocyanhaltige Fraktionen, sowie repräsentative Anthocyanine und Anthocyanidine im Rahmen einer integrierten Strategie zur ernährungsphysiologischen Bewertung von Lebensmitteln und Lebensmittelinhaltsstoffen. Diese Strategie beinhaltet Untersuchungen zur direkten Interaktionen von zu testenden Schutzproben mit ätiologischen Risikoparametern (z.B. Oxidantien, Cancerogene), zur Wirkung der Schutzproben in den Ursprungszellen der Erkrankungen (z.B. Colonozyten für das Beispiel der Erforschung von Dickdarmkrebs), *in vivo* Fütterungsversuche an Tieren sowie humane Ernährungsinterventions-Studien. Erfasst werden physiologische zelluläre Parameter, die für die Prozesse eines Krankheitsverlaufs von Bedeutung sind (z.B. Zytotoxizität,  $\text{Ca}^{2+}$ -Homeostase, DNA-Schäden, Enzym-Modulationen).

#### Inhibition von DNA-Schäden und oxidierten DNA-Basen an Dickdarmzellen:

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Kurzzeitexpositionen Anthocyanfraktionen aus roten Trauben (TAC) keine direkte Interaktion mit Wasserstoffperoxid aufweisen. Dagegen wirken TAC-Extrakte an frisch isolierten Dickdarmzellen der Ratte deutlich antigenotoxisch. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml 15 Minuten mit  $1.56 \mu\text{l}$  TAC inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation von TAC gereinigt und mit 100, 200 oder  $500 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert. Zur Bestimmung der induzierten DNA Schäden wurden die Zellen in Agar suspendiert, lysiert, und einer Elektrophorese (20 min, 30 mV) unterworfen. Geschädigte Zellen, deren DNA mit dem elektrischen Feld wandert, wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und quantitativ mittels Bildverarbeitung ausgewertet. Es zeigte sich, daß (1)  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter diesen Bedingungen ab  $100 \mu\text{M}$  zu DNA-Schäden in primären Dickdarmzellen führt und daß (2) TAC ab  $3.125 \mu\text{l/ml}$  zu DNA-Schäden führt und (3) daß TAC in "subgenotoxischen" Konzentrationen ( $1.56 \mu\text{l/ml}$ ) antigenotoxisch wirken (Abbildung 2). Die

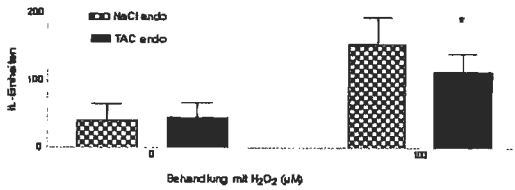
Schutzwirkung war insbesondere für die Reduktion des Grades der insgesamt beobachteten Schädigung vorhanden.



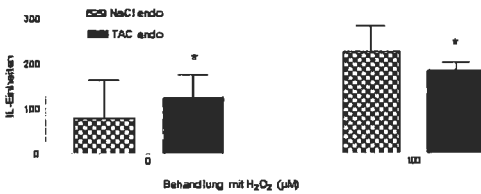
**Abbildung 2:** Antigenotoxische Wirkung von Anthocyanidin-Fractionen an Dickdarmzellen der Ratte. (TAC, 1.56 µl Trauben-Anthocyanidine pro ml Zellsuspension mit 100 bis 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; IL-Einheiten, Ausmaß des Grades der DNA Schädigung berechnet aus % Kometen mit moderater bis starker DNA Schädigung (9) MW±SD, n=4, \* p<0.05)

Es wurde weiterhin eine neue Modifikation dieses Testsystems erprobt, mit dem es nunmehr möglich ist oxidativ-entstandene DNA-Schäden nachzuweisen. Durch Inkubation der o.g. Präparate vor Elektrophorese mit dem Enzym Endonuclease III werden spezifische Oxidations-Schäden der DNA (z.B. Thymin-Glykol) erfaßt (10). Das Enzym arbeitet gleichzeitig als Glykosylase und DNA-Nuklease. Es entfernt oxidierte Pyrimidinbasen und Nucleotide in dem gebildeten apyrimidinen Bereich. Diese "Nicks" führen zu einer erhöhten Rate an DNA-Schäden. Die Differenz der DNA-Schädigung mit und ohne Endonuclease- Behandlung spiegelt die Menge der oxidierten DNA-Basen wieder. Wir konnten zeigen, daß (1) 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu mehr DNA-Schäden führte und daß (2) diese DNA Schäden durch TAC Vorbehandlung der Zellen vermindert werden konnten (Abbildung 3).

Damit haben wir exemplarisch für Dickdarmzellen erstmals belegen können, daß Anthocyane nicht nur "antioxidativ" wirken, sondern daß diese Wirkung in Tumorzellen vorhanden ist. Mittlerweile haben wir derartige Untersuchungen auf Zellen aus humanen Colonbiopsien erweitert. Erste Ergebnisse zeigen, daß auch diese Zellen durch Behandlung mit Anthocyanfraktionen gegenüber "oxidativem Stress" geschützt werden können.



**Abbildung 3:** Verminderung der Rate an oxidierten DNA Basen durch Anthocyanidin-Fractionen an primären Dickdarmzellen der Ratte (S. Legende Abbildung 2).

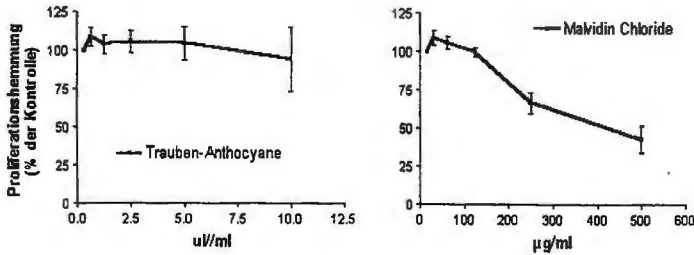


**Abbildung 4:** Verminderung der Rate an oxidierten DNA Basen durch Anthocyanidin-Fractionen an primären, humanen Dickdarmzellen (S. Legende Abbildung 2)

