



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

**XXXV. Vortragstagung**

**Funktionelle Inhaltsstoffe  
pflanzlicher Lebensmittel**

20. - 21. März 2000  
in Karlsruhe

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

ISBN 3-9805230-4-7

ISSN 1431-3596

**Wissenschaftliche Leitung:**

*Prof. Dr. D. Treutter*, Freising, Präsident

*Prof. Dr. H. Bergmann*, Jena

*Dr. J. Habben*, Hannover

*Prof. Dr. T. Nilsson*, Alnarp

*Prof. Dr. B. Tauscher*, Karlsruhe

*Dr. U. Tietz*, Potsdam

*PD. Dr. E. Wisker*, Kiel

Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung e.V.  
Geschäftsstelle c/o Fachgebiet Obstbau  
Technische Universität München  
85350 Freising-Weihenstephan

## Inhalt

Vorwort, <i>D. Treutter</i>	1
Antioxidants in dietary plants, <i>W. Bors</i>	3
Terpenoide - funktionelle Inhaltsstoffe, <i>K.-H. Wagner, I. Elmadfa</i>	17
Funktionelle Wirkungen unverdaulicher Kohlenhydrate, <i>E. Wisker</i>	29
Leinsamen: Lebensmittel mit funktionellen Eigenschaften, <i>W. Feldheim</i>	39
Glucosinolate in Brassicaceae und Möglichkeiten ihrer Beeinflussung, <i>I. Schonhof, A. Krumbein, S. Widell</i>	47
Einfluss von Bewässerung und N-Düngung auf Ertrag und Sulforaphangehalt von Brokkoli, <i>P.-J. Paschold, J. Kleber, S. T. Adam, A. Bognar, B. Tauscher</i>	57
Sommer- und Wintergersten mit veränderter Kohlenhydratzusammensetzung als Quelle für diätetische Lebensmittel, <i>W. Flamme, G. Jansen, G. Dongowski, E. Gebhardt, A. Jacobi</i>	67
In vitro antioxidative Aktivitäten von Früchten und Gemüsen in verschiedenen Testsystemen, <i>R. Edenharder, E. Gollner, M. Fickler</i>	79
Untersuchung rebsortenreiner Traubensäfte auf den Gehalt an Resveratrol-Derivaten, <i>M. Pour Nikfardjam, K. Schmitt, E.H. Rühl, C.-D. Patz, H. Dietrich</i>	91
Harmonisierung nationaler und internationaler lebensmittelrechtlicher Gesetze und Verordnungen, <i>B. Luckas</i>	101
Antioxidantien in pflanzlichen Lebensmitteln - am Beispiel Cystus-Teekraut, <i>G. Wichmann, U. Kasel</i>	107
Flavonoide im menschlichen Urin nach Genuss von Holundersaft, <i>M. Netzel, M. Herbst, G. Strass, V. Böhm, I. Bitsch, R. Bitsch</i>	111
Altersabhängige Variation der Catechinprofile in unfermentierten Teeblättern ( <i>Camellia sinensis</i> L.), <i>W. Feldheim, H. Schulz, S. Nimmannit, E. Wisker</i>	117
Phenolische Verbindungen in Apfelsaft, Apfelwein und Apfelessig, <i>C. Müller, D. Treutter</i>	121
Fruchtfleischverbräunungen bei Birnen durch Lagerstress und mögliche Abwehr durch funktionelle Inhaltsstoffe, <i>H. Xuan, J. Streif</i>	127
Antioxidative Kapazität und Stabilität bioaktiver Inhaltsstoffe in Fruchtsäften während einer 3-wöchigen Lagerung, <i>M. Netzel, M. Herbst, E. Carle, B. Kesenheimer, G. Strass, I. Bitsch, R. Bitsch</i>	133
Einfluss verschiedener Antioxidantien auf die Vergärung von Traubenmost und die Weinqualität, <i>O. Löhnertz, D. Rauhut, P.G. Shefford, M.Pour Nikfardjam, U. Loos</i>	139
Einfluss der Teigwarenherstellung auf farbgebende sekundäre Pflanzenstoffe von Durumweizen, <i>V. Hentschel, N. Kolb, K. Münzing, V. Böhm, I. Bitsch</i>	145
Mikrowellenbehandlung von Stärke, <i>Kyeong-Seok Oh, E. Pawelzik</i>	151
Kartoffelfruchtwasser als biotechnologisches Medium für die fermentative Gewinnung von Paramylon und sekundären Pflanzenstoffen aus Einzellern, <i>M. Felski, T. Betsche, E. Flaschel, M. Lotz</i>	157
Rheologische und NIR-spektroskopische Untersuchungen an Gerstenmehlen und -stärken, <i>G. Jansen, W. Flamme</i>	163
Neue HPLC und HPLC/MS Methoden zur Bestimmung von Tocopherolen in Pflanzen und Phytopharmaka, <i>W. M. Stöggel, C. W. Huck, M. Popp, H. Scherz, G. K. Bonn</i>	169
Quantitative Nah-Infrarot-Transflexions-Spektroskopie (NIRS) Untersuchungen am Rotwein, <i>W. Guggenbichler, G. Stecher, C. W. Huck, N. Basener, G. K. Bonn</i>	175
Vergleich und Bewertung verschiedener Detektionsmethoden für die HPLC-Bestimmung von Stilbenen und Flavonoiden in Rotwein, <i>G. Stecher, C. W. Huck, M. Popp, G. K. Bonn</i>	181

Neue HPLC und HPLC-MS Methode zur Bestimmung des Carotinoidgehaltes in ausgewählten Gemüse- und Obstarten, <i>C. W. Huck, M. Popp, H. Scherz, G. K. Bonn</i>	187
Gaschromatographische Analyse von Sulforaphan in Broccoli, <i>S. Adam, A. Bognar</i>	193
Possibility of determination forgery of roast ground coffee by analysis contents of mineral matter, <i>Z. Pavlovic, I. Miletic, M. Miric, I. Stankovic, S. Sobajic, Z. Lalic, B. Djordjevic</i>	197
Vergleich der <i>trans</i> -Resveratrolbildung in Blättern verschiedener Genotypen der Kartoffel ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) nach UV-Bestrahlung, <i>R. Mascher, B. Lippmann, C. Balko, H. Bergmann</i>	201
Verteilung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in Äpfeln der Sorte 'Braeburn', <i>M. Chennan, J. Streif</i>	207
Aminosäuren - funktionelle Inhaltsstoffe von Pflanzenprotein: Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung von weißen Bohnen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, <i>P. Stolz, J. Strube, M. Buchmann, C. Hiss</i>	213
Zur Qualität von Frühmöhren aus einem biologisch-dynamischen Züchtungsprojekt, <i>I. Hagel, D. Bauer, S. Haneklaus, E. Schnug</i>	217
Zur Qualität von Herbstmöhren aus einem biologisch-dynamischen Züchtungsprojekt, <i>I. Hagel, D. Bauer, S. Haneklaus, E. Schnug</i>	223
Die Fruchtqualität durch die Wahl der Unterlage beeinflussen? <i>G. Baab, U. Hornung, B. Lacher, K. Puderbach</i>	229
Charakterisierung von Allium-Bastarden auf Basis der Aromaprofile, <i>H. Schulz, H. Krüger, N. Herchert, E.R.J. Keller, M. Keusgen</i>	235
Das Möhrenblatt - seine Bedeutung als Lieferant von aromagebenden Inhaltsstoffen, <i>R. Habegger, W.H. Schnitzler</i>	241
Biological value of lipids of some sortes of nuts and hazelnuts from southern Serbia, <i>Z. Lalic, M. Miric, I. Miletic, S. Sobajic, B. Djordjevic, G. Vuckovic, J. Ajdic</i>	247
Effect of sewage- and metal sludge application in selected Australian soils on CD-uptake and growth of mangold, <i>M. Lämmerhirt, M. McLaughlin, H.-G. Schön</i>	250
Analytische Charakterisierung des Fermentationsprozesses von Rotbuschtee ( <i>Aspalathus linearis</i> ), <i>B. Steuer, W. Schütze, H. Schulz, E. Joubert</i>	256
Variabilität der Carotinoide, Chlorophylle und Vitamin C in Brokkoli in Abhängigkeit vom Brokkolityp, von der Kopfentwicklung und vom Anbauzeitraum, <i>A. Krumbain, I. Schonhof</i>	261
In vitro antioxidative Wirkung von Gemüse auf humanpathologisch relevante reaktive Sauerstoffspezies, <i>R.G. Schaller, S. Walter, W.H. Schnitzler</i>	267
Beeinflusst Hochdruckbehandlung die Funktionalität von Lebensmitteln? Beispiel: Glucose Retardation Index von Tomatenpüree, <i>A. Fernández García, P. Butz, B. Tauscher</i>	273
Free amino acid composition of primary and secondary inflorescences of broccoli ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i> ) cultivars and ist variation in growing seasons, <i>H. Gomes, E. Rosa, C. Sator, E. Schnug</i>	277
Standard Referenzmaterialien zur Bestimmung von Gesamt-Schwefel und Gesamt-Glucosinolaten, <i>E. Schnug, S. Haneklaus, H. Schimmel, T. Lisinger, N. Mabon, M. Marlier, J.-P. Wathelet, C. Sator</i>	283
Bestimmung leichter Elemente in vegetativem Pflanzenmaterial und des Gesamtglucosinolatgehaltes in <i>Brassica</i> Samen mittels Roentgenfluoreszenz-Analyse, <i>E. Schnug, S. Haneklaus, C. Sator</i>	287
<b>Autorenindex</b>	293
<b>Stichwortverzeichnis</b>	294

## Vorwort des Präsidenten

Erklärtes Ziel der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. ist es, an den wissenschaftlichen Jahrestagungen Arbeitsgruppen aus verschiedenen Disziplinen zusammenzubringen, um auf diese Weise aktuelle Themen umfassend zu bearbeiten. Die Thematik “Funktionelle Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel” hat Ernährungsphysiologen, Mediziner, Pharmakologen, Pflanzenbauer, Lebensmittelverarbeiter und Analytiker sowie Experten des Lebensmittelrechts nach Karlsruhe gelockt. Die unterschiedlichen Blickwinkel und Forschungsschwerpunkte spiegeln sich in den vorliegenden Beiträgen des Tagungsbandes wider.

Eine kritische Auseinandersetzung mit “funktionellen Inhaltsstoffen” muss die Analytik, die Resorption und Bioverfügbarkeit sowie die molekulare Wirkungsweise umfassen. Das neue Wissen um die Bedeutung der funktionellen Inhaltsstoffe muss rückwirken auf die Produktion pflanzlicher Lebensmittelrohstoffe. Umwelt, Anbautechnologie im Verein mit der genetischen Konstitution der Nutzpflanzen beeinflussen die “funktionelle Qualität” der pflanzlichen Nahrungsmittel. Damit stellen sich den Produzenten pflanzlicher Rohware und daraus abgeleiteter Produkte neue Herausforderungen. Ohne dass traditionelle Qualitätskriterien vernachlässigt werden dürfen, muss den pflanzlichen Sekundärstoffen als wertgebende Kriterien noch mehr Beachtung geschenkt werden.

Für die gelungene Ausrichtung der 35. Vortragstagung danke ich im Namen der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. sehr herzlich der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe, besonders Herrn Kollegen B. Tauscher.

Freising-Weihenstephan, im Mai 2000

Prof. Dr. habil. Dieter Treutter  
Präsident der DGQ





## Antioxidants in dietary plants

*Wolf Bors*

Institut für Strahlenbiologie,  
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, 85764 Neuherberg

*Abstract:* Antioxidant principles in plant food comprise both vitamins such as vitamin C, vitamin E, carotenoids and the multitude of phenolic secondary plant metabolites, e.g. phenolic acids, flavonoids, proanthocyanidins and other polyphenols. By definition, all antioxidants are capable of scavenging oxygen radicals and thus ameliorate oxidative stress conditions. Sources for these various antioxidants are practically all dietary plants such as cereals, vegetables and vegetable oils, fruits and berries, spices and beverages such as fruit juices, tea, chocolate or red wine. Both content and isomeric structures of the different antioxidants is specific for individual plant types.

*key words:* fruits, berries, vegetables, soybean, olive oil, palm oil, spices, tea, wine, cocoa; flavonoids, isoflavones, flavanols, polyphenols, phenolic acids, hydrolysable tannins, condensed tannins, proanthocyanidins, antioxidant vitamins, vitamin C, vitamin E, carotenoids,

*address:* Dr. Wolf Bors, Inst. Strahlenbiologie, GSF Forschungszentrum, 85764 Neuherberg  
*ph.* (+49-89) 3187-2508, *fax* (+49-89) 3187-3378; *e-mail:* bors@gsf.de

### Introduction

Plants, due to their inability of avoiding detrimental conditions by removing themselves from the source of the danger, have evolved a whole battery of protective measures. One of the unavoidable adverse condition is oxidative stress, against which numerous antioxidatively active components exist in plants. Animals and humans, in their diet, ingest these ingredients and thus partake in the plant antioxidant defense system. While the question of bioavailability in animals or humans has still not been conclusively solved for a number of these antioxidants, there is considerable progress in this area. We may thus expect that in the near future these results merge with those from epidemiological and animal studies, which thus far are the only ones which clearly point to a correlation of vegetable intake and improved health. Health benefits, however, are not limited to an antioxidant function of these substances as they may also exhibit anticarcinogenic activities [Ho et al., 1994; Huang et al., 1994; Surh, 1999] and may participate in signalling pathways [Pan et al., 2000; Polya et al., 1995]. With regard to the antioxidant function, two topics are of particular interest in this context: the Mediterranean diet and the French paradox. In the following, the various plant sources will be listed which are known to contain particularly high amounts of antioxidants - after first defining those antioxidants.

### Dietary relevant plant antioxidants

If we distinguish between low-molecular weight and high-molecular weight antioxidants, then the latter group contains mainly enzymes such as catalase, superoxide dismutase, the enzymes of the glutathione redox cycle (glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, NAD(P)H reductase) which are not confined to plant material. Thus nutritionally available plant antioxidants are by definition low-molecular weight substances. They are listed, according to their chemical structures and major functions, in Table 1.

Table 1 - Classification of low-molecular weight plant antioxidants

type	comments (see text for further details)
<b>monophenols</b>	
tocols	$\alpha$ - to $\delta$ -tocopherols $\alpha$ - to $\delta$ -tocotrienols with unsaturated phytyl side chain
phenolic acids	e.g. vanillic, ferulic acids
eugenol	antioxidant principle of clove
resveratrol	stilbene with 3 isolated hydroxy groups, in grape seeds
capsaicin	antioxidant principle of pepper, structural relationship with gingerol and curcumin
gingerol	antioxidant principle of ginger
curcumin	antioxidant principle of turmeric, two isolated hydroxy groups
isoflavones	genistein, daizein with isolated hydroxy groups
<b>diphenols &amp; triphenols</b>	
phenolic acids	e.g. caffeic, gallic acids
carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid, rosmanol	active ingredients of rosemary, sage
hydroxytyrosol, oleuropein	major catechol components of olive oil
aspalathin	catechol from rooibos tea with sweetening properties
<b>polyphenols</b>	
flavonoids	subgroups flavanones, flavones, flavonols, anthocyanidins
flavan-3-ols	derivatives of (+)-catechin, (-)-epicatechin proanthocyanidin monomers (ECG, EGC, EGCG)
condensed tannins	proanthocyanidin oligomers
hydrolyzable tannins	glucose gallate esters; ellagitannins
<b>Miscellaneous compounds</b>	
ascorbic acid (vitamin C)	strong reductant
carotenoids	carotenes (provitamin A) xanthophylls (oxygen-containing), e.g. lycopene
allyl sulfides	active principles in garlic, antioxidant function doubtful

As seen in the table, a distinction is made between monophenols and di-/triphenols, even though some 'monophenols' contain more than one hydroxy group in the molecule. The fact is, that phenoxyl radicals (derived from monophenols) and semiquinones (derived from catechols or from hydroquinones) behave kinetically and chemically quite differently. This is best exemplified for the grape seed product *trans*-resveratrol, a multi-functional stilbene with 3,5,4'-trihydroxy substitution [Fremont, 2000]. It is listed in the table as a monophenol because its antioxidant properties [Belguendouz et al., 1997] has been questioned [Turrens et al., 1997] and it could be clearly shown, that stilbene derivatives with *o*-dihydroxy structures (catechols) possess a much higher activity [Wang et al., 1999]. The best-known monophenols are the tocols, which comprise both the tocopherols ( $\alpha$  to  $\delta$ ), of which only  $\alpha$ -tocopherol has vitamin E activity, and the tocotrienols with unsaturated phytyl side chains and the same aromatic substitution pattern as the tocopherols [Papad, 1999a; Sheppard & Pennington, 1993]. Flavonoids generally exist in plants as multiple variations of O- and C-glycosides [Harborne,

1988] - with the aglycones the active components - whereas flavanols, i.e. derivatives of (+)-catechin and (-)-epicatechin, preferentially form 3-O-gallate esters. The most active flavonoid antioxidants all contain at least a catechol structure in the B ring, a 2,3-double bond and a 3-hydroxy-4-oxo structure [Bors et al., 1990,1992a]. The distinction between condensed and hydrolysable tannins lies in the fact that the proanthocyanidins form oligomers via carbon-carbon bonds [Ferreira et al., 1999] in contrast to the genuine ester bond of the glucose gallates. The latter are also called ellagitannins, since the condensation product of two gallate moieties, hexahydroxydiphenic acid, is a precursor of the common degradation product ellagic acid [Quideau & Feldman, 1996].

The large majority of the compounds listed in Table I contain at least one aromatic hydroxy group. It is this functional group which governs the most important antioxidant function, i.e. the radical-scavenging potential. In fact, whenever talking about oxidative stress, we have to assume the presence and/or participation of oxygen radicals - or oxygen-containing molecules generally termed reactive oxygen species (ROS) - during reactions, such as lipid peroxidation, metal-catalyzed univalent oxidation, enzymatically-catalyzed redox cycling, etc. [Balzan & Bannister, 1997; Scandalios, 1997; Sies, 1991]. As radical reactions are generally prone to chain propagation processes (aside from initiation and termination reactions), it is understandable that such radical scavengers are also termed chain-breaking antioxidants [Rice-Evans, 1995]. Flavonoids, especially, have from early on been studied with regard to their food-protective potential respectively extension of the shelf-life of oxidation-prone food such as lard or vegetable oils [Adegoke et al., 1998] - in fact, the so-called rancidity test evaluates this function [Liang & Schwarzer, 1998; St. Angelo, 1996]. While flavonoids have a variety of other functions [Bors, 1997; Middleton & Kandaswami, 1994] and remain the most thoroughly investigated plant polyphenolic antioxidants [Bors et al., 1996; Hollman & Katan, 1999; Kandaswami & Middleton, 1997], more recently other polyphenols are favored as the dominant food antioxidants [Ursini et al., 1999; Waterhouse & Walzem, 1997] - even with respect to beneficial effect as forage for range animals (cattle, sheep) [Aerts et al., 1999]. Part of the reason is the probability of the flavonoids to act as pro-oxidative or even cytotoxic agent due to the futile redox cycling of the elusive flavonoid quinones [Metodiewa et al., 1999; Miura et al., 1998]. In contrast, the quinones of the polyphenolic tannins are more likely to undergo phenolic coupling reactions with the retention of the number of reactive hydroxy groups during the oligomerisation process [Ferreira et al., 1999; Quideau et al., 1995] - and potentially even an enhanced antioxidant capacity [Bors & Michel, 1999; Bors et al., 2000].

Non-phenolic antioxidants are first of all ascorbate, which functions mainly as a reductant (e.g. in the synergistic interaction with the  $\alpha$ -tocopheroxyl radical [Packer et al., 1979] as well as with flavonoid aroxy radicals [Bors et al., 1995]). The major differences among carotenoids are the presence or absence of oxygen in the molecules (carotenes vs. xanthophylls) and the capability of forming vitamin A (retinol); e.g. the most common  $\beta$ -carotene is a provitamin A in contrast to lycopene which is not a precursor [Nikoleit, 1997]. The antioxidant (radical-scavenging) function of carotenoids is limited to low oxygen tensions [Burton & Ingold, 1984] or the reactive oxygen species singlet oxygen [di Mascio et al., 1992; Oliveros et al., 1992] - yet some are capable of scavenging other types of radicals [Mortensen et al., 1997]. Carotenoids and other antioxidant vitamins have been extensively reviewed [Sies & Krinsky, 1995], yet the *in vivo* antioxidant capacity of carotenoids and especially  $\beta$ -carotene is still rather controversial [Rice-Evans et al., 1997; Rock, 1997]. The same is the case for the active principles in garlic, the allyl sulfides alliin and allicin [Kim et al., 1997]. Garlic does ameliorate oxidative stress under *in vivo* conditions [Grune et al.,

1996], but this could be due to unknown degradation products in aged garlic [Ide & Laue, 1999; Munday et al., 1999], interaction with thiol compounds [Rabinkov et al., 1998] or the ease of membrane permeability of allicin [Miron et al., 2000].

For almost all of the phenolic compounds the reaction rate constants with at least one type of oxygen radical is known, be they hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxide anions ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroxy radicals ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) or alkoxy radicals ( $\text{RO}^{\cdot}$ ) [Bors et al., 1992a, 1994; Erben-Russ et al., 1987; Jiang et al., 1998; Jovanovic et al., 1995; Wang et al., 1996]. Of equal importance for the antioxidative potential of these compounds is the stability of the antioxidant radical after hydrogen or electron donation to the primary radical, as otherwise they would merely propagate chain reactions themselves. Such parameters have been obtained for a number of compounds by pulse radiolysis [Bors et al., 1992a, 1997]. This method also allows to determine the rate constants for the synergistic interactions of the phenoxyl (aroxyl and/or semiquinone) radicals with reductants such as ascorbate [Bors et al., 1995] or dihydrolipoate [Bors & Michel, 1997], which on the one hand places the individual compounds within the antioxidant network [Harakami et al., 1998] or the antioxidant 'pecking order' [Buetner, 1993]. On the other hand, quantification of this interaction may result in univalent redox potentials of the phenolic antioxidants [Bors et al., 1995; Jovanovic et al., 1995, 1997b; Steenken & Neta, 1982]. With pulse radiolysis methods uniquely suited to provide absolute reaction rate constants, other methods of determining the antioxidant potential of plant compounds are limited to relative rates [Bors et al., 1992b, 1999].

#### **Sources of dietary antioxidants**

It is only rarely possible to pinpoint a certain plant as the exclusive source of one type of antioxidant. Rather, there exist a broad distribution, which has been best summarized for phenolic acids [Clifford, 1999]. A comprehensive list also exists of 92 phenolic extracts from mostly dietary plants with regard to their antioxidative potential [Kähkönen et al., 1999]. Doubts have been expressed, however, concerning the reliability of such data. For example with carotenoids, food composition lists are considerably error-prone with gross over- and underestimates between individual studies [Granado et al., 1997]. Nevertheless, the correlation between antioxidant protection and a healthy diet is now broadly accepted [Frankel, 1999; Papas, 1999b; Weisburger, 1999]. In the context of dietary intake of plant antioxidants, one has to further distinguish between regular diet, a health-orientated diet (e.g. Mediterranean), intake of fortified or even functional food [Papas, 1999b; Weisburger, 1999].

**Cereals:** As shown in Table 2a, phenolic acids as well as tocopherols occur quite profusely in most cereals, such as barley (*Hordeum vulgare*), oat (*Avena sativa*), wheat (*Triticum aestivum*), rye (*Secale cereale*), sorghum (*Sorghum bicolor*), corn (*Zea mays*) or rice (*Oryza sativa*) - in contrast to less common flavonoids or carotenoids [White & Xing, 1997].

**Vegetables:** The most common carotenoid  $\beta$ -carotene, whose major use is actually as a food colorant [Ong & Choo, 1997], is present in practically all dietary plants in various amounts with the highest yield, together with  $\alpha$ -carotene, from carrots (*Daucus carota*) [Castenmiller & West, 1998; Nikoleit, 1997]. Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) are obviously the best source of lycopene [Paetau et al., 1998]. Owing to the lipophilicity of the carotenoids, it is not surprising that lycopene is more readily available from processed rather than from fresh tomatoes [Gärtner et al., 1997]. Despite the fact that potatoes (*Solanum tuberosum*) belong to the same family as tomatoes of Solanaceae, the tubers growing underground contain mostly anthocyanidin glycosides esterified with phenolic acids [Lewis et al., 1998] - also with antioxidant activity [Friedman, 1997]. Dark-green vegetables such as kale (*Brassica oleracea acephala*), spinach (*Spinacea oleracea*) or

parsley (*Petroselinum crispum*) contain the highest amounts of the carotenoids lutein and zeaxanthin [Nikoleit, 1997]. Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), contains a number of antioxidant phenolic acids and flavonoids [Plumb et al., 1997] in addition to  $\beta$ -carotene and lutein. Soybeans (*Glycine max*) contain the highest amount of isoflavones among vegetables [Wiseman, 1999], which can act as phytoestrogens but have also strong antioxidant potential in such fermented soy products as Tempeh [Esaki et al., 1999; Kasaoka et al., 1997]. Onions (*Allium cepa*) contain high amounts of the flavonoid quercetin, whose antioxidant potential has been traditionally employed in the preparation of lard to delay its rancidity [Adegoke et al., 1998; Liang & Schwarzer, 1998].

**Table 2a - Antioxidants in dietary plants: staple food**

Plant type	Plant	Antioxidant type*
Cereals	barley ( <i>Hordeum vulgare</i> )	various phenolic acids; tocopherols (all 8)
	oat ( <i>Avena sativa</i> )	phenolic acids and esters; tocopherols
	wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	various phenolic acids; $\alpha$ -, $\beta$ -tocopherols, flavonoids
	rye ( <i>Secale cereale</i> )	phenolic acids (mostly ferulic acid); $\alpha$ -, $\beta$ -tocopherols
	sorghum ( <i>Sorghum bicolor</i> )	phenolic acids; $\gamma$ -tocopherol; flavonoids
	corn ( <i>Zea mays</i> )	phenolic acids; tocopherols (mostly $\alpha$ -, $\gamma$ -tocopherol); carotenoids
Vegetables	rice ( <i>Oryza sativa</i> )	ferulic acid esters; $\alpha$ -, $\gamma$ -tocopherol, $\gamma$ -tocotrienol
	carrot ( <i>Daucus carota</i> )	carotenoids
	tomato ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	lycopene, flavonoids
	potato ( <i>Solanum tuberosum</i> )	anthocyanidin/phenolic acid glycosides
	kale ( <i>Brassica oleracea acephala</i> )	lutein, zeaxanthin
	broccoli ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> )	$\beta$ -carotene, lutein; phenolic acids, flavonoids
	spinach ( <i>Spinacea oleracea</i> )	lutein, zeaxanthin
	parsley ( <i>Petroselinum crispum</i> )	lutein, zeaxanthin
	soybean ( <i>Glycine max</i> )	isoflavones; phenolic acids
	onion ( <i>Allium cepa</i> )	quercetin & other flavonoids
	garlic ( <i>Allium sativum</i> )	allyl sulfides (alliin, allicin)

**Vegetable oils and oil seeds:** Only extra-virgin olive oil from olive seeds (*Olea europaea*) contains a high amount of phenolic acids as they are destroyed during refining [Nergiz & Ünal, 1991; Clifford, 1999]. A catecholic component of olive oil, hydroxytyrosol, has also been shown to possess antioxidant potential [Saija et al., 1998; Visioli et al., 1998]. It is actually a hydrolysis product of the complex glycosidic lactone oleuropein, which is the most common phenol in olives [De Stefano et al., 1999]. Palm oil from oil palms (*Elaeis guineensis*) is the best commercial source of carotenoids [Ong & Choo, 1997] and of tocotrienols [Kamat et al., 1997]. Tocopherols and tocotrienols as lipid-soluble antioxidants are most highly concentrated in vegetable oils and oil-rich fats and plants [Eitenmiller, 1997; Sheppard & Pennington, 1993]. Peanuts (*Arachis hypogaea*) contain mostly  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols, with very small amounts of  $\beta$ - and  $\delta$ -tocopherols and no tocotrienols [White & King, 1997]. It is obvious that the content of the various antioxidants in these oxidation-sensitive lipids also governs their stability [Shukla et al., 1997].

**Fruits and berries:** Due to their mostly intense color, fruits and berries (and the respective juices) are major sources of anthocyanidins. As constituents of the flavonoid family, they exist *in vivo* mainly as complexes with flavonols and flavanols due to their instability in water [Francia-Aricha et al., 1997] (they easily form colorless leuco adducts with water [Kühnau, 1976]), but have nevertheless been shown to have antioxidant potential [Gabrielska et al., 1999; Lapidot et al., 1999]. Citrus plants obviously are a good source of vitamin C, yet they also contain relatively high amounts of flavonoids [Carroll et al.,

1997]. Fruit juices in general retain the antioxidant components of the respective plant sources [Gardner et al., 2000].

**Table 2b - Antioxidants in dietary plants: food additives and beverages**

Plant type	Plant	Antioxidant type*
vegetable oils & oil seeds	olive ( <i>Olea europaea</i> )	phenolic acids; catechols (hydroxytyrosol, oleuropein)
	oil palm ( <i>Elaeis guineensis</i> )	tocopherols, tocotrienols, carotenoids
fruits, berries	peanuts ( <i>Arachis hypogaea</i> )	$\alpha$ -, $\gamma$ -tocopherols
	Ribes sp.	Anthocyanidins
Spices	Citrus sp.	ascorbic acid; flavonoids
	turmeric ( <i>Curcuma longa</i> )	curcuminoids
	ginger ( <i>Zingiber officinale</i> )	gingerol and derivatives
	pepper ( <i>Capiscum annum</i> )	capsaicin
	sage ( <i>Salvia officinale</i> )	carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid
	rosemary ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid
	thyme ( <i>Thymus vulgaris</i> )	carvarcrol, thymol; flavonoid glycosides
	oregano ( <i>Origanum vulgare</i> )	tocopherols
	clove ( <i>Eugenia aromatica</i> )	eugenol
	basil ( <i>Ocimum basilicum</i> )	anthocyanidins
	mustard ( <i>Brassica nigra</i> )	sinapic acid methyl ester
	sesame ( <i>Sesamum indicum</i> )	sesamin, sesaminol, sesaminol (lignans)
	fenugreek ( <i>Trigonella foenum-graecum</i> )	no active principle in seeds identified
Beverages	tea ( <i>Camillia sinensis</i> )	proanthocyanidins
	rooibos tea ( <i>Aspalathus linearis</i> )	phenolic acids: flavonoids & flavonoid glycosides (e.g. vitexin); aspalathin
	red wine ( <i>Vitis vinifera</i> )	proanthocyanidins, anthocyanidins, tannins; resveratrol
	cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> )	proanthocyanidins

**Spices:** The use of spices in their native tropical countries and after introduction to the European diet during the medieval ages was mainly due to their food-protective, i.e. antioxidant capacity [Madsen & Bertelsen, 1995; Plumb et al., 1996; Risch & Ho, 1997]. Best known among antioxidant spice ingredients is curcumin from turmeric (*Curcuma longa*) [Cohly et al., 1998], a major component of curry - which itself is a mixture of up to 24 spices. Its antioxidant mechanism has recently been elucidated by pulse-radiolytic methods to be primarily hydrogen transfer [Jovanovic et al., 1999]. The closely related ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) contains monophenolic gingerol compounds, which are also chemically related to curcuminoids [Nakatani, 1997]. Capsaicin, the active principle of pepper (*Capiscum annum*) has likewise been shown to have antioxidant potential [Joe & Lokesh, 1994]. Within the Lamiales family sage (*Salvia officinalis*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) have basically the same diphenolic compounds such as carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid, etc. [Cuvelier et al., 1994; Offord et al., 1997]. Quite distinct antioxidant patterns exhibit non-polar extracts of thyme (*Thymus vulgaris*), which contain simple mono- and diphenols with aliphatic substituents [Schwarz et al., 1996] and flavonoid glycosides [Wang et al., 1998], while oregano (*Origanum sp.*) has mostly tocopherols [Lagouri & Boskou, 1996]. Other spices known for their antioxidant ingredients are clove (*Eugenia aromatica*) with its active ingredient eugenol [Nagababu & Lakshmaiah, 1996], basil, containing mostly anthocyanidins (*Ocimum basilicum*) [Phippen & Simon, 1998], mustard with sinapic acid methyl ester as active principle (*Brassica nigra*) [Chung et al., 1997], and fenugreek seeds, whose active compound is not yet known [Ravikumar & Anuradha, 1999]. The antioxidant activity of mustard was part of a study, where 51 different spices were evaluated for their antioxidant potential [Chung et al., 1997]. Sesame (*Sesamum*

*indicum*) presents an interesting example of antioxidants which are only indirectly active. The seeds contain several lignans, compounds with methylene-dioxo bridges such as sesamin, sesamol, sesaminol aside from glycosylated pinoselinols with *o*-methoxy phenol structures and strong antioxidant activity [Shukla et al., 1997]. Sesamin, however, becomes a potent antioxidant only when a methylene-dioxo bridge is hydrolysed to form a catechol moiety [Akimoto et al., 1996].

**Tea:** The ingredients of predominantly green tea have long been studied with regard to their anticarcinogenic properties [Han, 1997; Tijburg et al., 1997]. More recently their polyphenolic components, i.e. the proanthocyanidin monomers and oligomers derived from (-)-epicatechin, became a focus of antioxidant research [Bors & Michel, 1999; Bors et al., 2000; Jovanovic et al., 1997a; Plumb et al., 1998]. Green tea contains most of these polyphenols, whereas in fermented (oxidized) black tea mostly higher polymers with diminished antioxidant activity remain [Hasimoto et al., 1992]. Moderately fermented tea such as Oolong is a source of oligomers, the so-called theasinensins [Harbowy & Balentine, 1997; Hashimoto et al., 1988], which are evidently formed by radical reactions [Yoshino et al., 1999].

Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) from the Fabaceae family is a favorite beverage in South Africa. As shown by Rabe et al. (1994), it contains numerous phenolic compounds which all express antioxidant activity. Even aspalathin, exclusive to this plant, and known for its non-nutritive sweetening capacity, can be considered an antioxidant due to its catechol moiety [von Gadow et al., 1997; Hitomi et al., 1999]. Yet according to the latter study, flavonoids are the most dominant phenolic compounds present.

**Wine:** Health-beneficial effect of wine consumption have been the topic of several conferences and at least one book [Watkins, 1997]. The polyphenol (proanthocyanidins and tannins) content of grapes and especially red wine with their known strong antioxidant potential is one of the favored explanations for the so-called French paradox, the fact that the French eat as much fat as other Europeans but develop much less cardiovascular problems [Renaud & de Lorgeril, 1992]. While epidemiological [Hertog, 1996; Hollman & Katan, 1997; Samman et al., 1997] and animal studies [Koga et al., 1999; Wakabayashi, 1999] generally support this notion, other antioxidant principles have also been invoked [Day & Stansbie, 1995; Parodi, 1997; Stanley & Mazier, 1999]. Red wine contains a far higher amount of the polyphenols than white wine [Kanner et al., 1994; Sanchez-Moreno et al., 1999], which points to the predominant presence of these substances in the seed (skin and stems) of grapes [Cheynier et al., 1992; Freitas et al., 1998], extracted during the maceration period [Castellari et al., 1998]. The 'French' part of the paradox, as opposed to an Italian or Spanish contribution, is probably due to the fact that here the aging in barriques with an additional extraction of tannins [Matricardi & Waterhouse, 1999; Puech et al., 1999] has been performed for the longest period.

**Cocoa** (*Theobroma cacao*): This is another source of proanthocyanidins, yet with a different substitution pattern than those in green tea or grapes [Adamson et al., 1999; Lazarus et al., 1999]. Due to their polyphenolic structure they are likewise good antioxidants [Adamson et al., 1999; Arteel & Sies, 1999].

With the recent advances in gene engineering it is understandable that attempts to enhance the content of antioxidants in dietary plants is not limited to food processing [Chen et al., 1999; Manzocco et al., 1998] but also to gene amplification [Farnham et al., 1999]. The best example are tomatoes where both the content of carotenoids and of flavonoids has been genetically enhanced [DellaPenna, 1999; Hirschberg, 1999]. The backlash owing to the non-

acceptance of such manipulated plants by consumers has thus far been confined to Europe but is actually spreading. According to the recent reports in C&EN 'functional food' or 'nutriceuticals', in consequence, are at present red-flagged terms [Heylin, 1999; Thayer, 1999]. The recent signing of the Cartagena Biosafety Protocol in Montreal [Hileman, 2000] did in fact take into account these uncertainties.

### Acknowledgements

I appreciate the stimulating discussions with the colleagues Christa Michel, Manfred Saran and Kurt Stettmaier during the preparation of the manuscript.

### References

- Adamson, GE, Lazarus, SA, Mitchell, AE, Prior, RL, Cao, GH, Jacobs, PH, Kremers, BG, Hammerstone, JF, Rucker, RB, Ritter, KA and Schmitz, HH (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4184-4188
- Adegoke, GO, Kumar, MV, Krishna, AGG, Varadaraj, MC, Sambaiah, K and Lokesh, BR (1998) Antioxidants and lipid oxidation in foods - A critical appraisal. *J. Food Sci. Technol.* 35, 283-298
- Aerts, RJ, Barry, TN and McNabb, WC (1999) Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 75, 1-12
- Akimoto, K, Asami, S, Tanaka, T, Shimizu, S, Sugano, M and Yamada, H (1996) Antioxidant activity of sesamin on NADPH-dependent lipid peroxidation in liver microsomes. in: *Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention* (Kumpulainen, JT, Salonen, JT, eds., Royal Chem. Soc., Cambridge, UK), 241-246
- Arteel, GE and Sies, H (1999) Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS-Lett.* 462, 167-170
- Balzan, R and Bannister, WH (1997) Oxidative stress: a potential hazard for living organisms. *Life Chem. Rep.* 15, 3-14
- Belguendouz, L, Fremont, L and Linard, A (1997) Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1347-1355
- Bors, W (1997) Flavonoid functions in vivo: are they predominantly antioxidants?. in: *Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases* (Montagnier, L, Olivier, R, Pasquier, C, eds., Marcel Dekker, New York), 285-304
- Bors, W and Michel, C (1997) Lipoate redox function in chemical systems. in: *Lipoic Acid in Health and Disease* (Fuchs, J, Packer, L, Zimmer, G, eds., Marcel Dekker, New York), 33-46
- Bors, W and Michel, C (1999) Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: Pulse radiolysis studies. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 1413-1426
- Bors, W, Heller, W, Michel, C and Saran, M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Meth. Enzymol.* 186, 343-354
- Bors, W, Heller, W, Michel, C and Saran, M (1992a) Structural principles of flavonoid antioxidants. in: *Free Radicals and the Liver* (Csomos, G, Feher, J, eds., Springer, Berlin), 77-95
- Bors, W, Saran, M and Elstner, EF (1992b) Screening for plant antioxidants. in: *Plant Toxin Analysis - (Linskens, HF, Jackson, JF, eds., Springer, Berlin), Modern Methods in Plant Analysis.* 13, 277-295
- Bors, W, Michel, C and Saran, M (1994) Flavonoid antioxidants: Rate constants for reactions with oxygen radicals. *Meth. Enzymol.* 234, 420-429
- Bors, W, Michel, C and Schikora, S (1995) Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 45-52
- Bors, W, Heller, W, Michel, C and Stettmaier, K (1996) Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology. in: *Handbook of Antioxidants* (Cadenas, E, Packer, L, eds., Marcel Dekker, New York), 409-466
- Bors, W, Heller, W and Michel, C (1997) The chemistry of flavonoids. in: *Flavonoids in Health and*

- Disease (Rice-Evans, C, Packer, L, eds., Marcel Dekker, New York), 111-136
- Bors, W, Michel, C, Saran, M and Stettmaier, K (1999) Determination of antioxidant activities: relative vs. absolute methods. in: Different Pathways through Life. Biochemical pathways of plant biology and medicine (Denke, A, Dornisch, K, Fleischmann, F, Graßmann, J, Heiser, I, Hippeli, S, Obwald, W, Schempp, H, eds., LINCUM Europe, Munich, Germany), 9-34
- Bors, W, Michel, C and Stettmaier, K (2000) Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. Arch. Biochem. Biophys. 374, 347-355
- Buettner, GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. 300, 535-543
- Burton, GW and Ingold, KU (1984) Beta-carotene: An unusual type of lipid antioxidant. Science 224, 569-573
- Carroll, KK, Guthrie, N, So, FV and Chambers, AF (1997) Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids. In: Flavonoids in Health and Disease (Rice-Evans, C, Packer, L, eds., Marcel Dekker, New York), 437-446
- Castellari, M, Arfelli, G, Riponi, C and Amati, A (1998) Evolution of phenolic compounds in red winemaking as affected by must oxygenation. Am. J. Enol. Viticult. 49, 91-94
- Castenmiller, JJM and West, CE (1998) Bioavailability and bioconversion of carotenoids. Annu. Rev. Nutr. 18, 19-38
- Chen, Y, Zhu, NQ, Lo, CY, Wang, MF and Ho, CT (1999) Process-induced health-promoting substances in foods. Food Rev. Int. 15, 473-501
- Cheyrier, V, Rigaud, J and Ricardo da Silva, JM (1992) Structure of procyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties. in: Plant Polyphenols (Hemingway, RW, Laks, PE, eds., Plenum Press, New York), 59, 281-294
- Chung, SK, Osawa, T and Kawakishi, S (1997) Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 118-123
- Clifford, MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric. 79, 362-372
- Cohly, HHP, Taylor, A, Angel, MF and Salahudeen, AK (1998) Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. Free Rad. Biol. Med. 24, 49-54
- Craig, WJ (1999) Health-promoting properties of common herbs. Am. J. Clin. Nutr. 70 (Suppl. S), 491S-499S
- Cuvelier, ME, Berset, C and Richard, H (1994) Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). J. Agric. Food Chem. 42, 665-669
- Day, A and Stansbie, D (1995) Cardioprotective effect of red wine may be mediated by urate. Clin. Chem. 41, 1319-1320
- DellaPenna, D (1999) Nutritional genomics: Manipulating plant micronutrients to improve human health. Science 285, 375-379
- DeStefano, G, Piacquadio, P, Servili, M, DiGiovacchino, L and Sciancalepore, V (1999) Effect of extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils. Fett Lipid. 101, 328-332
- Eitenmiller, RR (1997) Vitamin E content of fats and oils - Nutritional implications. Food Technol. 51, 78-81
- Erben-Russ, M, Bors, W and Saran, M (1987) Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. Int. J. Radiat. Biol. 52, 393-412
- Esaki, H, Watanabe, R, Onozaki, H, Kawakishi, S and Osawa, T (1999) Formation mechanism for potent antioxidative *o*-dihydroxyisoflavones in soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 851-858
- Farnham, MW, Simon, PW and Stommel, JR (1999) Improved phytonutrient content through plant genetic improvement. Nutr. Rev. 57, S19-S26
- Ferreira, D, Brandt, EV, Coetzee, J and Malan, E (1999) Condensed tannins. Progr. Chem. Organ. Natural Prod. 77, 21-67
- Francia-Aricha, EM, Guerra, MT, Rivas-Gonzalo, JC and Santos-Buelga, C (1997) New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. J. Agric. Food Chem. 45, 2262-2266
- Frankel, EN (1999) Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. Fett

- Lipid 101, 450-455
- de Freitas, VAP, Glories, Y, Bourgeois, G and Vitry, C (1998) Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry* 49, 1435-1441
- Fremont, L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66, 663-673
- Friedman, M (1997) Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1523-1540
- Gabrielska, J, Oszmianski, J, Komorowska, M and Langner, M (1999) Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effect. *Z. Naturforsch. C* 54c, 319-324
- von Gadow, A, Joubert, E and Hansmann, CF (1997) Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem.* 60, 73-77
- Gardner, PT, White, TAC, McPhail, DB and Duthie, GG (2000) The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* 68, 471-474
- Gärtner, C, Stahl, W and Sies, H (1997) Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 116-122
- Granado, F, Olmedilla, B, Blanco, I, Gil-Martinez, E and Rojas-Hidalgo, E (1997) Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: A user's point of view. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, 621-633
- Grune, T, Scherat, T, Behrend, H, Conradi, E, Brenke, R and Siems, W (1996) Influence of *Allium sativum* on oxidative stress status - A clinical investigation. *Phytomedicine* 2, 205-207
- Han, C (1997) Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols. *Cancer Lett* 114, 153-58
- Haramaki, N, Stewart, DB, Aggarwal, S, Ikeda, H, Reznick, AZ and Packer, L (1998) Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. *Free Rad. Biol. Med.* 25, 329-339
- Harborne, JB, ed. (1988) *The Flavonoids. Advances in Research since 1980* (Chapman & Hall, London)
- Harbowy, ME and Balentine, DA (1997) Tea chemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 415-480
- Hashimoto, F, Nonaka, GI and Nishioka, I (1988) Tannins and related compounds. LXIX. Isolation and structure elucidation of B,B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from Oolong tea. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1676-1684
- Hashimoto, F, Nonaka, GI and Nishioka, I (1992) Tannins and related compounds. CXIV. Structures of novel fermentation products, theagallinin, theaflavonin and desgalloyl theaflavonin from black tea, and changes of tea leaf polyphenols during fermentation. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1383-1389
- Hertog, MGL (1996) Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 385-397
- Heylin, M (1999) Ag biotech's promise clouded by consumer fear. *Chem. Engin. News* 77 (49), 73-82
- Hileman, B (2000) At last: a biosafety pact. *Chem. Engin. News* 78 (7), 65-74
- Hirschberg, J (1999) Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 186-191
- Hitomi, E, Tamura, S, Tsurumoto, Y, Tsuda, T and Nakano, M (1999) Antioxidative activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 46, 779-785
- Ho, CT, Osawa, T, Huang, MT and Rosen, RT, eds. (1994): *Food Phytochemicals for Cancer Prevention. II. Teas, Spices, and Herbs* (ACS, Washington, DC), ACS Sympos. Ser. 547
- Hollman, PCH and Katan, MB (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* 51, 305-310
- Hollman, PCH and Katan, MB (1999) Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Tox.* 37, 937-942
- Huang, MT, Osawa, T, Ho, CT and Rosen, RT, eds. (1994): *Food Phytochemicals for Cancer Prevention. I. Fruits and Vegetables* (ACS, Washington, DC), ACS Sympos. Ser. 546

- Ide, N and Lau, BHS (1999) Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phyto-medicine* 6, 125-131
- Jiang, Y, Yao, SD, Lin, WZ, Lin, NY and Zhu, DU (1998) Reactions of tea polyphenol four constituents with hydroxyl radical: A pulse radiolytic study. *Sci. China Ser. B* 41, 295-300
- Joe, B and Lokesh, BR (1994) Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1224, 255-263
- Jovanovic, SV, Hara, Y, Steenken, S and Simic, MG (1995) Antioxidant potential of gallocatechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9881-9888
- Jovanovic, SV, Hara, Y, Steenken, S and Simic, MG (1997) Antioxidant potential of theaflavins. A pulse radiolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5337-5343
- Jovanovic, SV, Steenken, S, Simic, MG and Hara, Y (1997) Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. in: *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans, C, Packer, L, eds., Marcel Dekker, New York), 137-161
- Jovanovic, SV, Steenken, S, Boone, CW and Simic, MG (1999) H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 9677-9681
- Kähkönen, MP, Hopia, AI, Vuorela, HJ, Rauha, JP, Pihlaja, K, Kujala, TS and Heinonen, M (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954-3962
- Kamat, JP, Sarma, HD, Devasagayam, TPA, Nesaretnam, K and Basiron, Y (1997) Tocotrienols from palm oil as effective inhibitors of protein oxidation and Lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Mol. Cell. Biochem.* 170, 131-137
- Kandaswami, C and Middleton, E (1997) Flavonoids as antioxidants. in: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications* (Shahidi, F, eds., AOCS Press, Champaign, IL), 174-203
- Kanner, J, Frankel, E, Granit, R, German, B and Kinsella, JE (1994) Natural Antioxidants in Grapes and Wines. *J. Agric. Food Chem.* 42, 64-69
- Kasaoka, S, Astuti, M, Uehara, M, Suzuki, K and Goto, S (1997) Effect of Indonesian fermented soybean tempeh on iron bioavailability and lipid peroxidation in anemic rats. *J. Agric. Food Chem.* 45, 195-198
- Kim, SM, Kubota, K and Kobayashi, A (1997) Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1482-1485
- Koga, T, Moro, K, Nakamori, K, Yamakoshi, J, Hosoyama, H, Kataoka, S and Ariga, T (1999) Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1892-1897
- Kuehnau, J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24, 117-191
- Lagouri, V and Boskou, D (1996) Nutrient antioxidants in oregano. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47, 493-497
- Lapidot, T, Harel, S, Akiri, B, Granit, R and Kanner, J (1999) pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 47, 67-70
- Lazarus, SA, Hammerstone, JF and Schmitz, HH (1999) Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. *Lancet* 354, 1825
- Lewis, CE, Walker, JRL, Lancaster, JE and Sutton, KH (1998) Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I. Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Sci. Food Agric.* 77, 45-57
- Liang, C and Schwarzer, K (1998) Comparison of four accelerated stability methods for lard and tallow with and without antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1441-1443
- Madsen, HL and Bertelsen, G (1995) Spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 271-277
- Manzocco, L, Anese, M and Nicolì, MC (1998) Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Food Sci. Technol.* 31, 694-698
- di Mascio, P, Sundquist, AR, Devasagayam, TPA and Sies, H (1992) Assay of lycopene and other carotenoids as singlet oxygen quenchers. *Meth. Enzymol.* 213, 429-38

- Matricardi, L and Waterhouse, AL (1999) Influence of toasting technique on color and ellagitannins of oak wood in barrel making. *Am. J. Enol. Viticult.* 50, 519-526
- Metodiewa, D, Jaiswal, AK, Cenas, N, Dickançaité, E and Segura-Aguilar, J (1999) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 107-116
- Middleton, E and 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, JB, ed., Chapman & Hall, London), 619-652
- Miron, T, Rabinkov, A, Mirelman, D, Wilchek, M and Weiner, L (2000) The mode of action of allixin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1463, 20-30
- Miura, YH, Tomita, I, Watanabe, T, Hirayama, T and Fukui, S (1998) Active oxygens generation by flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 93-96
- Mortensen, A, Skibsted, LH, Sampson, J, Rice-Evans, C and Everett, SA (1997) Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS-Lett.* 418, 91-97
- Munday, JS, James, KA, Fray, LM, Kirkwood, SW and Thompson, KG (1999) Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against in vitro oxidation. *Atherosclerosis* 143, 399-404
- Nagababu, E and Lakshmaiah, N (1996) Inhibition of lipoxygenase-mediated lipid peroxidation by eugenol in a liposomal system. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 21, 123-129
- Nakatani, N (1997) Antioxidants from spices and herbs. in: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications* (Shahidi, F, eds., AOCS Press, Champaign, IL), 64-75
- Nergiz, C and Ünal, K (1991) Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chem.* 39, 237-240
- Nikoleit, D (1997) Carotinoide natürlicher Ursprungs: wichtige physiologische Modulatoren, mehr als nur Provitamin A. *VitaMinSpur* 12, 5-19
- Offord, EA, Guillot, F, Aeschbach, R, Löliger, J and Pfeifer, AMA (1997) Antioxidant and biological properties of rosemary components: implications for food and health. in: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications* (Shahidi, F, eds., AOCS Press, Champaign, IL), 88
- Oliveros, E, Murasecco-Suardi, P, Braun, AM and Hansen, HJ (1992) Efficiency of singlet oxygen quenching by carotenoids measured by near-infrared steady-state luminescence. *Meth. Enzymol.* 213, 420-29
- Ong, ASH and Choo, YM (1997) Carotenoids and tocols from palm oil. in: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications* (Shahidi, F, eds., AOCS Press, Champaign, IL), 133-149
- Packer, JE, Slater, TF and Willson, RL (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278, 737-738
- Paetau, I, Khachik, F, Brown, ED, Beecher, GR, Kramer, TR, Chittams, J and Clevidence, BA (1998) Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1187-1195
- Pan, MH, Lin-Shiau, SY, Ho, CT, Lin, JH and Lin, JK (2000) Suppression of lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of I kappa B kinase activity. *Biochem. Pharmacol.* 59, 357-367
- Papas, AM (1999a) Vitamin E: tocopherols and tocotrienols. in: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health* (Papas, AM, eds., CRC Press, Boca Raton, FL), 189-210
- Papas, AM (1999b) Diet and antioxidant status. *Food Chem. Tox.* 37, 999-1007
- Parodi, PW (1997) The French paradox unmasked: the role of folate. *Med. Hypoth.* 49, 313-318
- Phippen, WB and Simon, JE (1998) Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 46, 1734-1738
- Plumb, GW, Chambers, SJ, Lambert, N, Bartolomé, B, Heaney, RK, Wanigatunga, S, Aruoma, OI, Halliwell, B and Williamson, G (1996) Antioxidant actions of fruit, herb and spice extracts. *J.*

Food Lipids 3, 171-188

- Plumb, GW, Price, KR, Rhodes, MJC and Williamson, G (1997) Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radical Res.* 27, 429-435
- Plumb, GW, De Pascual-Teresa, S, Santos-Buelga, C, Cheynier, V and Williamson, G (1998) Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Res.* 29, 351-358
- Polya, GM, Wang, BH and Foo, LY (1995) Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolysable tannins. *Phytochemistry* 38, 307-314
- Puech, JL, Feuillat, F and Mosedale, JR (1999) The tannins of oak heartwood: Structure, properties, and their influence on wine flavor. *Am. J. Enol. Viticult.* 50, 469-478
- Quideau, S and Feldman, KS (1996) Ellagitannin chemistry. *Chem. Rev.* 96, 475-503
- Quideau, S, Feldman, KS and Appel, HM (1995) Chemistry of galloyl-derived *o*-quinones: Reactivity toward nucleophiles. *J. Org. Chem.* 60, 4982-4983
- Rabe, C, Steenkamp, JA, Joubert, E, Burger, JFW and Ferreira, D (1994) Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* 35, 1559-1565
- Rabinkov, A, Miron, T, Konstantinovski, L, Wilchek, M, Mirelman, D and Weiner, L (1998) The mode of action of alliin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 233-244
- Ravikumar, P and Anuradha, CV (1999) Effect of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats. *Phytother. Res.* 13, 197-201
- Renaud, S and de Lorgeril, M (1992) Wine, alcohol, platelets, and French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-26
- Rice-Evans, C (1995) Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? in: *Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives* (Rice-Evans, C, Halliwell, B, Lunt, GG, eds., Portland Press, London), 103-116
- Rice-Evans, CA, Sampson, J, Bramley, PM and Holloway, DE (1997) Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? *Free Radical Res.* 26, 381-398
- Risch, SJ and Ho, CT, eds. (1997) *Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*. (ACS, Washington, DC), ACS Symp. Ser. Vol. 660
- Rock, CL (1997) Carotenoids: Biology and treatment. *Pharmacol. Ther.* 75, 185-197
- Saija, A, Trombetta, D, Tomaino, A, Locascio, R, Princi, P, Uccella, N, Bonina, F and Castelli, F (1998) 'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharmaceut.* 166, 123-133
- Samman, S, Lyons Wall, PM and Cook, NC (1997) Flavonoids and coronary heart disease: dietary perspectives. in: *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans, C, Packer, L, eds., Marcel Dekker, New York), 469-481
- Sanchez-Moreno, C, Larrauri, JA and Saura-Calixto, F (1999) Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1301-1304
- Scandalios, JG, ed. (1997) *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Schwarz, K, Ernst, H and Ternes, W (1996) Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *J. Sci. Food Agric.* 70, 217-223
- Sheppard, AJ and Pennington, JAT (1993) Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. in: *Vitamin E in Health and Disease* (Packer, L, Fuchs, J, eds., Marcel Dekker, New York), 9-31
- Shukla, VKS, Wanasundara, PKJPD and Shahidi, F (1997) Natural antioxidants from oilseed. in: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications* (Shahidi, F, eds., AOCS Press, Champaign, IL), 97-132
- Sies, H, ed. (1991) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (Academic Press, London)
- Sies, H and Krinsky, NI (1995) The present status of antioxidant vitamins and  $\beta$ -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, S1299-S1300
- St. Angelo, AJ (1996) Lipid oxidation in foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 175-224
- Stanley, LL and Mazier, MJP (1999) Potential explanations for the French paradox. *Nutrit. Res.* 19,

- Steenken, S and Neta, P (1982) One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and amino-phenols and related compounds of biological interest. *J. Phys. Chem.* 86, 3661-3667
- Surh, YJ (1999) Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* 428, 305-327
- Thayer, AM (1999) Ag biotech food: risky or risk-free? *Chem. Engin. News* 77 (44), 11-20
- Tijburg, LBM, Mattern, T, Folts, JD, Weisgerber, UM and Katan, MB (1997) Tea flavonoids and cardiovascular diseases: A review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, 771-785
- Turrens, JF, Lariccia, J and Nair, MG (1997) Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats. *Free Radical Res.* 27, 557-562
- Ursini, F, Tubaro, F, Rong, J and Sevanian, A (1999) Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. *Nutrit. Rev.* 57, 241-249
- Visioli, F, Bellomo, G and Galli, C (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 247, 60-64
- Wakabayashi, Y (1999) Effect of red wine consumption on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in aorta and coronary artery in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4724-4730
- Wang, PF, Zheng, RL, Gao, JJ, Jia, ZJ, Wang, WF, Yao, SD, Zhang, JS and Lin, NY (1996) Reaction of hydroxyl radical with phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* species: A pulse radiolysis study. *Sci. China Ser. C* 39, 154-158
- Wang, M, Li, J, Ho, GS, Peng, X and Ho, CT (1998) Isolation and identification of antioxidative flavonoid glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Food Lipids* 5, 313-321
- Wang, MF, Jin, Y and Ho, CT (1999) Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3974-3977
- Waterhouse, AL and Walzem, RL (1997) Nutrition of grape phenolics. in: *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans, C, Packer, L, eds., Marcel Dekker, New York), 359-385
- Watkins, TR, ed. (1997) *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits.* (ACS, Washington, DC), ACS Symp. Ser. Vol. 661
- Weisburger, JH (1999) Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem. Tox.* 37, 943-948
- White, PJ and Xing, Y (1997) Antioxidants from cereal and legumes. in: *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications* (Shahidi, F, eds., AOCS Press, Champaign, IL), 25-63
- Wiseman, H (1999) The bioavailability of non-nutrient plant factors: dietary flavonoids and phyto-oestrogens. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 139-146
- Yoshino, K, Suzuki, M, Sasaki, K, Miyase, T and Sano, M (1999) Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *J. Nutr. Biochem.* 10, 223-229



## Terpenoide - funktionelle Inhaltsstoffe

*Wagner K.-H., Elmadfa I.*

Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien

Die Gruppe der Terpenoide umfaßt etwa 15.000 – 20.000 bekannte Verbindungen mit einer Reihe von unterschiedlichen Verbindungsklassen, die vor allem in der Natur in vielfältiger Weise vorkommen. Als Terpene bezeichnet man Verbindungen die aus zwei oder mehr Isopreneinheiten aufgebaut sind. Grundkörper ist das Isopren, das eigentlich eine Flüssigkeit ist mit einem Siedepunkt von 31°C und aus Aceton und Acetylen synthetisierbar ist. Die Nomenklatur der Terpene geht aus Tabelle 1 hervor.

Zum Unterschied anderer sekundärer Metabolite werden die fettlöslichen Terpenoide aus Mevalonsäure und Isopentenylpyrophosphat gebildet. Chemisch gesehen sind Terpenoide cyclische, ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit einem unterschiedlichen Sauerstoffgehalt in der substituierten Gruppe.

Tabelle 1: Nomenklatur der Terpenoide

Bezeichnung	Anzahl der C-Atome	Anzahl der Isoprenreste
Monoterpene	10	2
Sesquiterpene	15	3
Diterpene	20	4
Triterpene	30	6
Tetraterpene	40	8
Polyterpene	> 40	> 8

Terpenoide spielen eine wichtige Rolle in den Zwischenbeziehungen von Pflanzen – Tieren, Pflanzen – Pflanzen sowie Pflanzen – Mikroorganismen. In der Pflanzenwelt sind sie unter anderem als Phytoalexine, Abwehrsysteme, Pheromone, Allelochemicals oder Signalstoffe bekannt.

Darüberhinaus werden Terpene in ihrer Vielfalt natürlich auch vom Menschen aufgenommen und entfalten im Organismus unterschiedliche Wirkungen und werden daher mit dem Begriff "Funktionelle Inhaltsstoffe" in Verbindung gebracht. Schwerpunkte der folgenden Zusammenfassung funktioneller Eigenschaften von Terpenoiden werden Mono-, Di- und Tetraterpene sein.

## 1. Monoterpene

Sie bestehen aus zwei Isopren-Einheiten mit insgesamt 10 C-Atomen. Monoterpene kommen vor allem in Obst, Gemüse und Gewürzen vor (Tabelle 2) und besitzen für den Menschen besondere Bedeutung als Aromastoffe z.B. Menthol aus der Pfefferminze oder Limonen aus dem Zitrusöl.

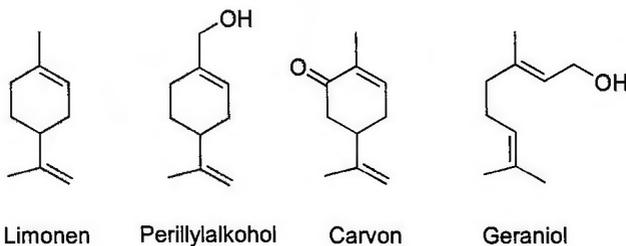
Tabelle 2: Vorkommen von natürlichen Monoterpenen (nach Huber 1995)

Monoterpene	Vorkommen	Konzentration	
Menthol	Pfefferminze		
Limonen	Zitrusöl, Orangen	> 1	mg/kg
Carvon	Kümmelöl		
Citronellol	Orangen, Weintrauben	<50	µg/kg
Geraniol	Aprikosen, Himbeeren, Weintrauben	50-500	µg/kg
Nerol	Orangen, Weintrauben	50-500	µg/kg
Myrcen	Orangen	> 1	mg/kg
Linalool	Orangen, Aprikosen, Weintrauben	50-500	µg/kg

### Funktionelle Wirkung von speziellen Monoterpenen

Zu den am besten untersuchten Substanzen innerhalb der Gruppe der Monoterpene zählen Limonen, Carvon und Perillylalkohol (Abb.1). Ihnen werden im Tierversuch und bei Untersuchungen mit Zellkulturen antikanzerogene Eigenschaften zugeschrieben. Im Tierversuch konnten Limonen und Carvon sowie Zitrusöl die Brust-, Lungen- und Magenkrebsbildung unterdrücken, sofern sie vor dem Kanzerogen verabreicht worden sind. Chemisch induzierte Hauttumore und Brusttumore bei Ratten konnten durch die lokale Applikation von Limonen verringert und teilweise sogar verhindert werden. Eine Gabe von reinem d-Limonen oder Orangenschalenöl (95% d-Limonen) verhinderte im Tierversuch die Entstehung von chemisch induzierten Brusttumoren in Nagetieren (Elson et al. 1988, Maltzmann et al. 1989), Hauttumoren (Elgbede et al. 1986) sowie Leber und Vormagenkarzinomen (Wattenberg et al. 1989). Chemopreventiv wirken auch die Substanzen Carvon gegen Lungen und Vormagenkarzinome (Wattenberg et al. 1989), Carveol und Menthol (Russin et al. 1989) gegen DMBA-induzierten Brustkrebs in Ratten in einer Konzentration von 1% der täglichen Nahrung wenn sie in der Initiationsphase verabreicht wurden. Darüber hinaus waren d-Limonen und Perillylalkohol (Haag und Gould 1994) chemopreventiv gegen Brusttumore in Ratten (>80% Reduktion). Perillylalkohol wirkte auch preventiv gegen Pankreastumore in Hamstern (>50% Reduktion gegenüber der Kontrolle) (Stark et al. 1995).

Abbildung 1: Struktur von ausgewählter Monoterpene



In humanen myeloidinen THP-1 und lymphoiden RPMI-8402 Leukämie Zelllinien konnte Perillylalkohol die Konzentrationen des antigenen ras-Onkogen senken (Hohl 1996). Weitere Zellkulturstudien konnten die Unterdrückung der Tumorgenese durch bestimmte Monoterpe- ne zeigen: Geraniol bei B16 Melanomzellen (Shoff et al. 1991), 1 mmol/l Perillylalkohol bei SW480 Kolonkarzinomzellen und bei PHA stimulierten Lymphozyten durch Perillinsäure (Schulz et al. 1994).

Basierend auf den positiven Ergebnissen der Tierversuche und Zellkulturen werden derzeit erste Humanstudien mit Limonen durchgeführt. Durch die maximal tolerierbare Dosis von 8g/m<sup>2</sup> Körperoberfläche treten bei Krebspatienten Plasmakonzentrationen von 10-30 µM auf (Vigushin et al. 1998). Um jedoch therapeutisch wirksame Konzentrationen mit der Nahrung aufzunehmen müssten etwa 400 Orangen/Tag gegessen werden (Senior 1997).

### **Wirkmechanismen von Monoterpenen**

Untersuchungen deuten darauf hin, dass Monoterpene sowohl in die Initiationsphase als auch in die Promotionsphase der Kanzerogenese einwirken (Elson und Yu 1994, Crowell 1997). In der Initiationsphase wird zum einen die Aktivierung von Prokanzerogen zum aktiven Kanze- rogen und zum anderen die Bindung eines bereits aktivierten Kanzerogens an die DNA unter- drückt. Eine bereits mutierte DNA kann in der Promotionsphase durch Antipromotoren, zu denen auch bestimmte Monoterpene gezählt werden in ihrer Umwandlung zum aktiven Tumor gehemmt werden.

Die Wirkung von Monoterpenen auf die Tumorgenese umfaßt 3 unterschiedliche Wirkme- chanismen:

- Hemmung/Induktion von Phase-I-Enzymen bei gleichzeitiger
- Induktion von Phase-II-Enzymen
- Eingriff in den RAS-Transduktion Signalstoffwechsel

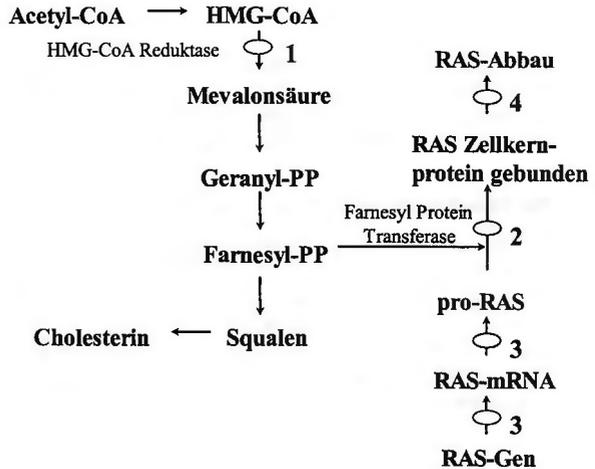
Phase-I-Enzyme sind verantwortlich für die Aktivierung des Prokanzerogens zum Kanzerogen. Die Ergebnisse vereinzelter Studie weisen auf eine mögliche Hemmung der Phase-I- Enzyme für d-Limonen und d-Carvon hin (Gould et al. 1990) allerdings zeigen Ergebnisse auch deren Induktion (Maltzmann et al. 1991). Im Tierversuch zeigten Wattenberg et al. (1989) eine protektive Wirkung von d-Limonen und d-Carvon auf die Lungen- und Magen- krebsbildung, wenn sie eine Stunde vor dem Prokanzerogen verabreicht wurden. Gleichzeitig kam es zur Induktion von Phase-II-Enzymen durch Monoterpene (Elgbede et al. 1993, Crowell 1999).

Vor allem die Phase-II-Enzyme Glutathion-S-Transferase und UDP-Glucuronyl-Transferase (Maltzmann et al. 1991, Elgbede et al. 1993) werden durch Monoterpene induziert und bewir- ken dadurch eine Inaktivierung des Prokanzerogens oder Kanzerogens in der Initiationsphase. Während der Promotionsphase wirken Monoterpene - vor allem Limonen und Perillylalkohol – durch Induktion der Tumor-Zelldifferenzierung, durch eine Erhöhung der Rate der Tumorzell- tode und/oder durch Unterdrückung der Tumor-Zellwucherung (Reddy et al. 1997).

Monoterpene, allen voran Limonen, Menthol oder Perillylalkohol haben auch die Möglichkeit in den Mevalonsäurestoffwechsel einzugreifen und auf diesem Weg Tumorsuppressiv wirken (Elson 1995) (Abb. 2). Sie hemmen auf direktem Weg Prenyl-Protein Transferasen (Abb. 2;

Stufe 2), die Farnesylpyrophosphat und Geranygeranylphosphat zwei Stoffwechselprodukte aus dem Mevalonsäurestoffwechsel enthalten, in vitro unter Verabreichung von Konzentrationen die auch in vivo erreichbar sind (Elgbede et al. 1993, Phillips et al. 1995).

Abbildung 2: Isoprenbiosynthese und RAS Stoffwechsel. Die numerierten Stoffwechselwege sind im Text beschrieben und kennzeichnen die diskutierte Einflußnahme durch Monoterpene.



Monoterpene greifen in den Cholesterinstoffwechsel durch eine Hemmung der HMG-CoA Reduktase (Abb. 2; Stufe 1) (Elson 1995) ein und reduzieren auf diesem Weg die Farnesylpyrophosphat-Synthese. Ferner bewirken sie durch diese Hemmung auch eine Reduktion des Serum-Cholestrinspiegels. Erste Studien mit <sup>35</sup>S-Methionin konnten zeigen, dass Limonen und Perillylalkohol die Konzentrationen an RAS Proteinen reduzieren konnten (Hohl 1996) und dadurch möglicherweise auch in die RAS-Transkription (Abb. 2; Stufen 3) oder den RAS-Abbau (Abb. 2; Stufe 4) eingreifen können.

Diese zusammengefaßten Ergebnisse basieren nur auf Tier- und Zellkulturversuchen, Humanstudien mit Brustkrebspatientinnen werden derzeit gerade durchgeführt und lassen auf positive Ergebnisse hoffen.

## 2. Diterpene

Diterpene bestehen aus vier Isopren-Einheiten mit insgesamt 20 C-Atomen. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe mit funktionellen Eigenschaften ist das essentielle fettlösliche Vitamin A (Retinol). Eine einheitliche Wirkungsweise kann dem Vitamin A als Überbegriff nicht zugeordnet werden. Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Derivate mit Vitamin A Wirksamkeit zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Nomenklatur und Wirkung verschiedener Substanzen mit Vitamin-A-Aktivität (Elmadfa und Leitzmann 1998)

Name	Wirksame Formen/ Wirkung
<b>all-trans-Retinol:</b>	• Physiologisch wirksames Vitamin A
<b>9-cis-Retinol, 11-cis-Retinol, 13-cis-Retinol:</b>	• Werden zu all-trans-Retinol isomerisiert
<b>Retinyl-Palmitat:</b>	• Transportform in der Lymphe
<b>all-trans-Retinal, 11-cis Retinal:</b>	• Beteiligung am Sehvorgang
<b>all-trans-Retinsäure, 11-cis-Retinsäure:</b>	• Zelldifferenzierung, Krebsvorbeugend
<b>Retinyl-Glucuronid:</b>	• Ausscheidungsprodukt
<b>α-Carotin, β-Carotin, γ-Carotin:</b>	• Provitamin A

Für den Sehvorgang wird Retinol in der Retina von der äußeren Kapillarseite der Zelle aufgenommen, an das zelluläre Retinol-bindende Protein (CRBP) gebunden, isomerisiert, zu 11-cis-Retinal oxidiert und an das zelluläre Retinal-bindende Protein übertragen. Das 11-cis Retinal wird proteingebunden zur Außenseite der Stäbchen transportiert, wo es sich mit Opsin zum Rhodopsin verbindet. Nach Lichteinfall isomerisiert 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal, wobei Opsin abgelöst wird und eine Stoffwechselfkaskade ausgelöst wird, die in der Erregung der Neuronen endet und somit dem Gehirn „Lichteinfall“ signalisiert wird.

Die Funktionalität von Vitamin-A lässt sich alleine damit beschreiben, dass die typische Mangerscheinung im fortgeschrittenen Stadium Xerophthalmie ist, bei der es zu einer Hornhauttrübung, Nekrosen der Hornhaut und im nicht behandelten Zustand zur Erblindung kommt. Laut WHO (1994) sind 228 Millionen Kinder in 75 Staaten, vor allem in Entwicklungsländern, im Anfangsstadium eines Vitamin A Mangels oder subklinisch betroffen, 14 Millionen unter 5 Jahren von Vitamin-A-Mangel betroffen, bis zu 500 000 erblinden im Jahr wovon 60% wenige Monate später sterben (WHO 1990, Harris et al. 1998).

Eine weitere wichtige Funktion ist die Beeinflussung der Zelldifferenzierung und –proliferation. Retinsäure-Isomere besitzen die Fähigkeit eine Genexpression zu stimulieren oder zu hemmen. Diskutiert wird auch die Wirkung der Zelldifferenzierung bei der Karzinogenese, indem Karzinom-Zellen unter dem Einfluss von Retinsäure bzw. ihren Estern wieder zu normalen Zellen differenzieren (Schwartz 1996, Elmadfa und Leitzmann 1998). In vitro Studien mit Leukämiezellen konnten einen positiven Effekt von Retinoiden auf die Entstehung von akuter promyelocytischer Leukämie (APL) zeigen (Cornic et al. 1994). Bei Patienten mit Patienten mit diagnostizierter APL war ein 86-95%iger Rückgang feststellbar. Das Risiko von starken Blutungen während einer Chemotherapie wurde durch all-trans-Retinsäure um 20% vermindert.

Die Rolle von Vitamin A bei der Lungenentwicklung ist noch nicht bestätigt, es gibt jedoch Hinweise auf einen Einfluss in der Genentwicklung, auf Matrixmoleküle in der Lunge und auf Wachstumsfaktoren (Zachman 1996). Die Basis für diese Vermutung und auch für die diskutierte Rolle von Retinoiden in der Lungenkrebsprävention ist das Vorkommen von bislang 6 identifizierten Retinoid-Rezeptoren in der Lunge (Khuri und Lippman 2000). Randomisierte Studien konnten zeigen, dass 13-cis-Retinsäure sehr effektiv in der Behandlung Pre-maligner Läsionen (z.B. orale Leucoplakie) eingesetzt werden konnte (Lippman et al. 1993).

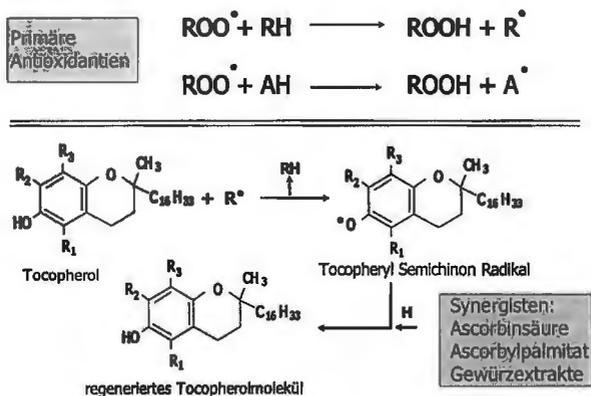


Abbildung 3: Diterpene als primäre und synergistische Antioxidantien

Eine wichtige Quelle für Terpenoide, die zur Optimierung der Lebensmittelqualität eingesetzt werden, stellt Rosmarin dar. In ihm sind die Diterpene Rosmarinsäure, Carnosol und Carnosinsäure enthalten die eine Steigerung der antioxidativen Aktivität in Lebensmitteln bewirken (Richeimer et al. 1996 Frankel 1998). Aufgrund ihrer Struktur (Polyphenole) wirken sie als primäre Antioxidantien indem sie als Wasserstoffdonatoren agieren und dadurch

freie Radikale abfangen können. Zusätzlich sind sie in der Lage als Synergisten primäre Antioxidantien wie z.B. Tocopherole zu regenerieren (Abb. 3).

Tabelle 4: Antioxidative Wirkung des Diterpens Carnosinsäure im Vergleich zu anderen primär wirkenden Antioxidantien in Schmalz

	<b>Induktionsperiode (min)</b>	<b>Schutzfaktor</b>
<b>Kontrolle (Schmalz)</b>	<b>40</b>	<b>--</b>
<b><math>\alpha</math>-Toc</b>	<b>265</b>	<b>6.6</b>
<b>Carnosinsre. (CS)</b>	<b>180</b>	<b>4.4</b>
<b>Ascorbylpalmitat (AP)</b>	<b>440</b>	<b>11.0</b>
<b><math>\alpha</math>-Toc + CS</b>	<b>445</b>	<b>11.1</b>
<b>AP + CS</b>	<b>990</b>	<b>24.8</b>
<b><math>\alpha</math>-Toc + AP + CS</b>	<b>1070</b>	<b>26.8</b>

Frankel et al. 1998

### 3. Tetraterpene

Die wichtigste und am besten erforschte Gruppe der Tetraterpene sind die Carotinoide. Sie umfaßt etwa 600 verschiedene Verbindungen, von der allerdings nur eine geringe Anzahl von physiologischer Bedeutung sind. Sie sind Polyenkohlenwasserstoffe mit 40 C-Atomen und 8 Isopreneinheiten, die durch Geranylgeranyldiphosphate gebildet werden. Entsprechend ihrer Struktur unterscheidet man Carotene und Oxycarotinoide (Abb. 4). Zur ersten Gruppe zählen - und -Carotin sowie Lycopin. Die zweite Gruppe, auch bekannt als Gruppe der Xanthophylle, beinhaltet in ihrer Struktur auch Sauerstoff und ist zahlenmäßig die weitaus größere Gruppe. Zu den wichtigsten Vertretern zählen -Cry t oxanthin, Zeaxanthin und Lutein.

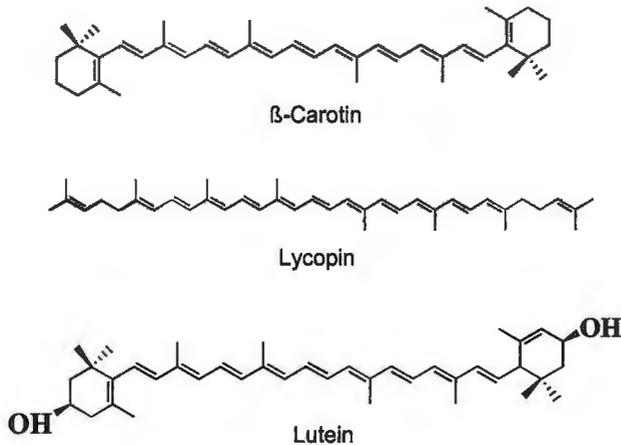


Abbildung 4: Struktur ausgewählter Sauerstofffreier und -haltiger Carotinoide

Carotene sind vor allem in gelben und orangen Obst und Gemüse enthalten während die sauerstoffhaltigen Oxycarotinoide vorwiegend in grünem Gemüse vorkommen (Tab. 5).

Tabelle 5: Carotinoidgehalte ausgewählter Lebensmittel (Mangels et al. 1993, Majchrzak und Elmadfa 1997)

Lebensmittel	$\beta$ -Carotin ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	- Carotin ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	Lycopin ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	Lutein/Zeaxanthin ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
Aprikose	3.500	-	5	-
Guave	812	-	5.400	-
Wassermelone	230	1	4.100	14
Rote Grapefruit	1.130	-	3.362	-
Grünkohl	4.700	-	-	21.900
Spinat	4.100	-	-	10.200
Karotte	7.900	3.600	-	260
Tomate	300	-	3100	100
Tomatenpaste	2.000	-	10000	-
Eier	4	2	-	713

## Physiologische Wirkung der Carotinoide

### Provitamin A-Aktivität

Von den rund 600 identifizierten Carotinoiden besitzen 50 Provitamin-A-Aktivität, von praktischer Bedeutung sind vor allem -Carotin, daneben noch - und -Carotin sowie Cryptox-

anthin. Die enzymatische Umwandlung zu Vitamin A ist abhängig vom Retinolstatus, der Vitamin-E-Versorgung der -Carotin- und Proteinzufuhr sowie der Fettzufuhr. Die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin zu Retinal beträgt etwa 1/6 (Olson 1996), aufgrund der Kontrolle dieses Stoffwechselweges wird der Organismus einerseits vor Vitamin-A Intoxikationen und andererseits vor Vitamin A Mangel geschützt (Gerster 1993).

### Antioxidative Wirkung

Carotinoïdradikale können durch Oxidation, Reduktion, Wasserstoffabstraktion und durch Additionsreaktionen gebildet werden. Da Carotinoide Quencher freier Radikale allerdings nur bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck sind, können sie mit Tocopherolen, die auch bei hohem Partialdruck wirken, eine synergistische Wirkung beim Schutz des Organismus gegen Radikalkettenreaktionen erzielen.

Die antioxidative Aktivität hängt unter anderem von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen und der Anwesenheit funktioneller Gruppen ab und sinkt daher wie folgt (Miller et al. 1996):

Lycopin >  $\beta$ -Carotin =  $\beta$ -Cryptoxanthin > Lutein = Zeaxanthin > -Carotin > Echinenon > Canthaxanthin = Astaxanthin

Neben der Fähigkeit als Quencher wirkt vor allem  $\beta$ -Carotin auch als freier Radikalfänger bei der Lipidperoxidation von Fetten und Ölen. In den letzten 20 Jahren haben sich auf Basis vieler Studien die Hinweise gehäuft, dass Carotinoide wesentlich zur Reduktion des Risikos degenerativer Erkrankungen, vor allem durch kumulative oxidative Schädigung, beitragen können.

Bei Patienten mit erblich bedingter krankhafter Lichtempfindlichkeit konnten 15 – 180 mg  $\beta$ -Carotin/Tag protektive Wirkungen erzielen. Viele Autoren berichten von einer positiven Korrelation zwischen der Aufnahme carotinoïdreicher Nahrung und Krebs sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Kritchevski 1999).

Allerdings zeigten die großen Interventionsstudien die in den 80er und 90er Jahren mit  $\beta$ -Carotin durchgeführt wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse. Es zeigte sich bei der ABTC Studie an 29.000 Männern die mindestens 20 Jahre lang 20 Zigaretten/Tag geraucht haben, eine positive Korrelation zu Lungenkrebs durch 20 mg  $\beta$ -Carotin/Tag. Die gleiche negative Wirkung wurde bei der CARET-Studie festgestellt. Auch hier zeigten starke Langzeitraucher eine positive Korrelation zu Lungenkrebs (Omenn et al. 1996). Beide Studie mußten daher abgebrochen werden. Die Physician's Health Study zeigte keine Auswirkung von 50 mg/ $\beta$ -Carotin/Tag auf 22.000 amerikanische Ärzte (Hennekens et al. 1996). Positiv hingegen war das Ergebnis der Linxian Studie in China wo die Gesamtkrebsmortalität durch die 5-jährige Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin (15 mg/Tag), Vitamin E und Selen um 13% gesenkt werden konnte (Blot et al. 1993).

Neben den Untersuchungen mit  $\beta$ -Carotin häufen sich Studien mit grünen und gelben Gemüsen, um auch die anderen Carotinoide entsprechend zu berücksichtigen. So konnte ein größerer Einfluß von dunkelgrünem Gemüse und Tomatensaft auf das Lungenkrebsrisiko gezeigt werden, als durch  $\beta$ -Carotin oder Karotten, was die Wirkung von oxidierten Carotinoïden wie Lutein oder Zeaxanthin betont. Auch Lycopin ist assoziiert mit einem niedrigen Risiko für diverse Krebsarten (Gerster 1997).

### **Weitere biologische Funktionen**

Zahlreiche Studien zeigten eine protektive Wirkung von Carotinoiden auf das Immunsystem. Eine noch nicht sehr lange erkannte biologische Funktion von Carotinoiden ist die Aktivierung bestimmter Gene, die die Produktion von Gap junction-Proteinen steuern. Dadurch wird die Zellkommunikation und ein Signalaustausch gewährleistet und die Umwandlung von vorgeschädigten Zellen in tatsächliche Krebszellen unterdrückt. Neben  $\beta$ -Carotin wirken auch Cantaxanthin, Lutein, Lycopin und -Carotin. Weiters beeinflussen Carotinoide die enzymatische Aktivität der Lipoxygenase vor allem im Arachidonsäurestoffwechsel.

Zusammenfassend kann gesagt werden dass Terpenoide eine Reihe von positiven Wirkungen in Zellkulturen, Tierversuchen und Humanstudien gezeigt haben, und daher mit großer Berechtigung als funktionell bezeichnet werden sollten. Um jedoch eine hohe Aufnahme dieser protektiven Terpenoide zu gewährleisten, sollten die Empfehlung der unterschiedlichen Ernährungsgesellschaften (Deutsche/Österreichische Gesellschaft für Ernährung, American Dietetics Association, Food and Nutrition Board) wahrgenommen werden und der Verzehr an frischem Obst und Gemüse in einer großen Bandbreite gesteigert werden.

### **Literatur**

- Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY, et al. (1993): Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 85:1483-92
- Cornic M, Agadir A, Degos L, Chomienne C (1994): Retinoids and differentiation treatment: a strategy for treatment in cancer. *Anticancer Res* 14:2339-46.
- Crowell PL (1999): Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr* 129:775S-778S.
- Crowell PL (1997): Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat* 46:191-7.
- Elegbede JA, Maltzman TH, Elson CE, Gould MN (1993): Effects of anticarcinogenic monoterpenes on phase II hepatic metabolizing enzymes. *Carcinogenesis* 14:1221-3.
- Elegbede JA, Maltzman TH, Verma AK, Tanner MA, Elson CE, Gould MN (1986): Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and d-limonene: a re-evaluation. *Carcinogenesis* 7:2047-9.
- Elmadfa I, Leitzmann C (1998): Ernährung des Menschen. 3. Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, pp 289-300.
- Elson CE (1995): Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. *J Nutr* 125:1666S-1672S.
- Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN (1988): Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 9:331-2.
- Elson CE, Yu SG (1994): The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. *J Nutr* 124:607-14.
- Frankel EN (1998): Lipid Oxidation. THE OILY PRESS
- Gerster H (1997): The potential role of lycopene for human health. *J Am Coll Nutr* 16:109-26

Gerster H (1993): Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res* 63:93-121.

Gould MN, Wacker WD, Maltzman TH (1990): Chemoprevention and chemotherapy of mammary tumors by monoterpenoids. *Prog Clin Biol Res* 347:255-68.

Haag JD, Gould MN (1994): Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother Pharmacol* 34:477-83.

Harris EW, Loewenstein JI, Azar D (1998): Vitamin A deficiency and its effects on the eye. *Int Ophthalmol Clin* 38:155-61.

Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, La-Motte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R (1996): Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996 334:1145-9

Hohl RJ (1996): Monoterpenes as regulators of malignant cell proliferation. *Adv Exp Med Biol* 401:137-46.

Huber C (1995): Terpene in Obst und Gemüse – Vorkommen und Bedeutung. Diplomarbeit an der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, TU München-Weihenstephan.

Khuri FR, Lippman SM (2000): Lung cancer chemoprevention. *Semin Surg Oncol* 18:100-5.

Kritchevsky SB (1999): beta-Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *J Nutr* 129:5-8.

Lippman SM, Benner SE, Hong WK (1993): Chemoprevention strategies in lung carcinogenesis. *Chest* 103:15S-19S.

Majchrzak, I. und Elmadfa, I. (1997) Carotinoid- und Retinolgehalt in Hühnereiern. *Fett/Lipid* 99:365-368

Maltzman TH, Hurt LM, Elson CE, Tanner MA, Gould MN (1989): The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. *Carcinogenesis* 10:781-3.

Mangels, A.R., Holden, J.M., Beecher, G.R., Forman, M.R. und Lanza, E. (1993). Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J. Am. Diet Assoc.* 93:284-296

Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA (1996): Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* 384:240-2.

Olson JA (1996): Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *J Nutr* 126:1208S-12S.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL Jr, Valanis B, Williams JH Jr, Barnhart S, Cherniack MG, Brodtkin CA, Hammar S (1996): Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* 88:1550-9.

Phillips LR, Malspeis L, Supko JG (1995): Pharmacokinetics of active drug metabolites after oral administration of perillyl alcohol, an investigational antineoplastic agent, to the dog. *Drug Metab Dispos* 23:676-80.

Reddy BS, Wang CX, Samaha H, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Rao CV (1997): Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res* 57:420-5.

Richheimer SL, Bernart MW, King GA, Kent MC, Bailey DT (1996): Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *JAOCS* 73:507-14.

Schulz S, Buhling F, Ansorge S (1994): Prenylated proteins and lymphocyte proliferation: inhibition by d-limonene related monoterpenes. *Eur J Immunol* 24:301-7.

Schwartz JL (1996): The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *J Nutr* 126:1221S-7S.

Senior K (1997): How can components of common foods affect cancer risk? *Mol Med Today*

3:103-7.

Shoff SM, Grummer M, Yatvin MB, Elson CE (1991): Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Res* 51:37-42.

Stark MJ, Burke YD, McKinzie JH, Ayoubi AS, Crowell PL (1995): Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett* 96:15-21.

Vigushin DM, Poon GK, Boddy A, English J, Halbert GW, Pagonis C, Jarman M, Coombes RC (1998): Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol* 42:111-7.

Wattenberg LW, Sporn VL, Barany G (1989): Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res* 49:2689-92.

World Health Organisation (1990): Global prevalence of vitamin A deficiency. (MDIS working paper no. 2) Geneva: World Health Organisation

World Health Organisation (1994): Prevention of childhood blindness. Geneva: World Health Organisation

Zachman RD (1995): Role of vitamin A in lung development. *J Nutr* 125:1634S-38S.



## Funktionelle Wirkungen unverdaulicher Kohlenhydrate

*Elisabeth Wisker*

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

### ***Functional Properties of Non-Digestible Carbohydrates***

*Non-digestible carbohydrates include cell wall (cellulose, hemicellulose,  $\beta$ -glucans, pectin) and storage carbohydrates (guar, inulin/fructooligosaccharides). Inulin and fructooligosaccharide consumption led to an increase in faecal bifido bacteria. There are indications that fructan consumption may also increase calcium absorption in humans. These findings need confirmation in further studies. In addition, the long-term effects for human health need to be studied. Viscous types of polysaccharides (isolated pectin, guar, oat fibre, psyllium) have been shown to decrease plasma total and LDL cholesterol, mainly by inhibiting bile acid reabsorption. The cholesterol-lowering effect of these fibres can contribute to the prevention of atherosclerosis. However, there are only few data on the effects of viscous fibres on colonic concentration of secondary bile acids. Because increased secondary bile acid concentrations may be disadvantageous, further studies in humans on this subject are needed.*

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, CAU Kiel, Düsternbrooker Weg 17, D-24105 Kiel

### ***Einleitung***

Fast alle Kohlenhydrate, die im Dünndarm des Menschen nicht verdaut werden, gehören zur Gruppe der Ballaststoffe. Dabei handelt es sich um Bestandteile pflanzlicher Zellwände, i.e. Cellulose, Hemicellulose,  $\beta$ -Glucan und Pektin, und um spezifische Speicherkohlenhydrate wie Guar und Inulin/Fructooligosaccharide. Bestimmte Formen von Stärke können von den Verdauungsenzymen des Menschen ebenfalls nicht gespalten werden; diese Stärke wird als resistente Stärke bezeichnet.

Welche funktionellen Eigenschaften haben diese Kohlenhydrate? Als „Functional Food“ werden Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe bezeichnet, die über den reinen Nährwert hinausgehende positive Wirkungen auf die Gesundheit haben (Clydesdale 1997); idealerweise sollten sie zur Prävention von Erkrankungen beitragen. Von besonderem Interesse sind dabei die Prävention von Krebs und von arteriosklerotischen Erkrankungen, vor allem von koronarer Herzkrankheit, aber auch von anderen Erkrankungen wie z. B. Osteoporose. Diese Krankheiten haben in den westlichen Industrieländern in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Das hängt sicher mit dem höheren Lebensalter der Bevölkerung, aber auch mit den Veränderungen

der Ernährungs- und Lebensgewohnheiten zusammen.

Epidemiologische Studien zeigen, daß eine hohe Zufuhr von Ballaststoffen mit einem geringeren Risiko für Arteriosklerose und Dickdarmkrebs korreliert (Wolk et al. 1999, Rimm et al. 1996, Trock et al. 1990). Die Ballaststoffaufnahme wird in solchen Studien aus dem Verzehr von Lebensmitteln berechnet. Deshalb läßt sich nicht beweisen, ob die Ballaststoffe selbst oder andere Inhaltsstoffe ballaststoffhaltiger Lebensmittel vor den genannten Erkrankungen schützen oder ob andere Faktoren dafür verantwortlich sind. In westlichen Industrieländern haben Menschen, die sich ballaststoffreich ernähren, oft auch andere günstige Ernährungsgewohnheiten, z. B. einen geringeren Verzehr von Fleisch und Fett. Der Einfluß der Ballaststoffaufnahme ist deshalb nur schwer abzugrenzen (Wynder et al. 1996). Funktionelle Eigenschaften von Lebensmitteln bzw. ihren Inhaltsstoffen sollten sich aber mit wissenschaftlichen Methoden nachweisen lassen (Clydesdale 1997). Ein solcher Wirkungsnachweis wird natürlich erleichtert, wenn sich die betreffende Verbindung isolieren läßt. Dies ermöglicht die Abgrenzung der Wirkung einer Verbindung von derjenigen anderer in einem Lebensmittel vorkommender Stoffe sowie die Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen und Wirkungsmechanismen. Als wirksam erkannte isolierte Bestandteile können gezielt zur Anreicherung von Lebensmitteln verwendet werden.

Die Wirkung isolierter Verbindungen entspricht allerdings nicht immer der Wirkung der gleichen Stoffe in natürlichen Lebensmitteln. In Lebensmitteln kommen einzelne Inhaltsstoffe im Verbund mit anderen Bestandteilen vor, die ihre Wirkung beeinflussen können. Die Isolierung unverdaulicher Kohlenhydrate ist z. B. mit einem Verlust der Struktur der Zellwand verbunden. Dies kann zu Änderungen von Eigenschaften und Wirkungen der isolierten Verbindungen im Vergleich zum Ausgangsmaterial führen. Isoliertes Pektin z. B. bildet viskose Lösungen; sein Verzehr kann demzufolge zu einer Erhöhung der Viskosität des Dünndarminhalts führen. Pektin in der Mittellamelle pflanzlicher Zellwände scheint dagegen keinen nennenswerten Einfluß auf die Viskosität des Chymus zu haben. Da die Viskosität des Chymus die Resorptionsvorgänge im Dünndarm beeinflusst (Johnson 1992), sind Unterschiede in der Wirkung zwischen isoliertem Pektin und Pektin in Gemüse und Obst zu erwarten.

Funktionelle Wirkungen von Lebensmittel(inhaltstoffe)n auf einzelne physiologische Parameter (z. B. Stuhlgewicht und Transitzeit; Konzentration der Plasmalipide; Höhe der Calciumresorption) lassen sich oft relativ einfach bestimmen. Der Nachweis *präventiver* Eigenschaften ist allerdings schwierig. Selbst wenn ein Lebensmittel oder ein Lebensmittelinhaltsstoff zum Schutz vor Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs oder Osteoporose beiträgt, ist dies kaum direkt zu beweisen. Die Entstehung dieser Erkrankungen erstreckt sich über viele Jahre, z.T. über Jahrzehnte. Jedes Lebensmittel mit potentielltem Schutzeffekt müßte demzufolge unter kontrollierten Bedingungen über Jahre am Menschen untersucht werden; dies ist aus praktischen und finanziellen Gründen nicht möglich. Daher wird die Wirkung auf Parameter gemessen, die als Risikofaktoren für die genannten Erkrankungen bzw. als Biomarker gelten. Die Suche nach aussagefähigen Parametern ist demzufolge enorm wichtig. Es gilt z. B. als gesichert, daß hohe Plasmakonzentrationen an LDL-Cholesterin ein kausaler Faktor für die Entstehung von Arteriosklerose sind (Hornstra et al. 1998). Für andere Risikofaktoren und Biomarker sind kausale Beziehungen zur Entstehung einer Erkrankung noch nicht so sicher nachgewiesen. So ist z. B. noch nicht untersucht, ob eine Verbesserung der Calciumresorption vor der Ausbildung von Osteoporose beim Menschen schützt. Unter dieser Einschränkung sollten auch die funktionellen Wirkungen unverdaulicher Kohlenhydrate betrachtet werden.

### ***Inulin/Oligofructose***

Die unverdaulichen Kohlenhydrate, die am häufigsten mit dem Begriff „funktionell“ in Beziehung gebracht werden, sind Inulin und Oligofructose. Oligofructose ist ein Synonym für Fructooligosaccharide und wird durch partielle Hydrolyse von Inulin gewonnen. Beide Fructane werden als Präbiotika bezeichnet. An Präbiotika werden gewisse Anforderungen gestellt: sie müssen im Dickdarm selektiv von potentiell günstigen Bakterien fermentiert werden, ihr Verzehr muß zu einer vorteilhaften Verschiebung in der Zusammensetzung der Darmflora führen und sie sollten Wirkungen hervorrufen, die sich positiv auf die Gesundheit auswirken (Gibson 1999).

### ***Einfluß auf die Zusammensetzung der Darmflora***

Zur menschlichen Darmflora gehören ca. 500 verschiedene Bakterienspezies. Unter diesen werden Bifidobakterien und Lactobazillen als „gute“ Bakterien eingestuft. In beiden Spezies finden sich keine pathogenen Vertreter, sie produzieren keine Fäulnisprodukte, Toxine oder potentiellen Carcinogene; beide Spezies können dagegen Milchsäure bilden (Gibson 1999). Inulin und Fructooligosaccharide werden bevorzugt von Bifidobakterien fermentiert, weil diese - im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien - Enzyme für die Hydrolyse von Fructanen besitzen (De Vries & Stouthamer 1967). Bifidobakterien haben demzufolge beim Verzehr von Fructanen einen Nährstoffvorteil gegenüber ihrer bakteriellen Konkurrenz.

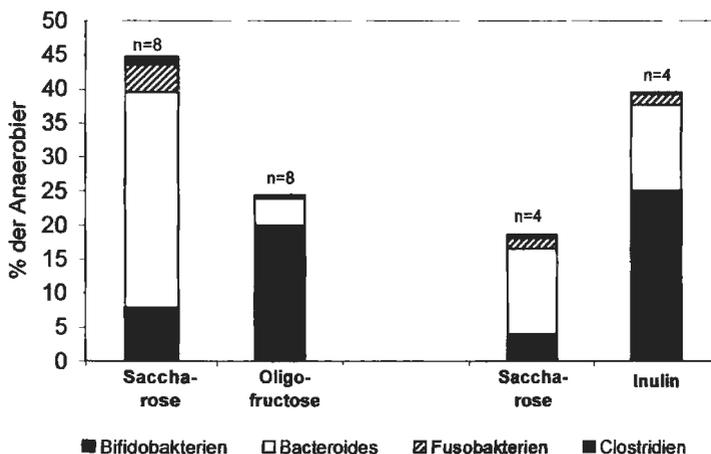


Abb. 1: Einfluß des Verzehrs von 15 g Oligofructose, Inulin oder Saccharose pro Tag auf die Anteile einiger Bakterienspezies in menschlichen Fäzes. (Berechnet aus den Daten von Gibson et al. 1995)

In mehreren Studien - Abb. 1 zeigt ein repräsentatives Beispiel - führte der Verzehr von Inulin und Oligofructose in isolierter Form zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung der Darmflora. Die Bifidusflora nahm zu auf Kosten von Spezies, die als weniger günstig eingestuft

werden (Buddington et al. 1996, Gibson et al. 1995; Kleesen et al. 1997). Eine Erhöhung des Anteils an Bifidobakterien ließ sich mit unterschiedlichen Aufnahmen von Fructanen (4-40 g /Tag) erreichen (Buddington et al. 1996, Gibson et al. 1995; Kleesen et al. 1997). Produkte wie Joghurt, die mit Inulin oder Oligofructose angereichert sind, enthalten oft zwischen 3 und 5 g pro Portion. Möglichweise würde eine solche Menge bereits ausreichen, um den Anteil von Bifidobakterien zu erhöhen; dazu liegen allerdings keine systematischen Studien vor.

Welche langfristigen Auswirkungen die Vermehrung der Bifidobakterien für die Gesundheit des Menschen hat, ist noch nicht nachgewiesen. Es wird angenommen, daß Bifidobakterien über mehrere Mechanismen zum Schutz vor pathogenen Keimen beitragen. Die schnelle Fermentation von Fructanen führt infolge der Bildung von Milchsäure bzw. kurzkettigen Fettsäuren zu einer Verringerung des pH-Wertes im Dickdarm; hierdurch kann das Wachstum pathogener Keime gehemmt werden. Eine erhöhte Zahl von Bifidobakterien könnte darüber hinaus um Kolonisationsorte und verfügbare Nährstoffe mit den Pathogenen konkurrieren (Gibson 1999). Zumindest in vitro bilden Bifidobakterien antibiotika-ähnliche Stoffe, die das Wachstum verschiedener pathogener Keime hemmen (Gibson u. Wang 1994). Es wird auch vermutet, daß sie das Immunsystem stimulieren (Roberfroid 1999). Die größere Zahl von Bifidobakterien beim gestillten Säugling im Vergleich zum nicht gestillten scheint ein Grund zu sein, weshalb gestillte Säuglinge besser vor Infektionen geschützt sind (Gibson et al. 1997). Es gibt Hinweise, daß die Darmflora älterer Menschen einen geringeren Anteil an Bifidobakterien aufweist als die jüngerer (Kleesen et al. 1997). Gerade bei älteren Menschen können bakteriell verursachte Darmerkrankungen besonders gravierende Folgen haben (Gibson 1999). Falls es sich zeigen läßt, daß Bifidobakterien tatsächlich zum Schutz vor pathogenen Keimen beitragen, dann könnte eine gezielte Erhöhung des Anteils an Bifidobakterien durch die Aufnahme von Fructanen für ältere Menschen besonders interessant sein.

Einige Autoren sprechen Inulin/Oligofructose ein viel weiteres Spektrum an Wirkungen zu. In Tierexperimenten wurde z. B. gezeigt, daß Inulin und Oligofructose zu einer drastischen Verminderung der Konzentration von Triglyceriden (Kok et al. 1996a, b, Trautwein et al. 1998), z. T. auch von Cholesterin (Trautwein et al. 1998) im Plasma führten. Diese Wirkung war darauf zurückzuführen, daß bei Aufnahme von Fructanen anstelle von verdaulichen Kohlenhydraten (Stärke, Fructose, Saccharose) die Triglyceridsynthese in der Leber abnahm (Kok et al. 1996a,b). Die wenigen am Menschen durchgeführten Studien ergaben widersprüchliche Ergebnisse. In den meisten Studien hatte der Verzehr von Fructanen in einer Höhe zwischen 8 und 20 g pro Tag keine triglyceridsenkende Wirkung (Yamashita et al. 1984, Luo et al. 1996, Pedersen et al. 1997; Davidson & Maki 1999). Auf der anderen Seite wird berichtet, daß eine tägliche Aufnahme von nur 9 g bzw. 10 g Inulin zu einer signifikanten Senkung der Plasmatriglyceride führte (Brighenti et al. 1999, Jackson et al. 1999). Die Ursachen für diese kontroversen Ergebnisse beim Menschen sind nicht klar. In einer dieser Studien (Brighenti et al. 1999) war z. B. die Kost mit Ausnahme der Fructanzufuhr nicht kontrolliert.

Daß Fructane in den meisten Studien beim Menschen im Gegensatz zu Versuchstieren keine Wirkung zeigten, kann mit Unterschieden zwischen Mensch und Tieren in der Höhe der Triglyceridsynthese aus Kohlenhydraten in der Leber zusammenhängen. Diese ist beim Menschen bei fettreicher Ernährung gering (Roberfroid 1999). Ein weiterer, vielleicht wichtigerer Grund ist, daß der Mensch nur begrenzte Mengen an Fructanen toleriert. In den Tierversuchen wurden Fructane in einer Höhe zwischen 8-16 % der Futtertrockenmasse verabreicht. Dies würde für den Menschen einer Zufuhr von ca. 40-80 g pro Tag entsprechen, wenn die Kost den gleichen

Prozentsatz (bezogen auf Trockenmasse) an Fructanen wie das Tierfutter enthielte. Bekämen beide Spezies gleiche Mengen pro kg metabolisches Körpergewicht, dann entsprächen die in den Tierversuchen verwendeten Fructandosen beim Menschen einer Aufnahme von 100-240 g pro Tag. Die meisten Menschen (70-95 % der untersuchten Personen) vertragen ohne Beschwerden aber nur Mengen von etwa 30 g Fructanen pro Tag. Dabei ist von Vorteil, wenn die Tagesmenge auf mehrere Portionen verteilt wird. Wenn Fructane zu festen Lebensmitteln zugesetzt werden, ist die Verträglichkeit besser als bei Aufnahme über Getränke (Coussement 1999), vermutlich wegen der längeren Verweildauer fester Lebensmittel im Magen. Es gibt aber Menschen, bei denen schon geringe Mengen von ca. 10 g zu Beschwerden führen (Coussement 1999). Die begrenzte Toleranz von Fructanen beim Menschen hat ihre Ursache in deren schneller Fermentation, die zu Blähungen und Bauchschmerzen, aber auch zu osmotisch bedingten Durchfällen führen kann.

#### *Wirkung auf die Calciumresorption*

In mehreren Studien wurde gezeigt, daß Inulin und Oligofructose bei Ratten die Resorption von Mineralstoffen, insbesondere von Calcium und Magnesium, erhöhten (z. B. Delzenne et al. 1995, Ohta et al. 1994). Die langfristige Aufnahme von Fructanen verminderte den Verlust der Knochenmasse bei Tieren, bei denen die Ovarien entfernt wurden (Taguchi et al. 1994). Diese Tiere dienen als Modell für die postmenopausale Osteoporose der Frau. Offenbar steigt beim Verzehr von Fructanen die Resorption von Kationen aus dem Zäkum. Dies wird auf die fermentationsbedingten Veränderungen in diesem Darmabschnitt zurückgeführt (niedriger pH-Wert, bessere Löslichkeit der Kationen, Hypertrophie der Zäkumwand) (Levrat et al. 1991, Ohta et al. 1994). Die wenigen bisher durchgeführten Studien zum Einfluß von Fructanen auf die Mineralstoffresorption beim Menschen ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Van den Heuvel et al. (1998) fanden bei Erwachsenen keinen Einfluß von Inulin und Oligofructose auf die Resorption von Calcium und Eisen, aber bei Jugendlichen steigerte die Aufnahme von 15 g Oligofructose pro Tag die Calciumresorption (Van den Heuvel et al. 1999). Die tägliche Zufuhr von 40 g Inulin führte bei jungen Männern ebenfalls zu einer Steigerung der Resorption und einer Verbesserung der Bilanzen von Calcium, aber nicht von anderen Kationen (Coudray et al. 1997). Diese wenigen Studien lassen noch keine sicheren Aussagen über den Einfluß von Fructanen auf die Resorption von Calcium beim Menschen zu. Auch wenn sich die Förderung der Calciumresorption in weiteren Studien bestätigen läßt, ist noch unbekannt, inwieweit sich die altersbedingte oder durch Östrogenmangel verursachte Verminderung der Knochendichte und das Auftreten von Osteoporose durch den langjährigen Verzehr von Fructanen verhindern oder verzögern läßt.

#### *Wirkung unverdaulicher Kohlenhydrate auf Risikofaktoren für arteriosklerotische Erkrankungen*

Die Senkung der Konzentrationen an Gesamt- und LDL-Cholesterin im Plasma gilt als Maßnahme zur Prävention von Arteriosklerose. Empfohlen wird, den Verzehr von Fett auf höchstens 30 % und den von gesättigten Fettsäuren auf höchstens 10 % der Energie zu beschränken sowie das Körpergewicht zu reduzieren (z. B. Department of Health 1994).

Eine Vielzahl experimenteller Studien hat gezeigt, daß der Verzehr von Ballaststoffen, die viskose Lösungen bilden, ebenfalls zu einer Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterins führt. Zu diesen Ballaststoffen gehören Haferballaststoffe mit der hauptsächlich wirksamen Komponente  $\beta$ -Glucan, isoliertes Pektin, Guar und Psyllium. Bei Psyllium handelt es sich um lösliche Arabinoxylane aus Plantago-Arten, meist aus deren Samenschale. Die durch diese

Ballaststoffe bewirkte Reduktion der Cholesterinwerte fiel in einzelnen Studien allerdings unterschiedlich hoch aus. Unterschiede zwischen den Studien in der Höhe der Ballaststoffaufnahme, der Basisdiät, der geringen Zahl und der Auswahl der Versuchspersonen (Menschen mit normalen oder erhöhten Plasmalipiden) können für die heterogenen Ergebnisse verantwortlich sein (Brown et al. 1999). Sog. Metaanalysen, in denen die Einzelstudien gemeinsam statistisch ausgewertet werden, ergeben eine größere Sicherheit in der Bewertung der Ergebnisse. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einer solchen Metaanalyse, die 67 Einzelstudien einbezog (Brown et al. 1999). In dieser Metaanalyse wurden die Ergebnisse für alle Studien und Höhen der Ballaststoffaufnahme ausgewertet sowie getrennt für die Studien, in denen die Aufnahme in dem als praktikabel angesehenen Bereich von 2- 10 g pro Tag lag. Lediglich für Guar gab es in dem niedrigeren Bereich nicht genügend Daten für eine Auswertung.

Tabelle 1: Änderung der Cholesterinkonzentration im Plasma beim Verzehr von viskosen Ballaststoffen im Vergleich zu ballaststoffarmen Diäten (nach Brown et al. 1999).

Ballaststoff	Gesamt-Cholesterin	LDL-Cholesterin	HDL-Cholesterin	Änderung pro g Ballaststoff (mg/100 ml)			
Haferballaststoffe (2-10 g)	-1,5	-1,4	0				
Psyllium (2-10 g)	-1,4	-2,6	-0,2				
Pektin (2-10 g)	-2,7	-2,1	-0,2				
Guar (2-30 g)*	-1,0	-1,3	-0,1				
<b>Alle Ballaststoffe (2-10 g)</b>	<b>-1,7</b>	<b>-2,2</b>	<b>-0,1</b>				

\*: bei Guar gab es nicht genügend Studien mit niedriger Aufnahme

Zwischen den einzelnen löslichen Ballaststoffen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der cholesterinsenkenden Wirkung. Hohe Ballaststoffmengen waren relativ weniger wirksam als niedrige. In einer als praktikabel angesehenen Verzehrshöhe (2-10 g lösliche Ballaststoffe) wurde das Gesamt-Cholesterin im Mittel um 1,7 mg/100 ml, das LDL-Cholesterin um 2,2 mg/100 ml pro g Ballaststoff gesenkt. Ein Verzehr von 10 g viskoser Ballaststoffe würde demnach das Gesamt-Cholesterin um durchschnittlich 17 mg und das LDL-Cholesterin um 22 mg/100 ml Plasma senken. Die Senkung des Gesamt-Cholesterins war unabhängig von der Höhe der Ausgangswerte; der Einfluß auf das LDL-Cholesterin war dagegen bei Menschen mit hohen Plasmakonzentrationen größer.

Einige Autoren messen der Cholesterinsenkung durch viskose Ballaststoffe eine Bedeutung für die Prävention der Arteriosklerose bei, vor allem, wenn die Aufnahme löslicher Ballaststoffe mit zusätzlichen Maßnahmen kombiniert wird (Anderson et al. 2000, Jenkins 2000); andere schätzen den Effekt eher als gering ein (Brown et al. 1999). Eine Metaanalyse von Studien zur Wirkung

einer Stufe-1 Diät (<30% der Energie als Fett, <10% der Energie als gesättigte Fettsäuren, <300 mg Cholesterin) auf das Plasmacholesterin ergab, daß diese Diät zu einer durchschnittlichen Senkung des Gesamt-Cholesterins um 24 mg/100 ml (10%) und des LDL-Cholesterins um 19 mg (12%) führte (Yu-Poth et al. 1999). Die durch den täglichen Verzehr von 10 g löslicher Ballaststoffe erzielte Senkung der Cholesterinwerte wäre demnach ähnlich wie die durch Änderungen im Fettverzehr erreichten Werte. Ballaststoffe haben außerdem den Vorteil, daß sie das - als günstig eingestufte - HDL-Cholesterin nur wenig beeinflussen (Brown et al. 1999, Anderson et al. 2000). Eine Reduktion des Verzehrs von Fett und von gesättigten Fettsäuren zugunsten von Kohlenhydraten führte dagegen in vielen Studien zu einer Verminderung des HDL-Cholesterins (Katan 1998, Yu-Poth et al. 1999).

Bisher gibt es aber keine offizielle Empfehlung, den Verzehr viskoser löslicher Ballaststoffe zu erhöhen. In den USA dürfen Haferballaststoffe und mit Psyllium angereicherte Produkte als cholesterinsenkend beworben werden. Psyllium wird in den USA zur Anreicherung von Frühstückscerealien verwendet; in Deutschland hat es gegenwärtig den Status eines Arzneimittels und ist als Abführmittel im Handel. Über natürliche, nicht angereicherte Lebensmittel läßt sich die Zufuhr viskoser Ballaststoffe nur begrenzt erhöhen. Für 10 g Haferballaststoffe müßten ca. 110-120 g Haferflocken oder 65-90 g Haferkleieprodukte verzehrt werden. Pektin kommt in Obst und Gemüse in relativ geringen Mengen vor (ca. 0.5-1.0 g/100 g) und besitzt andere physikalische Eigenschaften als isoliertes Pektin (Morris 1992). Bei strikt kontrollierter Kost führte der tägliche Verzehr von ca. 6 g Pektin in Form von 500-600 g Karotten nicht zu einer Senkung des Plasmacholesterins (Wisker et al. 1994).

Der cholesterinsenkende Effekt viskoser Ballaststoffe scheint vor allem dadurch zustande zu kommen, daß sie die Resorption von Gallensäuren, evtl. auch von Cholesterin, beeinflussen. Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin gebildet, in die Gallenblase als Speicherorgan sezerniert und für die Verdauung der Nahrungsfette in den Dünndarm abgegeben. Am Ende des Dünndarms wird der weitaus größte Teil dieser Gallensäuren zurückresorbiert und erneut in den sog. enterohepatischen Kreislauf eingeschleust. Ballaststoffe, die die Viskosität des Dünndarminhaltes erhöhen, vermindern die Rückresorption von Gallensäuren, z.T. auch die Resorption von Cholesterin (Nagengast 1992). Die Leber reagiert auf das geringere Angebot an Gallensäuren u.a. damit, daß sie vermehrt Cholesterin aus dem Plasma für die Neubildung von Gallensäuren aufnimmt. Als Folge sinkt die Cholesterinkonzentration im Plasma ab.

Daß mit dem Verzehr viskoser Ballaststoffe vermehrt Gallensäuren in den Dickdarm gelangen, kann zumindest theoretisch auch negative Wirkungen haben. Der größte Teil dieser Gallensäuren wird von den Dickdarmbakterien zu sog. sekundären Gallensäuren umgewandelt (Nagengast 1992). Lösliche sekundäre Gallensäuren wirken zytotoxisch und stimulieren die Zellteilung. Da sie in Tierversuchen das Wachstum von Dickdarntumoren förderten, gelten sie als Promotoren für die Entstehung von Dickdarmkrebs (nach Cheah 1990). Erhöhte Konzentrationen löslicher sekundärer Gallensäuren in den Fäzes sind daher kritisch zu beurteilen. Beim Verzehr viskoser Ballaststoffe kann nicht nur die absolute Menge (Nagengast 1992), sondern auch die Konzentration von sekundären Gallensäuren im Dickdarm ansteigen, wenn diese Ballaststoffe das Stuhlgewicht nur wenig erhöhen (Hill & Fernandez 1990). Allerdings gibt es hierzu beim Menschen nur sehr wenige Daten. Bevor der jahrelange Verzehr viskoser Ballaststoffe zur Cholesterinsenkung empfohlen wird, wäre es wünschenswert, ihren Einfluß auf die Ausscheidung an löslichen sekundären Gallensäuren beim Menschen zu untersuchen.

### **Schlussfolgerungen**

Der Verzehr von Lebensmitteln, die mit unverdaulichen Kohlenhydraten angereichert sind, z. B. von Frühstückscerealien mit Psyllium oder anderen viskosen Ballaststoffen oder von Joghurt mit Fructanen, kann mit gesundheitlichen Vorteilen verbunden sein. Es besteht hierbei aber auch die Gefahr, daß sich der Verbraucher in einer falschen Sicherheit wiegt und meint, er habe mit dem Verzehr solcher Produkte in punkto Ernährung genug für seine Gesundheit getan. In vielen epidemiologischen Studien korrelierte ein hoher Verzehr von Gemüse, Obst und Vollkornprodukten mit einem geringeren Risiko für bestimmte Zivilisationskrankheiten. Eine solche Kost besitzt in der Regel eine niedrige Energiedichte, enthält weniger tierische Lebensmittel, dafür aber genügend unverdauliche Kohlenhydrate und eine Vielzahl verschiedener pflanzlicher Verbindungen, z. B. sekundäre Pflanzenstoffe. Inwieweit und unter welchen Bedingungen sich die positive Wirkung einer solchen Kost durch den gezielten Mehrverzehr einzelner Inhaltsstoffe ersetzen oder steigern läßt, bleibt abzuwarten.

### **LITERATUR**

- Anderson JW, Allgood LD, Lawrence A et al.*: Cholesterol-lowering effects of psyllium intake adjunctive to diet therapy in men and women with hypercholesterolemia: meta-analysis of 8 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 472-479 (2000)
- Brighenti F, Casiraghi MC, Canzi E, Ferrari A*: Effect of consumption of a ready-to-eat breakfast cereals containing inulin on the intestinal milieu and blood lipids in healthy male volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53: 726-733 (1999)
- Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM*: Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 30-42 (1999)
- Buddington RK, Williams CH, Chen SC, Witherly SA*: Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 709-716 (1996)
- Cheah PY*: Hypotheses for the etiology of colorectal cancer - an overview. *Nutr. Cancer* 14: 5-13 (1990)
- Clydesdale FM*: A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr. Rev.* 55: 413-422 (1997)
- Coudray C, Bellanger J, Castiglia-Delavaud C et al.*: Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 375-380 (1997)
- Coussement PAA*: Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *J. Nutr.* 129: 1412S-1417S (1999)
- Davidson MH, Maki KC*: Effects of dietary inulin on serum lipids. *J. Nutr.* 129: 1474S-1477S (1999)
- Delzenne N, Aertssens J, Verplaetse H et al.*: Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Life Sci.* 57: 1579-1597 (1995)
- Department of Health*: Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease. Report on Health and Social Subjects 46. London HMSO 1994
- DeVries W, Stouthamer AH*: Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum* var *pennsylvanicus*. *Biochim. Biophys. Acta* 136: 415-425 (1967)
- Gibson GR*: Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* 129: 1438S-1441S (1999)
- Gibson GR, Beatty EB, Wang X, Cummings JH*: Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108: 975-982 (1995)

- Gibson GR, Wang X*: Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 412-420 (1994)
- Gibson GR, Saavedra JM, Macfarlane S, Macfarlane GT*: Probiotics and intestinal infections. In: *Probiotics: Therapeutic and other beneficial effects* (Fuller R, ed.) pp.10-39. Chapman & Hall, London (1997)
- Hill MJ, Fernandez F*: Bacterial metabolism, fiber, and colorectal cancer. In: *Dietary fiber. Chemistry, physiology, and health effects* (Kritchevsky D, Bonfield C, Anderson JW, eds) pp. 417-429 (1990)
- Hornstra G, Barth CA, Galli C et al.*: Functional food science and cardiovascular system. *Br. J. Nutr.* 80: Suppl. 1: S113-S146 (1998)
- Jackson KG, Taylor GRJ, Clohessy AM, Williams CM*: The effect of daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. *Br. J. Nutr.* 82: 23-30 (1999)
- Jenkins DJA, Kendall CWC, Vuksan V*: Viscous fibers, health claims, and strategies to reduce cardiovascular disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 401-402 (2000)
- Johnson IT*: The influence of dietary fibre on lipid digestion and absorption. In: *Dietary fibre - A component of food. ILSI Human Nutrition Reviews.* (Schweizer TF, Edwards CA, eds), pp.167-180. Springer-Verlag, London (1992)
- Katan MB*: Effect of low-fat diets on plasma high-density lipoprotein concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 573S-576S (1998)
- Kleesen B, Sykura B, Zunft H-J, Blaut M*: Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1397-1402 (1997)
- Kok N, Roberfroid M, Robert A, Delzenne N*: Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br. J. Nutr.* 76: 880-891 (1996a)
- Kok N, Roberfroid M, Robert A, Delzenne N*: Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism* 45: 1547-1550 (1996b)
- Levrat MA, Rémésy C, Demigné C*: High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. *J Nutr* 121: 1730-1737 (1991)
- Luo J, Rizkalla SW, Alamowitch C et al.*: Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 939-945 (1996)
- Mitsuoka T, Hikada H, Eida T*: Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. *Nahrung* 31: 5-6, 427-436 (1987)
- Morris ER*: Physico-chemical properties of food polysaccharides. In: *Dietary fibre - A component of food. ILSI Human Nutrition Reviews.* (Schweizer TF, Edwards CA, eds), pp. 41-56. Springer-Verlag, London (1992)
- Nagengast FM*: Dietary fibre and bile acid metabolism. In: *Dietary fibre - A component of food. ILSI Human Nutrition Reviews.* (Schweizer TF, Edwards CA, eds), pp. 217-231. Springer-Verlag, London (1992)
- Ohta A, Ohtsuki M, Hosono A et al.*: Dietary fructooligosaccharides prevent osteopenia after gastrectomy in rats. *J. Nutr.* 128: 106-110 (1998)
- Pedersen A, Sandström B, Van Amelsvoort JMM*: The effect of ingestion of inulin on blood lipids and gastrointestinal symptoms in healthy females. *Br J. Nutr.* 78: 215-222 (1997)
- Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E et al.*: Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA* 275: 447-451 (1996)

- Roberfroid MB*: Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *J. Nutr.* 129: 1398-1401 (1999)
- Taguchi A, Ohta A, Abe M et al.*: The influence of fructo-oligosaccharides on the bone of model rats with ovariectomized osteoporosis. *Sci. Rep. Meiji Seika Kaisha* 33: 37-44 (1994)
- Trautwein EA, Rieckhoff D, Erbersdobler HF*: Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters. *J. Nutr.* 128: 1937-1943 (1998)
- Trock B, Lanza E, Greenwald P*: Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: Critical review and meta-analysis of the epidemiologic evidence. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 650-661 (1990)
- Van den Heuvel EGHM, Schaafsma G, Muys T, van Dokkum W*: Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and nonheme iron absorption in young, healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 445-451 (1998)
- Van den Heuvel EGHM, Muys T, van Dokkum W, Schaafsma G*: Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 544-548 (1999)
- Wisker E, Schweizer TF, Daniel M, Feldheim W*: Fiber-mediated effects of raw and processed carrots in humans. *Br. J. Nutr.* 72: 579-599 (1994)
- Wolk A, Manson JE, Stampfer MJ et al.*: Long-term intake of dietary fiber and decreased risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 281: 1998-2004 (1999)
- Wynder EL, Stellman SD, Zang EA*: High fiber intake. Indicator of a healthy lifestyle. *JAMA* 275: 486-487 (1996)
- Yamashita K, Kawai K, Itakura M*: Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr. Res.* 4: 961-966 (1984)
- Yu-Poth S, Zhao G., Etherton T, et al.*: Effects of the National Cholesterol Education Program's Step I and Step II dietary intervention programs on cardiovascular disease risk factors: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 632-646 (1999)



## Leinsamen - Lebensmittel mit funktionellen Eigenschaften

*Walter Feldheim*

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

### ***Linseed - a potential functional food***

*Linseed is an excellent source of dietary fibre, alpha-linolenic acid and lignans. The quantity of seeds required to prevent constipation is greater than that required for adequate alpha-linolenic acid and lignan supply. The release of nutrients and the bulking capacity are both affected by the particle size of the seeds. Nutrients such as alpha-linolenic acid will only be available if the seeds are at least partly ground. With respect to bulking capacity, whole seeds may be the most effective form.*

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, CAU Kiel, Düsternbrooker Weg 17, D-24105 Kiel

### ***Einleitung***

Funktionelle Lebensmittel sind keine Entdeckung der Neuzeit. Sehr viel früher war bekannt, daß in Lebensmitteln neben lebensnotwendigen Nährstoffen und Energieträgern weitere Stoffe enthalten sind, die sich günstig auf die Erhaltung und Wiederherstellung der Gesundheit auswirken können. Das Jahrtausende alte hippokratische Prinzip "Deine Nahrung sei auch Deine Medizin" könnte als Leitsatz für die funktionellen Lebensmittel gelten. Während uns dieses Wissen verloren gegangen ist -Kalorienberechnung, Vitamindosierung und Entfernung des scheinbaren Ballasts in Lebensmitteln galten bisher als wichtiger - ist im asiatischen Kulturkreis das aus alter Erfahrung stammende Wissen des Zusammenhangs zwischen Lebensmitteln und Gesundheit erhalten geblieben. Die höchste Lebenserwartung haben japanische Männer und Frauen, ihr Ernährungsverhalten spielt dabei eine wichtige Rolle.

Mit dem Leinsamen soll ein altes Lebensmittel vorgestellt werden, das sich früher großer Wertschätzung erfreute, heute jedoch nur noch in Apotheken und Reformhäusern als Abführmittel erhältlich ist. Regional ist die Verwendung von Leinöl als Bestandteil von Gerichten (Pelkartoffeln mit Quark und Leinöl als Spezialität im Spreewald) anzutreffen. Manche Backwaren, Riegel und Müslis enthalten Leinsamen, allerdings meist nur in geringen Mengen. Das war in vergangenen Jahrhunderten ganz anders und die botanische Bezeichnung für Lein oder Flachs, *Linum usitatissimum* = der Allernützlichste, läßt die große Bedeutung des Leins sowohl als Faserpflanze zur Herstellung von Leinen und als Öllein für Ernährungszwecke

erkennen. Die Verwendung von Lein läßt sich Jahrtausende zurück verfolgen (Judd 1995). In einem Grab der Totenstadt von Theben in Oberägypten aus der 12. Dynastie (etwa 2000 Jahre v. Chr.) wurde ein Gefäß mit Leinkapseln als Nahrungsvorrat für das Jenseits vorgefunden. Die Leinkapseln entsprachen in ihrer Anlage dem heutigen Lein, sie waren etwas kleiner.

Für die menschliche Ernährung ist von Bedeutung, daß der Leinsamen eine Ölsaat mit hohem Lipidanteil ist; gleichzeitig ist der Proteingehalt des Samens beachtlich. Kohlenhydrate sind nur in Form unverdaulicher Ballaststoffe vorhanden. Tab. 1 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des Leinsamens (Bhatty 1995).

Tabelle 1: Zusammensetzung von Leinsamen

	Bereich	Mittelwert
Protein (g/100 g)	17 - 33	21
Fett (g/100 g)	21 - 44	42
Ballaststoffe (g/100 g)	24 - 37	30
Asche (g/100 g)	2 - 6	5
Energie (kcal/kJ/100 g)		450/1910

Drei Gruppen von Inhaltsstoffen geben dem Leinsamen eine besondere Bedeutung für die Gesundheit und machen ihn damit zu einem funktionellen Lebensmittel: Ballaststoffe, Lignane und alpha-Linolensäure.

### ***Ballaststoffe***

Wegen der in der Epidermis der Samenschale enthaltenen, schleimbildenden Nicht-Stärke-Polysaccharide wird Leinsamen in der Naturheilkunde als Schleimdroge geführt (Weiss & Fintelmann 1997). Traditionell wird er als Hausmittel gegen Gastritis, als "Hustenlöser" und zur Vorbeugung und Behandlung der Obstipation eingesetzt (Schilcher et al. 1986, Kolodziejczyk & Fedek 1995). Die Ballaststoffe der Epidermis der Samenschale sind relativ gut in Bezug auf ihre Zusammensetzung und physikalischen Eigenschaften (Schleimbildung) untersucht (Wannenberger et al. 1991, Cui et al. 1994), sie stellen mit 4-8 g/100 g Samen aber nur einen Teil der Ballaststoffe. Die Wirkung von Leinsamen auf den Dickdarm wird zwar oft mit den schleimbildenden Ballaststoffen in Verbindung gebracht, der Samen enthält jedoch erheblich mehr Ballaststoffe als die löslichen Komponenten der Samenschale. Eine Untersuchung von 6 Proben aus dem Handel ergab die in Tab. 2 angegebenen Werte.

Bei der Analyse wird stets von fein gemahlten Proben ausgegangen, um alle nachweisbaren Inhaltsstoffe zu erfassen. Da die Samenschale relativ hart ist, spielt der Grad der Zerkleinerung für die Verfügbarkeit der Inhaltsstoffe im Verdauungstrakt eine Rolle (Wisker et al. 1999). Bei der Bestimmung der Ballaststoffe wurden die Proben entsprechend der Vorschrift (Proskey et al. 1988, Amt. Sammlg. Untersuchungsmeth. 1988) fein vermahlen (1 mm Partikelgröße).

Tabelle 2: Ballaststoffgehalte in Leinsamen aus dem Handel

gesamt	Ballaststoffe		
	unlöslich	löslich	
g/100 g			
27.0	16.5	10.5	(b)
31.5	23.7	7.8	(b)
32.9	21.3	11.7	(g)
35.3	27.7	8.9	(b)
35.6	26.4	9.2	(g)
36.9	27.5	9.4	(g)

*(gravimetrische Bestimmung nach § 35 LMBG)*  
*g = gelber Samen, b= brauner Samen*

Verzehrt wird der Samen allerdings nicht fein vermahlen, sondern entweder ganz, aufgebrochen oder grob geschrotet. Daher kann der Anteil an Samenbestandteilen, der der Verdauung im Dünndarm entgeht und den Dickdarm erreicht, von den analytisch bestimmten Werten abweichen. Dies trifft auch für andere Samen zu (Cranker et al. 1997). Tab. 3 zeigt, wie sich der "scheinbare" Ballaststoffgehalt in Abhängigkeit von der Zerkleinerung darstellt und welcher Anteil des Samens nach einer in vitro-Verdauung mit Pepsin und Pankreatin "verdaut" wird.

Tabelle 3: Einfluß der Partikelgröße von Leinsamen auf den scheinbaren Gehalt an Ballaststoffen und auf den Anteil an verdaulichen Bestandteilen

Leinsamen	"Scheinbare Ballaststoffe" <sup>1)</sup>			Verdauliche Bestandteile nach der <i>in vitro</i> -Verdauung mit Pepsin und Pankreatin <sup>2)</sup>
	unlöslich	löslich	gesamt	
	g/100 g Samen			g/100 g Samen
ganz	58.8	6.7	65.5	3.8
grob geschrotet	32.1	7.3	39.4	27.4
fein vermahlen	19.5	7.8	27.3	46.5

<sup>1)</sup> Gravimetrische Bestimmung nach § 35 LMBG, aber abweichend von der Vorschrift wurden die Analysen auch mit dem ganzen oder grob zerkleinerten Samen durchgeführt. Für die in den Ballaststoffrückständen enthaltenen Reste an Protein und Asche wurden Korrekturen vorgenommen.

Bei unzerkleinerten Samen ist der Zugang der Verdauungsenzyme offensichtlich behindert, größere Anteile des Samens gelangen in den Dickdarm und erhöhen die Stuhlwirksamkeit. Von

Vollkornbrot und Weizenkleie ist ebenfalls bekannt, daß grobe Partikel einen größeren Einfluß auf das Stuhlgewicht haben als feine (Wisker et al. 1986, 1996). In Anbetracht des Vorkommens weiterer Inhaltsstoffe mit funktioneller Wirksamkeit erscheint es jedoch berechtigt, eine aufgeschlossene Form des Samens zu empfehlen, die eine Aufnahme dieser Inhaltsstoffe gestattet. Leinsamen wird zur Stuhlregulierung in Mengen von 20-45 g/Tag empfohlen (Schilcher et al. 1986, Wolf 1998), gleichzeitig sollte reichlich Flüssigkeit aufgenommen werden.

### Lignane

Lignane sind diphenolische Verbindungen, die als Glycoside in vielen Pflanzen nachweisbar sind. Die mengenmäßig bedeutendsten Verbindungen sind Secoisolariciresinol und Matairesinol. Leinsamen besitzen von allen Lebensmitteln den höchsten Gehalt an Lignan (Tab. 4).

Tabelle 4: Lignangehalte in ausgewählten Lebensmitteln

	Secoisolariciresinol	Matairesinol
	µg/100 g	
Leinsamen	53 200 - 369 900	1087
Ölsaaten	610 - 638	0
Getreidekleien	110 - 486	0
Getreidekörner	33 - 44	3 - 65
Gemüse	144 - 414	3 - 23
Früchte	84	

Adlercreutz & Mazur 1997; Thompson et al. 1990

Pflanzliche Lignane werden durch Mikroorganismen des Dickdarms unter Glycosidspaltung, Dehydrierung und Demethylierung zu Enterolacton und Enterodiol (Setchell et al. 1981, Borriello et al. 1985) in "tierische" Lignane umgewandelt. Sie unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf (Lampe et al. 1994, Kurzer et al. 1995, Adlercreutz & Mazur 1997). Die Ausscheidung erfolgt nach Konjugation mit Glucuronsäure über den Urin oder via Galle über die Fäces. Lignane haben strukturelle Ähnlichkeit mit Östrogenen und werden deshalb Phytoöstrogene genannt (Kurzer 1997). Hierzu gehören auch die in Sojabohnen vorkommenden Isoflavonoide. Aus epidemiologischen Studien hat man abgeleitet, daß diese Verbindungen möglicherweise zum Schutz vor hormonabhängigen Krebsformen wie Brust- und Prostatakrebs beitragen (Bhatty 1995, Bingham et al. 1998). Der Verzehr von gemahlenem Leinsamen führte beim Menschen zu einer erhöhten Ausscheidung von Enterolacton und Enterodiol (Shultz et al. 1991, Lampe et al. 1994, Kurzer et al. 1995, Cunane et al. 1995). Weitere Studien am Menschen sind unbedingt erforderlich.

### alpha-Linolensäure

Leinsamenlipide haben einen hohen Anteil an alpha-Linolensäure (C 18:3 n-3), der für pflanzliche Öle ungewöhnlich ist und die "trocknenden" Eigenschaften und die Oxidationsempfindlichkeit der aus traditionellen Öleinsorten hergestellten Öle bedingt. Im ganzen Samen ist der Lipidanteil vor Oxidation geschützt. Einen Vergleich der Fettsäurezusammensetzung von Leinöl und Sojaöl zeigt

Tab. 5. Im Gegensatz zu den alten Leinölsorten mit hohem Gehalt an alpha-Linolensäure haben Neuzüchtungen (z.B. Linola) nur geringe Gehalte und dafür einen höheren Anteil an Linolsäure (C 18:2 n-6) oder Ölsäure. Diese Verschiebung verbessert zwar die Stabilität des Öls gegen Autoxidation, führt jedoch zu einem weitgehenden Verlust einer potentiell funktionellen Eigenschaft des Öls.

Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung von Leinöl im Vergleich zu Sojaöl

Fettsäure	Leinöl <sup>1</sup> (konventionelle Sorten)	Leinöl <sup>1</sup> (spezielle Züchtung)	Sojaöl <sup>2</sup>
	g/100 g Fettsäuren		
Palmitinsäure	5.2 - 9.7	8.7 - 9.8	6.7 - 14.5
Stearinsäure	3.0 - 5.3	4.7 - 5.5	0.5 - 8.9
Ölsäure	16.9 - 35.1	16.1 - 33.5	14.3 - 28.7
Linolsäure	14.6 - 15.9	50.7 - 67.3	35.6 - 57.2
α-Linolensäure	40.1 - 58.8	1.6 - 2.4	1.9 - 14.7

<sup>1</sup> Bhattay 1995; <sup>2</sup> Souci, Fachmann, Kraut 1994

alpha-Linolensäure wird bei gesteigerter Zufuhr vermehrt in Plasmatriglyceride und Plasmaphospholipide eingebaut (Cunnane et al. 1995, Layne et al. 1996) und reichert sich auch im Fettgewebe an (Cunnane et al. 1995). Im Stoffwechsel können durch Kettenverlängerung essentielle längerkettige Fettsäuren vom n-3 -Typ gebildet werden. Die Biosynthese scheint jedoch im Vergleich zu den Fettsäuren vom n-6 -Typ langsamer zu erfolgen und weniger effektiv zu sein. Die längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vor allem in Fettfischen (Fischölen) enthalten und können auch direkt aufgenommen werden. Sie beeinflussen die Fluidität und Struktur der Zellmembran und damit deren Funktionen (Salter & White 1996). Die Fettsäuren sind Vorstufen von Eicosanoiden, die als Gewebshormone gelten und u.a. an der Blutgerinnung (Thrombozytenaggregation), der Regulation des Blutdrucks und an entzündlichen Prozessen beteiligt sind (WHO FAO Joint Comm. 1995). Eine höhere Aufnahme an alpha-Linolensäure war günstig für die Sekundärprophylaxe von Herzinfarkten (DeLorgeril et al. 1994). Unter präventiven Gesichtspunkten wird ein Verhältnis von n-6- zu n-3-Fettsäuren von 5:1 empfohlen (Wolfram 1998). Dies entspricht etwa der Aufnahme von 10 g Leinsamen/Tag.

### **Cyanogene Glycoside**

Leinsamen enthält variable Mengen an cyanogenen Glycosiden (Schilcher & Wilkens-Sauter, 1986, Mazza & Oomah, 1995). Die wichtigsten sind Linostatin und Neolinostatin, während das oft erwähnte Linamarin nur in geringen Mengen vorkommt. Beim Backvorgang scheint ein Teil der cyanogenen Glycoside zerstört zu werden (Cunnane et al. 1993). Aus den Glycosiden kann durch enzymatische Hydrolyse ( $\beta$ -Glucosidase) in schwach saurem Milieu Blausäure freigesetzt werden. Im stärker sauren pH-Bereich des Magens wird die  $\beta$ -Glucosidase gehemmt, die Hydrolyse ist gering (Schilcher et al. 1986) und vom Zerkleinerungsgrad des Leinsamens abhängig. Über eine Freisetzung von Blausäure durch mikrobielle  $\beta$ -Glucosidasen im Dickdarm ist nichts bekannt. Bei einer langsamen Freisetzung werden unterhalb der toxischen Schwelle

liegende Cyanidmengen im Körper in das weniger toxische Thiocyanat umgewandelt, das mit dem Urin ausgeschieden wird. Der Verzehr von Leinsamen führte zur Erhöhung der Konzentration von Thiocyanat im Blut und der Ausscheidung im Urin. Der Verzehr von Leinsamen in den verwendeten Mengen (bis 50 g) wird als sicher angesehen (Schulz et al. 1981, Schlicher et al. 1986, Cunnane et al. 1993).

### **Schlussfolgerungen**

Die funktionellen Eigenschaften des Leinsamens beruhen auf seinen hohen Gehalten an Ballaststoffen, Lignan und alpha-Linolensäure. Ballaststoffe sind für eine normale Funktion des Verdauungstrakts unerlässlich. Bei der Aufnahme von Ballaststoffen mit der Kost besteht bei Erwachsenen eine Lücke von mindestens 10 g/Tag, die in der Bevölkerung zu einem hohen Anteil an Obstipation führt, besonders bei Frauen und älteren Menschen. Lignane könnten als Phytohormone möglicherweise das Risiko herabsetzen, an Brustkrebs zu erkranken. alpha-Linolensäure ist über ihre Metabolite, die Eicosanoide, an verschiedenen Prozessen beteiligt, die als gesundheitsfördernd anzusehen sind. Durch den Verzehr relativ geringer Mengen an Leinsamen kann die Zufuhr dieser bioaktiven Substanzen verbessert werden, wobei allerdings die Verfügbarkeit bzw. die Wirkung von der Zerkleinerung des Samens abhängt. Obgleich über Lignane und alpha-Linolensäure keine abschließenden Untersuchungen vorliegen, sollte Leinsamen wieder einen festen Platz in unserer Ernährung einnehmen.

### **Literatur**

- Adlercreutz H, Mazur W (1997): Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann. Med.* 29: 95-120
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden LMBG (1988): Methode 00.0018, Beuth. Berlin-Köln
- Bhatty R S (1995): Nutrient composition of whole flaxseed and flaxseed meal. In: *Flaxseed in Human Nutrition*. (Cunnane SC, Thompson LU, eds), pp. 22-42, AOCS Press, Champaign, Illinois
- Bingham S, Atkinson C, Liggins J, et al. (1998): Phyto-oestrogens: where are we now? *Br. J. Nutr.* 79: 393-406
- Borriello SP, Satchell KDR, Axelson M, Lawson AM (1985): Production and metabolism of lignans by human faecal flora. *J. Appl. Bacteriol.* 58: 37-43
- Cranker KJ, Phillips, KM, Gonzales, MCRV, Stewart KK (1997): Effect of seeds on bile-enzymatic-gravimetric analysis of total dietary fiber. *J. AOAC Internat.* 80: 95-97
- Cui W, Mazza G, Biliaderis CG (1994): Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1891-1895 (1994)
- Cunnane SC, Ganguli S, Menard C et al. (1993) : High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br. J. Nutr.* 69: 443-453
- Cunnane SC, Hamadeh MJ, Liede AC et al. (1995): Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 62-68
- DeLorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P et al. (1994): Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343: 1454-1459
- Judd A (1995): Flax - some historical considerations. In: *Flaxseed in Human Nutrition*. (Cunnane SC, Thompson LU, eds), pp. 1-10, AOCS Press, Champaign, Illinois
- Kolodziejczyk PP, Fedec P (1995): Processing flaxseed for human consumption. In: *Flaxseed in Human Nutrition*. (Cunnane SC, Thompson LU, eds), pp. 1-10, AOCS Press, Champaign, Illinois (1995)

- Kurzer MS, Lampe JW, Martini MC, Adlercreutz H (1995):* Fecal lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4: 353-358 (1995)
- Kurzer MS, Xy X (1997)* Dietary phytoestrogens. *Ann Rev Nutr* 17: 353 - 381
- Lampe JW, Martini MC, Kurzer MS et al. (1994):* Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 122-128
- Layne KS, Goh YK, Jumpsen JA, Ryan EA et al. (1996):* Normal subjects consuming physiological levels of 18:3(n-3) and 20:5(n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. *J. Nutr.* 126: 2130-2140
- Mazza G, Oomah BD (1995):* Flaxseed, dietary fiber and cyanogens. In: *Flaxseed in Human Nutrition.* (Cunnane SC, Thompson LU, eds), pp. 56-81, AOCS Press, Champaign, Illinois (1995)
- Prosky L, Asp N-G, Schweizer Tjet et al. (1988):* Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 1017- 1023
- Schilcher H, Schulz V, Nissler A (1986):* Zur Wirksamkeit und Toxikologie von Semen Lini. *Z. Phytotherapie* 7: 113-117
- Schulz V, Löffler A, Pasch T et al. (1981):* Blausäurespiegel im Blut nach Leinsamen, Bittermandeln, Kaliumzyanid und Natriumnitroprussid. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 87: 1189
- Setchell KDR, Lawson AM, Borriello SP et al. (1981):* Lignan formation in man - microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet* 2: 4-7
- Shultz TD, Bonorden WR, Seaman WR (1991):* Effect of short-term flaxseed consumption on lignan and sex hormone metabolism in men. *Nutr. Res.* 11: 1089-1100
- Wannerberger K, Nylander T, Nyman M (1991):* Rheological and chemical properties of mucilage in different varieties of linseed (*Linum usitatissimum L.*). *Acta Agric. Scand.* 41: 311-319
- Weiss RF, Fintelmann V (1997):* Lehrbuch der Phytotherapie. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart
- Wisker E, Krumm U, Feldheim W (1986):* Einfluß der Partikelgröße von Getreideprodukten auf das Stuhlgewicht von jungen Frauen. *Akt. Ernähr.* 11: 208-211
- Wisker E, Daniel M, Feldheim W (1996):* Particle size of whole meal rye bread does not affect the digestibility of macronutrients and non-starch polysaccharides and the energy value of dietary fibre in humans. *J. Sci. Food Agric.* 70: 327-333
- Wisker E, Rabe E, Metzner C, Feldheim W (1999):* Zur Wirksamkeit von Leinsamen. *Ernähr. Umschau* 46: 76-81
- Wolf E (1998):* Obstipation und Laxantien. Ein Update in zehn Schritten für regelmäßig gute Geschäfte. *Pharm. Z.* 143: 11-17
- Wolfgram G (1998):* Auf das falsche Fett gesetzt? Editorial, *DGE Info* 4: 50





DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR QUALITÄTSFORSCHUNG  
(PFLANZLICHE NAHRUNGSMITTEL) E.V.  
c/o Fachgebiet Obstbau TUM 85350 Freising

XXXV. VORTRAGSTAGUNG, KARLSRUHE, 2000

## Glucosinolate in *Brassicaceae* und Möglichkeiten ihrer Beeinflussung

*Ilona Schonhof, Angelika Krumbein und Stephanie Widell*

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V.

*Glucosinolates in Brassicaceae and influence possibility*

### *Abstract*

*Brassicaceae species differ significantly in pattern and content of glucosinolates. The genotype mainly influenced the content of glucosinolates, but not the glucosinolate pattern. The contents of glucosinolates varied with daily mean temperature in all species and genotypes. Depending on genotype the photosynthetic photon flux density also effected the glucosinolate contents. Additionally, the sulphur supply influenced especially the glucosinolates glucoraphanin and glucoraphasatin. In contrast the density of spacing and water supply have little or no influence, respectively. Young and fully developed broccoli heads have more glucosinolates than broccoli heads, which show some opening flower buds. During postharvest the content of glucorapasatin decreased dramatically, while indolglucosinolates have no uniform behavior.*

Dr. Ilona Schonhof Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V. Theodor-Echtermeyer-Weg 1 D-14979 Großbeeren Telefon +049-(0)33701 / 78314  
e-mail: Schonhof@igzev.de

### **Einleitung**

Die Stoffgruppe der Glucosinolate wird nur in Pflanzen gefunden. Glucosinolate werden als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe eingestuft und mit ihren Abbauprodukten (Sulforaphan, Thiozyanate, Isothiozyanate und Indole) den bioaktiven Substanzen zugeordnet. Die Bewertung dieser Stoffgruppe für die menschliche Ernährung hat sich seit Beginn der 90iger Jahre geändert. Während bisher die goitrogene Aktivität im Vordergrund stand (LANGE et al., 1992), zeigen Tierversuche und Humanstudien, daß Glucosinolate und ihre Abbauprodukte gesundheitsfördernd durch eine hemmende Wirkung bei der Krebsentstehung und antioxidative Eigenschaften sein können (FAHEY et al. 1997, MUSK and JOHNSON 1993, WATZL und LEITZMANN 1999, ZHANG et al. 1992, ZHANG et al. 1994).

Gleichzeitig sind einige Abbauprodukte der Glucosinolate geschmacksbeeinflussend. Bei der Zerstörung der Pflanzenzellen entstehen Verbindungen, die aromawirksam sind, und z.B. bitter oder scharf schmecken (FENWICK and GRIFFITHS 1981, HERRMANN 1992, SCHMIDBAUER 1995). Das Wissen um das Glucosinolatspektrum und die Gehalte ist deshalb nicht nur aus pflanzenbaulicher Sicht, sondern auch unter ernährungswissenschaftlichen Aspekten und verbraucherorientierter Qualitätsproduktion notwendig.

### Biosynthese der Glucosinolate und ihr enzymatischer Abbau

Glucosinolate sind stickstoff- und schwefelhaltige Verbindungen, die alle eine gleiche Grundstruktur haben und sich nur in ihrem Molekülrest unterscheiden. (Abb 1). Die Aufklärung ihrer Struktur begann 1956 durch ETTLINGER und LUNDEEN.

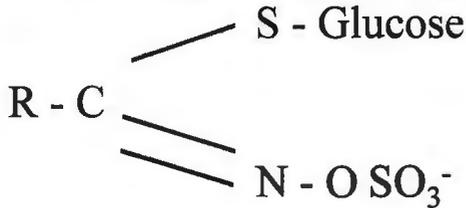


Abb. 1 Grundstruktur der Glucosinolate

In den folgenden Jahren identifizierte man über 100 verschiedene Glucosinolate. Außer bei den Monokotyledonen und einigen wenigen Unterklassen der Zweikeimblättrigen fand man in allen anderen Ordnungen in jeweils einigen Familien Glucosinolate. Auffällig war aber, daß in der Ordnung der *Caperales*, zu der die *Brassicaceae* gehören, alle Familien Glucosinolate und spezielle Zellen mit dem Enzym Myrosinase enthielten. Die wichtigsten Glucosinolate der *Brassicaceae* kann man ausgehend von ihrem Molekülrest vier Gruppen zuordnen, den kettenförmigen Alkyl- und Alkenyl-, sowie den ringförmigen Aryl- und Indolglucosinolaten.

Ausgangspunkt für die Synthese von Glucosinolaten sind Aminosäuren, zu deren Bildung Stickstoff und Schwefel nötig sind. Die meisten Glucosinolate der *Brassicaceae* werden über einen mehrstufigen Prozeß durch Kettenverlängerung der Aminosäuren Phenylalanin und Methionin gebildet. Es entsteht in Einzelschritten unter dem Einfluß verschiedener Enzyme und bei Vorhandensein von anorganischem Sulfat das jeweilige Glucosinolat (WALLSGROVE und BENETT 1995). Dieser Vorgang scheint genetisch gesteuert zu werden (MITHEN and TOROSER 1995). Einige Glucosinolate wie die Indolglucosinolate entstehen mit Hilfe von Enzymen direkt aus Aminosäuren (Tryptophan) ohne Kettenverlängerung.

WALLSGROVE und BENETT (1995) haben für Raps die zur Glucosinolatsynthese notwendigen Enzyme nachgewiesen und festgestellt, daß in licht- oder ernährungsgestrebten Pflanzen die Enzymaktivität signifikant reduziert war.

In intakten Pflanzen liegen die Glucosinolate in den beschriebenen Formen vor und gleichzeitig wurde, räumlich getrennt, in spezifischen Zellen das Enzym Myrosinase gefunden, welches in der Lage ist, die Glucosinolate zu spalten. Nach der Zerstörung der Pflanzenzellen entstehen Abbauprodukte der Glucosinolate. Vorrangig werden Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile gebildet. Isothiocyanate bewirken z. B. den typischen Geruch und Geschmack der *Brassicaceae*. Zum Teil sind die gebildeten Isothiocyanate instabil und werden weiter abgebaut - z.B. Indolyliothiocyanat zu Indol-3-Carbinol, einem Stoff, der für die menschliche Gesundheit wichtig zu sein scheint (FONG et al. 1990).

### Die Rolle der Glucosinolate in der Pflanze

Umfangreiche Untersuchungen, beginnend 1979 durch VAN ETEN und TOCKEY, zeigen, daß Glucosinolate und ihre Abbauprodukte eine entscheidende Rolle im Komplex der Beziehungen zwischen den *Brassicaceae* und ihren potentiellen Fressern, Pathogenen, Konkurrenten

und Symbionten spielen. Einerseits scheinen bestimmte Glucosinolate aber auch Isothiocyanate Lockstoffe zu sein. So wurden z. B. in Insektenfallen, bestückt mit intakten Glucosinolaten oder Isothiocyanaten, verschiedene Phyllostreta gefangen. Andererseits scheinen Glucosinolate aber auch abschreckende oder antibiotische Effekte zu haben. Von Raps, Senf und Grünkohl ist bekannt, daß :

- bei Fraß durch Insekten der Glucosinolatgehalt und hierbei vor allem der Indolylglucosinolatgehalt signifikant zunahm (KORITAS et al. 1991)
  - bei Pilzbefall sich die Gehalte aller Glucosinolate erhöhten (DOUGHTY et al. 1991)
- Insgesamt wird in der Literatur eingeschätzt, daß Glucosinolate wichtige Stoffwechselprodukte für die Pflanze sind, deren Verhalten Ansätze für Untersuchungen zur Pflanzengesundheit bieten. Ausreichendes Wissen ist aber nicht vorhanden.

### Glucosinolatgehalte in *Brassicaceae*

In der Literatur findet man eine Vielzahl von Einzeluntersuchungen zu den Glucosinolatgehalten der einzelnen *Brassicaceae* (Tab. 1).

Tab. 1 Spanne der Gesamtglucosinolatgehalte von *Brassicaceae* (als Quelle wurden Untersuchungsergebnisse aus dem IGZ und Literaturangaben verwendet)

Gemüseart	Gesamtglucosinolatgehalte mg/100g FM	Quelle der Angaben (siehe Literaturverzeichnis)
Kohlgemüse		
• Weißkohl	26 - 275	16, 12, 18, IGZ
• Rotkohl	16 - 120	16, 5, 17
• Wirsingkohl	47 - 129	5, 17
• Blumenkohl, weiß	14 - 208	16, 5, IGZ
• Blumenkohl, grün	130 - 150	IGZ
• Brokkoli	40 - 340	16, 5, 12, IGZ
• Rosenkohl	145 - 394	16, 5
• Grünkohl	40 - 140	16, 5
• Kohlrabi	109 - 200	16, 5
Kohlrübe/Steckrübe	21 - 166	16, 5
Speiserübe		
• Mairübe	21 - 340	5, IGZ
• Teltower Rübchen	790 - 890	IGZ
Chinesischer Brokkoli	2100 - 2400	IGZ
Chinakohl	17 - 136	5, 6
Rettich	34	16
Radies	4 - 218	5, IGZ
Meerrettich	500	5
Gartenkresse	121	16, 5
Brunnenkresse	95	16

Die Zusammenstellung zeigt, daß sich die Gesamtglucosinolatgehalte innerhalb der Familie, aber auch innerhalb der einzelnen Arten erheblich unterscheiden. Von den für die Ernährung wichtigen Arten sind vor allem Rosenkohl, Weißkohl und Brokkoli als glucosinolatreich hervorzuheben. Die höchsten Gehalte wurden bei den wenig gezüchteten Arten chinesischer

Brokkoli (*Brassica rapa* var. *alboglabra*) und Teltower Rübchen (*Brassica rapa* var. *rapifera*) nachgewiesen.

Tab. 2 Einzelglucosinolatanteile am Gesamtglucosinolatgehalt für ausgewählte *Brassicaceae* (als Quelle wurden Untersuchungsergebnisse aus dem IGZ und Literaturangaben verwendet)

Gemüseart	Hauptglucosinolate	Anteil %	Quelle
• Weißkohl	Indole	37%	5
	Glucosiberin	25%	
	Sinigrin	22%	
• Rotkohl	Glucoraphanin	33%	5
	Indole	26%	
• Wirsingkohl	Indole	52%	5
	Glucosiberin	29%	
• Blumenkohl, weiß	Indole	39%	IGZ
	Sinigrin	25%	
	Glucosiberin	22%	
• Blumenkohl, grün	Indole	55%	IGZ
	Glucoraphanin	21%	
	Progoitrin	12%	
• Brokkoli	Glucoraphanin	47%	IGZ
	Indole	44%	
• Rosenkohl	Indole	32%	14
	Progoitrin	21%	
	Sinigrin	20%	
• Grünkohl	Progoitrin, Indole, Glucosiberin		5, 6,
• Kohlrabi	Indole, Glucoberevin		5, 6
Kohlrübe/Steckrübe	Progoitrin	30%	5
	Indole	23%	
	Glucoserucin	14%	
	Glucoberteroiin	14%	
• Mairübe	Glucosasturtiin	30%	IGZ
	Progoitrin	30%	
	Glucoserucin	12%	
• Teltower Rübchen	Glucosasturtiin	46%	IGZ
	Glucoserucin	18%	
	Progoitrin	11%	
Chinesischer Brokkoli	Glucosinapin	48%	IGZ
	Glucoraphanin	27%	
	Progoitrin	16%	
Chinakohl	Indole	38%	5
	Glucobrassicinapin	16%	
	Glucosasturtiin	14%	
Rettich	Glucoraphasatin	>90%	9
Radies	Glucoraphasatin	>90%	IGZ
Gartenkresse	Glucoscheirolin		5
Brunnenkresse	Glucosasturtiin		5
Meerrettich	Sinigrin		5

Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist aber auch das Spektrum der einzelnen Glucosinolate und ihr Anteil am Gesamtglucosinolatgehalt entscheidend für die gesundheitliche Wirkung sowie für den Geschmack.

Betrachtet man die Einzelglucosinolate, zeigen sich deutliche Unterschiede bei den einzelnen Arten (Tab. 2). Es unterscheiden sich sowohl das Glucosinolatspektrum als auch der Anteil der einzelnen Glucosinolate an diesem Spektrum.

Hauptglucosinolate der meisten Kohlgemüse sind Indolglucosinolate, gefolgt von Sinigrin und Glucoiberin und vor allem bei älteren Rosenkohlsorten und Grünkohl dem bitter schmeckenden Progoitrin. Das Glucoraphanin, die Vorstufe des gesundheitsfördernden Sulforaphan, wurde als Hauptglucosinolat in Brokkoli, grünem Blumenkohl sowie in Rotkohl nachgewiesen.

Die *Brassica* chinesischer Herkunft unterscheiden sich in ihrem Spektrum. Im chinesischen Brokkoli dominieren Gluconapin und Glucoraphanin, in Chinakohl auch das aus der Brunnenkresse bekannte Gluconasturtiin.

Die Wurzelgemüse Rettich und Radies enthalten zu über 90% Glucoraphasatin, das in anderen *Brassicaceae* nicht nachgewiesen wurde, während Speiserüben ebenso wie Brunnenkresse einen hohen Anteil Gluconasturtiin haben.

### Möglichkeiten der Beeinflussung der Glucosinolatgehalte

Aus dem bisher Dargestellten wird deutlich, daß die Glucosinolatgehalte der einzelnen Arten erheblich schwanken. Die Ursache dafür kann genetisch, aber auch durch Erntezeitpunkt und Anbauverfahren sowie Nachernteeinflüsse bedingt sein. Das zeigt eine Vielzahl von Versuchen, die im Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V. am Beispiel von Brokkoli aber auch bei Blumenkohl, Radies und Speiserüben durchgeführt wurden.

#### • Sorteneinfluß

Mit der Sortenwahl wird bereits entscheidend das Level an Glucosinolaten bestimmt (Tab.3).

Tab. 3 Gesamtglucosinolatgehalte verschiedener Sorten

Art	Anzahl der Sorten	Gesamtglucosinolatgehalt mg/100g FM		
		Mittelwert	Minimum	Maximum
Brokkoli	12	85	14	350
Radies	6	11	4	22
Mairüben	3	211	13	343
Teltower Rüben (Herkünfte)	3	835	789	889

Unsere Untersuchungen über mehrere Jahre zeigten, daß sich die Relation der Gehalte der Sorten zueinander im Gegensatz zu den absoluten Gehalten kaum veränderte. Zur Produktion glucosinolatreicher *Brassicaceae* muß deshalb immer der Einfluß des genetischen Potentials untersucht werden.

#### • Einfluß von Temperatur und Strahlung

Durch Anbauermine im Frühjahr, Sommer und Herbst werden unterschiedliche Tagesmitteltemperaturen und Strahlungsmengen bis zur Ernte realisiert. In unseren Untersuchungen zeigten sich deutliche Zusammenhänge zwischen diesen Faktoren und den Glucosinolatgehalten.

So stieg mit der Abnahme der Tagesmitteltemperatur der Gehalt von Glucoraphanin bei Brokkoli deutlich an. Gleichzeitig bewirkte eine hohe tägliche Strahlungssumme ein Ansteigen des Glucoraphaningehaltes (Abb.2). Der letzte Zusammenhang wurde auch für die Indolglucosinolate nachgewiesen, geringe Einstrahlungen bewirkten eine Indolglucosinolatreduzierung. Für die Alkenylglucosinolate wurden keine Zusammenhänge nachgewiesen.

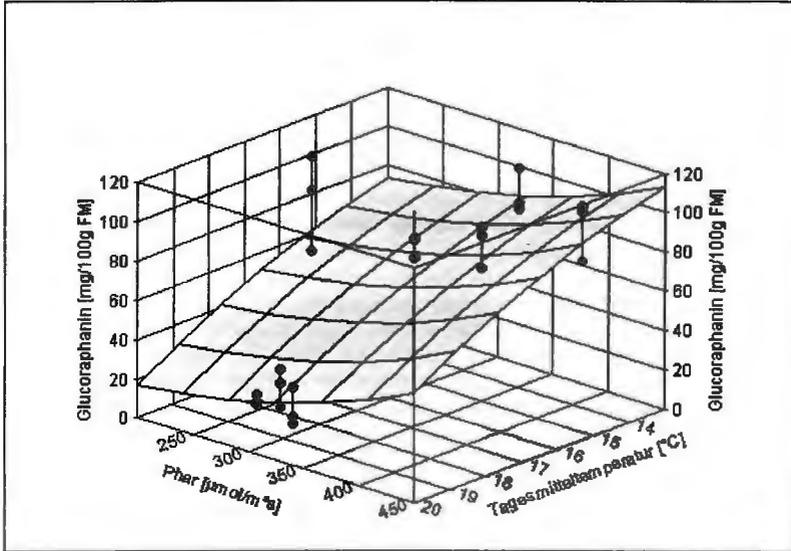


Abb. 2 Zusammenhang zwischen Tagesmitteltemperatur, Strahlung und Glucoraphaningehalt in Brokkoliröschen 'Emperor' ( $z = a + bx^2 + cy^3$ ,  $r^2 = 0,754$ )

Bei Radies zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Tagesmitteltemperatur und dem Glucoraphasatingehalt, einem Alkenylglucosinolat. Tagesmitteltemperaturen  $>16^\circ\text{C}$  bewirkten ein Ansteigen des Glucoraphasatingehaltes um im Mittel 50% gegenüber Tagesmitteltemperaturen zwischen 10 und  $15^\circ\text{C}$ .

Die bisherigen Ergebnisse machen deutlich, daß sich die Glucosinolatgruppen in Beziehung zu Temperatur und Strahlung unterschiedlich verhalten. Um z. B. Rohstoffe mit hohen Gehalten an Glucoraphanin und Indolglucosinolaten zu produzieren, sollten Anbaugelände mit kühlen Klimaten gewählt werden.

• **Einfluß des Pflanzenentwicklungsstadiums zur Ernte**

Sowohl Angaben in der Literatur als auch unsere Untersuchungen zeigen, daß die Entwicklung der Pflanze zum Erntetermin den Glucosinolatgehalt beeinflusst.

So enthielten kleine Brokkoliköpfe zu Beginn der Kopfentwicklung bei allen Sorten hohe Glucosinolatgehalte, während voll ausgewachsene Köpfe mit Beginn der Blütenöffnung generell die niedrigsten Gehalte aufwiesen (Abb. 3). Bedingt war dies durch die signifikante Abnahme des Indolglucosinolates Glucobrassicin. Ähnliche Tendenzen fanden einzelne Autoren bei Weißkohl (Kopfgröße) und begründeten dies u. a. mit der Rolle der Indolglucosinolate

beim Auxinstoffwechsel. Die Gehalte des Hauptglucosinolates Glucoraphanin zeigten während der Kopfentwicklung keine signifikanten Veränderungen.

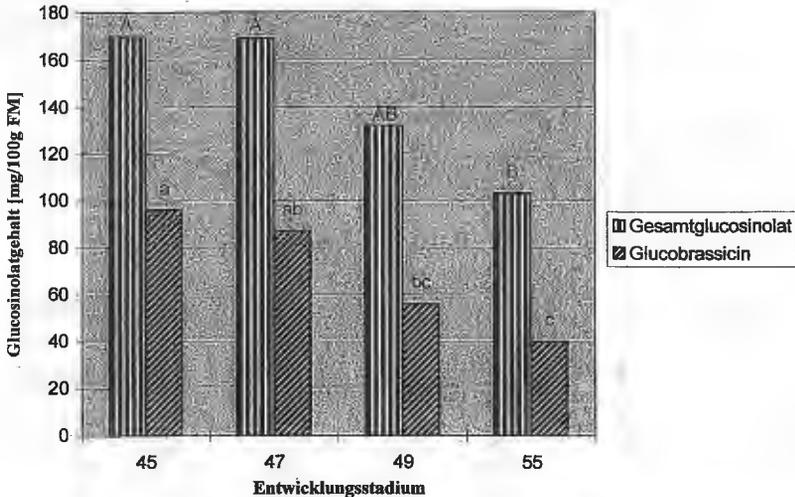


Abb. 3 Glucosinolatgehalt in Brokkoliröschen in den Entwicklungsstadien 45 bis 55 (Versuch 1, im Mittel der Sorten)

#### • Einfluß des Pflanzabstandes von Brokkoli auf den Glucosinolatgehalt

Aus der Rolle der Glucosinolate in der Pflanze ist ein Reaktion auf Streß, wie er z. B. durch Dichtpflanzung hervorgerufen wird, zu erwarten. Ein Anbauversuch mit Brokkoli zu 2 Terminen (Frühjahr und Herbst) auf unterschiedlichen Böden (Sand und Löß) durchgeführt, ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Standweite und dem Glucosinolatgehalt des Brokkoli.

- Eine sehr dichte Standweite (97.500 Pfl./ha) bewirkte ein Ansteigen des Glucoraphaningehaltes um im Mittel 37%, die Gehalte bei den Standweiten 45.000 bzw. 70.000 Pfl./ha unterschieden sich nicht.
- Bei den Indolglucosinolaten wurde kein signifikanter Zusammenhang über alle Versuche gefunden, die Ergebnisse variierten in Abhängigkeit von Anbauermin und Boden.

#### • Einfluß der Wasserversorgung auf den Glucosinolatgehalt von Brokkoli

Ein weiterer streßauslösender Faktor ist die Wasserversorgung der Pflanze. In einigen pflanzenbaulichen Versuchen bei Arabidopsis und verschiedenen Gemüsekohlen bewirkte Wasserstreß teilweise ein Ansteigen des Glucosinolatgehaltes. Unsere Untersuchungen zu Brokkoli und Radies ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Glucosinolatgehalten wobei die Bewässerungsstufen so gewählt wurden, daß noch ausreichende Erträge erzielt wurden.

- **Einfluß der Schwefelversorgung**

Da die Bildung der Glucosinolate in der Pflanze Schwefel voraussetzt, wurde bei Radies und Brokkoli der Einfluß der Schwefelversorgung untersucht. Die Untersuchungen zeigten einen signifikanten Einfluß der Höhe der Schwefelgabe auf den Glucosinolatgehalt von Brokkoli hier wieder besonders auf den Glucoraphaningehalt und bei Radies auf den Glucoraphasatingehalt. Bei beiden Kulturen wurden optimale Werte für die Schwefelversorgung gefunden, höhere Mengen beeinflussten die Gehalte nicht mehr.

- **Einfluß einer klimatischen Belastung nach der Ernte**

Auf dem Weg vom Erzeuger zum Verbraucher sind die Gemüse unterschiedlichen klimatischen Belastungen ausgesetzt. Die Ergebnisse aus mehreren Versuchen, die zu Radies vorliegen, zeigen einen starken Abbau des Glucoraphastin unter simulierten Vermarktungsbedingungen (96h 18°C, 96% Luftfeuchte), während sich die Indolglucosinolate mit insgesamt sehr geringen Gehalten uneinheitlich verhielten (Tab. 4).

Tab. 4 Änderungen der Glucosinolatgehalte von Radies nach klimatischer Belastung (am Beispiel des Sommersversuches 1998)

Glucosinolat	Gehalt mg/100g FM		Abbau um %
	frisch geerntet	96h belastet	
Progoitrin	0,26	0,15*	42
Glucoraphenin	0,19	0,10*	47
Glucoraphasatin	15,14	8,09*	47
Glucobrassicin	0,17	0,10	41
4-Methoxyglucobrassicin	0,41	0,20*	51
Gesamtglucosinolate	16,17	8,64*	47

\* signifikante Veränderung

Aufgrund der Ergebnisse werden in diesem Jahr die Auswirkung von Vorerntemaßnahmen auf den Glucosinolatgehalt in der Nachernte bei Brokkoli untersucht.

### Zusammenfassung

Zwischen den Arten der *Brassicaceae* differieren die Glucosinolatgehalte und die jeweiligen Glucosinolattmuster erheblich.

Durch den Genotyp wurde der Glucosinolatgehalt aber nicht das Glucosinolattmuster, und dabei vor allem der Glucoraphenin- und Indolglucosinolatgehalt als Vorstufe anticancerogen wirkender Stoffe sowie der Glucoraphasatingehalt, in erheblichem Umfang beeinflusst.

Bei allen Arten und Genotypen variierten die Glucosinolatgehalte in Abhängigkeit von der Tagesmitteltemperatur und z. T. (in Abhängigkeit von der Art) von der Globalstrahlung. Der Einfluß der Schwefelversorgung zeigte sich besonders bei den kettenförmigen Glucosinolaten Glucoraphenin und Glucoraphasatin. Die Anbaumaßnahmen Pflanzdichte und Wasserversorgung waren wenig bzw. nicht ausschlaggebend. Bei Brokkoli wiesen Köpfe mit einer Tendenz zur Handelsklasse II (beginnende Blütenöffnung) generell geringere Gehalte auf, als junge bzw. voll ausgebildete feste Köpfe. Versuche zum Nachernteverhalten zeigen eine erheblich Reduzierung des kettenförmigen Glucoraphasatin bei klimatischer Belastung von Radies, während sich Indolglucosinolate mit insgesamt sehr geringen Gehalten uneinheitlich verhielten.

## Literatur

1. Doughty, K: J., A. J. R. Porter, A. M. Morton, G. Kiddle, C. H. Bock and R. Wallsgrove. 1991. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. II. Response to infection by *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. Ann. appl. Biol. 118:469-477
2. Ettlinger, M. G. and A. J. Lundeen. 1956. The structure of Sinigrin and Sinalbin: an enzymatic rearrangement. J. Amer. Chem. Soc. 78:1952-1954
3. Fahey, J. W., Y. Zhang, and P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:1367-1372.
4. Fenwick, G. R. and N. M. Griffiths. 1981. The Identification of the Goitrogen(-) 5- vinyloxazolidine-2-thione (Goitrin), as a bitter Principle of Cooked Brussels Sprouts. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 172:90-92.
5. Fenwick, G. R., R. K. Heaney and W. J. Mullin 1982. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 18(2):123-201
6. Fenwick, G. R. and R. K. Heaney. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feedingstuffs. Food Chem. 11:249.
7. Fong, A.T., H. I. Swanson, R. H. Dashwood, D. E. Williams, J. D. Hendricks and G. S. Bailey. 1990. Mechanism of Anti-Carcinogenesis by Indole-3-Carbinol. Biochemical Pharmacology. 39 (1):19-26
8. Herrmann, K. 1992. Vorkommen, Gehalte und Bedeutung von Inhaltsstoffen des Obstes und Gemüses VI. Schwefelhaltige Aromastoffe der Kohlarten, Zwiebelgewächse und des Spargels. Die Industrielle Obst- und Gemüseverwertung (4):130-133.
9. Holst, B. 1997. Glucosinolate und Abbauprodukte in Cruciferen-Gemüse - Einfluß der Speisenzubereitung auf Glucosinolatkatabolismus und Aroma. Dissertation Technische Universität Berlin D 83 / FB 15 Nr. 091
10. Koritas, V. M., J. A. Lewis and G. R. Fenwick 1991. Glucosinolate responses of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). Ann. appl. Biol. 118:209-221
11. Lange, R., R. Baumgrass, M. Diedrich, K.-H. Henschel und M. Kujawa. 1992. Glucosinolate in der Ernährung - Pro und Contra einer Naturstoffklasse Teil 1. Ernährungs-Umschau. 39:252-257.
12. Lewis, J. and G. R. Fenwick. 1987. Glucosinolate Content of *Brassica* Vegetables: Analysis of Twenty-Four Cultivars of Calabrese (green sprouting broccoli, *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* subvar. *cymosa* Lam). Food Chemistry 25:259-268.
13. Mithen, R. and D. Toroser. 1995. Biochemical genetics of aliphatic glucosinolates in *Brassica* and *Arabidopsis*. In: Wallsgrove, R. M. Amino Acids and Their Derivates in Higher Plants, Society for Experimental Biology Seminar; 56, University Press, Cambridge. pp. 261-275
14. Musk, S. R. R. and I. T. Johnson. 1993. In Vitro Studies into Toxicity of Allyl Isothiocyanate towards Transformed Human Tumor Cells. In: K. W. Waldron, I. T. Johanson, and G. R. Fenwick (ed.) The Royal Society of Chemistry, p. 286-289.
15. Schmidbauer, S. 1995. Nicht nutritive bioaktive Inhaltsstoffe in Obst und Gemüse. Ernährungs-Umschau (Teil Ernährungslehre und -praxis). 42 (2):B5-B8.
16. Sones, K., R. K. Heaney and G. R. Fenwick. 1984. An Estimate of the Mean Daily Intake of Glucosinolates from Cruciferous Vegetables in the UK. J. Sci. Food Agric. 35:712-720

17. Van Etten, C. H., M. E. Daxenbichler and I. A. Wolff. 1969. Natural Glucosinolates (thioglucosides) in foods and feeds. *J. Agric. Fd. Chem.* 17:483-491
18. Van Etten, C. H., M. E. Williams, P. H. Williams and W. F. Kwolek. 1976. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables: Analyses of the edible part from twenty-two varieties of cabbage. *J. Agric. Fd. Chem.* 24, 452-455
19. Van Etten, C. H. and H. L. Tookey. 1979. Chemistry and Biological Effects of Glucosinolates. In: *Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Eds. G. A. Rosenthal and D. J. Janzen. New York, Academic Press. pp. 471-500
20. Wallsgrove, R. M. and R. N. Bennett. 1995. The biosynthesis of glucosinolates in *Brassicaceae*. In: *Wallsgrove, R. M. Amino Acids and Their Derivates in Higher Plants*, Society for Experimental Biology Seminar; 56, University Press, Cambridge. pp. 243-259.
21. Watzl, B. und C. Leitzmann. 1999. *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag Stuttgart, Germany.
22. Zhang, Y., P. Talalay, C.-G. Cho, and G. H. Posner. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:2399- 2403.
23. Zhang, Y., Th. W. Kensler, C.-G. Cho, G. H. Posner, and P. Talalay. 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3147-3150.



## Einfluss von Bewässerung und N-Düngung auf Ertrag und Sulforaphangehalt von Brokkoli (*Brassica oleracea*)

*P.-J. Paschold<sup>1)</sup>, J. Kleber<sup>1)</sup>, S.T. Adam<sup>2)</sup>, A. Bognar<sup>2)</sup> und B. Tauscher<sup>2)</sup>*

<sup>1)</sup> Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Gemüsebau, Von-Lade-Str.1, 65366 Geisenheim  
E-mail: Paschold@geisenheim.fbl.fh-wiesbaden.de

<sup>2)</sup> Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Institut für Chemie und Biologie, Haid-und-Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe

Influence of irrigation and N-fertilization on the yield and the content of sulforaphane in broccoli

The influence of irrigation and N-fertilization on the yield of broccoli, cultivar 'Lord', was investigated in a long-term trial during the summertime. The highest water supply resulted in the highest yield of plant development and formation of florets, characterized as 'Handelsklasse I' (Grade I). Sulforaphane, a prominent protective component, was included in the study in order to provide a standard for internal quality. This component, a product deriving from glucoraphanin, was determined by gas chromatography after myrosinase-induced hydrolysis. The content of sulforaphane doubled by reduced water supply. The increase of N-fertilizer resulted in lower amounts of sulforaphane.

The preliminary results allow optimized water supply and ecological fertilization. The aspects of health may be brought to light and the consumer's demand may be influenced.

### Einleitung

Brokkoli ist eine der Gemüsearten, deren Anbaufläche sich in Deutschland in den letzten Jahren deutlich erhöhte. Sie stieg von 680 ha im Jahre 1992 auf 1.380 ha im Jahre 1996 (ZMP-Bilanz 1998). Die sachgerechte Versorgung der Pflanzen mit Wasser und Stickstoff stellt einen wesentlichen Faktor zur Ertragsbildung bei Brokkoli dar. In der Praxis wird nach Erfahrungen bewässert, um die Erträge zu erhöhen und zu stabilisieren. Dabei werden Ertragsreserven verschenkt, Wasser nicht immer zur richtigen Zeit und in der richtigen Menge eingesetzt und die Schonung der Umwelt erfolgt nicht optimal. Aspekte der Beeinflussung der inneren Qualität werden bisher bei der Bemessung von Wasser und Stickstoff nicht berücksichtigt, da kaum Kenntnisse vorliegen, wie diese Faktoren neben dem Ertrag wesentliche wertgebende Inhaltsstoffe beim Anbau unter den Klimabedingungen Deutschlands beeinflussen. Da epidemiologische Studien und tierexperimentelle Versuche darauf hinweisen, dass der Verzehr von Gemüse eine gesundheitsfördernde Wirkung haben kann (Block et al., 1992; Johnson et

al., 1994), sollte die Beeinflussung dieser Inhaltsstoffe künftig auch beim Anbau berücksichtigt werden, wenn der Markt diese Kriterien berücksichtigt. Insbesondere die verschiedenen Kohlarten der Gattung *Brassica* haben das Interesse der Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaftler geweckt (Verhoeven et al., 1996). In allen *Brassicaceae*, die als Gemüse genutzt werden, sind Glucosinolate enthalten, die beim Zerkleinern des pflanzlichen Gewebes und bei der Lebensmittelaufbereitung durch enzymatisch induzierte Hydrolyse ein Spektrum von Abbauprodukten freisetzen. Broccoli enthält neben anderen Glucosinolaten Methylsulfinylbutylglucosinolat (Glucoraphanin), das durch Hydrolyse, gefolgt von einer Lossen-Umlagerung, zu Sulforaphan (1-Isothiocyano-4-Methylsulfinyl-butan) abgebaut wird. Untersuchungen in Zellkulturen zeigen, dass diese Substanz krebsprotektive Eigenschaften aufweist (Barcelo et al., 1998; Zhang et al., 1992). Eine nachvollziehbare und befriedigenden Methodik zur gaschromatographischen Bestimmung von Sulforaphan ist bisher in der Fachliteratur nicht belegt, wurde jedoch in jüngster Zeit von Adam und Bogner (2000) entwickelt.

### Material und Methoden

In einem Dauerversuch der Forschungsanstalt Geisenheim wurde bei Brokkoli (Sommeranbau) der Einfluss einer differenzierten Beregnung und N-Düngung auf die Entwicklung der Gesamtpflanze und die Blumenbildung untersucht. Bei einer Standweite von 50 x 37,5 cm beträgt die Bestandesdichte 5,3 Pflanzen/m<sup>2</sup>. Der Brokkoli wurde jährlich Ende April bis Ende Mai gepflanzt. Bedingt durch Sortimentsänderungen während des langen Versuchszeitraumes wurden im Verlauf der Jahre die Sorten gewechselt (Tab. 1).

Tabelle 1: Sorten für den Brokkoli-Versuch 1992 - 1999

Jahr	Sorte	Jahr	Sorte
1994	Skiff	1997	Lord
1995	Cordula	1998	Lord
1996	Cordula	1999	Lord

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte durch Varianzanalysen mit  $\alpha = 0,05$  sowie nach Signifikanz im F-Test die Berechnung der Grenzdifferenzen für den Mittelwertvergleich mittels Tukey-Test bei der gleichen Irrtumswahrscheinlichkeit.

### Steuern der Bewässerung

Die von Doorenbos und Pruitt (1977) modifizierte Penman-Gleichung wird von der Food and Agriculture Organisation (FAO) zum Steuern der Bewässerung empfohlen und deshalb auch als Basis dieser Versuche gewählt. In Zusammenarbeit mit der Agrarmeteorologischen Beratungs- und Forschungsstelle Geisenheim wurden die klimatischen Wasserbilanzen nach der 'Geisenheimer Methode' erstellt (Paschold und Zengerle, 1997; Paschold 1999).

Die zur Bewässerungssteuerung als Standard in allen Jahren einheitlich angesetzten kc-Stadien (Variante 1) wurden in einer wägbaren Lysimeteranlage gewonnen. Dabei wurden drei Entwicklungsstadien der Pflanze unterschieden, an die auch die Gabenhöhe der Wurzelentwicklung angepasst wurde (Tab. 2).

Tabelle 2: Bewässerungsmengen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Brokkoli

Entwicklungsstadium	Beschreibung	kc-Faktor	Wassergabe (mm)
kc I	Bis zu 8 Blättern	0,5	10
kc II	Bis zu 14 Blättern	0,8	20
kc III	ab 15 Blättern	1,4	30

Diesem Standard wurde ein vermindertes Wasserangebot gegenübergestellt, um zu prüfen, ob die im Lysimeter ermittelten kc unter Feldbedingungen reduziert werden können. Deshalb wurden in den ersten Jahren zunächst die kc-Werte in einer Variante reduziert, in den Folgejahren auch eine noch weitergehende Verminderung untersucht (Tab. 3).

Tabelle 3: Untersuchungen zur Präzisierung der Bewässerungssteuerung bei Brokkoli 1994 bis 1998

Bewäss. stufe	Abkürzung	Beschreibung
1	kc*	kc I - 0,5; II - 0,8; III - 1,4
2	kc red	kc I - 0,4; II - 0,8; III - 1,2
3	kc red +	kc I - 0,4; II - 0,8; III - 1,0

Die Differenzierung konnte unter den Witterungsbedingungen des Jahres 1999 am deutlichsten eingehalten werden.

Ausgehend von der zunehmenden Bedeutung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe für eine gesunde Ernährung wurden die Untersuchungen ab 1999 durch Einbeziehung der Bundesforschungsanstalt in Karlsruhe erweitert. Aliquote Anteile der Blumen wurden fein zerkleinert, mit exogener Myrosinase inkubiert und die Hydrolyseprodukte mit Dichlormethan extrahiert. Die gewonnenen Extrakte wurden gaschromatographisch analysiert.

Das fein zerkleinerte Probenmaterial (Broccoli-Röschen mit Stielen) wurde zur Freisetzung von Sulforaphan nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 mit Myrosinase (Thioglucosidaseaktivität: 4,5 IU/g Probentrockenmasse) bei 30°C (1h) inkubiert. Nach thermischer Inaktivierung des Enzyms wurde die Aufschlusslösung zentrifugiert und filtriert. Das Filtrat wurde mit Dichlormethan extrahiert und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in tert. Butylmethylether gelöst. Als interner Standard diente Tetradecansäuremethylester, der dem Filtrat zugesetzt wurde.

Die Messprobe wurde mit Hilfe der split/splitless-Technik bei 250° C injiziert, in einer unpolaren Trennsäule (L: 15m, I.D.: 0,25mm, F.S.: 0,25µm) aufgetrennt und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors analysiert. Die Anfangsisotherme der Säule betrug 50°C, die Anstiegsrate 18°C/ min und die Endisotherme 250°C (10min.). Als Trägergas wurde Helium bei einem Druck von 2 bar verwendet.

Die vorgestellte Methode gestattet eine quantitative Bestimmung von Sulforaphan in Broccoli und anderen Kohlgemüsen im Spurenbereich. Die erhaltene Peakform ist von vergleichbarer Qualität wie diejenige von Tetradecansäuremethylester. Der Detektorresponse ist linear im Bereich einer dosierten Masse von 0,5 bis 20 ng. Die Wiederfindungsrate für den gesamten Prozess beträgt nahezu 100%. In der Regel liegen die Sulforaphangehalte von

Wiederholungsmessungen einer identischen Probe enger zusammen als die Meßwerte für zwei Aufarbeitungen (Adam und Bogner, 2000).

## Ergebnisse

### Wasserhaushalt

Im Verlauf von sieben Jahren bei Pflanzungen zwischen dem 28. 4 und dem 14. 6. benötigte der Brokkoli eine Vegetationsdauer zwischen 55 und 68 Tagen zur Ausbildung der marktfähigen Blumen. Bei der Standardbewässerung, die in allen Jahren nach einheitlichen Kriterien erfolgte, konnten ab 1995 mit den Sorten 'Cordula' und nachfolgend 'Lord' jährlich Markterträge von über 220 dt/ha erreicht werden (Tab. 4).

Tabelle 4: Anbaudaten, Erträge und Wasserverbrauch von Brokkoli bei Sommeranbau 1994 bis 1999 bei Steuerung nach klimatischer Wasserbilanz (Standardvariante)

Datum		Veg.dauer (dt/ha)			Wasser (mm)		mm Wasser/ Veg.tag
Pflanzung	Ernte	Tage	Aufwuchs	Marktertrag	Bewäss	Gesamt	
22.5.95	17.7.95	56	813	224	178	265	4,7
17.5.96	17.7.96	61	992	222	191	256	4,2
21.5.97	23.7.97	63	1013	222	90	230	3,7
30.4.98	7.7.98	68	975	240	203	322	4,7
28.4.99	29.6.99	65	1076	248	218	270	4,2

Der oberirdische Aufwuchs erreichte zwischen 813 und 1076 dt/ha. Insgesamt benötigte der Brokkoli in diesen sieben Jahren zwischen 230 und 322 mm Wasser, davon wurden zwischen 90 und 218 mm berechnet. Bezogen auf die gesamte Vegetationszeit ab Pflanzung waren für die Ertragsbildung des Brokkoli zwischen 3,7 und 4,7 mm Wasser je Tag notwendig. 1999 wurde die Versuchsanstellung modifiziert. Deshalb konnte die Wasserstaffelung zwischen allen drei Abstufungen eingehalten werden (Tab. 5).

Tabelle 5: Wasserangebot und Entwicklung des Brokkoli bei differenziertem Wasserangebot 1999

Entwicklungsabschnitt	Dimension	8-Blatt	14-Blatt	Ernte
Veg. Tage	d	34	51	65
Niederschl.	mm	16	29	52
Bewäss. kc	mm	73	143	218
Bewäss. kc red.	mm	43	113	188
Bewäss. kc red.+	mm	46	116	146
Oberird. Aufwuchs kc	dt/ha	140	626	1076
Oberird. Aufwuchs kc red.	dt/ha	106	541	1034
Oberird. Aufwuchs kc red.+	dt/ha	100	573	963

Das Gesamtwasserangebot bei der Kontrollvariante erreichte 234 mm (Abbildung. 1).

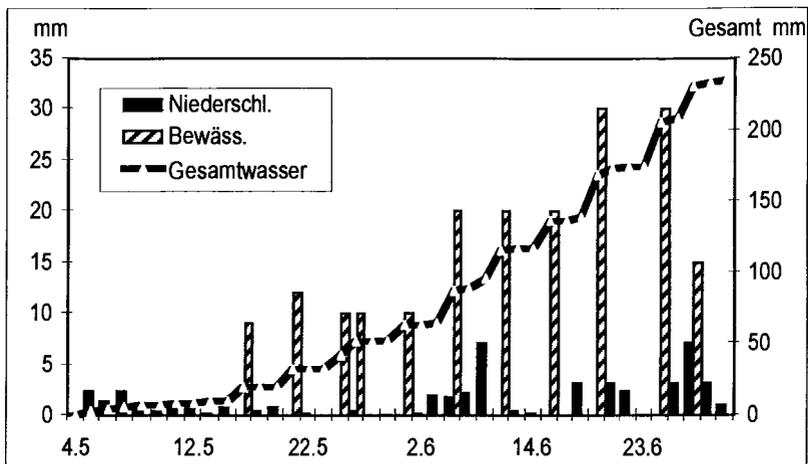


Abb. 1: Niederschläge, Beregnung und Gesamtwasserangebot bei Brokkoli nach Geisenheimer Steuerung 1999

Die Pflanzen hatten nach fünf Wochen das 8-Blatt-Stadium und eine Masse von 140 dt/ha erreicht. Bei einer um 30 mm niedrigeren Beregnungsmenge (kc - 0,3) wiesen die Pflanzen einen signifikant geringeren Aufwuchs von 106 dt/ha auf. Im nachfolgenden Entwicklungsabschnitt bis zum 14-Blatt-Stadium nach 51 Tagen hatten die Pflanzen der Kontrollvariante (kc - 0,8) eine Masse von 626 dt/ha gebildet (Tab. 6).

Tabelle 6: Entwicklung des Brokkoli 1999 bei differenzierter Bewässerung

Var. Nr.	Bezeichnung	Pflanzung	8-Blatt	14-Blatt	Ernte
1	Bewäss. kc	0	89	172	270
2	Bewäss. kc red.	0	59	142	240
3	Bewäss. kc red.+	0	62	145	198
1	Oberird. Aufwuchs kc	1,7	140	626	1076
2	Oberird. Aufwuchs kc red.	1,7	106	541	1034
3	Oberird. Aufwuchs kc red.+	1,7	100	573	963

Die in der ersten Phase vermindert bewässerten Pflanzen hatten eine Masse von 541 dt/ha gebildet, obwohl sie nachfolgend die gleiche Wassermenge wie die Kontrollvariante erhielten. Die noch weitergehende Reduzierung des Wasserangebotes bei der Variante 3 setzte erst nach dem 14-Blatt-Stadium ein. Hier wurde im Gegensatz zu den anderen Varianten der kc nicht auf 1,4 erhöht, sondern nur auf 1,0. Damit wurden bei dieser Variante in den letzten zwei Wachstumswochen nur 30 mm im Gegensatz zu 75 mm Wasser bei den Varianten 1 und 2 mit jeweils appliziert. Die bis zu diesem Zeitpunkt nahezu gleichen

Pflanzenmassen der Varianten 2 und 3 entwickelten sich nachfolgend unterschiedlich. Durch das nun reduzierte Wasserangebot verminderte sich der Aufwuchs gegenüber der Vergleichsvariante um 71 dt/ha und gegenüber dem Standard um 113 dt/ha. Bei der Standardvariante (kc) wurde ein Blumentertrag von 248 dt/ha, bei der Variante 2 (kc red.) von 230 dt/ha und bei der Variante 3 (kc red.+) von 196 dt/ha erreicht.

Da ein reduzierter Aufwuchs in der ersten Wachstumsphase bis zum 8-Blattstadium zur Minderung des Ertrages führt, kann ein verminderter Wassereinsatz nicht empfohlen werden, wenn in jedem Jahr optimale Erträge erzielt werden sollen.

Alle Maßnahmen, die zu einem erhöhten Aufwuchs an Gesamtpflanzenmasse führen, lassen auch höhere Blumenträge erwarten (Abbildung 2).

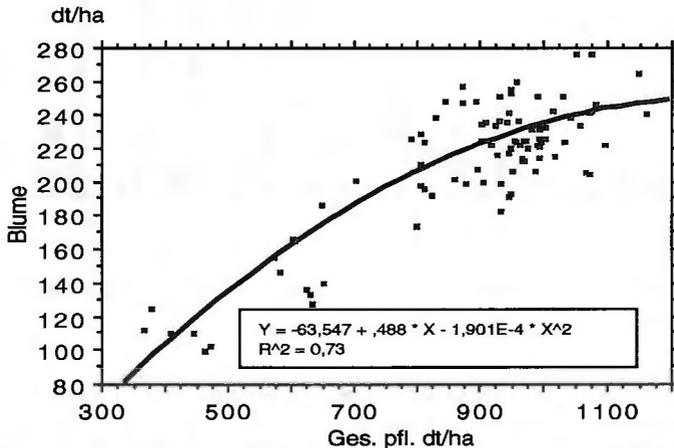


Abb. 2: Abhängigkeit des Ertrages an Brokkoli-Blumen von der Gesamtpflanzenmasse 1999

Unter Freilandbedingungen sind in mehrjährigen Versuchen kaum höhere Bestimmtheitsmaße als die erreichten 0,73 zu erwarten, da durch unvorhersehbare Niederschläge und technische Restriktionen bei der Bewässerung zeitweise Störungen der angestrebten Wasserbilanzen unvermeidlich sind.

Messungen der Bodenfeuchte zeigten bei der optimal bewässerten Variante, dass die Bodenfeuchte in der Wurzelzone im ökologisch vertretbaren Bereich zwischen 60 und 400 hPa variierte. Lediglich nach stärkeren Niederschlägen trat kurzzeitig höhere Bodenfeuchte auf.

### Sulforaphangehalt

Die Analysenergebnisse von fünf Jahren zeigen einen signifikanten Einfluss der Beregnung auf den Trockensubstanzgehalt und die Hauptnährstoffe in der Gesamtpflanze sowie der Blume.

Die Bestimmungen des Sulforaphangehaltes, der auf die Frischmasse bezogen wurde, erfolgte an drei relativ kurz aufeinander folgenden Ernteterminen eines Bestandes. Hierbei wurde keine signifikanten Änderungen der Sulforaphangehalte festgestellt (Abb. 3).