Zytotoxizität, Modulation der Zellproliferation und des Metabolismus *in vitro*

Neben DNA-Schäden, sind die Zellteilungsrate und die Zytotoxizität wichtige Parameter der Zelltransformation. Mutationen werden durch Proliferation manifestiert oder durch den programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Die Hemmung oder Förderung der Teilungsrate sind Indikatoren für Differenzierung, Toxizität und physiologischem Status einer Zellpopulation. Unter Verwendung einer humanen Tumorzelllinie aus einem Dickdarmtumor (COLO 320) zeigten Kolodziej et al (11) daß 16 Proanthocyanidine nur mäßig zytotoxisch wirkten. Im Testsystem wurde die Erfassung der mitochondrialen Respiration als Parameter der Zytotoxizität verwendet. Der Test beruht auf der Reduktion einer löslichen Tetrazolium-Verbindung (MTT) zur Bildung einer blau gefärbten Substanz (Formazan) durch die mitochondriale Enzymumsetzung. Die Menge des aus dieser Reaktion entstehenden Formazan-Produkts ist direkt proportional der Menge an vitalen Zellen. Eine Zunahme des Farbstoffs wird als Proliferation, die Abnahme als Zytotoxizität bewertet. Es wurden IC<sub>50</sub>-Werte (die

Substanzkonzentration, die eine 50% Wachstumshemmung verursacht) ermittelt. Die Werte für die einzelnen, sehr komplexen Verbindungen betragen zwischen 18 und 200  $\mu\text{M}$ . Unsere eigenen Untersuchungen mit TAC und Malvidin-Chlorid (Abbildung 5) ergaben  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $>12 \mu\text{l/ml}$  bzw. 400  $\mu\text{g/ml}$ .



**Abbildung 5:** Einfluß einer komplexen Anthocyanin-Fraktion und des Malvidin-Chlorids auf die mitochondriale Stoffwechsellistung im MTT Test, Mittelwerte  $\pm$  SE,  $n=5$  (Abrahamse, unveröffentlichte Ergebnisse).

### Metabolismus und Wirkungen *in vivo*

Für die *in vivo* Wirkung von Anthocyaninen ist von Bedeutung, daß sie und ihre Metabolite in Abhängigkeit des pH-Werts als Säuren oder als Basen vorkommen können. 4 Strukturen sind möglich. Bei niedrigen pH-Werten liegen sie z. B. als weniger farbintensive rot bis gelbe Flavyliumkationen vor, was für die Resorption im sauren Magenlumen von Bedeutung ist. Bei zunehmenden pH-Werten, entstehen rot bis blau gefärbte Quinolinbasen und nach Hydrierung farblose Pseudobasen. Aus diesen kann durch Ringöffnung die ebenfalls farblose Chalconform entstehen. Die relative Konzentration der 4 Strukturen ist abhängig von der Art des Anthocyanidins und vom pH-Wert. Komplexbildungen mit Metallionen und die Bildung von kondensierten Molekülstapeln führen zu einer Intensivierung der Farben zu dunkleren Blautönen (6). Ältere Untersuchungen zur Pharmakokinetik an Hunden zeigten, daß nach oraler Aufnahme eines Präparats aus blauen Weintraubenschalen gefärbte Produkte in den Faeces auftreten können (12). Toxische Effekte oder pathologische Veränderungen wurden nach 13-wöchiger Fütterung des Präparats an Hunde oder Ratten (15% Anteil in der Diät) nicht beobachtet (12,13).

Der Metabolismus von Delphinidin und Malvidin wurde vor über 20 Jahren an je einer Ratte nach Verabreichung (100 mg) per Schlundsonde untersucht. Im Urin wurden, neben Verunreinigungen aus der Testsubstanz, neutrale Verbindungen detektiert (14). Die derzeit einzige neuere Untersuchung zur *in vivo* Wirkung von Anthocyanidinen aus pflanzlichen Lebensmitteln, ist ein Bericht zur Senkung des Serum-Cholesterinspiegels an Ratten (15). Die roten Farbstoffe einer "Turnip"-Art aus Japan wurden isoliert. Die Hauptinhaltsstoffe wurden als (I) Cyanidin-3-diglucosid-5-monoglucosid, (II) Cyanidin-3,5-diglucosid und (III) Cyanidin-3-monoglucosid identifiziert. Die jeweiligen Ausbeuten betragen 550, 280 und 140 mg Anthocyanidin aus 10 kg Wurzelschale. Die Ratten erhielten eine mit Cholesterin und mit 0.03% I oder mit einer 2:1 Mischung von II+III (0.045%) angereicherte Diät. Nach einer Versuchsdauer von 21 Tagen wurden Gesamtcholesteringehalt und HDL-, VDL- und LDL-Cholesterin bestimmt. Bei einer berechneten Aufnahme von 3.6 mg pro Ratte (164 g k.G.) pro Tag wurden für I sowie für II+III Senkungen des atherogenen Index ermittelt und daraus auf eine gefäß-protective Wirkung dieser Anthocyanidine geschlossen.

### **French Paradox**

Wichtige Anhaltspunkte für eine gesundheitliche Wirkung der Anthocyane sind für das als "French Paradox" bezeichnete Phänomen aus Südfrankreich zu nennen. In epidemiologischen Studien wurden dort weniger Todesfälle durch Herz-Kreislauf-erkrankungen beobachtet als in anderen Regionen, trotz einer ernährungsphysiologisch ungünstigen Ernährungsweise mit hohen Anteilen an tierischem Fett. Die verringerte Herz-Kreislauf-Todesrate wird mit einem moderatem und regelmäßigem Konsum an Wein bzw. Alkohol in Zusammenhang gebracht (16). Auf Grund des Konsums an dunklen roten Weinen in den Gebieten mit niedrigem Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall, lag es nahe die regionalen Weinsorten auf ihre physiologischen Wirkungen zu untersuchen. Interventionsstudien haben gezeigt, daß 300ml Rotwein zur einer Erhöhung des Serum-Antioxidantien Status geführt haben (17). Für das Beispiel der Herz-Kreislauf-erkrankungen spielt vermutlich die Oxidation des Low-Density Lipoproteins (LDL) eine entscheidende Rolle (18). Frankel et al. haben für die phenolischen Substanzen des Rotweins eine effektive Hemmung der LDL-Oxidation ermittelt (7). Dadurch stehen neben dem Alkohol auch andere Inhaltsstoffe des

Rotweins, wie die z.B. die Anthocyanidine, im Verdacht eine Rolle für das "French Paradox" zu spielen. Möglicherweise kommt jedoch, den nicht-rotfarbigen Flavonoiden eine ebenso wichtige Rolle zu, da auch Weisswein-Phenole potente Antioxidantien sind (19). Diese Befunde stehen z.T. im Widerspruch zu anderen *in vitro* Untersuchungen zum antioxidativen Charakter von Wein, die zeigten, daß 9 Rotweinsorten ein höheres antioxidatives Potential aufwiesen als Weisswein, Apfelsaft, Orangensaft oder Traubensaft. Rotwein war 20-fach stärker wirksam als Traubensaft (17). Erschwerend bei der Beurteilung der antioxidativen Wirkungen der Rotweine sind auch die verschiedenen Anthocyangehalte bei verschiedenen Sorten (20). Des weiteren spielen vermutlich auch qualitative Eigenschaften der Flavonoide eine wichtige Rolle. Durch die Fermentation, Reifung, und Alterung entstehen aus den Anthocyanidinen und den anderen Flavonoiden komplexe Verbindungen (Tannine, Procyanidine), die ebenfalls antioxidative Wirkungen haben können und bei der Beurteilung möglicher gesundheitliche Wirkungen mit berücksichtigt werden müssen (20,21).