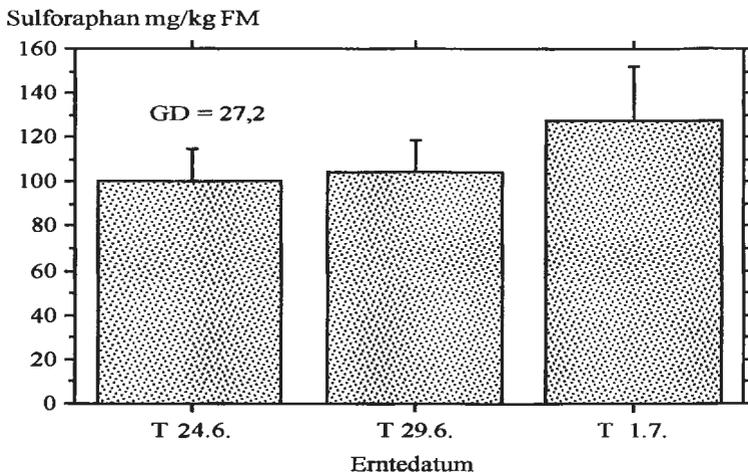


Abb. 3: Einfluss von drei Ernteterminen auf den Gehalt an Sulforaphan in Brokkoli 1999 (FM – Frischmasse; GD - Grenzdifferenz)

Es ist zu erwarten, dass die Änderungen von den konkreten Witterungsbedingungen im jeweiligen Anbaujahr abhängen und bei Wiederholung der Untersuchungen nicht immer wieder die gleiche obige Tendenz auftritt.

Eine reduzierte Bewässerung (146 mm anstelle von 218mm) bewirkte nahezu eine Verdoppelung des Sulforaphangehaltes, die statistisch signifikant ist (Abb. 4).

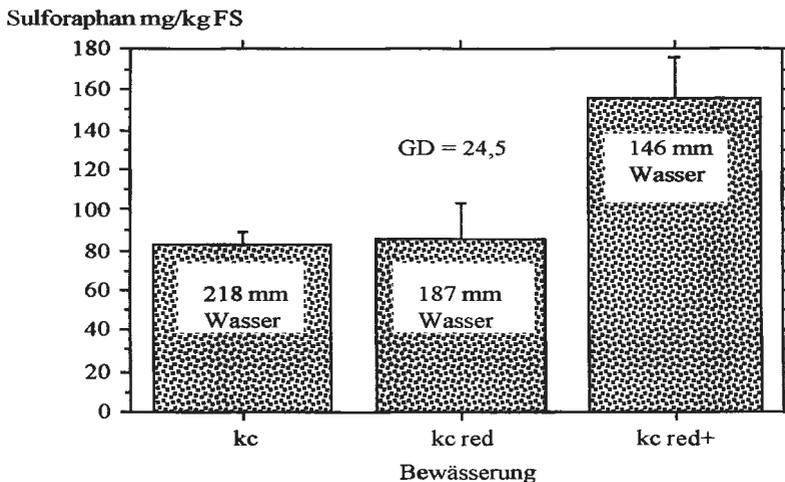


Abb. 4: Einfluss der Bewässerung auf Änderungen des Sulforaphangehaltes bei Brokkoli

Auch bei den reduzierten Wasserangeboten wurden Blumen geerntet, die den Anforderungen an Qualität der Handelsklasse I entsprechen.

Die zwei unterschiedlichen N-Düngermengen zeigten bei den zunächst einjährigen Untersuchungen einen signifikanten Einfluss dieses Faktors im Mittel aller Bewässerungsstufen und Termine, wobei sich der Gehalt mit steigender N-Düngermenge reduzierte (Abbildung 5). Ein Anbauer würde den dabei auftretenden Ertragsverlust nur dann in Kauf nehmen, wenn für Brokkoli mit erhöhtem Wertstoffgehalt künftig ein höherer Preis erzielt werden könnte.

Sulforaphan mg/kg FM

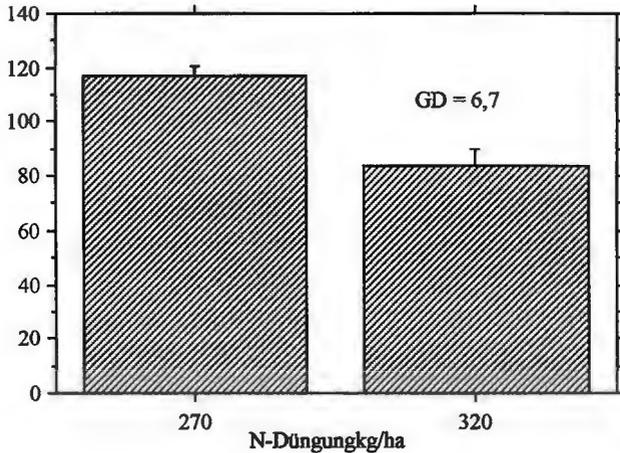


Abb. 5: Einfluss der N-Düngermenge auf Änderungen des Sulforaphangehaltes bei Brokkoli

## Diskussion

Die Qualität von Gemüse wird zunehmend nicht nur durch äußerliche Merkmale sondern auch durch die Gehalte an wertgebenden Inhaltsstoffen geprägt. Diese variieren sehr stark in Abhängigkeit von den Sorten und den Umweltbedingungen sowie den Anbaumaßnahmen. In den mehrjährigen Versuchen wurde vorrangig der Einfluss der Bewässerung auf die Erträge, Trockenstoffgehalte und Hauptnährstoffe der Pflanze bestimmt. Im Jahre 1999 erfolgte eine Ergänzung der Versuche durch Bestimmung des Gehaltes an Sulforaphan, was zu den bioaktiven Substanzen zählt.

Der Gehalt an diesen Substanzen wird aus medizinischer Sicht immer mehr als positive Eigenschaft von Gemüse hervorgehoben (Edenharder et al. 1995; Edenharder et al. 1998). Insbesondere Kohlrarten, und so auch Brokkoli, spielen eine besondere Rolle bei der Zufuhr von Glucosinolaten für die menschliche Ernährung (Kore et al. 1993; Barcelo et al. 1996; Kall et al. 1996).

Die Gehalte an Sulforaphan schwanken sehr stark in Abhängigkeit von Sorte und Umweltbedingungen (Faulkner et al. 1998; Kushad et al. 1999; Schonhoff et al. 1999). Die vorliegende Untersuchung bestätigt insbesondere die signifikante Wirkung der Bewässerung.

Die Ergebnisse zum objektiv gesteuerten Wassereinsatz ermöglichen eine präzisierte Bewässerungssteuerung und die Erstellung von Nährstoffbilanzen für eine umweltschonende Düngung unter Berücksichtigung der genannten Inhaltsstoffe auch unter Praxisbedingungen. Eine Verallgemeinerung der Aussagen kann erst erfolgen, nachdem die Untersuchungen im Jahre 2000 zu zwei Anbauterminen fortgeführt wurden.

### **Zusammenfassung**

In einem Dauerversuch wurde bei Brokkoli der Sorte ‚Lord‘ im Sommeranbau der Einfluss einer differenzierten Beregnung und N-Düngung auf die Gesamtpflanzenentwicklung und die Blumenbildung untersucht. Das höchste Wasserangebot bewirkte den höchsten Ertrag an Blumen der Handelsklasse I. Als wertgebender Inhaltsstoff wurde Sulforaphan, eine physiologisch wirksame Schutzkomponente, in die Untersuchungen einbezogen. Diese Komponente, ein Folgeprodukt von Glucoraphanin, wurde nach enzyminduzierter Hydrolyse gaschromatographisch bestimmt.

Die zunächst einjährigen Ergebnisse zeigen einen signifikanten Einfluss der Bewässerung, wobei eine Verdoppelung des Sulforaphangehalts bei reduziertem Wasserangebot beobachtet wurde. Bei steigender N-Düngermenge reduzierte sich der Gehalt an Sulforaphan.

Die Ergebnisse ermöglichen eine optimierte Bewässerungssteuerung und eine umweltschonende Düngung. Praktische Bedeutung erlangen die Untersuchungen zum Sulforaphangehalt, wenn gesundheitliche Aspekte auch die Nachfrage bzw. den Verkaufspreis beeinflussen.

### **Literatur**

Adam, S. T. und Bogner, A. (2000): Gaschromatographische Analyse von Sulforaphan in Broccoli. DGQ - 35. Vortragstagung Karlsruhe.

Barcelo, S.; Gardiner, J. M.; Gescher, A. und Chipman J. K. (1996): CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane, *Carcinogenesis* **17**, 277-282.

Barcelo, S.; Mace, K.; Pfeifer, A. M. A. und Chipman, J. K. (1998): Production of DNA strand breaks by N-nitrosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline in THLE cells expressing human CYP isoenzymes and inhibition by sulforaphane, *Mutat. Res.* **402**, 111-120.

Block, G.; Patterson, B. und Subar A. (1992) : Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutr. Cancer* **18**, 1-29.

Doorenbos, J. und Pruitt, W.O. (1977): Guidelines for predicting crop water requirements. FAO Irrigation and drainage paper 33. FAO Rome.

- Edenharder, R.; Leopold, C. und Kries (1995): Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ) and 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline(MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 98, *Mutation Res.* **341**, 303-318.
- Edenharder, R.; Frangart, J.; Hager, M.; Hofmann, P. und Rauscher, R. (1998): Protective effects of fruits and vegetables against *in vivo* clastogenicity of cyclophosphamide or benzo[ $\alpha$ ]pyrene in mice, *Food Chemical Toxicology* **36**, 637-645.
- Faulkner, K.; Mithen, R. und Williamson, G. (1998): Selective increase of the potential anticarcinogen 4-methylsulphinylbutyl glucosinolate in broccoli, *Carcinogenesis* **19**, 605-609.
- Johnson, I.T.; Williamson, G. und Musk, S.R.R. (1994): Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients? *Nutrition Res. Rev.* **7**, 175-204.
- Kall, M. A.; Vang O. und Clausen J. (1996): Effects of dietary broccoli on human *in vivo* drug metabolizing enzymes: evaluation of caffeine, oestrone and chlorzoxazone metabolism, *Carcinogenesis* **17**, 793-799.
- Kore, A. M.; Spencer, G. F. und Wallig, M. A. (1993): Purification of the  $\omega$ -(methylsulfinyl) alkyl glucosinolate hydrolysis products: 1-Isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)propane, 1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane, 4-(methylsulfinyl)butanenitrile, and 5-(methylsulfinyl)pentanenitrile from broccoli and *Lesquerella fendleri*, *J. Agric. Food Chem.* **41**, 89-95.
- Kushad, M.; Brown, A.F.; Kurilich, A.C.; Juvik, J.A.; Klein, B.P.; Wallig, M.A. und Jeffery, E.H. (1999): Variation of glucosinolates in vegetable crops of *brassica oleracea*, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1541-1548.
- Paschold, P.-J. und Zengerle, K.-H. (1997): Irrigation scheduling of vegetables to increase the effectivity of the use of water in respect of ecological aspects using lettuce in open field conditions as an example, *Acta Hort.* **449** (1), 289-295.
- Paschold, P.-J. (1999): Geisenheimer Bewässerungssteuerung-Aktuelle Empfehlungen, *Gemüse* **35**(2), 88-92.
- Schonhoff, I; Krumbein, A.; Schreiner, M.; Gutezeit, B. (1999): Bioactive substances in cruziferous products. In: *Agri-Food Quality II – Quality management of fruits and vegetables. Special publication 229*, The Royal Society of Chemistry Cambridge, UK.
- Verhoeven, D.T.H.; Goldbohm, R.A.; van Poppel, G.; Verhagen, H. und van den Brandt, P. A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* **5**, 733-748.
- Zhang, Y.; Talalay, P.; Cho, C.-G. und Posner, G.H. (1992): A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2399-2403.



## Sommer- und Wintergersten mit veränderter Kohlenhydratzusammensetzung als Quelle für diätetische Lebensmittel

W. Flamme<sup>1</sup>, G. Jansen<sup>1</sup>, G. Dongowski<sup>2</sup>, E. Gebhardt<sup>3</sup>, A. Jacobi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Streßphysiologie und Rohstoffqualität, Rudolf-Schick-Platz 3, 18190 Groß Lüsewitz

<sup>2</sup>Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Arthur-Scheunert-Allee 114-116,  
14558 Bergholz-Rehbrücke

<sup>3</sup>Institut für Getreideverarbeitung, Arthur-Scheunert-Allee 40-41, 14558 Bergholz-Rehbrücke

<sup>4</sup>Saatzucht Dr. h.c. Carsten, Lübecker Straße 62-66, 23601 Bad Schwartau

*Spring and winter barley with changed composition of carbohydrates as a source of dietary foods*

*Increase in content of starch compounds amylose or amylopectin as well as of nonstarchpolysaccharide  $\beta$ -D-glucan opens possibilities to improve the positive physiological effects of barley products on health and disease.*

*The results of interdependent projects were the development of*

- *breeding relevant methods for analysis of barley, starch isolation and characterization*
  - *breeding of barley strains with a high potential of dietary fiber*
  - *an extrusion procedure to generate resistant starch in amylose rich coarse meal without destruction of  $\beta$ -D-glucans*
- and*
- *the proof of positive physiological effects of barley extrudates, enriched in dietary fiber, in humans and rats*

*Prof. Dr. W. Flamme, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Streßphysiologie und Rohstoffqualität, Rudolf-Schick-Platz 3, 18190 Groß Lüsewitz*

### Einleitung

Weltweit hat Gerste als Nahrungsmittel einen hohen Stellenwert. In Deutschland sind im Nahrungs- und Industriebereich die Einsatzgebiete unbedeutend und beschränken sich auf den Futterbereich und die Herstellung von Malz und Bier.

Gerste besitzt in der Züchtung und Züchtungsforschung Vorteile gegenüber den anderen heimischen Getreidearten. Biotechnologische Methoden haben bereits einen festen Platz in der praktischen Pflanzenzüchtung. In der Tabelle 1 sind die Vorteile der Gerste dargestellt.

Tab. 1: Gerste – Vorteile in Züchtung und Verwertung

<p>Züchtung</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Selbstbefruchter</li> <li>- diploides Genom</li> <li>- gute Eignung für Zell- und Gewebekultur</li> <li>- umfangreiche Genkarte</li> <li>- umfangreiche DNA-Sondenbank</li> <li>- gute genetische Kenntnisse über Qualitätsparameter</li> </ul>
<p>Rohstoff für den Nahrungsbereich</p>	<p>Mutanten (Ausgangsmaterial für die Züchtung) mit hohem Gehalt an</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Amylose, Amylopektin , <math>\beta</math>-Glucanen und</li> <li>- hohem Ballaststoff-Potential</li> </ul>
<p>Futterwert Malz- und Brauqualität</p>	<p>ertragreiche Sommer- und Wintergersten mit großer Variabilität in</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vollkornanteil und Hektolitergewicht</li> <li>- Bespelzung</li> <li>- Proteingehalt und Aminosäurezusammensetzung</li> <li>- Malz- und Brauqualität</li> </ul>

Aktuelle Biotechnologieprogramme der Bundesrepublik Deutschland konzentrieren sich z.B. bei der Genomforschung an landwirtschaftlichen Nutzpflanzen auf Gerste als Modellpflanze (z.B. im Pflanzengenomprojekt GABI).

1999 wurde die erste waxy-Nacktgerste in Schweden zugelassen. Der von Nacktgersten bekannte Minderertrag und die Anfälligkeit der Sorte gegenüber Mehltau werden trotz eines erhöhten Preises einen Markt finden (MOORE, M., 1999). Für gentechnisch veränderte amylose- bzw. amylopektinreiche Gersten dürfte – ähnlich wie gegenwärtig beim Mais zu beobachten – nur eine geringe Akzeptanz beim Verbraucher zu erwarten sein.

Methoden und Ergebnisse zur Analyse des Rohstoffs Gerste, der Isolation und der Charakterisierung von Gerstenstärke

Eine Zusammenfassung der angewandten Methoden zur Bestimmung der Rohstoff- und Stärkequalität von Gersten ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Von Anbeginn der Arbeiten wurde die Leistungsfähigkeit der Stärkemutanten der Gerste über Ertrag, Tausendkorngewicht und Hektolitergewicht erfaßt. Die mitgeführten aktuellen Sorten ermöglichen im Züchtungsverlauf neben der Qualitätsbeurteilung auch die Einschätzung der für die Praxis wichtigen Ertragsleistung (JACOBI und FLAMME, 1993).

Zur Charakterisierung der Rohstoffqualität wurde der Gehalt an Protein, Stärke,  $\beta$ -D-Glucan, Amylose und Amylopektin bestimmt. Für die Bestimmung der  $\beta$ -D-Glucane wurde neben dem Screening der löslichen Glucane mit Calcofluor in einem Flow Solution-Analyser die enzymatische Bestimmung des Gesamtglucosegehaltes mit dem Megazyme-Kit genutzt

(FLAMME und JACOBI, 1997). Die Korrelation zwischen beiden Methoden lag bei  $r = 0,99$  bei deutlichen Niveauunterschieden der Mittelwerte des  $\beta$ -D-Glucangehaltes mit 3,66 % für die Calcofluormethode und 4,41 % für die enzymatische Bestimmung.

Tab. 2: Methoden zur Bestimmung der Rohstoff- und Stärkequalität von Gerste

Merkmal	Probenmatrix
<b>Ertrag</b> Tausendkorngewicht Hektolitergewicht	<b>Korn</b>
<b>Rohstoffcharakterisierung</b> Proteingehalt Stärkegehalt $\beta$ -Glucangehalt enzymatisch $\beta$ -Glucangehalt fluorometrisch Amylaseaktivität ( $\alpha+\beta$ ) $\alpha$ -Amylaseaktivität-Phadebas Verkleisterungskurve 30°/95°/55 °C Fließkurven Schrotkleister Pentosengehalt-GC Quellkurve Schrot/Wasser 30 °C Fließkurve Schrot/Wasser	<b>Schrot</b>
<b>Stärkeisolierung</b> Wasseraufnahme Extraktviskosität Stärkeausbeute Faserausbeute Schlierschichtausbeute	<b>Schrot</b>
<b>Stärkecharakterisierung</b> Amylosegehalt Blauwert R-Wert amperometrisch JBV Proteingehalt Korngrößenverteilung Verkleisterungskurve 30°/95°/55 °C Fließkurven Stärkepaste	<b>Stärke</b>

Einige Stärkemutanten weisen deutlich erhöhte Amylaseaktivitäten zur Vollreife auf. Die Aktivität der  $\alpha+\beta$ -Amylasen wurde gemäß ICC-Standard 108 und die  $\alpha$ -Amylaseaktivität

mittels Phadebas-Tablettentest bestimmt. Fallzahl und Verkleisterungskurven, bisher eindeutig Maßzahlen für den Auswuchsgrad, lassen bei den Stärkemutanten keine eindeutigen Aussagen zu, da neben dem Abbau der Biopolymeren durch Hydrolasen, auch die Höhe des Amylose/Amylopektin gehaltes die Verkleisterungsdaten beeinflussen (JANSEN und FLAMME, 2000).

Das Verhältnis von Amylose und Amylopektin im Vollschrot (Korn) wurde durch die Bestimmung der Extinktion bei  $E_{\lambda_{\max} AM} = 630 \text{ nm}$  und  $E_{\lambda_{\max} AP} = 550 \text{ nm}$  und Berechnung des konzentrationsunabhängigen R-Wertes

$$R = \frac{E_{\lambda_{\max} AM}}{E_{\lambda_{\max} AP}}$$

ermittelt (SCHONDELMAIER u.a., 1992). Reine Amylopektinstärken lagen bei einem R-Wert von 0,70, der höchste für eine amylosereiche Stärke gemessene Wert bei 1,52. Damit weichen die Mutanten sehr deutlich von den Normalstärken ( $R \approx 1,20$ ) ab, eine für die züchterische Selektion erforderliche Voraussetzung. Abweicher wurden durch amperometrische Jodtitration und die Bestimmung der Wellenlängenmaxima bei zwei Jodkonzentrationen im VIS-Spektrum zwischen 500 nm und 700 nm kontrolliert.

In der Literatur häufig unerwähnt ist der hohe Anteil von Pentosanen. Die Stärkemutanten HiAmi und waxy Oderbrucker besitzen 6,74 % bzw. 7,77 % Gesamtpentosane und 0,39 % bzw. 0,57 % lösliche Pentosane. Gegenüber Roggen sind besonders die löslichen Pentosane deutlich reduziert (Tab. 3). Sie weisen jedoch einen höheren Verzweigungsgrad auf, ausgedrückt durch das Verhältnis Arabinose/Xylose.

Tab. 3: Gehalt und Verhältnis von Arabinose/Xylose, von Gesamtpentosanen, wasserlöslichen Pentosanen und Extraktviskosität von Roggen, Gerste, Triticale und Weizen

	Pentosane lösliche und unlösliche		Pentosane lösliche		Extraktviskosität (relativ) [s]
	[%]	Arabinose/Xylose	[%]	Arabinose/Xylose	
<b>Roggen</b>	8,95	0,58	1,69	0,68	18,00
Amando	8,94	0,57	1,72	0,65	21,61
Clou	8,81	0,58	1,56	0,66	16,52
Stamm 6688	9,10	0,60	1,79	0,71	15,87
<b>Gerste</b>	7,43	0,49	0,44	0,81	8,51
waxy Oderbrucker	7,77	0,49	0,57	0,74	9,84
Oderbrucker	8,64	0,46	0,43	0,78	11,85
Glacier	6,56	0,50	0,38	0,86	7,89
Hi Ami	6,74	0,52	0,39	0,86	4,45
<b>Triticale</b>	7,13	0,64	0,55	0,98	3,42
Stamm 111	7,21	0,61	0,62	0,94	4,78
Alamo	7,05	0,66	0,49	1,01	2,07
<b>Weizen</b>	6,30	0,60	0,63	0,87	2,77
Zentos	6,30	0,60	0,63	0,87	2,77

Von HUTH, M. (1999) wurde die Viskosität wässriger Gerstensextrakte mit Lichenase vollständig abgebaut. Daraus ist auf einen geringen Anteil der Pentosane an der gemessenen Extraktviskosität zu schließen.

Das Quellvermögen und der Abbau der Quellstoffe werden durch Quell- und Fließkurven ohne und mit Milchsäure (zur Enzyminhibierung) charakterisiert (JANSEN und FLAMME, 2000). Unabhängig vom Molekulargewicht, der Viskosität und deren Beeinflussung durch zellwandlytische Enzyme, ergibt sich für Gersten ein Gehalt an löslicher verdaulicher Rohfaser ( $\beta$ -D-Glucose und Pentosane) von 12 – 14 %, der deutlich über dem der anderen Getreidearten liegt.

Zur Stärkeauswaschung wurde ein Kleberauswaschgerät (Glutomatik, Fa. Perten) mit einer Flutenrinne kombiniert. Als Rückstand im Knetter verbleiben Faserbestandteile (Abb. 1).

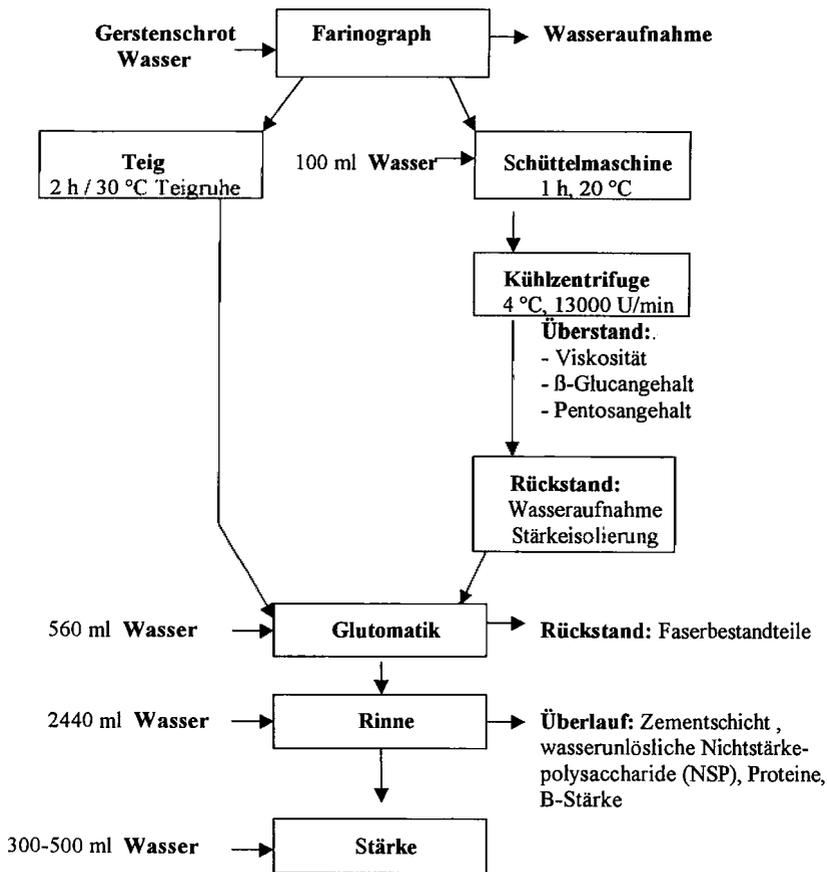


Abb. 1: Isolierung von Stärke aus Gerstenvollschrot

Der erste Schritt der Stärkeisolation, die Extraktion mit Wasser, wurde zur Ermittlung der Wasseraufnahme des Gerstenschrotes am Sediment und zur Bestimmung der Viskosität und der Nichtstärkepolysaccharide (NSP) an den Extrakten (Überstand) genutzt.

Besonderer Wert wurde auf eine Bilanzierung der einzelnen Trenn- und Reinigungsschritte gelegt. Neben der Stärke wurde auch die Zementschicht isoliert. Zur Bestimmung der Partikelgröße wurde die isolierte Stärke und der Überlauf (A- und B-Stärke, unlösliche Proteine und NSP) verwendet. Damit ist eine Kontrolle des Trennvorgangs gegeben. Stärke und Zement fallen im Mittel in einem Verhältnis von 2,5 : 1 an. Die Volumenverteilung gibt nur Auskunft über qualitative Eigenschaften der Fraktionen, nicht dagegen zum quantitativen Masseverhältnis. Ein wichtiges Kriterium für die Reinheit der isolierten Stärke ist der Restproteingehalt. Er wurde in der Stärke nach Kjeldahl bestimmt, eine material- und arbeitsaufwendige Methode (FLAMME u.a., 1999).

#### Analyse der Rohstoff- und Stärkequalität der Gerste mittels NahInfrarot-Spektroskopie (NIRS)

Die "nassen" Analysenmethoden sind trotz vorgenommener Rationalisierungen chemikalien-, geräte- und arbeitsintensiv. Der Schwerpunkt der Adaption der Geräte und Methoden lag auf der Minimierung der Probenmenge und der Erhöhung des Probendurchsatzes, um bereits in frühen Zuchtstadien mit der Selektion beginnen zu können.

Von den seit 1995 untersuchten Gerstenmustern, wie aktuelle Sommer- und Wintergerstensorten, Amylose-, Amylopektin- und  $\beta$ -Glucanmutanten und deren Kreuzung mit leistungsfähigen Sorten, wurden vom Vollschrot und von den isolierten Stärken im NahenInfrarot Reflexionsspektren mit dem NIRS 5000 aufgenommen. Die NIR-Spektren von Vollschrot ermöglichten die Erstellung von Kalibrationen zur Bestimmung des Gehaltes von Feuchte, Protein, Stärke,  $\beta$ -D-Glucanen, Amylosegehalt, Extraktviskosität und Verkleisterungsmaximum (JANSEN und FLAMME, 2000). Züchtungsrelevante Kalibrationen wurden auch für die wichtigsten Inhaltsstoffe und Eigenschaften der isolierten Stärke erhalten (FLAMME u.a., 1999 a; b).

In der Abbildung 2 sind die Stärkemutanten mit erhöhtem Amylose- bzw. Amylopektingehalt deutlich von den Normalformen zu unterscheiden.

#### Ergebnisse der Qualitätsanalyse von Zuchtmaterial

Aus der Literatur sind eine Reihe von nativen Mutanten der Gerste bekannt, von denen hier die amylosereiche „HiAmi“, die waxy-Gerste „waxy Oderbrucker“ und die bis zu 16 %  $\beta$ -D-Glucan enthaltende waxy-Form „Prowashunupana“ erwähnt werden sollen. Vornehmlich die Sommergersten HiAmi und waxy Oderbrucker wurden im Züchtungsprogramm der Saatzeit Dr. h.c. Carsten – Bad Schwartau mit leistungsfähigen Sommer- und Wintergersten gekreuzt. Auf diesem Weg wurde Zuchtmaterial mit guten agronomischen Leistungen (Ertrag, Krankheitsresistenz, Standfestigkeit und Kornmerkmale) unter Beibehaltung des hohen Amylose- bzw. Amylopektingehaltes erstellt. Deutlich angehoben wurde auch der Stärkegehalt der Kreuzungen im Vergleich zum Ausgangsmaterial.

Die Untersuchung des Zuchtmaterials nach den in Tabelle 2 aufgeführten Qualitätsparametern ermöglichte zudem die Auswahl amylose- bzw. amylopektinreicher Kreuzungsnachkommen mit hohem  $\beta$ -D-Glucangehalt.

Beschleunigend wirkte sich die Anwendung der Halbkornanalyse (Amylose/Amylopektin) und der Haploidentechnik auf den Zuchtfortschritt aus.

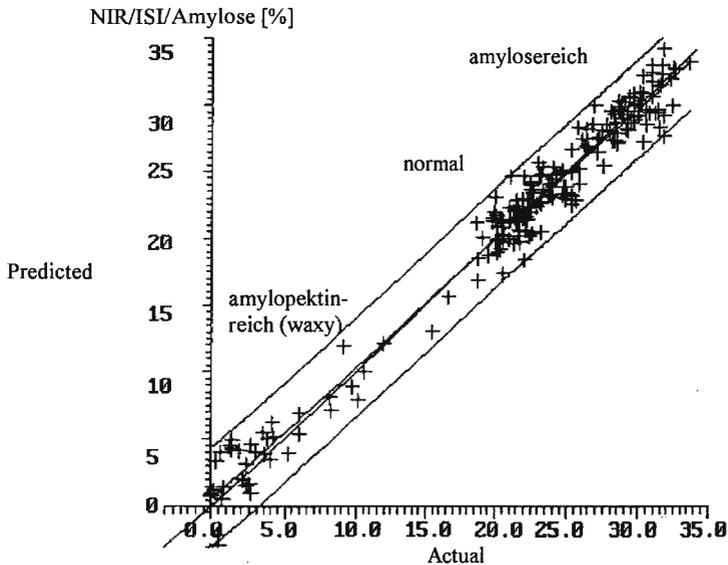


Abb. 2: NIRS-Ergebnisse der Bestimmung des Amylosegehaltes von Gerstenstärke, isoliert aus Zuchtmaterial und aktuellen Sorten der mehrortigen Anbauversuche 1995 – 1997

#### Verfahren zur Herstellung gesundheitsfördernder Produkte auf Gerstenbasis

Als Ergebnis der Qualitätsanalyse des neuartigen Gerstenzuchtmaterials der Saatzeit Dr. h.c. Carsten wurde eine Form gefunden, die neben einem Amylosegehalt der Stärke von 33 % einen  $\beta$ -D-Glucan Gehalt von 7 % besaß (FLAMME u.a., 1998). Durch eine polymer-protektive Extrusion dieser Gerste wurde unter Erhalt der Eigenschaften der  $\beta$ -D-Glucane die Bildung von resistenter Stärke (RS) optimiert und damit der Ballaststoffgehalt auf der Basis von Glucanen und RS deutlich erhöht (GEBHARDT u.a., 1998).

Für die Extrusion erwies sich Gerstengrieß, der aus gereinigten und geschälten Graupen mit einer Stiftmühle hergestellt wurde, sowohl für den Extrusionsablauf als auch für die Inhaltsstoffzusammensetzung (%)

$\beta$ -D-Glucan	6,5
Amylose	34,0
Stärke	57,0
Protein	3,7
Asche	1,8

als vorteilhaft.

Für die Extrusion von Gerstengrieß mit definierter Partikelgröße und Wassergehalt wurde ein Doppelschneckenextruder (APV-MPF 50 / Schneckenkonfiguration) eingesetzt. Um das polymer protektive Prinzip durchzusetzen, wurden Feuchte, Temperatur, Scherkraft und Druck zur Verfahrensoptimierung genutzt.

Stoffveränderungen bei der Extrusion waren:

- Gelatinisierung/Plastifizierung von Stärke durch Erhitzen unter Druck
- geringe partielle Depolymerisation der Polysaccharide durch Erhitzung und Scherung
- Zustandsänderung beim Abkühlen, einschließlich Retrogradation der Stärke unter teilweiser Bildung von resistenter Stärke

Vorteilhaft wirkte sich eine Lagerung der Extrudate bei Minustemperaturen (-18 °C) auf den Gehalt an RS aus.

Funktionelle Eigenschaften der Extrudate bzw. von Extrakten aus den Extrudaten sind (HUTH u.a., 1998):

- hohe Viskosität
- hohe Säure-Extrakt-Viskosität
- pseudoplastisches Fließverhalten
- erhöhte Löslichkeit
- hohe Wasserbindung
- hohes Molekulargewicht der  $\beta$ -Glucane
- gute sensorische Eigenschaften

Die gewonnenen Extrudate besaßen eine helle Farbe, regulierbare Form und Festigkeit, gute Kaeigenschaften und einen angenehmen Getreidegeschmack statt des erwarteten Gersten off flavour.

#### Physiologische Wirkungen der $\beta$ -Glucane und der resistenten Stärke der Gerstenextrudate

Durch Extrusion von Gerstengrieß mit erhöhten Gehalten an  $\beta$ -D-Glucanen und Amylose erfolgte die Generierung butyratogener resistenter Stärke.

Die gesundheitsfördernde Wirkung der bifunktionellen Extrudate wurde durch in vitro-Tests, durch Fütterung von Ratten und durch Ernährungstests mit Probanden belegt. Für die Versuche wurden Proben auf der Basis von Gerstengrieß verwendet (Tab. 4). Als amylosereiche Gerste diente eine zweifache Rückkreuzung der amylosereichen Sommergerste HiAmi mit der Wintergerste Cheri und als  $\beta$ -D-glucanreiche Gerste die waxy-Gerste Prowashonupana. Weiterhin kamen isolierte Amylose und RS (Nevelose 330) im Gemisch mit Prowashonupana zum Einsatz.

Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen und der Fütterungsversuche mit Ratten stimmten mit den Ernährungstests in den wesentlichen Punkten überein (DONGOWSKI und GEBHARDT, 1998; DONGOWSKI u.a., 1999).

Tab. 4 : Proben auf Gerstenbasis für Ernährungsversuche

Zusammensetzung	A	B	C	D
(HiAmi x Cheri) x Cheri (%)	100	50		
Prowashonupana (%)		50	60	50
Amylose (%)			40	
Novelose 330 (%)				50
	<b>Extrudate Doppelschnecken-Extruder</b>			<b>Mix</b>
β-Glucan (%)	7,2	12,0	10,6	7,9
RS (%)	6,6	6,8	18,4	24,3
β-Glucan + RS (%)	13,8	18,7	28,9	32,2
Stärke (%)	56,2	42,8	54,8	61,2

RS = resistente Stärke

Bei der Aufnahme von 100 g Extrudat der Gerste (HiAmi x Cheri) x Cheri (Probe A) zusätzlich zur habituellen Diät über vier Wochen, wurden positive Effekte am Menschen beobachtet:

- gute Verträglichkeit
- geringe Abnahme der Serumlipide bei BMI > 25
- höherer molarer Anteil an Butyrat in den Faeces
- Abnahme des pH-Wertes in den Faeces
- Abnahme coliformer Keime
- Zunahme der Lactobacillen und Bifidobakterien
- verminderte Gallensäureausscheidung
- Zunahme des Anteils sekundärer Gallensäuren
- erhöhte Ausscheidung neutraler Sterole
- zusätzliche Aufnahme von ca. 14 g BS/d

#### Ausblick: Nutzung der waxy-Gersten zur Gewinnung von resistenter Stärke

Aus Amylopektin können durch den Einsatz von Entzweigungsenzymen (Isomaltase) unverzweigte Ketten mit 10-35 Glucoseeinheiten neben höher molekularen Fraktionen gewonnen werden (ASP u.a., 1996). Die hydrothermische Behandlung der niedermolekularen Fraktion führt zu hohen Ausbeuten an RS. Waxy-Stärken, die aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen gewonnen werden, können ohne die aufwendige Isolation von Amylopektin, wie sie bei den Normalstärketypen mit 75 - 80 % Amylopektingehalt erforderlich ist, direkt hydrothermisch behandelt werden.

Erste Versuche mit waxy-Gerstenstärke ergaben Ausbeuten von RS um 30 % (LEHMANN u.a., 1999). Die Unterschiede in der Bildung der RS zwischen den waxy-Stärken verschiedener Pflanzenarten Banane > Kartoffel > Gerste erfordern weitere Untersuchungen zur Steigerung der Ausbeuten von RS in Gersten. Positive Ansatzpunkte sind in der genetischen Breite des vorhandenen Basis- und Zuchtmaterials von waxy-Gersten (FLAMME u.a., 1998) vorhanden.

## Literatur

- ASP, N.-G.; VAN AMELSFORT, J.M.M., HAUTVAST, J.G.A.J.: Nutritional implications of resistant starch. *Nutr. Res. Rev.* 9, 1996, 1-31
- DONGOWSKI, G.; HUTH, M.; GEBHARDT, E.; FLAMME, W.; FRENZ, U.: Effects of barley products on physiological parameters in rats. ICC Conference, 06.-09.06.1999, Valencia, Spanien, Abstracts Book, 1999, S. 29
- DONGOWSKI, G.; GEBHARDT, E.: Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung gesundheitsfördernder Produkte auf Basis neuer Gerstenformen – Physiologische Wirkungen der Beta-Glucane und der resistenten Stärke. Abschlußbericht AiF-FV 10751B
- FLAMME, W.; ANDRÉE, S.; JANSEN, G.; JACOBI, A.; HUTH, M.; DONGOWSKI, G.: New winter barley breeding lines with changed content of amylopectin, amylose and  $\beta$ -glucan. International Conference „Cereals for human health and preventive nutrition“, Brno, Czech Republic 07.-11.07.1998. Proceedings, 1998, 145-150
- FLAMME, W.; JACOBI, A., 1997: Erstellung von in ihren Anbaueigenschaften verbesserten Gerstengenotypen mit verändertem Amylose-/Amylopektin Gehalt und analytischer Vergleich ihrer Stärken im Hinblick auf ihre spätere industrielle Verwertung. Forschungsvorhaben: G 64/94 - AiF-Nr. 10028B
- FLAMME, W.; JANSEN, G.; ANDRÉE, S.; JACOBI, A.; DONGOWSKI, G.: Methoden und Ergebnisse der Qualitätsforschung und -züchtung von Getreide mit veränderter Stärkezusammensetzung. NAROSSA 99, 07.-08.06.99, Magdeburg, Tagungsband, 150-168
- FLAMME, W.; JANSEN, G.; JUGERT, M.: Analyse der Getreide- und Stärkequalität mittels NIRS- und Farbmessung. 34. Vortragsstagung der DGQ "Zerstörungsfreie Qualitätsanalyse", 22.-23.03.1999, Freising-Weihenstephan, 25-41
- GEBHARDT, E.; WEBERS, V.; DONGOWSKI, G.; HUTH, M.: Generierung resistenter Stärke in Gerste durch Extrusion unter Protektion hoher Viskosität. *Getreide, Mehl und Brot* 52, 1998, 241-247
- HUTH, M.: Physiko-chemische Charakterisierung von Polymeren aus Gerstenprodukten und deren physiologische Wirkungen beim Menschen. Dissertation Universität Potsdam, 1999
- HUTH, M.; DONGOWSKI, G.; GEBHARDT, E.; WEBERS, V.; FLAMME, W.: Preparation and properties of dietary fiber products from barley. 16<sup>th</sup> ICC Conference „Cereal Science – its Contribution to Health and Wellbeing“, Wien, 09.-12.05.1998, Proceedings, S. 98
- JACOBI, A.; FLAMME, W., 1993: Abschlußbericht zum Projekt (G 48/90-88NR005): „Quantitative und qualitative Verbesserung der Stärke für den non-food-Bereich in Weizen und Gerste durch züchterische Maßnahmen.“
- JANSEN, G.; FLAMME, W.: Rheologische und NIR-spektroskopische Untersuchungen an Gerstenmehlen und -stärken. DGQ-Tagung, 20.-21.03.2000, Karlsruhe, Tagungsband XXXV
- LEHMANN, U.; SCHMIEDL, D.; JACOBASCH, G.; SCHMEHL, K.; FLAMME, W.: Structure and biological functions of resistant starches developed from waxy wheat, barley starch and other sources. ICC Conference, 06.-09.06.1999, Valencia, Spanien, Abstracts Book, 1999, S. 35

MOORE, M.: Starch is key to barley break through. Svalöf Weibull AB, 1999, 10-11  
SCHONDELMAIER, J.; JACOBI, A.; FISCHBECK, G.; JAHLOOR, A.: Genetical Studies on  
the Mode of Inheritance and Localization of the amo 1 (High Amylose) Gene in Barley.  
Plant Breeding, Berlin, 109, 1992, S. 274-280

Die Forschungsvorhaben wurden aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft (BMWi) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen 'Otto von Guericke' e.V. (AiF), des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BML) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) und der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) gefördert.  
Wir danken für die Unterstützung.





## In vitro antioxidative Aktivitäten von Früchten und Gemüsen in verschiedenen Testsystemen

R. Edenharder, E. Gollner, M. Fickler

Abteilung für Hygiene und Umweltmedizin der Universität Mainz

### *In vitro antioxidative capacity of fruits and vegetables in various test systems*

In this paper, we report the antioxidant capacities of about 30 fruits and vegetables measured using the xanthine/xanthine oxidase assay (XOD; generation of  $O_2^{\cdot -}$ ), the phagocytose/chemiluminescence assay (PCA; generation of  $O_2^{\cdot -}$  and other reactive oxygen species (ROS), the deoxyribose assay (DA; generation of  $OH^{\cdot}$ ), the peroxy radical mediated hemolysis test (HT; generation of  $ROO^{\cdot}$  from 2,2'-Azinobis-(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH)), and the stable model radicals 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; ABTS<sup>+</sup>) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). With a few exceptions against  $O_2^{\cdot -}$ , all juices of fruits and vegetables and methanolic extracts from water-insoluble residues and lyophilisates (ABTS, DPPH-assay) exerted antioxidant activities in all tests assays. The hierarchy, however, varied depending on the test system. In general, berries were very potent while citrus fruits and stone fruits were less potent. Among vegetables tested, cruciferous vegetables, red beets, and spinach but not carrots had high antioxidant activities. The ABTS-assay was more sensitive than the DPPH-assay, the latter being relative insensitive for extracts rich in carotenoids.

Prof.Dr. Rudolf Edenharder, Abteilung für Hygiene und Umweltmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz, Hochhaus am Augustusplatz, 55124 Mainz

### Einleitung

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien, Kohortenstudien sowohl als Fall-Kontrollstudien, belegen, daß eine Ernährung mit einem hohen Anteil an Obst und Gemüse beständig und fest mit niedrigen Inzidenzen der meisten wichtigen Organkrebse des Menschen korreliert (Steinmetz und Potter, 1991; Block et al., 1992). Dies gilt insbesondere für epitheliale Krebse des Verdauungstraktes und der Atemwege. Antigenotoxische Effekte von Obst und Gemüse wurden von uns wie von anderen auch in *in vitro* Modellsystemen (Edenharder et al., 1994; 1995 und in tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen (Bresnick et al., 1990; Edenharder et al., 1998). In diesen Experimenten ist ein Schutz gegenüber den alkylierenden Eigenschaften von Genotoxinen anzunehmen. Protektive Effekte von Obst und Gemüse werden auch für kardiovaskuläre und cerebrovaskuläre Erkrankungen diskutiert (Armstrong et al., 1975; Verlangieri et al., 1985). Bei den zuletzt genannten Krankheiten werden die Schutzwirkungen den diversen Antioxidantien in Früchten und Gemüsen zugeschrieben, was aber auch ein wichtiger Mechanismus der antikanzinogenen Effekte sein könnte. Die antioxidativen Wirkungen dürfen aber keinesfalls allein den entsprechenden Vitaminen, Vitamin C und E sowie  $\beta$ -Carotin und weiteren Carotinoiden, zugeschrieben werden wie früher üblicherweise geschehen, vielmehr

muß beachtet werden, daß in Früchten und Gemüse eine Vielzahl weiterer Stoffe mit antioxidativen Wirkungen vorliegen, insbesondere phenolische Verbindungen wie Flavonoide, Anthocyane, phenolische Säuren u.a. sowie ihrer Struktur nach unbekannt Substanzen. Weiter ist zu beachten, daß Wechselwirkungen der Inhaltsstoffe wahrscheinlich sind, es also auf die Gesamtheit der Matrix ankommen könnte, nicht lediglich auf einzelne Inhaltsstoffe. Das Ziel unserer Untersuchungen war es deshalb, die antioxidativen Potenzen von Obst und Gemüse gegenüber möglichst vielen im Organismus des Menschen entstehenden reaktiven Sauerstoffspecies (ROS) sowie von stabilen Modellradikalen zu bestimmen. In diesem Beitrag wird über die bisher vorliegenden Ergebnisse berichtet.

## **Materialien und Methoden**

### *Verarbeitung von Obst und Gemüse*

Früchte und Gemüse wurden wie im Haushalt üblich verarbeitet, kleingeschnitten und mittels eines Haushaltsmixers (Moulinex Moulinette) entsaftet. Aliquote der Preßsäfte wurden 20 min bei 20.000 g zentrifugiert und der pH-Wert bestimmt. (Für den DPPH-Test wurde durch Zusatz von Methanol ein geeigneter Extrakt hergestellt.) Die Rückstände wurden in einem 0, 1M Natriumacetatpuffer, pH 3,5 - 5,6, resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Rückstände wurden erneut gewaschen, insgesamt dreimal, bei -20°C eingefroren und gefriergetrocknet. Zur Herstellung von Lyophilisaten wurden Früchte und Gemüse püriert, eingefroren und gefriergetrocknet. Rückstände und Lyophilisate wurden mit Methanol extrahiert, eine Soxhlet-Extraktion verbesserte die Ausbeuten nicht. Die Trockenmassen wurden gravimetrisch nach Standardverfahren bestimmt.

### *Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität*

Zur Ermittlung der antioxidativen Potenz der Frucht-bzw. Gemüseextrakte wurden in den im folgenden genannten Testsystemen Dosis-Wirkungskurven erstellt, aus diesen wurde ein RSC<sub>50</sub>-Wert (radical scavenging capacity) errechnet, d.h. die Konzentration, die den Anfangswert der Extinktion im jeweiligen Testsystem auf die Hälfte reduzierte. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Standardisierung mittels der TEAC-Werte (trolox equivalent antioxidant capacity) im ABTS-Test erfolgte durch Vergleich mit einer Dosis-Wirkungskurve von Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure). TEAC-Wert: 1 µmol Trolox Äquivalent/ml.

### Erzeugung und Bestimmung von Superoxidanionen mittels des Xanthin/Xanthinoxidase-Tests

Die Methode basiert auf der Erzeugung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> im System Xanthin/Xanthinoxidase und der Reaktion mit Tetrazoliumsalzen als Elektronenakzeptoren, die zur Bildung von blau gefärbtem Formazan führt. Das sehr schwer wasserlösliche Formazan wird durch Zusatz von Gelatine in Lösung gehalten und kann bei 540 nm photometrisch quantifiziert werden. Der Testansatz enthält: 2,0 ml Reagens-Mix (0,4 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7,8, 0,6 ml 0,87 mM EDTA-Lösung, 0,5 ml Gelatine-Lösung (2,2 mg/ml), 0,3 ml 4-Nitroblautetrazoliumchloridlösung (173 µg NBT/ml), 0,2 ml Phenazin Methosulfatlösung (5,8 mg PMS/ml)), 0,6 ml 1 mM Xanthinlösung, 0,4 ml Xanthinoxidase (0,08 Units), 0,01 - 1,7 ml Probenmaterial, 2,89 - 0,3 ml Wasser, Gesamtvolumen 6 ml. Dieser Ansatz wird bei 38°C 15 min inkubiert. Gemessen wurde gegen Kontrollen. Zusätzlich wurde stets geprüft, ob das Probenmaterial die Enzymaktivität hemmte. Hierzu diente ein Testansatz mit einem Reagens-Mix ohne Gelatine-, NBT- und PMS-Lösung. Die Enzymaktivität wurde bei 295 nm gemessen.

### Der Phagozytose-Chemilumineszenz-Test

Der Test beruht auf der Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) durch ROS wie  $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$  u.a. zu  $\alpha$ -Aminophtalat und  $N_2$  unter Emission von Licht,  $\lambda = 425$  nm. Das Superoxid anion wurde durch menschliche Granulozyten freigesetzt, nachdem diese durch Phorbol-myristat-12-13-acetat aktiviert worden waren. Die Granulozyten wurden mittels Standardmethoden aus dem Blut verschiedener Probanden isoliert, ihr Überleben wurde mittels eines ATP-Kontrolltests überprüft. Der Zusatz antioxidativer Substanzen reduziert die Chemilumineszenz durch Abfangen von ROS (oder durch Enzymhemmung). Das relativ komplizierte Verfahren wurde im Detail von Fickler, 1998 beschrieben.

### Der Desoxyribose-Test

Das Hydroxylradikal OH entsteht im Organismus insbesondere aus der Reaktion von Übergangsmetallen wie  $Fe^{2+}$  und  $Cu^+$  mit  $H_2O_2$ . Im Desoxyribose-Test wird OH in der Reaktion zwischen  $Fe^{3+}$ -EDTA und  $H_2O_2$  in Gegenwart von Ascorbinsäure erzeugt und attackiert soweit es nicht komplexiert werden kann den Zucker Desoxyribose, wobei beim Erhitzen mit Thiobarbitursäure bei niedrigem pH eine rosa Farbe entsteht. Reaktive Stoffe im Testgemisch können das Hydroxylradikal abfangen. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2,4 ml die folgenden Reagenzien bzw. Lösungen in den angegebenen Endkonzentrationen: 100  $\mu$ l Desoxyribose (2,8 mM), 200  $\mu$ l  $FeCl_3$  (25  $\mu$ M), 100  $\mu$ l EDTA (100  $\mu$ M), 100  $\mu$ l  $H_2O_2$  (2,8 mM), 1800  $\mu$ l Phosphatpuffer pH 7,4 (10mM) und 100  $\mu$ l Ascorbinsäure (100  $\mu$ M) - Start der Reaktion. Bis zu 500  $\mu$ l des Puffers wurden für die eigentlichen Messungen durch Probenmaterialien ersetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert, dann wurden 2 ml 1% Thiobarbitursäure in 50  $\mu$ M NaOH und 2 ml 2,8% Trichloressigsäure zugesetzt und der Ansatz 20 min bei 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden Niederschläge durch 5 min Zentrifugieren entfernt. Im Überstand wurde die Absorption bei 532 nm gemessen und mit Kontrollen verglichen.

### Der radikalvermittelte Hämolyse-Test

Dieser Test wurde im wesentlichen nach der Methode von Chen et al., 1996 ausgeführt, jedoch wurden menschliche Erythrozyten verwendet. Das Verfahrens beruht auf dem Austreten von Hämoglobin aus Erythrozyten als Folge der Einwirkung von Peroxylradikalen ROO $\cdot$ , die als konstanter Strom durch Inkubation der wasserlöslichen Modellspezies 2,2'-Azinobis-(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH) erzeugt wurden. Der Testansatz von 0,5 ml Probenmaterial, 1,5 ml AAPH-Lösung (0,2 M) und 2 ml Erythrozytensuspension in Phosphatpuffer pH 7,4 wurde 150 min im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Dann wurden 8 ml dieses Puffers hinzugefügt und die Erythrozyten durch 10 min Zentrifugieren entfernt. Im Überstand wurde die Hämoglobinkonzentration bei 540 nm gemessen.

### Der Test mit dem 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Radikalkation (ABTS $^+$ )

Die Messungen erfolgten wie von Miller und Rice-Evans, 1997 angegeben. Eine 5mM ABTS-Lösung wird mit  $MnO_2$  versetzt und einige Zeit geschüttelt. Der Überschuss  $MnO_2$  wird abfiltriert, die Lösung mit dem Radikalkation ist im Kühlschrank mindestens 2-3 Tage haltbar. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird die Lösung auf 30°C vorgewärmt und mit 5mM Phosphatpuffer pH 7,4 so verdünnt, daß eine Extinktion von  $\sim 0,7$  bei 734 nm erreicht wird. Zu 3 ml dieser Lösung wurden 0,5 ml mit dem Probenmaterial pipettiert, die Abnahme der Extinktion

Tabelle 1 Antioxidative Potenzen von Obst im Xanthin/Xanthinoxidase-Test

	RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [μl/ml]		RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [μl/ml]
<b>A. Beerenobst</b>		Kirschen, süß	76,3
Brombeeren	41,2	Mirabellen	120,5
Erdbeeren	67,5	Pfirsiche	220,2
Heidelbeeren	38	<b>C. Kernobst</b>	
Himbeeren	45,3	Äpfel	84,1
Holunder	14,7	Birnen	n.e.
Johannisbeeren, rot	13,3	<b>D. Zitrusfrüchte</b>	
Stachelbeeren	54,3	Grapefruit	(76,3) <sup>b</sup>
Trauben, blau	11,2	Orangen	inaktiv <sup>c</sup>
Trauben, rot	147,5	<b>E. Exotische Früchte</b>	
Trauben, weiß	156,7	Ananas	inaktiv
<b>B. Steinobst</b>		Kiwi	inaktiv <sup>c</sup>
Aprikosen	63,6	Wassermelone	inaktiv <sup>c</sup>

a, RSC<sub>50</sub> (radical scavenging concentration 50%) ist die Konzentration eines gegebenen Preßsaftes, die erforderlich ist, um die Anfangsaktivität der Xanthinoxidase zur Erzeugung von Superoxidationen (Messung bei 540 nm) um 50% zu reduzieren. b, als Ergebnis der Hemmung der Xanthinoxidase; c, bei hohen Konzentrationen Hemmung der Xanthinoxidase; n.e., nicht erreicht.

Tabelle 2 Antioxidative Potenzen von Preßsäften aus Obst und Gemüse im Phagozytose-Chemilumineszenz-Test

Obst/Gemüse	RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [μl/ml]		RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [μl/ml]
<b>A. Obst</b>		Kirschen, süß	15,8
Äpfel	90,3	Trauben, blau	23,8
Erdbeeren	18,2	Trauben, weiß	inaktiv
Grapefruit	127,9	<b>B. Gemüse</b>	
Himbeeren	48,3	Blumenkohl	19,8
Johannisbeeren, rot	18,6	Broccoli	19
Orangen	inaktiv	Karotten	77,6

a, RSC<sub>50</sub> (radical scavenging concentration 50%) ist die Konzentration eines gegebenen Preßsaftes, die erforderlich ist, um den Ausgangswert der Luminol-Chemilumineszenz um 50% zu reduzieren.

photometrisch verfolgt und nach 2 min ein Endwert bestimmt. Auch für schwach aktive Gemische sind längere Meßzeiten (10 min) in der Regel nicht erforderlich. Mit dieser Methode wird ausschließlich die Reduktion von ABTS<sup>+</sup> gemessen, Störungen durch Wechselwirkungen mit dem Ferrylmyoglobin oder dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wie im Myoglobin/ABTS<sup>+</sup>-Test sind ausgeschlossen. Eigenfärbungen von Obst- oder Gemüseextrakten bei 734 nm wurden nicht beobachtet.

Der Test mit 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Brand-Williams et al., 1995)

Zu 3 ml einer 100 µM Lösung von DPPH wurden 0,5 ml mit dem Probenmaterial in Methanol pipettiert. Die Abnahme der Extinktion bei 517 nm wurde photometrisch verfolgt und ein Endwert nach 10 min bestimmt. Dieser wurde um die Verdünnung (16,67%) und die Eigenfärbung des jeweiligen Extraktes korrigiert. Für sehr schwach aktive Gemische können auch längere Meßzeiten erforderlich werden.

Tabelle 3 Antioxidative Potenzen von Obst und Gemüse im Test mit 2-Desoxyribose					
Obst/Gemüse	+ EDTA	- EDTA	Obst/Gemüse	+ EDTA	- EDTA
	RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [µl/ml]	RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [µl/ml]		RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [µl/ml]	RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [µl/ml]
<b>A. Beerenobst</b>			Pflaumen	2,6	7,9
Brombeeren	1	5,9	<b>C. Kernobst</b>		
Erdbeeren	13,3	46,9	Äpfel	5	33,9
Heidelbeeren	1,1	1,5	Birnen	6,1	Anstieg
Himbeeren	2,5	4,1	<b>D. Zitrusfrüchte</b>		
Holunder	0,8		Grapefruit	10,5	14,9
Johannisbeeren, rot	12,6	11,3	Orangen	5,4	51,2
Johannisbeeren, schwarz	5	8,4	<b>E. Exotische Früchte</b>		
Stachelbeeren	8,4	7,8	Kürbis	43,7	
Trauben, blau	3,1	6	Wassermelone	n. e.	
Trauben, rot	2,9	28,1	<b>F. Gemüse</b>		
Trauben, weiß	3,9	3,9	rote Beete	1,5	2,4
<b>B. Steinobst</b>			Blumenkohl	1,2	18,3
Aprikosen	1,3	5,9	Broccoli	1,2	9,5
Kirschen, süß	8,3	15,6	Karotten	1,9	6,7
Kirschen, sauer	0,7	6,6	Rosenkohl	2,8	5,1
Mirabellen	52,7		Spinat	1,4	5,7
Pfirsiche	6,4	35,5			

a, RSC<sub>50</sub> (radical scavenging concentration 50%) ist die Konzentration eines gegebenen Preßsaftes, die erforderlich ist, um den Ausgangswert der Extinktion bei 532 nm um 50% zu reduzieren. EDTA, ethylenediamine-tetra-acetic acid; n.e., nicht erreicht.

## Ergebnisse

Die antioxidativen Potenzen von ca. 20 Früchten und 6 Gemüsen gegenüber verschiedenen ROS und Modellradikalen sind in den Tabellen 1 - 6 dargestellt. Wie die Tab. 1 erkennen läßt zeigten die Preßsäfte einiger Beeren wie blaue Trauben, rote Johannisbeeren und Holunder die stärksten antioxidativen Potenzen gegenüber dem im Xanthin/Xanthinoxidase-Test erzeugten Superoxidanion  $O_2^-$ . Weniger wirksam waren Heidelbeeren, Brombeeren, Himbeeren, Stachelbeeren und Erdbeeren, gefolgt von Aprikosen Kirschen und Äpfeln. Mäßig wirksam waren Mirabellen, rote und weiße Trauben sowie Birnen, inaktiv waren Ananas, Kiwi, Orangen und Wassermelonen, während Grapefruit die Xanthinoxidase hemmte und deshalb in diesem System nicht gemessen werden konnte. Im Phagozytose-Chemilumineszenz-Test, in dem mittels des Enzyms NADPH-Oxidase in Granulozyten zunächst wieder Superoxidanionen erzeugt werden, aber prinzipiell alle vorhandenen ROS gemessen werden, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, jedoch mit etwas unterschiedlicher Rangfolge (Tab. 2). Die Preßsäfte der blauen Trauben, Erdbeeren, roten Johannisbeeren und Kirschen, aber auch von Blumenkohl und Broccoli demonstrierten die niedrigsten  $RSC_{50}$ -Werte und somit die höchsten antioxidativen Potenzen, gefolgt von Himbeeren, Karotten, Äpfeln und Grapefruit. Orangen und weiße Trauben waren in diesem System inaktiv.

Das hochreaktive Hydroxylradikal OH dagegen konnten nahezu alle untersuchten Früchte und Gemüse mit hoher Effektivität abfangen wie die Tab. 3 zeigt. Hohe antioxidative Aktivitäten zeigte wieder das Beerenobst - schwächer wirksam waren im Desoxyribose-Test lediglich Erdbeeren und rote Johannisbeeren -, aber auch alle untersuchten Gemüse sowie das meiste Steinobst, Kernobst und die Zitrusfrüchte. Schwach aktiv waren lediglich Mirabellen, Kürbis und Wassermelone. Wie die Untersuchungen in Abwesenheit des Komplexbildners EDTA erkennen lassen waren in der großen Mehrzahl der Früchte und Gemüse potente natürliche Komplexbildner in ausreichender Konzentration vorhanden, um das EDTA vollständig oder zumindest weitgehend ersetzen zu können. Relativ schwache Effekte zeigten lediglich Erdbeeren, rote Trauben, Pfirsiche, Äpfel, Orangen und Blumenkohl. Auch im radikalvermittelten Hämolyse-Test, in dem mittels AAPH ein konstanter Strom von Peroxylradikalen ROO erzeugt wird, die die Erythrozytenmembran schädigen, zeigten die meisten untersuchten Preßsäfte recht ähnliche antioxidative Potenzen (Tab. 4). Besonders potent waren hier blaue Trauben, mäßig effektiv waren wieder Äpfel.

Die Verwendung der stabilen Modellradikale ABTS<sup>+</sup> und DPPH ermöglichte sowohl die Untersuchung von Preßsäften wie von methanolischen Extrakten der Rückstände und Lyophilisate (Tab. 5 und 6). Das ABTS<sup>+</sup> Radikalkation wird durch Übertragung eines Elektrons reduziert, beim DPPH geschieht dies mittels eines H-Atoms (auch die Aufnahme eines Alkylrestes R ist möglich). Wie die Tab. 5 zeigt waren antioxidative Aktivitäten sowohl im Preßsaft wie im Rückstand von Früchten vorhanden, wobei die Rückstände in aller Regel potenter waren als die Preßsäfte wie am besten bei vielen Beerenfrüchten zu sehen ist. Letztere waren wieder sehr potent. Die höchste antioxidative Potenz unter den Säften besaß Holunder, die niedrigsten TEAC-Werte wiesen wieder rote und weiße Trauben auf. Bei den Rückständen zeigten Heidelbeeren den bisher höchsten gemessenen TEAC-Wert. Unter dem übrigen Obst waren noch Sauerkirschen recht potent, gefolgt von Grapefruit, Orangen und Wassermelonen. Unter den untersuchten Gemüsen waren die Preßsäfte von Rosenkohl und Spinat am effektivsten. Die antioxidativen Potenzen der Lyophilisate lagen in der Regel zwischen den Werten der Preßsäfte und der Rückstände. Beachtenswerte Ausnahmen mit höherem antioxidativem Potential der Lyophilisate waren Grapefruit und Orangen.

Die im DPPH-Test erhaltenen Resultate waren denjenigen, die mittels des ABTS-Tests erhalten worden waren, meist sehr ähnlich. So waren Beeren wieder die Früchte mit der höchsten antioxidativen Potenz, jedoch war die Rangfolge der Früchte unterschiedlich. Schwarze Johannisbeeren, Holunder, Brombeeren und Himbeeren waren in diesem Test am aktivsten, gefolgt von blauen Trauben, roten Johannisbeeren, Heidelbeeren, Erdbeeren und Stachelbeeren. Rote und weiße Trauben zeigten wieder weit geringere antioxidative Potenzen als blaue Trauben. Sehr potent gegenüber DPPH waren auch die Zitrusfrüchte, wobei hier wie auch bei Wassermelonen die Rückstände auffälligerweise weniger wirksam waren als die Säfte. Auffällig war weiter, daß bei einigen Gemüsen die Säfte höhere antioxidative Potenzen aufwiesen als die Rückstände.

Tabelle 4 Antioxidative Potenzen von Preßsäften aus Obst und Gemüse im radikalvermittelten Hämolyse-Test

Obst/Gemüse	RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [µl/ml]		RSC <sub>50</sub> -Wert <sup>a</sup> [µl/ml]
<b>A. Obst</b>		Kirschen, süß	3,7
Äpfel	13,5	Trauben, blau	1,5
Erdbeeren	5,8	Trauben, weiß	7,2
Grapefruit	3,3	<b>B. Gemüse</b>	
Himbeeren	2,6	Blumenkohl	3,1
Johannisbeeren, rot	2,3	Broccoli	6,4
Orangen	5,8	Karotten	7

a. RSC<sub>50</sub> (radical scavenging concentration 50%) ist die Konzentration eines gegebenen Preßsaftes, die erforderlich ist, um die Hämolyse der Erythrozyten um 50% herabzusetzen. Alle Werte sind auf eine 0,2M AAPH-Konzentration bezogen.

## Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen beweisen, daß alle untersuchten Früchte und Gemüse antioxidative Aktivitäten gegenüber dem Hydroxylradikal, Peroxylradikalen, den stabilen Modellradikalen ABTS<sup>+</sup> und DPPH ausübten, einige Früchte wie Grapefruit, Orangen und Wassermelonen jedoch überraschenderweise inaktiv gegenüber dem Superoxidanion waren. Die mit Grapefruit beobachtete Hemmung der Xanthinoxidase könnte sich im Phagozytose-Chemilumineszenz-Test in der Weise widerspiegeln, daß die beobachtete Inhibition der Chemilumineszenz der Granulozyten ebenfalls durch eine Hemmung der NADPH-Oxidase verursacht sein kann. Eine Klärung des Sachverhalts ist nur durch ein unabhängiges Verfahren möglich. Peroxylradikale entstehen im Körper häufig, ihre Halbwertszeit wird mit Sekunden angenommen, damit sind sie weniger reaktiv als Hydroxylradikale, deren Halbwertszeit Nanosekunden beträgt (Grisham, 1992). Die natürlichen Gemische von Antioxidantien wie sie in Preßsäften von Obst und Gemüse vorliegen (mit den verfügbaren Tests konnten nur wässrige Lösungen untersucht werden) waren somit geeignet, diese Radikale abzufangen. Aufgrund seiner hohen Reaktivität kann das Hydroxylradikal mit den meisten Zellbestandteilen reagieren. es setzt sich u.a. mit Zuckern um, aber nicht mit Substanzen wie Ascorbinsäure, die direkt mit dem Eisen reagieren. Der (durchschnittliche) Zuckergehalt von Äpfeln, Birnen, Orangen, Pfirsichen und Trauben sowie von roten Beeten, Blumenkohl und Karotten kann die erhaltenen Resultate

Tabelle 5 Antioxidative Potenzen von Obst und Gemüse im ABTS-Test

Obst	RSC <sub>50</sub> [mg/ml] <sup>a</sup>			TEAC-Wert <sup>b</sup>		
	Saft	Rückstand	Lyophilisat	Saft	Rückstand	Lyophilisat
<b>A. Beerenobst</b>						
Brombeeren	3,2	0,7	1,3	6,7	31,1	17,1
Erdbeeren	2,3	0,6	2,1	9,3	37,6	10,1
Heidelbeeren	5,3	0,09	1,5	4,1	58,8	14,2
Himbeeren	4,1	1,4	1,6	5,2	13,5	13,4
Johannisbeeren, rot	4,9	0,85	1,8	4,4	25,3	11,8
Johannisbeeren, schwarz	5,3		1,1	4,1		18,8
Stachelbeeren	44,9			0,5		
Trauben, blau	3,1	1,7	1,4	7,5	15,4	12,6
Trauben, rot	30,9	3,3	9,9	0,7	6,6	2,2
Trauben, weiß	124,8	11,4	36,2	0,2	1,9	0,6
<b>B. Steinobst</b>						
Aprikosen	47,7			0,5		
Kirschen süß	34,8	4,4	6,4	0,6	4,9	3,4
Kirschen, sauer	4,9	1,1		4,4	18,8	
Mirabellen	n.e.	10		n.e.	2,2	
Pfirsiche	196,1	18,2	19	0,1	1,1	1,2
Pflaumen	28,7	2,7	7,6	0,9	8	2,8
<b>C. Kernobst</b>						
Äpfel	45,5	8	11,4	0,5	2,7	1,9
Birnen	152	4	16,7	0,14	5,4	1,3
<b>D. Zitrusfrüchte</b>						
Grapefruit, gelb	9,6	6,1	4,9	2,3	3,5	4,4
Orangen	8,8	7,7	3,9	2,4	2,8	5,5
<b>E. Wildfrüchte</b>						
Holunder	0,83			26		
<b>F. Exotische Früchte</b>						
Kürbis	12,1			1,8		
Wassermelone	8,1			2,7		
<b>G. Gemüse</b>						
Blumenkohl	22,3			1		
Broccoli	13,8			1,6		

Karotten	153,4		0,2	
Spinat	5,7		3,8	

a,  $RSC_{50}$  (radical scavenging concentration 50%) ist die Konzentration eines gegebenen Extraktes, die erforderlich ist, um den Ausgangswert der Extinktion der  $ABTS^+$ -Radikalkationen-Lösung um 50% zu reduzieren. b, TEAC, "trolox equivalent antioxidative capacity" [ $1 \mu\text{mol Trolox \u00c4quivalent/ml}$ ]. n.e., nicht erreicht.

bereits erklären wie entsprechende Experimente zeigten (Me\u00dfwerte nicht dargestellt). Beachtenswert ist hier die Tatsache, da\u00df es zwischen blauen, roten und wei\u00dfen Trauben praktisch keine Unterschiede gab, ganz im Gegensatz zu den \u00fcbrigen Testverfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazit\u00e4ten. Es gab jedoch auch Fr\u00fcchte wie Heidelbeeren und Pflaumen und Gem\u00fcse wie Broccoli, Rosenkohl und Spinat deren Ergebnisse im Test mit 2-Desoxyribose nicht durch den Zuckergehalt allein erkl\u00e4rt werden k\u00f6nnen. Zu den in anderen Tests antioxidativ wirksamen Substanzen m\u00fcssen auch phenolische Verbindungen geh\u00f6ren wie phenolische S\u00e4uren, Flavonoide und Anthocyane, deren Vorkommen und Aktivit\u00e4t z.T. bekannt sind. Ein Beitrag von Anthocyanglykosiden wird schon dadurch wahrscheinlich gemacht, da\u00df Pre\u00dfsaft wie R\u00fcckst\u00e4nde entsprechender Fr\u00fcchte meist sehr potent waren. Die in allen Experimenten beobachtete Variation der Rangfolge der \u00fcberpr\u00fcften Fr\u00fcchte und Gem\u00fcse entspricht ganz den Erwartungen. Ob und wie die erhaltenen Ergebnisse zu einer totalen antioxidativen Rangfolge zusammengefa\u00df\u00e4t werden k\u00f6nnen ist noch ungekl\u00e4rt. Ungekl\u00e4rt ist auch noch, welche Wechselwirkungen etwa in den Extrakten der Lyophilisate vorliegen. Sicher ist jedoch bereits, da\u00df wenigstens in einigen F\u00e4llen keine einfachen additiven Effekte von S\u00e4ften und R\u00fcckst\u00e4nden im DPPH bzw. ABTS-Test vorliegen wie Modellrechnungen zeigten. Dies wird auch durch einige auff\u00e4llige Diskrepanzen belegt (Tab. 5: Himbeeren, Pfirsiche, Grapefruit, Orangen). Andererseits waren die carotinoidreichen R\u00fcckst\u00e4nde von Grapefruit und Orangen im DPPH-Test wenig aktiv, Karotten sogar nahezu inaktiv. Dies kann so erkl\u00e4rt werden, da\u00df Carotinoide im DPPH-Test kaum aktiv sind, da sie ein H-Atom nur sehr schwer abgeben k\u00f6nnen, w\u00e4hrend die Abgabe eines Elektrons im ABTS-Test sehr wohl m\u00f6glich ist.

Untersuchungen von Obst und Gem\u00fcse im Hinblick auf antioxidative Aktivit\u00e4ten wurden auch von anderen Autoren durchgef\u00fchrt. So untersuchten Rechner et al., 1997 mittels des ABTS-Testes kommerzielle S\u00e4fte und Nektare und fanden in sogenannten "Bunfts\u00e4ften" (roter Traubensaft, Sauerkirschnektar, Beerennektare) wie wir hohe antioxidative Potentiale. Bei schwarzen Johannisbeeren war ein Einflu\u00df der Sorte eindeutig nachweisbar. Ein Einflu\u00df der Sorte ist immer m\u00f6glich und wurde auch f\u00fcr vier *Vaccinium* Species, darunter Heidelbeeren, nachgewiesen, allerdings unter Verwendung des ORAC-Tests (oxygen radical absorbance capacity; Prior et al., 1998). In diesem Test werden Peroxylradikale aus AAPH erzeugt, die jedoch anders als in unseren Untersuchungen mittels eines braunen Proteins aus Algen ( $\beta$ -Phycocerythrin) detektiert werden. Mit demselben Testsystem wurde auch die antioxidativen Potenzen von Fr\u00fcchten (Wang et al., 1996) und Gem\u00fcsen (Cao et al., 1996) bestimmt. Neben vielen \u00c4hnlichkeiten mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen wurden erwartungsgem\u00e4\u00df im Detail z.T. andere Rangfolgen beschrieben, \u00dcbereinstimmung besteht jedoch darin, da\u00df Obst und Gem\u00fcse eine wichtige Quelle f\u00fcr eine Vielzahl von Antioxidantien darstellen. Dieser Sachverhalt wurde mit unabh\u00e4ngigen elektrochemischen Daten f\u00fcr Pre\u00dfsaft von Obst und Gem\u00fcse best\u00e4tigt (Guo et al., 1997). Dar\u00fcberhinaus liegen weitere Studien vor, die mit unterschiedlichen Methoden antioxidative Effekte von Obst und Gem\u00fcse nachwiesen (Miller et al., 1996; Abuja et al., 1998;

Tabelle 6 Antioxidative Potenzen von Obst und Gemüse im DPPH-Test

RSC <sub>50</sub> [mg/ml] <sup>a</sup>							
Obst	Saft	Rückstand	Lyophilisat	Obst/Gemüse	Saft	Rückstand	Lyophilisat
<b>A. Beerenobst</b>				<b>C. Kernobst</b>			
Brombeeren	6,5	2,8	4,6	Äpfel	168,2	7,5	63,7
Erdbeeren	11,7	3,1	9,5	Birnen	n.e.	29,4	66,6
Heidelbeeren	11	1,6	7,6	<b>D. Zitrusfrüchte</b>			
Himbeeren	7,2	5,5	4,8	Grapefruit, gelb	11,5	41,3	12,4
Johannisbeeren, rot	12,1	2	7,4	Orangen	11,2	51,7	10,8
Johannisbeeren, schwarz	2,7	0,7		<b>E. Wildfrüchte</b>			
Stachelbeeren	29,7	9,1		Holunder	6,5	4,8	
Trauben, blau	16,6	1,4	7,3	<b>F. Exotische Früchte</b>			
Trauben, rot	69,5	18,1	67,5	Kürbis	55,9		
Trauben, weiß	180,9	5,9	167,2	Wassermelone	24,4	165,7	
<b>B. Steinobst</b>				<b>G. Gemüse</b>			
Aprikosen	42,7			Rote Beete	7,5	7,3	
Kirschen süß	83,7	17,2	30,4	Blumenkohl		28,5	
Kirschen, sauer	14	8,3		Broccoli	23,2	57,8	14,3
Mirabellen	79,5	28,6		Karotten	n.e.	n.e.	
Pfirsiche	n.e.	68,9	123,9	Rosenkohl	18,5		
Pflaumen	78,8	5,9	35,2	Spinat	21,6	85	

a, RSC<sub>50</sub> (radical scavenging concentration 50%) ist die Konzentration eines gegebenen Extraktes, die erforderlich ist, um den Ausgangswert der DPPH-Extinktion um 50% zu reduzieren. n.e., nicht erreicht.

## Literatur

Abuja P.M., M. Murkovic, W. Pfannhauser, Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4091-4096.

Armstrong, B.K., J.I. Mann, A.M. Adelstein, F. Eskin, Commodity consumption and ischemic heart disease mortality, with special reference to dietary practices, J. Chron. Dis. 28 (1975) 455-469.

Block G., B. Patterson, A. Subar, Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the available epidemiologic evidence, Nutr. Cancer 18 (1992) 1-29.

- Brand-Williams W., M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Sci. Technol* 28 (1995) 25-30.
- Bresnick E., D.F. Birt, K. Wolterman, M. Wheeler, R.S. Markin, Reduction in mammary tumorigenesis in the rat by cabbage and cabbage residue, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1159-1163.
- Cao G., E. Sofic, R.L. Prior, Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3426-3431.
- Chen Z.Y., P.T. Chan, K.Y. Ho, K.P. Fung, J. Wang, Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups, *Chem. Phys. Lipids*, 79 (1996) 157-163.
- Edenharder R., P. Kurz, K. John, S. Burgard, K. Seeger, In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 443-459.
- Edenharder R., Ch. Leopold, K. Kries, Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.* 341 (1995) 303-318.
- Edenharder R., J. Frangart, M. Hager, P. Hofmann, R. Rauscher, Protective effects of fruits and vegetables against *in vivo* clastogenicity of cyclophosphamide or benzo[a]pyrene in mice, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 637-645.
- Fickler, M., Antioxidative und antimutagene Aktivitäten in Obst und Gemüse und Stabilität dieser Faktoren nach Ultrahochdruckbehandlung, *Diplomarbeit zur Erlangung des Grades Diplom-Biologe*, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 1998.
- Fried R., L.W. Fried, *Farb-Test, 1879-1884* in: H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", Bd. I, Verlag Chemie, Weinheim, 1970.
- Grisham M.B., *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine*; R.G. Landes Co: Austin, TX, USA, 1992
- Guo Ch., G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: relationship to oxygen radical absorbance capacity, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1787-1796.
- Heinonen I.M., A.S. Meyer, E.N. Frankel, Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4107-4112
- Meyer A.S., O-S. Yi, D.A. Pearson, A.L. Waterhouse, E.N. Frankel, Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*), *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1638-1643.
- Miller N.J., C. Rice-Evans, Factors influencing the antioxidant activity determined by the

- ABTS<sup>-</sup> radical cation assay, *Free Rad. Res.* 26 (1997) 195-199.
- Miller N.J., C. Rice-Evans, The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple juices and blackcurrant drink, *Food Chemistry* 60 (1997) 331-337.
- Plumb G.W., N. Lambert, S.J. Chambers, S. Wanigatunga, R.K. Heaney, J.A. Plumb, O.I. Aruoma, B. Halliwell, N.J. Miller, G. Williamson, Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants?, *Free Rad. Res.* 25 (1996) 75-86.
- Prior R.L., G. CAO, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, Ch. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewere, C.M. Mainland, Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2686-2693.
- Rechner A., C.-D. Patz, H. Dietrich, Beitrag zur Bewertung der antioxidativen Kapazität verschiedener Getränke, *Flüssiges Obst*, 64 (1997) 62-65.
- Steinmetz K.A., J.D. Potter, Vegetables, fruit and cancer: I. Epidemiology, *Cancer Causes Control* 2 (1991) 325-357.
- Verlangieri A.J., J.C. Kapeghian, S. el-Dean, M. Bush, Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality, *Med. Hypoth.* 16 (1985) 7-15.
- Wang H., G. Cao, R.L. Prior, Total antioxidant capacity of fruits, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 701-705.



## Untersuchung rebsortenreiner Traubensäfte auf den Gehalt an Resveratrol-Derivaten

*M. Pour Nikfardjam, K. Schmitt, E.H. Rühl, C.-D. Patz, H. Dietrich*

Forschungsanstalt Geisenheim, FG Weinanalytik und Getränkeforschung,  
von-Lade-Str. 1, D-65366 Geisenheim

*Analysis of Variety Pure Grape Juices on their content of Resveratrol-Derivates*

### **Abstract**

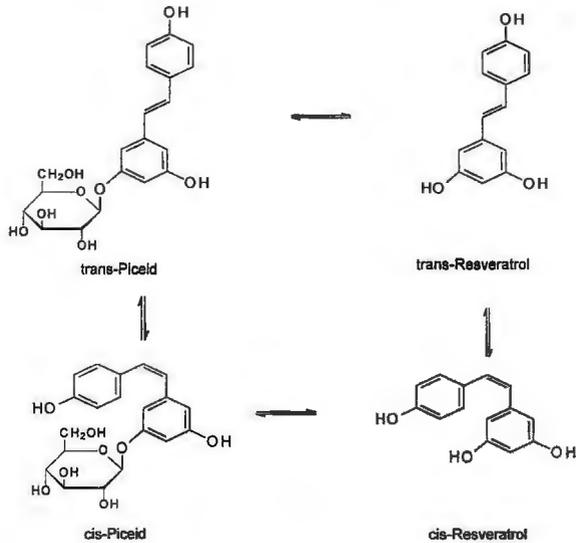
*Content of resveratrol-derivates was analyzed in commercial grape juices. The obtained results were compared with experimental juices of pure varieties. In white commercial samples only little amounts of resveratrol-derivates could be found (mean: 0.5 mg/L; max. 2.2 mg/L; min. < 0.1 mg/L), in red juices significantly more (mean: 3.1 mg/L, max. 12.5 mg/L, min. < 0.1 mg/L). In white variety pure juices the amounts were also low (mean: 0.2 mg/L, max. 0.5 mg/L, min. < 0.1 mg/L), in red juices again quite high (mean: 6.3 mg/L, max. 15.3 mg/L, min. < 0.1 mg/L). In variety pure juices the resveratrol-content depended on the variety as reported for wine. Blending of red with white juice could not be proved by resveratrol-content, but possibly by the percentile content on polyphenols, because e.g. commercial samples contain rather small concentrations of anthocyanins (13% of whole polyphenol content, in variety pure juices more than 60%). The antioxidative capacity is quite higher in the variety pure juices (mean: 16.1 mmol/L, max. 36.2 mmol/L) than in the commercial ones (mean: 5.0 mmol/L, max. 12.9 mmol/L). These parameters, in combination with the polyphenol content (estimated by Folin-method), could eventually be used to prove a blending of red grape juice with white ones.*

\* *Corresponding author: H. Dietrich*

### **1. Einleitung**

In Zusammenhang mit der Diskussion über „Wein & Gesundheit“ steht in der Literatur insbesondere die Substanz Resveratrol im Mittelpunkt. Sie gilt als Leitsubstanz für die gesundheitliche Rolle von Weinhaltstoffen aus der Gruppe der Polyphenole<sup>1,2,3,4,5,6</sup>). Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) ist ein in der Weinrebe vorkommendes *Phytoalexin*, welches gegen Pilzbefall und als Fraßgift gebildet wird und die Rebe gleichzeitig vor Krankheitsserregern schützt<sup>1</sup>). Chemisch gehört die Substanz zur Stilbengruppe und kommt in der Natur in vier Formen vor: *trans*- und *cis*-Resveratrol sowie deren Glucoside, die auch als "Piceide" bezeichnet werden (s. Abbildung 1). Die in der Natur vorherrschende Form ist die *trans*-Verbindung. Ihr werden gesundheitlich-präventive Effekte wie antioxidative, antithrombotische und anticancerogene Wirkungen zugesprochen<sup>2,3,4,5,6</sup>). Aber auch eine östrogene Wirkung wird zunehmend diskutiert<sup>7</sup>).

Abbildung 1: Resveratrol und seine Derivate



Insbesondere die antioxidative Wirkung soll hier besprochen werden. Sie ist eng verknüpft mit dem sog. "French Paradoxon", nach dem die französische Bevölkerung offenbar aufgrund ihres höheren Rotweinkonsums eine geringere Inzidenz an Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufweist als die amerikanische<sup>8)</sup>. Die im Rotwein enthaltenen Polyphenole und hierbei insbes. Resveratrol sollen den menschlichen Organismus durch ihre antioxidative Wirkung vor aggressiven Radikalen schützen und die körpereigene Abwehr unterstützen. Bei der körpereigenen Abwehr sind insbes. die Enzyme Superoxiddismutase (SOD) und Katalase zu nennen, sowie die "Radikalfänger" Glutathion und die Vitamine A, C und E<sup>9)</sup>.

Um die antioxidative Wirkung ("antioxidative Kapazität") eines Produktes mit einem anderen zu vergleichen, hat sich die Verwendung eines Radikalabfangtests ("TEAC-Test") unter Zuhilfenahme einer Referenzsubstanz eingebürgert, auf die alle antioxidativen Wirkungen bezogen und somit miteinander verglichen werden können. Als Referenzsubstanz wird das wasserlösliche Vitamin E-Derivat TROLOX® verwendet<sup>10)</sup>. (Anm.: Über diesen Test kann jedoch nur eine *in vitro*-Wirkung nachgewiesen werden. Die Bioverfügbarkeit bzw. die Wirkung *in vivo* können darüber nicht beurteilt werden.)

Während das Vorkommen von Resveratrol in Weinen bereits sehr gut untersucht ist<sup>11,12)</sup>, ist über die Resveratrol-Gehalte von Traubensäften bislang nur wenig bekannt<sup>13,14,15,16)</sup>. Es stellte sich nun die Frage, ob Traubensäfte vergleichbare Konzentrationen wie die Weine an den genannten Derivaten aufweisen. Hierfür war eine Bestandsaufnahme der im Handel erhältlichen Säfte notwendig. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob über das Resveratrol-Muster evtl. ein Verschnitt-Nachweis von rotem mit weißem Traubensaft möglich ist.

Zur Bestandsaufnahme wurden 33 Säfte des Handels auf ihren Gehalt an Resveratrol-Derivaten untersucht. Parallel dazu wurde aus sieben Rebsorten im Kleinmaßstab sortenreiner Traubensaft hergestellt. Zusätzlich wurden drei rebsortenreine Traubensäfte mit bekanntem Herstellungsverfahren aus einem Großbetrieb analysiert, um den Einfluss großindustrieller Verfahren auf den Resveratrol-Gehalt zu untersuchen.

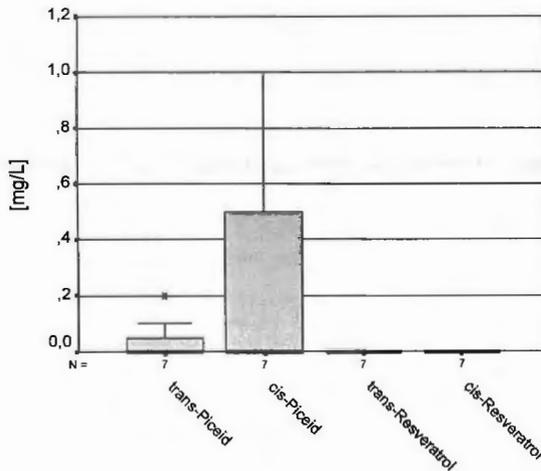
Neben dem Gehalt an Resveratrol-Derivaten<sup>13)</sup> wurde auch das Polyphenolmuster mittels HPLC<sup>17)</sup>, der Gesamtphenolgehalt (n. FOLIN-CIOCALTEU) und die antioxidative Kapazität<sup>10)</sup> gemessen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 weiße Traubensäfte

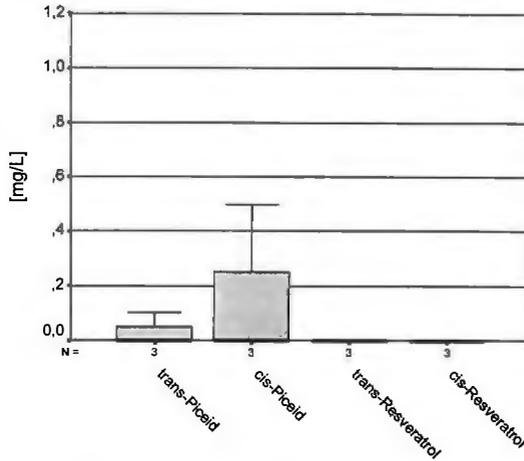
In den weißen Traubensäften des Handels stellten die Glucoside die Hauptformen der Resveratrol-Derivate dar. Es ließen sich jedoch keine freie Isomere (Aglykone) nachweisen. In allen Säften dominierte das *cis*-Piceid. Dies ist vermutlich auf die genuin geringen Gehalte von weißen Trauben an Resveratrol-Derivaten zurückzuführen. Da bei weißen Trauben keine Maischeerhitzung, wie dies bei den roten Sorten der Fall ist, durchgeführt wird, können die Derivate vermutlich nicht gut aus der Traubenschale herausgelöst werden. Die Ergebnisse für die weißen Säfte sind in Abbildung 2 dargestellt. Dadurch, dass viele Proben nur sehr geringe Konzentrationen an den Resveratrol-Derivaten aufwiesen, liegen deren Mittelwerte unter der Nachweisgrenze von 0,1 mg/L, obschon einige Proben recht hohe Einzelwerte von bis zu 1,0 mg/L an *cis*-Piceid aufwiesen.

Abbildung 2: Resveratrol in weißen Handelstraubensäften



Der Trend zu geringen Resveratrol-Gehalten in weißen Säften setzte sich auch in den rebsortenreinen Säften fort. Hier konnten ebenfalls keine Aglykone nachgewiesen werden, aber die *Piceide* lagen in weit geringeren Konzentrationen (max. 0,5 mg/L) vor als bei den Handelsproben (vgl. Abbildung 3). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Handelssäfte im Gegensatz zu den selbst hergestellten Säften zumeist Maische-enzymiert sind, und dadurch die höheren Gehalte der Handelssäfte zustande kommen.

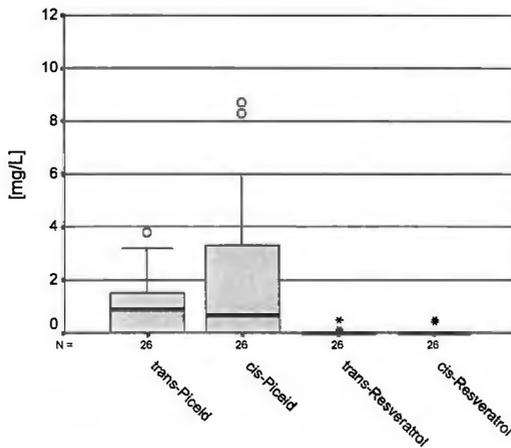
**Abbildung 3: Resveratrol-Derivate in weißen rebsortenreinen Traubensäften**



### 2.2 rote Traubensäfte

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse für die roten Traubensäfte.

**Abbildung 4: Resveratrol-Derivate in roten Handelstraubensäften**

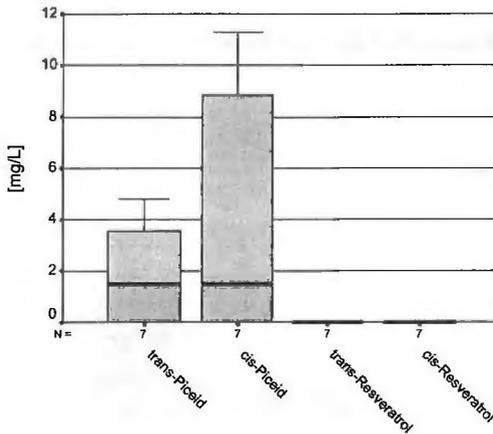


Es zeigt sich, dass die roten Handelstraubensäfte mit einem Mittelwert von 1,1 mg/L für trans- bzw. 1,9 mg/L für cis-Piceid deutlich mehr Resveratrol-Derivate besitzen als die weißen (Mittelwert: 0,1 mg/L). Auch hier dominierte bei weitem das *cis*-Piceid, im Gegensatz zu

den weißen Säften ließen sich hier aber auch in manchen Proben geringe Mengen an Aglykonen nachweisen. Diese Unterschiede lassen sich durch die unterschiedliche Herstellung (Maischeerhitzung, -enzymierung) und die von Natur aus höheren Konzentrationen an Resveratrol-Derivaten in roten Trauben erklären.

In den rebsortenreinen roten Säften ließen sich deutlich höhere Konzentrationen an Resveratrol-Derivaten nachweisen (vgl. Abbildung 5). Der Mittelwert liegt hier für das trans-Piceid bei 1,9 mg/L bzw. bei 4,4 mg/L für das cis-Piceid. Die Spanne reicht hier aber viel weiter als bei den Handelssäften. In manchen Proben waren bis zu 11,2 mg/L an cis-Piceid nachzuweisen. Die große Spannweite der Werte spricht für die von roten Sorten bekannte Rebsortenabhängigkeit des Resveratrol-Gehaltes. So sollen rote Rebsorten insbes. diejenigen aus der Burgunder-Familie besonders hohe Gehalte an Resveratrol-Derivaten aufweisen<sup>18)</sup>.

**Abbildung 5: Resveratrol-Derivate in roten rebsortenreinen Traubensäften**



### 2.3 Vergleich Traubensaft ↔ Wein

Zieht man nun einen Vergleich der ermittelten Konzentrationen mit den für Weinen bekannten Werten, so fällt auf, dass die Traubensäfte deutlich geringere Mengen an Resveratrol-Derivaten aufweisen (vgl. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Vergleich von Resveratrol-Konzentrationen in Säften und Weinen**

[mg/L]	Traubensaft (weiß)	Traubensaft (rot)	Weißwein*	Rotwein*
trans-Piceid	0,1	1,1	4,0	11,6
cis-Piceid	0,5	1,9	1,4	4,3
trans-Resveratrol	n.n.	0,1	0,6	1,3
cis-Resveratrol	n.n.	0,1	0,3	2,5

\* Lit: Ribiero de Lima et al. (1999) J. Agric. Food Chem. 47/2, 666-70

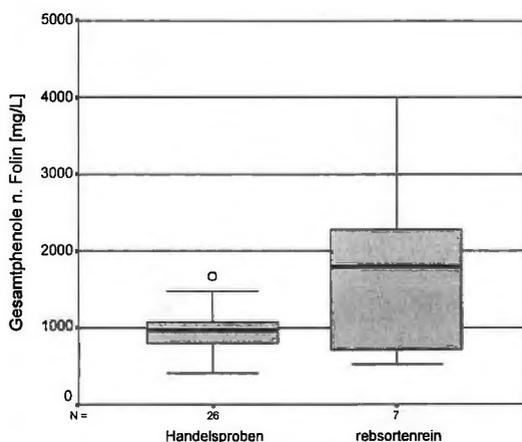
Die höheren Konzentrationen der Weine sind insbes. auf die unterschiedlichen Herstellungsverfahren zurückzuführen. Durch den sich bei der Gärung bildenden Alkohol und durch ver-

schiedene hydrolytische und enzymatische Prozesse können die Resveratrol-Derivate besser aus der Traubenschale herausgelöst werden. Durch die Vergärung auf der Maische und die genuin höheren Konzentrationen in den roten Trauben zeigen sich bei den Rotweinen besonders hohe Werte.

#### 2.4 Gesamtphenole n. Folin

Wie bereits gezeigt wurde, ist die Spanne der Resveratrol-Werte bei den Traubensäften recht groß und uneinheitlich. Ein möglicher Verschnittnachweis von rotem mit weißem Traubensaft kann vermutlich nicht über diesen Parameter geführt werden. Betrachtet man dagegen die Werte für Folin und TEAC-Wert, so könnte darüber evtl. ein Nachweis geführt werden. In Abbildung 6 sind die Folin-Werte für die roten Säfte abgebildet.

**Abbildung 6: Folin-Werte von roten Traubensäften**

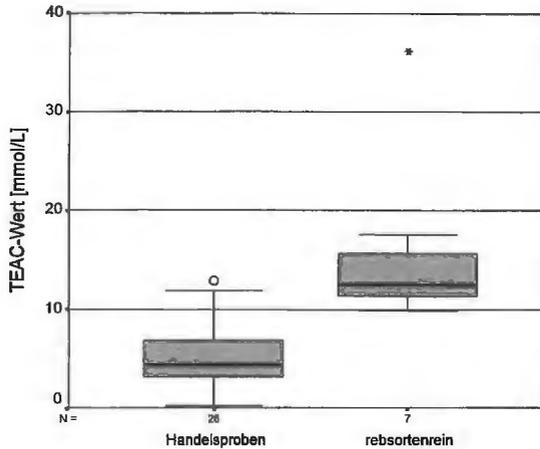


Die Gesamtphenolgehalte der Handelsproben liegen fast genau bei 1000 mg/L und wirken u.a. auch durch die geringe Spannweite der Werte "eingestellt". Betrachtet man dagegen die Werte für die rebsortenreinen Säfte, so liegen die Werte im Mittel mit 1800 mg/L deutlich höher und sind damit auch vergleichbar mit Werten, die von Weinen bekannt sind. Bei Rotweinen findet man Werte, die im Mittel bei 1800 mg/L liegen und bis zu 3800 mg/L reichen können<sup>12)</sup>. Bei den rebsortenreinen Säften lässt sich auch die Charakteristik der jeweiligen Rebsorte ablesen. So enthalten farbstarke (Anthocyan-reiche) Säfte wie aus Dunkelfelder-Trauben z.B. Werte von bis zu 4000 mg/L und können damit durchaus mit den Rotweinen konkurrieren. Bei den Handelssäften ist dies nicht zu beobachten und lässt somit auf einen Verschnitt vermuten.

#### 2.5 Antioxidative Kapazität (TEAC-Wert)

Dies bestätigt sich auch in den Ergebnissen für den TEAC-Wert. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung auf die antioxidative Kapazität der Säfte.

**Abbildung 7: TEAC-Werte von roten Traubensäften**



Die TEAC-Werte der Handelssäfte weisen einen Mittelwert von 5,0 mmol/L auf. Nur wenige Proben erreichten Werte über 10 mmol/L. Der relativ hohe Wert von 12,9 mmol/L einer Handelsprobe wurde von einem "Bio-Traubensaft" erreicht, der auch durch seine besonders tiefe Farbe (hoher Gehalt an Anthocyanen) auffiel. Die TEAC-Werte korrelieren gut mit den gemessenen Werten für die Gesamtphenole nach Folin und beweisen einmal mehr, dass die antioxidative Kapazität von der Gesamtheit der Phenole abhängig ist und nicht von einer Substanz (Resveratrol) alleine. Die TEAC-Werte der rebsortenreinen Säfte liegen ca. dreimal so hoch (Mittel: 16,1 mmol/L) wie bei den Handelssäften und erreichen Werte, die sonst nur von Rotweinen (Mittel: 8-14 mmol/L) oder anderen farbstarken Buntsäften bekannt sind<sup>19)</sup>. Besondere Beachtung verdient der Saft aus Dunkelfelder-Trauben, der einen TEAC-Wert von 36,2 mmol/L aufwies. Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der mittleren TEAC-Werte verschiedener Produkte mit den gemessenen Werten<sup>19)</sup>:

**Tabelle 2: mittlere TEAC-Werte verschiedener Getränke (n. Will et al. (1999))**

Produkt	TEAC-Wert [mmol/L]
Apfelsaft (klar)	2,1
Apfelsaft (trüb)	2,9
Orangensaft	2,4
Multivitaminsaft	3,4
Schwarzer Johannisbeersaft	32,8
Holundersaft	50-60
Brombeersaft	13,1
Rotwein	8-14
roter Traubensaft (Handel)*	0,2-12,9 (Ø 5,0)
rebsortenreine Säfte (eigene Herstellung)*	9,9-36,2 (Ø 16,1)

(\* eigene Ergebnisse)

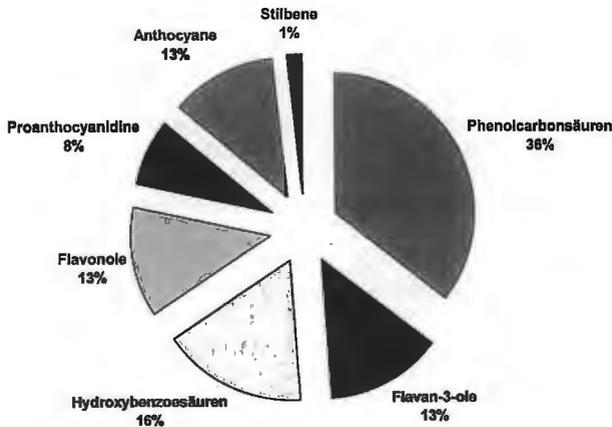
Die niedrigen Werte der Handelssäfte hinsichtlich TEAC-Wert könnten auf Veränderungen während des Ausbaus und der Lagerung bzw. auf einen evtl. Verschnitt von rotem mit weißem Traubensaft zurückzuführen sein., der sehr hohe Wert von 36,2 mmol/L eines selbst hergestellten Saftes stammt wie bereits erwähnt aus Dunkelfelder-Trauben.

### 2.6 Verschnittnachweis

Der eventuelle Verschnitt von rotem mit weißem Traubensaft kann wie oben beschrieben vermutlich nicht über den Gehalt an Resveratrol-Derivaten nachgewiesen werden. Zum einen ist nach *Vrhovsek* (1996) der Einfluss der Rebsorte (Zugehörigkeit zur Burgunder-Familie) und der Herstellung (Maischeerhitzung/-enzymierung, Dauer der Behandlung, verwendete Schönungsmittel) sehr groß: So lassen sich - wie oben gezeigt - nur in den enzymisierten Säften die Aglykone des Resveratrols nachweisen. Zum anderen sind die Konzentrationen an Resveratrol-Derivaten in beiden Saftarten geringer als im Wein, so dass ein Verschnitt nicht eindeutig erkennbar wäre.

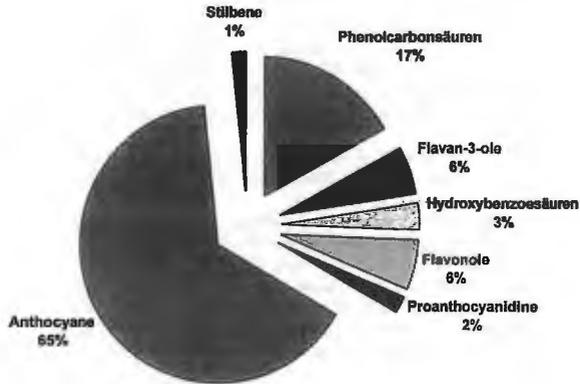
Der Verschnitt könnte aber evtl. an der prozentualen Phenolzusammensetzung abgelesen werden. Hierbei zeigt sich, dass die Handelsproben nur sehr geringe Mengen an Anthocyanen besitzen (vgl. Abbildung 8). Ihr Anteil beträgt nur 13%, während die Phenolcarbonsäuren den Löwenanteil an den Phenolen stellen.

**Abbildung 8: Phenolzusammensetzung der roten Handelssäfte (n=27)**



Vergleicht man dies mit den rebsortenreinen Säften, so fällt sofort der sehr hohe Gehalt an Anthocyanen dieser Säfte auf (weit über 60%). Auch ist der Anteil an Phenolcarbonsäuren, Flavonolen, Proanthocyanidinen und Flavan-3-olen in den Handelssäften mehr als doppelt so hoch, so dass diese Tatsache ebenfalls auf einen Verschnitt hindeuten könnte (vgl. Abbildung 9).

**Abbildung 9: Phenolzusammensetzung roter rebsortenreiner Traubensäfte (n=7)**



Somit könnte ein Verschnitt von rotem mit weißem Traubensaft über das Phenolmuster nachweisbar sein; allerdings nur in Kombination mit den Werten für Gesamtphenolgehalt und TEAC-Wert, da sich während Lagerung durch Kondensationsreaktionen der Gehalt an monomeren Anthocyanen ändern könnte, der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin dabei jedoch nahezu konstant bleiben bzw. - im Falle des TEAC-Wertes - sogar leicht zunehmen.

### **3. Empfehlung für die Fruchtsaftindustrie**

Auch im Sinne des Verbrauchers wäre eine Herstellung von Säften mit hohem Gehalt an Phenolen und Anthocyanen wünschenswert. Es könnten Säfte mit weit höheren antioxidativen Kapazitäten hergestellt werden, als sie bislang im Handel sind bzw. dies bislang von Weinen bekannt ist. Hierdurch würde sich eine alkoholfreie Alternative zum "gesunden" Weinkonsum eröffnen, der damit auch für Abstinenzler, Menschen mit Leberkrankheiten und Kinder zugänglich wäre.

### **4. Danksagung**

Die Autoren bedanken sich bei der Baumann-Gonser-Stiftung / Geisenheim für die finanzielle Unterstützung und der Firma Zipperle (Meran/Italien) für die Kooperation.

## 5. Literatur

1. *Stein U. und M. Blaich: Vitis 24, 75-87 (1985)*
2. *Fontecave M., M. Lepoivre, E. Elleingand, C. Gerez und O. Giuttet: FEBS Letters 421, 277-79 (1998)*
3. *Jang M., L. Cai, G.F. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinhorn, R.G. Mehta, R.C. Moon und J.M. Pezzuto: Science 275, 218-20 (1997)*
4. *Frankel E.N., A.L. Waterhouse und J.E. Kinsella: Lancet 341, 1103-04 (1993)*
5. *Pace-Asciak C.R., S. Hahn, E.P. Diamandis, G.M. Soleas und D.M. Goldberg: Clin. Chim. Acta 235, 207-19 (1995)*
6. *Bertelli A.A.E., L. Giovannini, F. de Caterina, M. Miglioni, W. Bernini, M. Fregoni, J. Bavaresco, M. Trevisan und A. Bertelli: Feuillet Bleu 25, Office International de la Vigne et du Vin, Paris, France (1996)*
7. *Willtams R.L., M. Elliott, R. Perry und B. Greaves: Groupe Polyphenols 2, 489-490 (1996)*
8. *Renaud S. und M. de Lorgeril: Lancet 339, 1523-26 (1992)*
9. *Ehrentsch-Förster E., D. Schischniaschwili, M.I. Song und F.W. Scheller: BioForum 1-2, 7-10 (1997)*
10. *Miller N.J., C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan und A. Milner: Clin. Sci. 84, 407-12 (1993)*
11. *Vrhovsek U., S. Wendelin und R. Eder: Groupe Polyphenols Bull. Liaison 2, 339-340 (1996)*
12. *Pour Nikfaradjam M., A. Rechner, C.-D. Patz und H. Dietrich: Vitic. Enol. Sci. 54/1, 17-20 (1999)*
13. *Romero-Pérez A.I., R.M. Lamuela-Raventós und M.C. de la Torre-Boronat: J. Agric. Food Chem. 47, 1533-36 (1999)*
14. *Ribiero de Lima M.T., P. Waffo-Têguo, P.L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J.C. Cabanis und J.M. Mérillon: J. Agric. Food Chem. 47/2, 666-70 (1999)*
15. *Soleas G.J., D.M. Goldberg, A. Karumanchiri, E.P. Diamandis und E. Ngu: J. Wine Res. 6, 107-21 (1995)*
16. *Romero-Pérez A.I., R.M. Lamuela-Raventós, A.L. Waterhouse und M.C. de la Torre-Boronat: J. Agric. Food Chem. 44, 2124-28 (1996)*
17. *Rechner A., C.-D. Patz und H. Dietrich: DLR 94, 363-365 (1998)*
18. *Ector B.C., J.B. Magee, C.P. Hegwood und M.J. Coign: Am. J. Enol. Vitic. 47/1, 57-62 (1996)*
19. *Will F., A. Rechner und H. Dietrich: Getränkeindustrie 11/99, 692-98 (1999)*



DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR QUALITÄTSFORSCHUNG  
(PFLANZLICHE NAHRUNGSMITTEL) E. V.  
c/o Fachgebiet Obstbau TUM 85350 Freising  
XXXV. VORTRAGSTAGUNG, KARLSRUHE, 2000

## **Harmonisierung nationaler und internationaler lebensmittelrechtlicher Gesetze und Verordnungen**

*Bernd Luckas*

Lehrstuhl Lebensmittelchemie, Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena

*Harmonization of national and international legislation related to food commerce*

*In Germany legislation related to food commerce is based on a law from 1879. Food chemists were needed for supervising the food commerce. This tradition was prolonged in the next century and accompanied by permanent changes of the national regulations referring food. The most important national law related to food is the LMBG established 1974. Parallel in Europe the members of the EU enacted own regulations referring food commerce considering national particularities in food manufacturing and consumption. Therefore, many efforts were undertaken to harmonize the national legislation and EU regulations. Independent of the harmonization in Europe the individual states of the world are working on the Codex Alimentarius which contains internationally accepted standards for food commerce.*

Prof. Bernd Luckas, Institut für Ernährungswissenschaften, Dornburger Str. 25, 07743 Jena, Germany

### **Die Entwicklung des Lebensmittelrechts in Deutschland**

In Deutschland entstand die Lebensmittelchemie als exakte Naturwissenschaft vor ca. 125 Jahren, und gleichzeitig erfolgte bereits damals die Ausbildung von Lebensmittelchemikern mit einem eigenständigen Berufsbild, denn die Politiker hatten erkannt, daß der Staat Fachleute benötigt, um die Bevölkerung vor Risiken durch Lebensmittel zu schützen. Die entscheidende gesundheitspolitische Maßnahme in dieser Zeit war ein Reichsgesetz von 1879, das die „chemisch-technische Untersuchung und Beurteilung von Nahrungs-, Genußmitteln und Gebrauchsgegenständen“ vorschrieb. Diese Aufgabe konnte nur eine Berufsgruppe mit profunden analytischen Fähigkeiten und speziellen Kenntnissen bzgl. der rechtlichen Beurteilung von Lebensmitteln übernehmen. Ihre Ausbildung wurde 1894 durch eine im Deutschen Reich einheitliche Prüfungsordnung geregelt; wobei die Ausbildung gemäß dem staatlichen Auftrag durch eine staatliche Prüfung abgeschlossen wurde. Das „Lebensmittelgesetz (LMG)“ von 1927 führte schließlich die Berufsbezeichnung „Lebensmittelchemiker“ ein und blieb ohne wesentliche Änderungen bis 1958 in Kraft.

Allerdings gab es bereits zu Beginn der fünfziger Jahre Bestrebungen zur Reform des gesamten nationalen Lebensmittelrechts. Sie beruhten auf einer weiter gewachsenen Unübersichtlichkeit des Lebensmittelrechts sowie spürbaren Veränderungen der Lebensmitteltechnologie, die das geltende Lebensmittelrecht teilweise unpraktikabel hatten werden lassen.

Deshalb verabschiedete 1958 der Deutsche Bundestag das „Gesetz zur Änderung und Ergänzung des Lebensmittelgesetzes“. Hauptbestandteil dieses Gesetzes war die Einführung und Definition des Begriffes „Fremdstoff“ und seine Unterstellung unter das Verbotprinzip. „Fremde Stoffe“ im Sinne dieses Gesetzes waren Stoffe, die nach §1 des neuen LMG „zu Lebensmitteln werden und die keinen Gehalt an verdaulichen Kohlenhydraten, verdaulichen Fetten, verdaulichem Eiweiß oder keinen natürlichen Gehalt an Vitaminen, Provitaminen, Geruchs- oder Geschmacksstoffen haben oder bei denen ein solcher Gehalt nicht dafür maßgebend ist, daß sie als Lebensmittel verwendet werden“. Diese „Fremdstoffe“ durften fortan nicht mehr bei der Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden, wenn sie nicht ausdrücklich dafür zugelassen waren (Verbotprinzip). Außerdem war mit der Verwendung dieser Stoffe immer eine Kenntlichmachung verbunden.

Die 1958 offen gebliebenen Reformwünsche sollten durch eine umfassende Neuordnung des Lebensmittelrechts erfüllt werden, und deshalb bildete 1963 das Gesundheitsministerium eine Kommission, der Vertreter der Wissenschaft, der Lebensmittelüberwachung, der Verbraucher und der Wirtschaft angehörten. Diese Kommission stellte 1973 im Ergebnis ihrer Beratungen den „Entwurf eines Gesetzes zur Neuordnung und Bereinigung des Rechts betreffend den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen“ vor, und 1974 wurde das „Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG)“ verkündet. Damit war die Neuordnung des Lebensmittelrechts zu einem gewissen Abschluß gebracht worden.

Das LMBG von 1974 (zuletzt geändert in der Bekanntmachung der Neufassung des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes vom 9. September 1997, BGBl. I, G 5702, Nr. 63, 1997) regelt abweichend vom alten LMG auch den Verkehr mit Tabakerzeugnissen und kosmetischen Erzeugnissen. Teilweise fand eine Rechtsbereinigung statt, indem die in mehreren selbständigen Verordnungen geregelte Materie des Zusatzstoffrechts (Fremdstoff-, Farbstoff-, Konservierungsstoff-Verordnung) in einer neuen Zusatzstoffzulassungs-Verordnung und in der Zusatzstoffverkehrs-Verordnung vereinigt wurden, was mit der Aufgabe des Begriffes „Fremdstoff“ und der Einführung des Begriffes „Zusatzstoff“ verbunden war.

Durch die Erweiterung des Anwendungsbereiches des LMBG sowie seiner Folgeverordnungen auf Lebensmittel, Tabakerzeugnisse, kosmetische Artikel und sonstige Bedarfsgegenstände ergab sich die Notwendigkeit einer Definition dieser Erzeugnisse, und diese Aufgabe erfüllen die §§ 1-5 LMBG. Danach sind Lebensmittel Stoffe, „ die dazu bestimmt sind, in unverändertem, zubereitetem oder verarbeitetem Zustand von Menschen verzehrt zu werden; ausgenommen sind Stoffe, die überwiegend dazu bestimmt sind, zu anderen Zwecken als zur Ernährung oder zum Genuß verzehrt zu werden“ (§1 LMBG). Mit dieser Definition des Lebensmittels ist die Abgrenzung zum Arzneimittel gegeben, jedoch auch die Möglichkeit, Rechtsvorschriften für Lebensmittel, die für eine besondere Ernährung bestimmt sind, auf der Grundlage des LMBG, zu erlassen. In der amtlichen Begründung des Gesetzesentwurfes von 1974 wurde das nationale LMBG als das umfangreichste Gesetzesvorhaben auf dem Gebiet des Verbraucherschutzes bezeichnet.

Der Lebensmittelchemiker ist in erster Linie dem Schutz des Verbrauchers verpflichtet, wobei die Kontrolle der Lebensmittel auf der Basis geltender Rechtsvorschriften erfolgt. Hierbei werden vorwiegend chemisch-analytische Methoden eingesetzt, um die Zusammensetzung der meist sehr kompliziert aufgebauten Lebensmittel und ihrer Rohstoffe zu ermitteln, die Reaktionen ihrer Inhaltsstoffe bei der Lagerung, Zubereitung und Verarbeitung zu untersuchen, die Art, Reinheit und Wirkungsweise der Zusatzstoffe zu überprüfen und unerwünschte Bestandteile wie Rückstände und Verunreinigungen aufzuspüren. Dadurch sind Lebensmittelchemiker die kompetenten Ansprechpartner für die Öffentlichkeit in allen Fragen, bei denen stoffliche Belastungen und Veränderungen von Lebensmitteln, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen sowie die zugehörigen ernährungsphysiologischen und toxikologischen Auswirkungen eingeschätzt werden müssen. Gleichzeitig gewannen in den letzten Jahren im Zusammenhang mit Novel Food, Nutraceuticals und Functional Food sowie gentechnisch veränderten Lebensmitteln zunehmend international kontrovers diskutierte lebensmittelrechtliche Aspekte an Bedeutung, wodurch die Probleme der Lebensmittelchemiker bzgl. der Kontrolle und Zertifizierung dieser Produkte auf der Basis der jeweils geltenden Rechtsvorschriften deutlich schwerer lösbar wurden.

### **Probleme bei der Harmonisierung des Lebensmittelrechts**

Der erwähnte Zusammenhang zwischen neuesten naturwissenschaftlichen Erkenntnissen auf speziellen Gebieten der Lebensmitteltechnologie und ihrer Widerspiegelung in nationalen lebensmittelrechtlichen Bestimmungen stellt besondere Anforderungen an die mit der Aktualisierung und Angleichung an Verordnungen anderer Staaten befaßten Rechtsexperten. So müssen z.B. die bereits erwähnten „neuen“ Lebensmittel, die vor allem durch international operierende Unternehmen auf der Grundlage aufeinander abgestimmter Programme entwickelt werden, wenn sie in den jeweiligen Ländern als Lebensmittel verkehrsfähig sein sollen, vorher ein Zulassungsverfahren durchlaufen.

Sehr oft kommt es dabei zu rechtlichen Problemen, da in nationalen Verordnungen diese Lebensmittel entweder völlig fehlen oder in einer anderen Zusammensetzung, die jedoch mit der bisherigen Verkehrsauffassung bzw. Verbrauchererwartung übereinstimmt, aufgeführt sind. Um Benachteiligungen der eigenen Produzenten zu vermeiden, gleichzeitig aber auch internationale Handelshemmnisse abzubauen, ist es in den letzten Jahren zunehmend Aufgabe der nationalen Lebensmittelgesetzgebung geworden, Verordnungen und Erlasse auf internationale Kompatibilität, d. h. auf Kongruenz mit in anderen Ländern vorherrschenden Rechtsauffassungen und Rechtsgrundlagen zu prüfen und ggf. Korrekturen vorzunehmen.

Für die Bundesrepublik Deutschland sind hier vor allem die anderen EU-Staaten Diskussionspartner, wobei zu konstatieren ist, daß bzgl. der allgemeinen Rechtsauffassung innerhalb der EU weitgehend Konsens besteht. Kontrovers wird jedoch immer noch im Zusammenhang mit der in den jeweiligen EU-Mitgliedsstaaten vorherrschenden Verbrauchererwartung diskutiert. Allerdings wirkte es sich sehr positiv aus, daß allgemein der Gesundheit des Verbrauchers (geschützt durch das Verbotssprinzip) Vorrang vor der Marktfreiheit eingeräumt wurde.

Für das deutsche und europäische Lebensmittelrecht ist das Urteil des Europäischen Gerichtshofes vom 20.2.1979 bzgl. „Cassis de Dijon“ besonders wichtig geworden, da neue Grundsätze aufgestellt wurden, die auch durch entsprechende Folgeurteile und insbesondere durch das „Bier-Urteil“ untermauert worden sind.

Diese Urteile besagen ausdrücklich, daß in allen EU-Staaten ein Produkt immer dann zulässig ist, wenn es der Rechtsituation eines EU-Ursprungslandes entspricht. Allerdings muß der Verbraucher im Importland über die Art des Erzeugnisses entsprechend informiert werden, die ergänzende Bezeichnung darf aber nicht diskriminierend sein.

Nach § 189 des EWG-Vertrages unterliegen alle Mitgliedsstaaten, also auch die Bundesrepublik Deutschland, den Verordnungen und Richtlinien des Rates sowie den Verordnungen und Richtlinien der Kommission der Europäischen Gemeinschaft. Dabei haben EG-Verordnungen allgemeine Geltung in EU-Ländern, während die Richtlinien nur hinsichtlich des Inhaltes für die Mitgliedsstaaten verbindlich sind und durch Gesetze oder Verordnungen umgesetzt werden müssen. EG-Verordnungen bedürfen also für die Entfaltung ihrer Wirkung in den Mitgliedsstaaten nicht der Umsetzung in nationales Recht durch nationale Rechtsetzung, d.h. EG-Verordnungen sind im Verhältnis zu nationalem Recht höherrangig und gehen solchem vor.

Hingegen wird durch eine EG-Richtlinie nur jeder Mitgliedsstaat verpflichtet, rechtsverbindliche Normen (Gesetz, Verordnung) zu erlassen, um die Ziele der jeweiligen Richtlinie in allgemein gültiges Recht umzusetzen. Dabei werden diese Richtlinien, je nachdem, ob sie die Harmonisierung bestimmter Tatbestände (z.B. Kennzeichnung, Verpackung, Zusatzstoffe) für sämtliche Lebensmittel oder aber nur eine Gruppe von Lebensmitteln vorsehen, als horizontale oder vertikale Richtlinien bezeichnet. Die Kommission hat in ihrem Weißbuch vom 8.11.1985 zur Harmonisierung des Lebensmittelrechts das Schwergewicht für den künftigen Erlaß von Richtlinien auf horizontale Richtlinien gelegt.

### **Internationale Standards im Lebensmittelbereich und ihre Kontrolle**

Der internationale Welthandel verlangt auch im Lebensmittelbereich schnelle und präzise Entscheidungen. Diese sind nur möglich, wenn durch nationale und internationale Gremien Verkaufs- und Lieferbedingungen für einzelne Produkte aufgestellt werden. Deshalb enthalten Kaufverträge sehr oft bestimmte Qualitätsklauseln, in denen z. B. außer Einzelheiten bzgl. der Menge, Herkunft, Lieferzeit, Versicherung und Zahlungsabwicklung auch spezifische Produktanforderungen festgeschrieben wurden (z.B. Fett-, Aschegehalt, pH-Wert, Sortierungsmerkmale, Höchstwerte für die Belastung mit Schwermetallen und/oder Pflanzenschutzmitteln), die das nationale Lebensmittelrecht ergänzen und durch ständige Praxis produktbezogene Handelsbräuche schaffen.

Dabei erschöpft sich die Wirkung dieser produktbezogenen Handelsbräuche jedoch nicht in ihrem Charakter als international angenommene aber unverbindliche Richtlinien für bestimmte Herstellungspraktiken oder Beschaffenheitsmerkmale. Vielmehr bilden Inhalte kaufmännischer Lieferungsbedingungen oft die Grundlage internationaler Standards, so daß sie mittelbar ebenfalls zu einer wichtigen Rechtsquelle werden können.

In diesem Zusammenhang kommt den Arbeiten am Codex Alimentarius, d.h. den Arbeiten an einer Sammlung international verbindlicher lebensmittelrechtlicher Standards, besondere Bedeutung zu. Während die Rechtsangleichung innerhalb der europäischen Staaten vordringlich darauf gerichtet ist, die in der Praxis maßgeblichen Rechtsbestimmungen für den innergemeinschaftlichen Warenaustausch anzugleichen, um das „ordnungsgemäße Funktionieren des gemeinsamen Marktes“ (Art. 3 EWGV) zu erreichen, werden mit dem Codex Alimentarius weitergehende Ziele verfolgt. Hier besitzt die Aufstellung von international weitgehend anerkannten Standardbedingungen für die Hygiene-Praxis sowie für die Herstellung und Beschaffenheit von Lebensmitteln durch eine gemeinsame Kommission

der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Welternährungsorganisation (FAO) Priorität. Zu dieser Kommission hat jeder Mitgliedsstaat der UNO stimmberechtigt Zutritt. Andere Staaten oder internationale Organisationen können ohne Stimmrecht mitberaten. Erkennt die Bundesregierung Standards der Codex Alimentarius-Kommission an, so ist die Deutsche Lebensmittelbuch-Kommission nach § 33 LMBG gehalten, gegebenenfalls Leitsätze unter Berücksichtigung der von der Bundesregierung anerkannten internationalen Lebensmittelstandards zu erarbeiten und zu beschließen.

Im Hinblick auf die Tatsache, daß bei wichtigen Handelspartnern der EU-Staaten z.T. abweichende Vorstellungen sowohl bzgl. der Verkehrsfähigkeit von Lebensmitteln als auch der entsprechenden rechtlichen Regelungen bestehen und angesichts der bereits in voller Dynamik befindlichen Globalisierung des Lebensmittelhandels ist das einmütige Bekenntnis der Europäer zu ihren einstimmig beschlossenen grenzüberschreitenden Neuregelungen lebensmittelrechtlicher Vorschriften von besonderer Bedeutung für den Abbau von Handelshemmnissen und die weitere Entwicklung des freien Warenverkehrs. Erfreulicherweise sind sich aber die EU-Staaten und die Staaten der Codex Alimentarius-Kommission nicht nur bei diesem Ziel einig, denn der Schutz der Gesundheit der Verbraucher und die Sicherstellung des lautereren Wettbewerbs im Verkehr mit Lebensmitteln sind auch nach dem Statut der Codex Alimentarius-Kommission oberste Richtschnur für alle Aktivitäten. Deshalb werden die Bemühungen um eine Harmonisierung lebensmittelrechtlicher Vorschriften auf einer über Europa hinausgehenden Ebene langfristig sicher ebenfalls erfolgreich sein, zum Vorteil für alle Bewohner unseres Planeten.





## Antioxidantien in pflanzlichen Lebensmitteln - am Beispiel Cystus-Teekraut

G. Wichmann, U. Kasel, Ahrensburg

LEFO-Institut, Waldemar-Bonsels-Weg 170, 22926 Ahrensburg

### *Antioxidants in vegetable food – i.e. Cystus drink*

*The antioxidant activity of special test plants and beverages was monitored by TEAC-method. The results were calculated in mmol Trolox per litre. As central sample the mediterranean plant Cystus (Cistus incanus ssp. Tauricus) was chosen. These results were compared with different tea-types, red wine and some juices. The results of the antioxidant activity-measurements were as follows: Cystus-tea (23,5 mmol Trolox/l), Cystus-extract (24,0 mmol Trolox/l), green tea (8,5 mmol Trolox/l), black tea (3,1 mmol Trolox/l), camomile tea (< 1,0 mmol Trolox/l), red wine (5,3 mmol Trolox/l), cherry juice (4,8 mmol Trolox/l), elderberry juice (7,0 mmol Trolox/l), lemon juice (< 1,0 mmol Trolox/l) and apple juice (1,0 mmol Trolox/l).*

### **Antioxidantien**

Antioxidantien sind organische Verbindungen von sehr verschiedenartigem Bau, die unerwünschte, durch Sauerstoff-Einwirkungen und andere oxidative Prozesse bedingte Veränderungen in den zu schützenden Stoffen hemmen oder verhindern. In Lebensmitteln sind Verbindungen wie Tocopherole (Vitamin E), BHA, BHT, Octyl- u. Dodecylgallat, organische Sulfide, Carotinoide, Polyphenole, Flavonoide, Curcumin sowie einige organische Säuren wie Vitamin C (Ascorbinsäure), Phenolsäuren, Milch-, Citronen- u. Weinsäure eingesetzte bzw. vorkommende Antioxidantien.

Die Wirkung der Antioxidantien besteht meist darin, daß sie als Radikalfänger für die bei der Autoxidation auftretenden freien Radikale wirken. Zu den freien Radikalen des körpereigenen Stoffwechsels sind zu zählen:

- Singulett-Sauerstoff,
- Superoxidation,
- Folgeprodukte von Wasserstoffperoxid,
- Hydroxylradikale,
- Peroxidradikale.

Wenn die Fähigkeit des Organismus, Radikale abzufangen, gestört ist (z.B. durch Streßwirkung, Mangel an sekundären Pflanzenstoffen oder andere pathogene Bedingungen), können diese Störungen an den Schwachstellen der Zellen überproportional schädigend oder zerstörend wirken. Während entgiftende Enzyme oder Katalysatoren durch ihre Aktivität nicht verbraucht werden, müssen Antioxidantien ausreichend und regelmäßig durch regenerieren oder mit der Nahrungsaufnahme ersetzt werden.

Die Aufnahme von antioxidativen Nahrungsbestandteilen zeigt zellschützende Wirkung und unterstützt die körpereigene Abwehr gegen zahlreiche Krankheiten, von einer Erkältung bis zum Krebs. Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe (besonders Phenolsäuren und Flavonoide) zählen zu den am weitesten verbreiteten sekundären Inhaltsstoffen von Obst und Gemüse. Die antioxidative Aktivität vieler pflanzlicher Phenole ist sogar höher als die der antioxidativen Vitamine E und C und trägt wahrscheinlich zur schützenden Wirkung dieser sekundären Pflanzenstoffe bei. Eine Kombination von Antioxidantien erzielt eine stärkere zellschützende Wirkung als eine einzelne Substanz. Es zeigt sich, daß im Cystus-Tee eine individuelle und hochwirksamen Kombination von Antioxidantien enthalten ist, die als wesentlich wirksamer als z.B. Vitamin C – Tabletten zu beurteilen sind. Schon 20 ml (= 1 Schnapsglas) von den untersuchten Cystus-Getränken hat die selbe antioxidative Wirkung wie die Tagesdosis an Vitamin C !

### **Cystus-Teekraut**

Als zentrale Testpflanze wurde der in Griechenland beheimatete Cystus (*Cistus incanus* ssp. *Tauricus*) ausgewählt. Cystus ist ein bis zu ein Meter hoher aromatisch riechender Strauch. Seine Blätter sind eiförmig-lanzettlich und die Blüten rosarot. Daher wird die Pflanze auch Cistrose genannt.

Der Genuß des Cystus läßt sich bis ins 4. Jahrhundert vor Christus zurückverfolgen. An nährenden Inhaltsstoffen ist besonders der hohe Gehalt an Polyphenolen hervorzuheben, die sich beim Übergießen der Blätter und Zweige leicht herauslösen und dem Tee einem besonderen Geschmack geben. Kurz gekochte wäßrige Extrakte werden zur lokalen Therapie entzündlicher Hauterkrankungen, zur Wundheilung und für Körperwaschungen eingesetzt. Zur Pharmakologie der Gattung *Cistus* L. liegen nur wenige Untersuchungen vor. Diese betreffen hauptsächlich die antimikrobielle Aktivität der ätherischen Öle und Harze. Dem Pflanzenextrakt werden aufgrund der kondensierten Gerbstoffe antimykotische Wirkungen und aufgrund des hohen Gehaltes an Polyphenolen eine entgiftende Wirkung der mit der Nahrung aufgenommenen Schwermetalle (z.B. Cadmium) zugeschrieben.

### **Die Ergebnisse**

Das antioxidative Potential der ausgewählten Pflanzentees und Säfte wurde mittels der TEAC-Methode bestimmt. Die Ergebnisse wurden in mmol Trolox pro Liter berechnet.

Als zentrale Testpflanze wurde der in Griechenland beheimatete Cystus (*Cistus incanus* ssp. *Tauricus*) ausgewählt. Untersucht wurde der Aufguß (5g Cystus/ 100 ml kochendes Wasser) und der im Handel erhältliche Cystus-Sud. Verglichen wurden die Ergebnisse mit wichtigen Teesorten ( Aufguß nach Herstellerangaben), Rotwein und Säften wie Holunderbeersaft, Kirschsafft, frisch gepreßter Citronensaft und Apfelsaft. Folgende antioxidative Potentiale wurden gemessen:

	<b>Antioxidatives Potential</b>
<b>Tee´s</b>	
Cystus-Tee	23,5 mmol Trolox/ Liter
Cysuts-Sud	24,0 mmol Trolox/ Liter
Grüner Tee	8,5 mmol Trolox/ Liter
Schwarzer Tee	3,1 mmol Trolox/ Liter
Kamillentee	< 1,0 mmol Trolox/ Liter
<b>Wein</b>	
Rotwein	5,3 mmol Trolox/ Liter
<b>Säfte</b>	
Kirschsafte	4,8 mmol Trolox/ Liter
Holunderbeersafte	7,0 mmol Trolox/ Liter
Citronensafte, frisch gepreßt	< 1,0 mmol Trolox/ Liter
Apfelsafte (Lit.)	1,0 mmol Trolox/ Liter
<b>Vitamin C</b>	
Ascorbinsäure-Lösung (880 mg/ Liter)	5,6 mmol Trolox/ Liter

Durch den besonders hohen Gehalt an Polyphenolen wurde für Cystus-Tee und Cystus-Sud ein erstaunlich hohes antioxidatives Potential gemessen, das mit 23,5 bzw. 24,0 mmol Trolox/ Liter wesentlich höher liegt als herkömmliche Teesorten, Säfte oder auch Rotwein. Im Vergleich zum Rotwein besitzt der Cystus-Sud ein mehr als 4fach (!) höheres antioxidatives Potential. Aber auch im Vergleich mit alten Hausmitteln wie Kirschsafte oder Zitronensafte schneidet der Cystus-Sud hervorragend ab. Zum Vergleich wurde für eine Ascorbinsäure-Lösung (880 mg/l = 5 mmol/l) ein antioxidatives Potential von 5,6 mmol Trolox/l bestimmt.

Die Ergebnisse focussieren und erhellen das noch knappe Wissen über die seit über 2 Jahrtausenden bekannte Wirkung dieser imponierenden Pflanze – dem Cystus-Teekraut.

Wir danken der Firma *Dr. Pandalis Naturprodukte*, die uns die Cystus-Produkte zur Untersuchung zur Verfügung gestellt hat.

#### **Literatur:**

1. Römps Chemie Lexikon, 9. Auflage, Thieme Verlag
2. Umweltmedizin für Heilpraktiker, Martin, Aescura Verlag, 1996
3. Krankheitsprävention durch Ernährung, Ramke, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH Stuttgart, 1998
4. Ernährung des Menschen, Elmadfa/ Leitzmann, UTB für Wissenschaft Verlag Ulmer, 1998
5. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln, Watzl/Leitzmann, Hippokrates 1995
6. Liebert et al.: Antioxidant properties and total phenolics content of green und black tea under different brewing conditions, Z. Lebensm. Unters. Forsch. A 208: 217-220 (1999)
7. Miller et. al.: Evaluation of the Total Antioxidant Activity as a Marker of the Deterioration of Apple Juice on Storage, J. Agric. Food Chem. 43: 1794-1801 (1995)

8. Miller et.al.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science* 84: 407-412 (1993)
9. Böhm et. al.: Gesund durch pflanzliche Phenole – Antioxidative Aktivität von Frucht- und Gemüsekonzentraten, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 139/22: 53-55, (3.6.1999)
10. Petereit: Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze *Cistus incanus* L. (Cistaceae), Inaugural Dissertation der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (1992)



## Flavonoide im menschlichen Urin nach Genuss von Holundersaft

M Netzel<sup>1</sup>, M Herbst<sup>1</sup>, G Strass<sup>1</sup>, V Böhm<sup>2</sup>, I Bitsch<sup>1</sup>, R Bitsch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Giessen

<sup>2</sup>Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena

### *Flavonoids in human urine after ingestion of elderberry juice*

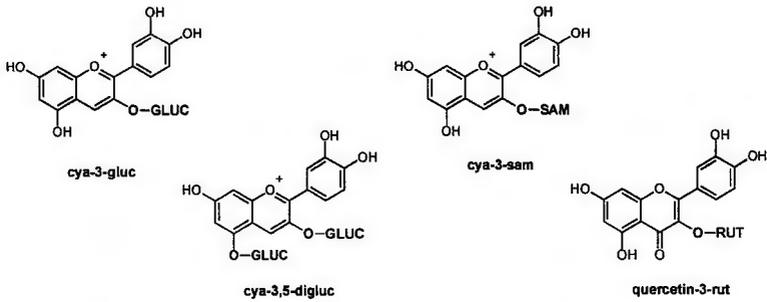
*The present study was designed to determine the potential bioavailability in humans of cyanidine-3,5-diglucoside, cyanidine-3-sambubioside, cyanidine-3-glucoside and quercetine-3-rutinoside, being the most important flavonoids in elderberries. Urinary samples of 3 healthy volunteers were collected before (baseline) and over a period of 7 hours with intervals of 60 minutes after ingestion of 400 ml elderberry juice. With HPLC analysis it was possible to quantify the main flavonoids of elderberries in the urine samples. Our results demonstrate for the first time that humans can absorb and excrete remarkable amounts of elderberry flavonoids as unmodified glycosides, being possible of relevance for biological effects.*

*Dr. Michael Netzel*

*Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Wilhelmstrasse 20, 35392 Giessen*

### **Problemstellung**

Nachdem eine beachtlich hohe Anzahl epidemiologischer Studien auf eine Assoziation zwischen einer obst- und gemüserreichen Ernährung und einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und bestimmte Krebsformen beim Menschen hingewiesen hat, wird vor allem den antioxidativen Inhaltsstoffen pflanzlicher Lebensmittel die entscheidende protektive Wirksamkeit zugesprochen [1,2,3]. Insbesondere gilt dies für die grosse Gruppe der Polyphenole, die freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies inaktivieren und dadurch wichtige Biomoleküle des Organismus vor oxidativem Stress schützen können [4]. Die Holunderbeere und daraus hergestellte Säfte zeichnen sich insbesondere durch einen hohen Polyphenol- bzw. Flavonoidgehalt (Abb. 1) aus [5]. In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, inwieweit diese bioaktiven Inhaltsstoffe für den Menschen verfügbar sind.



**Abb. 1:** chemische Strukturen wichtiger Flavonoide der Holunderbeere

### Methode

Nüchtern und nach der Zufuhr von 400 ml Holundersaft (Tab. 1), wurde der Urin von 3 gesunden, männlichen Versuchspersonen (Nichtraucher;  $26 \pm 3$  Jahre; BMI  $21,9 \pm 3,6$  kg/m<sup>2</sup>) über einen Zeitraum von 7 Stunden (in 60-minütigen Intervallen) gesammelt und mittels HPLC (Tab. 2) untersucht. Während der gesamten Versuchsperiode war ausschliesslich der Konsum von Mineralwasser erlaubt.

**Tab. 1:** Qualitätsparameter des verwendeten Holundersaftes

<b>Gesamtphenole*</b>	7,4 g/l
<b>Anthocyane<sup>Σ</sup></b>	1,7 g/l
<b>Quercetin-3-Rutinosid</b>	0,53 g/l
<b>Chlorogensäure</b>	0,25 g/l
<b>TEAC-Wert<sup>#</sup></b> (antioxidative Kapazität)	49 mmol/l

\*Methode nach Folin-Ciocalteu (EWG-VO 2676, 1990) mit Gallussäure als Referenzsubstanz; Anthocyane<sup>Σ</sup>: Cyanidin-3,5-Diglucosid+Cyanidin-3-Sambubiosid+Cyanidin-3-Glucosid; <sup>#</sup>TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

### Probenvorbereitung

Der Urin wurde mit Ameisensäure versetzt (1:0,28), im Rotationsverdampfer (10 Minuten) unter Vakuum bei 50°C konzentriert, mit HPLC-Fliessmittel verdünnt (1:1) und 10 Minuten bei 14000 U/Minute zentrifugiert.

**Tab. 2:** HPLC-Parameter

<b>Vorsäule:</b>	LiChrospher® 100 RP-18; 4x4 mm; 5 µm
<b>Trennsäule:</b>	LiChrospher® 100 RP-18; 250x4 mm; 5 µm
<b>mobile Phase:</b>	H <sub>2</sub> O : Ameisensäure : Acetonitril (v/v/v); 1,0 ml/Min.; isokratisch 81 : 10 : 9 (Anthocyane) 74 : 10 : 16 (Quercetin-3-Rutinosid)
<b>Detektion (UV/VIS):</b>	520 nm (Anthocyane) 363 nm (Quercetin-3-Rutinosid)
<b>Injektionsvolumen:</b>	100 µl

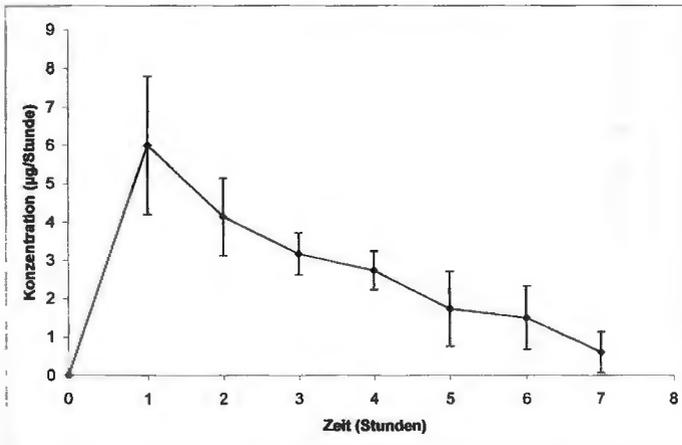
### Ergebnisse

Wie in der nachfolgenden Tabelle 3 dargestellt ist, konnten 4 Hauptflavonoide der Holunderbeere (Cyanidin-3,5-Diglucosid, Cyanidin-3-Sambubiosid, Cyanidin-3-Glucosid und Quercetin-3-Rutinosid) in unterschiedlichen Konzentrationen im Urin der VP quantifiziert werden. Die Abbildungen 2-5 zeigen die Konzentrations-Zeit-Profile der einzelnen Flavonoide im Urin der VP.

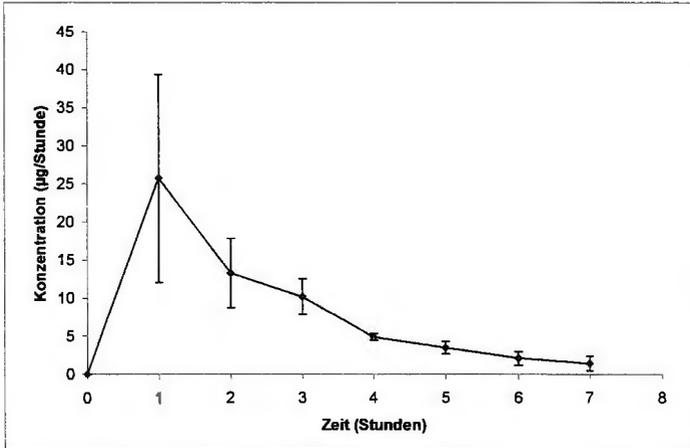
**Tab. 3:** Flavonoid-Exkretionsparameter (Urin) der 3 VP nach Zufuhr von 400 ml Holundersaft

Flavonoid	$t_{\max}$ (Min.)	$c_{\max}$ $\mu\text{g}/\text{Stunde}$	kumulative Exkretion <sup>1</sup> ( $\mu\text{g}$ )	relative Exkretion <sup>2</sup> (%)
Cya-3,5-Digluc	60	$6,0 \pm 1,8$	$19,7 \pm 4,0$	0,040
Cya-3-Sam	60	$25,7 \pm 13,5$	$61,9 \pm 13,6$	0,017
Cya-3-Gluc	60	$23,9 \pm 6,7$	$53,5 \pm 8,7$	0,017
Quercetin-3-Rut	120	$3,3 \pm 1,4$	$8,2 \pm 3,9$	0,0038

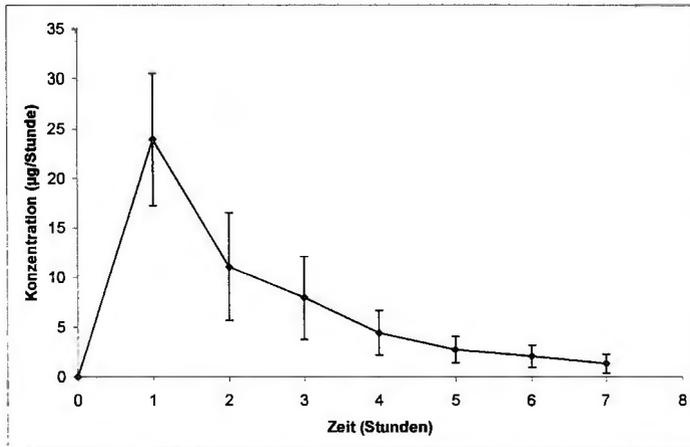
<sup>1</sup>über 7 Stunden; <sup>2</sup>im Vergleich zur zugeführten Menge (212 mg Quercetin-3-Rut, 48 mg Cya-3,5-Digluc, 353 mg Cya-3-Sam, 314 mg Cya-3-Gluc)



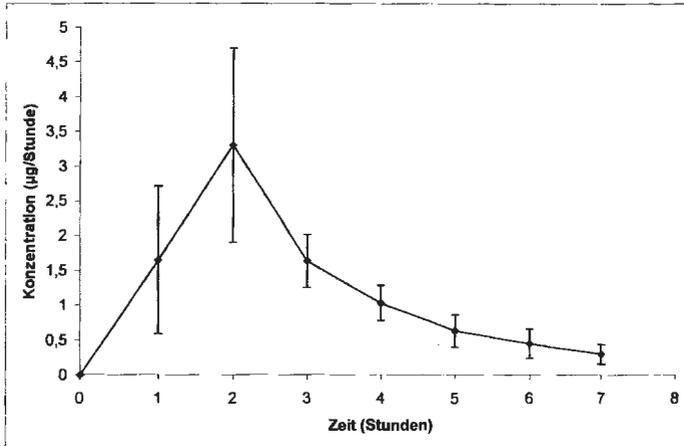
**Abb. 2:** Konzentrations-Zeit-Profil ( $x \pm s$ ) von Cya-3,5-Digluc im Urin der VP nach Holundersaft



**Abb. 3:** Konzentrations-Zeit-Profil ( $x \pm s$ ) von Cya-3-Sam im Urin der VP nach Holundersaft



**Abb. 4:** Konzentrations-Zeit-Profil ( $x \pm s$ ) von Cya-3-Gluc im Urin der VP nach Holundersaft



**Abb. 5:** Konzentrations-Zeit-Profil ( $x \pm s$ ) von Quercetin-3-Rut im Urin der VP nach Holundersaft

### Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass die quantitativ wichtigsten Flavonoide der Holunderbeere bei oraler Zufuhr (Saft) intakt resorbiert und intakt über den Urin ausgeschieden werden. Die geringe renale Exkretionsrate dieser bioaktiven Substanzen im Vergleich zur zugeführten Menge spricht für einen hohen Umsatz im Organismus (Metabolismus bzw. Radikalabfangreaktionen) und/oder für eine geringe Resorptionsrate. Zur eindeutigen Klärung müssen weitere Untersuchungen (insbesondere pharmakokinetische Auswertungen der Plasmakonzentrationen) durchgeführt werden. Ein weiterer, ganz entscheidender Aspekt ist die Überprüfung, inwieweit eine antioxidative in-vivo-Wirkung beim Menschen nach Saftgenuss messbar ist.

### Literatur

1. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB [1995]: Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155 (27): 381-386
2. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D [1993]: Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011
3. Hollman PCH, Hertog MGL [1997]: Epidemiological evidence on potential health effects of flavonoids. Polyphenols in food COST 961, 1<sup>st</sup> workshop, Aberdeen/Scotland: 137
4. Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J [1993]: Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology* 47 (4): 85-89

5. Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A [1998]: Flavonole, Flavone und anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. Z Ernährungswiss 37: 147-163

**Förderhinweis**

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie / AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) gefördert. Projekt-Nr.: AiF-FV 11160 B I



## Altersabhängige Variation der Catechinprofile in unfermentierten Teeblättern (*Camellia sinensis* L.)

*Walter Feldheim, Hartwig Schulz, Suchon Nimmannit, Elisabeth Wisker*

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrechts-Universität, Kiel  
Institut für Qualitätsanalyse, Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Quedlinburg  
B.B. Development Co. Ltd, Maekorn, Chiangrai, Thailand

***Effect of age on the content of the main catechins in fresh tea (*Camellia sinensis* L.) leaves***  
*Green tea catechins (EGCG, ECG, EGC, EC) differed in their antioxidant and antimutagenic properties. As the age of the tea leaf is one of the factors affecting the content and pattern of the catechins, EGCG, ECG, EGC, and EC were determined in freshly harvested leaves of different age, but plucked at the same time from the same tea bushes in Northern Thailand. Analyses were performed by RP-HPLC and NIRS. Whilst EGCG and ECG were the dominant catechins in two and the bud and the 3rd leaf, their concentrations decreased (most sharply for EGCG) in older leaves. EGC and EC being minor components in the youngest leaves showed an increase in the older ones. From the 4th leaf, EC was the predominant catechin.*

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, CAU Kiel, Düsternbrooker Weg 17, D-24105 Kiel

Institut für Qualitätsanalyse, Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Neuer Weg 22/23, D-06484 Quedlinburg

### ***Einleitung***

Tee, insbesondere grüner Tee, gehört zu den Lebensmitteln, von denen vermutet wird, daß sie zum Schutz vor degenerativen Erkrankungen wie Arteriosklerose und Krebs beitragen können (Serafini et al. 1996, Ahmad & Mukhtar 1999). Von den Bestandteilen des Teeblattes nehmen die Catechine eine herausragende Stellung ein. Sie besitzen antioxidative (Serafini et al. 1996 Pearson et al. 1998) und zumindest in vitro und in Tierversuchen antimutagene und anticarcinogene Eigenschaften (Ahmad & Mukhtar 1999, Linet al. 1996). Da sich die einzelnen Catechine in Stärke und Art ihrer Wirkungen unterscheiden, sind Kenntnisse über ihre Gehalte im Teegetränk bzw. -extrakt von Interesse. Die Catechinprofile im grünen Tee entsprechen denen der frischen Blätter (Ahmad & Mukhtar 1999). Faktoren, die die Catechingehalte der Blätter beeinflussen, haben demzufolge einen Einfluß auf die Gehalte im Getränk. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß des Alters der Blätter auf die Gehalte der wichtigsten Catechine in unfermentierten Teeblättern gleicher Herkunft und Erntezeit zu bestimmen.

### Material und Methoden

In einem Teegarten im Norden Thailands wurden in einem Zeitraum von 3 Tagen im Frühjahr Blätter unterschiedlichen Alters („Two and the bud“, 3., 4., 5., 6. Blatt und Vorjahresblätter) von den gleichen Sträuchern gepflückt. Die Blätter wurden innerhalb von 2 Stunden nach der Ernte in einem Mikrowellenherd erhitzt (100 W, 40-60 s), um den Wassergehalt herabzusetzen (DM 94%) und unkontrollierte Phenoloxidase-Reaktionen zu verhindern. Catechine (Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Epicatechin-3-gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epicatechin (EC)) und Coffein wurden mittels RP-HPLC and NIRS analysiert wie kürzlich beschrieben (Schulz et al. 1999).

### Ergebnisse

Gesamtcatechin- und Coffeingehalte nahmen mit zunehmendem Alter der Blätter kontinuierlich ab (Abb. 1).

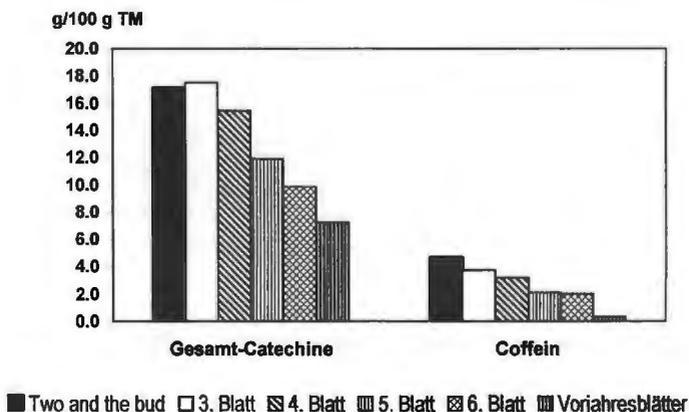


Abbildung 1: Gesamtcatechin- und Coffeingehalte in grünen Teeblättern unterschiedlichen Alters

Abb. 2 zeigt den Einfluß des Blattalters auf die einzelnen Catechine. Den größten Einfluß hatte das Alter der Blätter auf die EGCG-Gehalte. Sie betragen im 3. Blatt nur noch 64% , im 5. Blatt 24% der Gehalte in „Two and the bud“. Die ECG-Gehalte waren ebenfalls niedriger in den älteren als in den jüngeren Blättern, allerdings war dies erst ab dem 5. Blatt deutlich ausgeprägt. Die EC-Gehalte stiegen demgegenüber ab dem 3. Blatt an; die EGC-Gehalte waren in allen Blättern ähnlich.

Infolge der Veränderungen der Gehalte der einzelnen Verbindungen und der Abnahme des Gesamtcatechingehalts mit dem Alter der Blätter kam es auch zu Veränderungen in den Relationen der einzelnen Catechine (Abb. 3). Während bei „Two and the bud“ EGCG mit 42 % das vorherrschende Catechin war, betrug sein Anteil im 3. Blatt nur noch 26 %. Umgekehrt stieg der Anteil von EC von 13 % in „Two and the bud“ auf 26 % im 3. Blatt und 44 % im 5. Blatt an.

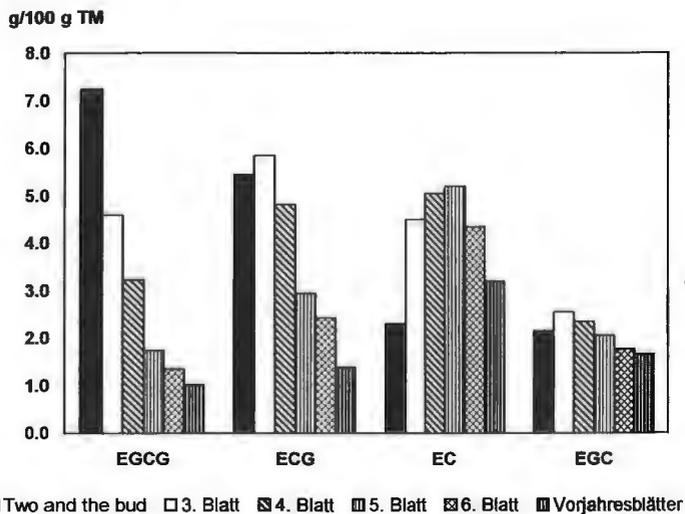


Abbildung 2: Gehalte an EGCG, ECG, EC und EGC in grünen Teeblättern unterschiedlichen Alters

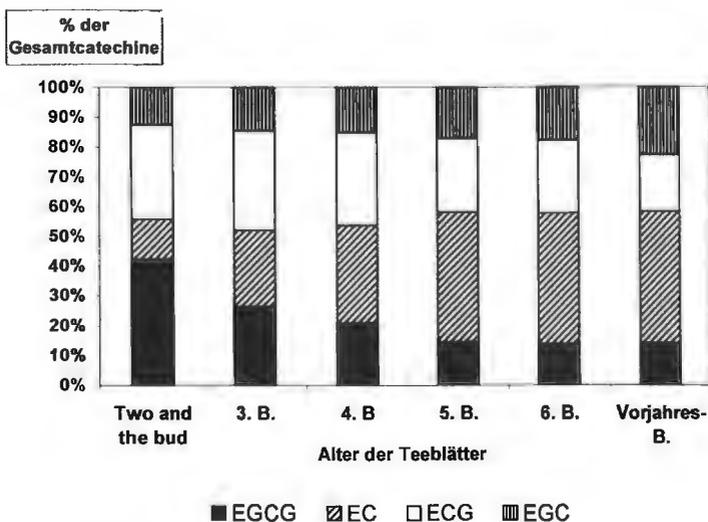


Abbildung 3: Anteil der einzelnen Catechine am Gesamtcatechingehalt bei grünen Teeblättern unterschiedlichen Alters

### **Diskussion**

Die Catechingehalte in Teeblättern hängen u.a. von der Teesorte, der Jahreszeit, dem Klima und den Kulturbedingungen ab (Feldheim 1994). Unsere Arbeit zeigt, daß bei gleichen sonstigen Bedingungen die Gesamtgehalte und das Muster der Catechine auch vom Alter der Blätter, d.h. von ihrer Position am Teebusch beeinflusst werden. Andere Autoren (Lin et al. 1996) fanden ebenfalls niedrigere Gehalte an Gesamtcatechinen in älteren (5-10. Blatt) als in jüngeren Blättern („Two and the bud“); allerdings war der Einfluß des Blattalters auf das Profil der Catechine in der Arbeit von Lin et al. (1996) wesentlich geringer als in unserer Arbeit.

Zwischen den einzelnen Catechinen bestehen in vivo möglicherweise ebenso wie in vitro Unterschiede in der Wirkung. In Untersuchungen zur anticarcinogenen Wirkung von Catechinen erwies sich EGCG als besonders wirksam (Ahmad & Mukhtar 1999, Lin et al. 1996). EGCG kommt in den jüngsten (und teuersten) Blättern in der höchsten Konzentration vor und stellt auch den größten Anteil der Catechine. In Tees bzw. Teepulvern, die aus (billigeren) älteren Blättern hergestellt sind, können demgegenüber andere Verbindungen, z.B. EC, überwiegen, überwiegen, was möglicherweise Auswirkungen auf die physiologischen Wirkungen haben kann.

### **Literatur**

*Ahmad N, Mukhtar H* (1999) Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* 57: 78-83

*Feldheim W* (1994) Tee und Tee-Erzeugnisse. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

*Lin YL, Juan IM, Chen YL., Liang YC, Lin JK* (1996) Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *J. Agr. Food Chem.* 44:1387-1394

*Pearson DA, Frankel EN, Aeschbach R, German JB* (1998) Inhibition of endothelial cell mediated low-density lipoprotein oxidation by green tea extracts. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1445-1449

*Schulz H, Engelhardt UH, Wegent A, Drews H-H, Lapczynski S* (1999) Application of near-infrared reflectance spectroscopy to the simultaneous prediction of alkaloids and phenolic substances in green tea leaves. *J. Agr. Food Chem.* 47: 5064-5067

*Serafini M, Ghiselli A., Ferro-Luzzi A* (1996) In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50: 28-32



## Phenolische Verbindungen in Apfelsaft, Apfelwein und Apfelszig

C. Müller und D. Treutter

Fachgebiet für Obstbau, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt, Technische Universität München

### *Phenolic compounds in apple-juice, -wine and -vinegar*

*Juices, wines and vinegars made from apples were analysed for their phenolic constituents by reversed-phase HPLC. The use of a chemical reaction detection method allowed the analysis of procyanidins without further purification procedures. The phenolic content of the products is determined by the varieties used and by the processing methods. If the amount of the bioactive hydroxycinnamic acids and flavonoids is regarded as a quality marker, the juice- and wine-making processes have to be optimized with respect to extraction and prevention of degradation of the secondary products.*

*Institute of Fruit Science, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Alte Akademie  
16, D-85350 Freising, Germany*

Phenolische Verbindungen werden allgemein als wertvolle, bioaktive Nahrungskomponenten betrachtet (Rechkemmer und Pool-Zobel 1996, Treutter 1996). Äpfel, Apfelsäfte und Apfelweine liefern ein relativ breites Spektrum dieser antioxidativen Substanzen (Rechner et al. 1999). Allerdings besteht eine große quantitative Variabilität zwischen den als Rohware verwendeten Sorten, zwischen Herkünften und den Verarbeitungsverfahren (Mayr und Treutter 1996, Guyot et al. 1997). Die hier beschriebene Studie stellt die Anwendung einer einfachen HPLC-Methode kombiniert mit Nachsäulenderivatisierung für die Bestimmung von Phenylpropanoiden in Apfelsäften und daraus hergestellten Produkten dar.

Dazu wurden die flüssigen Proben zentrifugiert und ohne weitere Vorbereitung bzw. Reinigungsschritte zu je 20 µl zur HPLC-Analyse injiziert. Hydroxyzimtsäuren und Dihydrochalkone wurden bei 280 nm detektiert, Anthocyanidine bei 520 nm und Catechine und Proanthocyanidine nach on-line-Derivatisierung mit p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) bei 640 nm (Treutter 1989). DMAZA reagiert selektiv mit den Molekülen der Flavanol-Gruppe und verbessert deren Detektion wesentlich.

Folgende Verbindungen wurden quantifiziert: HMF (Hydroxymethylfurfural; (1), p-Cumaroyl-Chinasäure (2), Kaffeesäure (3), Chlorogensäure (4), p-Cumaroyl-Glycosid (5), p-Cumarsäure (6), Ferulasäure (7); Phloretin-Glycosid (8), Phloretin-xyloglucosid (9), Phloridzin (10), Phloretin (11), Procyanidin \* (12), Procyanidin B1 (13), Catechin (14),

Procyanidin\* (15, 16, 17), Procyanidin B2 (18), Procyanidin\* (19, 20), Epicatechin (21), Procyanidin C1 (22), Procyanidin\* (23), Procyanidin B5. Die Nummerierung entspricht der in Abb.1 und Abb. 2 angegebenen Bezeichnung; mit \* sind diejenigen Procyanidine gekennzeichnet die nicht näher charakterisiert werden konnten.

Abb. 1.: Detektion von Hydroxyzimtsäuren und Dihydrochalkonen aus Apfelsaft nach rp-HPLC-Trennung bei 280 nm

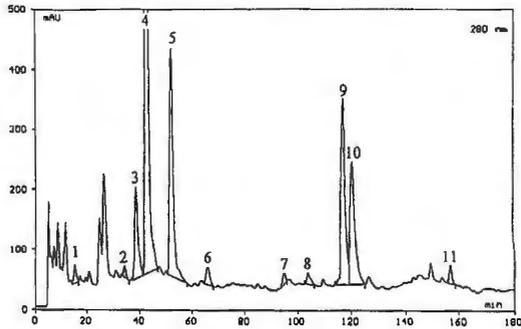
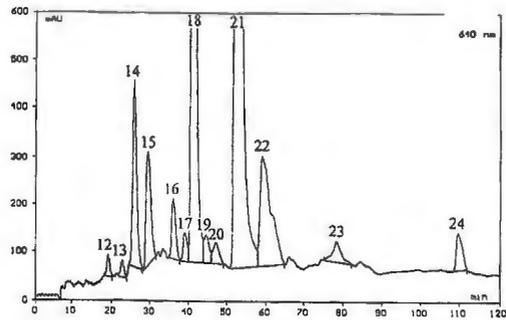


Abb. 2: Detektion von Flavanolen per Nachsäulenderivatisierung bei 640 nm



Der Gehalt in Apfelsäften wird in hohem Maß von der verwendeten Rohware bestimmt (Guyot et al., 1998) sowie vom Produktionsprozeß beeinflusst. Abb. 3 zeigt die Variabilität der Phenylpropanoidgehalte mehrerer handelsüblicher Apfelsäfte. Die Gesamtphenolgehalte reichen in den untersuchten Proben von 20 mg/l bis 370 mg/l.

Die untersuchten Direktsäfte weisen z. T. wesentlich höhere Gehalte auf als diejenigen, die aus Konzentraten hergestellt wurden. Der Gehalt des Furfurals Hydroxymethylfurfural (HMF) kann als Maß für die Hitzebehandlung von Apfelsäften angesehen werden oder auch Hinweise geben auf hohe Lagertemperaturen (Feldmann, 1995). Die eigenen Befunde (Tab.

1) lassen darauf schließen, dass der Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen mit der HMF-Konzentration negativ korreliert.

Im Zuge der weiteren Verarbeitung des Apfelsafts über Apfelwein zu Apfelessig nimmt der Gehalt an Flavanolen kontinuierlich ab (Tab. 2). Bei den Hydroxyzimtsäurederivaten ist nach dem fortschreitenden Verarbeitungsprozess eine Abnahme der Säuredimere bei gleichzeitigem Anstieg der freien Säuren Kaffeesäure, Ferulasäure und Protocatechusäure sowie eine Deglycosidierung von Phloridzin zum Phloretin zu beobachten. An diesen hydrolytischen Spaltungen sind vermutlich apefelegene und/oder von den verwendeten Mikroorganismen (Hefen und Essigbakterien) gebildete Enzyme beteiligt. Der dabei entstehende Verlust der Glykoside wird allerdings durch die freigesetzten Aglykone nicht ausgeglichen, so dass von einer weitergehenden Metabolisierung auszugehen ist. Durch Vergärung der Äpfel auf der Maische kann die Extraktion der in den Schalen enthaltenen Flavanole deutlich verbessert werden. Die dabei festzustellende Umlagerung der Hydroxyzimtsäure-Ester zu freien Säuren lässt auf eine relativ hohe hydrolytische Aktivität der Maische schließen. Damit zusammenhängen dürfte auch der weitgehende Abbau des Anthocyans, das im Fruchtfleisch und im Direktsaft der für dieses Experiment verwendeten Apfelsorte 'Weirouge' in relativ hoher Konzentration vorkommt.

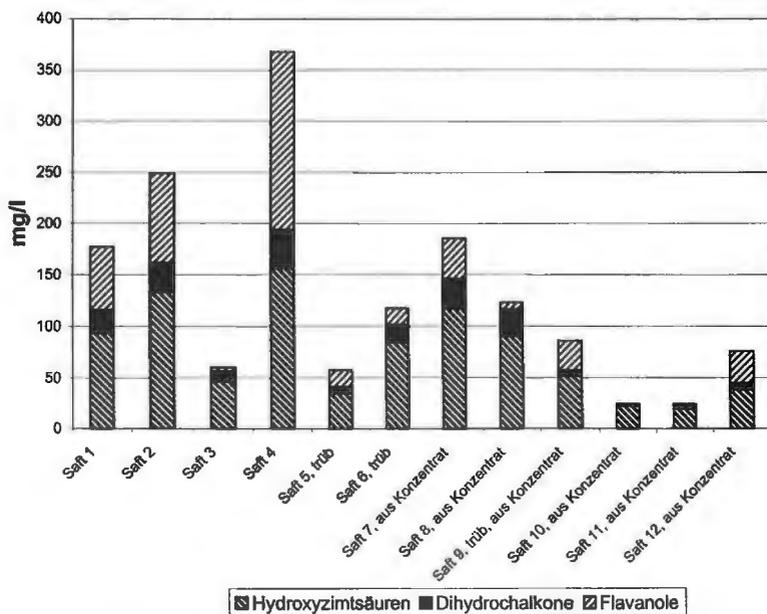


Abb. 3: Gehalte phenolischer Verbindungen in handelsüblichen Apfelsäften

**Tab. 1:** Gehalte von Hydroxymethylfurfural (HMF, mg/l) in handelsüblichen Apfelsäften

Saft Nr.	HMF	Saft Nr.	HMF	Saft Nr.	HMF
1	0,39	5	2,53	9	9,24
2	0,49	6	7,03	10	22,29
3	6,38	7	1,96	11	2,37
4	1,00	8	7,48	12	1,18

**Tab. 2:** Gehalte phenolscher Verbindungen in Apfelsaft der Sorte 'Weirouge' und daraus hergestellten Weinen und Essig

	<i>Saft, frisch gepresst</i>	<i>Saft, erhitzt</i>	<i>Wein</i>	<i>Wein, auf der Maische vergoren</i>	<i>Essig</i>
<b>Flavanole</b>					
Catechin	-	-	-	0.20	-
Procyanidin*	-	-	-	0.61	-
Procyanidin*	-	-	-	0.42	-
Procyanidin*	-	-	-	-	-
Procyanidin B2	1.91	2.04	0.61	3.25	-
Procyanidin*	-	-	-	-	-
Procyanidin*	-	-	-	-	-
Epicatechin	0.93	0.41	0.50	1.98	-
Procyanidin C1	-	-	-	0.99	-
Procyanidin*	-	-	-	-	-
Procyanidin B5	-	-	-	0.04	-
<i>Flavanole, total</i>	<i>2.8</i>	<i>2.45</i>	<i>1.11</i>	<i>7.48</i>	-
<b>Phenolische Säuren</b>					
Protocatechusäure	-	-	5.34	2.46	5.12
Kaffeesäure	3.42	7.05	6.44	8.01	19.67
Chlorogensäure	38.02	30.74	43.69	29.26	3.01
p-Cumaroyl-Chinasäure	2.21	2.35	0.46	0.37	0.16
p-Cumaroylglucose	7.29	6.53	5.93	5.31	5.94
p-Cumarsäure	0.06	0.12	0.37	0.99	3.09
Ferulasäure	-	-	0.10	0.30	0.34
<i>phenolische Säuren, total</i>	<i>51.01</i>	<i>46.79</i>	<i>57.00</i>	<i>44.24</i>	<i>32.21</i>
<b>Anthocyanidin</b>					
Idaein	3.67	0.94	0.76	0.03	-
<b>Dihydrochalkone</b>					
Phloretin-2-xylosylglucoside	10.48	10.27	9.17	8.27	10.54
Phloridzin	7.21	7.08	11.54	14.46	7.45
Phloretin	-	-	-	0.35	0.05
<i>Dihydrochalkone, total</i>	<i>17.69</i>	<i>17.35</i>	<i>20.71</i>	<i>23.08</i>	<i>18.03</i>
<i>Gesamtgehalt</i>	<i>75.22</i>	<i>67.53</i>	<i>84.91</i>	<i>77.29</i>	<i>55.36</i>

\* genauere Struktur nicht bekannt

## Literatur:

- Feldmann, G. (1995). Veränderungen an Saftinhaltsstoffen bei Herstellung, Umarbeitung, Lagerung und Transport von Fruchtsaftkonzentraten. 62, 543-547 und 605-608.
- Guyot, S.; Doco, T.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Drilleau, J. F. (1997). Characterization of highly polymerised procyanidins in ciderapple (*Malus domestica* var. *Kermerrien*) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44, 351-357.
- Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P.; Drilleau J. F. (1998). Reversed-Phase HPLC following Thiolyse for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* Var. *Kermerrien*). *Agricultural Food Chemistry*, 46, 1698.
- Mayr, U.; Treutter, D. (1996). Vorkommen und Gehalte von Flavanolen in Apfelfrüchten und -säften. In: Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, XXXI. Vortragsstagung, Kiel, 113-118.
- Reckemmer, G.; Pool-Zobel, B.L. (1996). Gesundheitliche Bewertung von Anthocyanen/Anthocyanidinen. In: Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, XXXI. Vortragsstagung, Kiel, 219-232
- Rechner, A.; Dietrich, H.; Patz, C.D.; Netzel, M.; Böhm, V.; Bitsch, R.; Bitsch, I.; Antioxidative Wirkung von naturtrüben apfelsäften: Einfluss der Apfelsorte und des Polyphenolgehaltes. *Flüssiges Obst*, 5, 227-230.
- Treutter, D. (1989). Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *Journal of Chromatography A*, 467, 185-193
- Treutter, D. (1996) Flavane in pflanzlichen Lebensmitteln. In: Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, XXXI. Vortragsstagung, Kiel, 81-90.





## Fruchtfleischverbräunungen bei Birnen durch Lagerstress und mögliche Abwehr durch funktionelle Inhaltsstoffe

*Haibo Xuan, und Josef Streif*

Institut für Obst-, Gemüse-, und Weinbau, Bavendorf, Universität Hohenheim  
D-88213 Ravensburg, streif@uni-hohenheim.de

### ***Brown heart of pears under storage stress and possible defense mechanism by functional constituents***

#### **Abstract:**

*Brown heart is a physiological disorder of pear fruit stored under high CO<sub>2</sub> and low O<sub>2</sub>-CA conditions. Affected pears are not suitable for consumption, even with minor symptoms. In this paper, the physiological reasons for the development of the disorder are tried to explain hypothetically.*

*Peroxidation of membrane lipids is a natural consequence of metabolic processes in the cell. For each source of lipid peroxidation within the cell there is a defense mechanism. It can scavenge the free radicals and repair the impairment of lipid peroxidation. Upon long term exposure to high CO<sub>2</sub> and low O<sub>2</sub>-CA conditions, however, the level of prooxidants can exceed the defense capacity of the cell, leading to membrane damage. In the following cell death, and brown heart can happen. In our investigation, different components of the enzymatic and non-enzymatic defense mechanism in pear tissue were analysed, which support this hypothesis.*

#### **Einleitung**

Fruchtfleischverbräunung (brown heart) ist eine physiologische Krankheit bei Birnenfrüchten unter CA Lagerbedingungen. Sie beginnt vor allem in der Umgebung des Kernhauses als hell- bis dunkelbraune, diffuse Verbräunung und kann sich über den ganzen Cortextbereich ausbreiten, mit Ausnahme eines etwa ein cm dicken Bereichs unter der Schale. Aus dem befallenen Fruchtgewebe können sich später durch Eintrocknen von Zellpartien mehr oder weniger große Kavernen entwickeln. Die Erkrankung ist von außen an den Früchten nicht erkennbar und auch mit kleinen Symptomen sind die Birnen für den Verkauf nicht mehr geeignet. Die Ursache dieser physiologischen Störung ist noch nicht klar, obwohl es schon einige korrelative Erkenntnisse zur Entwicklung der Fruchtfleischbräunung gibt. In diesem Artikel wird versucht, die Beziehung zwischen dem Auftreten der Erkrankung unter speziellen CA Lagerbedingungen und den möglichen zellulären Abwehrmechanismen durch funktionelle Inhaltsstoffe zu erklären.

## Mögliche Entstehung von Fleischverbräunungen bei Birnen im CA-Lager

CA-Lagerung zur Qualitätserhaltung bei Birnen, speziell bei der Sorte Conference, hat europaweit eine große Bedeutung. Unter bestimmten Bedingungen im CA-Lager kann es aber zu Fruchtfleischverbräunungen kommen, was bereits Kidd und West (1935) als Folge von überhöhten  $\text{CO}_2$  Konzentrationen beschrieben hatten. Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber  $\text{CO}_2$  in Abhängigkeit von der Sorte und dem Erntetermin (Pierson et al., 1971, Veltman and Van Schaik, 1997) sind bekannt. Daneben spielen auch die andern Lagerfaktoren: tiefe Temperatur, hohe Luftfeuchte und geringe Sauerstoffkonzentration eine entscheidende Rolle (Kader, 1999, Peppelenbos, 1999).

Die schädliche Wirkung erhöhter  $\text{CO}_2$  Konzentrationen wird besonders auf eine Störung des Tricarbonsäure-Zyklus zurückgeführt, wodurch es zur Anreicherung von zellschädigenden Zwischenprodukten kommt (Wang, 1990). Eine weitere mögliche Art der Schädigung ist die strukturelle Veränderung von Zellmembranen durch Lipidperoxidation, was zu Störungen, Seneszenz und Absterben von Zellen führt (Shewfelt und Purvis, 1995). Entsprechend der Theorie über die Beziehung von freien Radikalen und Antioxidantien (Noctor und Foyer, 1998, Alscher et al., 1997) ist es denkbar, daß sich Birnen bei höherer  $\text{CO}_2$ - und niedriger  $\text{O}_2$ -Konzentration im CA-Lager ständig unter Lagerstress befinden, wobei ein Überschuß von freien Radikalen die Membranen angreifen. Das zelleigene antioxidative Abwehrsystem ist nach einiger Zeit geschwächt oder erschöpft. Es kommt zu Membranschädigungen, Absterben von Zellen und nachfolgend zu Verbräunungsreaktionen von phenolischen Inhaltsstoffen.

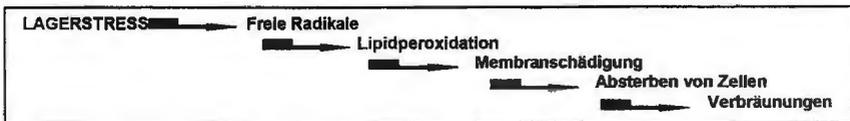


Abb. 1: Möglicher Ablauf bei der Entstehung von Fleischverbräunungen bei Birnen

### Membranschädigung durch freie Radikale

Die Lipid Peroxidation von Membranen ist generell ein Zeichen für Reifung und Alterung von Pflanzengewebe (Thompson et al., 1991) und eine natürlichen Konsequenz metabolischer Prozesse in der Zelle. Membranschädigungen durch freie Radikale können diesen Verlauf beschleunigen (Abb. 2, oberer Teil). Aktive Sauerstoff-Spezies z. B. Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sind Nebenprodukte des Elektronentransports in den Chloroplasten, Mitochondrien und Plasmamembranen (Noctor und Foyer, 1998). Durch Interaktion von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Eisenionen in den Membranen kann es zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen ( $\text{HO}\cdot$ ) kommen, die die Entstehung von freien Lipid-Radikalen ( $-\text{ROO}\cdot$ ) verursachen. Lipid-Hydroperoxide (LOOH) entstehen im Pflanzengewebe durch die Lipoxygenase (LOX) (Siedow, 1991). LOX greift bevorzugt freie Fettsäuren an (Hildebrand, 1989), wobei unter aerobischen Bedingungen keine freien Lipid-Radikale (Gardner, 1991) entstehen. Normalerweise arbeitet LOX gemeinsam mit hydrolytischen Enzymen (Lipasen)(Leshem, 1992). Endprodukte der Lipid-Peroxidation sind u. a. Ethan, Malondialdehyd und thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS). Thiobarbitursäure ist ein empfindlicher Indikator für die Lipid-Peroxidation (Droillard et al, 1993). Die Folgen von Lipid-Peroxidation sind Membranschädigungen, wodurch es zur Aufhebung der Zellkompartimentierung und zum Ausfließen von Substanzen aus dem Zellinnern kommt.

Die Zunahme der Leitfähigkeit von Lösungen mit inkubiertem Zellgewebe, kann als Zeichen für eine fortschreitende Lipidperoxidation gewertet werden (Dhindsa und Dhindsa 1981).

### **Das zelluläre Abwehrsystem**

Innerhalb der Zelle gibt es einen natürlichen Abwehrmechanismus für jede Art von Lipidperoxidation (Abb 2, unterer Teil). Superoxide ( $O_2^-$ ) können durch einen enzymatischen Abbau mit Hilfe der Superoxide-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und anschließend durch Catalase (CAT) zu Wasser und Sauerstoff unschädlich gemacht werden.  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin und Ascorbinsäure sind Fänger für freie Radikale, einschließlich des Hydroxylradikals ( $HO^\cdot$ ) (Büttner, 1993), während Carotenoide und Ubiquinon das Sauerstoff-Singlet ( $O_2^\cdot$ ) neutralisieren. Um die Ester-Form der Fettsäuren zu schützen, kann die LOX-Aktivität durch die Zellkompartimentierung kontrolliert werden.

Aus den durch das Hydroxylradikal( $HO^\cdot$ ) peroxidierten ungesättigten Fettsäuren entstehen Lipid-Peroxyradikale (Alkylperoxyradikal). Diese werden durch Interaktion mit  $\alpha$ -Tocopherol schnell zu Lipid-Hydroperoxid ( $-ROOH$ ) verändert (Büttner, 1993). Das dadurch entstehende  $\alpha$ -Tocopheroxyl-Radikal kann durch die Oxidation von Ascorbinsäure wieder zu  $\alpha$ -Tocopherol regeneriert werden. Andererseits kann die entstandene Dehydroascorbinsäure (DHAS) ihrerseits durch die Oxidation von Glutathion zu Ascorbinsäure wieder regeneriert werden. Wenn DHAS nicht rechtzeitig zu Ascorbinsäure reduziert wird, kommt es zum Abbau von DHAS zu 2- oder 4-Carbon Produkten, z. B. 2,3-diketo-4-Gulonsäure.

Unter normalen Bedingungen in der Zelle werden aktive Sauerstoff-Radikale produziert. Der größte Teil von ihnen wird durch den zellulären Abwehr-Mechanismus eingefangen oder gelöscht. Lipide und Proteine können zwar z.T. peroxidiert werden, aber durch den intakten Abwehrmechanismus werden sie schnell wieder repariert. Unter Streß jedoch verläuft die freie Radikal-Ketten-Reaktion schneller als der Reparaturmechanismus (Mishra et al., 1993). Die Folge ist metabolisches Ungleichgewicht, zelluläre Mißverhältnisse und endlich Gewebeschäden. Mehr Radikale werden während der Alterung von Früchten gebildet, die wieder von Abwehrsystem inaktiviert werden müssen. Die Regeneration des Radikal-Fänger-Systems ist ein energie-verbrauchender Prozeß. Die dafür notwendige Energie ist unter CA-Bedingungen möglicherweise nicht ausreichend vorhanden (Saquet et al., 2000) und es kommt zu Membranschädigung mit nachfolgender Verbräunung und Kavernenbildung. Karvenbildung ist vermutlich die Folge von Wasserverlust und Eintrocknen der vorher geschädigten und verbräunten Zellen. Die Fleischverbräunung treten vor allem in den ersten beiden Monaten der Lagerung und oft nur partiell auf. Danach ist meist ein Stillstand in der Entwicklung von Fleischbräune zu beobachten. Möglicherweise können die Schäden dadurch eingegrenzt werden, daß benachbarte Zellen ihr Abwehrsystem angepaßt und verstärkt haben.

### **Eigene Untersuchungen**

In eigenen Untersuchungen wurden verschiedene bei der Lipid-Peroxidation entstehende Substanzen sowie am enzymatischen und nicht-enzymatischen Abwehrmechanismus beteiligte Inhaltsstoffe bestimmt. Im einzelnen waren dies: Malondialdehyd (MDA), thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBARS), Lipoxigenase (LOX), Superoxid-Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbat-Peroxidase (APX), Monodehydroascorbat-Reduktase (MDHAR), Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR), Glutathion-Reduktase (GR), Ascorbinsäure (AS) und Dehydro-Ascorbinsäure (DHAS). Im Rahmen dieser Arbeit kann auf einzelne Ergebnisse nicht eingegangen werden. Generell konnten die dargestellten Zusammenhänge aber bestätigt werden.

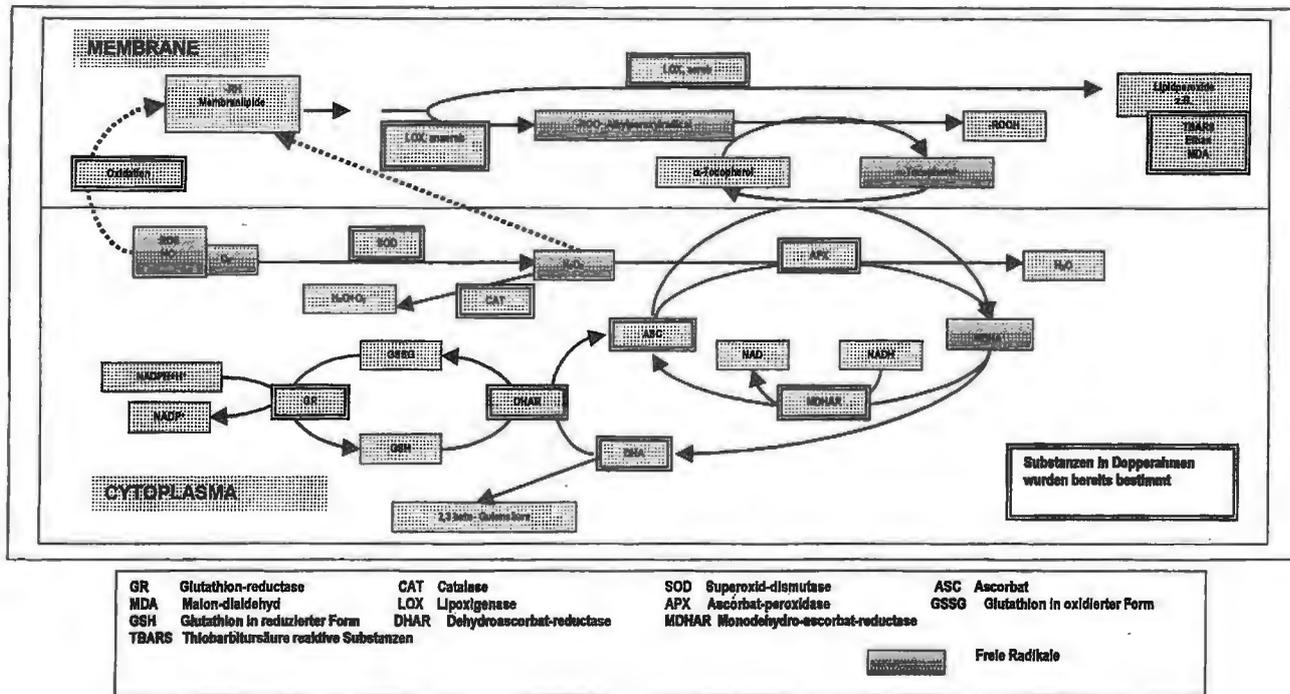


Abb. 2: Schematische Darstellung der Lipidperoxidation durch freie Radikale und mögliche Beteiligung funktioneller Inhaltsstoffe an den zellulären Abwehrmechanismen

## Literatur

1. Alscher, R. G., Donahue, J. L. and Cramer, C. L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells *Physiol. Plant.* 100:224-233.
2. Beckman, K. B. und Ames, B. N. Oxidants, antioxidants, and aging.. In: J. G. Scandalios (eds). *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pp. 201-246.
3. Büttner, G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300:535-543.
4. Dhindsa, R. J. und Dhindsa, P. P. 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Expt. Bot.* 32:93-101.
5. Droillard, M.J., Rouet-Mayer, M.A., Bureau, J.M. and Laurier, C. 1993. Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. Characterization and involvement in membrane alterations. *Plant Physiology.* 103:1211-1219.
6. Gardner, H.W. 1991. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochem. Biophys. Acta.* 1084:221-239.
7. Hildebrand, D.F. 1989. Lipoxygenases. *Physiol. Plant.* 76:249-253
8. Kader, A.A. 1999. Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Proc. Int. Symp. On Effect of Pre- and Post Harvest Factors on Storage of Fruit.* Acta Hort. 485: 203-208.
9. Kidd, F. und West, C., 1935. The gas-storage of English-grown Conference pears. *Rep. Fd Invest. Bd for 1935*, 102-110.
10. Leshem, Y.Y. 1992. *The plant membrane: A biophysical approach to structure, development and senescence*. Kluwer Press, Amsterdam. The Netherlands.
11. Mishra, P.M., Mishra, R. K. und Singhal, G. S. 1993. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* 102: 903-910.
12. Noctor, G. und Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Cell Biol.* 49: 249-279.
13. Peppelenbos, H.W. 1999. Controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology.* 16. 201-202.
14. Pierson, C., Ceponis, M. and McCulloch, P. 1971. Market diseases of apples, pears and quinces. *US Department of Agriculture Handbook*, No. 376.
15. Saquet, A.A., Streif, J. und Bangerth, F. 2000. Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in 'Conference' pears and 'Jonagold' apples during controlled atmosphere storage. *J.Hort. Sci. & Biotech.* 75:
16. Shewfelt, R. L., Purvis, A.C. 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *Hort. Science.* 30: 213-218.
17. Siedow, J.N. 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 145-188.
18. Thompson, J.E., Brown J.H., Paliyath, G., Todd, J. F. und Yao. K. 1991. Membrane phospholipid catabolism primes the production of activated oxygen in senescing tissues. In: E. J. Pell and K. L. Steffen (eds.). *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, Md. Pp. 57-66.
19. Veltman, R. and Van Schaik, A. 1997. Membrane damage in fruits perhaps the explanation of hollow core and flesh browning. *Fruittect.*, 87, 12-13.
20. Wang, C. Y. Physiological and biochemical effects of controlled atmosphere on fruit and vegetables. In: *Food Preservation by Modified Atmospheres*. Calderon, M. (eds). CRC Press. Pp. 197-223.





## Antioxidative Kapazität und Stabilität bioaktiver Inhaltsstoffe in Fruchtsäften während einer 3 wöchigen Lagerung

M Netzel<sup>1</sup>, M Herbst<sup>1</sup>, E Carle<sup>1</sup>, B Kesenheimer<sup>1</sup>, G Strass<sup>1</sup>, I Bitsch<sup>1</sup>, R Bitsch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Giessen

<sup>2</sup>Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena

### *Antioxidant capacity and stability of bioactive compounds in juices during a 3 weeks storage*

*The present study was designed to determine the effect of "normal" storage conditions (opened bottles, refrigerator, +4°C) on the antioxidant capacity and stability of bioactive compounds in elderberry-, blackcurrant- and apple juice. The antioxidant capacity was measured as TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), the bioactive compounds (anthocyanins, quercetin-3-rutinoside and chlorogenic acid) were determined by HPLC once a week over a period of 3 weeks. Between 69 and 76% of the original antioxidant capacity remained in the juices after the 3 weeks storage under the described conditions, but only a slight decrease of the bioactive compounds (2-7%) could be observed. Further investigations on storage conditions affecting the antioxidant capacity and bioactive compounds are in preparation.*

*Dr. Michael Netzel*

*Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Wilhelmstrasse 20, 35392 Giessen*

### **Problemstellung**

Nach neueren Erkenntnissen übertreffen zahlreiche Polyphenole von Obst und Gemüse die Vitamine E und C, sowie das  $\beta$ -Carotin deutlich in ihrer antioxidativen Aktivität [1]. Fruchtsäfte sind in dieser Hinsicht besonders interessante Verarbeitungsprodukte: Obwohl meistens während der Produktion ein Verlust bioaktiver Inhaltsstoffe nicht zu vermeiden ist, ist deren Verfügbarkeit aus Fruchtsäften deutlich höher als aus Fruchtfleisch. Dies hängt mit dem Vorliegen in gelöster Form und dem weitgehenden Fehlen von Matrixeffekten zusammen [2]. In der vorliegenden Arbeit sollte die Stabilität der wichtigsten Polyphenole, sowie das antioxidative Potential in ausgewählten Beerenobst- bzw. Apfelsäften während einer haushaltsüblichen Lagerung untersucht werden.

## Methodik

Bei 3 verschiedenen Fruchtsäften (Tab. 1) wurde während einer 3 wöchigen Lagerung unter haushaltsüblichen Bedingungen (nach Öffnung im Kühlschrank bei +4°C) in 7-tägigen Intervallen das antioxidative Potential (mittels TRAP-Test) und der Gehalt der wichtigsten Polyphenole (mittels HPLC) bestimmt. Die verwendeten Säfte zeichnen sich durch einen besonders hohen Polyphenolgehalt aus.

**Tab.1:** Gesamtphenolgehalte\* der untersuchten Fruchtsäfte

<b>Holundersaft</b>	5,2 g/l
<b>schwarzer Johannisbeersaft</b>	4,8 g/l
<b>naturtrüber Apfelsaft (Brettacher)</b>	1,1 g/l

\*Methode nach Folin-Ciocalteu (EWG-VO 2676, 1990) mit Gallussäure als Referenzsubstanz

## TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter)-Test

### *Prinzip der Bestimmung*

Die Methode basiert auf der Messung der Fluoreszenz des Proteins R-Phycoerythrin (Anregung:  $\lambda = 495$  nm; Emission:  $\lambda = 575$  nm). Durch die thermische Zersetzung von ABAP (2,2'-azobis-(2-Amidinopropan)) werden Radikale freigesetzt, die das R-Phycoerythrin zerstören, wodurch die Fluoreszenz stetig abnimmt. Antioxidantien, die vor Beginn der Messung zugesetzt werden, schützen das Phycoerythrin eine Zeit lang und zögern somit die Abnahme der Fluoreszenz hinaus (Lagphase). Die Länge der Lagphase charakterisiert die antioxidative Aktivität. Als Standard dient Trolox<sup>®</sup>. Der TRAP-Wert gibt an, wieviel mol Radikale von einem Liter Analysenlösung (bzw. Plasma) "abgefangen" werden können [3].

## HPLC (High-Performance Liquid-Chromatography)-Analytik

### *Prinzip der Bestimmung*

Die Saftproben wurden abhängig vom Gesamtphenol- bzw. Anthocyan-Gehalt verdünnt (1:10, 1:50 oder 1:100) und 5 Minuten bei 14000 U/Minute zentrifugiert. Für die anschließende HPLC-Analyse (Tab. 2) wurden jeweils 100  $\mu$ l verwendet.

**Tab. 2:** HPLC-Parameter [4,5]

<b>Vorsäule:</b>	LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18; 4 x 4 mm; 5 $\mu$ m
<b>Trennsäule:</b>	LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18; 125 x 4 mm; 5 $\mu$ m (Johannisbeer-Anthocyane) LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18; 250 x 4 mm; 5 $\mu$ m (Holunder-Anthocyane, Quercetin-3-Rutinosid und Chlorogensäure)
<b>mobile Phase:</b>	H <sub>2</sub> O : Ameisensäure : Acetonitril (v/v/v); 1,0 ml/Min.; isokratisch 81 : 10 : 9 (Anthocyane, Chlorogensäure) 74 : 10 : 16 (Quercetin-3-Rutinosid)
<b>Detektion:</b>	520 nm (Anthocyane) 363 nm (Quercetin-3-Rutinosid) 320 nm (Chlorogensäure)

## Ergebnisse

Die während der 3 wöchigen Lagerung gemessenen Veränderungen in den untersuchten Parametern, sind in Tabelle 3 (absolut) und den Abbildungen 1-4 (relativ) dargestellt.