#### *Vaccinium myrtillus*

Anthocyanidinhaltige Extrakte aus *Vaccinium myrtillus* finden seit über 30 Jahren pharmazeutische Anwendung für die Behandlung von Seh- oder Kreislaufstörungen. Des weiteren finden sich Hinweise für die Behandlung von Magengeschwüren und entzündlichen Reaktionen (22,23). Die Präparate sind nicht von ernährungsphysiologischer Bedeutung, weil sie nicht aus pflanzlichen Lebensmittel stammen. Es sind aber die bisher am intensivsten untersuchten anthocyaninhaltigen Präparate überhaupt. Die pharmakokinetischen Eigenschaften wurden von Lietti und Forni (13) und von Morazzoni et al. (4) untersucht. Nach oraler Applikation des Arzneimittels Myrtocyan mit 36% Anthocyanosid-Anteil (10ml/kg Körpergewicht) an männlichen Sprague-Dawley Ratten (220-240 g KG) wurden Metabolite in Blut und Urin spektrophotometrisch bestimmt (Nachweisgrenze 100ng/ml). Es zeigte sich, dass nach dieser Dosis von umgerechnet 400 mg/kg KG die Maxima der Plasmakonzentrationen (circa 2.5 µg/ml) nach 15 Minuten erreicht wurden. Eine schnelle Plasma-Eliminierung (14.1 ml.min<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>) folgte. Verabreichte Anthocyanoside wurden über Galle (4%) und Urin (1%) ausgeschieden. Die mittlere Bioverfügbarkeit nach intravenöser Applikation von 20-40 mg/kg KG betrug 1.2%. (6% der p.o. verabreichten Dosis lassen sich aus den Inhalten des Magen-Darmtrakts wieder finden). Diese

Befunde deuten darauf hin, daß die Anthocyanoside nach oraler Applikation schnell absorbiert werden, und innerhalb von 15 Minuten ihre maximale Konzentration im Plasma erreichen. Danach werden sie schnell aus dem systemischen Blutkreislauf entfernt, worin sie nach 2h nicht mehr nachweisbar sind. Scheinbar reichen jedoch die resorbierten Mengen von 2-3 µg/ml aus um pharmakologische Wirkungen zu entfalten. Die HPLC Analysen der im Blut und Urin vorhandenen Verbindungen zeigen, daß in beiden Fällen intakte Glukoside und nicht die Aglykone vorhanden sind. Anthocyanoside hemmen cAMP und cGMP *in vitro* bei 2, 3 und 7 µg/ml. Bei 4 µg/ml wirken sie als Radikalfänger. Im Vergleich hierzu sind unsere Untersuchungen zu nennen (s. o.): TAC zeigen ihre antigenotoxische, antioxidative und zellprotektive Eigenschaften bei ähnlichen Konzentrationen (1-2 µl/ml). Malvidinchlorid beeinflusst die Proliferation von Caco-2-Zellen (humane Tumorzelllinie des Darms) im Konzentrationsbereich von 0,3-1,4 mM (100-500 µg/ml). Toxische und genotoxische Wirkungen durch AAC an primären humanen Dickdarmzellen werden bei > 6 µl/ml beobachtet (s. o.).

### **Toxische Wirkungen**

Paracelsus sagte bereits vor 800 Jahren, daß es die Dosis sei, die das Gift ausmacht. Dies gilt insbesondere für biologisch wirksame Substanzen, zu denen auch die Anthocyanine und Anthocyanidine gehören. An isolierten Mitochondrien wurden 14 Flavonoiden daraufhin untersucht ob sie zur Bildung toxischer Sauerstoffradikale führen. Zu diesen 14 Verbindungen gehörten die Anthocyanidine Delphinidin und Cyanidinchlorid. Untersucht wurden die Hemmung der Succinat-Oxidase-Aktivität, Atmungs-Schub (Respiratory Burst) und die Bildung zytotoxischer Sauerstoffradikale (24).

Der IC<sub>50</sub>-Wert (Konzentration der Substanz, die die Succinat-Oxidase-Aktivität um 50% verringerte) für Delphinidin betrug 740 nMol/mg Protein, der Wert für Cyanidin war 290 nMol/mg Protein. Im Vergleich hierzu war die am stärksten wirksame Verbindung, Butein (ein Chalcon) bereits bei 21 nMol/mg Protein wirksam. Generell wurde die Reihenfolge der Wirksamkeit wie folgt ermittelt: Chalcone > Flavone > Flavonole > Dihydroflavonole > Anthocyanidine. Catechine waren inaktiv. 4 der 15 untersuchten Verbindungen (Quercetin > Delphinidin > Myricetin > Quercetagetin) induzierten einen Atmungsschub, die für Myricetin und Quercetagetin mit der Bildung

freier Sauerstoffradikale gekoppelt war. Delphinidin wurde in diesem Zusammenhang nicht auf die Bildung freier Sauerstoffradikale geprüft, jedoch zeigen unsere oben dargestellten Ergebnisse zur Bildung oxidiertes DNA-Basen durch Anthocyanine der Aroniafrucht, daß sehr wohl derartige reaktiver Verbindungen aus dieser Substanzgruppe auftreten könnten.

Neben dieser Art des induzierten oxidativen Stress durch die Flavonoide steht weiterhin die Nitrosierung der Verbindungen in Verdacht mit negativen biologischen Konsequenzen verbunden zu sein. So könnte die genotoxische Wirkung von Rotweinextrakten auf präformierten Nitrosoverbindungen beruhen. Rotweinkomponenten reagieren bei saurem pH mit Nitrit, wodurch eine starke Mutagenität im *Salmonella typhimurium* Mutagenitätstest die Folge ist. Inwiefern diese an Bakterien beobachteten Effekte für die *in vivo* Situation allerdings relevant sind, kann derzeit nicht beantwortet werden. Parallele Befunde mit Quercetin waren *in vivo* nicht nachvollziehbar. Weder Quercetin, noch das nitrosierte Produkt (beide Mutagene an *S. typhimurium*) wirkten *in vivo* genotoxisch (25). Weitere Untersuchungen sind allerdings notwendig um das toxikologische Potential der nitrosierten Rotweineverbindungen abzuklären. Im Magen liegen optimale Nitrosierungsbedingungen vor und Rotwein steht im Verdacht ein ätiologischer Risikofaktor für Magenkrebs zu sein (26,27).

### **Bewertung**

Nach Kühnau beträgt die mittlere tägliche Aufnahme von Anthocyanidinen in den USA 180-215 mg (1). Die Werte für Italien liegen bei 220 mg (Mann) und 81 mg (Frau), wobei hier der Rotweinkonsum mengenmäßig den größten Anteil ausmacht. Immerhin entsprechen 100 ml Rotwein bereits 92 mg (Miniati und Coli). Die ursprüngliche Abschätzung der Gesamtflavonoid-Aufnahme von Kühnau betrug 1 g pro Tag. Für die holländische Bevölkerung wurde dieser Wert auf 23-26 mg an Flavonolen und Flavonen relativiert (2). In Anbetracht dieser genaueren Analyse scheint es wahrscheinlich, daß auch in Deutschland der Wert ähnlich liegt, wodurch wir nur bei regelmäßigem aber moderaten Weinverzehr ("ein Viertel") die für *Vaccinium myrtillus* beschriebene effektive Dosis erreichen. Wie oben beschrieben, haben 300 ml Rotwein antioxidative Wirkungen. Der nächste Schritt ist zu erkunden, welche Konsequenzen diese antioxidative Wirkungen haben, bzw. inwiefern gesundheitliche Wirkungen (Senkung des Herzinfarkttrisikos) die Folge sind. Für



die Möglichkeit zur Senkung des Krebsrisikos, insbesondere des Dickdarmkrebs, spielen u.U. wieder die pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindungsklasse eine wichtige Rolle. Dadurch daß sie schlecht resorbiert und zu einem großen Anteil in den Fäces ausgeschieden werden, können sie in effektiven Konzentrationen auf die Zellen der Dickdarmmucosa einwirken. In diesem Zusammenhang spielt die metabolische Leistung der Darmflora eine wahrscheinlich bedeutsame Rolle.  $\beta$ -Glucosidasen aus der Mikroflora können vermutlich aus den Anthocyaninen die freien Aglykone bilden, die eine andere physiologische und toxikologische Wirkungsbreite haben sollen als die Konjugate. Eine Arbeit vor 25 Jahren beschreibt diese Möglichkeit für Glucoside des Cyanidins (14). Wir wissen inzwischen, daß die  $\beta$ -Glucosidasen-Aktivität sowie die Zusammensetzung der Darmflora durch verschiedene Ballaststoffe deutlich beeinflusst werden kann (28,29). Inwiefern sich diese ernährungsbedingten Einflüsse auf die Wirksamkeit der Anthocyanine auswirken ist nicht bekannt aber für deren Bewertung essentiell. Unsere Befunde zur Reduktion von DNA- Schäden bzw. der oxidierten DNA-Basen an Dickdarmzellen, die ein wichtiges Zielorgan ernährungsbedingter Tumoren sind, stellen einen Weg dar die direkte Wirkung der Anthocyanine auf die Zellen zu ermitteln. *In vivo* Untersuchungen und Studien der Dickdarmzellen erlauben uns zusätzlich die Wirkung pharmakokinetischer Einflussfaktoren und der Mikroflora mit zu berücksichtigen. Diese Untersuchungen werden hilfreich sein derartige Zusammenhänge besser zu verstehen und zu beurteilen.

Teile dieser Arbeiten werden gefördert durch die "Dr. Rainer Wild-Stiftung für Gesunde Ernährung" und Molecular Devices. Wir danken Dr. Andrew Collins, Rowett Research Center, Aberdeen, U.K. für das Enzym Endonuclease III,

## Literatur

1. Kühnau J: "The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition." *World Review on Nutrition and Diet* 24, 117-191, 1976.
2. Hertog MGL: Flavonols and flavanes in foods and their relation with cancer and coronary heart disease risk. 11994(Abstract)
3. Mazza G: Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, CRC Press, 1993
4. Morazzoni P, Livio S, Scilingo A, Malandrino S: "Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats." *Arzneimf Drug Res* 41, 128-131, 1991.
5. Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Choi SW, Kawakishi S, Osawa T: "Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-D-glucoside and cyanidin." *J Agric Food Chem* 1994, 2407-2410, 1994.
6. Kondo T, Yoshida K, Nakagawa A, Kawai T, Tamura H, Goto T: "Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*." *Nature* 358, 515-518, 1992.

7. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE: "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine." *The Lancet* **341**, 454-457, 1993.
8. Iacobucci GA, Sweeny JG: "The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts." *Tetrahedron* **39**, 3005-3038, 1983.
9. Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ: "The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells." *Mutation Research* **336**, 69-77, 1995.
10. Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL: "Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocytid DNA." *Carcinogenesis* **14**, 1733-1735, 1995.
11. Kolodziejc H, Haberland C, Woerdenbag HJ, Konings AWT: "Moderate cytotoxicity of proanthocyanidins to human tumour cell lines." *Phytotherapy Research* **9**, 410-415, 1995.
12. Becci PJ, Hess FG, Gallo MA, Johnson WD, Babish JG: "Subchronic feeding study of grape colour extract in beagle dogs." *Fd Chem Toxicol* **21**, 75-77, 1983.
13. Lietti A, Forni G: "Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides." *Arzneimittel-Forschung* **26**, 832-835, 1976.
14. Griffiths LA, Smith GE: "Metabolism of myricetin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*." *Biochem J* **130**, 141-151, 1972.
15. Igarashi K, Abe S, Satoh J: "Effects of *Atsumi-kabu* (red turnip, *Brassica campestris L.*) anthocyanin on serum cholesterol levels in cholesterol-fed rats." *Agric Biol Chem* **54**, 171-175, 1990.
16. Renaud S, DeLorgeril M: "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." *The Lancet* **339**, 1523-1526, 1992.
17. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A: "Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum." *Clinical Chemistry* **41**, 32-35, 1995.
18. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: "Beyond cholesterol, Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." *N Engl J Med* **320**, 915-924, 1989.
19. Vinson JA, Hontz BA: "Phenol antioxidant index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines." *J Agric Food Chem* **43**, 401-403, 1995.
20. Mazza G: "Anthocyanins in grapes and grape products." *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**, 341-371, 1995.
21. Maffei Facino R, Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Morelli R: "Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*." *Arzneimf Drug Res* **44**, 592-601, 1994.
22. Lietti A, Cristoni A, Picci M: "Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity." *Arzneimf Drug Res* **26**, 829-832, 1976.
23. Magistretti MJ, Conti M, Cristoni A: "Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*." *Arzneimf Drug Res* **38**, 686-690, 1988.
24. Hodnick WF, Kung FS, Roettger WJ, Bohmont CW, Pardini RS: "Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids." *Biochem Pharmacol* **35**, 2345-2357, 1986.
25. Gaspar J, Laires A, Rueff J: "Genotoxic flavonoids and red wine: a possible role in stomach carcinogenesis." *European Journal of Cancer Prevention* **3** (Suppl. 2), 13-17, 1994.
26. Falcao JM, Dias JA, Miranda AC, Leitao CN, Lacerda MM, Motta LC: "Red wine consumption and gastric cancer in Portugal-a case control study." *European Journal of Cancer Prevention* **3**, 269-276, 1994.
27. Hoey J, Montvernay C, Lambert R: "Wine and tobacco: risk factors for gastric cancer in France." *American Journal of Epidemiology* **113**, 668-674, 1981.
28. Rowland IR: Diet, gut microflora and carcinogenesis. In Food, nutrition and chemical toxicity. Edited by DV Parke, R Walker, Great Britain, Smith-Gordon, 1993, pp 337-341
29. Mallett AK, Rowland IR: "Bacterial enzymes: Their role in the formation of mutagens and carcinogens in the intestine." *Drug Disposition* **8**, 71-79, 1990.