Tab. 3: Lagerstabilität der untersuchten Fruchtsäfte

Saft	Ld	Anthocyane $\Sigma$ [mg/l]	Q-3-Rut [mg/l]	Cs [mg/l]	TRAP [mmol/l]
Holunder	t <sub>0</sub>	1777	530	255	16,8
	t <sub>3</sub>	1659	519	243	12,5
schw. Joh.	t <sub>0</sub>	1753	n.b.	n.b.	21,0
	t <sub>3</sub>	1680	n.b.	n.b.	14,5
Apfel	t <sub>0</sub>	n.b.	n.b.	232	3,3
	t <sub>3</sub>			227	2,5

t<sub>0</sub>: Beginn des Lagerversuchs; t<sub>3</sub>: Ende des Lagerversuchs nach 3 Wochen; Ld: Lagerdauer; n.b.: nicht bestimmt; Anthocyane $\Sigma$ : Cyanidin-3,5-Diglucosid+Cyanidin-3-Sambubiosid+Cyanidin-3-Glucosid für Holundersaft bzw. Delphinidin-3-Glucosid+Delphinidin-3-Rutinosid+Cyanidin-3-Glucosid+Cyanidin-3-Rutinosid für schwarzen Johannisbeersaft; Q-3-Rut: Quercetin-3-Rutinosid; Cs: Chlorogensäure

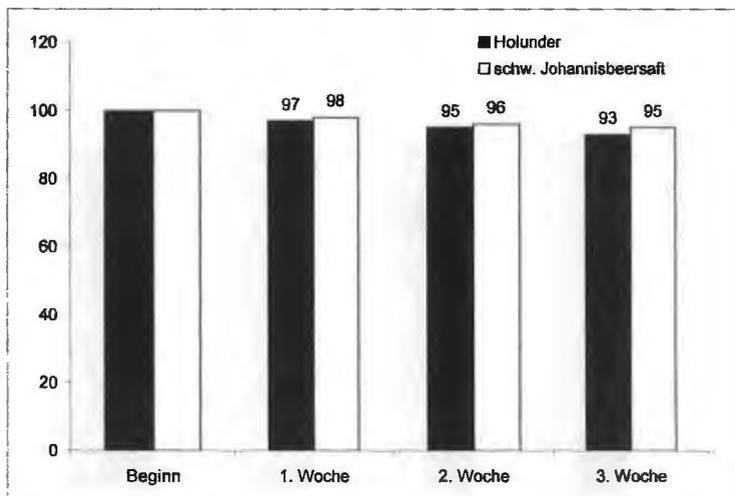
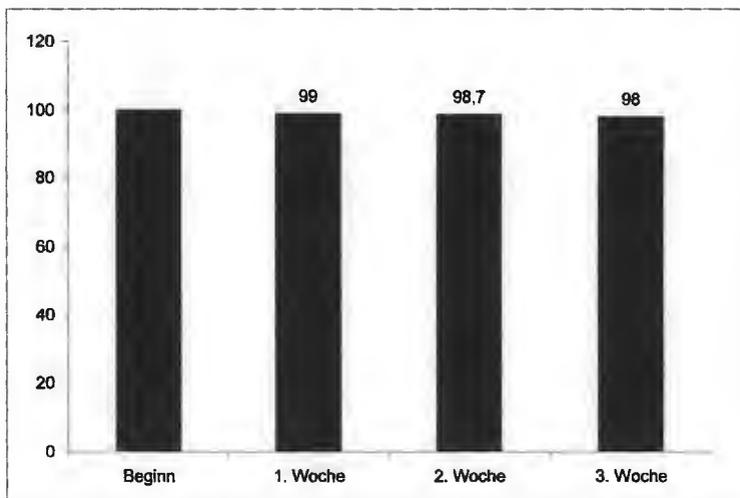
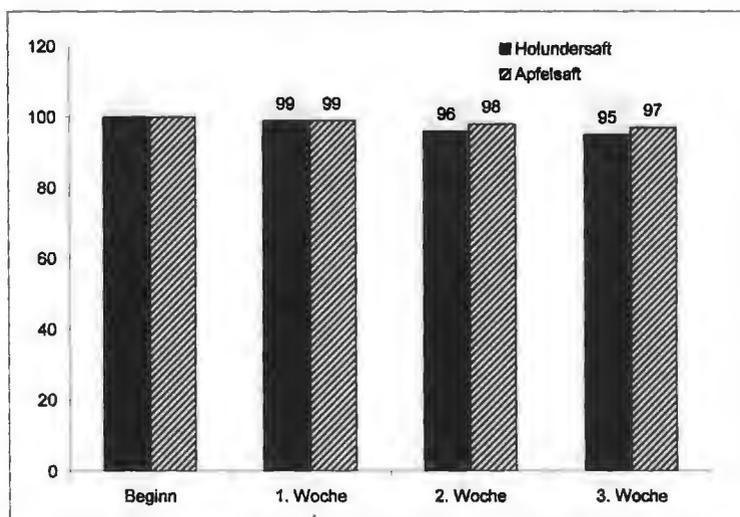


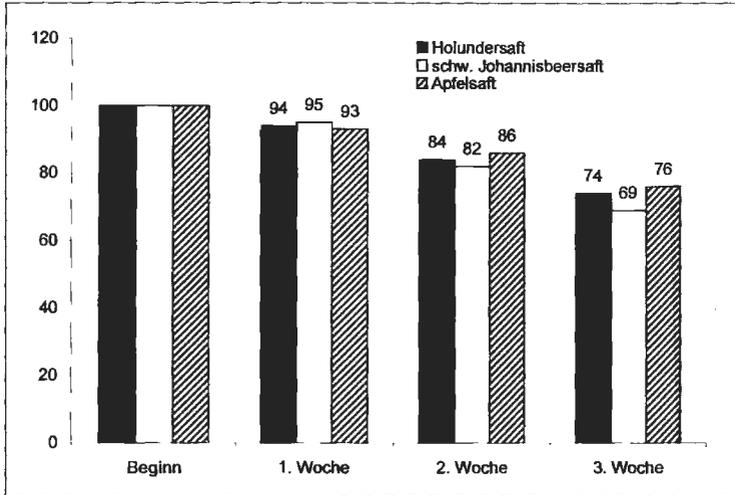
Abb. 1: Veränderung der Anthocyan $\Sigma$ -Konzentration (%) im Holunder- und schwarzen Johannisbeersaft in Abhängigkeit von der Lagerdauer



**Abb. 2:** Veränderung der Quercetin-3-Rutinosid-Konzentration (%) im Holundersaft in Abhängigkeit von der Lagerdauer



**Abb. 3:** Veränderung der Chlorogensäure-Konzentration (%) im Holunder- und naturtrüben Apfelsaft in Abhängigkeit von der Lagerdauer



**Abb. 4:** Veränderung der antioxidativen Kapazität (%) der untersuchten Säfte in Abhängigkeit von der Lagerdauer

### Schlussfolgerung

Bei den untersuchten Polyphenolen der verschiedenen Säfte, konnte eine weitgehende Stabilität während der 3 wöchigen Lagerung (nach Öffnung im Kühlschrank bei +4°C) beobachtet werden, während die antioxidative Kapazität deutlich abgenommen hat (max. 31%). Ob hierfür ausschließlich die geringe Abnahme (max. 7%) der Hauptpolyphenole verantwortlich ist, oder aber chemische Veränderungen (wie z.B. Reaktionen mit Sauerstoff, intermolekulare Kondensationsreaktionen) der mit der verwendeten HPLC-Methodik bisher nicht erfassten phenolischen Verbindungen ausschlaggebend sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Insbesondere im Hinblick einer Bewertung dieser Säfte als potentielle Lieferanten bioaktiver Inhaltsstoffe für den Menschen, ist dies von Bedeutung.

### Literatur

1. Cao G, Russeel RM, Lischer N, Prior RL [1998]: Serum antioxidant activity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr* 128: 2383-2390
2. Dietz E, Bitsch I [1995]: Die relative Bioverfügbarkeit von Ascorbinsäure pflanzlicher Lebensmittel für den Menschen. in: *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier*: 308-311; Hrsg: Schubert R, Flachowsky G, Bitsch R ISBN 3-00-000361-4
3. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Assini E, Ferro-Luzzi A [1995]: A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Rad Biol Med* 18: 29-36

4. Netzel M, Strass G, Janssen M, Herbst M, Bitsch I [1999]: Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von antioxidativ wirksamen Anthocyanen aus Holunder- und schwarzen Johannisbeeren. Proceedings: 103-104  
Werkstattbericht der Justus-Liebig-Universität Giessen; ISBN 3-931866-12-2
5. Netzel M, Carle E, Kesenheimer B, Strass G, Bitsch I, Bitsch R [1999]: Effect of apple juice intake on antioxidative status in humans. Proceedings: P21  
4<sup>th</sup> Karlsruhe Nutrition Symposium

#### **Förderhinweis**

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie / AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) gefördert. Projekt-Nr.: **AiF-FV 11160 B I**



## **Einfluss verschiedener Antioxidantien auf die Vergärung von Traubenmost und die Weinqualität**

*Löhnertz, O.<sup>1)</sup>, Rauhut, D.<sup>2)</sup>, Shefford, P. G.<sup>3)</sup>, Pour Nikfardjam M.<sup>4)</sup>, Loos, U.<sup>1)</sup>*

*<sup>1)</sup>Fachgebiet für Bodenkunde und Pflanzenernährung, <sup>2)</sup>Fachgebiet für Mikrobiologie und Biochemie <sup>4)</sup>Fachgebiet für Weinanalytik und Getränkeforschung  
Forschungsanstalt Geisenheim <sup>3)</sup>Fachbereich für Weinbau und Getränketechnologie,  
Fachhochschule Wiesbaden Von-Lade-Straße 1, D-65366 Geisenheim*

### **Influence of different antioxidants on the fermentation of grape must and wine quality**

Must with very low assimilable nitrogen concentration was subject to pre-fermentation addition of different antioxidants and was fermented with three different commercial yeast strains in carboys. Fermentation controls were carried out without additions of any sort and with the usual amounts of nitrogen supplements that are added in the practice. It was possible to observe clear differences both in the fermentation progress as well as in the final degree of fermentation. The addition of antioxidants showed no influence on the fermentation progress. Both yeast strain as well as the addition of antioxidants clearly influenced the antioxidative potential (TEAC-value) of the individual wines. The addition of ascorbic acid was very positively sensorially judged with a higher quality number ("Qualitätszahl") and a lower rating for bitterness. The addition of Glutathion resulted in increased formation of negatively judged volatile sulphur compounds however this was not the case with ascorbic acid.

Otmar Löhnertz, Fachgebiet für Bodenkunde und Pflanzenernährung, Forschungsanstalt Geisenheim, 65366 Geisenheim, otmar.loehnertz@geisenheim.fh-wiesbaden.de

### **1 Einleitung**

In den letzten Jahren treten im Weinsektor verstärkt Gär- und Aromaprobleme auf, die zu großen wirtschaftlichen Verlusten führen. Die Zunahme von böckserartigen Fehleraromen, bedingt durch ein vermehrtes Vorkommen von flüchtigen schwefelhaltigen Substanzen, und das Auftreten einer sogenannten „Untypischen Alterungsnote (UTA), gekennzeichnet durch die Bildung von 2-Aminoacetophenon (AAP) in Weinen, können als Beispiele angeführt werden (Rapp und Versini 1995, Rauhut 1996). Besonders die Entstehung der UTA ist überwiegend auf Stresssituationen im Anbau zurückzuführen. Bei der Ausprägung der UTA wurde als verantwortliche Aromakomponente (AAP) identifiziert, welches nach der Gärung durch den Zusatz von schwefliger Säure mittels einer gekoppelten Oxidation aus dem Tryptophanstoffwechselprodukt Indolelessigsäure entstehen soll (Geßner et al. 1998). Diese Verbindung trat in geschmacks- und geruchsaktiven Konzentrationen erst in den letzten Jahren in Weinen aus europäischen Rebsorten auf. Auch die Zunahme von Böckern im Wein wird mit Stresssituationen im Anbau wie Stickstoffmangel oder Trockenheit in Verbindung gebracht. Unter diesen Bedingungen werden weniger für die Hefe assimilierbare Aminosäuren in die Trauben eingelagert, was zu den beschriebenen Weinfehlern führen kann. In umfangreichen

Untersuchungen konnte eine große Bedeutung der Konzentration an Aminosäuren im Most für den Verlauf der Gärung und für die Vermeidung von Fehleraromen bzw. der Ausprägung des Gärungsbuketts belegt werden (Löhnertz et al 1998, Rauhut et al.1998).

Die Bedeutung des antioxidativen Potentials von Trauben bzw. von Most und Wein für die Vermeidung unerwünschter Aromaveränderungen ist wenig untersucht. Da bei Rotweinen im Gegensatz zu Weißweinen mit einer anderen Phenolzusammensetzung die beschriebene UTA nicht auftritt, muß von einer antioxidativen Wirkung zur Vermeidung von AAP ausgegangen werden. Es sollte geprüft werden, ob negative Stresseinflüsse im Verlauf des Traubenwachstums im nachhinein durch den Zusatz von Antioxidantien gemildert werden können, indem freie Radikale vor der Gärung entfernt werden. Der Einsatz von Antioxidantien im Pflanzenbau steht erst am Anfang (Schmitz und Noga 1997). Die Bedeutung von Glutathion in Reben ist ebenfalls weitgehend unklar. Der Einfluß der Sorte, des Standortes und der S-Düngung auf den Glutathiongehalt wurde von Bastian (2000) und Bastian et al. (2000) geprüft. Dies erscheint besonders wichtig da eine enge Wechselwirkung zwischen Ascorbinsäure und Glutathion besteht.

Bei der Weinbereitung ist der Zusatz von Ascorbinsäure (Vitamin C) zugelassen. Besonders die Empfehlung die Bildung des AAP (Indikator für eine UTA im Wein) durch die Zugabe von Ascorbinsäure nach der Gärung (jedoch vor einer Behandlung mit schwefliger Säure) zu verhindern, hat im letzten Jahr zu einer verbreiteten Anwendung geführt (Geßner 1998)

Während in Deutschland der Einsatz von Ascorbinsäure vor der Gärung nicht praktiziert wird, erfolgt in anderen Ländern auch der Einsatz auf die Trauben vor der Kelterung. Der Wirkung anderer antioxidativer Substanzen und Präparate, wie Glutathion, Tannin, Traubenkernextrakt, Vitamin E (Tocopherole) etc., auf den Gärverlauf und die Weinqualität wurde nach deren Zusatz vor der Vergärung eines aus gestresstem Traubengut gewonnenen Mostes untersucht. Der für die Untersuchungen eingesetzte Traubenmost verfügte über einen äußerst geringen Gehalt an hefeverwertbarem Stickstoff. Die Messung der totalen antioxidativen Kapazität des Traubenmostes erfolgte durch die Bestimmung des TEAC-Wertes (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity; Dietrich et al. 1999). Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurde bei der Zugabe der unterschiedlichen Antioxidantien eine einheitliche totale antioxidative Kapazität (TEAC-Wert) eingestellt.

Bei der Durchführung der Gärversuche wurde gleichzeitig die Anwendung unterschiedlicher kommerzieller Reinzuchtheffen und die Zugabe von Gär Salz geprüft.

## **2 Material und Methoden**

Bei den Trauben handelt es sich um die Sorte Riesling aus einem Versuchsfeld des Fachgebietes Bodenkunde und Pflanzenernährung der Forschungsanstalt Geisenheim im Rheingau. Die Ernte der Trauben erfolgte am 19.10.1999 bei 95° Oe. Nach konventioneller Kelterung und Entschleimung wurde ein Ausbau in 25 Liter Korbflaschen vorgenommen.

### **2.1 Antioxidatives Potential**

Die Messung der totalen antioxidativen Kapazität des Traubenmostes erfolgte durch die Bestimmung des TEAC-Wertes. Der Rieslingmost wies mit 2,0 mmol/L einen für Weißweinmost hohes antioxidatives Potential auf. Bei der Zugabe der Antioxidantien wurden der Most jeweils auf einen Wert von ca. 2,73 mmol/L eingestellt.

Bei der Zugabe von Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) ging man von einer Verbesserung der Löslichkeit mit zunehmender Alkoholbildung während der Gärung aus.

Tab.1 Versuchsvarianten und eingesetzte Reinzuchthefen

Antioxidantien	Reinzuchthefer	Eigenschaft der Reinzuchthefer
Vitamin C (Ascorbinsäure)	Oenoferm Klosterneuburg (OEKN) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Stresstolerant
Vitamin E (Tocopherole)	Uvaferm CEG <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Stressempfindlich
Tannin	Lalvin EC1118 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	Stresstolerant

## 2.2 Aminosäurekonzentration des Ausgangsmostes

Die Aminosäuregehalte des Mostes sind für eine problemlose Gärung von besonderer Bedeutung. In diesem Versuch werden gezielt Trauben mit extrem niedrigen Konzentrationen eingesetzt. Der Gesamt-Aminosäuregehalt betrug 98 mg/l. Als Mindestgehalte werden 150 mg/l hefeverwertbaren Stickstoff angesehen.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Gärverlauf

Die eingesetzten Reinzuchthefen zeigten bereits in dem Most ohne Zugabe von Antioxidantien ein sehr unterschiedliches Gärverhalten. Bei der Hefe CEG erfolgte die langsamste Vergärung und es wurde der schlechteste Endvergärungsgrad erreicht. Nach 32 Tagen Gärdauer wies dieser Most noch 60 g/l Zucker auf. Durch den Zusatz von Gärtsalz erfolgte eine Beschleunigung. Ein Durchgären des Mostes konnte nicht erreicht werden (39 g/l Restzucker). Auch bei den beiden anderen Hefen traten ähnliche Effekte auf. So konnten Zuckergehalte von 18 bzw. 10 g/l Zucker ohne den Zusatz von Gärtsalz bei den beiden anderen Hefen nach 32 Tagen gemessen werden. Während der Vergärung traten somit erhebliche Gärverzögerungen und Gärstockungen auf. Der Einfluss der Reinzuchthefen auf die Gärleistung war wesentlich größer als eine Zugabe der verschiedenen Antioxidantien. Eine Gärbeschleunigung konnte nur nach Zusatz von Gärtsalz beobachtet werden. Die Auswirkung der verschiedenen Antioxidantien auf die Bildung wertgebender Gärungsnebenprodukte und die Sensorik der Weine wird untersucht.

In Abb. 1 ist beispielhaft der Gärverlauf mit der Hefe EC 1118 dargestellt. Diese Hefe vergor den eingesetzten Mangelmost nach 32 Tagen in allen Varianten fast vollständig. Eine Gärbeschleunigung konnte lediglich durch den Einsatz von Gärtsalz erreicht werden. Der Zusatz von Antioxidantien zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den Gärverlauf.

### 3.2 Aminosäuregehalte nach der Gärung

Die Konzentration an Aminosäuren nimmt während der Gärung ab. Dabei sind die Gehalte im Wein u. a. abhängig vom Gehalt der jeweiligen Aminosäuren vor der Gärung, aber auch von der eingesetzten Reinzuchthefer. Keine Veränderung erfährt in der Regel die Konzentration an Prolin, da diese Aminosäure unter Gärbedingungen von der Hefe nicht als N-Quelle genutzt werden kann. Bei dem durchgeführten Gärversuch liegen nach der Gärung auffallend niedrige Aminosäuregehalte in den Jungweinen vor. So traten Konzentrationen von nur noch 10 mg/l Aminosäure-Stickstoff auf. Die Hefen zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied im Aminosäurebedarf, da die Ausgangsmenge sehr gering war.

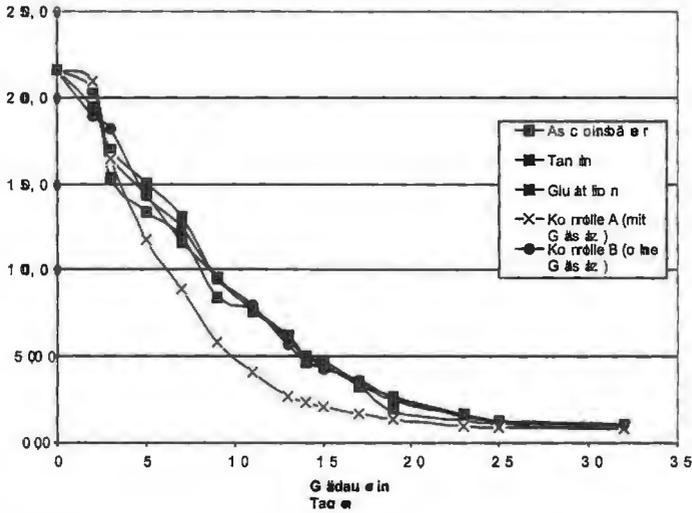


Abb. 1 Einfluß des Zusatzes von Antioxidantien und Gärnsalz vor der Gärung auf den Gärverlauf bei der Reinzuchthefe EC1118.

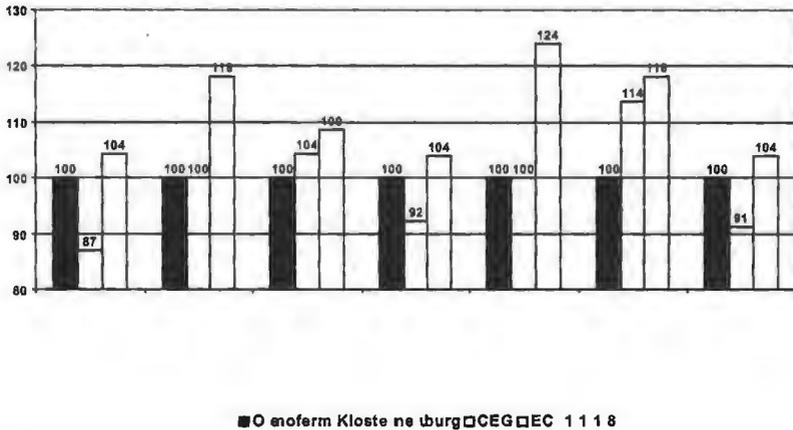


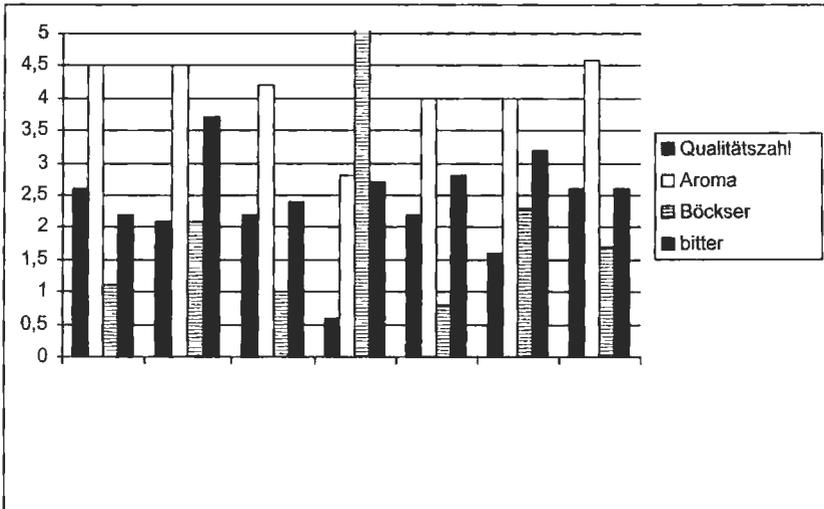
Abb. 2 Einfluß der eingesetzten Reinzuchthefe und des Zusatzes von Antioxidantien und Gärnsalz vor der Gärung auf die TEAC-Werte nach Abschluss der Gärung (prozentuale Veränderung des TEAC-Wertes während der Gärung)

Auffällig war bei den Hefen CEG und EC 1118 ein geringerer Aminosäurebedarf in den Varianten mit Tannin-Zusatz.

### 3.3 Antioxidatives Potential (TEAC-Werte) nach der Gärung

Überraschenderweise konnte ein deutlicher Einfluss der Hefe und des jeweiligen Zusatzstoffes auf das antioxidative Potential (TEAC-Wert) des Weines ermittelt werden. Abb. 2 veranschaulicht, dass die Werte bei der Hefe EC1118 in jeder der Varianten höher liegen als bei den Hefen OeKN und CEG. Auffallend sind auch erhöhte Werte in den Varianten „Zugabe von Ascorbinsäure“ bei den Hefen CEG und EC 1118.

### 3.4 Sensorische Bewertung der Weine



**Abb. 3** Sensorische Bewertung der Weine; Einfluß von Antioxidantien und Gärnsalz bei der Hefe EC1118 auf die Qualitätszahl und die Attribute „Aroma“, „Böckser“ und „bitter“. Intensität auf einer Skala von 0-10;

In einer Verkostung der noch nicht abgefüllten Jungweine Ende April 2000 konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich des Einflusses der zugegebenen Antioxidantien bzw. des Gärnsalzes auf die Weinqualität aufgezeigt werden. In Abb. 3 werden die Ergebnisse mit der Hefe OeKN, ein stresstoleranter *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm dargestellt. Ein Vergleich der Hefe-Varianten wurde nicht vorgenommen, auch weil die Restzuckergehalte der Weine sehr unterschiedlich sind und ein direkter Vergleich somit schwierig ist.

Am besten wurden vom Prüferpanel die Varianten „Kontrolle“ und „Ascorbinsäure“ mit einer Qualitätszahl von 2,6 bewertet (je höher die Zahl, desto besser bewertet). Ein deutlicher Abfall in der Qualitätszahl ergab sich bei der Variante mit Glutathion. Dieser Wein wies einen deutlichen Böckser auf und wurde deshalb schlecht beurteilt. Eine signifikant niedrigere

Qualitätszahl erhielt auch die Variante „Zugabe von Gärsalz“, obwohl dies ein in der Praxis übliches Verfahren ist.

Die Attribute „bitter“ und „Böckser“ wurden auf einer Skala von 0-10 (je höher die Zahl, desto intensiver erscheint das Attribut) bei der Verkostung bewertet. Bittertöne können als ein Indikator für gestresstes Traubenmaterial angesehen werden. Das in Weißweinen negativ bewertete Attribut „bitter“, wurde durch den Zusatz von Ascorbinsäure schwächer empfunden. Dies gilt vor allem in einem Vergleich zu der Variante „Zusatz von Gärsalz“. Während in dieser Variante der Wein mit 3,2 bewertet wurde, war ein Rückgang der Bittertöne auf 2,2 bei einem Zusatz von Ascorbinsäure zu verzeichnen.

#### 4 Zusammenfassung

In Most mit sehr niedrigem Stickstoffgehalt wurden vor der Gärung unterschiedliche Antioxidantien zugesetzt und mit drei verschiedenen Reinzuchtheften in Korbflaschen vergoren. Als Kontrolle erfolgte die Vergärung ohne jeglichen Zusatz und mit Zusatz von in der Praxis üblichen Menge an Gärsalz. Es konnten große Unterschiede im Gärverlauf und im Endvergärungsgrad in Abhängigkeit von der eingesetzten Hefe und des Zusatzes von Gärsalz, beobachtet werden. Die Zugabe von Antioxidantien zeigte keinen Einfluss auf den Gärverlauf. Das antioxidative Potential (TEAC-Wert) der einzelnen Weine wurde sowohl von der Hefe als auch durch den Zusatz von Antioxidantien deutlich beeinflusst. Der Zusatz von Ascorbinsäure wurde mit einer hohen Qualitätszahl und einer niedrigen Bewertung für „bitter“ sensorisch sehr positiv bewertet. Eine erhöhte Böckserbildung erfolgte durch den Zusatz von Glutathion, jedoch nicht bei Ascorbinsäure.

#### 6. Literatur

*Bertrand, A. u. G. de Revel* (1999): Utilisation de l' Acide Ascorbique en Association avec le Dioxyde de Soufre le Mout; OIV, „Microbiologie du Vin-Technologie du Vin

*Dietrich, H.; Patz, C-D.; Rechner, A.* (1999) Die antioxidative Aktivität von Getränken und ihre Bedeutung für die Getränkeentwicklung, Getränkeindustrie 3/99, 132-135

*Gefßner, M.* (1989): neue Erkenntnisse zur Bildung von Alterungsnoten im Wein 5. Intern. Symp. Innovationen in der Kellerwirtschaft - 11./12.5.1999 Stuttgart 290-305

*Löhnertz, O.; Prior, B.; Bleser, M. u. A. Linsenmeier* (1998): Einfluß von weinbaulichen Maßnahmen auf die Aminosäuregehalte in Trauben und Most der Sorte Riesling 5. Intern. Symp. Innovationen in der Kellerwirtschaft - 11./12.5.1999 Stuttgart 1-15

*Rapp, A. u. G. Versini* (1995): Fehleroma: Die untypische Alterungsnote. D. Deutsche Weinbau, 18, 18-22

*Rauhut, D.* (1996) Qualitätsmindernde schwefelhaltige Stoffe im Wein, - Vorkommen, Bildung, Beseitigung -. Dissertation Universität Gießen, Hrsg. Gesellschaft zur Förderung der Forschungsanstalt Geisenheim, Band 24

Rauhut, D; Kürbel, H.; Schneider K.; Löhnertz O.; Großmann M. (1998) Einfluß der Nährstoffzusammensetzung im Most auf die Bildung von böckserverursachenden schwefelhaltigen Substanzen im Wein , 5. Intern. Symp. Innovationen in der Kellerwirtschaft - Mikroorganismen und Weinbereitung 11./12.5.1999 Stuttgart 127 - 143

*Schmitz, M. u. G. Noga* 1997 Vorkommen, Chemie und Wirkungsweise bedeutender Antioxidantien in Pflanzen, Erwerbssobstbau, 39, 162-168

## EINFLUSS DER TEIGWARENHERSTELLUNG AUF FARBGEBENDE SEKUNDÄRE PFLANZENSTOFFE VON DURUMWEIZEN

V. Hentschel<sup>1</sup>, N. Kolb<sup>2</sup>, K. Münzing<sup>1</sup>, V. Böhm<sup>3</sup>, I. Bitsch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung in Detmold und Münster,

<sup>2</sup>Universität Gießen, Institut für Ernährungswissenschaft

<sup>3</sup>Universität Jena, Institut für Ernährungswissenschaften

*Influence of pasta processing on coloured secondary plant components contained in durum wheat*

*Yellow colour is an important criterion of pasta quality. The colouring compounds of durum wheat contain the important carotenoids and flavonoids. Since these ingredients were measured and allocated on the undiffered term „yellow pigment“. We proved the effect of pasta processing on the reduction of the xanthophyll lutein. The parameters (moisture content of the dough, temperature of added water and during drying, rotation per min [rpm]) were varied during the processing. Lutein was measured by the „yellow pigment“- and by HPLC-method. Changes of the moisture content of the dough and the rpm had the greatest influence on the temperature of the pressing device and duration of extrusion, which determine the destruction of lutein and hence the contents of „yellow pigment“ and lutein in pasta. However, lutein and other carotenoids obviously do not possess the importance for the colour of pasta.*

*Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung in Detmold und Münster, Institut für Getreide-, Kartoffel- und Stärketechnologie, Schützenberg 12, D-32756 Detmold*

### **Einführung**

Die gelbe Farbe bei Teigwaren stellt ein wichtiges Qualitätskriterium dar. Die Erhaltung der natürlichen Farbstoffe des Rohstoffes Durumweizen bei der Verarbeitung ist somit von großer Bedeutung. Das ernährungsphysiologisch interessante Carotinoid Lutein gilt als der Hauptfarbstoff von Durumweizen [1] (Abbildung 1).

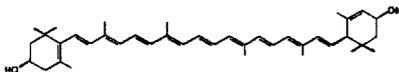


Abbildung 1: Strukturformel von Lutein

Zur Farbbeurteilung wurden die Pigmente von Durumweizen und Teigwaren bisher nur mit der im Hinblick auf die stoffliche Zusammensetzung undifferenzierten Gelbpigmentgehaltsermittlung erfaßt. Untersuchungen zur Charakterisierung der Stabilität von Lutein bei der Teigwarenherstellung, deren Einflussfaktoren und der Bedeutung des Luteins für die Produktfarbe wurden durchgeführt.

## Versuchsplan

Im Vordergrund einer experimentellen Studie steht der Abbau des Luteins bei der Teigwarenherstellung. Nach einem vollständigen Faktorenversuchsplan wurden relevante Prozessparameter wie folgt variiert:

Teigfeuchtigkeitsgehalt:	33 und 35 %
Schüttwassertemperatur:	15 und 45 °C
Schneckendrehzahl:	20 und 30 U/min
Trocknungstemperatur:	55 und 70 °C.

Die Oxidation des Luteins wird zum einen durch die Wirkung des Enzyms Lipoxygenase und zum anderen durch autoxidative Reaktionen verursacht. Angenommen wird, dass die Prozessparameter den Abbau des Luteins über die Veränderung des Extrusionsdrucks, der Verweilzeit des Teiges im Extruder, der Extrusionstemperatur und der Lipoxygenasedenaturierung beeinflussen.

## Meßmethodik

Der Luteingehalt von Grieß und Teigwaren wurde mittels HPLC-Methode [2] analysiert (Abbildung 2).

Zur Charakterisierung des Anteils von Lutein am Gesamtpigmentgehalt erfolgte die Bestimmung der Gelbpigmente nach ICC-Standard [3].

Die Entwicklung von Druck und Teigtemperatur während der Extrusion wurden über einen Druck- und Temperaturlaufnehmer am Matrizenkopf gemessen.

Die Lipoxygenasedenaturierung wurde durch den Vergleich der Enzymaktivitäten von Grieß und den fertigen Teigwaren erfaßt. Die Ermittlung der Lipoxygenaseaktivität erfolgte polarographisch mittels einer Clark-Elektrode [4].

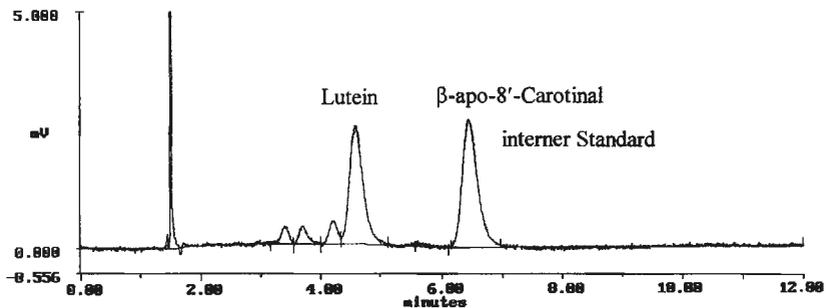


Abbildung 2: Beispielchromatogramm der HPLC-Analyse

## Ergebnisse

Der Einfluss der Prozessparameter auf die Luteingehalte der hergestellten Teigwaren war signifikant, jedoch gering. Die Änderungen von Teigfeuchtigkeitsgehalt und Drehzahl zeigten die größten Effekte. Trocknungs- und Schüttwassertemperatur beeinflussten den Luteingehalt nur geringfügig. Der Extrusionsprozess spielt somit im Vergleich zur Trocknung eine größere Rolle beim Pigmentabbau (Abbildung 3).

Bei den auftretenden Extrusionstemperaturen laufen autoxidative Prozesse nur langsam ab, so dass die Pigmentverluste vor allem auf eine durch die Lipoxygenase eingeleitete Oxidation zurückzuführen sind.

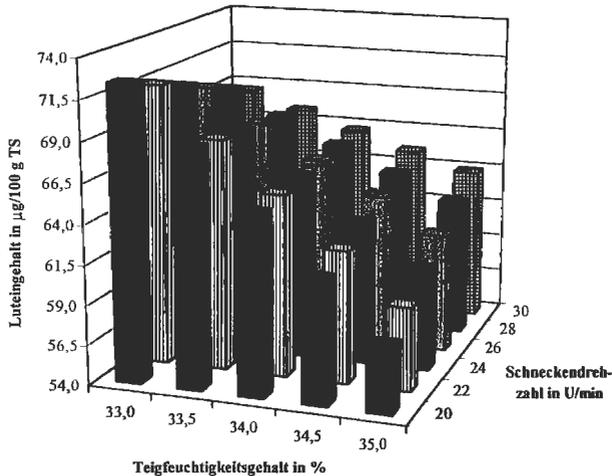


Abbildung 3: Einfluss von Teigfeuchtigkeitsgehalt und Schneckendrehzahl auf den Luteingehalt

Bei der Trocknung wird die Lipoxygenase mit steigenden Teigfeuchtigkeitsgehalten und Temperaturen denaturiert (Abbildung 4). Die Pigmentverluste bei der Extrusion werden dadurch jedoch nicht kompensiert.

Die höchsten Luteingehalte ergaben sich bei niedrigem Teigfeuchtigkeitsgehalt und niedriger Schneckendrehzahl.

Geringe Teigfeuchtigkeitsgehalte wirken sich in allen Einstellkombinationen der Prozessparameter günstig auf die Luteingehalte aus. Die Ursache hierfür liegt in dem resultierenden höheren Extrusionsdruck (Abbildung 5). Hohe Drücke bedingen eine geringe Verweilzeit des Teiges im Extruder. Die Einwirkzeit der Lipoxygenase wird somit verkürzt.

Die Schneckendrehzahl beeinflusst den oxidativen Abbau des Luteins über zwei gegenläufige Effekte. Zum einen bewirken steigende Drehzahlen eine Zunahme des Extrusionsdrucks und vermindern so den Pigmentverlust. Zum anderen bedingen sie aber auch eine Zunahme der Scherbeanspruchung und der Extrusionstemperatur des Teiges. Dies beschleunigt den Luteinabbau.

Welcher Effekt überwiegt, ist vom Teigfeuchtigkeitsgehalt abhängig. Bei hohem Teigfeuchtigkeitsgehalt sind aufgrund des drucksteigernden Effekts hohe Schneckendrehzahlen günstig. Bei niedrigem Teigfeuchtigkeitsgehalt sind wegen der geringeren Temperatur- und Scherbeanspruchung niedrige Drehzahlen als besser einzustufen.

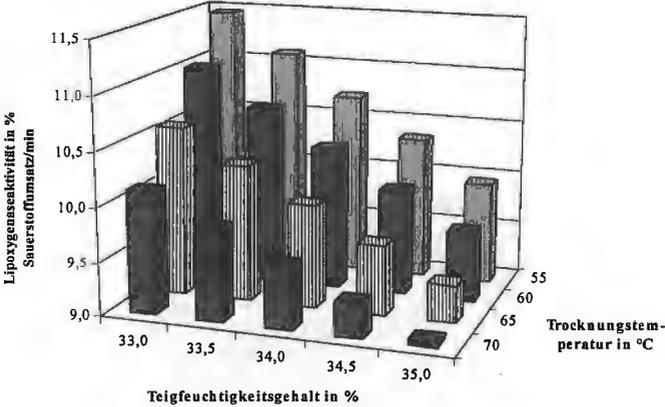


Abbildung 4: Einfluss von Teigfeuchtigkeitsgehalt und Trocknungstemperatur auf die Lipoxygenaseaktivität

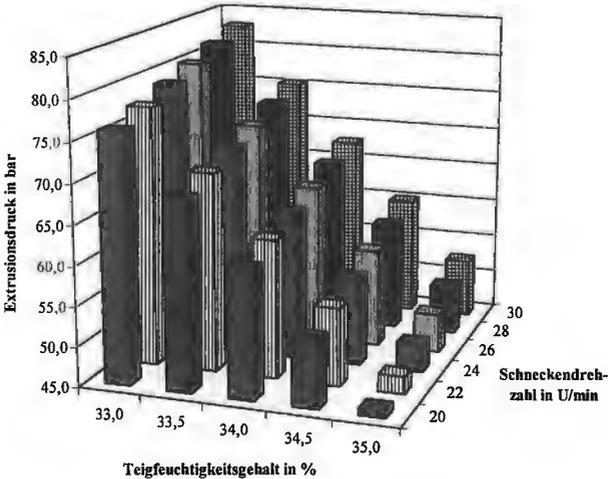


Abbildung 5: Einfluss von Teigfeuchtigkeitsgehalt und Schneckendrehzahl auf den Extrusionsdruck

Der über die HPLC-Methode bestimmte Luteingehalt lag niedriger als der photometrisch bestimmte Gelbpigmentgehalt. Darüber hinaus konnten keine Luteinester oder andere Carotinoide analytisch erfaßt werden. Neben dem Lutein besitzen offenbar Stoffe anderer Substanzklassen eine Bedeutung für die Teigwarenfarbe.

### *Literatur*

- [1] Lepage, M. ; Sims, R.P.A. (1968): Cereal Chem. 45 (6): 600-604
- [2] Böhm, V. (1999): Chromatographia 50: 281-286
- [3] Internationale Gesellschaft für Getreidewissenschaft und -technologie/ICC (1990): Standardmethoden, Nr. 152. Verlag Moritz Schäfer, Detmold
- [4] Fretzdorff, Barbara; Jördens, Angela (1986): Lebensm.-Wiss. u. -Technol. 19: 437-442





## Mikrowellenbehandlung von Stärke

*Kyeong-Seok Oh und Elke Pawelzik*

Institut für Agrikulturchemie der Georg - August Universität Göttingen,  
von - Siebold - Str. 6 37075 Göttingen  
E - Mail : koh@gwdg.de und epawelz@gwdg.de

### *Microwave treatment of starch*

*The characteristics of processing and the quality of starch products are influenced through the main component starch. The properties of nature starch can be changed through a series of processes, e. g. through thermal, mechanical, chemical and enzymatic modification. The damaged starch has opposite to nature starch other characteristics, like the increase of soaking in cold water, a fast and high water absorption and easy enzymatic digestibility. The quality of starch can influence starch-containing products profitably. Thus, the degree of starch damage is very important for the industrial production of foods.*

*In this work the effect of microwave treatment on the thermal damage and functional characteristics of wheat-, corn- and potato starch was investigated.*

*Through the microwave treatment the extractibility of amylose and the enzymatic debranching of starch are changed, whereby these rise with increasing treatment temperature. The starches show with increasing temperature also a rising in the water adsorption. The freeze-thaw stability of gels from corn- and potato starch is influenced disadvantageously.*

*Microwave treatment has an influence in different extent on the starch properties and the functional characteristics depending on starch nature.*

*Institut of Agricultural Chemistry, Georg-August-University Goettingen, Von-Siebold-Str.6 37075 Goettingen, Germany, E-mail : koh@gwdg.de and epawelz@gwdg.de*

### **Einführung**

Die Verarbeitungseigenschaften und die Qualität von stärkehaltigen Produkten werden durch den Hauptinhaltsstoff Stärke beeinflusst. Die Eigenschaften nativer Stärke können durch eine Reihe von Verfahren, unter anderem durch thermische, mechanische, chemische und enzymatische Modifizierung, weitreichend verändert werden.

Veränderte und beschädigte Stärke hat gegenüber nativer Stärke andere Eigenschaften, wie die Erhöhung der Quellbarkeit in kaltem Wasser, eine schnelle und hohe Wasseraufnahme sowie eine leichte enzymatische Abbaubarkeit. Dies alles kann die Qualität von stärkehaltigen Produkten vorteilhaft beeinflussen. Daher ist der Grad der Stärkebeschädigung in funktioneller

Hinsicht von Bedeutung bei der Herstellung von Lebensmitteln.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß der Mikrowellenbehandlung auf die thermische Beschädigung und funktionelle Eigenschaften von Weizen-, Mais- und Kartoffelstärke untersucht.

## Material und Methoden

### Material

Weizen-, Mais- und Kartoffelstärke (Fa. Carl Roth) wurden in einer Labormikrowellenanlage des Institutes für Agrartechnik der Universität Göttingen (max. Leistung: 1200W; Frequenz: 2,45GHz) auf Temperaturen von 80, 100 bzw. 120°C erwärmt. Vor der Behandlung wurde die Feuchte der Weizen- und Maisstärke auf ca. 13% konditioniert.

### Methoden

Für die Ermittlung der Stärkebeschädigung wurde die Methode nach Mc Dermott (1980) (Bestimmung der Amyloseextrahierbarkeit) und die enzymatische Methode nach Fa. MegaZyme (enzymatische Angreifbarkeit) angewendet. Bei der Bestimmung der Amyloseextrahierbarkeit wurde Amylose mit 1,67% Trichloressigsäure und 5,0% Kaliumthiocyanat extrahiert. Durch Zugabe von Jodlösung geht die gelöste Amylose mit dieser einen Amylose-Jod-Komplex ein. Dieser Komplex zeichnet sich durch eine blau-grüne Färbung aus, dessen Intensität bei 600nm gemessen werden kann. Bei der Megazyme - Methode wurde die beschädigte Stärke anfänglich mit Pilzamyase abgebaut. Durch Zusatz von Schwefelsäure wurde der Abbau gestoppt und die löslichen Oligosaccharide sowie Grenzextrine im Überstand mit Amyloglucosidase zu Glucose hydrolysiert. Glucose wurde mit Hilfe von Glucoseoxidase-Peroxidase-Reagenz quantitativ bestimmt.

Die Ermittlung der  $\alpha$ -Amylaseaktivität erfolgte mittels Phadebas-Test (Fa. Boehringer Mannheim).

Das Wasserbindungsvermögen der Stärken wurde in Analogie zu Richter et al. (1968) erfaßt.

Die Gefrier-Tau-Stabilität von Stärkegelelen wurde nach Schoch (1968) bestimmt.

## Ergebnisse und deren Diskussion

Abbildung 1 zeigt, wie die Mikrowellenbehandlung die Stärkebeschädigung der einzelnen Stärkeart beeinflusst. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nahm bei allen Stärken die Enzymangreifbarkeit mit steigender Temperatur zu, wobei in Maisstärke der Mikrowelleneinfluß am geringsten war. Aus Weizenstärke ließ sich insbesondere nach Behandlungen bei Temperaturen von 100 bzw. 120°C Amylose in hohen Anteilen extrahieren. In Maisstärke nahm die Amyloseextrahierbarkeit mit steigender Temperatur im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sogar ab. Die botanische Herkunft der Stärke ist offensichtlich von entscheidender Bedeutung für den Grad der Beschädigung. Zum Einen ist die unterschiedliche Größe der Stärkekörner von Einfluß. Andererseits kann auch die Höhe des Amylosegehaltes von Bedeutung sein, da Kartoffelstärke zu 21% und Weizen- bzw. Maisstärke zu 28% aus Amylose bestehen (Whistler u. BeMiller, 1997).

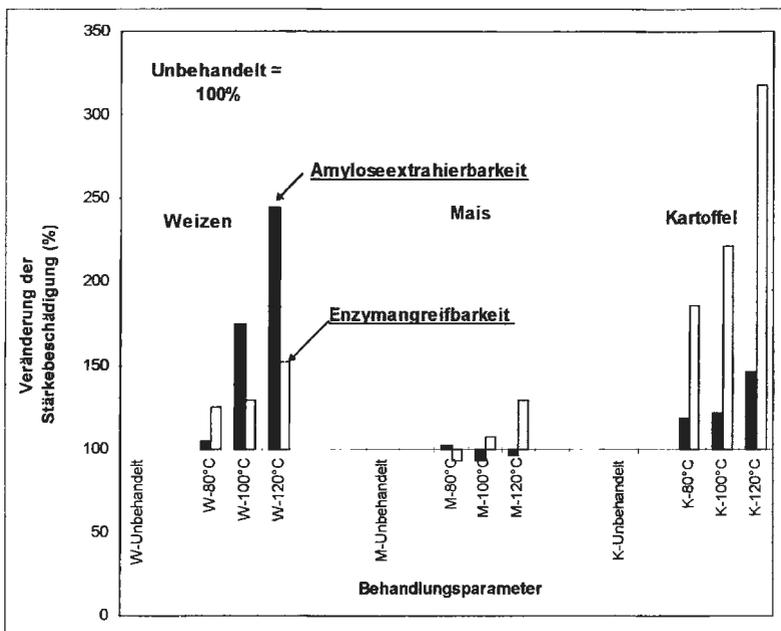


Abb. 1 : Einfluß der Mikrowellenbehandlung auf die Stärkebeschädigung der unterschiedlichen Stärkearten

$\alpha$  - Amylase wird in den untersuchten Weizen- und Maisstärken durch Mikrowellenbehandlung inaktiviert, während in Kartoffelstärke eine Aktivierung des Enzyms erfolgt (Abb. 2).

Infolge der Einwirkung von Mikrowellen wurden Veränderungen im Wasserbindungsvermögen der untersuchten Stärken festgestellt (Abb. 3). Die erste Veränderung der Stärkeeigenschaften nach der Stärkebeschädigung betrifft das Wasserbindungsvermögen. Bei nativer Stärke sind die intermolekularen Bindungen zu stark, um das Wasser eindringen zu lassen. Sie werden nur in den amorphen Zonen gebunden (Multon et al., 1980). Durch die Beschädigung werden die kristallinen Bereiche teilweise zerstört und die Stärkekörner können adsorptiv mehr Wasser binden. Es entstehen neue Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und den freien Hydroxylgruppen der Amylose und des Amylopektins (Meuser et al., 1978). Die Stärke zeigt in unseren Untersuchungen mit zunehmender Behandlungstemperatur ein Ansteigen im Wasserbindungsvermögen. Die Veränderung des Wasserbindungsvermögens von Maisstärke war ebenso geringfügig, wie die Veränderung der Stärkebeschädigung. Dagegen führte bei Kartoffelstärke die zunehmende Stärkebeschädigung zu einem deutlichen Ansteigen des Wasserbindungsvermögens. Belitz und Grosch (1992) haben festgestellt, daß die durch thermische Behandlung bewirkten Änderungen der physikalischen Eigenschaften, wie Verkleisterungstemperatur, Quellungsvermögen, Löslichkeit, Wasserbindungskapazität und enzymatische Angreifbarkeit, allerdings in Abhängigkeit von der botanischen Herkunft der Stärke sehr unterschiedlich sein können. Sie haben die Veränderung der Eigenschaften

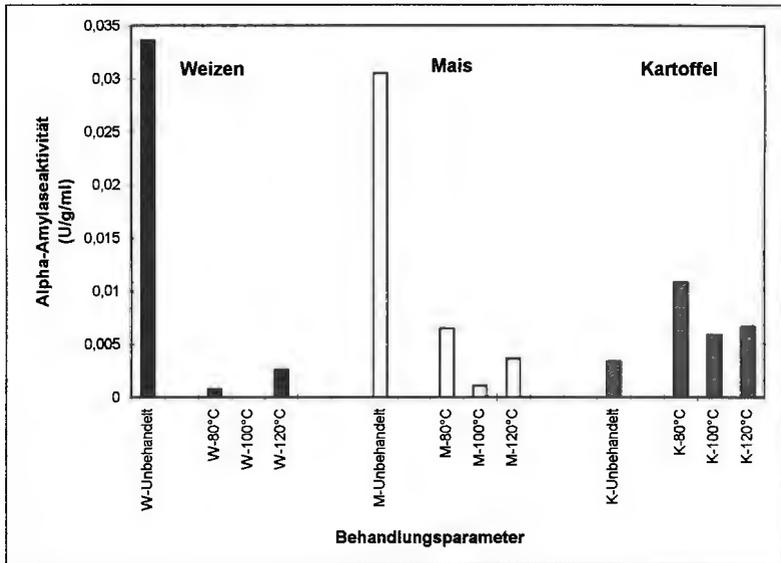


Abb. 2 : Einfluß der Mikrowellenbehandlung auf die  $\alpha$  - Amylaseaktivität der Stärken

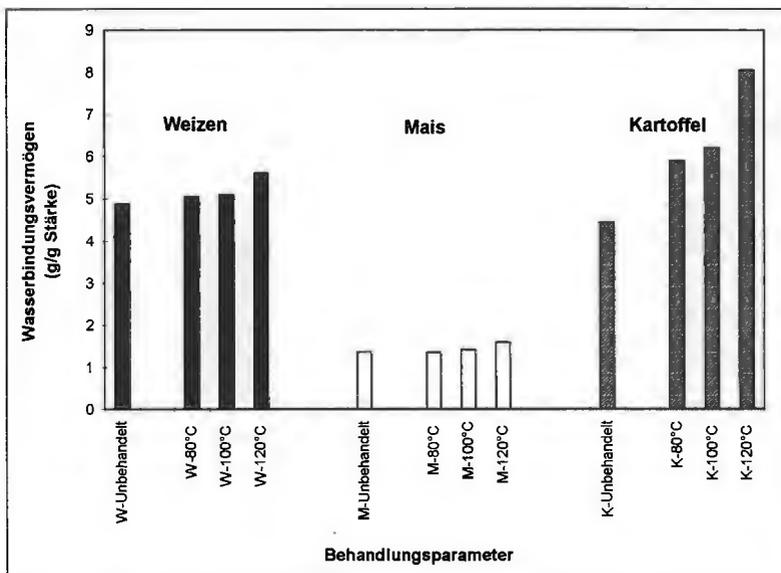


Abb. 3 : Einfluß der Mikrowellenbehandlung auf das Wasserbindungsvermögen von Stärke bei 55°C

von Weizen- und Kartoffelstärke nach konventioneller Hitzebehandlung untersucht und eine deutlich höhere Zunahme der Wasserbindungskapazität von Weizenstärke im Vergleich zu Kartoffelstärke ermittelt. Dieses im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehende Resultat ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß infolge der Mikrowellenbehandlung die Stärkekörner massiv beschädigt werden, so daß ein erhöhtes Wasserbindungsvermögen die Folge ist.

In Abb. 4 ist zu erkennen, daß durch die Mikrowellenbehandlung auch funktionelle Eigenschaften, wie die Gefrier-Tau-Stabilität der Gele, verändert wurden. Die Gefrier-Tau-Stabilität der Gele aus Mais- und Kartoffelstärke wurde nachteilig beeinflusst. Trotz des zunehmenden Wasserbindungsvermögens der Kartoffelstärke nahm die abgetrennte Wassermenge von 5%igen Gelen nach dem Gefrieren und Auftauen deutlich zu. Bei Weizenstärke dagegen wurde durch Mikrowellenbehandlung die Gefrier-Tau-Stabilität praktisch nicht verändert. Die Eigenschaft gequollener Stärkekörner, beim Gefrieren und Auftauen in wäßrigem Milieu schwammförmige Aggregate zu bilden, ist dann unerwünscht, wenn stärkehaltige Lebensmittelzubereitungen in gefrorenem Zustand aufbewahrt werden sollen. Mit zunehmender Stärkebeschädigung wurde die unerwünschte Bildung der Aggregate bei Kartoffelstärke beschleunigt, was in den spezifischen rheologischen Eigenschaften dieser Stärkeart begründet ist.

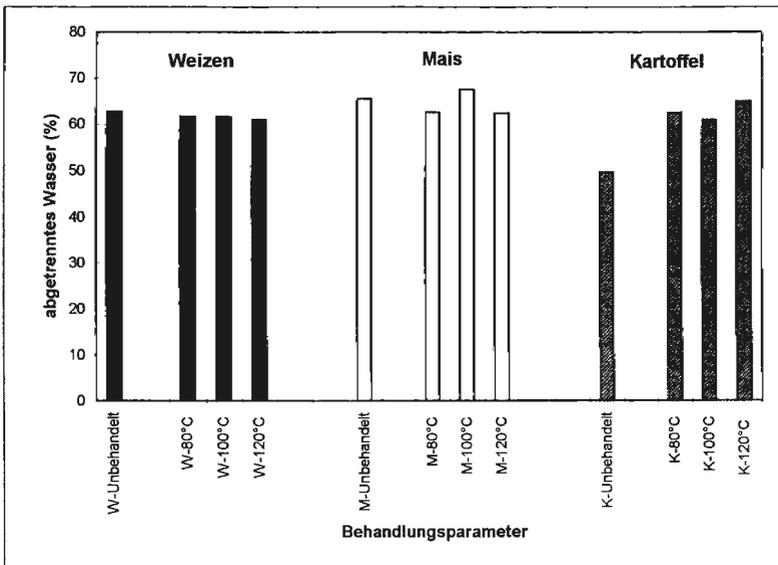


Abb. 4 : Einfluß der Mikrowellenbehandlung auf die Gefrier - Tau - Stabilität der unterschiedlichen Stärkearten

### Zusammenfassung

Die Mikrowellenbehandlung beeinflusst unterschiedlich bei den untersuchten Stärkearten den Gehalt an beschädigter Stärke sowie die Art der Beschädigung.

Stärkebeschädigung und Wasserbindungsvermögen stehen in engem Zusammenhang, wobei insbesondere die Enzymangreifbarkeit eine Rolle spielt.

Die Gefrier-Tau-Stabilität wird mit Ausnahme von Weizenstärke nachteilig beeinflusst, so daß eine Mikrowellenbehandlung nur bedingt für Produkte geeignet ist, die z. B. für Tiefkühlerzeugnisse verwendet werden.

## Literatur

Belitz, H.-D. und Grosch, W. (1992) : Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. Auflage, Springer-Verlag, S.286

Mc Dermott, E. E. (1980) : The rapid non-enzymic determination of damaged starch in flour, *Sci. Food Agric.* 31, S.405-413

Meuser, V.F., Klingler, R.W., und Niediek, E.A. (1978) : Charakterisierung mechanisch modifizierter Stärke, *Starch/Stärke* 30(11):376

Multon, J.L., Bizot, H. and Savet, B. (1980) : Water absorption in cereal foods and water activity measurement, *Cereals for food and Beverages*. G.E. Inglett and L. Munck, eds. Academic Press, New York, S.97-110

Richter, M., Augustat, S. und Schierbaum, F. (1968) : *Ausgewählte Methoden der Stärkechemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Schoch, T. J. (1968) : Effects of freezing and cold storage on pasted starches. In: *The Freezing Preservation of Food*. Vol. 4. D. K. Tressler, W. B. van Arsdel and M. J. Copley, eds. AVI: Westport, CT. S. 22-56

Whistler, R. L. and BeMiller, J. N. (1997) : *Carbohydrate chemistry for food scientists*, eagan press, St. Paul , S. 121



## **Kartoffel-fruchtwasser als biotechnologisches Medium für die fermentative Gewinnung von Paramylon und sekundären Pflanzenstoffen aus Einzellern**

*M. Felski, T. Betsche, E. Flaschel<sup>\*</sup>, M. Lotz<sup>#</sup>*

Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln, Detmold

<sup>\*</sup> Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Bielefeld

<sup>#</sup> Emslandstärke GmbH, Emlichheim

*Potatoliquor as a biotechnical media for the fermentative production of Paramylon and other secondary metabolics of single cell organisms*

*Abstract: During the production of potaostarch a large amount of liquid waste appears. This potatoliquor (KFW) has a high amount of minerals, protein (~5%), vitamins and aminoacids. In this study a way was found to use this wasteproduct for a fermentative production of different metabolics of single cell organisms. After the exclusion of the proteinload the now mostly proteinfree KFW can be used for diferent kinds of fermentation. The most sucesfull use seems to be the production of Paramylon, a beta-1,3-glucan, with Euglena gracilis. But in the way of a screening for organisms that could use the KFW as a fermentative media other organism show good results. Ashbya gossypii was used to produce vitamin B2 and with Chlorella prothothecoides carotinoides ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and Lutein were produced. Other organism are now looked for. The use of this products in functional food and healthcare is well known and the aim of this research.*

*Diplom Biologe Michael Felski, Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universitätstraße 26, 33602 Bielefeld. E-mail: [paramylon@hotmail.com](mailto:paramylon@hotmail.com)*

Bei der Stärkegewinnung aus Kartoffeln fallen neben der Stärke große Mengen Kartoffel-fruchtwasser (ca. 450.000 t/Jahr) mit einem Feststoffanteil von ca. 5 % an, welches zur Zeit nur zur Düngung von Agrarflächen sinnvoll genutzt wird. Aufgrund der interessanten Inhaltsstoffe des KFW wird nach Möglichkeiten einer besseren Nutzung gesucht. Das Protein daraus könnte für die tierische und menschliche Ernährung aufgearbeitet und das dann proteinarme Rest-KFW als Fermentationsmedium für Mikroorganismen verwendet werden.

Bestimmte Mikroorganismen sind in der Lage Stoffwechselendprodukte zu bilden, die als Zusätze zur Herstellung von Lebensmitteln mit einem gesundheitsfördernden Aspekt (Functional Food, → cholesterinsenkende Stoffe, insulinregulierende Stoffe, Antioxidantien, Vitamine), von Futtermitteln (Biomasse, bzw. Proteine) oder Kosmetika (Antioxidantien, Vitamine), geeignet sind.

Tab. 1: Nährstoffkonzentrationen und pH-Wert in proteinfreiem KFW.

Nährstoffe	Konzentration (mg/l)
Kalzium	10
Kalium	1500
Phosphat	500
Eisen	3
Sulfat	400
Nitrat	10 bis 25
pH-Wert	5,85

Neben Vitaminen, Mineral- und Ballaststoffen wirken auch sekundäre Pflanzenstoffe, wie Farbstoffe in Obst, Gemüse, Algen und Getreide gesundheitsfördernd. Darauf weisen zahlreiche Beobachtungsstudien und Untersuchungen an Tieren und zum Teil am Menschen hin. Sekundäre Pflanzenstoffe tragen dazu bei, das Krankheitsrisiko für Zivilisationserkrankungen, wie Krebs oder Herz-Kreislauf-Krankheiten, zu senken. Sie wirken sich auch günstig auf das Immunsystem, Entzündungen oder auf die Regulation des Blutzuckerspiegels aus. Galten früher viele sekundäre Pflanzenstoffe eher als schädlich, so weisen heute zahlreiche Untersuchungen darauf hin, daß sekundäre Pflanzenstoffe gesundheitsfördernde Wirkungen haben. Sie tragen dazu bei,

- das Krebsrisiko zu senken (antikanzergene Wirkung),
- die Bildung freier Radikale oder anderer schädigender Moleküle zu hemmen (antioxidative Wirkung),
- das Immunsystem zu stärken (immunmodulatorische Wirkung),
- vor Infektionen mit Pilzen, Bakterien und Viren zu schützen (antimikrobielle Wirkung),
- den Cholesterinspiegel zu senken.

Wenn man das von *Euglena gracilis* Klebs (heterotroph) gebildete Paramylon<sup>3</sup> (1,3-beta-Glucan) auch nicht als sekundären Pflanzenstoff bezeichnen kann, so treffen doch die meisten positiven Eigenschaften der sekundären Pflanzenstoffe auch auf das Paramylon zu.

Versuche zur fermentativen Herstellung von 1,3-beta-Glucan durch *Euglena gracilis* Klebs (heterotroph), von Lutein und Carotinoiden ( $\alpha$  und  $\beta$ ) durch *Chlorella prothothecoides*<sup>2</sup> mit KFW als Nährmedium verliefen erfolgversprechend. Als weitere Grünalgen zur  $\beta$ -Carotin-Gewinnung werden zwei *Dunaliella*-Arten untersucht

Riboflavin (Vitamin B2) konnte bereits durch *Ashbya gossypii*<sup>1</sup> produziert und später isoliert werden; weitere Organismen (Hefen, z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) werden derzeit getestet.

Durch den Einsatz diverser Mikroorganismen wird auf diese Weise aus dem bisherigen Reststoff (Abfallstoff) ein wertvoller Grundstoff. Vor einer endgültigen Entsorgung wird somit ein wertschöpfender Schritt eingeschoben.



Abb. 1: *Euglena gracilis* in photoautotropher Form. Chloroplasten sind ausgebildet. Die Flagelle ist gut zu erkennen.

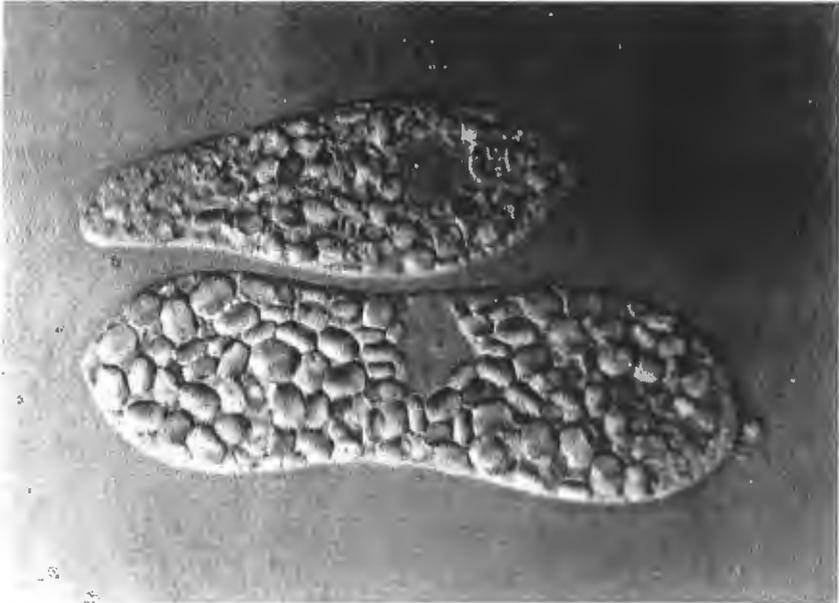


Abb. 2: *Euglena gracilis* in heterotrophem Zustand. Chloroplasten sind zurückgebildet und statt Stärke erscheint Paramylon als Speichersubstanz.

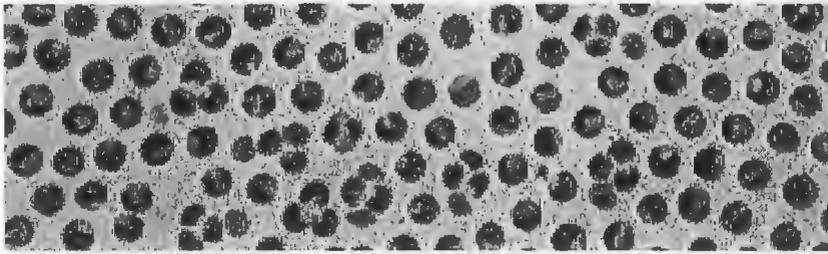


Abb. 3: Mikroskopische Aufnahme von Chlorella-Zellen (Bildung von Lutein).

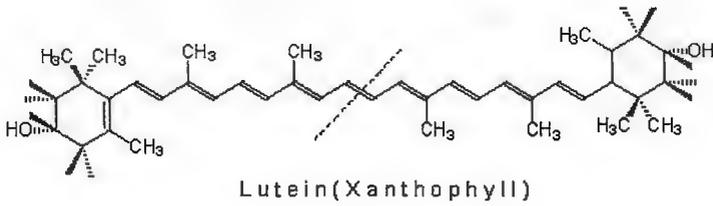


Abb. 4: Strukturformel des aus *Chlorella protothecoides* gewonnenen Luteins.



Abb. 5: Brechungsspektrum von Riboflavin (isoliert aus *Ashbya gossipii*).

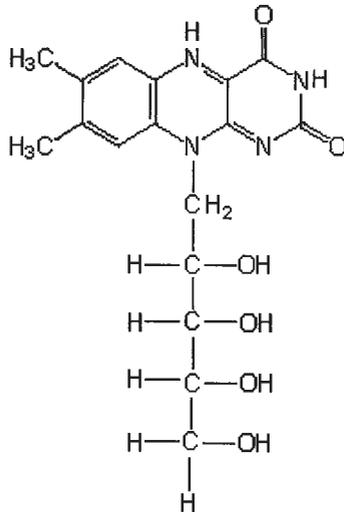


Abb. 6: Strukturformel des aus *Ashbya gossypii* gewonnenen Riboflavins.

#### Literatur

1. MONSCHAU, N., Dissertation Februar 1998, Untersuchungen von Glycin als Vorstufe von Riboflavin in *Ashbya gossypii*, Universität Düsseldorf, Berichte des Forschungszentrums Jülich 3519.
2. SHI, X. M. and CHEN, F., 1999. Production and rapid extraction of lutein and the other lipid-soluble pigments from *Chlorella protothecoides* grown under heterotrophic and mixotrophic conditions. *Nahrung* 43 : 109- 113.
3. JEZEQUEL, V., 1998. Curdlan: A new functional  $\beta$ -Glucan. *Cereal Foods World* 43: 361-363.
4. WAYGOOD et al., 1980 Purification and reclamation of farm and urban wastes by *Euglena gracilis*: photosynthetic capacity, effects of pH, temperature, acetate and whey. *Environmental Pollution (Series A)* 23: 179-215.





## Rheologische und NIR-spektroskopische Untersuchungen an Gerstenmehlen und –stärken

*G. Jansen, W. Flamme*

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen Quedlinburg  
Institut für Streßphysiologie und Rohstoffqualität

### Rheological and NIR-spectrometric investigations on barley meal and –starch

Spring barley crossings and winter barley crossings with increased amylose and amylopectin content were created and because of that barley with new possible uses. Within the framework of breeding in cooperation with Saatzucht Dr.h.c. Carsten, Bad Schwartau an analytic concept was developed including analysis of the raw material, isolation and characterization of starch. The change of the ratio amylose/amylopectin of starch and the swelling properties are determinable with rheological methods (pasting cycle curves of starch and meal and swelling curves of meal). To exclude enzymatic degradation in barley meal enzymes have to be inactivated.

NIR-spectrometric calibrations of kernels, meal and isolated starches were developed and used for prediction of quality parameters.

Gisela Jansen, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Streßphysiologie und Rohstoffqualität, Rudolf-Schick-Platz 3, 18190 Groß Lüsewitz

### Einleitung

Traditionell wird Getreidestärke mit einem Amylose /Amylopektinverhältnis von etwa 25:75 für industrielle Anwendungen eingesetzt. Bei Gersten gibt es jedoch Mutanten, die fast ausschließlich Amylopektin enthalten sowie amylosereiche Mutanten. Diese Mutanten wurden mit aktuellen Sorten gekreuzt und es gelang, leistungsfähiges Zuchtmaterial herzustellen [FLAMME, W. und JACOBI, A.]. Die veränderte Stärkezusammensetzung, kombiniert mit einem relativ hohen  $\beta$  – Glucangehalt, eröffnet neue Märkte für den Einsatz von Gersten, wie z. B. die Nutzung für diätetische Zwecke [LEHMANN, U. u.a.; DONGOWSKI, G. u.a.].

Veränderungen im Amylose / Amylopektinverhältnis führen zu erheblichen Veränderungen im rheologischen Verhalten der Stärken. Im Schrot wird das rheologische Verhalten durch das Vorhandensein von Enzymen stark beeinflusst, so daß ein Rückschluß auf den Amylose- bzw. Amylopektinanteil nur durch eine Inaktivierung der Enzyme möglich ist. Die unterschiedlichen rheologischen Eigenschaften der Gerstenmutanten sollen im folgenden Beitrag dargestellt werden. Weiterhin werden Möglichkeiten des Einsatzes von NIR-spektroskopischen Methoden zur Charakterisierung der Gersten aufgezeigt.

## Material und Methoden

Das Gerstenmaterial stammte von der Saatzucht Dr.h.c. Carsten, Bad Schwartau. Es wurden sowohl die aus der Literatur bekannten Sommergerstenmutanten Waxy Oderbrucker (amylopektinreich) und Hi Ami (amylosereich) und deren Ausgangsformen Oderbrucker und Glacier als auch von der Firma entwickelte leistungsfähige amylose- und amylopektinreiche Wintergerstenkreuzungen untersucht.

Die Gerstenkörner wurden mit einer Fallzählmühle (Fa. Perten Instruments) zerkleinert, die mit einem 0,8 mm Sieb ausgestattet ist.

Die Stärkeisolation erfolgte aus Schrot mit einem Kleberauswaschgerät, kombiniert mit einer Flutenrinne.

Für die Aufnahme von Quell- und Verkleisterungskurven wurde das Rotationsviskosimeter MC 100 der Fa. Physika mit einem Meßsystem MS-ME 3 und genutetem Meßzylinder eingesetzt (FLAMME und JANSEN), wobei für die Verkleisterungskurven 400 mg Gerstenschrot und 4 ml Wasser bzw. 350 mg Gerstenstärke und 4 ml Wasser und für Quellkurven 1,5 g Gerstenschrot und 3,5 ml Wasser suspendiert wurden. Zur Vermeidung des enzymatischen Abbaus bei der Aufnahme von Quell- und Verkleisterungskurven wurde der pH-Wert mit 0,21 %-iger Milchsäure abgesenkt.

Zur Ermittlung der Inhaltstoffe und Eigenschaften von Gerstenschrot kam ein im Nahen Infrarot (NIR) arbeitendes Reflexions- Spektrometer NIRSystems 5000 (Firma Tecator) zum Einsatz.

## Ergebnisse und Diskussion

„Normale“ Gerstenstärken enthalten etwa 20 bis 25 % Amylose bzw. 75 bis 80 % Amylopektin. Bei den Gerstenmutanten kann dieser Wert bis zu 0 % Amylose (100 % Amylopektin) in Waxy-Formen und etwa 40 % Amylose (60 % Amylopektin) in amylosereichen Formen betragen. Diese Änderungen im Amylose- bzw. Amylopektin Gehalt lassen sich gut mit rheologischen Methoden nachweisen. Der Verlauf von Verkleisterungskurven unterschiedlicher Gerstenstärken wurde bereits von GOERING und DEHAAS sowie LORENZ mit einem Brabender-Viskograph aufgenommen. Waxy-Formen zeichnen sich gegenüber „normalen“ Gerstenstärken durch ein höheres Verkleisterungsmaximum sowie eine geringere Verkleisterungstemperatur aus, zeigen jedoch eine geringere Temperatur- und Scherbeständigkeit der Stärkekleister. Amylosereiche Formen haben ein sehr geringes Verkleisterungsmaximum. Dieser charakteristische Verlauf der Verkleisterungskurven konnte an dem von uns untersuchten Material bestätigt werden. Durch den Einsatz des Rotationsviskosimeters mit genutetem Zylinder steht ein Gerät zur Verfügung mit dem echte physikalische Größen gemessen werden und die Untersuchungen konnten mit einer minimalen Probenmenge durchgeführt werden. Abb. 1 zeigt die Verkleisterungseigenschaften der Sommergerstensorten Glacier und Oderbrucker mit normalem Amylosegehalt im Vergleich zur amylosereichen Mutante HiAmi und zur amylopektinreichen Mutante Waxy-Oderbrucker.

Die Kreuzungen der Mutanten mit leistungsstarken Wintergersten sind in Abb.2 dargestellt. Bei den Kreuzungen sind die typischen Eigenschaften der amylopektin- bzw amylosereichen Mutanten ebenfalls unverkennbar. Parallel konnten in den Kreuzungen die Anbaueigenschaften und der Stärkegehalt gegenüber den Mutanten verbessert werden.

Während die Verkleisterungseigenschaften der enzymfreien Stärken klar durch das unterschiedliche Verhältnis von Amylose zu Amylopektin bestimmt werden, beeinflussen im

Schrot hauptsächlich stärkeabbauende Enzyme ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen) den Verlauf der Verkleisterungskurven (Abb. 3). Beim Vergleich von Schrot (Abb.3) und Stärke (Abb.1) verhält sich die Waxy Oderbrucker besonders auffällig. In der Stärke ist eine hohe Kleisterviskosität auf Grund des hohen Amylopektingehaltes vorhanden und im Schrot eine sehr geringe Kleisterviskosität durch eine erhöhte Aktivität der Enzyme, die einen Stärkeabbau bewirken.

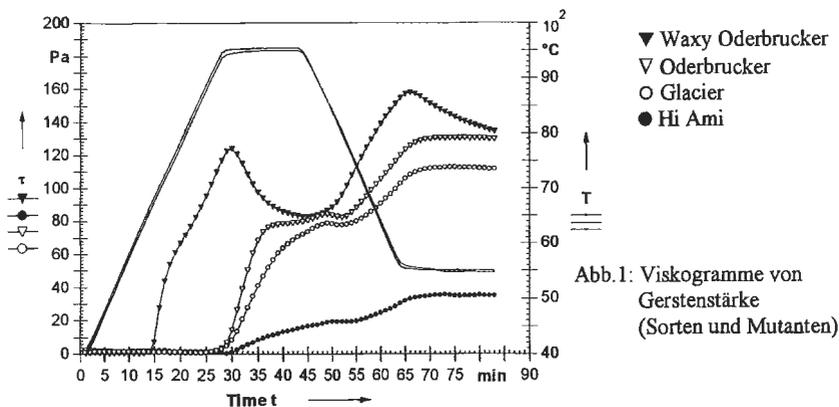


Abb.1: Viskogramme von Gerstenstärke (Sorten und Mutanten)

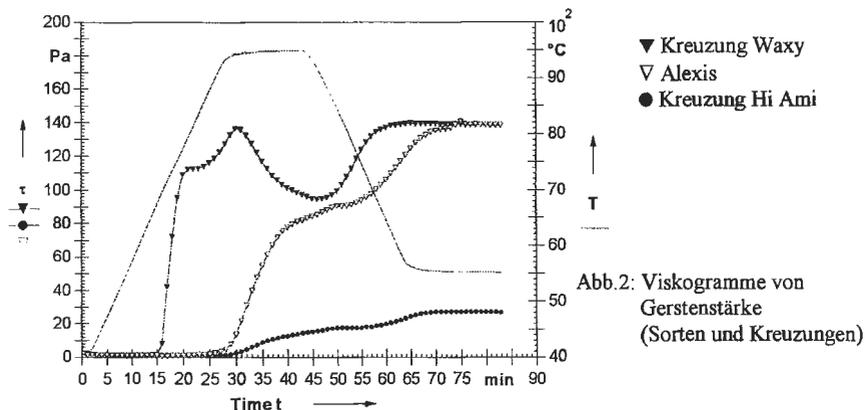


Abb.2: Viskogramme von Gerstenstärke (Sorten und Kreuzungen)

Eine Möglichkeit zur Inaktivierung der Enzyme im Schrot ist die Anwendung verdünnter Säuren bei der Erstellung von Viskogrammen, um auch im Schrot Rückschlüsse auf den vorhandenen Amylose- bzw. Amylopektingehalt ziehen zu können. In sogenannten „Säure“ –

Viskogrammen mit 0,21 %-iger Milchsäure kann man bei einem pH – Wert von etwa 2,6 von einer Inaktivierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen ausgehen. Die in Abb.4 dargestellten Schrot-Viskogramme ähneln in ihrem Verlauf den Stärke-Viskogrammen in Abb.1.

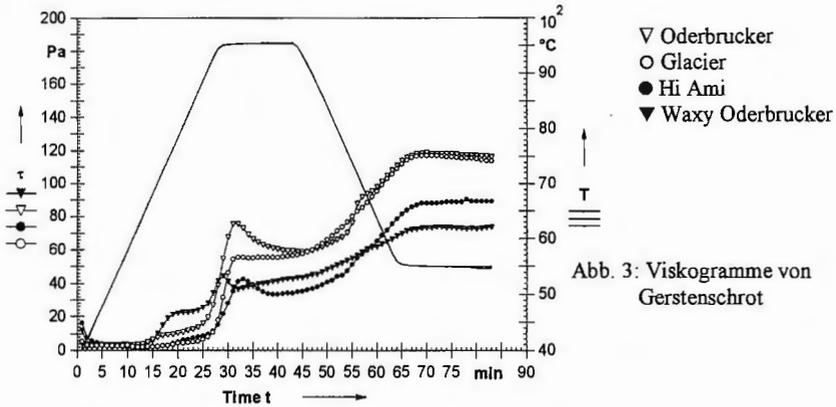


Abb. 3: Viskogramme von Gerstenschrot

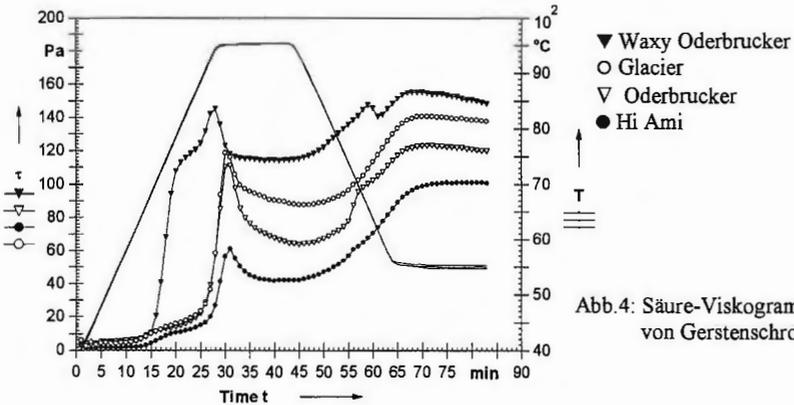


Abb. 4: Säure-Viskogramme von Gerstenschrot

Neben der Stärke sind im Gerstenschrot eine beträchtliche Menge an Nichtstärkepolysacchariden enthalten, sowohl Pentosane (lösliche und unlösliche) als auch  $\beta$ -Glucane. Eine rheologische Erfassung dieser wasserbindenden Quell- und Schleimstoffe ist unterhalb der Verkleisterungstemperatur in sogenannten Quellkurven möglich. In Abb.5 wurde die Quellung mit einer Schrot/Wasser-Suspension durchgeführt und in Abb.6 mit einer Schrot/Säure-Suspension. Die Quelleigenschaften wurden durch Enzyme weniger stark

beeinflusst, da es kaum Unterschiede zwischen den Säure – Quellkurven und den normalen Quellkurven gab. Das Viskositätsmaximum war bei der Waxy Oderbrucker am höchsten und wurde relativ schnell erreicht.

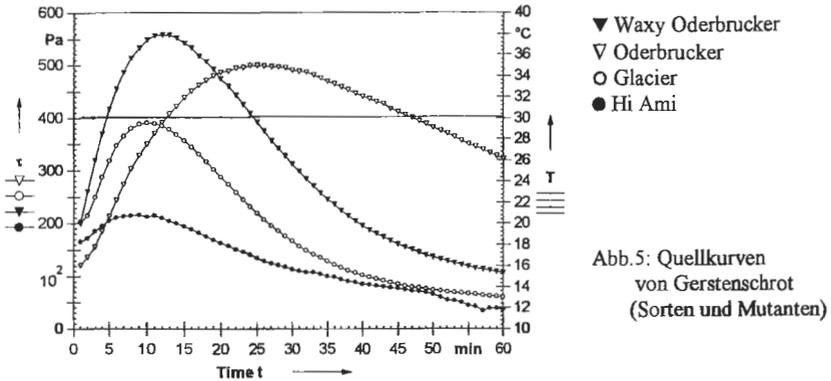


Abb.5: Quellkurven von Gerstenschrot (Sorten und Mutanten)

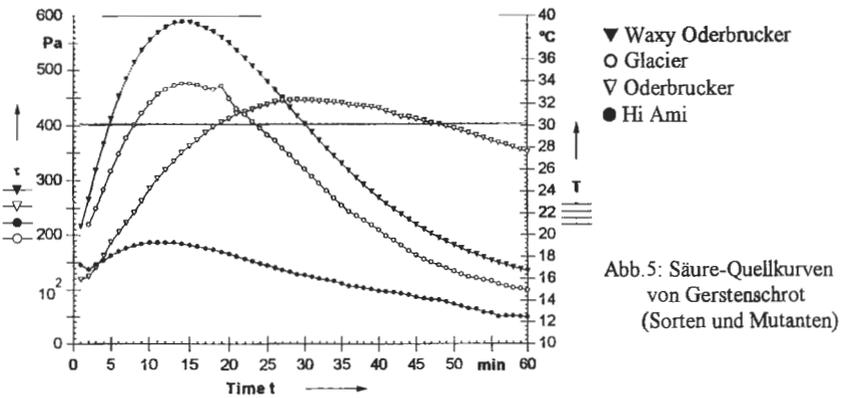


Abb.5: Säure-Quellkurven von Gerstenschrot (Sorten und Mutanten)

Zur schnellen und zerstörungsfreien Ermittlung der Inhaltstoffe und Eigenschaften von Gerstenschrot und Gerstenstärke wurden NIR – Methoden eingesetzt. Für den Gehalt an Feuchte, Protein und Stärke ergaben sich gute Vorhersagemöglichkeiten mit den erstellten Kalibrationen für Vollschrot (Tab.1). Etwas ungenauer sind die Vorhersagen des fluorometrisch bestimmten löslichen  $\beta$ -Glucangehaltes und die aus Schrotspektren vorhergesagten Viskositäten reichen nur zur groben Klassifizierung von Gerstenextrakten. Die NIR – Spektren ermöglichen jedoch eine gute Vorhersage des l.

Verkleisterungsmaximums (Rheogramm) und Amylosegehaltes. Für den Amylosegehalt lassen sich eindeutige Cluster für Waxy-, Normal- und amylosereiche Formen ausweisen.

Tab. 1: Charakteristik der MPLSR-Kalibration von NIR-Spektren (Sommergerstenschrote der Ernte 1995-1996-1997)

Inhaltsstoff	Bereich	Mittelwert	SEP	r
Feuchte	7,35 – 11,90	9,47	0,280	0,973
Protein	10,08 – 18,41	12,63	0,168	0,995
Stärkegehalt	48,66 – 65,75	56,40	0,787	0,975
Extrakt-viskosität	37,24 – 191,07	86,27	17,250	0,894
Rheogramm	8,00 – 151,00	77,67	13,890	0,919
lösliche $\beta$ -Glucane	2,87 – 5,84	4,376	0,280	0,941
Amylose	0,16 – 31,30	21,54	3,030	0,946

## Literatur

- DONGOWSKI, G.; HUTH, M.; GEBHARDT, E.; FLAMME, W.; FRENZ, U.: Effects of barley products on physiological parameters in rats. ICC Conference 06.-09.06.1999, Valencia, Spanien, Abstracts Book, 1999, S. 29
- GOERING, K.J., and DeHAAS, B. 1974: A comparison of the properties of large- and small-granule starch isolated from several isogenic lines of barley. *Cereal Chem.* 51, 573-578
- LEHMANN, U.; SCHMIEDL, D., JACOBASCH, G.; SCHMEHL, K.; FLAMME, W.: Structure and biological functions of resistant starches developed from waxy wheat, barley starch and other sources. ICC Conference, 06.-09.06.1999, Valencia, Spanien, Abstracts Book, 1999, S. 35
- LORENZ, K. 1995: Physicochemical characteristics and functional properties of starch from a high  $\beta$ -glucan waxy barley. *Starch/Stärke* Nr. 1, 14-18
- FLAMME, W. and JANSEN, G.: A new method to measure gelatinization and pasting properties with low amounts of cereal meal and starch. *Nahrung* 1997, 41, Nr.4, 241-242
- FLAMME, W. und JACOBI, A.: Erstellung von in ihren Anbaueigenschaften verbesserten Gerstengenotypen mit verändertem Amylose-/Amylopektingehalt und analytischer Vergleich ihrer Stärken im Hinblick auf ihre spätere industrielle Verwertung. Abschlussbericht Forschungsvorhaben: G 64/94 – AiF-Nr. 10028B, 1997



## Neue HPLC und HPLC/MS Methoden zur Bestimmung von Tocopherolen in Pflanzen und Phytopharmaka

W.M. Stögg<sup>1</sup>, C.W. Huck<sup>1</sup>, M. Popp<sup>2</sup>, H. Scherz<sup>3</sup>, G.K. Bonn<sup>1</sup>

- 1 Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens University, Innrain 52a, 6020-Innsbruck, Austria
- 2 Bionorica GmbH, Kerschensteinerstr. 11-15, 92318 Neumarkt/Oberpfalz, Deutschland
- 3 Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Lichtenbergerstr. 4, 85748-Garching, Deutschland

### *Topical HPLC and HPLC/MS Methods for the Determination of Tocopherols in Plants and Phytopharmaceuticals*

*Tocopherols are important lipid antioxidants occurring ubiquitously in plants. They are essential for human health and also show promising effects as preventive therapeutic agents against infectious and chronic diseases. As products containing vitamin E are becoming more and more important we have established a new normal-phase (NP) and reversed-phase (RP) high-performance liquid chromatographic (HPLC) system for a rugged and more efficient qualitative and quantitative analysis of vitamin E using UV-detection at 295 nm or fluorescence-detection ( $\lambda_{ex}=295$  nm;  $\lambda_{em}=330$  nm). For this end fluorescence-detection proved to be ten times more sensitive than UV-absorption detection. For the analysis of vitamin E in complex sample matrices both HPLC systems were coupled to a mass spectrometer by an atmospheric-pressure ionization interface (APCI). Additionally collisionally induced dissociation (CID) was used for identifying compounds of interest.*

### *Address correspondence to:*

*Wolfgang Stögg, Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens University, Innrain 52a, 6020-Innsbruck, Austria, Tel.: 0043 512 507 5196, Fax: 0043 512 507 2965; E-Mail: Wolfgang.Stoegg@uibk.ac.at*

## Übersicht

Tocopherole sind bedeutende Antioxidantien, die weitverbreitet in Pflanzen vorkommen. Sie spielen eine essentielle Rolle für die Gesundheit und zeigen positive Wirkungen vorbeugend gegen Infektionen und chronische Erkrankungen (1). Daher kommt Phytopharmakas und Nahrungsergänzungsmitteln, die Vitamin E enthalten, immer mehr Bedeutung zu. Zur Bestimmung von Tocopherolen wurde eine Reihe analytischer Methoden entwickelt (2). Heutzutage werden hochleistungsflüssigkeitschromatographische (HPLC) Methoden aufgrund der kurzen Analysenzeiten, leichten Bedienbarkeit, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit

bevorzugt (3). Das Ziel dieser Arbeit war, neue HPLC-Methoden für eine effizientere Analyse von Tocopherolen zu etablieren und Detektionsmethoden zu vergleichen. Ein Vergleich der etablierten normal-Phasen (NP) HPLC-Methode auf Silikagel unter Verwendung eines Isooktan-Diisopropylether-1,4-Dioxan (95/4/1 v/v/v) Eluenten mit der etablierten Umkehrphasen-(RP) HPLC-Methode auf Silika C<sub>18</sub> unter Verwendung von Methanol als Eluent zeigte, dass eine höhere Auflösung mit dem Normalphasensystem erzielt werden kann. Die Detektion der Tocopherole erfolgte aufgrund deren UV-Absorption bei 295 nm bzw. deren Eigenschaft zu fluoreszieren ( $\lambda_{ex}$ =295 nm;  $\lambda_{em}$ =330 nm). Fluoreszenzdetektion erwies sich als selektiver und um einen Faktor zehn empfindlicher als UV-Detektion. Für die Detektion der Tocopherylester wurde ein Diodenarraydetektor (DAD) verwendet. Für die Bestimmung von Vitamin E in komplexen Probenmatrices wurden sowohl das Normalphasen- als auch das Umkehrphasensystem durch ein Atmosphärendruckionisationsinterface (APCI) mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelt. Dabei erwies sich die Umkehrphasen-HPLC Methode als empfindlicher. Kollisionsinduzierte Zersetzung (CID) in der Ionenquelle wurde zur Aufnahme von Fragmentierungsreaktionen verwendet, um eine Identifizierung aufgrund des charakteristischen Fingerprints zu ermöglichen. Die beschriebenen Verfahren ermöglichen eine effizientere und empfindlichere Trennung von Tocopherolen - auch in sehr komplexen Probenmatrices.

## Einleitung

Die Bezeichnung Vitamin E sollte als allgemeiner Begriff für alle Tocol- und Tocotrienolderivate, die eine biologische Aktivität wie  $\alpha$ -Tocopherol aufweisen, verwendet werden. Bisher sind 8 vitaminwirksame Verbindungen der Vitamin E Gruppe, die in der Natur vorkommen bekannt. Sie bestehen aus einem 6-Chromanol Grundgerüst und einer C<sub>16</sub> Seitenkette. Als übergeordneten Begriff der Tocopherole und Tocotrienole findet man auch Tocochromanole. Die Seitenkette der Tocotrienole ist dreifach ungesättigt. Die jeweils vier Vertreter der beiden Gruppen unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanolring (**Abbildung 1**).

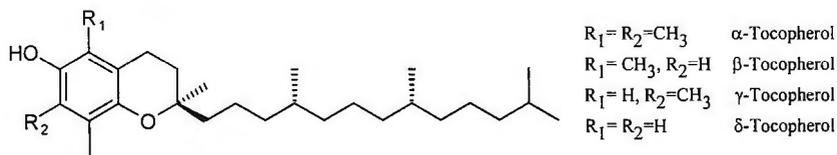


Abbildung 1 Struktur der frei vorkommenden Tocopherole

Bereits frühe Untersuchungen erkannten, dass  $\alpha$ -Tocopherol *in vivo* wahrscheinlich als Antioxidans wirkt (4). Allerdings ist die biologische Wirkungsweise der Verbindungen mit Vitamin E Aktivität bis heute nicht eindeutig überschaubar. Der Ort der biologischen Wirkung des Vitamin E liegt in den verschiedenen zellulären Membranen. Bedingt durch die Struktur kommt es zu einer Stabilisierung der Membran und zum Schutz vor Oxidation. Die antioxidative Wirkung lässt sich auf die phenolische Hydroxygruppe am aromatischen Ring der Tocopherole und Tocotrienole zurückführen. Beim komplexen Vorgang der Oxidation können sie Radikale inhibieren und somit die Kettenreaktion unterbrechen. Somit kommt Vitamin E eine antikanzerogene Bedeutung zu. Seit 1973 wurde eine ganze Reihe an

isokratischen und Gradienten-HPLC-Trennverfahren entwickelt. In der vorliegenden Arbeit werden erstmals anhand speziell entwickelter Normalphasen- und Umkehrphasen-HPLC-Systeme die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten wie UV-Absorptions-, Fluoreszenz- und massenspektroskopischer Detektion diskutiert.

## Material und Methoden

*Chemikalien und Materialien:* Methanol (gradient grade), Diisopropylether (p.a.) und 1,4-Dioxan (p.a.) wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das Wasser (bidest.) wurde durch eine Nano-Pure Einheit (Barnstead, Boston, MA, USA) aufbereitet. 2,2,4-Trimethylpentan (Isooktan, HPLC grade) und die Tocopherole stammten von Sigma Aldrich (Wien, Österreich).

*Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):* Bei dem für die Normalphasen-HPLC verwendeten System handelte es sich um ein zusammengebautes System bestehend aus zwei Niederdruckgradientenpumpen (Modell 510, Waters, Milford, MA, USA), einem automatischen Probenaufgeber (Modell 712 WISP, Waters), einem Fluoreszenzdetektor (Modell 474, Waters) mit eingebauter 16  $\mu\text{l}$  Flusszelle, und einem UV-Detektor (Modell 486, Waters) mit eingebauter 8  $\mu\text{l}$  Flusszelle. Als Säule wurde eine Chromcart CC250/4 Nucleosil 50-5 (5  $\mu\text{m}$ , 50  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  4 mm ID) mit einer 8  $\times$  4 mm ID Nucleosil 50-5 Vorsäule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) bzw. eine Hypersil Silica 120-5 (5  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ , 100  $\times$  2.1 mm ID) (Hypersil, Runcorn, England) verwendet. Die Thermostatisierung erfolgte durch ein Wasserbad.

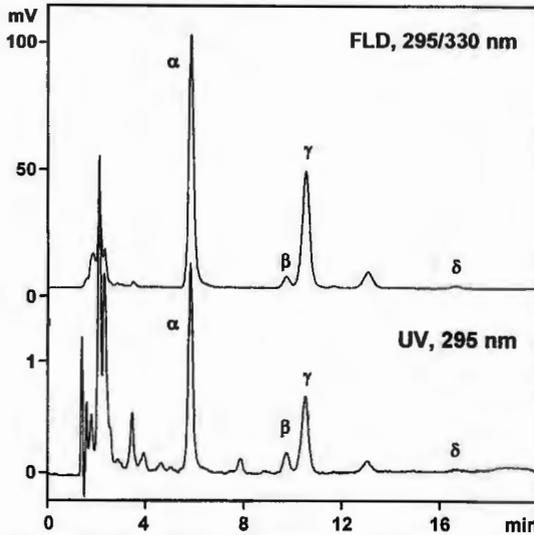
Für die umkehrphasenchromatographischen Trennungen wurde ein Niederdruckgradientensystem (Modell 616, Waters) gesteuert von einem Controller (Modell 600S, Waters), einem automatischen Probenaufgeber (Modell 717 plus, Waters), einem Photodiodenarraydetektor (Modell 996, Waters) verwendet. Als Säule diente eine Phenomenex (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  2 mm ID) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) bzw. eine Hypersil BDS-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  1 mm ID) (Grom, Herrenberg-Kayh, Deutschland). Die Thermostatisierung erfolgte durch einen externen Säulenofen (Modell TC 1900 HPLC Temperaturkontroller, ICI, Welshpool, Australien).

*Atmosphärendruckionisations-Massenspektrometrie (APCI-MS) gekoppelt mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):* Für HPLC-MS/MS Experimente wurde ein Niederdruckgradientenpumpensystem (Modell Rheos 2000, Flux, Karlskoga, Schweden), ein Entgaser (Knauer, Berlin, Deutschland), ein Mikroinjektor (Modell CC00030, Valco, Houston, TX, USA) mit einer 5  $\mu\text{l}$  Ladeschleife und ein variabler Wellenlängendetektor (Modell Linear UV-VIS 200, Linear Instruments, Fremont, CA, USA) mit einer 1.2  $\mu\text{l}$  Flusszelle verbunden mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Modell LCQ, Finnigan, San Jose, CA, USA) verwendet.

*Probenaufbereitung:* Die Aufbereitung der einzelnen Proben wurde in Anlehnung an die Literatur durchgeführt (5,6).

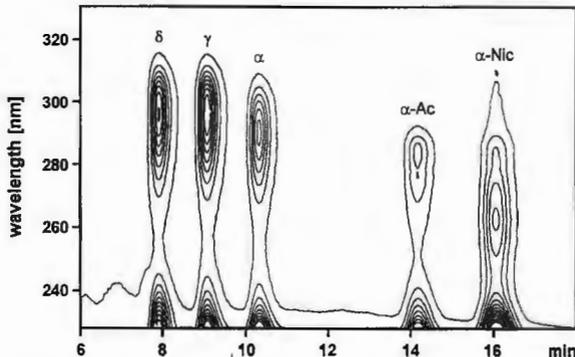
## Ergebnisse und Diskussion

Tocopherole wurden nach erfolgter Normalphasentrennung in verschiedenen Probenmatrices mittels UV-Absorptions und Fluoreszenzdetektion bestimmt (**Abbildung 2**). Dabei erwies sich die Fluoreszenzdetektion um einen Faktor zehn empfindlicher.



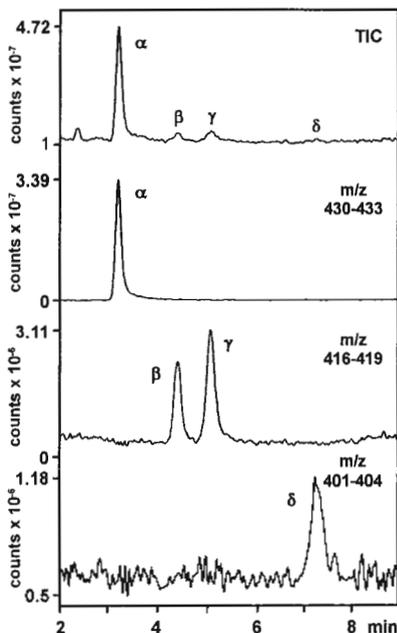
**Abbildung 2** Normalphasen-HPLC Bestimmung der Tocopherole im Erdnussextrakt unter Verwendung der Fluoreszenz- und UV-Absorptions-Detektion  
 Säule, Chromcart CC250/4 Nucleosil 50-5 (5  $\mu\text{m}$ , 50  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  4 mm ID) mit einer 8  $\times$  4 mm ID Nucleosil 50-5 Vorsäule; Mobile Phase, Isooktan/1,4-Dioxan (97/3 v/v); Flussrate, 2 ml/min; Temperatur, 30°C; Detektion, FLD, 295/330 nm und UV, 295 nm.

Im Falle der Umkehrphasen-HPLC erfolgte die Elution der Tocopherole in der umgekehrten Reihenfolge. Für die Bestimmung der Tocopherylester wurde ein Photodiodenarraydetektor verwendet, da diese kaum fluoreszieren und deren UV-Absorptions Maxima bei unterschiedlichen Wellenlängen liegen (**Abbildung 3**).