## Terpene - Mögliche Wirkmechanismen bei der Krebsprävention

*B.L. Pool-Zobel*

Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

### Ernährung und Krebsprävention

Krebs stellt eine wichtige ernährungsbedingte Erkrankung dar: 20 bis 60% aller Fälle sollten durch eine geeignete Ernährungsintervention vermeidbar sein (1). Im Jahre 1981 publizierten Doll und Peto ihre sehr beachtete Abschätzung der vermeidbaren Krebsursachen in den U.S.A., wobei die Ergebnisse exemplarisch für viele Länder mit westlicher Ernährungsweise ("Western Style Diet") zutreffen (2; Abbildung 1). Ca. 30% aller Todesfälle durch Tumoren sind auf den Konsum von Tabakwaren und ca. 30% auf die Ernährung zurückzuführen. Hierbei wurde die für ernährungsbedingten Tumoren damals ermittelte Spanne von 10 bis 70 %, zehn Jahre später auf 20-60% durch Doll und schließlich in diesem Jahr auf 20-40% durch Willet revidiert (2-4). Generell wird durch die Datenlage immer deutlicher, daß die Ursachen dieser gravierenden Krebsinzidenz eher auf den Mangel der adäquaten Zufuhr von Obst und Gemüse als auf ein "Zuviel" an schädlichen Substanzen in Lebensmittel zurückzuführen ist, obwohl nach wie vor die erhöhte Zufuhr von Energie (insbesondere als tierisches Fett) als wichtiger Risikofaktor angesehen wird (4).

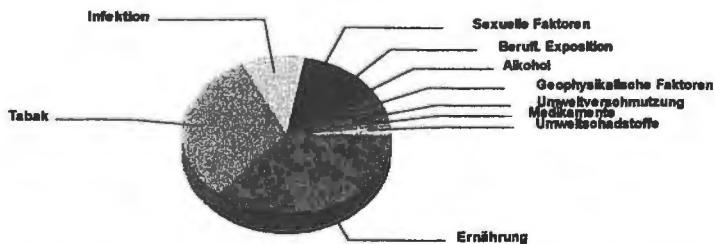


Abbildung 1: Vermeidbare Ursachen der Krebsentstehung (2), Tabak und Ernährung spielen anteilmäßig die größten Rollen als vermeidbare Ursachen

Epidemiologische Hinweise zur Beteiligung von Obst und Gemüse an der Risikoverminderung von vielen Krebsarten sind überwältigend und die Aussage gilt mittlerweile als gesichert (5). Die Risikoverminderung durch pflanzliche Lebensmitteln ist dosisabhängig, d.h. je höher der Verzehr (bei ausgewogener und nicht einseitiger Ernährung), desto größer ist die Schutzwirkung. Der protektive Effekt ist nicht organspezifisch, d.h. Schutz ist für viele Gewebe möglich, auch für solche, die im umgekehrten Fall, nicht durch eine Risikodiät primär verursacht werden (z.B. Tumoren des Respirationstrakt). Für Tumoren des unteren Intestinaltrakts zeigten Steinmetz und Potter, bzw. Block, daß in 11/14 bzw. 20/27 epidemiologischen Studien eine Risikoverminderung durch Obst und Gemüseverzehr nachgewiesen wurde (6,7). Die Wirkung ist laut Negri dosisabhängig mit relativen Risiken (Dick- und Enddarm) von 0,5 (Gemüseverzehr) und 0,6 (Obstverzehr) für das obere Tertile (8; Tabelle 1). Eine nur mit Frauen durchgeführte Studie durch Steinmetz zeigte ein relatives Risiko von 0,73 für Dickdarmkrebs bei hohem Obst und Gemüseverzehr (9). Günstige Lebensmittel hierfür sind allerlei Obst, Gemüse und Getreide-Sorten. Antikancerogene Inhaltsstoffe aus diesen pflanzlichen Produkten sind Ballaststoffe, Vitamine und sekundäre Pflanzenstoffe (10).

### **Die Terpene**

Terpene stellen eine große Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe dar (11). Zu Ihnen gehören Monoterpene (Citronellol, Geraniol, Linalool, Myrcen, Nerol, Limonen, Pinen u.v.m.), Sesquiterpene (z.B. Fanesen), Diterpene, (z.B. Gibberilin, Phytol), Triterpene (z.B. Limonoide, Phytosterole), Tetraterpene (Carotinoide). Mono- und Sesquiterpene sind vor allem in Obst enthalten, wo sie als Hauptbestandteile der ätherischen Öle als Aromastoffen dienen. Bekannt sind insbesondere Limonen und Pinen als wesentliche Inhalte von Citrusfrüchtenöle. Die Diterpene, Triterpene, und Tetraterpene sind relative weit verbreitet in verschiedenen Obst und Gemüsesorten. Triterpene sind auf Grund ihrer Wirkung gegen Insekten und als Bitterstoffe von Interesse. Tetraterpene oder Carotenoide sind neben der Provitamin A Wirkung von Bedeutung hinsichtlich ihres antioxidativen und anticancerogenen Potentials. Neben diesen relativ gut bekannten Substanzen, die für die Gelbfärbung vieler pflanzlicher Produkte verantwortlich sind, spielen möglicherweise Monoterpene, wie Limonen,

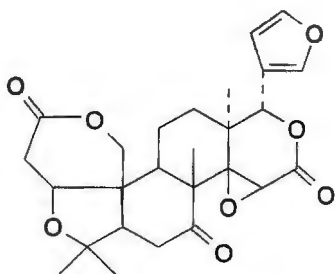
und Triterpene, wie die Limonoide, eine - wenn auch unterschiedliche- Rolle für die Krebsprävention (12,13).

**Tabelle 1:** Relative Tumorrisiken in verschiedenen Geweben in Abhängigkeit des Obst- und Gemüseverzehrs (5,8)

Tumor		Hohe Aufnahme	Mittlere Aufnahme	Geringe Aufnahme
Mundhöhle	Gemüse	0.3	0.6	1.0
	Obst	0.2	0.6	1.0
Speiseröhre	Gemüse	0.2	0.5	1.0
	Obst	0.3	0.5	1.0
Magen	Gemüse	0.4	0.8	1.0
	Obst	0.4	0.7	1.0
Dickdarm	Gemüse	0.5	1.0	1.0
	Obst	0.6	1.0	1.0
Bauchspeichel-drüse	Gemüse	0.4	0.7	1.0
	Obst	0.5	0.7	1.0
Brust	Gemüse	0.7	0.9	1.0
	Obst	1.1	0.9	1.0
Prostata	Gemüse	0.3	0.8	1.0
	Obst	0.4	0.8	1.0
Harnblase	Gemüse	0.4	1.0	1.0
	Obst	0.4	1.0	1.0
Leber	Gemüse	0.2	0.8	1.0
	Obst	0.6	1.3	1.0

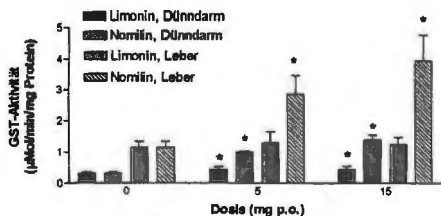
### **Limonoide und die Induktion der Glutathion-S-Transferase**

Die Limonoide sind bitterschmeckende Triperpene und wichtige Geschmacksstoffe der Zitrusfrüchte. Sie können als Glukosederivate in der reifen Frucht und in den Samen vorkommen .



**Abbildung 2:** Strukturformel von Limonin. Die Substanz gehört zu den Triterpenen. Sie verursacht den bitteren Geschmack von Zitrusfrüchten. Für die Pflanze ist sie an der Insektenabwehr beteiligt. Vorkommen vor allem in Zitrone und Grapefruit in Samen und Vorstufen im Albedogewebe der Frucht (11).

Limonin und Nobiletin stimulieren die Aktivität des Entgiftungsenzyms Glutathion-S-Transferase (GST) in verschiedenen Geweben (Abbildung 3). Limonin, Nobiletin, Deacetylnobiletin, Linonool, Obacunon, Deoxylimonin u.a. führen zu einer Steigerung der Enzymaktivität in der Leber und im Dünndarm der Ratte. Hierbei betragen die Dosen zwischen 5 und 10 mg / Tier, wobei Nobiletin doppelt so effektiv war wie Limonin und insbesondere die  $\mu$ -Form der Leber förderte (13).



**Abbildung 3:** Wirkungen von Limonin und Nobiletin auf die Aktivität der GST in Leber und Dünndarm der weiblichen ICR/Ha Maus. Die Messung erfolgte unter Verwendung von Chloro-dinitrobenzol als Substrat (Habig, 1974 in 13); n=3, \*p<0.05.

Auch Limonen, Geraniol, Carvon wirketen stimulierend auf die GST in Fütterungsversuchen bei Ratten (14). Die Aktivität der GST ist eine der wichtigen zellulären Abwehrmechanismen gegenüber Oxidantien und genotoxischen Cancerogenen. Ihre Anregung ist genetisch reguliert und unterschiedliche Isomere (a, m, p, t) sind bekannt. Immunhistochemisch können die verschiedenen GST Enzymuntereinheiten durch Antikörper erfaßt werden. Eine quantifizierbare Bestimmung erfolgt mittels HPLC Aufreinigung (15). Die Mechanismen der Stimulierung des g-GST-Gens erfolgt

möglicherweise über die Aktivierung des "Antioxidant Response Elements" (16-18). Antioxidantien können u. a. diese Stimulierung der Genexpression vornehmen (19).

Inwiefern Limonin oder Limonen und Analoga über ähnliche Mechanismen ihre Effekte entfalten ist allerdings nicht bekannt. Dennoch sind die Befunde wichtig für die Beurteilung der Substanzen, denn die unmittelbare Konsequenz derartiger Enzymstimulierung könnte die wirksame Desaktivierung cancerogener Noxen sein. Durch Limonin und Nobiletin wird die Rate an Lungen-, Vormagen- und Hauttumoren reduziert, die durch Benzo(a)pyren und Dimethylbenzanthracen an Maus und Hamster induziert wird. Limonen reduziert die Tumorausbeute in verschiedenen experimentellen Tiermodellen (s.u.). Reaktive Zwischenstufen beider Substanzen werden vermutlich durch die GST-katalysierte GSH Kopplung desaktiviert. Die Stimulierung der GST und damit verbundene erhöhte Entgiftung der Cancerogene könnte eine plausible Erklärung für einen Teil der in Tierversuchen beobachtete Schutzwirkungen durch die Terpene sein.

#### ***d*-Limonen und die Hemmung der Zellproliferation**

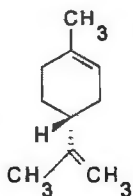
Ein zweiter Marker möglicher Schutzwirkungen ist die Modulation der Zellproliferation, die während der Krebsentstehung eine wichtige Rolle spielt. Zum einen werden die durch cancerogene Substanzen - induzierten promutagenen DNA-Veränderungen zu vererbaren Mutationen fixiert. Desweiteren ist die Rate der Zellproliferation entscheidend für die klonale Zellexpansion initiiert Zellen (d.h. solcher Zellen, die bereits die ersten genetischen Defekte einer Tumorzelle tragen). Dieser Weg spielt insbesondere bei transformierten Zellen eine Rolle, die eine Mutation im Tumor-Onkogen *K-ras* tragen. Durch diese Mutation wird das entsprechende *ras* Protein, nach seiner Einlagerung in die Zellmembran im permanent angeschalteten Zustand erhalten. Dieses 21-kd Protein gehört zu den GTP Proteinen, die zwischen der aktiven (GTP-Form) und inaktiven GDP-Formen im Gleichgewicht stehen. Sobald das Protein nach posttranslationaler Modifikation (Farnesylierung, Proteolyse, Methylveresterung) mit der Zellmembran assoziiert ist, sind im ruhenden Zellzustand > 90% des Proteins mit GDP verbunden (ausgeschaltet). Zellteilung wird nur durch GTP gebundenes Ras protein induziert. Die Katalyse GTP zur GDP Form wird durch das GAP (GTPase aktivierendes Protein) bewirkt. GEF (Guanin-Nucleotid-Exchange-Factor) ist für die Wiederherstellung der GTP-Form aus