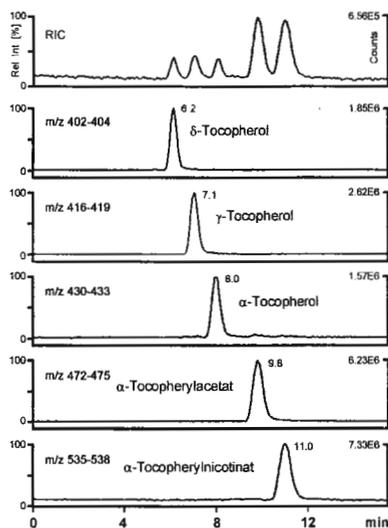


**Abbildung 3** Isolinienplot der Umkehrphasen-HPLC Bestimmung eines Standardgemisches bestehend aus drei Tocopherolen ( $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ),  $\alpha$ -Tocopherylacetat und Nicotinat unter Verwendung der Photodiodenarraydetektion.  
 Säule, Phenomenex Luna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  2 mm ID); Mobile Phase, Methanol; Flussrate, 0.3 ml/min; Temperatur, 25°C; Detektion, DAD, 230-330 nm.

Schließlich wurden sowohl das Umkehrphasen- als auch das Normalphasen-HPLC-System mittels eines Atmosphärendruckionisationsinterfaces (APCI) an ein Massenspektrometer (MS) gekoppelt. Dadurch konnte eine wesentlich selektivere Bestimmung der Tocopherole - speziell in sehr komplex zusammengesetzten Probenmatrices durchgeführt werden. Dabei zeigte das Normalphasensystem (**Abbildung 4**) eine um den Faktor zehn geringere Empfindlichkeit als das Umkehrphasensystem (**Abbildung 5**).



**Abbildung 4** Normalphasen (NP)-HPLC-APCI-MS Bestimmung eines Standardgemisches bestehend aus vier Tocopherolen (α, β, γ, δ). Säule, Hypersil 120-5 (5 μm, 120 Å, 100 × 2.1 mm ID); Mobile Phase, Isooktan/1,4-Dioxan (97/3 v/v); Flussrate, 0.2 ml/min; Temperatur, 25°C.



**Abbildung 5** Umkehrphasen (RP)-HPLC-APCI-MS Bestimmung eines Standardgemisches bestehend aus drei Tocopherolen (δ, γ, α), α-Tocopherylacetat und Nicotinat. Säule, Hypersil BDS C18 (3 μm, 130 Å, 250 × 1 mm ID); Mobile Phase, Methanol; Flussrate, 80 μl/min; Temperatur, 25°C.

Die Trennung aller Komponenten erfolgte dabei in weniger als zwölf Minuten. Schließlich wurden die Nachweisgrenzen der Tocopherole unter Verwendung der unterschiedlichen Detektionsmethoden verglichen (**Tabelle 1**). Das niedrigste Detektionslimit wurde dabei für α-Tocopherol bei 120 femtomol gefunden. Im Falle der Kopplung HPLC-APCI-MS wurde für jedes Tocopherol ein unterschiedliches Detektionslimit gefunden.

**Tabelle 1** Nachweisgrenzen der Tocopherole, Verhältnis Signal zu Rauschen = 3

	NP-UV	NP-FLD	RP-DAD	
Tocopherol	2,5 ng	0,25 ng	2 ng	

	NP-APCI-MS		RP-APCI-MS	
$\alpha$ -Tocopherol	2,5 ng	5,8 pmol	50 pg	120 fmol
$\beta$ -Tocopherol	10 ng	24 pmol	1,0 ng	2,5 pmol
$\gamma$ -Tocopherol	10 ng	24 pmol	1,0 ng	2,5 pmol
$\delta$ -Tocopherol	60 ng	150 pmol	5,4 ng	13 pmol

### Schlussfolgerungen

Die vorgestellten Umkehrphasen- und Normalphasen-HPLC Methoden unter Verwendung verschiedener Detektionsmethoden erlauben eine effizientere und empfindlichere Bestimmung von Tocopherolen auch in sehr komplexen Probenmatrices.

### Literaturverzeichnis

- 1 Machlin, Handbook of Vitamins, 2. Auflage, Marcel Dekker, New York, 1991
- 2 D.B. Parrish, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 13 (1980) 161-187.
- 3 P.J. Van Niekerk, R. Macrae (Editor), HPLC in Food Analysis, 2. Auflage, Academic Press, London, 1998, 144-152.
- 4 H.S. Olcott, H.A. Matill, Chemical Reviews, 29 (1941) 257.
- 5 V. Piironen, P. Varo, E.-L. Syväoja, K. Salminen, P. Koivistoinen, Internat. J. Vit. Nutr. Res., 53 (1983) 41-46.
- 6 C.J. Hogarty, C. Ang, R.R. Eitenmiller, Journal of Food Composition and Analysis, 2 (1989) 200-209.



## Quantitative-Nah-Infrarot-Transflexions-Spektroskopie (NIRS) Untersuchungen am Rotwein

W. Guggenbichler<sup>1</sup>, G. Stecher<sup>1</sup>, C.W. Huck<sup>1</sup>, N. Basener<sup>2</sup>, G.K. Bonn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Analytische Chemie und Radiochemie, Leopold-Franzens Universität Innsbruck, Innrain 52a, 6020 Innsbruck, Österreich

<sup>2</sup> DuPont Performance Coatings, Märkische Straße 243, 42281-Wuppertal, Deutschland

### *Quantitative Near-Infrared-Transflectance-Spectroscopy (NIRS) of Red Wine*

*Point of resresearch is a series of red wines from different vines. Several clinical studies have shown that phenolic compounds are responsible for health benefits. Therefore a fast and rugged analytical method for the routine analysis of those compounds and other tanning substances is desired. Near infrared transflectance spectroscopy (NIRS) offers the possibility to determine physiological active compounds like resveratrol, flavonoids (e.g. quercetine) and to control the solvent composition at the same time, wehereas the analysis times are very short (only a few seconds). Normally, the content of wine ingredients is determined by reversed-phase (RP) high-performance liquid chromatography (HPLC), which in our case provides the reference data for the NIRS-determination. The NIRS calibration step is time consuming, which is compensated by very short analysis times after validation of the established method. The described analytical-spectroscopic method is therefore to raise the efficiency in high quality red wine analysis for the wine manufacturing.*

*Address correspondence to: Dr. Christian Huck, Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens-University Innsbruck, Innrain 52a, 6020-Innsbruck Austria, Tel.: 0043 512 507 5195 , Fax: 0043 507 2965 , EMail: christian.w.huck@uibk.ac.at*

### Übersicht

Ziel der Untersuchungen ist eine Serie von Rotweinen, die von verschiedenen Reben stammen. Wie verschiedene Studien gezeigt haben, sind phenolische Verbindungen verantwortlich für die positiven Wirkungen auf das Gesundheitssystem (1). Daher ist eine schnelle und stabile Analysenmethode von Weininhaltsstoffen sehr wichtig. Die Nah-Infrarot-Transflexions-Spektroskopie (NIRS) bietet die Möglichkeit, den Gehalt physiologisch aktiver Komponenten wie Resveratrol, Flavonoide (z.B. Quercetin) und die Lösungsmittelzusammensetzung durch eine einzige Messung zu bestimmen. Auf konventionellem Wege werden Inhaltsstoffe im Rotwein mittels Umkehrphasen-(RP)-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Diese Methode dient als Referenzmethode zur Kalibrierung des NIR-Spektrometers (2). Die Kalibrierung des NIR-Spektrometers ist sehr aufwendig. Dieser Zeitaufwand wird sehr schnell durch die sehr

kurzen Analysenzeiten von nur wenigen Sekunden für eine Bestimmung relativiert. Zu diesem Zweck wurden die Spektren von 60 unterschiedliche Rotweinchargen über einen Wellenlängenbereich von 4008 bis 9996  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Auflösung von 12  $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen. Dabei wurden 10 Scans für die Berechnung eines Mittelwertspektrums aufgenommen. Alle aufgenommenen Spektren wurden einer chemometrischen Behandlung (Normalisierung, Berechnung der 1. bzw. 2. Ableitung) im PLS- oder PCR-Modell unterzogen. Die Qualität der angewandten chemometrischen Methode wurde durch die statistischen NIR Parameter ( $r^2$ , SEE, SEP, BIAS) beurteilt. Um eine maximale Reproduzierbarkeit zu erzielen wurden die Temperatur und die optische Weglänge (0.5, 1.5 und 3 mm) optimiert. Die etablierte analytisch-spektroskopische Methode erlaubt es Weininhaltsstoffe sowie die Lösungsmittelzusammensetzung innerhalb weniger Sekunden zu bestimmen.

## Einleitung

Die Nah-Infrarot-Transflexions-Spektroskopie (NIRS) spielt eine bedeutende Rolle in der Wareingangskontrolle sowie bei der Überwachung von Produktionsprozessen. Bei der NIRS handelt es sich um eine schnelle und stabile analytisch-spektroskopische Methode, die von einer hochentwickelten Software zur Berechnung der Hauptkomponentenanalyse (PCR) oder zur Berechnung der geringsten quadratischen Abweichung (PLS) dient (3). NIRS ist eine nicht-destruktive Methode, welche die Möglichkeit bietet, physikalische und chemische Eigenschaften gleichzeitig zu bestimmen. Für eine stabile Kalibrierung des NIR-Spektrometers empfiehlt es sich, Proben mit starker Streuung heranzuziehen. Phenolische Komponenten sind im allgemeinen dafür bekannt, antiallergische, entzündungshemmende und anticancerogene Eigenschaften zu besitzen (4). In dieser Arbeit wird eine NIR-Methode vorgestellt, die es ermöglicht, den Gehalt an phenolischen Komponenten und die Lösungsmittelzusammensetzung quantitativ zu bestimmen.

## Materialien und Methoden

*Standards:* Resveratrol und Flavonoide stammen von Sigma Aldrich (Wien, Österreich), Lösungsmittel von Merck (Darmstadt, Deutschland). Bei den Rotweinen handelt es sich um 60 Weine verschiedener Herkunft.

*Hochleistungsflüssigkeitschromatographie:* Für die umkehrphasenchromatographischen Trennungen wurde ein Niederdruckgradientensystem (Modell 616, Waters) gesteuert von einem Controller (Modell 600S, Waters), einem automatischen Probenaufgeber (Modell 717 plus, Waters), einem Photodiodenarraydetektor (Modell 996, Waters) verwendet. Als Säule diente eine Hypersil BDS- $\text{C}_{18}$  (3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 125  $\times$  4 mm ID, Crom, Herrenberg-Kayh, Deutschland) mit einer 5  $\times$  4 mm ID Vorsäule. Die Thermostatisierung erfolgte durch ein Wasserbad.

*Gaschromatographie-FID:* Die Bestimmung des Ethanolgehaltes erfolgte mit einer HP1 Silicasäule (50  $\times$  0.32 mm ID); Gas, Wasserstoff 0.7 bar; Injektortemperatur, 30°C; Temperaturgradient, 50°C (4 min) auf 220°C (8°C/min) und auf 300°C (20°C/min); Detektortemperatur, 300°C; Split, 35 ml/min 1:120; Probenvolumen, 5  $\mu\text{l}$ .

*Karl-Fischer Titration:* Der Wassergehalt wurde von je 20  $\mu\text{l}$  jeder Charge mit einem 684 KF Coulometer (Metrohm, Filterstadt, Deutschland) bestimmt.

*FT-NIRS:* Die NIR-Spektren wurden mit einem FT-NIR Spektrometer (Büchi, Uzwil, Schweiz) über einem Wellenlängenbereich von 4008 bis 9996  $\text{cm}^{-1}$ , mit einer Auflösung von 12  $\text{cm}^{-1}$  im Transflexionsmodus aufgenommen. Zehn Scans wurden zur Berechnung eines Mittelwertspektrums herangezogen.

## Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt die NIR-Spektren von verschiedenen Rotweinen. Durch mathematische Behandlung der Spektren und statistische Beurteilung konnte eine Kalibriergerade zur Bestimmung des Wassergehaltes mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.94 erstellt werden. Um eine entsprechend stabile Kalibrierung zu erhalten wurden auch Weine mit aufgenommen, die kurz vor dem „Umkippen“ waren. Als Referenzmethode diente hierzu die Karl-Fischer Titration (Abbildung 2).

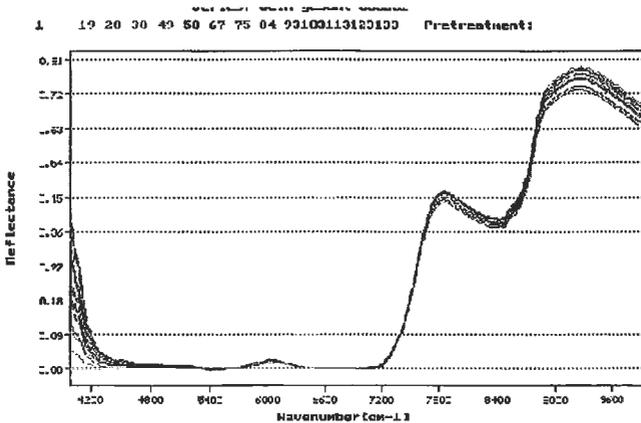


Abbildung 1 NIR-Spektren von verschiedenen Rotweinen

Die Erstellung einer Kalibriergerade für die Bestimmung des Ethanolgehaltes erfolgte nach demselben Prinzip. Dabei wurde eine Korrelation von 0.98 erhalten (Abbildung 3). Die Bestimmung des Ethanolgehaltes erfolgte gaschromatographisch. Nachdem die Temperatur einen direkten Einfluß auf die im nahen Infrarotbereich auftretenden Ober- und Kombinationsschwingungen besitzt, wurden die Spektren bei einer konstanten Temperatur von 22°C aufgenommen. Evaluierung der optischen Schichtdicke ergab ein Korrelationsmaximum für die Bestimmung der Lösungsmittelzusammensetzung bei 3 mm.

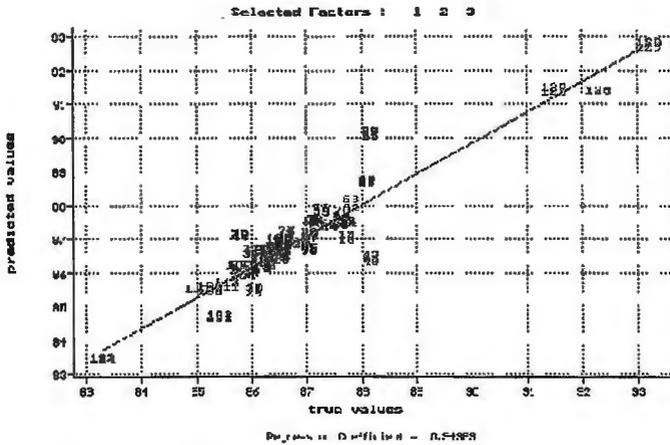


Abbildung 2 Kalibriergerade zur Bestimmung des Wassergehaltes

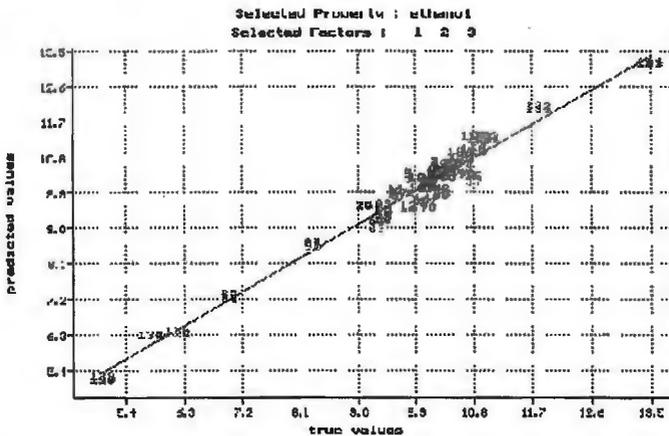
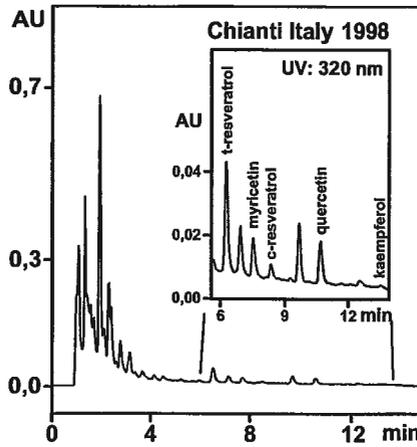


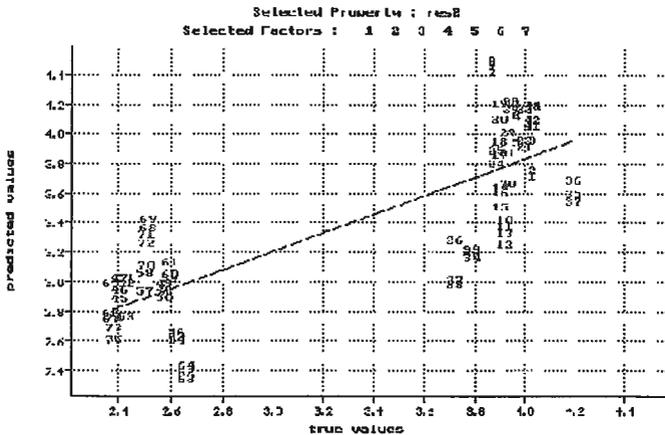
Abbildung 3 Kalibriergerade zur Bestimmung des Ethanolgehaltes

Schließlich wurden alle Rotweine einer Trennung mittels Umkehrphasen-HPLC unterzogen, welche zur Bestimmung phenolischer Komponenten etabliert worden war (Abbildung 4). Die Bestimmung nahm insgesamt eine Laufzeit von 12 Minuten in Anspruch. Nach erfolgter Kalibrierung des NIR-Spektrometers für Resveratrol mit einer Korrelation von 0.79 war es möglich eine quantitative Bestimmung des Resveratrolgehaltes innerhalb nur weniger Sekunden durchzuführen (Abbildung 5). An der Kalibrierung anderer phenolischer Komponenten im Rotwein wie Quercetin etc. wird zur Zeit gearbeitet.



**Abbildung 4** Umkehrphasen-HPLC Bestimmung von phenolischen Verbindungen (Resveratrol) und Flavonoiden im Rotweinextrakt

Säule, Hypersil BDS C<sub>18</sub> (3 µm, 100 Å, 125 × 4 mm ID) mit einer 5 × 4 mm ID Vorsäule; Mobile Phase; A=Bidest (900 g), Methanol (79 g), Phosphorsäure (10 ml); B=Bidest (600 g), THF (267 g), Methanol (79 g), Phosphorsäure (10 ml); Gradient, 50-83.3%B in 10 min, 50%B in 11 min; Flußrate, 1 ml/min ; Temperatur, 50°C; Detektion, UV, 320 nm (trans-Resveratrol), 280 nm (cis-Resveratrol), 377 nm (andere Flavonoide).



**Abbildung 5** Kalibriergerade für die Bestimmung des Resveratrolgehaltes

Der dreidimensionale Faktorenplot in **Abbildung 6** zeigt die Auftrennung verschiedener Rotweine in mehrere Wolken mit unterschiedlichem Wasser- und Ethanolgehalt. Daraus kann entnommen werden, daß eine effiziente Quantifizierung des Lösungsmittelgehaltes möglich ist.

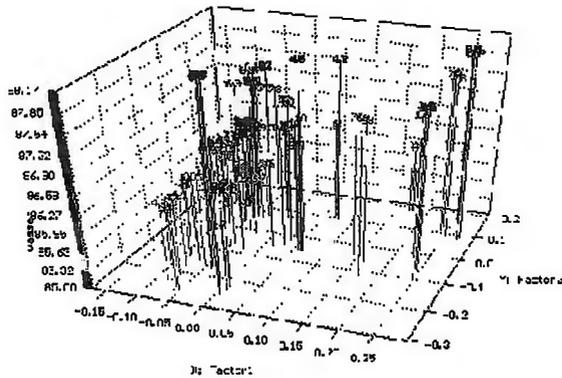


Abbildung 6 Dreidimensionaler Faktorenplot für Rotweine

### Schlußfolgerungen

Das vorgestellte NIRS-Modell erlaubt es, die Lösungsmittelzusammensetzung und den Gehalt an phenolischen Komponenten innerhalb weniger Sekunden mit hoher Genauigkeit anzugeben und stellt somit eine interessante Alternativmethode für die Qualitätskontrolle in der Weinindustrie dar.

### Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> C.R. Pace-Asok, S. Hahn, E.P. Diamandis, G. Soleas, D.M. Goldberg, *Clinica Chimica Acta*, 235 (2) (1995) 207
- <sup>2</sup> G. Stecher, C.W. Huck, M. Popp, G.K. Bonn, Evaluation of Detection Methods for the HPLC Determination of Stilbenes and Flavonoids, Poster bei der XXXV. Vortragstagung
- <sup>3</sup> H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons Inc., Chichester (1989)
- <sup>4</sup> M. Gabor, *The Pharmacology of Benzopyrone Derivatives and Related Copounds*, Akademiai Kiado, Budapest, (1986)



## Vergleich und Bewertung verschiedener Detektionsmethoden für die HPLC-Bestimmung von Stilbenen und Flavonoiden in Rotwein

G. Stecher<sup>1</sup>, C. W. Huck<sup>1</sup>, M. Popp<sup>2</sup>, G. K. Bonn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Analytische Chemie und Radiochemie, Universität Innsbruck  
<sup>2</sup> Bionorica/Plantamed GmbH, D-92318 Neumarkt-Oberpfalz

### *Evaluation of Detection Methods for the HPLC Determination of Stilbenes and Flavonoids:*

*The objective of the present study was to find out the best detection method for the determination of the stilbene resveratrol and several flavonoids like quercetin, myricetin and kaempferol in red wine. For this purpose an HPLC method for an efficient separation of wine ingredients was established and furthermore UV-detection was compared with fluorescence- and mass-spectrometric detection. The plot of peak area versus concentration showed for all calibration standards good linearity ( $r^2 \geq 0,999$ ). Retention- times of standards, UV-spectra, mass to charge ratio and fragmentation pathways were used for identifying the phenolic structures in red wine.*

Mag. Günther Stecher, Institute of Analytical Chemistry und Radiochemistry, Leopold-Franzens University of Innsbruck, Innrain 52a, A-6020 Innsbruck. [Günther.Stecher@uibk.ac.at](mailto:Günther.Stecher@uibk.ac.at)

Verschiedene klinische Studien konnten in den letzten Jahren belegen, daß Alkohol und phenolische Verbindungen wie Stilbene und Flavonoide für die gesundheitsfördernde Wirkung des Rotweins verantwortlich sind (1,2). Besonders die positive Wirkung von Resveratrol und Quercetin auf Herz und Kreislaufsystem, und somit ihre präventive Wirkung vor Herzinfarkt werden hervorgehoben (3,4,5). Andererseits werden auch antikanzerogene Eigenschaften dieser Verbindungen diskutiert. So konnte für Resveratrol eine hemmende Wirkung in allen 3 Krebsstadien, also während der Initiation, Promotion und Progression bestimmter Krebsarten wie Prostata- (6) und Brustkrebs (7) und gegen Krebs im Mund- und Rachenraum (8) nachgewiesen werden. Auch für Quercetin wurden entsprechende Ergebnisse bereits publiziert. Diese Studien belegen die Wichtigkeit der Analytik auf diesem Gebiet, um den Einsatz polyphenolischer Verbindungen im Sinne einer präventiven Vorsorgemedizin zu rechtfertigen. Die regelmäßige Zufuhr von Flavonoiden und Stilbenen in Form von Wein, aber auch in Form von Traubensäften, frischen Trauben oder Sultaninen ist somit essentiell, um den Körper vor verschiedenen Durchblutungserkrankungen bzw. auch Krebserkrankungen bis zu einem gewissen Maße schützen zu können.

Seit der ersten Arbeit, die das Vorkommen von Resveratrol in Rotwein dokumentiert (9), sind eine Vielzahl von Publikationen über die Analytik polyphenolischer Verbindungen erschienen. Organische Flüssigextraktion (10,11), Festphasenextraktion (12) oder direkte Injektionstechniken (12) wurden dabei für die Analytik von Resveratrol mittel GC, GC-MS (10,12) oder HPLC (11) verwendet. Die meisten GC-Methoden setzten dabei eine Derivatisierung der Proben voraus. Die Detektion wurde mittels Flammenionisation (10) oder

MS durchgeführt. Bei den HPLC-Methoden war eine Derivatisierung der Proben selten notwendig; detektiert wurde aufgrund der UV-Absorption (13), elektrochemischer Eigenschaften (14) oder fluoreszierender Eigenschaften (15). Sowohl die Verwendung eines Massenspektrometers in Verbindung mit HPLC, als auch der Vergleich zwischen UV, Fluoreszenz und Massenspektrometer ist in der Literatur noch nicht dokumentiert.

## Material und Methoden

Standards: *Trans*-Resveratrol, Myricetin, Quercetin und Kämpferol stammten von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). *Cis*-Resveratrol wurde durch UV-Bestrahlung von *trans*-Resveratrol erhalten. Standards wurden in Methanol aufgelöst, bei Dunkelheit und bei 6°C gelagert.

Geräte: Das Trennsystem wurde zuerst unabhängig vom Massenspektrometer etabliert und erst später gekoppelt. Für die HPLC wurde eine Hypersil BDS C18 Säule, 3 µm Partikelgröße, 125 mm x 4 mm I.D. und eine Hypersil BDS C18 Vorsäule, 3µm, 5 mm x 4 mm (Crom, Herrenberg-Kayh; Deutschland) verwendet. Das chromatographische System bestand aus einer Niederdruckgradientenpumpe (Modell 616, Waters, Milford, MA, USA), einem Photodiodenarraydetektor (Modell 996, Waters) mit einer 10 µL Flußzelle und einem Fluoreszenzdetektor (Modell 474, Waters).

20 µL Wein- bzw. Standardprobe wurden ohne Probenvorbereitung auf die Säule injiziert und mittels Gradientenelution getrennt. Das Laufmittel A setzte sich dabei aus destilliertem Wasser (900 g), Methanol (79 g) und Phosphorsäure (10 ml), Laufmittel B aus Wasser (600 g), Tetrahydrofuran (267 g), Methanol (79 g) und Phosphorsäure (10 ml) zusammen. Startbedingungen waren 50% A und 50% B bei einer Flussrate von 1 mL/min, nach 10 min 16,7% A und 83,3% B, bei 11 min wieder 50% A und 50% B. Dies wurde bis zum Ende des Laufs bei 20 Minuten beibehalten. Detektiert wurde im UV-Bereich bei 280, 320 und 377 nm, den relativen Absorptionsmaximas von *cis*-Resveratrol, *trans*-Resveratrol und den drei Flavonoiden. *Trans*-Resveratrol wurde auch mittels Fluoreszenz detektiert ( $\lambda_{ex}$ = 330nm,  $\lambda_{em}$ =374nm).

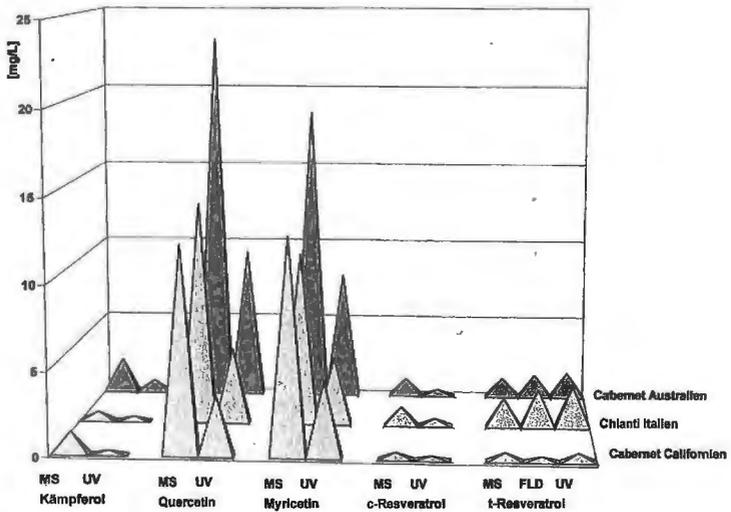
Für die Kopplung mit dem Massenspektrometer wurde das System von einer konventionellen Trennsäule (4 mm ID) auf eine Semimicrosäule (2mm ID) übertragen. Als stationäre Phase wurde eine Phenomenex Luna C18(2) Säule, 3µm Partikelgröße, 50 mm x 2 mm I.D. - und eine Phenomenex ODS, C18 Vorsäule, 5µm, 4 mm x 2 mm I.D. (Phenomenex, Torrance, CA, USA) verwendet.

Das chromatographische System bestand aus einer Rheos Flux Instruments 2000 Pumpe mit einem Phenomenex DG 301 online Entgaser. 5 µL Wein oder Standard wurden direkt injiziert. Laufmittel enthielten keine Phosphorsäure. Es wurde derselbe Gradient wie bereits oben beschrieben verwendet; die Flussrate betrug 200 µL/min. Über ein T-Stück wurden dem Laufmittel nach der Säule 15 µL/min Acetonitril beigemischt, um die Oberflächenspannung herabzusetzen und die Ionisierung im MS zu erhöhen.

Das Massenspektrometer, ein „LCQ quadrupole“ der Firma Finnigan Corporation (USA), arbeitete mit einem „Elektrospray-Interface“. Die Kapillare wurde auf 280° C aufgeheizt und mit einer Spannung von 5,6 V belegt. Die Ladung der Quelle betrug 3,7 kV. Stickstoff wurde als Trägergas für eine bessere Nebelbildung verwendet. LC-ESI-MS-Spektren wurden im Scanmodus zwischen 100 und 700 m/z aufgenommen.

Vor jeder Messung wurde die Säule für eine Stunde mit mobiler Phase bei 50% A und 50% B equilibriert. Standardlösungen wurden sowohl zu Beginn als auch als 6 Realproben injiziert.

Um die Genauigkeit der Quantifizierung zu überprüfen, wurde das System schließlich für die Kopplung mit einem Massenspektrometer umgebaut. Für die Trennung wurde eine Phenomenex-Säule mit einem geringeren Innendurchmesser verwendet, um mit einer Flußrate von 200 µL/min arbeiten zu können. Erste Vorversuche mit Ameisensäure bzw. Essigsäure an Stelle von Phosphorsäure zeigten, daß die Detektion der Flavonoide sehr wohl möglich war, aber nicht jene der Stilbene *cis*- und *trans*-Resveratrol. Auch die Veränderung des pH-Wertes nach der Säule durch Zugabe von Trimethylamin über ein T-Stück und somit die Detektion auf Anionen führte zu keiner Verbesserung der Stilbendetektion. Erst durch Ersetzen des Trimethylamins durch Acetonitril konnte ein Signal für Resveratrol empfangen werden. **Abbildung 3** zeigt die Trennung des bereits weiter oben erwähnten Chiantis (Italien, 1998). Die Messung ergab eine gute Übereinstimmung zwischen MS-Detektion und UV- bzw. Fluoreszenzdetektion bezüglich *trans*-Resveratrol. Wie erwartet, konnte über MS wesentlich mehr *cis*-Resveratrol nachgewiesen werden, als mit UV. Es zeigte sich, daß im Wein beide Resveratrolisomere ungefähr zu gleichen Anteilen vorkommen. Unerwartet lieferte das Massenspektrometer auch wesentlich höhere Werte für die Flavonoide Myricetin, Quercetin und Kämpferol (siehe **Abb. 4**). Die Ursache dürfte in den unterschiedlichen Auflösungsvermögen der einzelnen Detektionsmethoden zu finden sein.



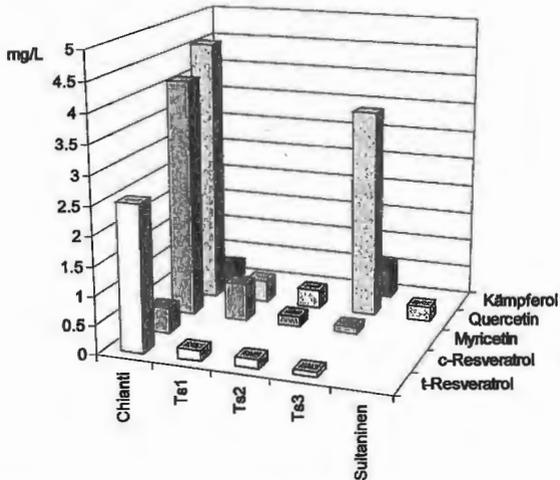
**Abb.4**

Vergleich verschiedener Detektionsmethoden

Cabernet aus Australien und Californien, Chianti aus Italien; MS = Detektion mittels Massenspektrometer, FLD = Detektion mittels Fluoreszenz

Trennbedingungen siehe **Abb 2 und 3**

Abschließend soll der Vergleich an Inhaltsstoffen von Wein, Traubensaft und getrockneten Trauben zeigen, daß der tägliche, aber moderate Weinkonsum wesentlich zur körperlichen Gesundheit beitragen kann (**Abb. 5**).



**Abb. 5**

Vergleich der Inhaltsstoffe von Wein, Traubensäften (TS) und getrockneten Trauben (Sultaninen); Bestimmung mittels HPLC-UV. Bedingungen siehe Abb. 2

### Schlußfolgerung

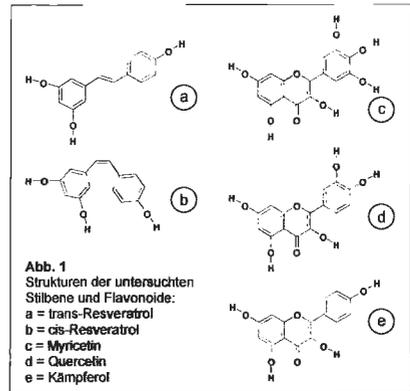
Neben UV- und Fluoreszenzdetektion stellt das Massenspektrometer eine ausgezeichnete Möglichkeit der Detektion von Flavonoiden und Stilbenen dar. Die vorgestellte Methode erlaubt es, Inhaltsstoffe in komplexen Systemen wie der Weinmatrix zu identifizieren, und schließlich auch in weiterer Folge zu quantifizieren.

### Literatur:

- 1 C.R.Pace-Asciak, S.Hahn, E.P.Diamandis, G.Soleas, D.M.Goldberg; *Clinica Chimica Acta*, 235 (2) (1995) 207
- 2 S.Renaud, M.DeLorgeril; *Lancet*, 339 (1992) 1523
- 3 Europäisches Institut für Lebensmittel- und Ernährungswiss. (EUL.E) e.V., *EUL.E.n-Spiegel*, 3 (1997)
- 4 D.M. Goldberg, *Clin.Chem.*, 41 (1995) 14
- 5 G.J.Soleas, E.P.Diamandis, D.M.Goldberg; *Clinical Biochemistry*, 30 (1997) 91
- 6 T.C.Hsieh, J.M.Wu; *Experimental Cell Research*, 249 (1999) 109
- 7 R.Lu, G.Serrero; *Journal of Cellular Physiology*, 179 (1999) 297
- 8 T.M.ElAittar, A.S.Virji; *Anticancer Drugs*, 10 (1999) 187
- 9 E.H.Siemann, L.L.Creasy; *Am.J.Enol.Vitic.*, 43 (1992) 49
- 10 P.Jeandet, R.Bessis, B.Gautheron; *Am.J.Enol.Vitic.*, 42 (1991) 41
- 11 P.Jeandet, R.Bessis, B.F.Maume, P.Meunier, D.Peyron, P.Trollat; *J.Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 316
- 12 D.M.Goldberg, A.Karumanchiri, E.Ng, et al.; *Am.J.Enol. Vitic.*, 44 (1993) 344
- 13 D.M.Goldberg, E.Ng, A.Karumanchiri, J.Yan, E.P.Diamandis, G.J.Soleas, *J. of Chromatography A*, 708 (1995) 89
- 14 K.D.McMurtrey, J.Minn, K.Pobanz, T.P.Schulz; *J.Agric.Food Chem.*, 42 (1994) 2077
- 15 R.M.Lamuella-Raventós, A.I.Romero-Perez, A.L.Waterhouse, M.C. De la Torre-Boronat; *J.Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 281

## Ergebnisse und Diskussion

Da die Aglykone der Flavonoide und Stilbene relativ lipophil sind (Abb.1), werden sie zwischen 6,5 und 14 Minuten in folgender Reihenfolge eluiert: *trans*-Resveratrol (6,5 min), Myricetin (7,5 min), *cis*-Resveratrol (8,5 min), Quercetin (11 min) und Kämpferol (13,5 min). Obwohl die Quantifizierung mittels UV für *trans*-Resveratrol, Myricetin, Quercetin und Kämpferol ohne Probleme funktionierte, war die Detektion von *cis*-Resveratrol bei 280 nm aufgrund des Basislinienanstiegs schwierig. Deshalb wurde *cis*-Resveratrol sowohl bei 280, als auch bei 320 nm detektiert. Die Peak-Zuordnung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit und des UV-Spektrums von Standard und Realprobe.



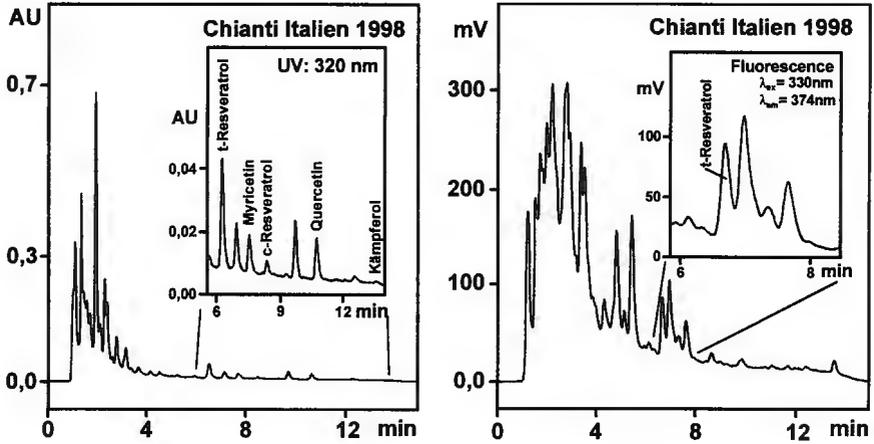
Für die Kalibrierung wurden alle 4 Standardsubstanzen in Methanol gelöst, auf 5 Konzentrationsstufen verdünnt und je 3 mal bestimmt. Die erhaltenen Daten zeigten optimale Linearität für alle Verbindungen. In Tabelle 1 sind die Parameter der linearen Regression, Korrelationskoeffizienten und Detektionslimits zusammengefasst.

Tab. 1: Kalibriergeraden, Korrelationskoeffizienten, Detektionslimits von Resveratrol, Myricetin, Quercetin und Kämpferol

SUBSTANZ	DETEKTIONS-METHODE	WELLENLÄNGE	KALIBRIER-GERADE	R <sup>2</sup>	LOD [ng]
Resveratrol	UV-visible	320 nm	$y=127882x-23862$	0,9999	1,312
	FLD	$\lambda_{ex}=330$ nm, $\lambda_{em}=374$ nm	$y=239194x+4255,3$	0,9996	0,700
	MS	$m/z = 227,4$	$y=9e+06x$	0,9878	1,312 (full scan)
Myricetin	UV-visible	377 nm	$y=83581x-16071$	1	2,775
	MS	$m/z = 317,4$	$y=2e+07x$	0,9928	1,387 (full scan)
Quercetin	UV-visible	377 nm	$y=86972x-17345$	0,9999	1,191
	MS	$m/z = 301,3$	$y=3e+07x$	0,9910	0,397 (full scan)
Kämpferol	UV-visible	377 nm	$y=80444x-10752$	0,9999	0,850
	MS	$m/z = 285,4$	$y=4e+07x$	0,9897	0,142 (full scan)

Die besten Korrelationskoeffizienten konnten mittels UV und Fluoreszenz erreicht werden, für die Detektion mittels Massenspektrometer lagen die Werte zwischen 0,988 und 0,993. Wie erwartet konnte in den meisten Fällen die tiefste Detektionsgrenze über LC-MS erreicht werden. Nur die Detektion von Resveratrol mittels Fluoreszenz zeigte geringere Werte als das Massenspektrometer im „full scan“ Modus.

Abbildung 2 a und b zeigen die Analyse eines Chianti (Italien, 1998) mittels UV- und Fluoreszenzdetektion. Da Großteil der Matrix innerhalb von 4 Minuten eluiert wurde, konnten die Analyten ohne Probleme detektiert werden. Obwohl die Peakauflösung (peak resolution) für alle Verbindungen größer als 1,5 war, zeigte die Fluoreszenzdetektion für Resveratrol keine Basislinientrennung.

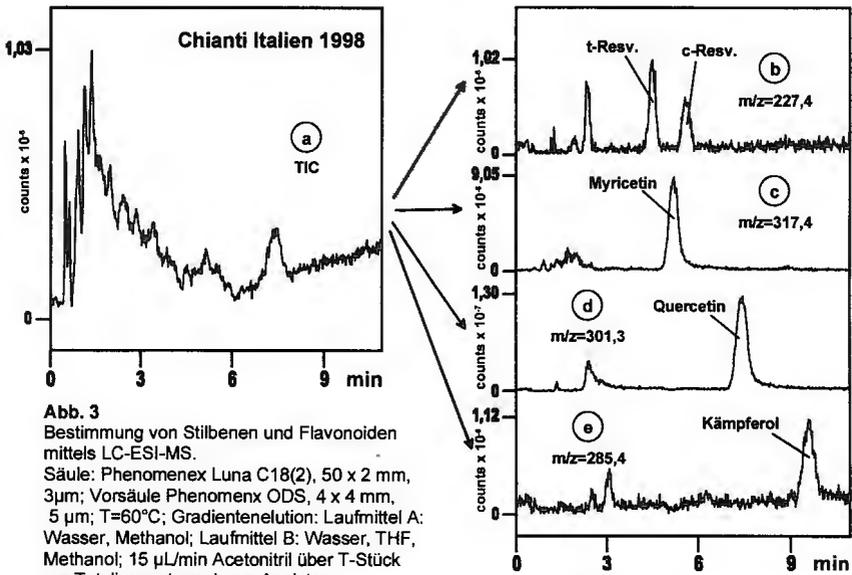


**Abb. 2**

Links: Abb.2a: Analyse eines Chianti aus Italien 1998 mit UV Detektion bei 320 nm.

Rechts: Abb.2b: Analyse eines Chianti aus Italien 1998 mit Fluoreszenzdetektion ( $\lambda_{ex}=330\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=374\text{nm}$ ).

Säule: Hypersil BDS C18, 125 x 4 mm, 3  $\mu\text{m}$ ; Vorsäule: Hypersil BDS C18, 5 x 4 mm, 3  $\mu\text{m}$ ; Gradientenelution: Laufmittel A: Wasser, Methanol, Phosphorsäure; Laufmittel B: Wasser, Tetrahydrofuran, Methanol, Phosphorsäure. Temp.: 50°C.



**Abb. 3**

Bestimmung von Stilbenen und Flavonoiden mittels LC-ESI-MS.

Säule: Phenomenex Luna C18(2), 50 x 2 mm, 3  $\mu\text{m}$ ; Vorsäule Phenomenex ODS, 4 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; T=60°C; Gradientenelution: Laufmittel A: Wasser, Methanol; Laufmittel B: Wasser, THF, Methanol; 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  Acetonitril über T-Stück  
a = Totalionenstrom, b-e = Analyten



## Neue HPLC und HPLC-MS Methode zur Bestimmung des Carotinoidgehaltes in ausgewählten Gemüse- und Obstarten

C.W. Huck<sup>1</sup>, M. Popp<sup>2</sup>, H. Scherz<sup>3</sup>, G.K. Bonn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Analytische Chemie und Radiochemie, Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Innrain 52a, 6020-Innsbruck, Österreich

<sup>2</sup> Bionorica/Plantamed GmbH, Kerschensteinerstr. 11-15, 92318-Neumarkt/Oberpfalz, Deutschland

<sup>3</sup> Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Lichtenbergerstr. 4, 85748-Garching, Deutschland

*New HPLC and HPLC-MS/MS Method for the Determination of the Carotenoid Content in Selected Vegetables and Fruits*

*Epidemiologic studies have shown inverse correlation between the consumption of carotenoids rich vegetables and the incidence of cancer. The most used analytical method is the reversed-phase (RP) high-performance liquid chromatography (HPLC). In this work 17 mobile-phase systems described in the literature and 6 RP-HPLC columns with differences in particle size and porosity are evaluated. Derived from these results a new mobile-phase (acetonitrile, methanol, chloroform, n-heptane) including solvent modifiers is presented, which allows an improved and more efficient separation of carotenoids. From all columns tested the best chromatographic parameters are found using a silica C<sub>18</sub> (250 × 2 mm, 5 μm, 100 Å) column. For the identification and quantification of carotenoids in complex sample matrices, which contain additionally other UV-absorbing compounds, the optimized reversed-phase chromatographic system is coupled to a mass spectrometer (HPLC-MS) using an atmospheric pressure ionization (APCI) interface. In this work a total of 9 species of vegetables commonly consumed in central Europe are analyzed for their contents of carotenoids, namely lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin and β-carotene, by RP-HPLC and RP-HPLC-MS/MS. It shows that good sources of lutein is spinach, kale, broccoli, for β-carotene broccoli, spinach, kale, carrots and tomatoes.*

*Address correspondence to:*

*Dr. Christian Huck, Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens University of Innsbruck, Innrain 52a, 6020-Innsbruck, Austria, Tel.: 0043 512 507 5195, Fax: 0043 512 507 2965, E-Mail: christian.w.huck@uibk.ac.at.*

## Übersicht

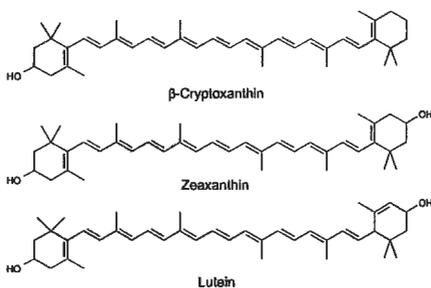
Epidemiologische Studien bestätigten eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme von carotinoidreichem Gemüse und Anzeichen von Krebs (1,2). Für weitere qualitative und quantitative Untersuchungen von Carotinoiden auch in sehr komplexen Probenmatrices sind analytische Trenntechniken sehr wichtig. Die am meisten verwendete Methode zur Carotinoidbestimmung ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). In dieser Arbeit wurden 17 Eluentensysteme und 6 Umkehrphasen-HPLC-Säulen mit unterschiedlichen Partikelgrößen und unterschiedlicher Porosität untersucht. Abgeleitet von diesen Ergebnissen wurde ein neues mobile-Phase System (Acetonitril, Methanol, Chloroform, n-Heptan) mit einem „Solvent-Modifier“ (4,5) etabliert, welches eine verbesserte und effizientere Trennung von Carotinoiden ermöglicht. Von den getesteten Säulen lieferte eine Silica C<sub>18</sub>-Säule (250 × 2 mm, 5 µm, 100 Å) die besten chromatographischen Parameter. Anhand der UV-Detektion bei 450 nm konnten die Carotinoide bis in den Picogramm-Bereich mit guter Linearität ( $R^2 > 0.98$ ) bestimmt werden. Für die Identifizierung und Quantifizierung von Carotinoiden in sehr komplexen Matrices, welche weitere UV-absorbierende Substanzen enthalten, wurde das Umkehrphasensystem durch ein Atmosphärendruckionisationsinterface (APCI) mit einem Massenspektrometer gekoppelt (HPLC-MS). Die Kalibriergerade zeigte eine gute Linearität ( $R^2 > 0.99$ ) und das Detektionslimit befand sich im unteren Nanogramm-Bereich. Weiters wurde kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) (6) in der Ionenquelle verwendet, um Carotinoide aufgrund ihres charakteristischen Fragmentierungsmusters zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden 9 Spezies von Gemüse die im allgemeinen in Mitteleuropa konsumiert werden, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß gute Quellen für Lutein Spinat, Kohl und Broccoli, für  $\beta$ -Carotin Broccoli, Spinat, Kohl Karotten und Tomaten sind. Diese neue Methode stellt eine Verbesserung für die Identifizierung und Quantifizierung von Carotinoiden in komplexen Matrices dar.

## Einleitung

Carotinoide sind konjugierte Kohlenwasserstoffe, die weiter in Carotine (ohne Sauerstoffatome) und Xanthophylle (mit Sauerstoffatom(en)) unterteilt werden (**Abbildung 1**). Carotinoide kommen weitverbreitet in allen Lebensbereichen vor. Mehr als 600 Carotinoide wurden identifiziert und diese Zahl nimmt ständig zu. Carotinoide werden synthetisiert von Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen (7), aber nicht von Tieren und Menschen, welche diese mit ihrer Nahrung aufnehmen müssen. Sie spielen eine essentielle Rolle für die Lichtenergiesammlung und als Lichtschutz (8). Von besonderem wissenschaftlichen Interesse sind jene Carotinoide, deren Konzentrationen im Blut am höchsten sind:  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin, Lykopen, Lutein und  $\beta$ -Cryptoxanthin. Drei von diesen, nämlich  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und  $\beta$ -Cryptoxanthin besitzen Provitamin A Aktivität und können im Körper in Retinol konvertiert werden.

Traditionelle Trennverfahren beschreiben die Anwendung der Säulen- und Dünnschichtchromatographie. Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) werden sowohl isokratische als auch Gradientensysteme vorgeschlagen (9-13). Aufgrund der Tatsache, daß Carotinoide sehr oxidationsempfindlich sind sollte der mobilen Phase ein Antioxidans, z.B. butyliertes Hydroxytoluol zugesetzt werden.

#### Sauerstoffhaltige Carotinoide (Xanthophylle)



#### Sauerstofffreie Carotinoide (Carotine)

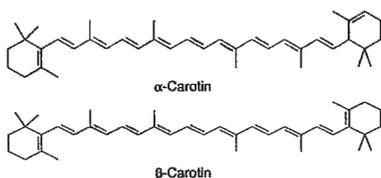


Abbildung 1 Struktur der Carotinoide

## Materialien und Methoden

**Carotinoidstandards:** Lutein, β-Carotin, sowie der interne Standard β-apo-8'-carotenal (trans) wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft, Zeaxanthin und β-Cryptoxanthin bei Roth (Karlsruhe, Deutschland). Alle weiteren verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien stammen von Merck (Darmstadt, Deutschland).

**Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):** Bei dem verwendeten HPLC-System handelt es sich um ein LC-Module I (Waters, Milford, MA, USA) bestehend aus einem Niederdruckgradientenpumpensystem, einer Heliumgasung, einem Autosampler mit einer 200 µl Ladeschleife und einem UV-Detektor (Modell 486, Waters) mit einer 10 µl Flußzelle. Die Daten wurden von einem Datensystem erfasst (Millenium, Version 32, Waters). Säule: Phenomenex Luna C18 (5µm, 100 Å, 250 × 2 mm ID, Torrance, CA, USA). Zum Thermostatisieren wurde ein Wasserbad verwendet.

**Atmosphärendruckionisations-Massenspektrometrie (APCI-MS) gekoppelt mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):** Für HPLC-MS/MS Experimente wurde ein Niederdruckgradientenpumpensystem (Modell Rheos 2000, Flux, Karlskoga, Schweden), ein Entgaser (Knauer, Berlin, Deutschland), ein Mikroinjektor (Modell CC00030, Valco, Houston, TX, USA) mit einer 5 µl Ladeschleife, einem variablen Wellenlängendetektor (Modell Linear UV-VIS 200, Linear Instruments, Fremont, CA, USA) mit einer 1.2 µl Flußzelle verbunden mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Modell LCQ, Finnigan, San Jose, CA, USA) verwendet.

**Probenvorbereitung:** Die auf öffentlichen Märkten in Innsbruck erstandenen Gemüsearten wurden folgend den Vorschlägen von Scott und Hart (14) mit einigen kleinen Änderungen aufbereitet.

## Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 2 zeigt, daß die optimale Zusammensetzung der mobilen Phase bei dem Gemisch Acetonitril/Methanol (0.05% Triethylamin, 0.05 M Ammoniumacetat)/Chloroform/n-Heptan=50/40/5/5 (v/v) liegt, da unter diesen Bedingungen die größten Werte für die Kapazitätsfaktoren der untersuchten Carotinoide erhalten werden. Durch die Zugabe von Triethylamin (TEA) können unerwünschte Wechselwirkungen mit den unterivatisierten Silanolgruppen der stationären Phase unterdrückt werden und somit die Wiederfindungsrate gesteigert werden. Die Zugabe von 0.05M Ammoniumacetat (AA) zum Methanol ermöglicht eine effiziente Pufferung, sodaß Einflüsse saurer Wechselwirkungen stammend von chlorierten Lösungsmitteln minimiert werden können. Durch die Zugabe von 0.05 M Ammoniumacetat und 0.05% Triethylamin konnte die Wiederfindungsrate für das Gemisch Lutein, Zeaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und  $\beta$ -Carotin von 70% auf 95% gesteigert werden. Die Wahl des quaternären Eluentensystems erfolgte aufgrund der Theorie des Selektivitätsdreiecks nach Snyder *et al.* (15).

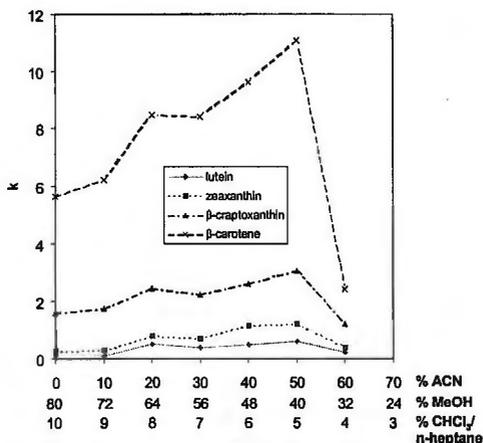
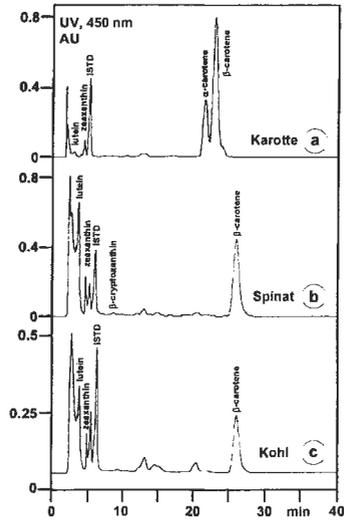


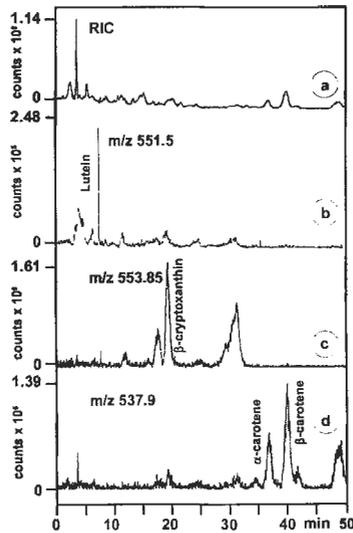
Abbildung 2 Kapazitätsfaktoren in Abhängigkeit der Zusammensetzung der mobilen Phase

Die besten chromatographischen Kenngrößen lieferte eine Phenomenex RP Si 18 (5  $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$ , 250  $\times$  2 mm). Die Temperatur wurde konstant bei 21°C gehalten. Kleine Temperaturschwankungen bewirken eine wesentliche Einbuße an Selektivität. Das optimierte Trennsystem wurde schließlich zur Identifizierung der Carotinoide in verschiedenen Gemüsearten verwendet (Abbildung 3).

Nach erfolgter Quantifizierung wurde das HPLC-System mit einem Massenspektrometer gekoppelt. Damit konnte gezeigt werden, daß es sich bei den untersuchten Verbindungen um keine Artefakte handelt. Abbildung 4 zeigt eine Reihe unaufgelöster Peaks im Totalionenstrom-Chromatogramm (Abbildung 4a).



**Abbildung 3** Bestimmung von Carotinoiden in Karotte (a), Spinat (b) und Kohl (c). Säule, Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (5 µm, 100 Å, 250 × 2 mm); Mobile Phase, ACN / MeOH (0.05% TEA, 0.05 M NH<sub>4</sub>OAc) / CHCl<sub>3</sub> / n-Heptan = 50/40/5/5 (v/v) mit 0.1 % BHT; isokratisch; Flußrate, 0.3 ml/min; Detektion, UV, 450 nm.



**Abbildung 4** HPLC-APCI-MS von Carotinoiden im Karottenextrakt. Scan; 85-100 amu in 1 sec; Flußrate, 0.2 ml/min; andere chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 3.

Das hydroxylierte Xanthophyll Lutein zeigt einen Basispeak bei  $m/z$  551 entsprechend der Abspaltung von Wasser von dem protonierten Molekül. Die anderen Carotinoide konnten in ihrer protonierten Form direkt erfaßt werden.

Durch kollisionsinduzierte Dissoziation wurde das für das jeweilige Carotinoid entsprechende Fragmentierungsmuster erhalten, welches als weiteres Identifizierungsindiz herangezogen wurde.

Die beschriebene Methode dient zur Detektion von Carotinoiden in komplexen Matrices bei verbesserter Wiederfindungsrate und Selektivität.

### Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> L.J. Machlin, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 35 (1995) 41
- <sup>2</sup> P. Astorg, Trends in Food Science & Technology, 8 (1997) 406
- <sup>3</sup> L.R. Snyder, J. Chromatogr. Sci., 16 (1978) 223
- <sup>4</sup> K.S. Epler, L.C. Sander, J. Chromatogr., 595 (1992) 89
- <sup>5</sup> L.C. Sander, S.A. Wise, Anal. Chem., 61 (1989) 1749
- <sup>6</sup> R.B.v.Breemen, C.-R. Huang, Y. Tan, L.C. Sander, A.B. Schilling, J. Mass Spectrom., 31 (1996) 975
- <sup>7</sup> G.A. Armstrong, J.E. Hearst, FASEB J. 10: 228-237 (1996)
- <sup>8</sup> B. Demmig-Adams, A.M. Gilmore, W.W. Adams FASEB J. 10: 403-412 (1996)
- <sup>9</sup> H.J.C.F. Nells, A.P. Leenheer, Anal. Chem. 55: 270-275 (1983)
- <sup>10</sup> F. Khachik, G.R. Beecher, N.F. Whittaker, J. Agric. Food Chem. 34:603-616 (1986)
- <sup>11</sup> N.E. Craft, S.A. Wise, J.H. Soares, J. Chromatogr. 589: 171-176 (1992)
- <sup>12</sup> H. Müller, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 204: 88-94 (1997)
- <sup>13</sup> R.J. Bushway, J. Liquid Chromat. 8: 1527-1547 (1985)
- <sup>14</sup> D.J. Hart, K.J. Scott, Food Chem. 54: 101-111 (1995)
- <sup>15</sup> L.R. Snyder, J. Chromatogr. Sci. 16: 223-234 (1978)



## Gaschromatographische Analyse von Sulforaphan in Broccoli

*Sieghard T. Adam und Antal Bognar*

Institut für Chemie und Biologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung  
Haid-und-Neu-Strasse 9, D-76131 Karlsruhe

### *Gas chromatographic analysis of sulforaphane in broccoli:*

*Sulforaphane (1-isothiocyanato-4-methylsulfinylbutane) is formed by enzymatically induced hydrolysis of glucoraphanine which represents the main component of glucosinolates in broccoli. Several biological studies have demonstrated that this component exhibits a cancer protective activity.*

*Samples of broccoli were minced, adjusted to pH6 and incubated with commercially available myrosinase (from sinapis alba). The disintegrated product was extracted with dichloromethane. After distillation of the solvent the residue was dissolved in tert-butyl-methyl ether. In this way stable samples to be measured were obtained. Gas chromatographic determinations revealed good repeatability and linear detection. The limit of determination was 0.3 ng/ $\mu$ l.*

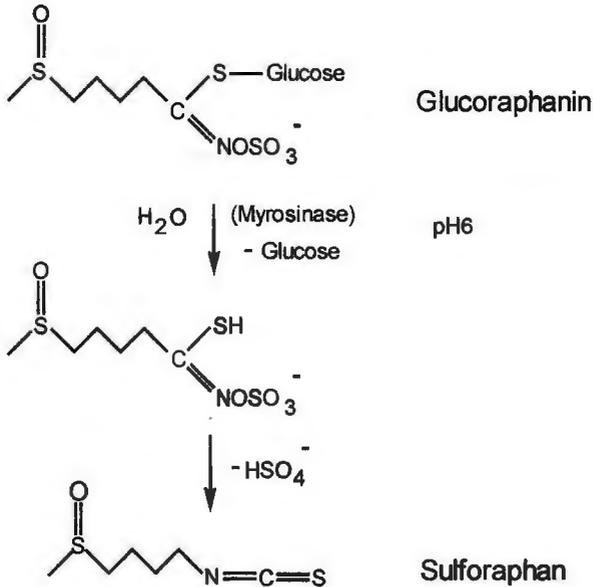
### Einleitung

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass der Verzehr von Gemüse eine gesundheitsfördernde Wirkung haben kann (1,2). Insbesondere die verschiedenen Kohlarten der Gattung Brassica haben das Interesse der Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaftler geweckt (3-5). In allen Brassicagemüsen, beispielsweise Weiskohl, Rotkohl, Wirsing, Grünkohl, Chinakohl und Broccoli sind Glucosinolate enthalten, die beim Zerkleinern des pflanzlichen Gewebes, bei der Lebensmittelaufbereitung und beim Verzehr ein Spektrum von Abbauprodukten durch enzymatisch induzierte Hydrolyse freisetzen (6).

Broccoli enthält neben anderen Glucosinolaten Methylsulfinylbutylglucosinolat (Glucoraphanin), das durch Hydrolyse, gefolgt von einer Lossenumlagerung, zu Sulforaphan (1-Isothio-cyanato-4-Methylsulfinylbutan) abgebaut wird (Schema1).

Untersuchungen an Leberzellen und bei Rattenversuchen mit authentischem Sulforaphan bestätigen die These, dass dieser Wirkstoff Phase2-Enzyme induziert und dadurch die Kanzerogenese verhindert (7,8).

Mehrere Quellen zeigen, dass dem gaschromatographischen Nachweis von Sulforaphan in Broccoliprüfungen unsymmetrische Peakformen zu Grunde liegen, die eine qualifizierte Analyse ausschliessen und eine Bestimmung im Spurenbereich nicht gestatten (9,10). Die vorliegende Arbeit verfolgt die Absicht, eine empfindliche, zuverlässige und zugleich robuste Nachweismethode für Sulforaphan in Broccoli vorzustellen.



**Schema 1:** Enzyminduzierte Umwandlung von Glucoraphanin in Sulforaphan

## Methodik

### Probenaufarbeitung

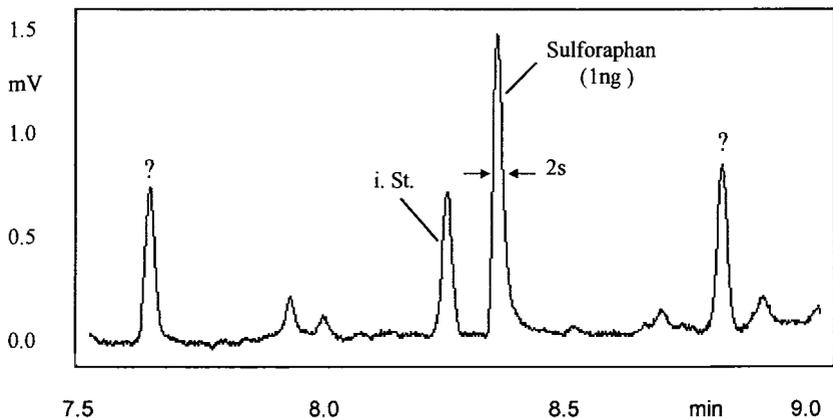
Das fein zerkleinerte Probenmaterial (Broccoli-Röschen mit Stielen) wurde zur Freisetzung von Sulforaphan nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 mit Myrosinase („from sinapis alba“, Thioglucosidaseaktivität: 0.9 IU/g Probensubstanz) bei 30°C (1h) inkubiert. Nach thermischer Inaktivierung des Enzyms bei 80°C (5min) wurde die Aufschlusslösung zentrifugiert und filtriert. Das Filtrat wurde mit Dichlormethan (interner Standard: Tetradecansäuremethylester) extrahiert und mit Natriumsulfat getrocknet (cf.: 8,11). Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels (40°C, Vakuum) wurde der Rückstand in tert. Butyl-methylether gelöst.

### Messtechnik

Die Messprobe (1µl) wurde mit Hilfe der split/splitless-Technik bei 250°C injiziert, in einer unpolaren Trennsäule (L.: 15m, I.D.: 0,25mm, F.S.: 0,25µm) aufgetrennt und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors analysiert. Die Anfangsisotherme der Säule betrug 50°C, die Anstiegsrate 18°C/min und die Endisotherme 250°C (10min). Als Trägergas wurde Helium bei einem Druck von 2 bar verwendet. Die Identität des Sulforaphanpeaks wurde durch massenspektroskopische Kongruenz mit Vergleichsspektren verifiziert (7).

## Ergebnisse

- Sulforaphan kann mit guter Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient <5%) aus der Matrix des pflanzlichen Materials extrahiert und gaschromatographisch bestimmt werden (s. Bild 1).
- Die Detektion erfolgt linear im Bereich von 0,5 bis 25 ng chromatographierter Masse (lin. Korrelationskoeffizient >0,99).
- Die Bestimmungsgrenze liegt bei ca. 0,3 ng/μl in der Messlösung.



**Bild 1:** Ausschnitt eines typischen Chromatogrammes einer Broccoliprobe (i.St.:interner Standard, ?: nicht identifizierte Peaks)

## Ausblick

- Es ist beabsichtigt, durch Bestimmung des Glucoraphaningehaltes in Broccoli die Vollständigkeit der enzyminduzierten Umwandlung von Glucoraphanin zu Sulforaphan nach dem EU-Standardverfahren (12) zu überprüfen.
- Die Anwendung des beschriebenen Verfahrens auf die enzymatische Hydrolyse in verwandten Kohlarten, beispielsweise die Umwandlung von Glucobrassicin zu Indolylacetonitril in Rotkohl, wird ins Auge gefasst.

## Literatur

- 1 K.A. Steinmetz, J.D. Potter (1996) *J. Amer. Dietet. Assoc.* 96, 1027-1039.
- 2 G. Block, B. Patterson, A. Subar (1992) *Nutr. Cancer* 18, 1-29.
- 3 M.E. Daxenbichler, C.H. VanEtten, G.F. Spencer (1977) *J. Agric. Food Chem.* 25, 121-124.
- 4 L.W. Wattenberg (1977) *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 395-398.
- 5 A. Martinez, I. Cambero, Y. Ikken, M.L. Marin, A.I. Haza, P. Morales (1998) *J. Agric. Food Chem* 46, 585-589.
- 6 A. J. Duncan und J. A. Milne (1989) *Aspects Appl. Biology* 19, 75-92.
- 7 Y. Zhang, P. Talalay, C.-G. Cho und G. H. Posner (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2399-2403.
- 8 W. C. K. Chiang, D. J. Pusateri und R. E. A. Leitz (1998) *J. Agric. Food Chem.* 46, 1018-1021.
- 9 A.M. Kore, G.F. Spencer, M.A. Wallig (1993) *J. Agric. Food Chem.* 41, 89-95.
- 10 K. Faulkner, R. Mithen, G. Williamson (1998) *Carcinogenesis* 19, 605-609.
- 11 G. Fröhlich, G. Fingerling, H. Hanke, H. He, W. H. Schnitzler (1999) *Lebensmittelchemie* 53, 5-6.
- 12 *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* (3.7.90) Nr. L170, 28-34.



## Possibility of Determination Forgery of Roast Ground Coffee by Analysis Contents of Mineral Matters

*Z. Pavlovic\*, I. Miletic, M. Miric, I. Stankovic,  
S. Sobajic, Z. Lalic, B. Djordjevic*

\*Inst. for health protection, Pozarevac Yugoslavia  
Inst. of Bromatology, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Yugoslavia

### Abstract

*On the Yugoslav market for the last couple of years expansion of private stores for roasting and grinding coffee has happened. Many cases of falsification are evident. Yugoslavian book of regulations allows the use of surrogates with required declaration. For determination of forgery of roast ground coffee Association of Official Analytical Chemists proposes a method for microscopic and macroscopic examination (1).*

*It is possible to detect the presence of different components of food according to the content of mineral matters (2). The possibility of forgery determination in roast ground coffee by analysis the contents of K, Na, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Co and Cr was investigated in this paper.*

*Corresponding author. Brizita Djordjevic, Inst of Bromatology, Faculty of Pharmacy, 450, Vojvode Stepe, 11000 Belgrade, Yugoslavia*

### MATERIALS AND METHODS

The samples (57) of roast, ground coffees were purchased from the private stores in the Yugoslav market. There was not any information on the types of coffee and localization of where it was grown. The forgery detection was based upon the

investigation of starch and sugars in water extract (3). The content of minerals was detected with flame atomic absorption spectrometry (Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Ni, Co and Cr), and also flames atomic emission spectrometry (Na and Ca), on atomic absorption spectrometer Varian, model Spectra 10. Before spectrometric analyses, samples were mineralized by dry ashing on 450°C. Data were analyzed using statistical package (Statistical Graphics Corp) on an IBM PC-compatible computer.

## RESULTS

Table 1. Contents of minerals' matter in samples of roast ground coffee, mg/kg

Element	Average n=50	Minimum	Maximum	Standard deviation
K	18572	15350	34790	2694.6
Na	112.7	53.90	181.7	32.67
Ca	1105	829	1952	187.5
Mg	2407	1878	2885	214.4
Cu	13.11	10.59	15.12	1.093
Ni	0.276	0/118	0.702	0.1563
Fe	45.99	25.8	69.8	8.732
Mn	32.90	21.13	42.00	5.299
Co	0.062	<0.04	0.128	0.0289
Cr	0.155	0.095	0.617	0.0764
Zn	5.001	3.71	8.01	0.8674

Table 2. Content of mineral matter in samples of forgery roast ground coffee

Element	Average n=7	Minimum	Maximum	Standard deviation
K	11364	5360	16505	1433.4
Na	93.1	58.3	156.3	34.06
Ca	741	499	1042	189.2
Mg	1920	1363	2403	349.8
Cu	9.15	5.94	11.3	1.893
Ni	0.302	0.121	0.262	0.0986
Fe	52.01	39.01	80.24	14.248
Mn	37.46	25.06	50.30	7.488
Co	0.016	<0.04	0.056	0.0271
Cr	0.136	0.110	0.190	0.0297
Zn	21.18	10.01	34.50	8.385

Table 3. Difference of content mineral matter between roast ground coffee and forgery

Element	Difference Between Means	Significance of difference for $p = 0.05$	Computed t statistic	Significance Level
K	7228	yes	6.138	1.7966E-7
Na	19.57	no	1.4767	0.1454
Ca	365.1	yes	4.8209	1.1760E-5
Mg	487.4	yes	5.1825	3.2839E-6
Cu	3.956	yes	8.1346	5.262E-11
Ni	-0.027	no	-0.4397	0.6618
Fe	-6.017	no	-1.5708	0.1219
Mn	-4.56	yes	-2.0252	0.0477
Co	0.046	yes	4.0077	1.8608E-4
Cr	0.019	no	0.6449	0.5216
Zn	-16.18	yes	-13.881	0

## CONCLUSIONS

The obtained results for content of K, Ca, Mg and Fe in roast ground coffee are in correlation with McCance and Widowson data, whereas for copper we obtained a 60% higher value, and for Na we obtained 5 times lower value.

The high relative standard deviation for the content of Cu, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg, Na and K in the forged roast ground coffee could be explained with different quantity of added grains.

Statistical analysis of data showed significant differences for the content of Ca, Mn, Zn, Ca, Mg and K, for the “correct” coffee and forgery. Forgeries contain more Zn and Mn, and less Cu, Ca, Mg and K, than “correct” coffee.

The major finding of this study is that the higher level for Zn than 10 mg/kg, indicates the possibility that coffee is forged. Simultaneously, reduced contents of Cu, Ca and K are the complementary confirmation. We can conclude that determination of minerals’ matter could be of importance in identifying forgery coffees.

## REFERENCES

- 1) Official Methods of Analysis of the A.O.A.C., K. Helreich (ed.) 15 Th. Ed., p:757, A.O.A.C. Arlington, 1990
- 2) Manual Suisse des denrees alimentaires, Zimmerman et Cie, S.A. imprimeurs et editeurs, Berne 1939
- 3) Harvey, R.A., & Theuer, R.C. (1991) J. Assoc.Off. Anal. Chem 74, 929-932
- 4) The Composition of Foods, McCance and Wisdowson's, Ministry of agriculture, Fisheries and Food, London 1985.



## Vergleich der *trans*-Resveratrolbildung in Blättern verschiedener Genotypen der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) nach UV-Bestrahlung

*R. Mascher*<sup>1</sup>, *B. Lippmann*<sup>1</sup>, *Ch. Balko*<sup>2</sup> und *H. Bergmann*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Ernährungswissenschaften,  
D-07743 Jena, Dornburger Str. 25; E-mail: mascher@mampf.ieu.uni-jena.de

<sup>2</sup>BAZ, Institut für Streßphysiologie und Rohstoffqualität,  
D-18190 Groß Lüsewitz, R.-Schick-Platz 3

### *Comparison of trans-resveratrol biosynthesis in the leaves of different potato (Solanum tuberosum L.) cultivars after UV-irradiation*

*The stilbene trans-resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin induced by infection with pathogen fungi or abiotic stressors like sugars, heavy metal ions or short wave UV radiation. In potatoes it has been shown, that it is possible to induce the trans-resveratrol biosynthesis by infection with Phytophthora infestans or inoculation with pmg-elicitor. We investigated the UV-induced trans-resveratrol accumulation in the leaves of in vitro- and greenhouse grown potatoes of 7 different genotypes. The trans-resveratrol biosynthesis was UV-inducible. Maximum of trans-resveratrol formation was measured after 6 min UV irradiation and 2 days incubation (in darkness; 25°C).*

### EINLEITUNG

Das *trans*-Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) ist ein Phytoalexin. Diese Gruppe von niedermolekularen organischen Substanzen ist induzierbar und antimikrobiell wirksam. So kann das *trans*-Resveratrol im Wein (*Vitis vinifera*) als Antwortreaktion auf Pilzbefall und Pmg-Elicitor oder auf abiotische Elicitoren wie verschiedene Zucker (Glucose, Fructose, Galaktarsäure), Ionen ( $Al^{3+}$  und  $Cu^{2+}$ ) und kurzweilige UV-Strahlung gebildet werden (Langcake und Pryce, 1977; Blaich und Bachmann, 1980; Stein und Hoos, 1984; Dercks und Creasy, 1989; Adrian et al., 1996).

Ein weiterer bedeutender Aspekt beim *trans*-Resveratrol ist seine pharmakologische Wirkung. So reicht hier das Wirkungsspektrum von Entzündungshemmung bei bakteriellen und pilzlichen Erkrankungen (Trela und Waterhouse, 1996), Hemmung präneoplastischer Mammatumoren durch seine oestrogenähnliche Struktur (Gehm et al., 1997), Einleitung der Apoptose in humanen Leukämiezellen (Synold und Doroshow, 1998) bis hin zur Senkung des koronaren Herz/Kreislauftrisikos durch eine HDL-Cholesterinerhöhung und Inhibierung der Thrombocytenaggregation (Soleas et al., 1997).

Durch Stahl et al. (1996) konnte die *trans*-Resveratrolsynthese in Knollen und Blättern des "Grundnahrungsmittels" Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. 'Desireé') nach Infektion mit *Phytophthora infestans* sowie Inokulation mit Pmg-Elicitor nachgewiesen werden.

Im folgenden soll vorgestellt werden, daß auch UV-Strahlung die Stilbenbildung in Blättern verschiedener Genotypen von *Solanum tuberosum* L. bei *in vitro*- und Gewächshauskultivierung induziert.

## MATERIAL UND METHODEN

### • Kultivierung der Pflanzen.Vorbereitung des Blattmaterials

Für die Etablierung der *in vitro*-Kulturen wurden von den entsprechenden Genotypen der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) sowohl die Sproßspitzenmeristeme als auch die Achselknospenmeristeme auf Murashige-Skoog-Basalmedium kultiviert. Für die Experimente mit *in vitro*-Pflanzen sind 9 Wochen alte Kulturen verwendet worden. Die Pflanzen aus den Gewächshauskulturen waren 15 Wochen alt und gingen auf *in vitro*-Kulturen zurück, die in Erdmischung umgesetzt und mit Hoaglandlösung im Gewächshaus weiterkultiviert worden waren.

Für die Experimente wurden von den *in vitro*-Kulturen nur die mittleren Blätter der aus den Meristemen regenerierten Sprosse eingesetzt, von den Gewächshauskulturen jeweils das jüngste ausgewachsene Blatt. Die Blätter der *in vitro*-Kulturen wurden unzerteilt verwendet, während von den Gewächshauskulturen Blattscheiben (Durchmesser 1cm, ohne Hauptrippen) ausgestanzt wurden. Die Blätter/Blattscheiben wurden invers in autoklavierte Petrischalen mit MS-Medium (*in vitro*-Kulturen) oder Filterpapier (Gewächshauskulturen) gelegt (ca. 1 g Blattmasse/Petrischale). Das Filterpapier war mit HEPES-Puffer (5 mM, pH 5,5) getränkt worden, der mit  $\text{CaCl}_2$  (3,5 mM) und KCl (25 mM) versetzt wurde.

### • Bestrahlung des Blattmaterials

Die Blattscheiben wurden mit einer UV-Lampe ( $\lambda=254$  nm) in einem Abstand von 10 cm zur Lichtquelle bestrahlt. Sofort nach der Bestrahlung (Nullproben ohne Bestrahlung) wurden die Petrischalen mit den Blattscheiben im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Pflanzenproben bei -20 °C tiefgefroren.

### • Resveratrolextraktion

Alle Arbeiten wurden in einem abgedunkelten Labor durchgeführt, um eine photochemische Zerstörung des Resveratrols zu vermeiden. Nach Homogenisierung des Blattmaterials in 70% Methanol (3 ml/g FM), Zentrifugation (10 min, 4000 U/min) und zweimaliger Extraktion der Sedimente mit Methanol wurden die Überstände vereinigt und im Vakuumverdampfer bei 40°C bis zur Trockene eingeengt. Nach Aufnahme der Rückstände in Aqua bidest (3 ml) wurde zweimal mit Ethylacetat (jeweils 3ml) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt und eingeengt, die Rückstände in Methanol gelöst, filtriert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

### • HPLC-Analyse der Blattproben

Die Extrakte wurden über HPLC in Anlehnung an eine Methode von Hain et al. (1990) getrennt. Die Authentizität des *trans*-Resveratrols wurde über einen Vergleich der Retentionszeiten mit Standard-Substanz (*trans*-Resveratrol, Sigma), bzw. Co-Elution mit Standard nachgewiesen.

## ERGEBNISSE

### • Identifizierung des *trans*-Resveratrols

Das Stilben *trans*-Resveratrol konnte in UV bestrahlten Kartoffelblättern und anschließender Inkubation im Dunkeln bei 25 °C über HPLC durch Retentionszeitenvergleich bzw. Co-Elution mit *trans*-Resveratrolstandard nachgewiesen werden.

- *Abhängigkeit der Resveratrolsynthese von der UV-Bestrahlungsdauer*

Die Resveratrolsynthese konnte durch UV-Strahlung in Blättern von *Solanum tuberosum* L. induziert werden. Dabei war bei steigender Bestrahlungsdauer eine Erhöhung der Stilbenakkumulation zu verzeichnen (Abb. 1). Das Maximum wurde bei den Gewächshaus- und *in vitro*- Kulturen nach 6 min UV-Bestrahlung erreicht; bei einer UV-Einwirkung über längere Zeiträume waren die Resveratrolgehalte rückläufig, da der hohe Energieeintrag mit Gewebeschädigungen einherging.

- *Abhängigkeit der Resveratrolsynthese von der Inkubationszeit*

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Stilbenakkumulation nach vorheriger UV-Bestrahlung bei verschiedenen Genotypen wurden die Sorten 'Desiree' (Gewächshauskultur, 10 min UV-Licht) und 'Kennebec' (*in vitro*-Meristemkultur, 5 min UV-Licht) ausgewählt (Abb. 2). Der Verlauf der Resveratrolakkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit war bei den Gewächshaus- und *in vitro*-Kulturen beider Genotypen identisch und erreichte das Maximum nach 2 Tagen.

Die *in vitro*-Kulturen des Genotyps 'Desiree' waren im Vergleich zu den Gewächshauskulturen bei gleicher UV-Bestrahlungsdauer zur Akkumulation höherer Resveratrolmengen befähigt (Abb. 3).

- *Gegenüberstellung der Resveratrolgehalte verschiedener Genotypen von Solanum tuberosum L. bei in vitro- und Gewächshauskultivierung*

Der Abb. 4 zufolge ist eine Übereinstimmung der getesteten Genotypen in der Reihenfolge der akkumulierten Resveratrolmenge unabhängig von der Kultivierungsform aufzeigbar.

Dabei erwiesen sich die Sorten 'Kennebec' und 'Arran Consul' als höchste Stilbenakkumulatoren. So enthielten die Blätter von 'Kennebec' die höchsten Gehalte von 230 ng/g FM bei *in vitro*-Kultivierung bzw. 60 ng/g FM nach Gewächshauskultivierung in unserem Versuch.

Für die Sorten 'Kennebec', 'Arran Consul', 'Hansa', 'Desiree' und die Linie 3466 waren die Blätter aus *in vitro*-Kulturen zu einer höheren Stilbenakkumulation befähigt als die Blattscheiben der Gewächshauskulturen des entsprechenden Genotyps.

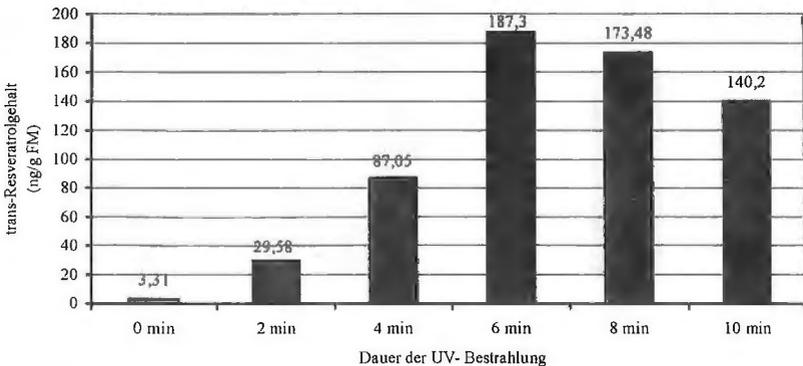


Abb. 1: Einfluß der UV- Bestrahlungsdauer auf die Resveratrolsynthese in Blättern der Sorte 'Kennebec' (*in vitro*-kultiviert) nach einer Inkubationszeit über 4 Tage

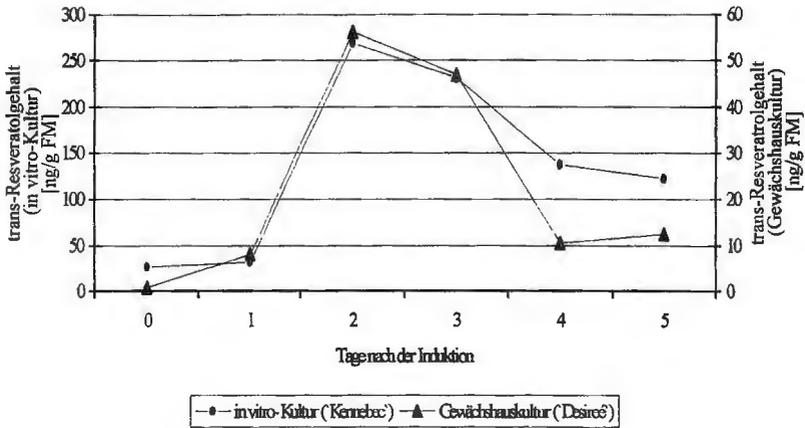


Abb. 2: Gegenüberstellung der Resveratrolsynthese in Blattgeweben von *in vitro*- Kulturen (5 min UV-Strahlung) und Gewächshauskulturen (10 min UV- Strahlung) bei 2 Genotypen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

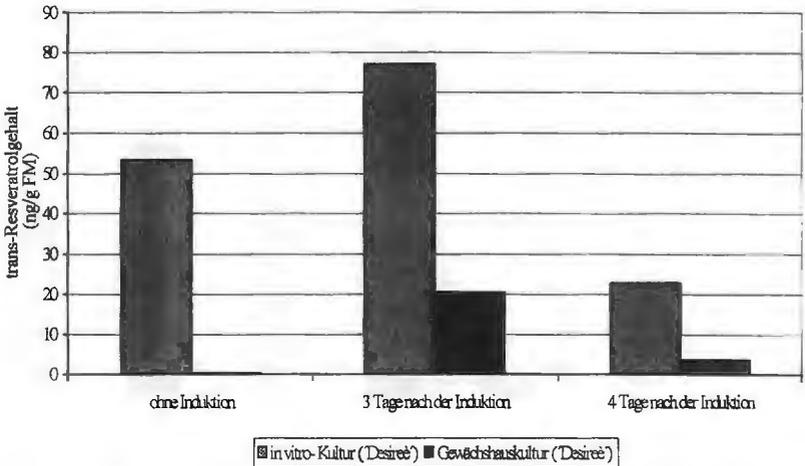


Abb.3: Gegenüberstellung der Resveratrolgehalte der Kartoffelsorte 'Désirée' als *in vitro*- und Gewächshauskultur nach erfolgter UV- Induktion über 5 min

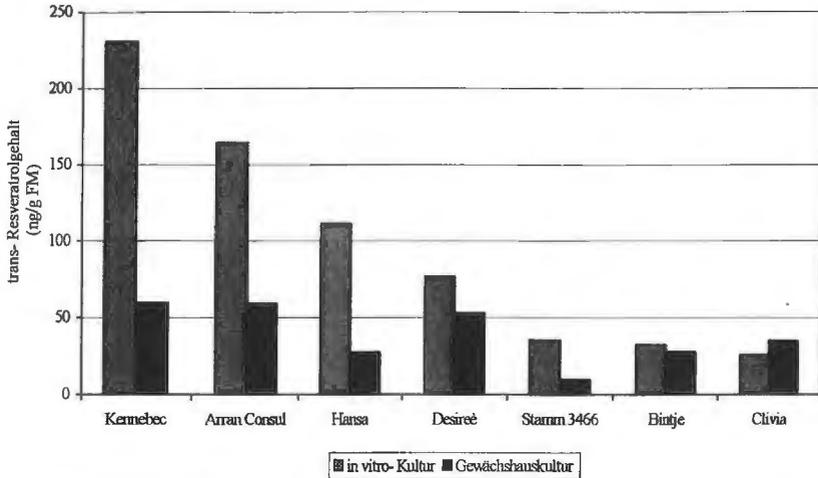


Abb. 4: *trans*-Resveratrolgehalte in Blättern unterschiedlicher Kartoffelgenotypen als *in vitro*- und Gewächshauskulturen 3 Tage nach der UV-Induktion

## DISKUSSION

Den vorgestellten Ergebnissen zufolge induziert UV-Strahlung nicht nur in Blättern von *Vitis vinifera*, sondern auch in Kartoffelblättern (*Solanum tuberosum* L.) die Resveratrolbildung. Dies konnte in vorangegangenen Untersuchungen auch durch qualitative Bestimmung des *trans*-Resveratrols über GC-MS-Analyse nach vorheriger Auftrennung über HPLC belegt werden (Ernst, 1996). Bei einer quantitativen Betrachtung der Resveratrolgehalte in Kartoffelblättern wird in der Literatur von bedeutend höheren Stilbenkonzentrationen bei *Vitis vinifera* berichtet (Dercks und Creasy, 1989; Langcake und Pryce, 1977). Die Versuchsbedingungen sind jedoch nicht vergleichbar.

Sehr interessant ist der Befund, daß einige Kartoffelgenotypen mit erhöhtem Resveratrolgehalt auch *Phytophthora*-resistenter sind als Sorten mit geringem Resveratrolbildungspotential. So werden 'Kennebec' und 'Arran Consul' in der Literatur als *Phytophthora*-widerstandsfähig beschrieben (Schick und Klinkowski, 1962; NIVAA, 1997). Eine Sorteneinteilung in Resistenzklassen, wie dies von der Dercks und Creasy (1989) für verschiedene Genotypen von *Vitis vinifera* vorgenommen wurde, kann zum heutigen Zeitpunkt für Kartoffelgenotypen jedoch noch nicht erstellt werden und bedarf daher weiterer Untersuchungen. Die Induktion der Resveratrolsynthese mit Hilfe der UV-Strahlung bei *in vitro*-Kulturen könnte möglicherweise eine für den Züchter interessante ergänzende Selektionsmethode zur Auffindung von resistenten Genotypen darstellen, da hier sehr genau dosierte Energiemengen je Flächeneinheit ausgebracht werden können, was demzufolge eine gleich starke Induktion der Stilbenbildung hervorruft. Durch den Einsatz von *in vitro*-Kulturen werden überdies weitere Induktionsmöglichkeiten (z.B. Pathogenbefall) ausgeschlossen.

In unseren Experimenten konnten die Ergebnisse von Barlass et al. (1987) nicht bestätigt werden, wonach der Elicitor UV-Licht bei *in vitro*-Kulturen nicht einsetzbar ist. Bei diesen

Untersuchungen wurden Blätter von *Vitis vinifera* eingesetzt, welche durch zu hohe UV-Dosen starke Schädigungen in Form von Nekrosen aufwiesen. Bei der Anwendung der UV-Bestrahlung für *in vitro* kultivierte Genotypen von *Solanum tuberosum* L. waren nach 6 minütiger UV-Strahleneinwirkung und 2-tägiger Inkubation (entspricht Optimum der Resveratrolakkumulation) lediglich anfängliche Chlorosen bei guter Gewebespannung feststellbar.

Für die Zukunft wären als Forschungsaufgaben Screening-Tests zur Resveratrolbildung wünschenswert, um die Resistenzproblematik bei verschiedenen Kartoffelsorten besser aufzuklären. Durch die Wahl widerstandsfähiger Genotypen könnte Einfluss auf die Knollenqualität genommen werden, da durch den verringerten Fungizideinsatz die Rückstandsproblematik gemindert wird. Betrachtet man die im Vergleich zum Wein geringen Stilbengehalte der hier untersuchten Kartoffelsorten, so ist es vorstellbar, daß über die Kartoffel als Grundnahrungsmittel sowie durch Züchtung auf ein gesteigertes Resveratrolakkumulationsvermögen die Versorgung des Menschen mit phytoprotektiven Stoffen verbessert werden kann.

## LITERATUR

- Adrian, M., Jandet, P., Bessis, R., Joubert, M.J. (1996): J. Agric. Food Chem. 44. 1979-1981  
Barlass, M., Miller, R.M., Douglas, T.J. (1987): Am. J. Enol. Vitic. 38. 65-68  
Blaich, R., Bachmann, O. (1980): Vitis 19. 230-240  
Dercks, W., Creasy, L.L. (1989): Physiol. Mol. Plant Pathol. 34. 189-202  
Ernst, S. (1996): Diplomarbeit, Universität Jena  
Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., Jameson, J.L. (1997): Proc. Natl. Sci. USA. 14138-14143  
Hain, R., Bieseler, B., Kindel, H., Schröder, G., Stöcker, R. (1990): Plant Mol. Biol. 15. 325-335  
Hoos, G. (1988): Dissertation, Universität Karlsruhe  
Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.V. (1997): Science 275, 218-220  
Langcake, P., Pryce, J. (1977): Phytochemistry 16, 1193-1196  
Lippmann, B., Mascher, R., Balko, Ch., Bergmann, H. (1999): Journal of Applied Botany Jg.74, Heft1 (in press)  
Mascher, R. (1999): Diplomarbeit, Universität Jena  
Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M. (1997): J. Clin. Lab. Anal. 11. 287-313  
Stahl, D., Lippmann, B., Leinhos, V., Maser, A., Dettendorfer, J., Gunstheimer, S., Ernst, S., Bergmann, H., Hilscher, H. (1996): In XXXI. Vortragsstagung der DGQ. Pflanzliche Lebensmittel e.V., 203-206  
NIVAA (Hrsg.) (1997): Niederländischer Katalog der Kartoffelsorten. Den Haag  
Schick, R., Klinkowski, M. (1962): Die Kartoffel. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag  
Stein, U., Hoos, G. (1984): Vitis 23. 179-194  
Synold, T.W., Doroshov, J.H. (1998): 89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. New Orleans. USA. 422



## Verteilung von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in Äpfeln der Sorte ‚Braeburn‘

M. Chennan und J. Streif

*Institut für Obst-, Gemüse- und Weinbau, Bavendorf, Universität Hohenheim  
D-88213 Ravensburg, mchennan@uni-hohenheim.de*

### **Distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in ‚Braeburn‘ apples**

#### **Abstract**

High-performance liquid chromatography was applied to the determination of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHA) in different sectors of Braeburn apples. DHA was determined after reduction to ascorbic acid with dithiothreitol. The results pointed to quantitative differences in the concentrations of AA and DHA in different parts of the apples: peel, cortex, core at the light side and shadow side of the stem half and the calyx half. Concentrations of AA were higher in more coloured fruits than in poorly coloured fruits. AA content is 5-fold higher in peel than in core. The distribution of DHA component in apples didn't show a continuity as the distribution of AA content. High concentrations of DHA fraction was found in highly coloured fruits. The content of DHA in core, however, was very low or absent. The ratio DHA/AA as indicator for the redox status was similar in peel and cortex in highly coloured fruits and in poorly coloured fruits.

#### **Einleitung**

Ascorbinsäure (AA) ist ein ernährungsphysiologisch bedeutsamer Bestandteil in Apfelfrüchten und spielt im zelleigenen Abwehrsystem gegenüber freien Radikalen eine wesentliche Rolle. Ascorbinsäure kann mit reaktiven Sauerstoffspezies reagieren und wird dabei selbst unter Inaktivierung von zwei Äquivalenten freier Radikale zur Dehydroascorbinsäure (DHA) oxidiert. DHA ist nicht sehr reaktiv, was eine Voraussetzung für ein effizientes Antioxidanz ist, andererseits kann DHA in einem Reaktionszyklus zu AA zurückreduziert werden (Foyer und Halliwell, 1976). Kann aufgrund von Stoffwechsellstörungen in den Zellen DHA nicht mehr in AA zurückverwandelt werden, dann wird DHA in die nächste Abbaustufe zu 2,3-Diketogulonsäure überführt, was eine irreversible Reaktion ist. Der DHA-Anteil in Pflanzengewebe kann in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie Alterungsprozess, pH-Wert in den Zellen, Temperatur, Lagerungsbedingungen höher als der AA-Anteil sein (Mc Gill et al., 1966; Gil et al., 1999), aber die Vitamin C-Wirksamkeit geht dabei nicht verloren. Da der überwiegende Teil an Vitamin C in den Früchten als AA vorliegt, beschränkt sich die Bestimmung oft nur auf diese Komponente. Der Quotient DHA/AA spielt eine wichtige Rolle als Indikator für den Redox-Status von Zellen (Sofic et al., 1991;

Lentheric et al., 1999). Bei der Oxidation von AA kann es zur Änderung des Verhältnisses AA zu DHA kommen, was lediglich anhand der AA-Bestimmung nicht erkannt werden und dadurch zu falschen Aussagen führen kann (Mokady et al., 1984). Aus diesem Grund untersuchten wir in dieser Arbeit die Verteilung beider Komponenten - AA und DHA - in verschiedenen Sektoren von Äpfeln der Sorte ‚Braeburn‘.

### Material und Methode

Die Probenahme erfolgt gleich nach der Ernte. Anhand der Ausfärbung der Fruchtschale wurden die Äpfel in zwei Fruchtqualitäten eingeteilt:

**Q1:** Gut ausgefärbte Äpfel mit >90 % Deckfarbe

**Q2:** Schwach ausgefärbte Äpfel mit lediglich <30% Deckfarbe

Von jeder Frucht wurden von der Sonnen- und der Schattenseite sowie von der Stiel- und der Kelchhälfte Proben aus den Bereichen Fruchtschale (außen), Fruchtfleisch (Mitte) und Kernhaus (innen) genommen, insgesamt 12 Sektoren.