der GDP-Form verantwortlich. Als Folge einer Stimulierung durch membran-gebundene Tyrosin-Kinasen und Nucleotid-Austausch-Faktoren wird der Aktivierungsschritt zum GTP-Ras stimuliert (20). Dadurch werden kontinuierlich die Signalfolgen zur Zellteilung an die entsprechenden DNA-Stellen weitergegeben. Eine starke Zellproliferation ist die Folge.

Die kontinuierliche Aufklärung dieser Zusammenhänge hat neue Wege aufgezeigt, um eine Hemmung der Ras-vermittelten Zellteilung zu hemmen. Diese Strategien beinhalten die Suche nach Substanzen, die mit verschiedenen Mechanismen eine Ras Desaktivierung bewirken sollten und die auf folgenden Prinzipien beruhen (20,21):

1. Hemmung der Farnesyltransferase und damit der Membran-Protein Assoziation
2. Beeinflussung des GTP-GDP Gleichgewichts durch
  - Hemmung des GEF
  - direkte Blockierung des GTP
  - GDP-Stabilisierung
  - GTPase Stimulierung
3. Stimulierung zytotoxischer T-Zellen, die Zellen mit mutiertem Ras erkennen

Der erste dieser Mechanismen ist für die Verbindungsklasse der Monoterpene (z.B. Limonen, S. Abbildung) intensiv untersucht worden. (Crowell et al. 1994).

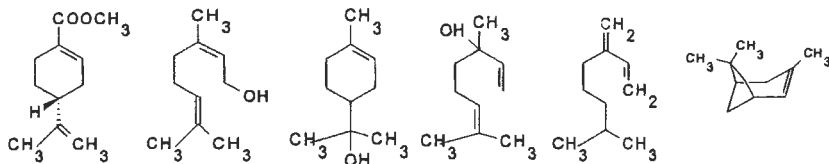


**Abbildung 4:** Strukturformel *d*-Limonen. Limonen ist das am weitesten verbreitete Monoterpen und für den "Zitronen"geruch der Citrusfrüchte verantwortlich. Die Konzentration in Citrusfrüchten beträgt zwischen 10 und 70 mg/l Frucht. In einheimischen Obstarten Sandorn, rote Johannesbeeren) liegen Konzentrationen zw. 5 und 100 µg/kg Frucht vor (Huber, 1995).

Diese Verbindungen können die Isoprenylierung von Proteinen mit 21-26 kDa hemmen. Der Schritt ist notwendig, damit das Ras- Protein an der Membran angelagert werden kann. Die Hemmung dieses Schrittes der Isoprenylierung (z B.



durch Hemmung der Farnesyltransferase) verhindert die Einlagerung des Ras-Proteins in die Membran, und somit letztendlich die Zellteilung. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigten, daß Peryllsäuremethylester der effektivere Hemmer war. Die mit OH-einfach substituierten Monoterpene waren wirksamer als die Diole und Triole. Crowell hat in ihrer Studie zur Strukturwirkungsbeziehung der Monoterpene die in Abbildung 5 dargestellte Reihenfolge der Hemmung beobachtet (22,23).



**Abbildung 5:** Hemmer der Protein-Isoprenylierung in der Reihenfolge ihrer relativen Wirksamkeit an Kulturzellen *in vitro* (22).  
(Peryllsäuremethylester > Geraniol >  $\alpha$ -Terpineol > (+)-Linalool >  $\beta$ -Myrcen >  $\alpha$ -Pinen.

*d*-Limonen war bei diesen Untersuchungen erst auf Rang Nr 20-21 wieder zu finden. Wahrscheinlich besitzen die für die Untersuchung verwendeten Zell-Linien (NIH3T3, HT29), nicht die metabolisierenden Enzyme um das *d*-Limonen in seinen aktiven Metaboliten Peryllsäuremethylester überzuführen. Die Wirkung für die übrigen Verbindungen ist aber so effektiv und spezifisch, daß mittlerweile Limonen bzw. entsprechende Metabolite für die ersten klinischen Voruntersuchungen zur Therapie von bereits vorhandenen Tumoren (Mamma- Carcinom, Pankreastumoren) erprobt werden. Die notwendigen therapeutischen Dosen übertreffen bei weitem die Mengen, die im Rahmen einer Ernährungsprophylaxe aufgenommen werden können. Dennoch sind die Schutzwirkungen in Anbetracht der bekannten gesundheitlichen Wirkungen von Obst von großer Bedeutung (12).

#### ***d*-Limonen und die Hemmung von Mamma-Carcinomen:**

Gestützt wird dieser Ansatz durch die vielen Tierversuchsbefunde und der schlechten Therapierbarkeit bestimmter Formen des Mammatumors. So liegen mittlerweile rund 10 Tierversuche vor, die auf eine inhibitorische Wirkung des Limonens hindeuten. Eine Untersuchung zur näheren Klärung der Mechanismen wurden durch

Gould et al (15) publiziert. Die Autoren überprüften die Hypothese, ob die durch mutiertem Ras ausgelösten Tumore besser durch Limonen gehemmt werden können als Tumore ohne mutiertem *ras* Onkogen. Hierfür haben sie 2 Tiermodelle verwendet. (A) Tiere mit Mammacarcinomen, die durch *v-Ha-ras* Gentransfer induziert wurden und (B) Tiere mit Nitrosomethylharnstoff (NMU) induzierten autochthonen Mammacarcinome, die zum großen Teil aktivierte *ras*-Onkogene (20-90%) enthalten sollten. Die Untersuchungen zeigten, daß 5% *d*-Limonen im Futter sowohl die durch *v-Ha-ras* Onkogenen als auch die durch NMU-induzierten Tumore verhindern (Abbildung 6).