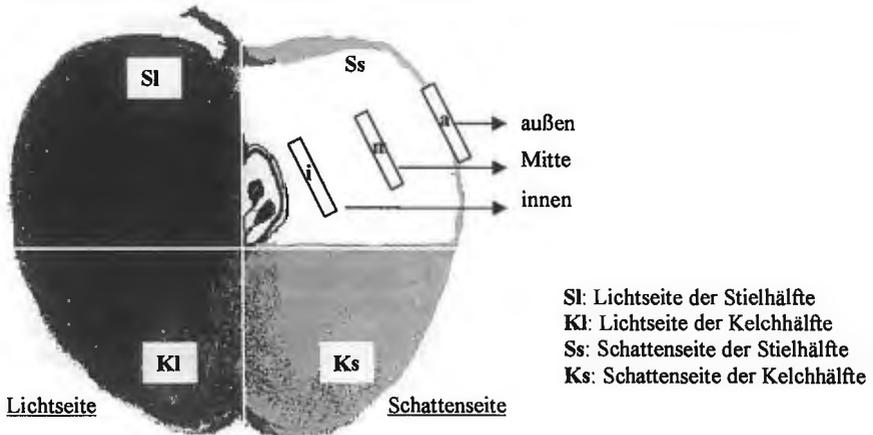


Abb. 1: Untersuchte Fruchtsektoren bei Braeburn.

Für jeden untersuchten Fruchtsektor wurde eine Mischprobe aus 20 Äpfeln genommen. Die klein geschnittenen Fruchtsektoren wurden sofort im flüssigem Stickstoff eingefroren und lichtgeschützt bei  $-18^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Proben wurden in gefrorenen Zustand gemahlen und mit Extraktionspuffer (5% Metaphosphorsäure) im Verhältnis 1:2 (g/ml) gemischt, homogenisiert und bei 14 000 U/min, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert ( $0,45\ \mu\text{m}$ ) und davon  $20\ \mu\text{l}$  injiziert. Alle Arbeitsschritte erfolgten im Dunkeln bei max.  $5^{\circ}\text{C}$ . Um Gesamt-AA (Vitamin C) zu bestimmen wurde DHA mit 10 mM Dithioeritrol in 0,5 M Tris-Puffer reduziert (modifizierte Methode nach Lykkesfeldt, 1995). DHA wurde aus der Differenz von Gesamt-AA und AA berechnet. Die HPLC-Analyse erfolgte bei folgenden Bedingungen: Säule: Prontosil 60-5-C18 ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4,0\ \text{mm}$ ); Eluent: 2,5 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfate und 55 ml Methanol in 1 L dest. Wasser (Veltman et al., 1999); Flußrate: isokratisch, 1ml/min; Detektor: UV 254 nm.

## Ergebnisse und Diskussion:

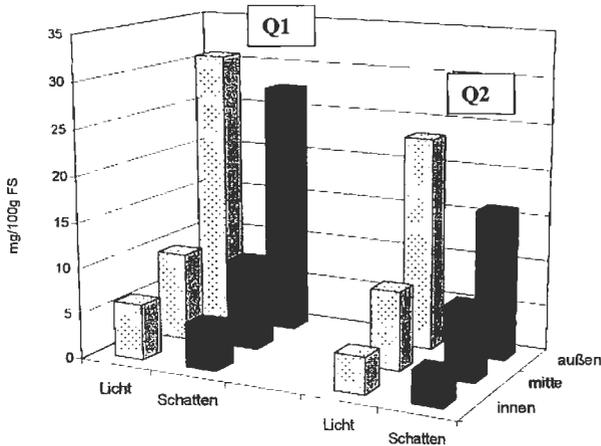


Abb. 2: Vergleich des Gehalts an Vitamin C in verschiedenen Fruchtsektoren von Äpfeln Braeburn Q1 (>90 % Deckfarbe) und Braeburn Q2 (<30 % Deckfarbe)

Die Untersuchungen erfolgten an Braeburn-Äpfeln, einer Sorte, die sich durch überdurchschnittlich hohe Vitamin C Werte auszeichnet.

Die Ergebnisse zeigten, dass gut ausgefärbte Äpfel einen deutlich höheren Gehalt an AA und Vitamin C aufweisen als schwach ausgefärbte Äpfel (Abb. 2). In der Kelchpartie (außen, Mitte, innen) auf der Sonnenseite der Äpfel war deutlich mehr Vitamin C nachweisbar als auf der Schattenseite (Abb. 3). Nach einer längeren Periode der Sonneneinstrahlung beinhalten stärker belichtete Blätter einen höheren Gehalt an Ascorbinsäure als weniger stark belichtete Blätter (Foyer, 1993) und der Gehalt an AA in den Früchten ist ebenfalls höher (Stoll, 1997). In der Stielpartie war die gemessene Konzentration an Vitamin C leicht niedriger als in der Kelchpartie (Abb. 3). Ausgehend vom Fruchtschalbereich nahm die Konzentration an AA nach innen zum Kernhaus hin um etwa das fünffache ab. Die höchsten Gehalte an Vitamin C waren bei Braeburn Q1 in der Kelchpartie nachweisbar (31,4 mg/100 g FS).

Die Verteilung der DHA-Fraktion in den untersuchten Fruchtsektoren zeigte dagegen keine so schlüssige Kontinuität wie die der AA-Fraktion.

AA wird reversibel zu DHA oxidiert. Diese Reaktion wird stark vom pH-Wert beeinflusst, und schon eine geringere Sauerstoffmenge kann das Reaktionsgleichgewicht ändern (Mc Gill et al., 1966; Lykkesfeldt et al., 1995; Levine et al., 1999). Wir fanden in allen untersuchten Fruchtsektoren eine hohe Konzentration an AA und eine niedrigere Konzentration an DHA, was in der Literatur als natürliches Gleichgewicht in Früchten und Blättern beschrieben wird (Agar, 1991; Gil et al., 1999). Die höchsten Werte an DHA wurden bei Braeburn Q1 im Schalenbereich der Stielhälfte gemessen (bis 7 mg DHA/100g FS). Im Kernhausbereich war kaum DHA nachweisbar, was vermutlich auf eine geringere Aktivität der Redox-Reaktion zurückzuführen war. Der Quotient DHA/AA als Indikator für die antioxidative Reaktion war bei Braeburn Q1 und Q2 für den Bereich Fruchtschale als auch für den Bereich Fruchtfleisch praktisch gleich (Tab. 1).

Tab. 1: Verteilung von AA und DHA (mg/100g FS) in Schale (außen), Fruchtfleisch (Mitte) und Kernhaus (innen) bei Braeburn Q1 und Braeburn Q2

Sektoren	Braeburn Q1			Braeburn Q2		
	AA* mg/100g	DHA* mg/100g	DHA/AA Ratio	AA* mg/100g	DHA* mg/100g	DHA/AA Ratio
außen	25,07	4	0,15	18,6	1,5	0,08
Mitte	8,8	0,9	0,10	7,4	0,9	0,12
innen	5,25	0,15	0,02	3,8	-	-

-: keine DHA nachweisbar.

\*: Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4 Sektoren der Kelch- und Stielhälfte (Kl, Ks, Sl, Ss, siehe Abb.1)

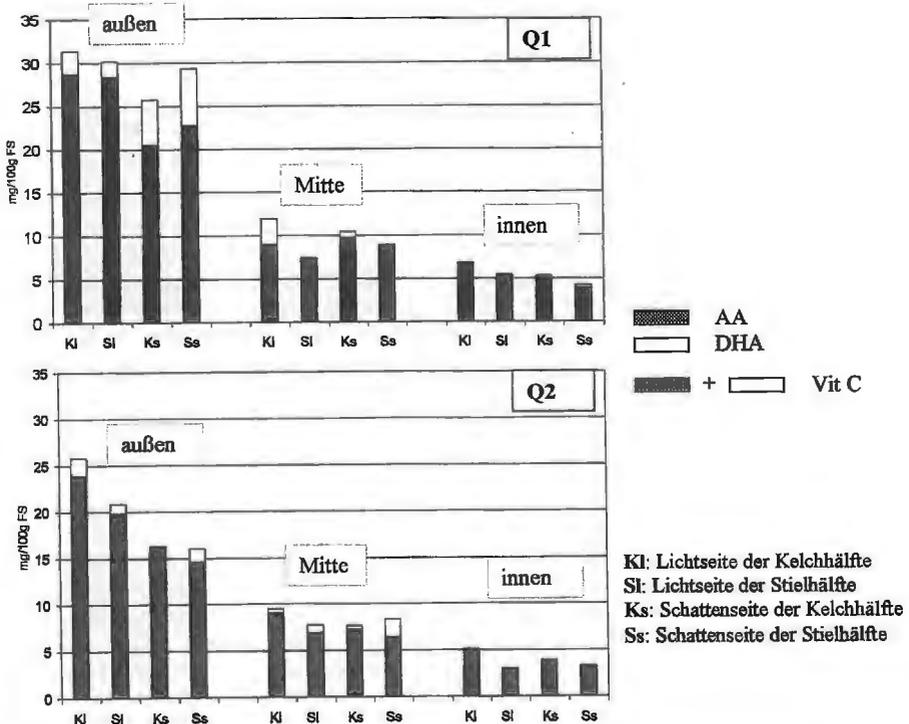


Abb. 3: Konzentration von Ascorbinsäure (AA) und Dehydroascorbinsäure (DHA) in verschiedenen Fruchtsektoren von Braeburn Q1 (>90% Deckfarbe) und Braeburn Q2 (<30% Deckfarbe)

## Literatur

- AGAR, I. T., 1991: Qualitätserhaltung bei verschiedenen Beerenobstarten durch Lagerung in Kontrollierter Atmosphäre (CA) und in erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, unter besonderer Berücksichtigung des Vitmain C-Gehalts und der Entstehung von Fremdgeschmack (Off-flavor). Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- FOYER, C. H., 1993: Ascorbic acid. In: Antioxidants in higher plants. R. G. Alscher, J. L. Hess (eds). Boca Raton: CRC Press, pp. 31-58.
- FOYER, C. H. and B. HALLIWELL, 1976: Presence of glutathione reductase in chloroplast. A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.
- GIL, M.I., F. FERRERES and F. A. TOMAS-BARBERAN, 1999: Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2213-2217.
- LENTHERIC, I., E. PINTO, M. VENDRELL und C. LARRIGAUDIÈRE, 1999: Harvest date affects the antioxidative systems in pear fruits. *J. Hort. Sci. & Biotech.* **74**, 791-795.
- LEVINE, M., W. YAOHU and S.C. RUMSEY, 1999: Analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. *Meth. Enzym.* **299**, 65-76.
- LYKKESFELDT, J., S. LOFT and H. E. POULSEN, 1995: Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection – Are they reliable biomarkers of oxidative stress? *Anal. Biochem.* **229**, 329-335.
- MC GILL, J. N., A. I. NELSON and M. P. STEINBERG, 1966: Effects of modified storage atmospheres on ascorbic acid and other quality characteristics of spinach. *J. Food Science* **31**, 510-517.
- MOKADY, S., U. COGAN and L. LIEBERMANN, 1984: Stability of vitamin C in fruits and fruit blends. *J. Sci. Food Agric.* **35**, 452-456.
- SOFIC, E., P. RIEDERER, R. BURGER, W. GSELL and G. HEUSCHNEIDER, 1991: Determination of glutathione, glutathione disulphide, ascorbic acid and dehydroascorbic acid in tissues by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Anal. Chem.* **339**, 258-260.
- STOLL, K., 1997: *Der Apfel*. Enrico Negri- Verlag, Zürich, pp 303.
- VELTMAN, R. H., M. G. SANDERS, S. T. PERSIJN, H. W. PEPPELENBOS and J. OOSTERHAVEN, 1999: Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). *Physiol. Plantar.* **107**, 39-45.





## Aminosäuren - Funktionelle Inhaltsstoffe von Pflanzenprotein Veränderungen der Aminosäuregehalte von weißen Bohnen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen

*Peter Stolz<sup>1</sup>, Jürgen Strube<sup>1</sup>, Markus Buchmann<sup>2</sup> und Christian Hiss<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Kwalis Qualitätsforschung Fulda GmbH, Fuldaer Str. 21 D-36169 Dipperz

<sup>2</sup> Forschungsprojekt Qualitätsuntersuchung, M. Buchmann, Usterstr. 70, CH-8330 Pfäffikon,  
C. Hiss, Hauptstraße 140, D 79356 Eichstetten

*Amino Acids - Funktional Components of Plant Protein; Changes of Amino Acid Content of  
Haricot Beans Under Different Cultivation Conditions*

*Haricot beans from biodynamic and from hydroponic (without earth) cultivation were analysed for their amino acid content. The hydroponic cultivars produced higher kjehldal nitrogen content and total essential amino acid content. The biodynamic cultivars produced a more balanced amino acid content and therefore a higher chemical-score-value of protein quality.*

Biodynamisch und in Hydrokultur (erdelos) gezogene weiße Bohnen aus kontrolliertem Anbauversuch wurden auf ihre Aminosäuregehalte untersucht. Die Auswertung des Chemical-Score ergab bei den erdelos gezogenen Proben zwar höhere Rohproteingehalte und eine höhere Gesamtsumme an essentiellen Aminosäuren, die biodynamisch gezogenen Bohnen wiesen jedoch eine ausgewogenere Aminosäurenverteilung und damit einen höheren Chemical-Score-Wert der Proteinqualität auf.

Die ernährungsphysiologische Funktion von Lebensmittelprotein besteht nach derzeitiger Kenntnis in der Versorgung des menschlichen Organismus mit essentiellen Aminosäuren sowie der Deckung des Gesamtstickstoffbedarfs zum Aufbau körpereigener Eiweiße und anderer Verbindungen, die zum normalen Wachstum und Leben des Organismus erforderlich sind (Pellet/Young 1988). Bestimmte Aminosäuren sind u.a. in ihrer Funktion als Vorstufen von Neurotransmittern als funktionelle Inhaltsstoffe anzusehen (Scheller 1997). Zur Auswertung der Ergebnisse der chemischen Untersuchung werden die gefundenen Aminosäuregehalte in

Bezug zum theoretisch ermittelten Bedarf (Referenzprotein) abgeleitet. Das hier angewandte Verfahren des Chemical-Score-Wertes wurde von der FAO zur Abschätzung der Proteinqualität verschiedener Lebensmittelproteine auf Basis der chemisch bestimmbarer Aminosäuregehalte vorgeschlagen (FAO 1973). In der Ernährungslehre ist es als ein Verfahren zur Abschätzung der Proteinqualität bekannt (Elmadfa/Leitzmann 1990)

Zur Frage möglicher Qualitätsunterschiede pflanzlicher Lebensmittel aus erdelosem (hors sol) Anbau (hs) im Vergleich zu biodynamischem Anbau (bd) war in den Jahren 1997 und 1998

ein Anbauversuch von weißen Bohnen in Nachbau und Wiederholung beider Wirtschaftsweisen durchgeführt worden (Buchmann et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse der Untersuchungen zur Veränderung der Proteinqualität dargestellt. Für die vorliegende Untersuchung standen zwei Probenserien von weißen Bohnen aus dem Erntejahr 1998 zur Verfügung.

Die chemische Bestimmung der Aminosäuregehalte erfolgte nach VDLUFA (Methode 4.11.1) mittels HPLC nach saurer Hydrolyse, die Bestimmung von Methionin und Cystein nach vorheriger Oxidation, die Rohproteinbestimmung nach Kjehldal (VDLUFA 4.1.)

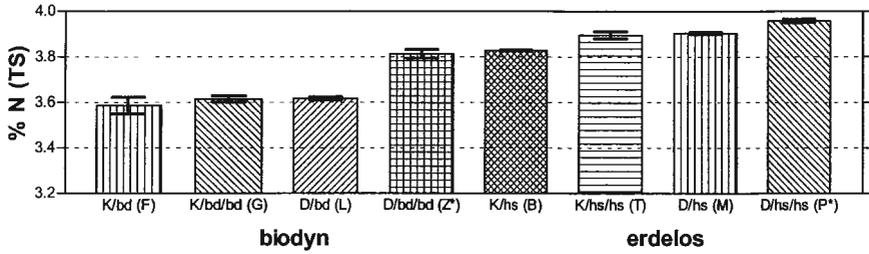
Bei den Rohproteingehalten ergaben sich für die Proben aus erdelosem Anbau erwartungsgemäß erhöhte Werte. Außerdem wiesen diese Proben bei der Gesamtsumme der essentiellen Aminosäuren am Gesamtprotein erhöhte Anteile auf. Die Gehalte der bei Bohnenprotein limitierenden schwefelhaltigen Aminosäuren (Belitz/Grosch 1992) lagen bei den biodynamischem Proben höher. Daher wurde bei den biodynamisch erzeugten Bohnen eine um ca. 3 % höhere Proteinqualität, berechnet als Chemical-Score-Wert, gefunden.

Die Abbildungen zeigen die Stickstoff- bzw. Methioningehalte der untersuchten Proben. Der Versuch lieferte Proben aus Wiederholung bzw Nachbau jeweils mit konventionellem bzw. Demeter-Saatgut

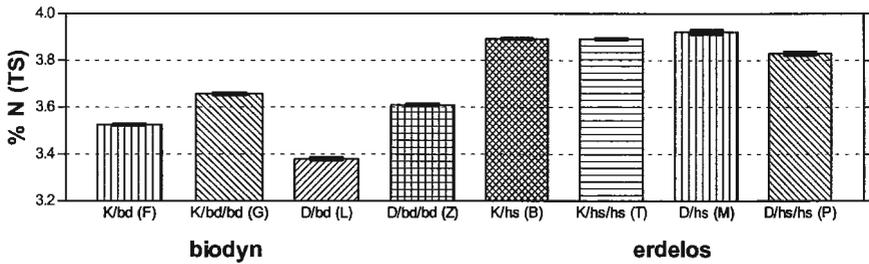
Die Hydrokultur mit Anbau in Nährlösung anstelle von Erde konfrontiert die Pflanze mit einem höheren Angebot an gelösten Mineral-, insbesondere Stickstoffsalzen. Als Konsequenz daraus bildet die Pflanze im allgemeinen mehr Rohprotein, im speziellen relativ mehr sogenanntes Reserveprotein. Das Reserveprotein der Bohne ist reich an Glutamin, Asparagin und Arginin (Mengel 1991). Da Asparagin und Glutamin bei der Hydrolyse zerstört werden, kann nur Arginin als Indikator für den Reserveproteingehalt in Frage. Die erdelos erzeugten Bohnen wiesen im Mittel mit 4,46 mol % gegenüber den biodynamisch erzeugten Bohnen (4,29 mol%) einen um 4 % höheren relativen Arginingehalt auf. Die Stickstoff (Rohprotein-) gehalte der erdelos erzeugten Varianten lagen mit im Mittel 3,89 % N gegenüber den biodynamisch gezogenen mit 3,60 % um 8,05 % höher. Die Methioningehalte der erdelos erzeugten Varianten (s.o.) lagen mit im Mittel 22,31  $\mu\text{mol/g}$  TS gegenüber den biodynamisch gezogenen mit 21,18  $\mu\text{mol/g}$  TS um 5,34 % höher. Die Cysteingehalte der erdelos erzeugten Varianten (ohne Abb.) lagen mit im Mittel 17,80  $\mu\text{mol/g}$  TS gegenüber den biodynamisch gezogenen mit 17,95  $\mu\text{mol/g}$  TS um 0,84 % niedriger. Durch den Anstieg der Rohproteingehalte um ca. 8 %, gegenüber dem geringeren Anstieg von Methionin und einem etwa gleichen Cysteingehalt, liegt in der Summe ein geringerer relativer Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren vor. Da diese bei Bohnenprotein die limitierenden Aminosäuren sind, resultiert ein geringerer Chemical-Score-Wert für die Proteinqualität.

In der Tabelle sind die Gehalte essentieller Aminosäuren verschiedener Lebensmittel je Gramm Protein mit den Chemical-Score-Werten dargestellt (nach Cheftel 1992 modifiziert). Beispielhaft sind den Literaturangaben für Hühnerei, Rindfleisch und Weizen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung gegenübergestellt. Als Maß für die unterschiedliche ernährungsphysiologische Qualität von Bohnen verschiedener Anbauweisen dienen Aminosäuregehalte und daraus berechneten Chemical-Score-Werte. Bohnen aus erdelosem Anbau weisen zwar in der Summe einen höheren Gehalt an essentiellen Aminosäuren auf, der höhere Gehalt der limitierenden schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein im Verhältnis zum Gesamtprotein bedingt jedoch einen um 2,63 Prozentpunkte und damit 3,58 % höheren Chemical-Score-Wert der Proteinqualität von biodynamischen Bohnen

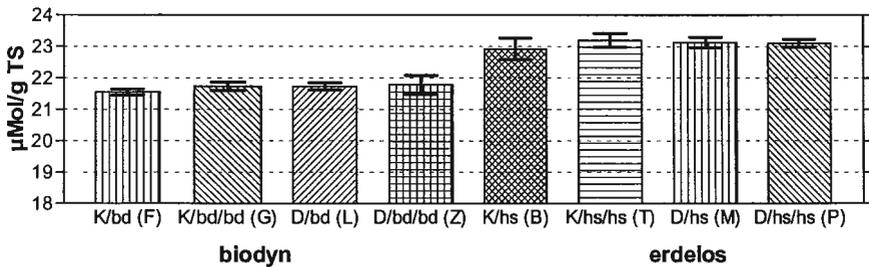
### Stickstoffgehalte Bohnen biodyn/erdelos 1. Probenserie



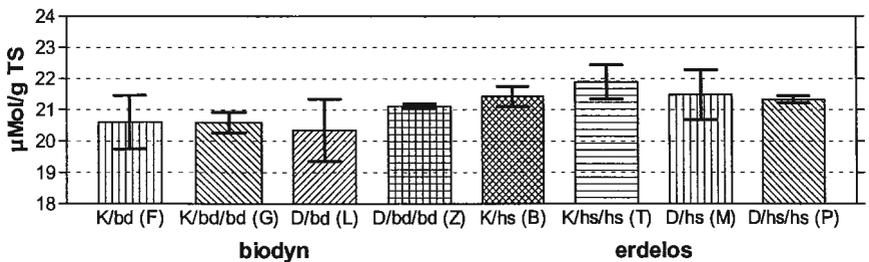
### Stickstoffgehalte Bohnen biodyn/erdelos 2. Probenserie



### Methioningehalte Bohnen biodyn/erdelos 1. Probenserie



### Methioningehalte Bohnen biodyn/erdelos 2. Probenserie



## Chemical-Score-Werte verschiedener Lebensmittel modifiziert nach Cheftel 1992

Aminosäure (mg/g Protein)	FAO 1973 Ref.-Prot.	Hühnerei ( <sup>1</sup> )	Rind- fleisch( <sup>1</sup> )	Weizen ( <sup>1</sup> )	Bohnen biodyn( <sup>2</sup> )	Bohnen erdelos( <sup>2</sup> )
Histidin	0	22	34	25	29,75	29,51
Isoleucin	40	54	48	35	46,70	47,00
Leucin	70	86	81	72	85,30	87,01
Lysin	55	70	89	31( <sup>3</sup> )	70,76	72,24
Methionin +Cystein	35	57	40	43	26,61( <sup>3</sup> )	25,69( <sup>3</sup> )
Phenylalanin +Tyrosin	60	93	80	80	95,08	94,88
Threonin	40	47	46	31	52,81	53,64
Tryptophan	10	17	11	12	11,54( <sup>1</sup> )	10,82( <sup>1</sup> )
Valin	50	66	50	47	53,09	53,77
Summe ess. AS ohne His	360	490	445	351	440,89	445,05
Chemical-Score (FAO)		100 %	100 %	56 %	76,01 %	73,39 %

(1) = Literaturwerte; (2) = Ergebnisse dieser Arbeit; (3) = limitierende Aminosäure, wenn einzige Proteinquelle

### Literatur

- Belitz, H.D., Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer Verlag Berlin 1992
- Buchmann, M.; Hiss, Ch.; Elers, B.: Qualitätsforschung am Beispiel bodenunabhängiger Kulturverfahren im Vergleich mit biodynamischer Wirtschaftsweise. Eigenverlag 1999
- Cheftel, J.-C., Cuq, J.L., Lorient, D.: Lebensmittelproteine: Biochemie, Funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, Chemische Modifizierung. Behr's Verlag Hamburg 1992
- Elmadfa, I., Leitzmann, C.: Ernährung des Menschen. Ulmer-Verlag Stuttgart 1990
- FAO/WHO, 1973: Energy and protein Requirements. Report of a joint FAO/WHO ad hoc expert committee. World Health Organization Techn. Rep. Ser 522, WHO Genf 1973
- Mengel, K.: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze; Gustav Fischer Verlag Jena 1991 S. 157
- Scheller, E.: Die Bedeutung der Proteinqualität für die Ernährung der Nerven. Erfahrungskunde 46 (1997) S. 136 -143
- Verband deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Methodenbuch Band III; 4 Ergänzungslieferung 1997. VDLUFA Verlag Darmstadt 1997



## Zur Qualität von Frühmöhren aus einem biologisch-dynamischen Züchtungsprojekt

I. Hagel<sup>1</sup>, D. Bauer<sup>2</sup>, S. Haneklaus<sup>3</sup>, E. Schnug<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut für biologisch-dynamische Forschung, Brandschneise 5, D-64295 Darmstadt

<sup>2</sup>Dottenfelderhof, Bad Vilbel

<sup>3</sup>Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig

### *Quality of Summer Carrots from a Biodynamic Breeding Project*

#### **Abstract**

14 different varieties of summer carrots (modern cultivars and selected types, F1-Hybrids) were grown in 1998. After only one year of selection the types MICHEL (Bauer) and FRÜHBUND (Bauer) selected from the modern cultivars MICHEL (Sperli) and FRÜHBUND (Sperli) showed higher contents of dry matter, N, P, K, S, Mg, Ca and saccharosis and lower contents of nitrate and monosaccharides. This progress was related to an improved maturity of the crop. This development can be regarded as a better degree of maturity.

#### **Einleitung**

Die Düngungs- und damit auch die Nährstoffverhältnisse des biologisch-dynamischen sind von denen des konventionellen Landbaus sehr verschieden. Schon aus diesem Grunde ist zu vermuten, daß Sorten, die auf nährstoffreichen Böden konventioneller Züchtungsbetriebe selektiert werden, nicht zwangsläufig für die Verhältnisse des ökologischen Landbaus geeignet sein müssen. Zudem werden für biologisch-dynamische Produkte hinsichtlich ihrer anzustrebenden Qualitätseigenschaften durchaus andere Schwerpunkte gesetzt: Eigenschaften, die eine genügende Ausreifung und Bewältigung des inneren Stoffwechsels der Pflanze anzeigen (z.B. niedrigere Nitrat- und höhere Zuckergehalte), werden neben den Zielen hoher Erntemengen und technologischer Eigenschaften des Produkts (z.B. einheitliche Größe) vor- bzw. gleichrangig verfolgt.

Aus diesen Gründen ist es sehr zu begrüßen, daß seit einigen Jahren die biologisch-dynamische Züchtungsarbeiten an Gemüse- und Getreidesorten sowie die Untersuchungen diesbezüglich intensiviert wurden (z.B. FLECK 2000, HAGEL 1997, HAGEL 1998 a und b). An dieser Stelle soll über die Untersuchung von Frühmöhren aus einem biologisch-dynamischen Züchtungsprojekt berichtet werden.

## Material und Methoden

14 verschiedene Frühmöhrentypen (moderne Zuchtsorten und daraus selektierte Linien, F1-Hybriden) wurden im Jahr 1998 unter biologisch-dynamischen Verhältnissen angebaut. Zur Untersuchung wurden an verschiedenen Stellen des feldmäßigen Anbaus Proben gezogen und zu einer Mischprobe vereinigt. Da im Vordergrund der Untersuchungen ein Vergleich der Qualitätseigenschaften der verschiedenen Sorten und selektierten Typen stand, wurden keine Erträge bestimmt.

Die Linien MICHEL (Bauer) und FRÜHBUND (Bauer) wurden durch nur einmalige Selektion aus den gleichnamigen Sorten der Firma Sperli gewonnen.

Das methodische Vorgehen bei der Selektionsarbeit orientierte sich nur an sensorisch erfaßbaren Parametern: Farbintensität und Durchfärbung der Möhre, innere Grünfärbungen, Farbe des Kambiumringes, Verhältnis von Rinde zum Zentralzylinder. Da der Möhrenkörper angeschnitten werden mußte, lag es nahe, auch eine Geschmacksbonitur durchzuführen. Dafür wurde im Verlauf der Arbeiten ein Boniturschema entwickelt, das sich an das 9-Punkte-Schema der DLG für sensorische Prüfungen anlehnt und im Züchtungsverlauf erweitert und verfeinert wurde. Auffallend war, daß bei herkömmlichen Sorten ca. 10 % der Möhren einen unangenehmen Geschmack aufwiesen.

Für die Analysen wurde ein Aliquot der Ernte (ca. 2,5 kg Möhren) gewaschen, geschnitten und homogenisiert und der Gehalt an Trockenmasse (TM) und N (nach Kjeldahl) bestimmt. Nitrat- und Zuckergehalte wurden photometrisch in den Extrakten mittels Enzymtests der Firmen Merck und Boehringer bestimmt. Die Quantifizierung der Mineralstoffe erfolgte über Röntgenfluoreszenzanalyse nach SCHNUG und HANEKLAUS (1992). Der Trockenmasserverlust (% der TM in der eingewogenen Frischmasse (FM) nach mikrobieller Zersetzung der geschnittenen Möhren (nach 7 Tagen Inkubation von ca. 35 g FM bei Raumtemperatur in Petrischalen) kann Hinweise auf die Lagerqualität geben und erfolgte nach REINHOLD (1942) und SAMARAS (1978).

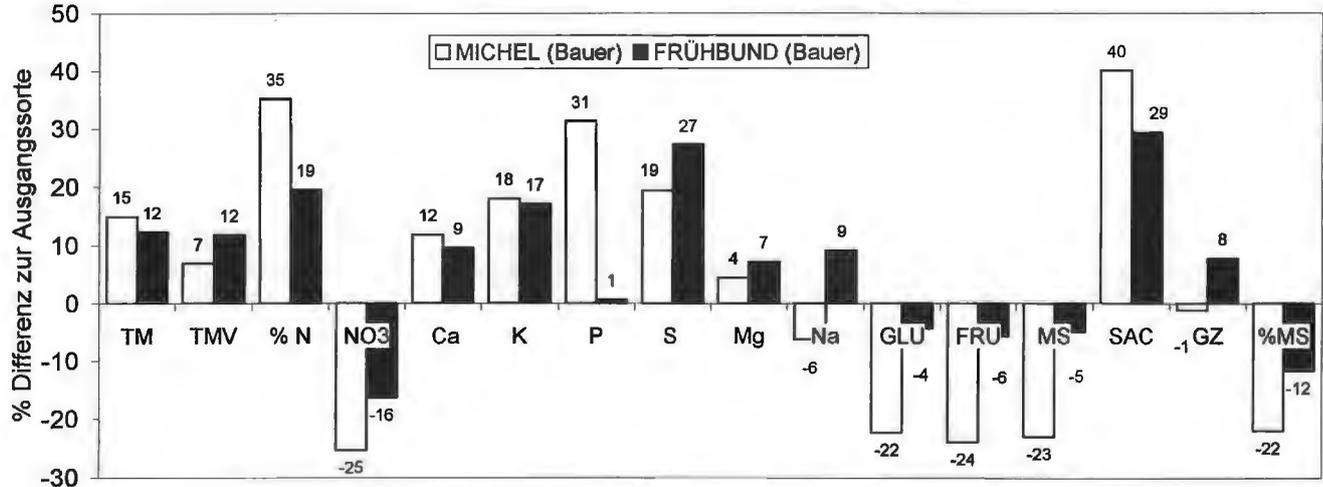
## Ergebnisse und Diskussion

Die höchsten Trockenmassegehalte aller untersuchten 14 Frühmöhrenvarianten wiesen die aus den konventionellen Sorten MICHEL (Sperli) und FRÜHBUND (Sperli) selektierten Sorten MICHEL (Bauer) und FRÜHBUND (Bauer) auf, mit jeweils 12,1 % TM (Tab. 1). Diese Steigerung um relativ 15 bzw. 12 % (Abb. 1) ist angesichts der einjährigen Selektionsarbeit beachtlich. Allerdings schlug sich nur bei der Variante FRÜHBUND (Bauer) dieser Zuwachs an Trockenmasse auch in höheren Gesamtzuckergehalten (8 % relative Steigerung gegenüber der Ausgangssorte) nieder. Somit wurden durch die Züchtungsarbeit neben den eigentlichen Zuckern auch andere Substanzen des Kohlenhydratstoffwechsels beeinflusst. Beobachtungen beim Schneiden der Möhren (geringeres Austreten von Flüssigkeit aus dem Raspelgut) lassen vermuten, daß es sich dabei um Zellwandbestandteile handeln könnte. Bei beiden Selektionen wurde gegenüber den Ausgangssorten allerdings der Anteil Monosaccharide am Gesamtzucker von 65,6 auf 51,2 % (MICHEL (Bauer)) bzw. von 63,2 auf 55,9 % (FRÜHBUND (Bauer)) gesenkt, was auf eine bessere Ausreife deutet. Auch die bei diesen zwei Selektionen (trotz höherer N-Gehalte) um 25 bzw. 15 % niedrigeren Nitratgehalte deuten auf einen intensivierten Eiweißstoffwechsels dieser selektierten Linien hin. Sehr hohe Nitratgehalte wiesen dagegen die Sorten AMSTERDAMER FINGER (298 ppm) und SCARLET NANTES (265 ppm) auf. Die F1-Hybriden BOLERO, ANGLIA und NANDA wiesen mit 112 – 137 ppm dagegen

**Tab. 1:** Trockenmasse (TM), % Trockenmasseverluste im Zersetzungstest (TMV), N-Gehalt in FM (% N), ppm Nitrat in FM (NO<sub>3</sub>), Mineralstoffgehalte (ppm in FM), Glucose (GLU), Fructose (FRU), Monosaccharide (MS), Saccharose (SAC), Gesamtzucker (GZ), % Monosaccharide vom Gesamtzucker von Frühmöhren (% MS). Zuckergehalte in % der FM.

Sorte	TM	TMV	% N	NO <sub>3</sub>	Ca	K	P	S	Mg	Na	GLU	FRU	MS	SAC	GZ	%MS
MICHEL (Bauer)	12,1	56	0,16	115	469	2333	359	226	131	484	1,67	1,30	2,97	2,83	5,79	51,2
MICHEL (Sperli)	10,5	53	0,12	155	419	1976	273	189	125	517	2,15	1,70	3,85	2,02	5,87	65,6
FRÜHBUND (Bauer)	12,1	51	0,14	156	422	2271	259	228	125	467	2,06	1,66	3,72	2,94	6,67	55,9
FRÜHBUND (Sperli)	10,8	46	0,12	186	385	1941	258	179	117	428	2,15	1,76	3,92	2,28	6,19	63,2
ERSTLING	10,8	55	0,16	171	411	2081	291	201	117	325	2,42	1,93	4,36	1,83	6,19	70,4
AMSTERD. FINGER	11,3	56	0,15	298	441	2323	314	166	115	351	2,34	2,14	4,48	1,50	5,99	74,9
NANTESKA	11,3	57	0,16	140	422	2658	333	190	130	199	1,95	1,63	3,58	2,39	5,97	59,9
SCARLET NANTES	9,8	50	0,12	265	423	1523	270	190	106	472	2,42	1,91	4,33	1,91	6,23	69,4
NANTES FANCY	10,5	46	0,12	161	395	1845	280	179	121	349	2,51	1,99	4,50	1,92	6,42	70,1
FANAL	9,9	52	0,12	180	419	1902	271	181	123	403	2,49	1,99	4,48	1,89	6,37	70,4
BABYLONG AD TREIB	10,8	51	0,14	165	385	2297	275	171	105	236	2,35	1,83	4,18	2,13	6,30	66,3
BOLERO F1	11,4	45	0,11	112	383	1930	228	131	93	365	2,15	1,72	3,87	2,99	6,86	56,4
ANGLIA F1	9,8	49	0,11	137	359	1632	229	155	98	441	2,35	1,73	4,08	2,02	6,10	66,9
NANDA F1	11,0	48	0,12	128	393	1695	249	158	104	479	2,24	1,62	3,86	2,85	6,72	57,5

Abb. 1: Relative Differenzen (% , gerundet) verschiedener Untersuchungsparameter der selektierten Möhrenlinien MICHEL (Bauer) und FRÜHBUND (Bauer) im Vergleich zu den Ausgangssorten MICHEL (Sperli) und FRÜHBUND (Sperli).  
Bauer, Sperli = Züchter der Vergleichssorten



*Erläuterungen:* Trockenmasse (TM), % Trockenmasseverluste im Selbstzersetzungstest (TMV), N-Gehalt in FM (% N), ppm Nitrat in FM (NO<sub>3</sub>), Mineralstoffgehalte (ppm in FM), Glucose (GLU), Fructose (FRU), Monosaccharide (MS), Saccharose (SAC), Gesamtzucker (GZ), % Monosaccharide vom Gesamtzucker von Frühhöhren (% MS). Zuckergehalte in % der FM.

eher niedrige Werte auf. Zwischen den N- und den Nitratgehalten aller Varianten bestand keine Beziehung. Dagegen wurde eine enge negative Beziehung zwischen den Nitrat- und den Saccharosegehalten beobachtet ( $r^2 = 49 \%$ ).

Die Selektionsarbeit führte auch zu fast durchweg höheren Mineralstoffgehalten (Tab. 1). Dabei fielen die relativen Zuwächse für P, K, S, Mg und Ca je nach Element und ausgelesener Variante (MICHEL (Bauer) bzw. FRÜHBUND (Bauer)) unterschiedlich hoch aus (Abb. 1): Mit, im Vergleich zu den Ausgangssorten um 4 – 7 % höheren Gehalten, lagen die Steigerungen für Mg in eher bescheidenem Rahmen.

Ob die o.a. bessere Gewebestruktur und Saffthaltefähigkeit des zerkleinerten Möhrenmaterials mit den um 9 – 12 % höheren Ca-Gehalten und einem evt. höheren Veresterungsgrad des Pektins in Beziehung stehen, bedarf näherer Untersuchung. Die Steigerungen für P waren mit 31 % für MICHEL (Bauer) beträchtlich, für FRÜHBUND (Bauer) dagegen war mit einem relativen Zuwachs von nur 1 % kein Züchtungserfolg zu verzeichnen. Auch für S fielen die Zuwächse mit 19 – 27 % unterschiedlich aus. Die Zuwächse für das mengenmäßig bei weitem dominierende Element K fielen mit 17 und 18 % nennenswert aus, unterschieden sich aber kaum. Möhren mit höheren K-Gehalten wiesen auch höhere TM-Gehalte ( $r^2 = 50 \%$ ) auf. Auch zwischen den N- und den K-Gehalten ( $r^2 = 72 \%$ ), den N- und P-Gehalten ( $r^2 = 76 \%$ ) sowie den S- und Mg-Gehalten ( $r^2 = 46 \%$ ) bestanden, z.T. enge, positive Beziehungen.

Im Gegensatz zu den untersuchten Herbstmöhren dieses Züchtungsprojektes (s. Beitrag in diesem Tagungsband) standen die Trockenmasseverluste im Zersetzungstest der Frühmöhren in starker positiver Beziehung zum N-Gehalt ( $r^2 = 72 \%$ ) sowie den Gehalten der Mineralstoffe P, K, S, Mg und Ca ( $r^2 = 40 - 67 \%$ ). Deshalb könnte eine Nährstoffwirkung auf die an den zerkleinerten Möhren sich entwickelnden Mikroorganismen vermutet werden. Dagegen spricht allerdings eine starke negative Beziehung zwischen den Gesamtzuckergehalten und den Trockenmasseverlusten ( $r^2 = 46 \%$ ).

### **Fazit**

Durch nur einmalige Selektion konnte der Gehalt an Trockenmasse, N, P, K, S, Mg, Ca und Saccharose, der aus den konventionellen Ausgangssorten MICHEL (Sperli) und FRÜHBUND (Sperli) selektierten Möhrenlinien MICHEL (Bauer) und FRÜHBUND (Bauer), beträchtlich gesteigert werden. Diese Entwicklung dürfte auf einen besseren Reifegrad zurückzuführen sein.

### **Literatur**

- FLECK, M. (2000): Qualitätsuntersuchungen an Möhrensorten aus einem Feldversuch an zwei Standorten des ökologischen Landbaus. Diplomarbeit, Gesamthochschule Kassel.
- HAGEL, I. (1997): Möhren: Bauen wir die falschen Sorten an? *Ökologie & Landbau* 1/1997; 42-43.
- HAGEL, I.; SPIESS, H. und E. SCHNUG (1998 a): Proteinqualität alter und moderner Winterweizensorten und -zuchtstämme. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V., XXXIII. Vortragstagung, 23./24. März 1998, Dresden, 165-170.

- HAGEL, I., H. SPIESS und E. SCHNUG (1998 b): Steigerung des ernährungsphysiologischen Wertes von Weizen für ökologischen Landbau. 110. VDLUFA-Kongreß, 14.-18.9.1998, Gießen, 235-238.
- REINHOLD, J. (1943): Die Haltbarkeit von Gemüse, ein wichtiger Qualitätsfaktor. Z. Pflanzenkrankh. PflSchutz 53, 175-199.
- SAMARAS, I. (1978): Nachernteverhalten unterschiedlich gedüngter Gemüsearten mit besonderer Berücksichtigung physiologischer und mikrobiologischer Parameter. Diss., Gießen.
- SCHNUG, E. and S. HANEKLAUS (1992): Sulfur and light element determination in plant material by x-ray fluorescence spectroscopy. *Phyton* 32, 123-126.



## Zur Qualität von Herbstmöhren aus einem biologisch-dynamischen Züchtungsprojekt

*I. Hagel<sup>1</sup>, D. Bauer<sup>2</sup>, S. Haneklaus<sup>3</sup>, E. Schnug<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Institut für biologisch-dynamische Forschung, Brandschneise 5, D-64295 Darmstadt  
<sup>2</sup>Dottenfelderhof, Bad Vilbel

<sup>3</sup>Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig

### Quality of Autumn Carrots from a Biodynamic Breeding Project

#### Abstract

The lines RODELIKA 97 (Bauer), RODELIKA 95 (Bauer) and RODELIKA 97 NUSSIG (Bauer) were selected from 3 and 4 generations, respectively of the conventional cultivar ROTHILD (Hild). These lines showed considerably increased levels of dry matter, saccharosis, total sugar and several plant nutrients (P, K, Mg). The content of nitrate and monosaccharides was decreased. Besides these lines the quality of other open pollinating cultivars as well as F1-hybrids was examined.

#### Einleitung

Die Düngungs- und damit auch die Nährstoffverhältnisse des biologisch-dynamischen sind von denen des konventionellen Landbaus sehr verschieden. Schon aus diesem Grunde ist zu vermuten, daß Sorten, die unter den mit Nährstoffen reichlich versorgten Bodenverhältnissen konventioneller Züchtungsbetriebe selektiert werden, nicht unbedingt für die Verhältnisse des ökologischen Landbaus geeignet sein müssen. Zudem können für biologisch-dynamische Produkte hinsichtlich ihrer anzustrebenden Qualitätseigenschaften durchaus andere Schwerpunkte gesetzt werden. Eigenschaften, die eine genügende Ausreifung und Bewältigung des inneren Stoffwechsels der Pflanze anzeigen (z.B. niedrigere Nitrat und höhere Zuckergehalte), werden neben den Zielen hoher Erntemengen und technologischer Eigenschaften des Produkts (z.B. einheitliche Größe) vor- bzw. gleichrangig verfolgt.

Sehr bedenklich erscheint, daß seit ca. 15 Jahren der Anteil von über Inzuchtlinien erhaltenen Hybridsorten nicht nur in den gemeinsamen Sortenkatalogen der EU sondern auch in der Praxis des ökologischen Land- und Gartenbaus ständig gestiegen ist. Hybridsorten weisen bis zu 40 % höhere Erträge als samenfeste Sorten auf. Auf diesem Wege kommt eine Betonung von massebildenden Wachstumsfaktoren über die Hintertür der Züchtung wieder in den Organischen Landbau hinein, nachdem ihr über das Hauptportal der Düngung der Zugang verwehrt wurde, denn der Einsatz leichtlöslicher mineralischer und vor allem N-haltiger Dünger ist in dieser Bewirtschaftungsmethode untersagt. Ob dies unter Einbeziehung menschenkundlicher Gesichtspunkte in den Qualitätsbegriff (HAGEL 1992) positiv zu bewerten ist, ist mehr als fraglich.

Aus diesen Gründen ist es sehr zu begrüßen, daß seit einigen Jahren die Züchtungsarbeit an biologisch-dynamischen Gemüse- und Getreidesorten intensiviert wurde. An dieser Stelle soll über die Untersuchung von Herbstmöhren aus einem biologisch-dynamischen Züchtungsprojekt berichtet werden (zur Untersuchung von Frühmöhren s. Beitrag in diesem Band).

### **Material und Methoden**

12 verschiedene Herbstmöhrentypen (moderne Zuchtsorten und daraus selektierte Linien, F1-Hybriden) wurden im Jahr 1998 unter biologisch-dynamischen Verhältnissen angebaut. Zur Untersuchung wurden von verschiedenen Stellen des feldmäßigen Anbaus Proben gezogen und zu einer Mischprobe vereinigt. Da im Vordergrund der Untersuchungen ein Vergleich der Qualitätseigenschaften der verschiedenen Sorten und selektierten Typen stand, wurden keine Erträge bestimmt.

Die verschiedenen RODELIKA-Linien des biologisch-dynamischen Züchters Dieter Bauer sind eine Weiterführung einer Selektion des biologisch-dynamischen Züchters Dr. Hartmut Spieß, die 1980 an der Sorte ROTHILD (Fa. Hild) vorgenommen wurde. Die Linie RODELIKA 95 resultiert aus drei, die Linie RODELIKA 97 aus vier Möhrengenerationen Züchtungsarbeit nach sensorisch erfaßbaren Parametern (s.u.). Die Selektion ROBILA (Heinze) des biologisch-dynamischen Züchters Thomas Heinze ging von der Sorte LANGE ROTE STUMPFE aus. ROBENA (Hild) sollte eine Verbesserung der Sorte ROTHILD (Hild) sein, wird allerdings im Sortenkatalog dieser Firma nicht mehr aufgeführt.

Das methodische Vorgehen bei der Selektionsarbeit orientierte sich nur an sensorisch erfaßbaren Parametern: Farbintensität und Durchfärbung der Möhre, innere Grünfärbungen, Farbe des Kambiumringes, Verhältnis von Rinde zum Zentralzylinder. Da der Möhrenkörper angeschnitten werden mußte, lag es nahe, auch eine Geschmacksbonitur durchzuführen. Dafür wurde im Verlauf der Arbeiten ein Boniturschema entwickelt, das sich an das 9-Punkte-Schema der DLG für sensorische Prüfungen anlehnt und im Züchtungsverlauf erweitert und verfeinert wurde. Auffallend war, daß bei herkömmlichen Sorten ca. 10 % der Möhren einen unangenehmen Geschmack aufwiesen.

Für die Analysen wurde ein Aliquot der Ernte (ca. 2,5 kg Möhren) gewaschen, zerkleinert, homogenisiert und auf Trockenmasse und N-Gehalt (nach Kjeldahl) untersucht. Nitrat- und Zuckergehalte in den Extrakten wurden photometrisch mittels Enzymtests der Firmen Merck und Boehringer bestimmt. Die Quantifizierung der Mineralstoffe erfolgte über Röntgenfluoreszenzanalyse nach SCHNUG und HANEKLAUS (1992). Das Einzelmöhrengewicht wurde nur bei den Herbstmöhren bestimmt. Der Trockenmasseverlust (% der TM in der eingewogenen FM) nach mikrobieller Zersetzung der gecutterten Möhren (nach 7 Tagen Inkubation von ca. 35 g FM bei Raumtemperatur in Petrischalen) kann Hinweise auf die Lagerqualität geben (SAMARAS 1978) und erfolgte nach REINHOLD (1942) und SAMARAS (1978).

### **Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen an Herbstmöhren**

Die Selektion RODELIKA 97 (Bauer) wies mit 14,6 % den höchsten Trockensubstanzgehalt aller Varianten auf (Tab. 1). Dieser lag relativ um 36 % über dem der Sorte ROTHILD (Hild), von der bei dieser Züchtung ausgegangen worden war (Abb. 1). Die Saccharosegehalte von RODELIKA 97 lagen mit 7,47 % um relativ 84 % höher als die der Ausgangssorte. Dieser beachtliche Züchtungserfolg wurde auch durch die gleichzeitige Senkung des Monosaccharidgehaltes um rel. 37 % (auf 1,11 %) bewirkt. Der damit induzierte niedrige Anteil Mono-

saccharide am Gesamtzucker von nur 12,9 % weist auf eine sehr gute Ausreife hin und wird von keiner der anderen Varianten dieses Sortimentes unterschritten. Dabei unterschieden sich die Einzelmöhrengewichte dieser beiden Varianten nicht. Ein Vergleich der Inhaltsstoffe der im Jahre 1997 selektierten Linie RODELIKA 97 mit der eine Generation früher durchgeführten Selektion RODELIKA 95 demonstriert einen nochmaligen deutlichen Züchtungsfortschritt hinsichtlich der Qualitätsparameter Trockenmasse, Nitrat, Zucker, Mineralstoffe. Dagegen weist die wegen ihres speziellen aromatisch-nussigen Geschmacks selektierte Linie RODELIKA NUSSIG 97 hinsichtlich Trockenmasse und Zuckergehalte vergleichsweise noch Verbesserungsmöglichkeiten auf. Allerdings wies sie zusammen mit RODELIKA 97 mit 91 bzw. 80 ppm die niedrigsten Nitratgehalte aller Varianten auf.

Hervorzuheben ist, daß auch hinsichtlich der Mineralstoffgehalte K, P, S, und Mg alle aus der Sorte ROTHILD (Hild) erhaltenen Selektionen durchweg höhere Gehalte (relativ zwischen 6 und 49 % (Abb. 1)) aufwiesen (Tab. 1). Dies betraf vor allem die Elemente K und P mit relativen Steigerungen zwischen 32 – 49 % (Abb. 1). Nur die Selektion RODELIKA 97 (Bauer) wies auch (um relativ 34 und 28 %) bedeutend höhere P- und S-Gehalte auf. Dieses höhere Mineralstoffaneignungsvermögen ist neben den o.a. Qualitätsaspekten höherer Trockenmasse, Saccharose- und Gesamtzuckergehalte ein weiteres Merkmal, das diese Selektionen für den Anbau im ökologischen Landbau mit seinem reduzierten Düngungsniveau auszeichnet. Die Steigerung der Mineralstoffgehalte ist allerdings bemerkenswert, da im Züchtungsprozeß nur über sensorisch erfaßbare Kriterien (z.B. Farbe und Geschmack der Rübe, s.o.), d.h. ohne weitere analytische Hilfsmittel selektiert wurde. Offenbar wird über eine züchterische Betonung dieser Merkmale gleichzeitig auch die Mineralstoffaufnahme beeinflusst.

In einer früheren Arbeit an Möhren aus der biologisch-dynamischen und konventionellen Praxis wurde eine starke Beziehung ( $r^2 = 46 - 58 \%$ ) zwischen P- und Saccharosegehalten beobachtet (HAGEL 1997). Die Beziehungen zwischen den verschiedenen Mineralstoffgehalten P, K, S, Mg und Ca und den Zuckerparametern für die Herbstmöhren dieses Sortimentes verschiedener Sorten eines Standortes fielen allerdings mit Bestimmtheitsmaßen bis maximal 26 % sehr schwach aus.

Während die Saccharose- und Gesamtzuckergehalte der Selektion ROBILA (Heinze) gegenüber der ähnlichen Sorte LANGE ROTE STUMPFE um 28 bzw. 14 % gesteigert wurden (Tab. 1), lag der Nitratgehalt mit 280 ppm allerdings über dem für Babykost zugelassenen Grenzwert von 250 ppm und um relativ 14 % über dem Wert dieser Ausgangssorte. Da zwischen den N- und Nitratgehalten aller Varianten keine signifikante Beziehung bestand, scheiden als Ursache dafür die gegenüber LANGE ROTE STUMPFE um relativ 51 % höheren N-Gehalte von ROBILA aus. Sehr uneinheitlich gestalteten sich die Veränderungen der verschiedenen Mineralstoffe: Um 19 % höheren Mg-Gehalten standen 12 % niedrigere P-Gehalte gegenüber. Die Gehalte an K, S, Na und Ca waren dagegen nicht oder kaum verändert.

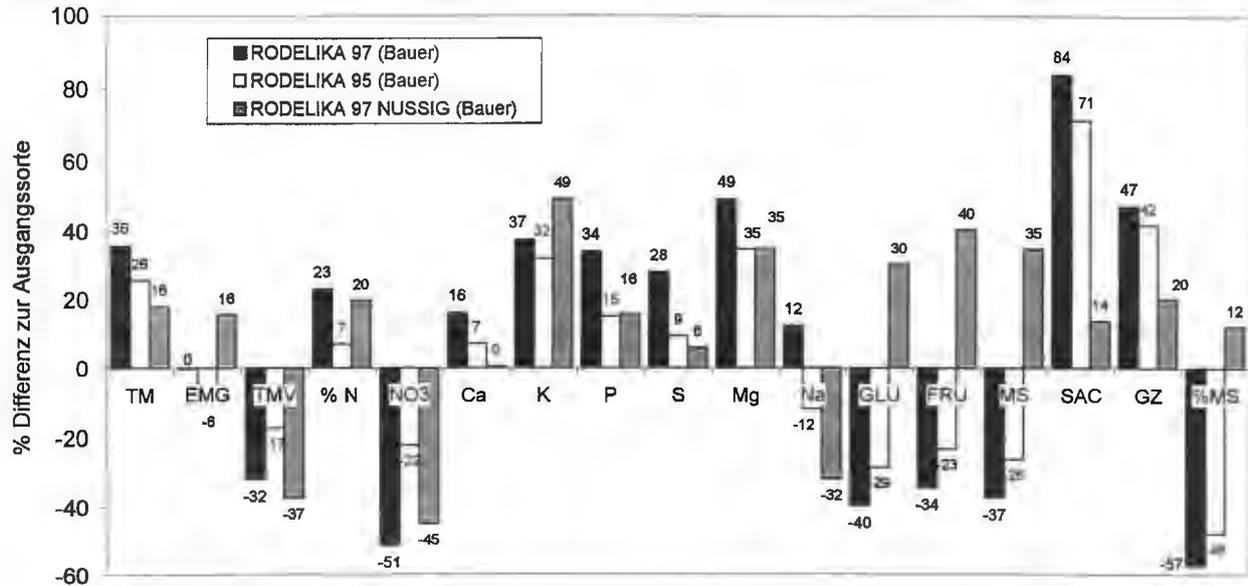
Bei den fünf Hybridsorten dieses Versuches fallen deren mit 74 – 111 g z.T. sehr niedrigen Einzelmöhrengewichte auf. Die korrelativen Beziehungen dieses Parameters zu den übrigen untersuchten Eigenschaften wiesen aber nur Bestimmtheitsmaße bis maximal 34 % (Einzelmöhrengewicht und TM) auf. Das Einzelmöhrengewicht der Herbstmöhren dieses Versuches war damit ohne Bedeutung für die Ausprägung anderer Eigenschaften.

**Tab. 1:** Trockenmasse (TM), Einzelmöhrengewicht g (EMG), % Trockenmasseverluste im Zersetzungstest (TMV), N-Gehalt (% N), ppm Nitrat in FM (NO<sub>3</sub>), Mineralstoffgehalte (ppm in FM), Glucose (GLU), Fructose (FRUC), Monosaccharide (MS), Saccharose (SAC), Gesamtzucker (GZ), % Monosaccharide vom Gesamtzucker von Herbstmöhren (% MS). Zuckergehalte in % der FM

Sorte	TM	EMG	TMV	% N	NO <sub>3</sub>	Ca	K	P	S	Mg	Na	GLU	FRU	MS	SAC	GZ	%MS
RODELIKA 97 (Bauer)	14,6	143	41	0,15	80	441	2295	329	191	131	788	0,60	0,51	1,11	7,47	8,57	12,9
RODELIKA 95 (Bauer)	13,5	134	49	0,13	129	407	2203	282	163	119	619	0,71	0,59	1,30	6,96	8,26	15,8
RODELIKA 97 NUSSIG (Bauer)	12,7	165	37	0,15	91	381	2492	284	158	119	478	1,30	1,08	2,39	4,62	7,00	34,1
ROTHILD (Hild)	10,8	143	60	0,12	166	380	1671	245	150	88	702	1,00	0,77	1,77	4,06	5,83	30,4
ROBILA (Heinze)	13,1	122	51	0,18	280	464	2590	315	219	154	569	0,65	0,66	1,31	5,45	6,76	19,4
LANGE ROTE STUMPFE	12,2	118	52	0,17	235	442	2578	357	212	129	541	0,92	0,79	1,71	4,24	5,95	28,8
ROBENA (Hild)	11,0	133	59	0,12	246	331	1996	223	147	83	479	0,99	0,77	1,75	4,54	6,30	27,9
TINO F1	10,1	74	46	0,12	211	430	1421	202	164	130	618	1,37	1,07	2,44	3,22	5,67	43,1
NEVIS F1	10,1	87	38	0,11	349	385	1901	241	145	94	601	1,40	1,11	2,50	2,93	5,43	46,1
NARMANN F1	10,3	97	39	0,09	139	375	1931	249	168	127	464	1,07	1,00	2,07	3,54	5,62	36,9
FILAMENT F1	11,0	111	59	0,12	255	384	1767	254	173	99	744	0,62	0,50	1,12	5,38	6,50	17,2
CARLO F1	12,1	86	43	0,13	129	382	1951	217	158	139	543	1,10	1,07	2,17	4,66	6,83	31,8

Bauer, Heinze, Hild = Züchter der Vergleichssorten

**Abb. 1:** Relative Differenzen (% , gerundet) verschiedener Untersuchungsparameter der selektierten Möhrenlinien RODELIKA 97 (Bauer), RODELIKA 95 (Bauer) und RODELIKA 97 NUSSIG im Vergleich zur ROTHILD (Hild) Bauer, Hild = Züchter der Vergleichsorten



*Erläuterungen:* Trockenmasse (TM), Einzelmöhrengewicht g (EMG), % Trockenmasseverluste im Selbstzersetzungstest (TMV), N-Gehalt in FM (% N), ppm Nitrat in FM (NO<sub>3</sub>), Mineralstoffgehalte (ppm in FM), Glucose (GLU), Fructose (FRU), Monosaccharide (MS), Saccharose (SAC), Gesamtzucker (GZ), % Monosaccharide vom Gesamtzucker von Frühmöhren (% MS). Zuckergehalte in % der FM.

Während die Gesamtzuckergerhalte der Hybriden TINO F1, NEVIS F1 und NARMANN F1 mit Werten zwischen 5,43 – 5,67 % sogar noch unter dem der in der biologisch-dynamischen Praxis gängigen konventionellen Sorte ROTHILD (Hild) mit 5,83 % lagen und weit unter dem der biologisch-dynamischen Selektion RODELIKA 97 (Bauer), wiesen die Hybriden FILAMENT F1 und CARLO F1 akzeptable Gehalte von 6,50 und 6,83 % auf. Allerdings lagen die Nitratgehalte der Sorten FILAMENT und NEVIS mit 255 und 349 ppm z.T. sehr hoch. Die Gehalte an K und P aller fünf Hybridsorten lagen grundsätzlich und z.T beträchtlich unter denen der biologisch-dynamischen Linien RODELIKA 97 (Bauer), RODELIKA 97 NUSSIG (Bauer) und ROBILA (Heinze). Verdünnungseffekte infolge einer überproportionalen Assimilateanreicherung in späteren vegetativen Stadien der Pflanze (FINCK 1976) kommen dafür nicht als Erklärung in Frage, da ja gerade die Hybriden unterdurchschnittliche Einzelmöhrengewichte aufwiesen. Wahrscheinlicher ist dagegen überhaupt bei herkömmlichen Sorten (aufgrund üppiger Nährstoffverhältnisse im Selektions- und Züchtungsprozess) und speziell bei Hybriden ein generell schlechteres Mineralstoffaneignungsvermögen im Zusammenhang mit einer geringeren Durchwurzelungsaktivität, was sich in einzelnen Untersuchungen bestätigte (HAGEL 1997, FLECK 2000) und in Zukunft intensiver untersucht werden sollte.

Die Trockenmasseverluste im Zersetzungstest nach REINHOLD (1942) und SAMARAS (1978) aller Varianten variierten mit Werten zwischen 37 % (RODELIKA 97 NUSSIG (Bauer)) und 60 % (ROTHILD (Hild)) beträchtlich. Da kein Lagerversuch durchgeführt wurde, können diese Zahlen allerdings nur als ein Hinweis auf das tatsächliche Leistungsvermögen hinsichtlich der Haltbarkeit aufgefaßt werden. Anders als bei den Frühmöhren ergaben sich für diesen zu den übrigen untersuchten Parametern nur relativ schwache Beziehungen mit Bestimmtheitsmaßen von maximal 32 %.

### Zusammenfassung

Durch nur drei bzw. vier Generationen dauernde Selektionsarbeit nach sensorisch erfassbaren Parametern konnten die Gehalte an TM, Saccharose, Gesamtzucker sowie der Mineralstoffe P, K und Mg der Linien RODELIKA 97 (Bauer), RODELIKA 95 (Bauer) und RODELIKA NUSSIG (Bauer) gegenüber der Ausgangssorte ROTHILD (Hild) beträchtlich gesteigert werden. Die Nitrat- und Monosaccharidgehalte wurden überwiegend gesenkt. Auch die Qualitätseigenschaften anderer samenfester Sorten sowie Hybriden werden beschrieben.

### Literatur

- FINCK, A. (1976): Pflanzenernährung in Stichworten. Verlag Ferdinand Hirt, Kiel.
- FLECK, M. (2000): Qualitätsuntersuchungen an Möhrensorten aus einem Feldversuch an zwei Standorten des ökologischen Landbaus. Diplomarbeit, Gesamthochschule Kassel.
- HAGEL, I. (1992): Warum Lebensmittel in Demeter-Qualität? - Ein Beitrag zum Problem der mineralischen Stickstoffdüngung im Hinblick auf die Ernährungsqualität der erzeugten Produkte. Lebendige Erde Nr. 4, 5 und 6.
- HAGEL, I. (1997): Möhren: Bauen wir die falschen Sorten an? Ökologie & Landbau 1/1997; 42-43.
- MENGEL, K. (1979): Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- REINHOLD, J. (1943): Die Haltbarkeit von Gemüse, ein wichtiger Qualitätsfaktor. Z. Pflanzenkrankh. PflSchutz 53, 175-199.
- SAMARAS, I. (1978): Nachernteverhalten unterschiedlich gedüngter Gemüsearten mit besonderer Berücksichtigung physiologischer und mikrobiologischer Parameter. Diss., Gießen.
- SCHNUG, E. and S. HANEKLAUS (1992): Sulfur and light element determination in plant material by x-ray fluorescence spectroscopy. Phytan 32, 123-126.



## Die Fruchtqualität durch die Wahl der Unterlage beeinflussen?

*Gerhard Baab, Ursula Hornung, Birgit Lacher, Karin Puderbach*

Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau  
Ahrweiler/Mayen Fachbereich Gartenbau

Walporzheimer Straße 48 D-53474 Bad Neuenahr-Ahrweiler

Tel.: 02641/9786-0 Fax: 02641/9786-66 eMail: Poststelle.SLVA@Agrarinfo.rpl.de

### Fruit quality to be influenced by a chosen rootstock ?

***Abstract:** Investigations with the apple cultivar Braeburn vt grafted on different rootstocks proved the Russian breeding B.9 (=Budakovsky 9) to be very interesting. Braeburn apple trees on B.9 rootstock were found as slow growing on rather dry locations. Also, less post harvest disorders were found in Braeburn apples on B.9, especially less bitter pits.*

*It is believed that the slow vegetative growth reduces the competition for calcium between the shoots and the fruit. Moreover, the trees on B.9 rootstock produced the main root tips during that phase while calcium is carried from the roots to the developing fruit.*

### **Unterlagensituation im Obstbau**

Der Obstanbauer sucht Schwachwuchs induzierende Unterlagen, weil sie die Rentabilität des Anbaus fördern.

Mit der Unterlage **M9**, hervorgegangen aus dem Zufallssämling 'Gelber Metzger Paradiesapfel' (aus Frankreich, 1879), steht eine schwachwachsende Unterlage zur Verfügung, die viele Vorteile bietet und die sich deshalb in den zurückliegenden 40 Jahren Europa-weit durchsetzen konnte.

**M9** hat leider auch Nachteile, z.B.:

- anfällig für Wühlmäuse, Blutläuse, Krebs, Staunässe;
- unter osteuropäisch-kontinentalen Bedingungen nicht ausreichend winterfrosthart;
- relativ starkwüchsig auf guten bzw. jungfräulichen Böden.

In vielen Ländern ist man auf der Suche nach einer neuen, Schwachwuchs induzierenden Unterlage, die sich möglichst ideal auf das Wuchs- und Ertragsverhalten der aufveredelten Sorte auswirkt.

Üblicherweise dauert es Jahre, ehe man die Einflüsse der jeweiligen Unterlage auf die aufveredelte Sorte in ihrer Bandbreite beobachten, und die Vor- und Nachteile abwägen kann.

Es wäre wünschenswert, wenn man von bestimmten Merkmalen oder vom Unterlagen-typischen Entwicklungsablauf auf den Einfluss einer Unterlage auf die Edelsorte schließen dürfte.

An der SLVA Ahrweiler wurde verschiedentlich, z.B. bei der Sorte 'Cox Orange Queen', beobachtet, dass auf Schwachwuchs induzierenden Unterlagen unterhalb **M9** weniger physiologische Schäden auftraten, insbesondere geringerer Stippebefall. Deshalb wurde ein Unterlagenversuch mit der Sorte 'Braeburn' angelegt.

### Stippe und der Calciumhaushalt bei Apfel

Stippe tritt bei Calcium-Mangel und in Verbindung mit Kalium-Übersorgung auf. 80 bis 90 % des Gesamtjahresbedarfs an Calcium müssen aus den Bodenvorräten neu aufgenommen werden. Die Aufnahme erfolgt passiv und ist abhängig vom Angebot an anderen Kationen. Calcium wird mit dem Bodenwasser im Xylemstrom in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert, vor allem in solche, die stark transpirieren oder Auxine produzieren, wie z.B. die Blätter.

Ein zu starkes, vor allem ein lang anhaltendes Triebwachstum kann dazu führen, dass aus den Früchten das dort bevorratete Calcium in noch wachsende Triebe abgezogen wird. Ein früher Triebabschluss und gleichmäßiges Wachstum fördern eine günstige Verteilung von Calcium in der Pflanze.

Früchte haben nur während ihrer Zellteilungsphase — das sind in etwa die ersten sechs Wochen nach der Abblüte — die Möglichkeit, sich mit Calcium zu bevorraten. Während der sich anschließenden Zellstreckungsphase verdünnt sich die Calcium-Konzentration in den Früchten.

Calcium wird überwiegend von den Wurzelspitzen aufgenommen, während Kalium über die gesamte Feinwurzel-Länge aufgenommen werden kann. Das Feinwurzelwachstum spielt für die Calcium-Versorgung von Obstgehölzen eine entscheidende Rolle, und damit auch für das Kalium-/Calcium-Verhältnis in den Früchten. Stoppt das Feinwurzelwachstum, stagniert auch die Ca-Aufnahme. Wuchsaktivitäten der Feinwurzeln in der Zellteilungsphase sichern hingegen die Calciumgehalte in Früchten.

### Versuchsanstellung

Im Frühjahr 1993 wurde an der SLVA Ahrweiler ein Versuch mit der Sorte **Braeburn vt** auf sechs verschiedenen Unterlagen angelegt.

Die Versuchsfläche weist sandigen Lehm (60 Bodenpunkte) auf. Im langjährigen Mittel fallen 650 mm Niederschlag pro Jahr. Die Fläche kann nicht bewässert werden.

Pro Unterlage wurden jeweils 12 sehr homogene Bäume in drei Wiederholungen gepflanzt, auf 3,25 x 0,75 m Abstand.

Im Vergleich zum Standard **M9 – T 337** standen:

- der diesem Standard ziemlich gleichwertige M9-Klon **Pajam 1**,
- die stärker als M9 wachsenden Unterlagen **B 9**, **Mark 9** und **M 26**,
- sowie der etwas stärker wachsende M9-Klon **Pajam 2**.

Die Wachstums- und Ertragsleistungen sowie die Fruchtqualität wurden aus der jeweiligen Jahreserntemenge ermittelt.

Für die Wurzelmessung wurden — 15 cm vom Stamm entfernt — aus 10 bis 15 cm Tiefe vorsichtig die Feinwurzeln gelöst und nach weiterer Reinigung der Messung zugeführt. Jeweils 12 Wurzelproben von einem Unterlagentyp wurden zu einer Mischprobe zusammengefasst. Anschließend erfolgte mit dem Computer-Bildanalyse-Programm **WIN RHIZO** die Messung der Gesamtlänge der Feinwurzeln, und zwar getrennt nach Dickenklassen von 0,5 mm, 1,0 mm, 1,5 mm und 2,0 mm Durchmesser, wobei die letzten beiden Dickenklassen der Absicherung dienen, dass tatsächlich alle Wurzeln mit 0,5 bzw. 1,0 mm Durchmesser für den Längenvergleich vorliegen. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms **POWER POINT**. Unterschiedliche Wurzeldicken kann man farblich kennzeichnen. Es besteht die Option, Verunreinigungen herauszufiltern. Überlappende Wurzeln und Wurzelteile werden erkannt, Längen, Durchmesser und Flächen der erfassten Feinwurzeln werden berechnet.

## Ergebnisse

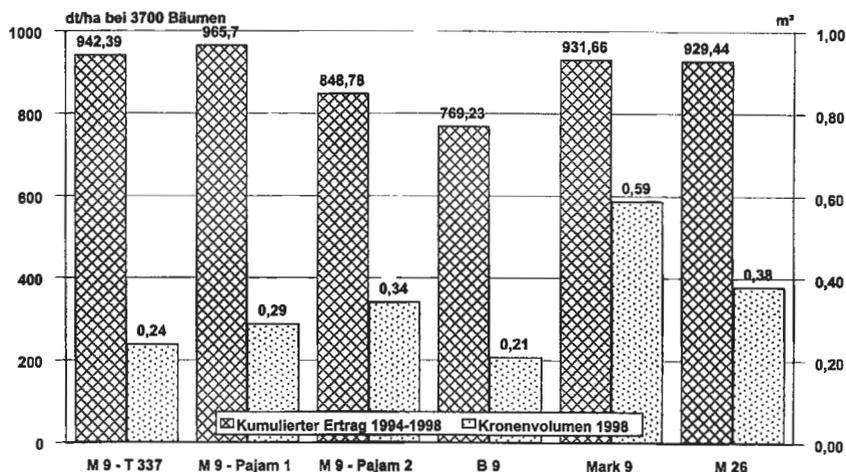
Nach fünf Standjahren präsentierten sich die sechs verwendeten Unterlagen nur teilweise mit der erwarteten Wuchsleistung: die nach allgemeiner Praxiserfahrung etwas stärker als **M 9** wachsende Unterlage **B 9** blieb in unserer Anlage unter dem **M 9** - Niveau (Darstellung 2, rechte Säulen).

Der Ertrag – dargestellt als kumulierter Ertrag über die Jahre 1994 bis 1998 – korreliert jedoch nicht mit der Kronenentwicklung (Darstellung 2, linke Säulen).

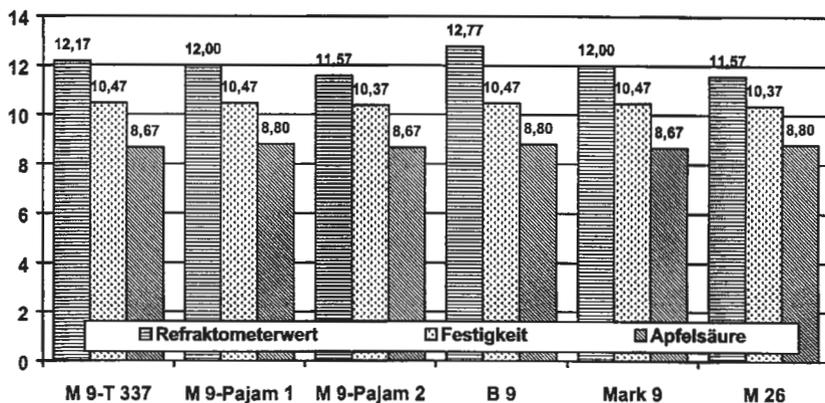
Offensichtlich reagiert die Unterlage **B 9** auf trockenem Standort mit schwächerem Wuchs, ohne dass es zu nennenswerten Ertragseinbußen kommt. Diese Aussage muss relativiert werden, denn beim Vergleich der einzelnen Jahreserntemengen zeigte sich deutlich, dass in den sommerheißen Jahren 1996 und 1998 die Sorte **Braeburn vt** auf der Unterlage **B 9** weniger Ertrag brachte als auf den zum Vergleich stehenden Unterlagen.

Mehr noch als die Erntemenge interessiert die Fruchtgesundheit, denn letztlich entscheidet der Verkaufserlös über den Betriebserfolg des Obstanbauers. Bonitiert wurden deshalb Qualitätskriterien wie Zuckergehalt, Festigkeit und Gehalt an Apfelsäure (Darstellung 2), sowie erkennbare physiologische Schäden bei der Auslagerung. Im Versuch werden alljährlich des weiteren die Fruchtgröße und die Fruchtfarbe erfasst. Insgesamt ergaben sich für die Sorte **Braeburn vt** besonders positive Ergebnisse bei Veredlung auf **B 9**. Vor allem beeindruckt der geringe Anteil stippiger Früchte (Darstellung 3).

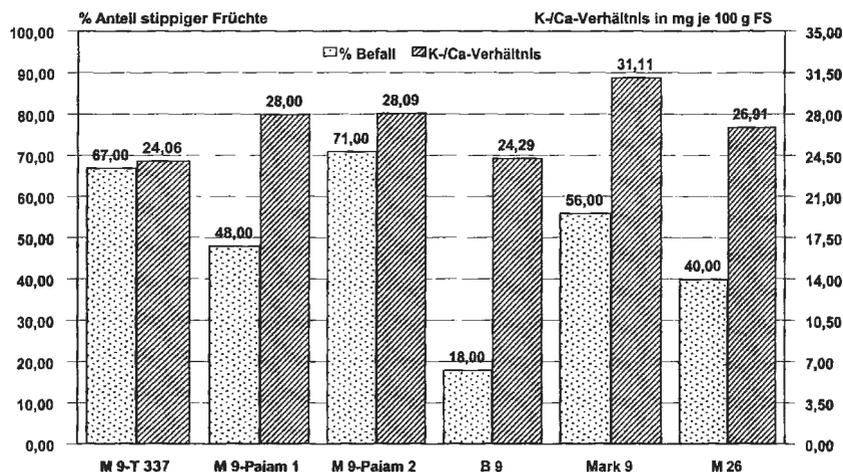
**Darstellung 1:** Ertragsentwicklung (kumulierte Erträge 1994 – 1998) und Baumkronenvolumen bei *Braeburn vt* auf sechs verschiedenen Unterlagen nach 5 Stand- bzw. Ertragsjahren



**Darstellung 2:** Pimpernelle-Daten für *Braeburn vt* auf verschiedenen Unterlagen – Durchschnittswerte von 1997 bis 1999 –



*Darstellung 3: Anteil stippiger Früchte (in %) an der Jahresernte 1997 bei Braeburn vt auf verschiedenen Unterlagen, und Kalium- /Calcium- Verhältnis in den Früchten*



Da das Auftreten von Stippe bekanntlich eng mit der Calcium- und auch Kalium-Versorgung der Pflanze und insbesondere der Früchte gekoppelt ist, und die Calcium-Aufnahme wiederum vom Vorhandensein wachsender Wurzelspitzen abhängt, wurde das Vermessen von Feinstwurzeln in das Versuchsprogramm aufgenommen. Unterschiede im Feinstwurzel-Wachstum zeigten sich nur beim ersten Probenahme-Termin, Anfang Juli: die meisten Feinstwurzeln waren von den Unterlagen **Mark 9** und **B 9** produziert worden, und zwar um etwa 10 % mehr als von **M9-T 337**.

Man kann schließen, dass diese Unterlagen in einer Phase, die für die Calcium-Aufnahme und den Calcium-Einbau in heranwachsenden Früchten entscheidend ist, positiven Einfluss ausüben, der sich später auch in der Fruchtqualität niederschlägt.

### Kernaussagen

- Bei Apfelsorten, die von durch Calciummangel bedingten, physiologischen Krankheiten wie Stippe, Fleischbräune, *Braeburn Browning Disorder* und anderen - betroffen sind, sollte das vegetative Wachstum auf dem untersten vertretbaren Niveau gefahren werden. Hierzu können je nach Standort, Wüchsigkeit und Sorte auch Unterlagen mit einer Wuchsleistung niedriger als die der M9-Gruppe sehr dienlich sein.
- Im vorliegenden Versuch erwies sich die Unterlage **B 9** (= *Budakovsky 9*) als besonders gut: **B 9** induzierte das geringste Triebwachstum, dafür intensives Wurzelwachstum in der für die Calcium-Aufnahme wichtigsten Periode. Insofern kann die Unterlage selbst über eine

- erhöhte Ca-Aufnahme bzw. durch ein günstiges K-/Ca-Verhältnis dem Auftreten physiologischer Erkrankungen gegensteuern.
- Auf der anderen Seite veranlassen die vom Handel gestellten Ansprüche an vermarktungsfähige Fruchtgrößen (75 bis 85 mm) den Obstanbauer, ein stärkeres Baumwachstum zuzulassen, obwohl dies eindeutig bei einzelnen Sorten (z.B. 'Cox', 'Braeburn') zu Lasten der inneren Fruchtqualität geht.



## Charakterisierung von *Allium*-Bastarden auf Basis der Aromaprofile

H. Schulz<sup>1</sup>, H. Krüger<sup>1</sup>, N. Herchert<sup>2</sup>, E.R.J. Keller<sup>3</sup>, M. Keusgen<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ),

Institut für Qualitätsanalytik, Neuer Weg 22/23, D-06484 Quedlinburg;

<sup>2</sup>Technische Universität (TU) Braunschweig, Institut für Lebensmittelchemie,  
Schleinitzstrasse 20, D-38106 Braunschweig

<sup>3</sup>Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Corrensstrasse 3,  
D-06466 Gatersleben

<sup>4</sup>Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn, Nußallee 6, D-53115 Bonn

*Abstract: Characterization of Allium hybrids based on the aroma profiles*

*Various Allium hybrids, received by cross-breedings of A. cepa as mother plant and 6 taxonomically distant wild types, are investigated with special respect to their individual profiles of cysteine sulfoxides as well as enzymatically formed aroma substances. Both rapid methods used in this study (HPLC with UV/Vis detection and SPME-GC, respectively) permit a high sample throughput, so that numerous gene bank accessions and Allium breeding material can be analyzed within a comparatively short time. In addition to the known RAPD or RFLP marker techniques the presented SPME-GC method is a promising approach to support efficiently breeding projects aimed to improve the health and aroma value of various Allium plants.*

### Einleitung

Die in *Allium*-Extrakten enthaltenen Cysteinsulfoxide wie Alliin oder die aus ihnen gebildeten Derivate wie Allicin, Ajoen oder bestimmte Alk(en)yl(poly)sulfide verfügen über eine beträchtliche pharmakologische Wirkung (z.B. Senkung des Lipidspiegels, Hemmung der Trombozytenaggregation, antioxidative und tumorprotektive Effekte). Wie aus verschiedenen epidemiologischen Studien hervorgeht, bietet ein hoher Verzehr an Zwiebeln und anderen *Allium*-Spezies einen wirksamen Schutz vor Magenkrebs [1,2]. Die anticarcinogene Wirksamkeit von Knoblauch wird dabei vor allem auf schwefelhaltige Inhaltsstoffe mit einem oder mehreren Allyl-Substituenten (z.B. Diallylsulfid, Diallyldisulfid, Allylmercaptan) zurückgeführt [3,4]. Darüber hinaus werden die hauptsächlich mittels Hydrodestillation hergestellten *Allium*-Öle (insbesondere Zwiebel-, Knoblauch- und Porreeöl) im größeren Umfang zur Aromatisierung von Lebensmitteln eingesetzt. Aufgrund der sehr geringen Ölausbeuten sowie der Nachfrage nach Produkten mit möglichst authentischen Aromaprofilen, die sich u.a. auch gezielt an Spezialitäten in der ethnischen Küche orientieren, besteht Bedarf, sowohl neue *Allium*-Wildtypen, als auch Bastarde sowie Zuchtformen analytisch näher zu betrachten.

In der hier vorgestellten Studie wurden daher die unterirdischen Pflanzenteile der folgenden 6 Bastardtypen im Hinblick auf die jeweiligen Cysteinsulfoxid- und Aromaprofile untersucht: *A. cepa* x *A. globosum*, *A. cepa* x *A. obliquum*, *A. cepa* x *A. senescens*, *A. cepa* x *A. chevsuricum* und *A. cepa* x *A. altynolicum*.

## Material und Methoden

### *Pflanzenmaterial*

Bastarde von Küchenzwiebel mit taxonomisch entfernteren Wildarten aus der Untergattung *Rhizirideum* wurden unter Zuhilfenahme der *In-vitro*-Kultur bestäubter Fruchtknoten (embryo rescue) erzeugt [5].

### *RAPD-Analysen*

Unter Standard-RAPD-Bedingungen werden vier gut geeignete Primer, die klare Unterschiede zwischen den Elternpflanzen aufzeigen, aus den Sätzen OPD, OPE und OPF (Operon Technologies) ausgewählt. Mit Hilfe von PCR (40 Zyklen, jeweils 20 Sec. bei 95°C, 20 Sec. bei 42°C und 2 Min. bei 72°C) werden mit diesen Primern RAPD-Fragmente amplifiziert und in 1,5 %-igen Agarose-Gelen aufgetrennt (Abb. 1).

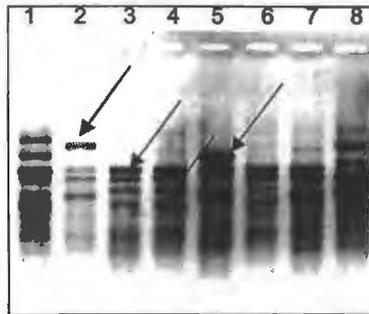


Abb. 1: Amplifizierte RAPD-Fragmente unterschiedlicher Bastard-Pflanzen von *A. cepa* x *A. obliquum* (2-7) und der Mutter- *A. cepa* (1) sowie Vaterpflanze *A. obliquum* (8). Die Pfeile weisen auf einige wichtige Hybridbanden hin.

In früheren Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass DNA-Analysen zum Bastardnachweis (RAPD und RFLP) bei *Allium*-Spezies prinzipiell anwendbar sind [6].

### *Cysteinsulfoxidanalysen*

Die genau gewogene Probe (ca. 0,2 - 0,8 g) wird zunächst in Methanol 10 Min. lang unter Rückfluß erhitzt. Das feuchte Pflanzenmaterial wird anschließend in einem Mörser zerkleinert und erneut unter Rückfluß erwärmt. Um eine quantitative Extraktion der Cysteinsulfoxide zu erreichen, werden dem Ansatz 20 mL Wasser zugesetzt. Der abgekühlte Extrakt wird filtriert,

mit Methanol nachgewaschen, die vereinigten Filtrate bis fast zur Trockne eingedampft und mit OPA-Derivatisierungsreagenz auf 5,0 mL aufgefüllt. Die sich anschließende Trennung und Quantifizierung der Cysteinsulfoxide erfolgt mittels HPLC unter Verwendung authentischer Vergleichssubstanzen (Kalibrierung und Ko-Chromatographie) [7].

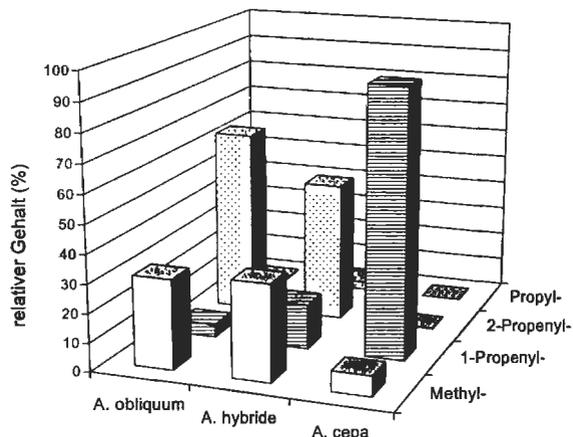


Abb. 2: Cysteinsulfoxid-Verteilungsmuster für *A. cepa* x *A. obliquum* und die entsprechenden Elternpflanzen

#### **Aromaanalysen mittels SPME-GC**

1 g der homogenisierten Zwiebelmasse wird in einem 20 mL Headspace-Vial zusammen mit 5 mL dest. Wasser 30 Min. lang bei einer Temperatur von 32°C gehalten und gleichzeitig gerührt [8]. Die sich hierbei bildenden Aromakomponenten werden danach durch 10-minütige Adsorption an einer PDMS-Faser [Poly(dimethyl)siloxanfaser, Schichtdicke 100 µm] im Dampfraum angereichert. Die mit dem Analyten beladene Faser wird anschließend in den auf 250°C beheizten GC-Injektorblock injiziert und die thermisch desorbierten Substanzen chromatographiert. Hierbei werden die folgenden GC-Parameter gewählt: Trennsäule: HP INNOWax mit 0,5 µm bonded PEG-Phase 60 m x 0,25 mm i.D., Split: 1:10, Temperaturprogramm: 35-220°C mit 10°C/Min., H<sub>2</sub>-Flußrate: 1mL/Min.

Die Identifizierung der einzelnen Aromakomponenten erfolgt durch Vergleich mit den Retentionsindizes entsprechender Standardsubstanzen (Fa. Oxford Chemicals, Harlepool, U.K.; Fa. Dragoco AG, Holzminden). Darüber hinaus werden von allen betreffenden Komponenten die EI-Massenspektren aufgenommen und mit den Daten authentischer Aromastoffe bzw. mit MS-Referenzbibliotheken (Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data) verglichen (HP-MSD, Modell 5972, He-Flußrate: 1mL/Min., Ionisierungsspannung: 70 eV, Temperatur der Ionenquelle: 195°C, Scan-Bereich: 27-300 m/z).

Die Diskriminanzanalysen der erhaltenen GC-Analysenresultate werden mit Hilfe des Statistik-Software-Programms SYSTAT 7.0 (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.) erstellt.

## Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der SPME-GC-Analytik gelingt es, Profile schwefelhaltiger Aromakomponenten von allotriploiden bzw. diploiden *Allium*-Bastarden schnell und reproduzierbar zu ermitteln. Auch bei geringen Probenmengen liegt die analytische Streubreite der verwendeten Methode noch innerhalb akzeptabler Grenzen, so daß signifikante Aussagen in Bezug auf die weitgehend genetisch bedingten Unterschiede im Aromaprofil der einzelnen Pflanzen ohne weiteres getroffen werden können. Demgegenüber benötigen klassische Probenaufbereitungsmethoden wie Hydrodestillation oder simultane Destillation/Extraktion (SDE) für eine vergleichbar gute Reproduzierbarkeit weit mehr Material, als aus Genbanken oder Züchtungsversuchen in der Regel zur Verfügung gestellt werden kann.

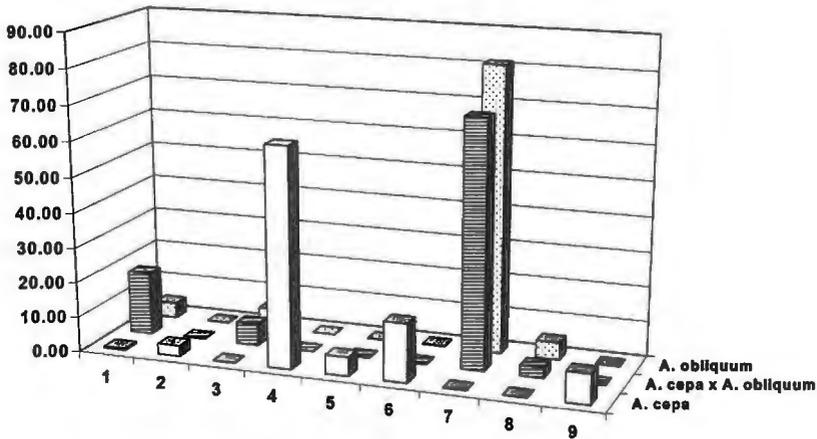


Abb. 3: SPME-GC-Aromaprofile von *A. cepa x A. obliquum* und den entsprechenden Elternpflanzen. 1: Di-2-propenyldisulfid; 2: Methylpropyldisulfid; 3: (Z)-Methyl-1-propenyldisulfid; 4: Dipropyldisulfid; 5: (Z)-1-Propenylpropyldisulfid; 6: (E)-1-Propenylpropyldisulfid; 7: Di-2-propenyldisulfid; 8: (E)-1-Propenyl-2-propenyldisulfid; 9: Dipropyltrisulfid

In Analogie zu früher bereits durchgeführten Aromaanalysen an *A. cepa x A. porrum* [8] weisen die auf Basis von bis zu 13 Aromakomponenten durchgeführten Diskriminanzanalysen insgesamt deutlich separierte Cluster für die einzelnen *Allium*-Bastarde und die beteiligten Elternpflanzen auf (Abb. 4). Die Einflußnahme der elterlichen Genome auf die Aromaausprägung des jeweiligen *Allium*-Bastards gestaltet sich bei den 6 untersuchten Typen jedoch sehr unterschiedlich. Während bei *A. cepa x A. globosum* das durch die Hauptkomponenten (Z)-1-Propenylmethylidisulfid, Di-2-propenyldisulfid und 2-Propenylpropyldisulfid bestimmte Aromaprofil in etwa eine Mittelstellung zwischen den entsprechenden Profilen der Elternpflanzen einnimmt, weist der Bastard *A. cepa x A. obliquum* eine deutlich größere Übereinstimmung mit dem väterlichen Wildtyp auf (Abb. 3).

Die für das Aroma von *A. cepa* typische Hauptkomponente Dipropyldisulfid wird im Bastard nicht nachgewiesen. Ein völlig anderes Ergebnis zeigt sich bei Einkreuzung der diploiden Wildart *A. saxatile*. Obwohl diese Spezies im wesentlichen dem Aromatyp „Knoblauch“ zugeordnet werden kann [9], kommen in dem Bastard die beiden aromapragenden Komponenten der Wildform, (Z)-1-Propenylmethylsulfid und Di-2-propenylsulfid nur in sehr geringer Konzentration vor, so daß das Profil im wesentlichen dem von *A. cepa* entspricht.

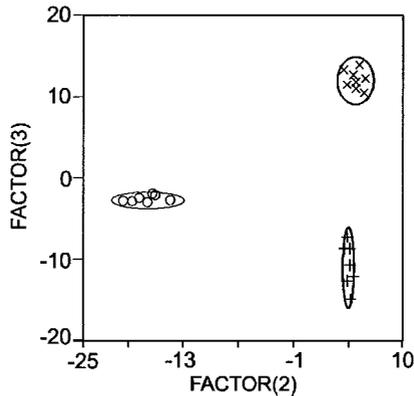


Abb. 4: Diskriminanzanalyse der SPME-GC-Aromakomponenten von *A. cepa* x *A. saxatile* und den entsprechenden Elternpflanzen

Die Hybridisierung mit den Wildtypen *A. senescens*, *A. altynolicum* und *A. chevsuricum* führt zu *Allium*-Formen, die in Bezug auf das jeweilige Aromaprofil geringere Unterschiede zu den Elternpflanzen aufweisen. In allen Fällen dominieren hier die flüchtigen Schwefelverbindungen Dipropyldisulfid, (*E*)-1-Propenylpropyldisulfid und Propanthiol. Auch die jeweiligen Cysteinsulfoxidgehalte, denen u.a. als Aromavorstufen eine besondere Bedeutung zukommt, korrelieren weitgehend mit den entsprechenden Aromaprofilen (Abb. 3). So dominieren z.B. bei *A. cepa* x *A. obliquum* die auch im Wildtyp hauptsächlich vorkommenden Verbindungen 2-Propenyl- und Methylcysteinsulfoxid (Anteile innerhalb der Cysteinsulfoxid-Fraktion: 64 % bzw. 31 %), während das für die Mutterpflanze typische 1-Propenylhomologe nur in vergleichsweise geringen Mengen nachzuweisen ist. In Ergänzung zu den bekannten RAPD- oder RFLP-Markertechniken ist die SPME-GC-Methode insgesamt gut geeignet, speziell solche Züchtungsarbeiten effizient zu unterstützen, die eine Verbesserung des Gesundheits- und Aromawertes bestehender *Allium*-Kulturarten durch Einkreuzung ausgesuchter Wildtypen zum Ziel haben.

## Literatur

1. You, W.-C., Blot, W.J., Chang, Y.-S., Ershow, A., Yang, Z.T., An, Q., Henderson, B.E., Fraumeni, J.F., Wang, T.-G. (1989): *Allium* vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 162-164.
2. Trichopoulos, D., Ouranos, G., Day, N.E., Tzonou, A., Manousos, O., Papadimitriou, C., Trichopoulos, A. (1985): Diet and cancer of the stomach: a case-control study in Greece. *Int J. Cancer* **36**, 291-297.

3. Wattenberg, L.W., Sparmins, V.L., Barany, G. (1989): Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res.* **49**, 2689-2692.
4. Sparmins, V.L., Barany, G., Wattenberg, L.W. (1988): Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo[ a ]pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* **9**, 131-134.
5. Keller, E.R.J. (1994): The use of the biodiversity for distant crosses facilitated by embryo rescue in the Gatersleben *Allium* collection. *Allium Improvement Newsl.* **4**, 1-3.
6. Bark, O.H., Havey, M.J., Corgan, J.N. (1994): Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of progeny from *Allium fistulosum* x *A. cepa* hybrid. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* **119**, 1046-1049.
7. Krest, I., Glodek, J., Keusgen, M. (2000): Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *J. Agric. Food Chem.* (im Druck).
8. Schulz, H., Krüger, H., Liebmann, J., Peterka, H. (1998): Distribution of volatile sulfur compounds in an interspecific hybrid between onion (*Allium cepa* L.) and leek (*Allium porrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5220-5224.
9. Schulz, H., Krüger, H., Herchert, N., Keller, E.R.J. (2000): Vorkommen flüchtiger Sekundärmetabolite in ausgewählten *Allium*-Wildtypen. *J. Appl. Bot.* (im Druck).

#### **Danksagung**

Herrn Dr. H. Lux, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben, möchten wir an dieser Stelle für die gewissenhafte Durchführung der PCR-Analysen danken.



## Das Möhrenblatt (*Daucus carota* ssp. *sativus*) - seine Bedeutung als Lieferant von aromagebenden Inhaltsstoffen

*Ruth Habegger und W.H. Schnitzler*

Lehrstuhl für Gemüsebau, Wachstumsphysiologie und Qualitätsforschung,  
Technische Universität München-Weihenstephan, D-85350 Freising

### *Leaves of carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus*) - an important source for essential oil and flavour compounds*

*Leaves of carrots have significant higher amounts of essential oil than roots. During vegetative growing the oil content is decreasing. Roots of 'Cubic' have higher oil contents than 'Nanco F<sub>1</sub>'; leaves of 'Nanco F<sub>1</sub>' have higher oil contents than 'Cubic'.*

*The dominating compounds of the essential oils are mono- and sesquiterpenes. In leaves these are sabinene,  $\beta$ -myrcene,  $\gamma$ -terpinene, d-germacrene, limonene,  $\alpha$ -pinene, trans-ocimene, terpinene-4-ol,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -bisabolol. The prediction of flavour compounds in roots by analysis of leaves is not possible.*

### **Einleitung**

Möhrensorten unterscheiden sich in der Rübe im Gesamtgehalt an ätherischen Ölen. Auch aromagebende Einzelkomponenten sind in den Sorten in verschiedenen Mengen enthalten, korrelieren aber nicht unbedingt mit dem Gesamtölgehalt (HABEGGER et al. 1996).

Für eine, was die Rübe betrifft, zerstörungsfreie Messung des Aromas als bedeutender innerer Qualitätsparameter sind Untersuchungen der Ölgehalte der Blätter und Kenntnisse über deren Zusammensetzung eine notwendige Voraussetzung.

### **Material und Methoden**

Es wurden zwei Möhrensorten, 'Nanco F<sub>1</sub>' und 'Cubic' praxisüblich auf eigenen Versuchsfeldern angebaut. Die Aussaat erfolgte am 31.3.1998. Geerntet wurden die Blätter am 25.5. zum ersten Mal und weiter in zweiwöchigem Abstand. Die Rüben wurden am 8.6. und dann weiter in vierwöchigem Abstand geerntet. Die letzte Ernte erfolgte ca. 120 Tage nach der Aussaat; 'Nanco F<sub>1</sub>' hatte zu diesem Zeitpunkt ein durchschnittliches Rübengewicht von 69 g, 'Cubic' von 85 g.