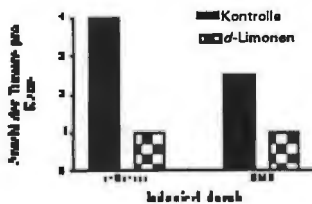


Abbildung 6: *d*-Limonen verursachte Hemmung von *vHa-ras* und NMU-induzierte Mammatumore

Nicht alle der NMU gehemmten Tumore tragen jedoch eine Mutation im *K-ras* Onkogen: 50% der Tumore in der Kontrolle und 50% der Tumore in der Limonen-gruppe (die der Therapie entgangen sind) tragen die *Ras* mutation. Dies bedeutet gleichfalls auch, daß nicht "*ras*" mutierte Tumore durch Limonen verhindert werden können (Abbildung 7).

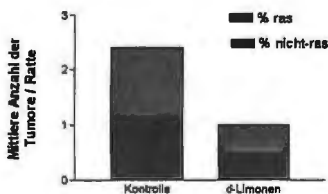
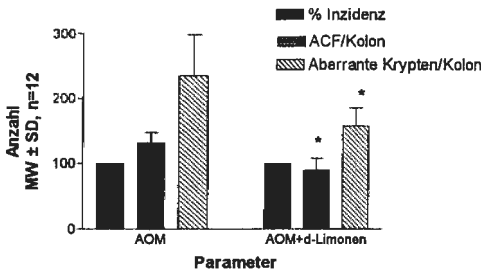


Abbildung 7: Anteil der *ras*-Mutation tragenden Tumore aus NMU behandelten Tieren.

### *d*-Limonen und die Hemmung von Dickdarntumoren

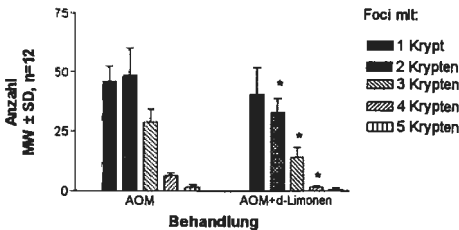
Maligne Dickdarntumoren entstehen in den Epithelzellen des Kolons und Rektums. Es sind häufige Krebsformen, die über 10-15 % aller Krebstodesfälle ausmachen. Die meisten Tumore treten im späten Lebensalter auf (>90% nach 55 Jahren). Früh

auftretende Adenome oder Polypen (die wahrscheinlich später zu einem großen Prozentsatz zu malignen Tumoren auswachsen würden) können im Rahmen von Früherkennungsmaßnahmen erkannt und chirurgisch entfernt werden (24). Der Entstehungsprozeß maligner Dickdarmtumoren ist ein sehr langsamer Vorgang und kann einen Zeitraum von 10-35 Jahren umspannen. Während dieser Zeit akkumulieren mehrere Mutationsereignisse in den betroffenen Zellen, insbesondere multifaktorielle Protoonkogen-Aktivierungen und die Desaktivierung von Tumorsuppressorgenen (25,26). *d*-Limonen kann zu einer Hemmung der durch Acetoxymethan (AOM) induzierten Dick Darmveränderungen in Ratten führen (27). Abbildung 8 zeigt, daß dieser Effekt in der verringerten Inzidenz der präneoplastischen Läsionen ("aberrante Krypten") zu beobachten ist..



**Abbildung 8:** *d*-Limonen verursachte Hemmung der Inzidenz von AOM-induzierten präneoplastischen Veränderungen im Dickdarm von Ratten (27)

Diese aberrante Krypten treten in Gruppen den sogenannten "aberrant-crypt-foci" (ACF) auf. Vermutlich sind ACF mit einer hohen Anzahl einzelner aberranten Krypten (>4-5), diejenigen, die sich mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Tumor entwickeln. *d*-Limonen führt insbesondere auch bei ACF mit 3-5 Krypten signifikant zu einer Reduktion der Inzidenz (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Reduktion des Anteils an fortgeschrittenen präneoplastischen Veränderungen im Dickdarm von Ratten durch *d*-Limonen (27).

### **Bewertung der Terpene in ihrer Rolle für die Krebsprävention:**

Aus diesen Darstellungen geht eindeutig hervor, daß die Verfütterung einzelner Terpene in Tierexperimenten zu einer verringerten Tumorzinzidenz geführt haben, und daß die beteiligten Mechanismen die Stimulierung der GST oder Hemmung der FST sein können. Die nächste Frage die sich stellt ist, mit welchem Potential können Terpene zu einer Minderung des Tumorrisikos beim Menschen führen. Gesicherte Erkenntnisse sind nur dafür vorhanden, daß Obst und Gemüse das Krebsrisiko vermindern. Die hierfür verantwortlichen Inhaltsstoffe sind vermutlich Ballaststoffe und Vitamine und möglicherweise auch sekundäre Pflanzenstoffe (SPS). Terpene sind derartige SPS, die z. T. protektive Wirkungen *in vitro* und im Tierversuch ausüben können. Die hierfür notwendigen Dosen übertreffen bei weitem die Mengen, die wir mit Obstverzehr zu uns nehmen können (e.g. 0.5-5% im Futter vs. ca. 0.007% Limonen in Zitrusfrüchten). Neben Terpenen sind noch eine Vielzahl andere SPS in Obst (z. B. Flavonoide in Zitrusfrüchten), die ebenfalls bioaktiv und protektiv sind und noch über andere Mechanismen eine Schutzwirkung entfalten könnten (10). In ihrer Zusammenwirkung spielen wahrscheinlich alle diese Inhaltsstoffe eine Rolle bei der Krebsprävention durch Obst und Gemüse. Der relative "Wirkungsanteil" der Monoterpene bei der Schutzwirkung durch Obst und Gemüse ist derzeit nicht abschätzbar.

### **Literatur**

1. Kneller RW, You W-C, Chang Y-S, Liu W-D, Zhang L, Zhao L, Xu GW, Fraumeni Jr. JF, Blot WJ: "Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions." *JNCI* **84**, 1261-1266, 1992.
2. Doll R, Peto R: "The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today." *JNCI* **66**, 1191-1308, 1981.
3. Doll R: "The lessons of life: Keynote address to the "Nutrition and Cancer Conference"." *Cancer Res* **52 Supplement**, 2024s-2029s, 1991.
4. Ames BN, Gold LS, Willet WC: "The causes and prevention of cancer." *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5258-5265, 1995.
5. Hill M: "Fruit and vegetable consumption and cancer risk." *ECP-News* **26**, 3-5, 1994.
6. Steinmetz KA, Potter JD: "Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology." *Cancer Causes and Control* **2**, 325-357, 1991.
7. Block G, Patterson B, Subar A: "Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence." *Nutr Canc* **18**, 1-29, 1993.
8. Negri E, La Vecchia C, Francheschi S, D'Avanzo B, Parazzini F: "Vegetable and fruit consumption and cancer risk." *Int J Cancer* **48**, 350-354, 1991.