Am Erntetag wurde das Pflanzenmaterial tiefgefroren und am Analysentag im tiefgefrorenen Zustand zerkleinert. Über simultane Wasserdampf-Destillation-Extraktion (mit Pentan) wurden die ätherischen Öle als Summe der flüchtigen Substanzen gewonnen.

Die Auftrennung der ätherischen Öle erfolgte gaschromatographisch über eine 60 m Supelco-Wax-Säule (i.D. = 0,32 mm, fd = 0,25 µm) mit folgendem Temperaturprogramm: 50 °C // 3 min // 10 °C/min // 120 °C // 2 min // 2 °C/min // 155 °C // 0 min // 8 °C/min // 240 °C // 30 min. Als Detektor wurde ein FID (240 °C) eingesetzt. Berechnet wurde die relative Substanzmenge rsm als Mengenverhältnis der einzelnen Substanz relativ zum internen Standard Octanol.

## Ergebnisse und Diskussion

Wie Abbildungen 1 und 2 zeigen, enthalten beide Möhrensorten in den Blättern deutlich höhere Gesamtgehalte an ätherischen Ölen als in den Rüben.

Insbesondere haben die Blätter von jungen Pflanzen sehr hohe Ölgehalte. Im Verlauf des Pflanzenwachstums nehmen diese signifikant ab und steigen gegen Ende der Kultur wieder etwas an. Die ätherischen Ölgehalte in den Rüben nehmen während des Wachstums ab.

Bezüglich der Rüben hat die Sorte 'Cubic' höhere Ölgehalte als 'Nanco F<sub>1</sub>'. Blätter der Sorte 'Nanco F<sub>1</sub>' haben höhere Ölgehalte als 'Cubic'.

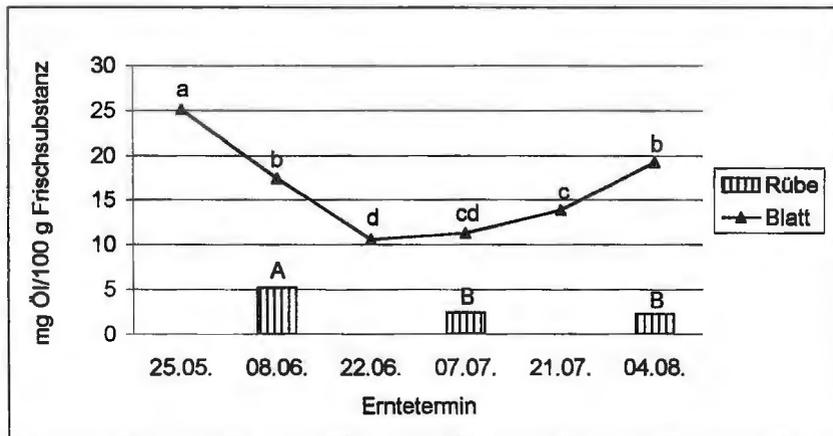


Abb. 1: Gesamtgehalte an ätherischen Ölen während der Entwicklung der Möhren, Sorte 'Nanco F<sub>1</sub>', Blatt und Rübe, Tukey-Test (p = 0,05)

Zum Zeitpunkt der erntereifen Rüben dominieren im ätherischen Öl der Blätter mengenmäßig die Substanzen:  $\beta$ -Myrcen, Limonen und  $\beta$ -Caryophyllen.

Dagegen sind  $\alpha$ -Terpinolen,  $\beta$ -Caryophyllen und trans- $\gamma$ -Bisabolen die dominierenden Substanzen im ätherischen Öl der erntereifen Rüben.

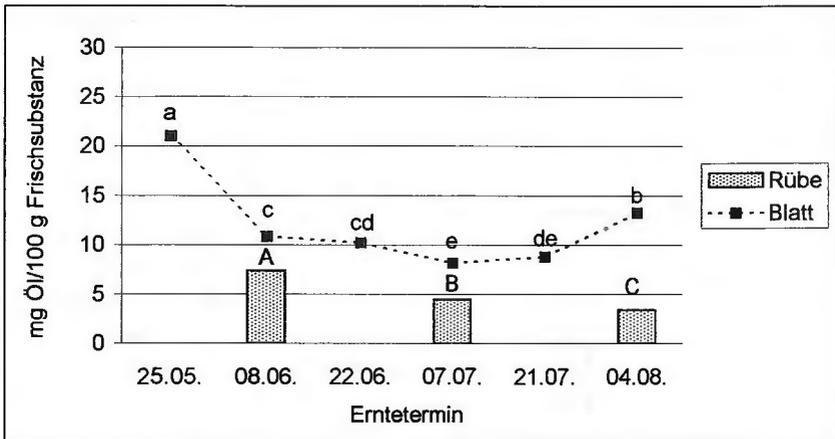


Abb. 2: Gesamtgehalte an ätherischen Ölen während der Entwicklung der Möhren, Sorte 'Cubic', Blatt und Rübe, Tukey-Test ( $p = 0,05$ )

Zum Aroma von Möhren trägt eine Vielzahl von Einzelsubstanzen bei. An einigen ausgewählten aromarelevanten Terpenen werden die relativen Mengen im Blatt- und Rübenöl verglichen.

Sowohl im Blatt als auch in der Rübe hat 'Nanco F<sub>1</sub>' signifikant höhere relative Mengen von Sabinen als die Sorte 'Cubic' (Abb. 3).

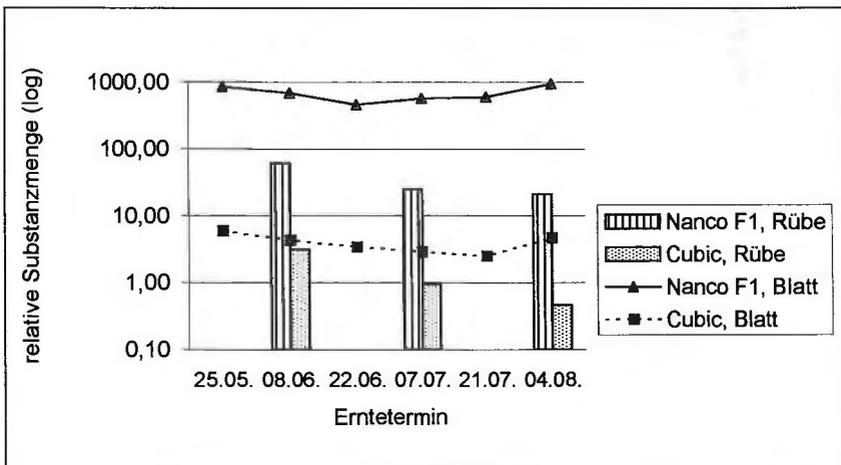


Abb. 3: Sabinen im ätherischen Öl der Blätter und Rüben während der Entwicklung der Möhren

Die Blätter beider Sorten enthalten signifikant höhere relative Mengen von  $\beta$ -Myrcen und  $\alpha$ -Phellandren verglichen mit den Rüben (Abb. 4).

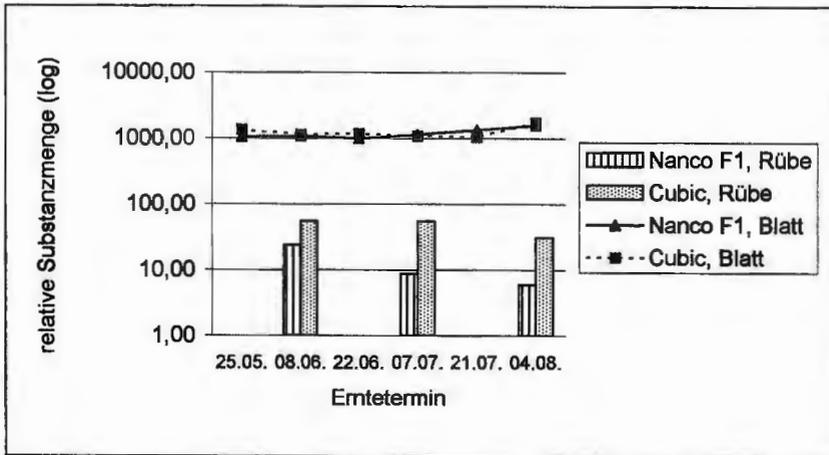


Abb. 4:  $\beta$ -Myrcen und  $\alpha$ -Phellandren im ätherischen Öl der Blätter und Rüben während der Entwicklung der Möhren

Die Rüben der Sorte 'Cubic' enthalten statistisch gesichert höhere relative Mengen von  $\gamma$ -Terpinen als 'Nanco F<sub>1</sub>'. Dagegen weisen die Blätter der Sorte 'Nanco F<sub>1</sub>' signifikant höhere Mengen  $\gamma$ -Terpinen auf als die Blätter der Sorte 'Cubic' (Abb. 5). In der Sorte 'Nanco F<sub>1</sub>' enthalten die Blätter signifikant höhere relative Mengen als die Rüben. In der Sorte 'Cubic' enthalten die Rüben signifikant höhere relative Mengen als die Blätter.

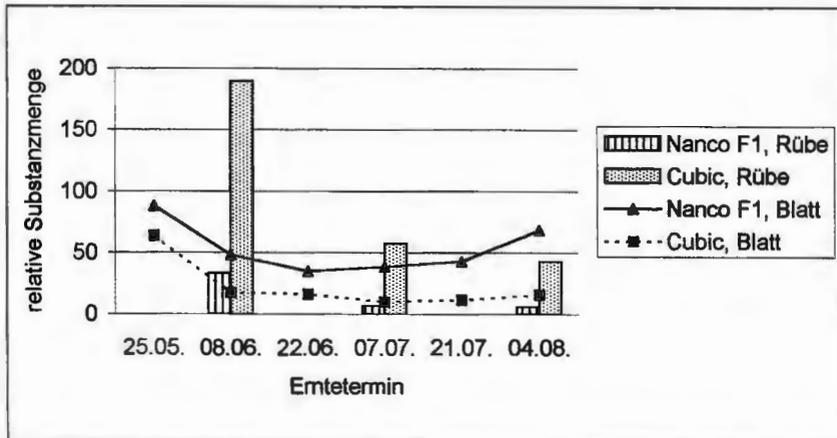


Abb. 5:  $\gamma$ -Terpinen im ätherischen Öl der Blätter und Rüben während der Entwicklung der Möhren

Betreff  $\alpha$ -Terpinolen enthalten von beiden Sorten die Rüben statistisch gesicherte höhere Mengen als die Blätter (Abb. 6).

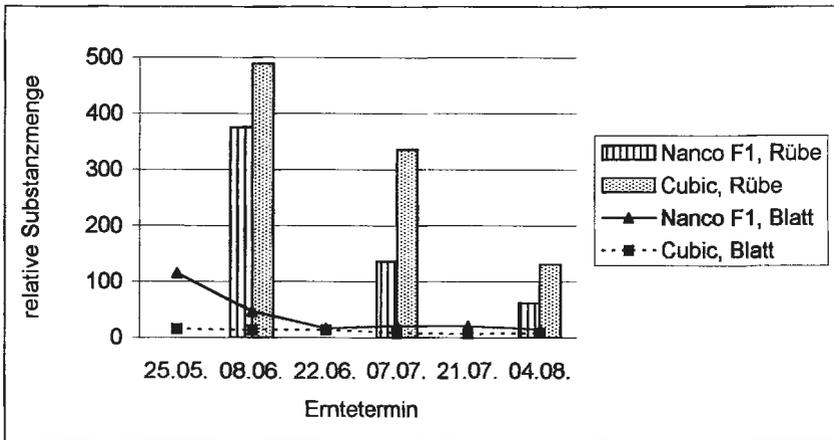


Abb. 6:  $\alpha$ -Terpinolen im ätherischen Öl der Blätter und Rüben während der Entwicklung der Möhren

### Zusammenfassung

Obwohl in den Blättern der Möhre höhere Gesamtölgehalte als in den Rüben gefunden wurden, sind nicht alle aromagebenden Komponenten auch in den Blättern in höheren Mengen enthalten.

Eine Vorhersage über die aromagebenden Inhaltsstoffe in den Rüben aus der Analyse der Blätter ist nach bisherigem Kenntnisstand nicht möglich.

Eine Nutzung der Möhrenblätter aufgrund der hohen Gehalte an aromarelevanten Mono- und Sesquiterpene im Hinblick ihrer bioaktiven Bedeutung ist zu evaluieren.

### Literatur

Habegger, R.; Müller, B.; Hanke, A.; Schnitzler, W.H. 1996: Geruchsgebende Inhaltsstoffe im ätherischen Öl von verschiedenen Möhrensornten. Gartenbau-Wissenschaft **61**, 225-229





## **Biological Value of Lipids of Some Sortes of Nuts and Hazelnuts From Southern Serbia**

*Z. Lalic, M. Miric, I. Miletic, S. Sobajic, B. Djordjevic,  
G. Vuckovic\*, J. Ajdic*

Inst. of Bromatology, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Yugoslavia  
\*Inst. for health protection, Kosovska Mitrovica, Yugoslavia

### **Abstract**

*Owing to its high nutritional value and specific pleasant taste, nuts and hazelnuts are considered delicious fruits and are widely consumed as snack or in production of fine sweets. They are known as good sources of lipids and proteins of high biological value. The aim of our work was to determine the biological value of lipids of some national sorts of nuts and hazelnuts, deriving from Kosovo region. The content of total lipids was determined by Soxhlet procedure (using ether as solvent) and by Maxwell dry column method (using the mixture of dichlorometane and methanol 9: 1 as solvent). Total lipid extract was separated on TLC plates and phospholipids, mono- and diglycerides, sterols, free fatty acids and triacylglycerols fractions were identified as dominant. The fatty acid's content was determined by GC. The content of polyunsaturated fatty acids was high in total nut's lipids and was composed of linoleic acid (56-61%) and  $\alpha$ -linolenic acid (10.5-16%), whereas total hazelnut's lipids contained linoleic (8.5 – 13.4%) and  $\alpha$ -linolenic (<1%), thus indicating the less biological value of hazelnut's lipids. Different extraction procedures that were performed did not have any influence upon the fatty acid composition.*

*Corresponding author. Brizita Djordjevic, Inst of Bromatology, Faculty of Pharmacy, 450, Vojvode Stepe, 11000 Belgrade, Yugoslavia*

## MATERIALS AND METHODS

Total lipids were extracted from dried and blended nuts and hazelnuts according to Soxhlet procedure (using ether as solvent) and by Maxwell's procedure (1).

The separation of total lipids on classes was performed on Silica G plates using so-called Mangold system as mobile phase (petroleum ether-dyethylether-glacial acetate, 80: 20: 1 (2). Detection of lipids was obtained by spraying the plates with 0,2 ethanolic dichlorfluoresceine and observing them under UV light. Fatty acid composition of total lipids was determined on Varian gas chromatographer equipped with flame ionization detector. Lipid samples were transesterified on cool with 2M KOH in methanol.

## RESULTS

The content of total lipids lies in a range between 62.8 – 67.9 % for hazelnuts and 64.5 –70.8 for nuts. The way of extraction did not have any influence upon lipid composition. TLC does not show qualitative differences in the composition of lipids of different sorts of nuts and hazelnuts. In all the samples are present phospholipids, mono- and diglycerides, sterols and free fatty acids, as well as triglycerides as the most prominent fraction. Nuts' lipids contain higher amount of polyunsaturated fatty acids, therefore are of higher biological value. Ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids for nuts' lipids is 7.4 – 7.8, and for hazelnuts' lipids 0.9-1.1. Different performed procedures did not have influence upon the fatty acid's composition.

The obtained results for determinations are presented in tables 1, 2 and 3. Samples 1, 2, 3 and 4 are nuts' lipids; samples 5,6 and 7 are hazelnuts' lipids.

**Table 1: The Content of Fatty Acids (obtained by Soxhlet procedure)**

SAMPLE	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>
1	7.33	0.22	1.83	19.26	57.79	13.53
2	6.94	0.19	2.38	21.42	57.53	11.50
3	7.12	0.10	2.06	18.76	58.34	13.60
4	7.35	trace	1.96	20.83	56.37	13.48
5	5.62	trace	3.12	81.56	8.43	1.25
6	5.65	0.10	1.84	81.28	11.11	trace
7	5.57	0.19	3.17	82.54	8.44	trace

**Table 2: The Content of Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids and Polyunsaturated /Saturated Ratio**

SAMPLE	Saturated Fatty Acids (%)	Monounsaturated Fatty Acids (%)	Polyunsaturated Fatty Acids (%)	P/S ratio
Sample 1	9.16	19.48	71.32	7.78
Sample 2	9.32	21.61	69.03	7.40
Sample 3	9.18	18.86	71.94	7.83
Sample 4	9.31	20.83	69.85	7.50
Sample 5	8.74	81.56	9.68	1.10
Sample 6	7.49	81.38	11.11	1.48
Sample 7	8.74	82.73	8.44	0.96

**Table 3: The Content of Fatty Acids (obtained by Maxwell procedure)**

SAMPLE	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>
1	5.99	0.10	2.17	19.93	61.43	10.45
2	7.59	0.11	2.76	20.14	56.06	13.27
3	7.52	0.14	3.41	19.16	57.88	11.86
4	7.51	0.13	2.41	18.79	55.57	15.54
5	5.66	0.11	3.36	81.73	7.82	1.30
6	5.61	0.18	3.26	77.17	13.76	trace
7	5.67	0.20	3.24	82.75	8.11	trace

**Table 4: The Content of Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids and Polyunsaturated /Saturated Ratio (obtained by Maxwell procedure)**

SAMPLE	Saturated Fatty Acids (%)	Monounsaturated Fatty Acids (%)	Polyunsaturated Fatty Acids (%)	P/S ratio
Sample 1	8.16	20.03	71.88	8.80
Sample 2	10.35	20.25	69.33	6.69
Sample 3	10.93	19.30	69.74	6.38
Sample 4	9.92	18.92	71.11	7.16
Sample 5	9.02	81.84	9.12	1.01
Sample 6	8.87	86.22	13.76	1.55
Sample 7	8.91	82.95	8.11	0.91

## CONCLUSIONS

Obtained results for fatty acid determination are in a good accordance with literature data (3). P/S ratio indicates that nuts' lipids are of high biological value, whereas polyunsaturated fatty acids consist of linoleic and linolenic acid. Both extraction procedures could be performed in lipids' analyses.

## REFERENCES

1. Maxwell R.J. Determination of total fat in meat and meat's products by a rapid dry column method. AOAC 1980. 63 (3), 600-603.
2. Trajkovic, J., Miric, M, Baras J., Siler S., Analiza zivotnih namirnica. Teholosko –metalurski fakultetet, Beograd (1983)
3. M.Miric, I. Miletic et Z. Lalic: Les acides gras et sterols de certain especes de noix et leur changement au cours du traitement thermique. Actes du Congress international Cvevreul pour l'etude des corps gras .1989.pp.107-114.

## Effect of sewage- and metal sludge application in selected Australian soils on Cd-uptake and growth of mangold

*Merle Lämmerhirt<sup>2</sup>, Mike McLaughlin<sup>1</sup> und Hans-Georg Schön<sup>2</sup>*

<sup>2</sup>Fachhochschule Osnabrück, Fachbereich Agrarwissenschaften, Oldenburger Landstrasse 24, 49090 Osnabrück

<sup>1</sup> CSIRO, Land and Water, Adelaide Laboratory, PMB 2, Glen Osmond, SA, 5064, Australia

### Objective

Reduction of solubility and bioavailability of Cd and other heavy metals by adding two concentrations of three different types of amendments (metal sludges) as well as sewage sludge to three different soils (sand, sandy loam, sandy clay loam)

### Questions:

1. Is the uptake of Cd by plants enhanced if sewage sludge is used and to what extent is it possible to reduce this uptake if metal sludges are also used as amendments together with reclaimed water for irrigation?
2. Are there any additional effects upon plant performance due to amendments?

### Expected outcomes

The solubility of Cd will be decreased because of adsorption by the metal oxides and hydroxides. It is also likely that deficiency symptoms will be observed for plants due to the addition of these metal sludges as a result of this adsorption.

### Why is the Cd uptake of plants so important?

- \* Cd is strongly toxic for animals, humans and plants
- \* Cd has the highest transfer quotient of the heavy metals (1.....10)
- \* Cd availability increases below pH 6.5 and over 7.5 (soluted as organic metal complexes and CdCO<sub>3</sub> in alkaline soils)

### Treatments

(only code no. is listed in the tables)

Every soil was amended with (dryweight)

- 1 - Sewagesludge + 19g Flue
- 2 - Sewagesludge + 57g Flue
- 3 - Sewagesludge + 19g Fe(OH)<sub>3</sub>
- 4 - Sewagesludge + 57g Fe(OH)<sub>3</sub>
- 5 - Sewagesludge + 19g Al-sludge
- 6 - Sewagesludge + 57g Al-sludge

7 - Sewagesludge  
8 – Control

Sewage sludge was amended at a rate of 25t/ha equivalent to 19 g/kg soil. The other amendments were applied at rates of 19g/kg soil and 57g/kg soil. Synthetically prepared reclaimed water was used to irrigate to field capacity  
Complete random block design with 4 replications was used (96 pots).

Table1:  
**Cation Exchange.Capacity of the 3 soils**  
cmol(+)/kg soil

Soil	Exch.Cations				Total	C.E.C (NH <sub>4</sub> OAc)
	Ca	Mg	Na	K		
Sandy clay loam	5.85	1.31	0.34	0.97	8	10
Sandy loam	16.55	1.43	0.33	1.46	20	20
Sand	2.31	0.37	0.22	0.25	3	3

Table 2:  
Metal- and Nutrient content of the treatments (ICP) by Total digest (*Aqua regia*)  
Element (mg/kg)=ppm

	Fe(OH) <sub>3</sub>	Al-sludge	Flue dust	Sewage sludge
Al	37881	91954	2834	10049
Ca	13868	7064	21004	2927
Co	9.8	2.2	5.3	4
Mg	3829	135165	2152	5712
K	2940	905	260	4448
Fe	60959	5774	23177	12093
P	1394	732	366	6636
Cu	26.4	345	29.9	328
Ni	20.5	6.03	2.92	36
Pb	0	0	277	59
Cr	26.4	7.8	29.9	119
Cd	*0.05	*0.08	*5.31	*2.93
Zn	41.2	16.1	2168	509

\*GFAAS Furnace has been used because the detection limit of ICP is to high for Cd

**Results:**

Table 3: Mean content of Cd in drymatter (mg/kg). Standard error for Cd content =0,265

Treatment	Soil texture	Mean content of Cd in drymatter (mg/kg)
1	Sand	2,23
	Sandy clay loam	2,01
	Sandy loam	0,77

2	Sand	5,20
	Sandy clay loam	2,07
	Sandy loam	1,27
3	Sand	0,46
	Sandy clay loam	1,31
	Sandy loam	0,47
4	Sand	1,25
	Sandy clay loam	0,82
	Sandy loam	0,37
5	Sand	0,94
	Sandy clay loam	1,44
	Sandy loam	0,38
6	Sand	0,61
	Sandy clay loam	1,05
	Sandy loam	0,46
7	Sand	0,95
	Sandy clay loam	2,01
	Sandy loam	0,41
8	Sand	0,40
	Sandy clay loam	2,18
	Sandy loam	0,37

Table 4: Mean values of drymatter (g/pot). Standard error for dry matter = 0,156

Treatment	Soil texture	Mean values of drymatter (g/pot)
1	Sand	1,01
	Sandy clay loam	0,41
	Sandy loam	3,17
2	Sand	0,09
	Sandy clay loam	0,32
	Sandy loam	2,83
3	Sand	1,27
	Sandy clay loam	0,43
	Sandy loam	3,40
4	Sand	0,91
	Sandy clay loam	0,20
	Sandy loam	3,54
5	Sand	1,13
	Sandy clay loam	0,30
	Sandy loam	3,08
6	Sand	1,68
	Sandy clay loam	0,23
	Sandy loam	3,56

7	Sand	1,08
	Sandy clay loam	1,33
	Sandy loam	2,93
8	Sand	1,07
	Sandy clay loam	0,74
	Sandy loam	2,81

Table 5: mean content of P in drymatter (mg/kg). Standard error for P content = 601,06

Treatment	Soil texture	Mean content of P in drymatter (mg/kg)
1	Sand	3818,35
	Sandy clay loam	3643,63
	Sandy loam	4766,87
2	Sand	3661,97
	Sandy clay loam	2581,58
	Sandy loam	4196,40
3	Sand	3525,85
	Sandy clay loam	3409,78
	Sandy loam	4424,42
4	Sand	3568,73
	Sandy clay loam	2952,39
	Sandy loam	4132,08
5	Sand	3293,74
	Sandy clay loam	2887,37
	Sandy loam	4320,73
6	Sand	2918,95
	Sandy clay loam	4104,50
	Sandy loam	3700,19
7	Sand	4340,00
	Sandy clay loam	5842,09
	Sandy loam	4808,57
8	Sand	4537,03
	Sandy clay loam	5060,33
	Sandy loam	4975,80

Figure 1: Association of Cd content in plants and drymatter (single plot data)

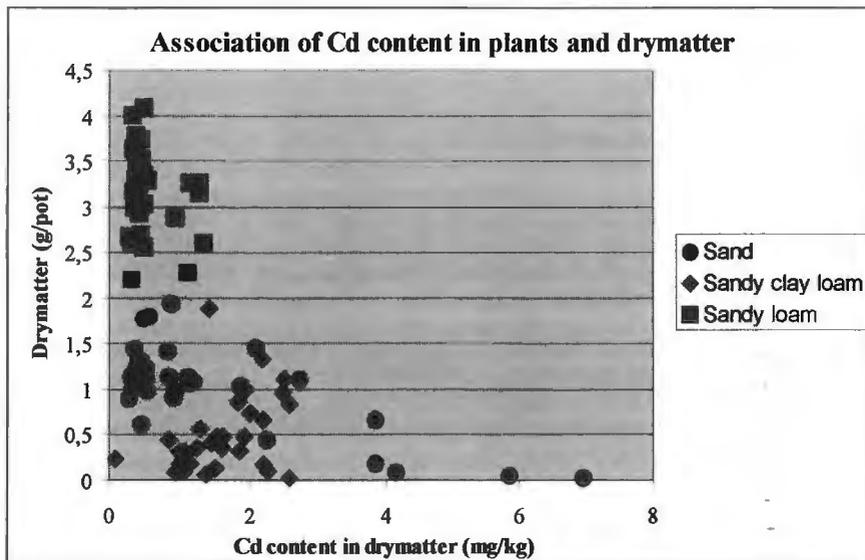


Table 6: Effect of amendments on pH and EC of the soils

EC	pH	Treatment (19/57g)	Sewage sludge (19g)
<i>Sand</i>			
0.36	8.28	19g Fe(OH) <sub>3</sub>	X
0.36	8.21	57g Fe(OH) <sub>3</sub>	X
0.45	8.17	19g Al-sludge	X
0.43	7.97	57g Al-sludge	X
0.50	8.07	19g Flue	X
0.72	7.99	57g Flue	X
0.38	8.22	O	X
0.07	8.81	O	O
<i>Sandy loam</i>			
0.39	7.91	19g Fe(OH) <sub>3</sub>	X

0.56	7.86	57g Fe(OH) <sub>3</sub>	X
0.48	7.91	19g Al-sludge	X
0.6	7.79	57g Al-sludge	X
0.6	7.83	19g Flue	X
0.83	7.76	57g Flue	X
0.44	7.91	O	X
0.19	8.1	O	O
<b><i>Sany clay loam</i></b>			
0.63	6	19g Fe(OH) <sub>3</sub>	X
0.74	6.15	57g Fe(OH) <sub>3</sub>	X
0.72	5.95	19g Al-sludge	X
0.63	6.23	57g Al-sludge	X
0.78	5.93	19g Flue	X
1.07	6.24	57g Flue	X
0.64	5.86	O	X
0.33	5.57	O	O

**Stepwise Multiple regression analysis** with P, Cd and Cd<sup>2</sup> as independant variables (content in dry matter) and dry matter as dependant variable resulted in:

$$Y=1.832-1.325\cdot Cd+0.149\cdot Cd^2+0.000235\cdot P$$

corrected R<sup>2</sup> = 0,388, F-value of the regression model = 20,883\*\*\* (N=96). This reflects also the significant influence of P-uptake on growth.

#### **Discussion:**

The Cd-content in plants was reduced in the sandy clay loam by the application of Fe(OH)<sub>3</sub> (significant difference between Fe(OH)<sub>3</sub> 57g and control). Also Al(OH)<sub>3</sub> resulted in lower Cd-content in this soil but without significant differences.

The correlation between Cd-content and dry matter was significant. The multiple regression also showed a significant influence of P-availability. P contents in plants were reduced significantly by the application of Flue dust (57g) compared with the sewage sludge treatment in the sandy clay loam.

Flue amendment resulted in high to very high Cd-contents in plants on the sandy soil but not in the sandy clay loam and sandy loam. On the sandy clay loam the pH effect of Flue dust could have resulted in increased Cd-adsorption due to increased negative variable charge. The comparatively small increase in the Cd content due to Flue amendment on the sandy loam is possibly caused by the lower Cd-concentration in the soil solution at field capacity. The sand most probably had higher Cd concentrations in the soil solution at field capacity.

Cd uptake was not significantly increased by the application of sewage sludge.



## Analytische Charakterisierung des Fermentationsprozesses von Rotbuschtee (*Aspalathus linearis*)

B. Steuer<sup>1</sup>, W. Schütze<sup>1</sup>, H. Schulz<sup>1</sup>, E. Joubert<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> ARC Infruitec, Centre for Fruit and Fruit Technology Research Institute,  
Stellenbosch, South-Africa

*„Analytical Characterization of the Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) Fermentation Process“*

*Rooibos tea cultivated in South Africa contains several different anti-oxidative compounds such as flavonols, flavanones and chalcones. With regard to the concentration two dihydrochalcones aspalathin and nothofagin have been considered as most valuable components. In order to characterize these valuable components a new fast HPLC method for the determination of rooibos tea compounds is described. Furthermore it is shown, that the amount of aspalathin decreases during the fermentation process, which can be monitored by a new near infrared method, which also allows a discrimination of different tea qualities.*

*Correspondence:*

*Dr. Boris Steuer, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Qualitätsanalytik, Neuer Weg 22/23, D-06484 Quedlinburg, Email: B.Steuer@bafz.de*

### **Einleitung**

Der aus Südafrika stammende Rotbusch-Tee (Rooibos- oder Massai-Tee) erfreut sich als koffeinfreies Getränk aufgrund der ihm zugeschriebenen gesundheitsfördernden Eigenschaften in den letzten Jahren zunehmender Beliebtheit. Studien belegen seine antimutagene und anticarcinogene sowie entzündungshemmende Wirkung. Rotbusch-Tee gehört zur Familie der Leguminosen, wächst in bis zu 2 m hohen Büschen mit nadelförmigen Blättern von 2 bis 6 cm Länge und ist bereits im Jahre 1772 erstmalig beschrieben worden. Er bevorzugt mediterranes Klima, kommt ausschließlich in einem kleinen Bereich Südafrikas im Clanwilliam-Distrikt vor und wird erst seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts kultiviert und gezüchtet.

Die Ernte des Rooibos-Tees findet in den Sommermonaten ab dem zweiten Jahr statt. Die Triebspitzen werden hierbei in ca. 0,5 cm lange Stücke geteilt, auf einem Steinuntergrund ausgebreitet und zur Einleitung der Fermentation mit Wasser versetzt. Je nach Witterung fermentiert die grüne Droge zwischen 8 und 24 Std. lang bei ca. 35° C bis der Rotbusch-Tee seine typisch rotbraune Färbung erreicht hat [1]. Während der Fermentation ändert sich das Flavour von unangenehm harzig zu süß, apfel- oder honig-caramelartig.

Anschließend wird der Tee solange in der Sonne getrocknet, bis ein Wassergehalt von <10 % erreicht ist (ca. 24 h), wobei auf eine möglichst kurze Zeitspanne zu achten ist, um „Über-Fermentation“ zu vermeiden. In Rooibos-Extrakten wurden bisher mehr als 120 aromarelevante Komponenten mittels GC-MS identifiziert, wobei das Aromaprofil sehr eng von der Prozessführung abhängt.

Der Rotbusch-Tee wird üblicherweise im folgenden durch 3 mm Siebe gegeben, wobei die „Waste“ (grobkörniges Material und Stengel) sowie die „Dust“-Fraktion (feinteiliger Staub) abgetrennt werden. Die Qualitätsbestimmung wird durch Mitglieder des Rooibos Tea Boards vorgenommen, die die fermentierte Ware auf Reinheitsgrad, Schnittlänge, Aroma, Farbgebung und Restfeuchte prüfen und anschließend in bis zu acht verschiedene Qualitäten einordnen.

### Inhaltsstoffe und Analytik

Rotbusch-Tee enthält einen vergleichsweise hohen Mineralstoffgehalt und bis zu 15,7 mg/100 g Ascorbinsäure [2]. Die gesundheitsfördernden Eigenschaften werden aber hauptsächlich auf die Anwesenheit zahlreicher Flavonoide wie z. B. Quercetin, Quercitrin, Luteolin, Orientin, Rutin und Vitexin [3] sowie die in Rooibos-Tee einzigartig vorkommenden Dihydrochalcone Aspalathin und Nothofagin (Abb.1) zurückgeführt.

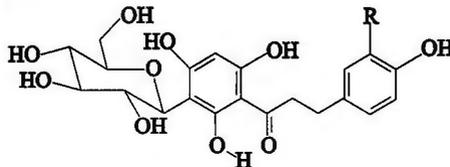


Abb. 1 R = OH – Aspalathin; R = H – Nothofagin

Nach der Charakterisierung des Flavonoidprofils mittels Dünnschichtchromatographie wurde später eine HPLC-Methode entwickelt, die insbesondere zur Quantifizierung von Aspalathin und Nothofagin während des Fermentationsprozesses eingesetzt wurde [4]. Da der Bedarf besteht, solche Bestimmungen in möglichst kurzer Zeit durchzuführen, behandelt der nachfolgende Artikel die Entwicklung einer Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS) Methode [5] basierend auf den Ergebnissen eines neuen hinsichtlich Trennleistung und Genauigkeit verbesserten HPLC-Verfahrens. Darüber hinaus wurden die Möglichkeiten und Grenzen einer Differenzierung verschiedener Fermentationsprodukte aufgrund der gewonnenen spektralen Daten untersucht.

### Material und Methoden

Untersucht wurden 120 Proben unfermentierten und fermentierten Tees aus verschiedenen Anbauregionen Südafrikas (Nieuwoudtville, Gifberg, Clanwilliam, Citrusdal, Eendekuil).

#### HPLC

Nach Vermahlen des Materials werden 500 mg bei 100° C (15 Min.) mit Wasser extrahiert und nach Abkühlung mit 1 %iger Ascorbinsäure versetzt. Die HPLC-Untersuchungen der zentrifugierten, gefilterten Lösung erfolgten an einer 3,5  $\mu$  ZORBAX SB-C18-Säule (3,0 x 15 mm) mit Gradientenelution (1% HCOOH / CH<sub>3</sub>CN) innerhalb von 30 Min.

### NIRS

Das Rohmaterial wurde an einem dispersiven NIR-Gerät NIR Systems 5000 der Firma Foss im Reflexionsmodus im Bereich von 1100 bis 2500 nm vermessen. Basierend auf den spektralen Daten wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt und anschließend eine quantitative Auswertung unter Anwendung eines modifizierten PLS-Algorithmus (Tecator ISI-Software) nach erfolgter Streukorrektur (WMSC) durchgeführt. Die Güte der Kalibration wurde mit Hilfe der Kreuzvalidationsparameter  $R^2$  (Bestimmtheitsmaß zwischen vorhergesagten und Referenzwerten) sowie SECV (Standardfehler der Kreuzvalidierung) ermittelt.

### Ergebnisse

#### HPLC

Die HPLC-DAD-Bestimmung konnte im Hinblick auf die flavonoiden Inhaltsstoffe in Trennleistung, Analysendauer und Wiederholbarkeit im Vergleich zu den bisher publizierten Methoden deutlich optimiert werden. Der Zusatz von Ascorbinsäure ermöglicht hierbei die zuverlässige Bestimmung des oxidationsempfindlichen Aspalathins, dessen Gehalt sich im Verlauf der Fermentation auf bis zu 1,5 % reduziert, während Nothofagin auf 10 % im Vergleich zum unfermentierten Tee zurückgeht (Tab.1). Die anderen sekundären Inhaltsstoffe bleiben während des Fermentationsprozesses weitgehend unverändert.

Unfermentiert	Aspal.	Notho.	Fermentiert	Aspal.	Notho.
Clanwilliam (A)	4,52	0,34	Choice grade	0,14	0,10
Clanwilliam (M)	5,44	0,56	Super grade	0,21	0,12
Gifberg (A)	6,25	0,66	sonnengetrocknet	0,11	0,09
Clanwilliam (J)	9,34	1,03	tunnelgetrocknet	0,16	0,11
Waste (Blätter)	4,45	0,68	Stengel, grobe Blätter	0,11	0,02
Waste (Stengel)	7,89	1,25	ungesiebt	0,11	0,03
Prozessfeld (Blätter)	11,9	1,33	Dust	0,12	0,03

**Tabelle 1:** Vergleich verschiedener unfermentierter und fermentierter Teequalitäten (J-überwiegend junge Pflanzen, A-überwiegend alte Pflanzen, M-Mischung aus alten und jungen Pflanzen)

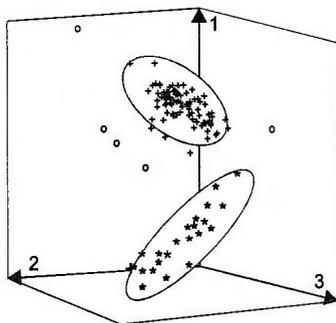
### NIRS

Auf Basis der spektralen Daten gelingt es, bei Anwendung von PCA deutlich getrennte Faktorgruppen für fermentierte und unfermentierte Teedrogen zu erhalten. Die semifermementierten Proben liegen erwartungsgemäß im Bereich zwischen den beiden Gruppen, während die bei der weiteren Aufbereitung erhaltenen „Dust“-Fraktionen sowie die aufgrund von Pilzbefall aussortierten Pflanzenteile als separate Cluster erkannt werden (Abb.2).

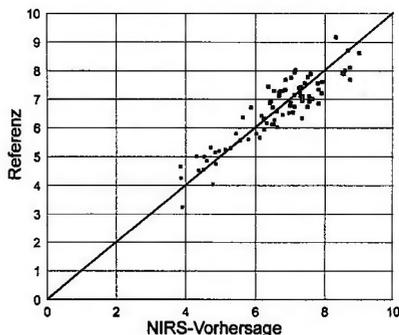
Für den Aspalathingehalt in unfermentiertem Tee (Gehalt 3,9 – 9 %) konnte eine Kalibration mit einem durchschnittlichen Methodenfehler von 0,65 % bei einer Korrelationsgüte ( $R^2$ ) zwischen NIRS-Vorhersage und HPLC-Referenzwert von 0,76 erstellt werden. Der relativ große Fehler ist auf die geringe Bandenintensität der CH-Valenzschwingung ( $\nu_{CH}$ ) im

Infrarotbereich zurückzuführen, wohingegen im Obertonbereich der Gerüstbanden Interferenzen mit der Matrix dominieren.

Die beschriebene NIRS-Methode ist trotz des relativ hohen Methodenfehlers gut geeignet, um für die Züchtung, den Anbau und die Erntezeitbestimmung hinreichend genaue Daten zu liefern und in Kombination mit PCA zusätzlich Qualitätsmerkmale verschiedener Fermentationsprodukte zu bestimmen.



**Abb. 2** PCA verschiedener Tee-Proben  
(\*) – unfermentiert; (+) – fermentiert;  
(o) – Waste/“Dust“



**Abb 3** NIRS-Kalibration für Aspalathin in unfermentiertem Rooibos-Tee

### Literatur

1. E. Joubert, O.T. de Villiers: Effect of fermentation and drying on the quality of rooibos tea. *Int. J. Food Sci. Tec.* (1997), **32**, 127-134.
2. J.F. Morton: Rooibos Tea, *Aspalathus linearis*, a Caffeinless, Low-Tannin Beverage. *Econ. Bot.* (1983), **37**, 164-173.
3. E. Joubert, D. Ferreira: Antioxidants of Rooibos tea – a possible explanation for its health promoting properties? *SA J. Food Sci. Nutr.* (1996), **8** (3), 79-83.
4. E. Joubert: HPLC quantification of the dihydrochalcones aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chem.* (1996), **55** (4), 403-411.
5. H. Schulz, U.H. Engelhardt, A. Wegent, H.-H. Drews, S. Lapczynski: Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to the Simultaneous Prediction of Alkaloids and Phenolic Substances in Green Tea Leaves, *J. Agric. Food Chem.* (1999), **47** (12), 5064-5067.



## Variabilität der Carotinoide, Chlorophylle und Vitamin C in Brokkoli in Abhängigkeit vom Brokkolityp, von der Kopfentwicklung und von dem Anbauzeitraum

*Angelika Krumbein und Ilona Schonhof*

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V.

*Variability of carotenoids, chlorophylls and vitamin C in broccoli dependent on broccoli type, development stage of the head at harvest time and production period*

### *Abstract*

*Broccoli is a rich source of healthy substances like carotenoids, chlorophylls and vitamin C. The choice of broccoli type already determines the level of substances. These genetic relations are constant during the entire growing period of the year. Complete developed heads of broccoli show the highest contents of carotenoids, chlorophylls and vitamin C. During production period the content of carotenoids is mainly influenced by the daily mean temperature. The content of vitamin C is dependent on photosynthetic photon flux density.*

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

### **Einleitung**

Aktuelle Trendanalysen im Verbraucherverhalten zeigen, daß der gesundheitliche Aspekt als Zusatznutzen bei der Gemüsequalität an Bedeutung gewinnen wird. Brokkoli, ein Gemüse mit zunehmendem Verbrauch in Deutschland, ist durch einen hohen Gesundheitswert charakterisiert (Watzl und Leitzmann 1999). Brokkoli zeichnet sich u.a. durch hohe Gehalte an Carotinoiden, Chlorophyll und Vitamin C aus, die eine antikancerogene Wirkung haben (Naumann 1997). Die Gehalte variieren dabei beträchtlich (Gross 1979, Heinonen et al. 1989, Albrecht et al. 1990, Hidaka et al. 1992, Herrmann 1999). Es sollte geklärt werden, inwieweit durch Wahl des Brokkolityps (Sorten), des Kopfentwicklungsstadiums zur Ernte sowie des Anbauzeitraums, der durch die Tagesmitteltemperatur und die Globalstrahlung charakterisiert ist, die Gehalte an Carotinoiden (Lutein,  $\beta$ -Carotin), Chlorophyll (Chlorophyll a, Chlorophyll b) und Vitamin C beeinflusst werden.

## Material und Methode

Brokkoli der Sorten 'Emperor' (Speartyp), 'Marathon' (Crowntyp) und 'Viola' (violetter Typ) wurden im Frühjahr, Sommer und Herbst (3 Jahre) nach den Richtlinien der 'Integrierten Produktion' (Winkhoff 1992) mit Kulturschutznetzbedeckung angebaut. Die Untersuchungen zum Stadium der Kopfentwicklung erfolgten an Pflanzen, die 30, 50, 70 und 100% des erwarteten Kopfdurchmessers erreicht hatten.

Für die Bestimmung der Inhaltsstoffe wurden von jeder Sorte bei drei pflanzenbaulichen Wiederholungen 5 Köpfe entnommen. Aus den Röschen (Blütenknospe und zweite Stielverzweigung) wurde eine Mischprobe gebildet. Die Gehalte der Carotinoide (Lutein,  $\beta$ -Carotin) und Chlorophylle (Chlorophyll a, Chlorophyll b) wurden mit der HPLC an der RP-18 Phase Lichrosphere 100 mit einem ternären Eluenten aus Acetonitril/Methanol/Dichlormethan (75:15:10) isokratisch ermittelt (Krumbein 1996). Vitamin C wurde als Ascorbinsäure titrimetrisch mit 2,6-Dichlorphenolindophenol bestimmt. Die Gehalte werden auf 100 g Frischmasse (FM) angegeben.

Die statistische Verrechnung der Daten erfolgte durch Varianzanalyse. Geprüft wurde die Signifikanz anhand des Tukey-Testes bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Varianzanalysen und Regressionen wurden mit dem Programm Statistica durchgeführt.

## Ergebnisse

### *Brokkolityp*

Im Anbau sind drei verschiedene Brokkolitypen, der kräftig grüne Spearbrokkoli (Sorte 'Emperor'), der graugrüne großköpfige Crownbrokkoli (Sorte 'Marathon') und im geringeren Umfang violetter Brokkoli (Sorte 'Viola'). Die Brokkolitypen unterschieden sich nicht nur im Aussehen, sondern auch in ihren Inhaltsstoffgehalten. Der Speartyp enthielt hohe Gehalte an Chlorophyll, gefolgt vom Crowntyp (Abb. 1). Der Speartyp zeichnete sich weiterhin durch hohe Gehalte an Carotinoiden (Lutein: 1,7 mg/100 g FM,  $\beta$ -Carotin: 1,5 mg/100 FM) aus besonders gegenüber dem violetten Typ mit den niedrigsten Gehalten (Lutein: 0,6 mg/100 g FM,  $\beta$ -Carotin: 0,4 mg/100 g FM). Der Gehalt an Ascorbinsäure (90 % des Vitamin C-Gehaltes waren Ascorbinsäure) variierte in den Brokkolitypen relativ gering zwischen 100 - 120 mg/100 g FM. Mit der Sortenwahl wurde das Level der bioaktiven Substanzen bestimmt. Die Relationen blieben bei allen Anbaubedingungen gleich.

### *Stadium der Kopfentwicklung*

Der Gehalt an den gesundheitlich wirkenden Inhaltsstoffen wurde durch das Kopfentwicklungsstadium zum Erntetermin beeinflusst. Zur Ernte voll entwickelte Brokkoliköpfe hatten die höchsten Gehalte an Vitamin C, Carotinoiden und Chlorophyll. Mit steigender Kopfentwicklung stieg der Ascorbinsäuregehalt in den Röschen um 18 - 33 % in Abhängigkeit von der Sorte. Für die jeweilige Sorte bestand ein enger Zusammenhang zwischen dem Durchmesser des Kopfes als morphologischem Kennzeichen der Kopfentwicklung und dem Ascorbinsäuregehalt (Abb. 2). Der Gehalt an Lutein nahm im Mittel um 136 % zu und der Gehalt an  $\beta$ -Carotin um 65 %. Der Gehalt an Chlorophyll a und b stieg um 111% bzw 117 % an.

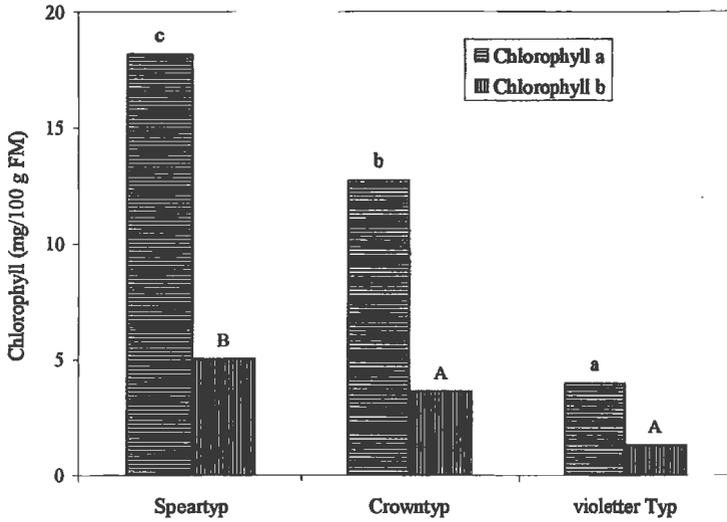


Abb. 1 Gehalt an Chlorophyll a und Chlorophyll b in drei Brokkolitypen

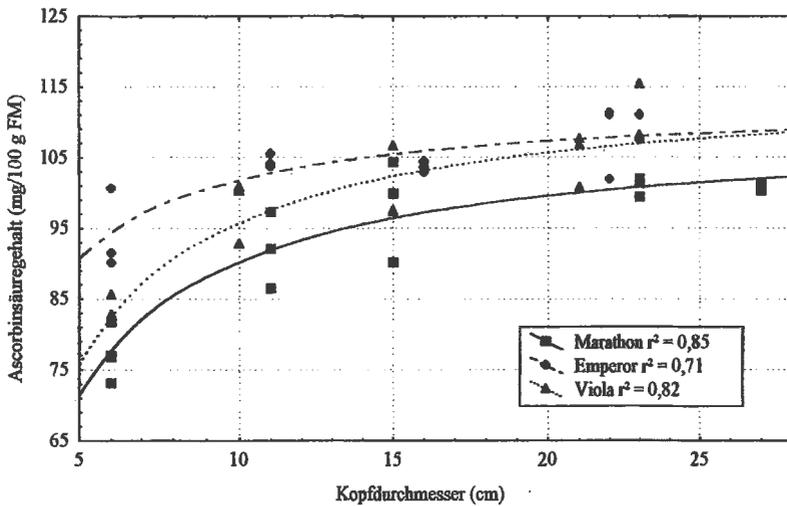


Abb. 2 Zusammenhang zwischen Ascorbinsäuregehalt und Kopfdwicklung bei Brokkoli

## Anbauzeitraum

Durch die verschiedenen Anbauzeiträume wurden unterschiedliche Tagesmitteltemperaturen und Globalstrahlungen realisiert. Der Gehalt an Carotinoiden wurde wesentlich durch die Tagesmitteltemperatur bestimmt. Der Gehalt an Lutein erreichte ein Maximum bei einer Tagesmitteltemperatur von etwa 15 °C (Abb. 3). Der Gehalt an  $\beta$ -Carotin nahm bei

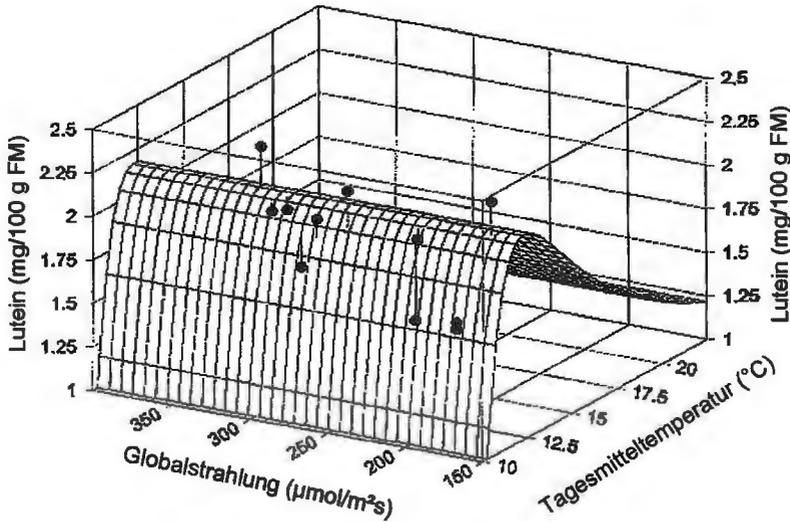


Abb. 3 Korrelation zwischen Lutein, Tagesmitteltemperatur und Globalstrahlung für Brokkoli der Sorte Emperor ( $z = a + b/x^2 + ce^{-x}$ ,  $r = 0,83$ )

Tagesmittelwerten unter 16,5 °C um 30-60 % zu gegenüber denen über 16,5 °C. Die Globalstrahlung hatte keinen Einfluß auf den Gehalt an Carotinoiden. Demgegenüber wurde der Vitamin C-Gehalt durch die Globalstrahlung beeinflusst. Eine Globalstrahlung unter 280  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  führte zu einem mittleren Wert von 125 mg Vitamin C/100 g FM. Dieser Wert verringerte sich auf 105 mg Vitamin C/100 g FM bei hohen Globalstrahlungen.

## Schlußfolgerungen

Der Gehalt an Carotinoiden, Chlorophyllen und Vitamin C in Brokkoli wird wesentlich durch den Brokkolityp, das Stadium der Kopfentwicklung und den Anbauzeitraum beeinflusst. Mit der Wahl des Brokkolityps wurde das Level der gesundheitlich wirkenden Substanzen bestimmt. Voll entwickelte Köpfe wiesen den höchsten Gehalt an Carotinoiden, Chlorophyllen und Vitamin C auf. Während des Anbauzeitraums beeinflusste die Tagesmitteltemperatur den Carotinoidgehalt und die Globalstrahlung den Vitamin C-Gehalt.

## Literatur

- Albrecht, J.A., H.W. Schafer and E.A. Zottola 1990: Relationship of total sulfer to inzial and retained ascorbic acid in selected cruciferos and noncruciferos vegetables. *Journal fo Food Science* 55, 1, 181-183.
- Gross, J. 1979: The Pigments of three hybrid varieties of Broccoli (*Brassica oleracea var. Italica*). *Gartenbauwissenschaft* 5, 213-216.
- Heinonen, M. I. , V. Ollilainen, E.K. Linkola, P.T. Varo and P.E. Koivistoinen 1989: Carotenoids in finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37, 655-659.
- Herrmann, K. 1999: Inhaltsstoffe des Brokkoli. *Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung* 2, 34-40.
- Hidaka, T., N. Fukuda and K. Taniguchi 1992: Contents of lipids, fatty acids, carotenoids and chlorophylls in broccoli (*Brassica oleracea L. var. Italica Plenck*) *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39, 425-428.
- Krumbein, A. 1996: Schnelle HPLC-Methode zur Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle in Brokkoli. *Tagungsband DGQ Kiel*, 41-44.
- Naumann, R. 1997: *Bioaktive Substanzen: Die Gesundmacher in unserer Nahrung*, Rowohlt.
- Watzl, B. und C. Leitzmann 1999: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.
- Winkhoff, J. 1992: *Integrierter Anbau von Gemüse in der Bundesrepublik Deutschland*. Zentralverband Gartenbau Bundesfachgruppe Gemüse, Bonn.





## In vitro antioxidative Wirkung von Gemüse auf humanpathologisch relevante reaktive Sauerstoffspezies

R.G. Schaller, S. Walter, W.H. Schnitzler

Lehrstuhl für System- und Qualitätsforschung bei Gemüse  
Technische Universität München-Weihenstephan

### *In vitro antioxidative effects of vegetables on reactive oxygen species with pathogenic impact*

*Watery extracts of lyophilized carrots, tomatoes, red pepper, broccoli and onions have antioxidative properties. This was proved with three methods, each of it specific for different reactive oxygen species (ROS). The antioxidant activity was highly dependent on the amount of vegetable extract used. The luminescence detection has clearly been the most sensitive test. Each of the three methods showed a different ranking of the vegetable-extracts. This leads to the conclusion that vegetable extracts act differently on different radicals. However, all these methods only dealt with radical scavenging activities on one or some few radicals which is not a representative model for the human body. In experimental studies a lot of substances show antioxidative activities. The practical relevance maintains unsolved as there are no clinical studies confirming these results.*

*Corresponding author: Dr. Robert G. Schaller, Technische Universität München-Weihenstephan, Lehrstuhl für System- und Qualitätsforschung bei Gemüse, 85350 Freising  
E-Mail: [schaller@vegetable.de](mailto:schaller@vegetable.de), Internet: <http://www.vegetable.de>*

### **Einleitung**

Im menschlichen Körper werden unter physiologischen Bedingungen und durch Umwelteinflüsse reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet [Bors et al. 1992, Elstner 1990]. Zum Schutz vor unkontrollierter Oxidation und zur Aufrechterhaltung der Balance zwischen Pro- und Antioxidantien ist zur Unterstützung des körpereigenen Regulationssystems eine ausreichende alimentäre Zufuhr von Antioxidantien notwendig [Popov et al. 1987]. Die Entstehung von Krankheiten wie Krebs, Arteriosklerose, Arthritis und Diabetes ist ursächlich mit der Wirkung von ROS verknüpft. Die Inzidenz dieser Krankheiten könnten bei Anwesenheit spezifischer Antioxidantien zur richtigen Zeit und am richtigen Ort im menschlichen Organismus erheblich vermindert werden [Elstner 1993]. Pflanzliche Nahrungsmittel, insbesondere Gemüse, enthalten eine Vielzahl bioaktiver Verbindungen mit antioxidativen Eigenschaften. Einige dieser Substanzen konnten bereits isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Um die gesundheitliche Relevanz einzelner Antioxidantien abschätzen zu können, müssen jedoch die Wirkorte im menschlichen Körper und die genauen Entgiftungsreaktionen bekannt sein. Bei einigen Antioxidantien sind in unterschiedlichen Kompartimenten synergistische Funktionen erkannt worden. Nur das Zusammenspiel der richtigen Kooperationspartner, zur richtige Zeit und am richtigen Ort, kann einen reibungslosen Ablauf der Entgiftungsreaktionen ermöglichen [Elstner 1990]. Für

den Einfluss der Ernährung auf die menschliche Gesundheit interessiert aus diesen Gründen die kombinatorische antioxidative Wirkung der bioaktiven Gemüseeinhaltsstoffe [Fogliano et al. 1999].

### **Material und Methoden**

Die antioxidative Wirkung von Brokkoli, Möhre, Paprika, Tomate und Zwiebel wurde in drei unterschiedlichen Testsystemen untersucht. Bei jeder Analysenmethode wurden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in wässrigen Gemüseextrakten generiert. In Gegenwart von geeigneten Indikatorsubstanzen wurde untersucht, in welchem Ausmaß Gemüseeinhaltsstoffe die oxidationsempfindlichen Indikatorsubstanzen vor radikalischen Angriffen schützen können.

#### Probenaufbereitung:

Brokkoli, Möhre, Paprika, Tomate und Zwiebel (jeweils 25 Stück, bekannte Sorten und Herkünfte) wurden vakuum-gefriergetrocknet in Labormøhlen feinstzerkleinert und mit bidestilliertem Wasser extrahiert.

#### Methode 1: „Fenton-System“

Im gepufferten (pH 7,4), wässrigen Gemüseextrakt werden durch Reaktion von  $\text{FeSO}_4$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer Fenton-Typ-Reaktion **Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ )** gebildet. Die Indikatorsubstanz  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methylthiobutyrische Säure (KMB) fragmentiert in Anwesenheit von  $\text{OH}^\cdot$ -Radikalen, wobei als Bruchstück Ethen entsteht. Die gebildete Menge an Ethen ist die Meßgröße dieses Systems und wird mit einer statischen Headspace-Methode gaschromatographisch quantifiziert (HS-GC-FID). Eine reduzierte Bildung von Ethen im Probenansatz weist auf antioxidative Wirkungen von Gemüseeinhaltsstoffen hin (v. Kruedener et al. 1995).

#### Methode 2: „Rose Bengal-System“

Das gepufferte Gemüseextrakt (pH 7,4) wird mit Rose Bengal versetzt und im thermostatisierten Wasserbad mit UV-Strahlung beaufschlagt ( $600 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Durch Rose Bengal wird vor allem **Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ )** erzeugt, der spontan mit zugesetzter Linolensäure reagiert. In einer übergangsmetallkatalysierten Reaktion ( $\text{Cu}^{++}$ ) werden die Gase Ethan und Ethen gebildet. Die gebildete Menge an Ethan und Ethen ist die Messgröße dieses Systems und wird mit einer statischen Headspace-Methode gaschromatographisch quantifiziert (HS-GC-FID). Eine reduzierte Bildung von Ethan und Ethen im Probenansatz weist auf antioxidative Wirkungen von Gemüseeinhaltsstoffen hin (Rohnert et al. 1998).

#### Methode 3: „Photochemolumineszenz (PCL)“

Spontane Chemolumineszenz tritt z.B. bei der radikalischen Oxidation von Lipiden auf und emittiert Strahlung im gesamten Spektralbereich mit niedriger Intensität (Popov & Levin 1986). Die hier durchgeführte photoinduzierte Chemolumineszenz-Messung basiert auf einer ca. 1000-fachen Verstärkung der oxidativen Vorgänge in vitro durch optische Anregung eines Photosensitizers in Gegenwart von Sauerstoff. Die wässrigen Gemüseextrakte werden mit Carbonatpuffer (pH 10,5), EDTA und Luminol (3-Aminophthalsäurehydrazid) versetzt und mit UV-A-Strahlung beaufschlagt. In diesem System wirkt Luminol als Photosensitizer und Indikatorsubstanz. Die induzierte Chemolumineszenz ist hauptsächlich auf die Bildung von **Superoxidradikalanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )** zurückzuführen und kann mit dem Analysengerät *Photochem*® (F.A.T. GmbH) quantifiziert werden [Lewin & Popov 1994, Popov & Lewin

1994]. In Gegenwart von Antioxidantien wird die Zeit bis zum Auftreten von Chemolumineszenz (lag-Phase) verlängert und die Intensität verringert.

### Ergebnisse und Diskussion

Alle untersuchten Gemüseextrakte zeigten in den drei angewendeten Testsystemen antioxidative Wirkung. Die drei Analysemethoden führten zu unterschiedlichen Bewertungen des antioxidativen Potentials der Proben. Als Messergebnis der Methoden 1 und 2 erhält man, wie in Abbildung 2 zu sehen, die Mengen der gebildeten Indikatorgase [nmol]. Diese Werte kann man auch als Hemmung der Gasproduktion im Vergleich zu einer gemüseextraktfreien Kontrolle [%] angeben (siehe Abbildung 1). Die Messergebnisse der PCL-Methode (Methode 3) sind prinzipiell einheitenlos. Betrachtet werden die Intensität der Chemolumineszenz und die Länge der lag-Phase. Die hohe Messempfindlichkeit des Gerätes Photochem erfordert, je nach Probenart, unterschiedliche Verdünnungen der Extrakte. Eine Darstellung der Chemolumineszenzmeßkurven aller Gemüseextrakte in einer Graphik ist deswegen problematisch. Exemplarisch für alle durchgeführten Analysen werden die Messergebnisse von wässrigen Extrakten aus Möhre und Tomate illustriert (Abbildungen 1, 2 und 3).

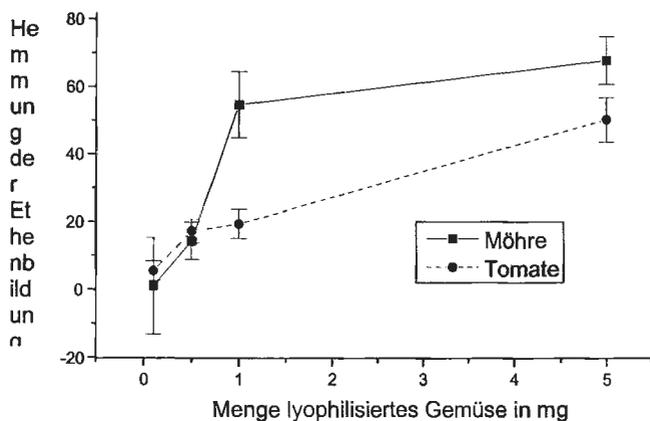


Abb. 1: Prozentuale Hemmung der Ethen-Bildung in einem Fenton/Haber-Weiss System durch Extrakte aus Möhre und Tomate (Methode 1)

Ein wesentliches Ergebnis dieser Studie ist die Tatsache, dass die untersuchten Gemüsearten sehr unterschiedlich auf verschiedene ROS reagieren. Extrakte von Möhren wirkten im Testsystem 1 sehr effektiv gegen Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) (vgl. Abbildung 1). Im Testsystem 2 war die Aktivität von Möhrenextrakten gegenüber Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) schwächer als die von Tomaten (Abbildung 2). Bei der Bestimmung der Photochemolumineszenz im Testsystem 3 boten Möhrenextrakte den geringsten Schutz aller getesteten Gemüse gegenüber Superoxidradikalen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), die am wirkungsvollsten durch Paprikaextrakte neutralisiert wurden (vgl. Tabelle 1).

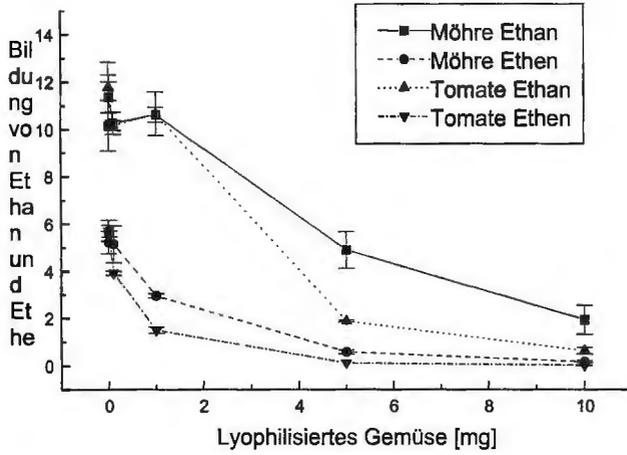


Abb. 2: Hemmung der absoluten Ethan- und Ethen-Bildung [nmol] im Rose Bengal-System durch Extrakte aus Möhre und Tomate (Methode 2)

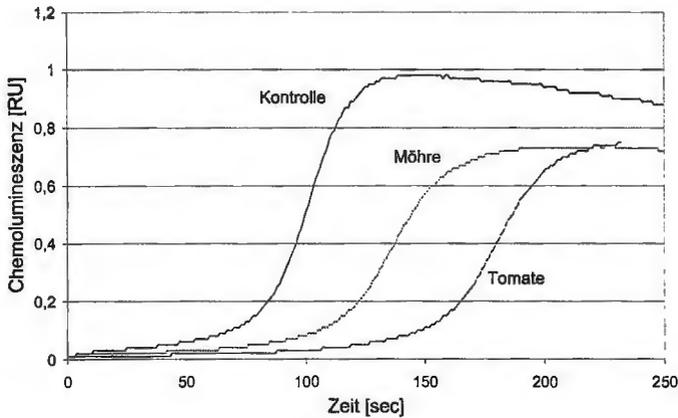


Abb. 3: Verzögerung und Verminderung von ROS-induzierter Photochemolumineszenz durch Gemüseextrakte von Möhre und Tomate

Tabelle 1: Antioxidative Aktivität von Gemüseextrakten in unterschiedlichen Testsystemen

Testsystem	Fenton System	Rose Bengal System	PCL-Methode
Spezifische ROS	Hydroxyl Radikal (OH <sup>·</sup> )	Singulett Sauerstoff ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	Superoxid Radikal Anion (O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> )
Brokkoli	••	••••	••••
Möhre	•••••	••	•
Paprika	•	•••	•••••
Tomate	••••	•••••	•••
Zwiebel	•••	•	••

Wässrige Extrakte von lyophilisiertem Gemüse sind antioxidativ wirksam. Dieser Nachweis wurde mit drei verschiedenen Methoden bei fünf unterschiedlichen Gemüsen erbracht. Da sich die Gemüseextrakte gegenüber verschiedenen ROS unterschiedlich verhalten, benötigt man mehrere Testsysteme, um die gesamte antioxidative Kapazität erfassen zu können. Wenn man die antioxidativen Eigenschaften von Gemüse umfassend beschreiben will, muss zusätzlich die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der angewendeten Testsysteme untersucht werden [Dornisch et al. 2000]. Jede der drei Analysenmethoden untersucht selektiv die Wirkung eines spezifischen, humanpathologisch relevanten Radikals. Für die menschliche Gesundheit spielen allerdings noch weitere ROS, darunter sowohl freie Radikale als auch Nicht-radikalische Verbindungen, eine Rolle [Elstner 1993]. Die Spezifität und Wirkungsweise des Radikalbildners Luminol wird zur Zeit in unterschiedlichen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert [Edenharder 2000, Popov & Levin 1999].

Die untersuchten Gemüse zeigen *in vitro* funktionelle Eigenschaften. Zahlreiche epidemiologische Studien untermauern den Gesundheitswert von Gemüse auch *in vivo*. Wenn man die Wirkung einer gemüsereichen Diät, auf die Pathogenese ROS-induzierter Erkrankungen prognostizieren möchte, müssen die antioxidativen Effekte in klinischen Studien belegt werden.

#### Literatur:

- [1] Bors W, Saran M, Elstner EF (1992). Screening for plant antioxidants. In: Linskens HF, Jackson JF (1992). Modern methods of plant analysis. Plant toxin analysis. New series vol 13. Berlin: Springer, 277-295.
- [2] Dornisch K, Hippeli S, Kern S, Janisch K, Elstner EF (2000). Biochemische Modellsysteme zur umfassenden Bestimmung antioxidativer Eigenschaften. Posterpräsentation DGQ-Tagung, Karlsruhe 2000.
- [3] Edenharder R, Gollner E, Fickler M (2000). In vitro antioxidative Aktivitäten von Früchten und Gemüsen in verschiedenen Testsystemen. Vortrag DGQ-Tagung, Karlsruhe 2000.
- [4] Elstner EF (1990). Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin. Mannheim: BI-Wiss.-Verl., 301-304.
- [5] Elstner EF (1993). Sauerstoffabhängige Erkrankungen und Therapien. Mannheim: BI-Wiss.-Verl., 21-38, 303-317.
- [6] Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A (1999). Method for measuring

- antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines.  
J Agric Food Chem 47, 1035-1040.
- [7] v. Kruedener S, Schempp H, Elstner EF (1995). Gas chromatographic differentiation between myeloperoxidase activity and Fenton-type oxidants. Free Rad Biol Med 19: 141 - 146.
- [8] Lewin G, Popov I (1994). Photochemiluminescent detection of antiradical activity III: a simple assay of ascorbate in blood plasma. J Biochem Biophys Methods. 28, 277-282.
- [9] Popov I, Lewin G (1986). Chemolumineszenz. Med akt 10:466-467.
- [10] Popov I, Lewin G (1994). Photochemiluminescent detection of antiradical activity IV: testing of lipid soluble antioxidants. J Biochem Biophys Methods. 31, 1-8.
- [11] Popov I, Lewin G (1999). Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. In: Packer L (1999). Methods in Enzymologie. Vol 300. New York: Academic Press, 437-456.
- [12] Popov I, Lewin G, v Baehr R (1987). Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. Biomed Biochim Acta 46, 775-779.
- [13] Rohnert U, Koske D, Schneider W, Elstner EF (1998). Inhibition by *Salix* - extracts and Phytodolor<sup>®</sup> of copper-catalyzed oxidative destructions. Z Naturforsch 53c: 233 - 240.

## Beeinflußt Hochdruckbehandlung die Funktionalität von Lebensmitteln? Beispiel: Glucose Retardation Index von Tomatenpüree

*A. Fernández García, P. Butz und B. Tauscher*

Institut für Chemie und Biologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung  
Haid- und Neu-Strasse 9, D-76131 Karlsruhe

*Does High Pressure Treatment Influence Food Functionality? As an Example: Glucose Retardation Index of Tomato Puree. The glucose retardation index is a valuable health attribute of dietary fibers. Soluble dietary fibers are highly effective in the reduction of post-prandial glucose levels, an advantageous effect for diabetics. After treatment of tomato puree with high pressure (60 min, 600 MPa) the glucose retardation index significantly increased. The results can be explained with pressure induced alterations in the structure of the macromolecules.*

### **Einleitung**

Die Hochdruckbehandlung, ein relativ neues, nichtthermisches Verfahren (kalte Pasteurisierung) zur Haltbarmachung von Lebensmitteln, kommt dem Verbraucherwunsch nach qualitativ hochwertigen Produkten mit weitgehend erhaltenen Frische-Eigenschaften entgegen. Gewünscht werden: Weniger Qualitätseinbußen infolge von Hitze oder Kälte, mehr Frische, weniger Zusätze. Bei derartigen, schonender be- und verarbeiteten Lebensmitteln treten Sicherheitsaspekte weiter in den Vordergrund, z.B. die sichere Beherrschung von Mikroorganismen. Aber auch die Möglichkeit unerwünschter chemischer Veränderungen [1] oder von ernährungsphysiologisch bedeutsamen Veränderungen als Folge solcher neuartigen Verfahren muss sorgfältig im Sinne eines vorsorgenden Verbraucherschutzes untersucht werden. Hochdruck läßt kleinere organische Moleküle, wie Vitamine, Farbstoffe oder Aromastoffe, in der Regel nahezu unverändert. Finden in einem Lebensmittel jedoch chemische Reaktionen statt, können diese durch Druckeinwirkung beschleunigt oder auch unterdrückt werden. So können auch kleinere organische Moleküle involviert werden, wie beispielsweise der Zuckerersatzstoff Aspartam, der sich (bei neutralem pH-Wert) unter Druck bedeutend schneller zersetzt [2]. Druck hat eine viel stärkere Wirkung auf biologische Makromoleküle, da er hauptsächlich physikalisch-chemische Bindungen beeinflusst, die oft strukturbestimmend sind. Die Auswirkungen können zerstörerisch sein, es können aber auch

völlig neue, ggf. vorteilhafte Produkteigenschaften erzeugt werden. In der Literatur wird z.B. über erhöhte Verdaubarkeit von druckbehandelten Proteinen berichtet [3], über verbesserte Kocheigenschaften bei Reis [4] sowie über verbesserte Fettkristallisation unter Druck [5]. Der Glucose Retardation Index ist eine gesundheitlich wertvolle Eigenschaft von Ballaststoffen. Lösliche Ballaststoffe sind hocheffektiv in der Absenkung post-prandialer Glucosespiegel, ein für Diabetiker vorteilhafter Effekt [6,7]. Eine Druckbehandlung hat zwar kaum Auswirkungen auf die reduzierenden Zucker [8], der Glucose Retardation Index könnte jedoch infolge druckinduzierter Strukturänderungen der Makromoleküle verändert werden. Daher wurde in dieser Arbeit die Auswirkung einer Hochdruckbehandlung auf den Glucose Retardation Index am Beispiel von Tomatenpüree untersucht.

### Material und Methoden

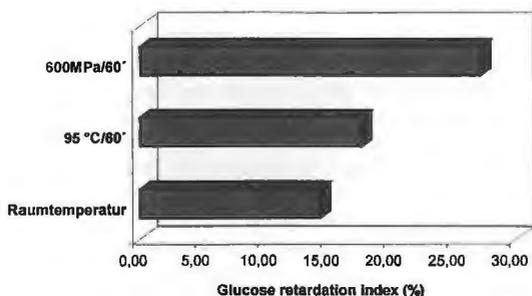
**Tomatenpüree:** Ganze Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.) von einem lokalen Anbieter wurden gewaschen und in einem Labormixer (Waring Commercial) homogenisiert. Zur Konzentrierung wurde das Tomatenpüree 3 min bei 4200 x g zentrifugiert, Samenkörner und Überstand wurden abgetrennt, 5,3 g Traubenzucker pro kg Püree hinzugefügt gefolgt von einer weiteren Homogenisierung.

**Hochdruckexperimente:** wie beschrieben bei Butz et al. 1994 [9].

**Glucose Retardation Index:** Die von Larrauri et al. [10] beschriebene Methode wurde angewandt. 10 g Tomatenpüree mit Zusatz von 53 mg D-Glukose wurde eine Stunde lang bei 95 °C gekocht, oder bei 600 MPa und 20 °C für 60 min druckbehandelt. 10 g Tomatenpüree in einem Dialyseschlauch (Visking, Größe 3-20/ 32"; 24 Å, 7 cm lang) wurden gegen 300 ml dest. Wasser für 60 min unter Rühren bei 37 °C dialysiert. Aliquote des Dialysates wurden mittels enzymatischem D-Glukose-Test (Boehringer Mannheim) analysiert. Der Glucose Retardation Index wurde wie folgt kalkuliert:  $RI = 100 - [(Glukose \text{ diffundiert aus Schlauch mit Püree} / Glukose \text{ diffundiert aus Schlauch ohne Püree}) \times 100]$ .

### Ergebnisse und Diskussion

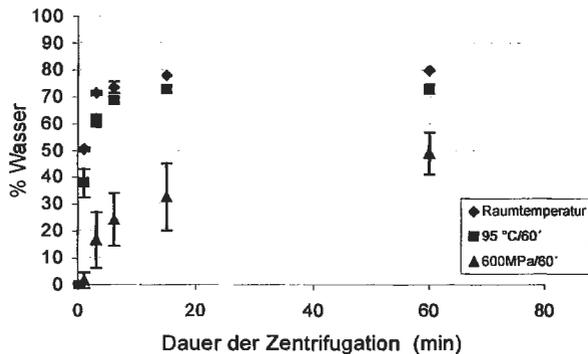
Abbildung 1 zeigt den Glucose Retardation Index von unterschiedlich behandeltem Tomatenpüree in Prozent. Man erkennt, daß die druckbehandelte Probe während einstündiger



**Abb. 1** Glucose Retardation Index von unterschiedlich behandeltem Tomatenpüree nach 60 min Dialyse bei 37 °C. Mittelwerte aus je 15 unabhängigen Versuchen.

Dialyse ca. 15% mehr Glukose zurückgehalten hat als die unbehandelte Vergleichsprobe (t-Test:  $t = 3,780$ ,  $P < 0,001$ ) während die nur thermisch behandelte Probe nur unwesentliche Veränderungen aufweist. Obwohl sich die durch chemische Analyse bestimmte Glukosekonzentration im Tomatenpüree infolge der Druckbehandlung nicht

verändert [11], ist also ein ausgeprägter Effekt auf die Dialysierbarkeit der Glukose (d.h. eine starke Veränderung des Glucose Retardation Index) erkennbar. Die Hochdruckbehandlung bei 600 MPa kann in der komplizierten Lebensmittelmatrix folgenreiche Veränderungen hervorrufen, z.B. an der Textur von Tomatenpüree. Proteine können denaturieren unter Konformationsänderungen, die ihrerseits Vorgänge wie Hydrolysen oder die Anlagerung von hydrophilen Stoffen wie Glukose beeinflussen und



**Abb. 2** Wässriger Überstand nach Zentrifugation von verschieden behandeltem Tomatenpüree bei 7000 x g .

damit auch die Diffusionsrate der Glukose bei der Dialyse. Druckbedingte Strukturveränderungen an Makromolekülen (bekannt z.B. an der Tertiärstruktur von Proteinen) können zu erhöhter Exposition hydrophiler Gruppen führen, die dann die Retention von Glukose verstärken. Kohlenhydrate scheinen im allgemeinen bei der Druckbehandlung relativ unempfindlich gegenüber chemischen Veränderungen zu sein, funktionale Eigenschaften von Polysacchariden, wie z.B. Retrogradationsverhalten oder Gelbildungseigenschaften bei Stärken [12], können jedoch durch die Anwendungen von hohen Drücken beeinflusst werden. In behandelten Lebensmitteln sind die Veränderungen der Kohlenhydrate stärker ausgeprägt. Es sind z.B. Abbaureaktionen bei Pektinen zu beobachten [13]. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Abbaureaktionen nicht primär durch die Druckbehandlung ausgelöst werden, sondern vielmehr durch enzymatische Abbaureaktionen.

Die Erklärung der erhöhten Glukoseretention in hochdruckbehandeltem wird untermauert durch Beobachtungen während der Zentrifugation solcher Proben (Abbildung 2): Nach gleichen Zentrifugationsdauern liegen die Grenzlinien Püree/wässriger Überstand bei den hochdruckbehandelten Proben deutlich höher. Ursache könnte einerseits erhöhtes Wasserbindungsvermögen, oder Strukturänderungen des Fruchtfleisches sein, bzw. eine Kombination davon. Eingehendere Untersuchungen dieser Befunde sollen dazu beitragen, die u.a. von Rovere et al. [11] und Porretta et al. [13] berichtete erhöhte Viskosität von hochdruckbehandelten Tomatenprodukten zu erklären. Die Möglichkeit, durch Druckbehandlung die Glukoseretention zu erhöhen, ist sicherlich interessant für die Herstellung spezieller Lebensmittel (Functional Food) für Diabetiker.

(Diese Arbeit wurde von der EU unter FAIR-CT98-5031 gefördert)

## Literatur

- [1] Tauscher, B. (1995): "Review: Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects". *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* **200**, 3-13.
- [2] Butz, P.; Fernández García, A.; Fister, H.; Tauscher, B.(1997): "Influence of High Hydrostatic Pressure on Aspartame: Instability at Neutral pH". *J. Agric. Food Chem.* **45**, 302-303.
- [3] E. A. Elgasim and W. H. Kennick, Effect of pressurization of pre-rigor beef muscles on protein quality, *J. Food Sci.* **45**:1122 (1980).
- [4] Yamazaki A., Sasagawa A. (1998) Development of rice food products processed by high pressure treatment. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, **45**, 9, 526-532
- [5] W. Buchheim and A. M. Abou El Nour, Induction of milk fat crystallization in the emulsified state by high hydrostatic pressure. *Fat Sci. Technol.* **10**:369 (1992).
- [6] Jenkins, D.J.A.; Jenkins, M.J.A.; Wolever, T.M.S.; Taylor, R.H. (1986): "Slow release carbohydrate: mechanism of action of viscous fibers". *J. Clin.Nutr.Gastroenterol* **1**, 237-241.
- [7] Morgan, L.M.; Goulder, T.J.; Tsiolakis, D.; Marks, V.; Alberti K.(1979): "The effect of unabsorbable carbohydrate on gut hormones". *Diabetologia* **17**, 85-89.
- [8] Kato, N., A. Teramoto, and M. Fuchigami, Pectic substance degradation and texture of carrots as affected by pressurization. *Journal of Food Science*, 1997. **62**(2): p. 359-362, 398.
- [9] Butz, P.; Koller, W.D.; Tauscher, B.; Wolf, S. (1994): "Ultra-high pressure processing of onions: chemical and sensory changes". *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **27**, 463-467.
- [10] Larrauri J.A.; Goñi, I.; Martín-Carrón, N.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. (1996): "Measurement of health-promoting properties in fruit dietary fibres: antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index". *J. Sci. Food Agr.* **71**, 515-519.
- [11] Rovere, P.; Sandei, L.; Colombi, A.; Munari, M.; Ghiretti, G.; Carpi, G.; Dall'Aglio, G.: "Effects of high pressure treatment on chopped tomatoes". *Industria Conserve* **72**, 3-12. (1997)
- [12] Douzals, J.P., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P., Coquille, J.C. (1998) High-pressure gelatinization of wheat starch and properties of pressure-induced gels. *J Agric Food Chem.* **46** (12): 4824-4829.
- [13] Porretta, S.; Birzi A.; Ghizzoni, C.; Vicini, E. (1995): "Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice". *Food Chemistry* **52**, 35-41.



## Free amino acid composition of primary and secondary inflorescences of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivars and its variation in growing seasons

M. Helena Gomes <sup>1</sup>, Eduardo Rosa <sup>1</sup>, Christine Sator <sup>2</sup> and Ewald Schnug

(1) Horticulture Section, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apt 202, 5001-911 Vila Real Codex, Portugal

(2) Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Federal Agricultural Research Centre, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany

### Abstract

Eleven broccoli cultivars were grown in the field during spring to summer and summer to winter. A total of 17 free amino acids were identified by HPLC in primary and secondary inflorescences: L-Alanine, L-Arginine, L-Asparagine, L-Aspartic acid, Glycine, L-Glutamic acid, L-Glutamine, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Methionine, L-Phenylalanine, L-Serine, L-Threonine, L-Tryptophan, L-Tyrosine and L-Valine.

The dominating free amino acid in both types of inflorescences was L-Glutamine which represented on average between 39.1 % (in cv. Claudia) and 59.7 % (in cv. Shogun) of the total free amino acid content, followed by L-Glutamic acid with a variation between 13.5 (in cv. Shogun) and 20.1 % (in cv. Marathon). A few free amino acids represented less than 1% each (L-Gly, L-Leu, L-Met, L-Phen, L-Thr, L-Trp and L-Tyr).

For most of the free amino acids significant differences between cultivars existed whilst between inflorescences only a few free amino acids showed significant variations. Seasons have also induced significant differences in the content of most of the identified free amino acids. The cultivar with the highest total content of free amino acids was Shogun which on an average for both seasons had 29.7 mmol\*100g<sup>-1</sup> DW (36.5 in spring-summer and 22.9 in summer-winter) whilst the others were above a minimum of 15.2 mmol\*100g<sup>-1</sup> DW in the cultivar SK3.

When comparing seasons there was a general tendency for higher total free amino acids levels in spring-summer than in summer-winter but the effect was clearly dependent on the cultivar. There is still a strong need for further investigations of influence of different seasons on the total free amino acid of the inflorescences.

### Introduction

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) is a plant of the Brassicaceae which in the past decade has received special attention due to recognized benefits of their inflorescences for

human health (Rosa et al., 1997). The high levels of vitamin C, fibre, antioxidants and the presence of a compound the 4-methylsulphinylbutyl glucosinolate (glucoraphanin) a precursor of a potent inducer (4-methylsulphinylbutyl isothiocyanate or sulphoraphane) of enzymes that protect against chemical carcinogens found in the inflorescences are the major attributes for such interest (Nestle, 1997; Steinmetz and Potter 1991 & 1996; Watzl and Leitzmann, 1999; Zhang et al., 1992) and the support of recommendations for higher broccoli consumptions (Nestle 1997). Recent research has even extended such interest to broccoli sprouts due to the extremely high levels of 4-methylsulphinylbutyl glucosinolate (Fahey et al., 1997).

Consumers are being increasingly aware about food composition and further comprehensive information has been demanded beyond the available on the food composition tables. Free amino acids composition in such tables is limited and mostly referred as both free and bound amino acids. Since they are involved in the secondary plant metabolism and in the production of compounds which directly or indirectly play an important role in the relation plant-environment, the composition of free amino acids becomes more relevant.

Considering the potential beneficial effects of broccoli, there is a continuous demand of fresh product throughout the year, which requires the growth of the plant under very different climatic conditions. If available, data in the food composition tables are not specific to which growth season the data refer and even less to which is the variation between inflorescences and cultivars.

The objective of the research work presented here was to make a characterisation of a group of broccoli cultivars which were commonly grown in most of the European production countries in respect to free amino acid composition. We intend to further clarify if there is any difference between growing seasons and between primary and secondary inflorescences. This is the first study so far which specifically refers to composition of secondary inflorescences which represent around 30% of the total yield (Rosa, unpublished).

## Materials and Methods

*Plant material.* Eleven cultivars of broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) cv Bejo, Claudia, Durango, Green Valiant, Legend, Marathon, Senshi, Shogun, SK<sub>3</sub>, SK<sub>4</sub> and Tokyodome, were grown in the experimental fields of the university of Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal, at an altitude of 453 m (41° 17' N; 7° 44' W). Sowing dates were the 1<sup>st</sup> of April of 1997 for the spring/summer season (Table 2: SS) and 14<sup>th</sup> of August 1997 for summer/winter season (Table 2: SW). The statistical design of the experiment was a randomised block system with 3 replicates and 21 plants each. For analysis, a total of 5 plants were used in each of the 3 replicates. Inflorescences were harvested, always at the same time of the day to avoid climate influences. Half of the inflorescences of each replicate were immediately freeze-dried and the other half was dried in a forced-air oven at 60 °C until constant weight, to determine the dry weight. When the secondary inflorescences reached commercial maturity they were submitted to the same procedure as previously described for the main inflorescences. Commercial maturity stage, occurred in spring/summer season at between 52 and 70 days after planting, for the primary inflorescences and between 64 and 84 days for the secondary. In summer/winter season, harvest spread was between 67 and 94 days after planting for the primary inflorescences and between 117 and 131 days for the secondary inflorescences.

*Extraction.* Samples were freeze-dried, reduced to a fine powder and an amount of approximately 0.2 g were weighted to a centrifuge tube and extracted with boiling methanol

(90%) and centrifuged. The supernatant was poured into a 10 mL volumetric flask. This step was repeated twice using methanol at 70% and the combined supernatants were made to a final volume of 10 mL with methanol (70%) and kept at  $-18^{\circ}\text{C}$ .

*Sample purification.* This step was based on the procedure reported by Gehrke *et al.* (1987) with fewer changes for higher reliability. After evaporation of 2mL of extract it was re-suspended in 2mL of HCl 0.1 N. In a vacuum chamber (*Varian Vac Elut SPS 24*) were set mini columns of 1 mL (*Chromabond* by *Macherey-Nagel*) which were filled up to 2 cm with a cation exchange resin Dowex ( $\text{H}^+$ ) 50WX8-400 (*SIGMA*). The re-suspended 2 mL of sample were passed through the column and washed with 5 mL of HCl 0,1 N. The free amino acids were eluted with  $4 \times 2.5$  mL of  $\text{NH}_3$  7N. After evaporation the residue was re-suspended in 0.3 mL of water (*MILLI Q*), filtered (*SPARTAN 13* -  $0.2 \mu\text{m}$ ) and kept in vials at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis.

*Determination.* Amino acids were determined by HPLC (*Gilson* system) using  $\text{C}_{18}$  columns (*Waters*, SPHERISORB S3 ODS2, id 4.6 mm) of 150 mm and a UV/VIS detector set at 340 nm, after pre-column derivatisation with *o*-phthalaldehyde (OPA)/2-mercaptoethanol (MCE), following a combined procedure described by Cooper *et al.* (1984) and Sørensen *et al.* (1999). The mobile phase was made of two solvents: A- 350 mM of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and 250 mM propionic acid (1:1), acetonitrile and *Milli Q* water (40:8:52); B-acetonitrile: methanol: *Milli Q* water (30:30:40). The gradient with the two solvents was set as given in Table 1.

**Table 1** Gradient program for HPLC analysis of free amino acids

Time (min)	0.0	9.5	11.0	13.6	20.4	23.4	25.4	32.0	34.0	37.0
Flow (mL/min)	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	0.8	0.8	1.3	1.3
% B	0.0	11.0	12.0	20.0	45.0	50.0	60.0	100.0	0.0	0.0

Identification and quantification of the detected amino acids were made by external standards after adjustment through regression lines. For data analysis, it was performed an analysis of variance using a SuperAnova package.

## Results and Discussion

A total of 17 amino acids (L-Alanine (Ala), L-Arginine (Arg), L-Asparagine (Asn), L-Aspartic acid (Asp), Glycine (Gly), L-Glutamic acid (Glu), L-Glutamine (Gln), L-Histidine (His), L-Isoleucine (Ile), L-Leucine (Leu), L-Methionine (Met), L-Phenylalanine (Phe), L-Serine (Ser), L-Threonine (Thr), L-Tryptophan (Trp), L-Tyrosine (Tyr) and L-Valine (Val)) were identified in the 11 cultivars of broccoli (Table 2 & 3). The level of amino acids generally showed significant differences between cultivars (Table 4). On average, the cultivar with the highest total free amino acid content ( $29.7 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{DW}$ ) was Shogun followed by Legend ( $24.4 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{DW}$ ) and Tokyodome ( $23.8 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{DW}$ ) whilst the lowest levels were observed in a group of three cultivars SK3, Green Valiant and Bejo with 15.2, 15.8 and  $15.9 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{DW}$ , respectively (Table 2). The major free amino acid was L-Glutamine which on average of both seasons and both inflorescences represented between 59.7 and 39.0 % of the total free amino acid content in cv. Shogun and Claudia, respectively, much higher than the second major free amino acid, L-Glutamic acid, which on average

represented between 20.1 and 13.5 % of the total free amino acid content in the cultivars Marathon and Shogun, respectively. A group of seven free amino acids represented less than 1% each of the total free amino acid content: L-Glycine, L-Leucine, L-Methionine, L-Phenylalanine, L-Threonine, L-Tryptophan and L-Tyrosine.

**Table 3** Descriptive statistics of free amino acids in broccoli (mmol\*100g<sup>-1</sup>DW); means of eleven cultivars, primary and secondary inflorescences and two growing seasons

	Asp	Glu	Asn	Ser	His	Gln	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Total
MIN	1.04	1.89	0.87	0.78	0.18	1.09	0.08	0.07	0.11	0.74	0.03	0.33	0.04	0.02	0.03	0.11	0.05	12.73
MAX	2.93	5.12	3.36	2.05	1.59	27.01	0.26	0.31	1.54	2.68	0.07	0.91	0.36	0.05	0.10	0.40	0.12	43.75
MEAN	1.89	3.28	1.50	1.34	0.66	10.11	0.15	0.15	0.51	1.63	0.05	0.58	0.14	0.03	0.06	0.24	0.08	22.39
MEDIAN	1.87	3.19	1.40	1.35	0.61	9.16	0.14	0.13	0.46	1.63	0.05	0.58	0.13	0.03	0.05	0.22	0.08	20.94

The levels of free amino acids of each cultivar were generally dependent on the growing season (Table 2). Except for the cultivars Green Valiant, Legend, SK4 and Tokyodome total free amino acid levels in spring/summer were higher than in summer/winter with a difference between 60% in Shogun and 8% in Claudia (Table 2). Although the major two free amino acids did not show significant differences between growing seasons (Table 4), most of the others did show differences with a tendency for higher levels in the summer/winter season (Table 2).

**Table 4** Influence of growing season (April to May & September to January), cultivar and inflorescence (first/second) on free amino acid concentration of broccoli (F-test)

Source of variatic	Asp	Glu	Asn	Ser	His	Gln	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Total
Season (S)	**	NS		***	NS	NS	***	***		**	NS	***	**	*	***	***	NS	NS
Cultivar (C)	**	***	***	***	***	***	**	**	***	*	NS	**	NS	NS	NS	**	NS	***
Inflorescence (I)	***	***	***	**	NS	NS	NS	NS	*	NS	*	NS						
S x C	**	**	***	NS	***	***	**	***	NS	NS	*	NS	NS	*	***	*	NS	***
S x I	***	**	NS	**	NS	NS	*	***	*	NS	**	NS	NS	*	NS	*	NS	NS
C x I	NS	NS	**	NS	**	***	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	*	NS	***
S x C x I	**	*	**	NS	*	NS	NS	NS	NS	**								

\*\*\*, \*\*, \* : Significant at 0.05; 0.01; 0.001 and non significant

## Conclusions

Free amino acids are not balanced distributed in the primary and secondary broccoli inflorescences since they try to concentrate in the primary inflorescences in summer/winter season and in the secondary inflorescences in spring/summer.

## References

- Cooper, J.D.H., Ogden, G., McIntosh, J. and Turnell, D.C. 1984. The stability of the o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: an investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique. *Analytical Biochemistry* 142: 98-102.
- Fahey, J.W., Y. Zhang, and P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:10367-10372.

- Gehrke, C.W., Kuo, K.C, Kaiser, F.E. and Zumwalt, R.W. 1987. Analysis of amino acids by gas chromatography as the *N*-trifluoroacetyl *n*-butyl esters. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 70(1): 160-170.
- Nestle, M. 1997. Broccoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme systems: clinical, dietary, and policy implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:11149-11151.
- Rosa, E.A.S., R.K Heaney, G.R. Fenwick, and C. Portas. 1997. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* 19:99-215.
- Beecher, C.W.W. 1994. Cancer preventive properties of varieties of *Brassica oleracea*: a review. *Am. J. Clin. Nutr.* 59(suppl):1166S-1170S.
- Sørensen, H., Sørensen, S., Bjerregaard, C. and Michaelsen, S. 1999. Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 470 pp.
- Steinmetz, K. A. and Potter, J. D. 1991. Vegetables, fruit and cancer. II. Mechanisms. *Cancer, Causes and Control.* 2:427-442.
- Steinmetz, K. A. and Potter, J. D. 1996. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J Amer. Diet. Assoc.*, 96:1027-1039.
- Watzl, B. and Leitzmann, C. 1999. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. 2. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Zhang, Y., P. Talalay, C.-G. Cho, and G.H. Posner. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:2399-2403.

**Table 2** Average levels of free amino acids (mmol\*100g<sup>-1</sup>DW) in primary (P) and secondary (S) inflorescences of the eleven cultivars of broccoli

Cultivar	Season	Inflorescence	Asp	Glu	Asn	Ser	His	Gln	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Total
Bejo	SS	P	2.09	3.67	1.09	1.41	0.68	7.92	0.14	0.18	0.25	1.80	0.04	0.49	0.18	0.02	0.05	0.17	0.07	20.25
		S	1.92	2.94	1.41	1.49	0.58	9.86	0.16	0.23	0.30	1.16	0.05	0.49	0.08	0.02	0.05	0.20	0.08	21.02
	SW	P	1.85	2.59	0.88	0.95	0.43	4.69	0.10	0.09	0.24	1.35	0.04	0.58	0.10	0.02	0.05	0.21	0.07	13.36
		S	1.45	2.37	1.18	0.99	0.62	8.15	0.12	0.13	0.25	1.08	0.04	0.52	0.11	0.03	0.05	0.25	0.07	17.40
Cláudia	SS	P	2.25	3.92	1.88	2.05	0.40	1.09	0.25	0.25	0.54	1.86	0.05	0.69	0.05	0.03	0.05	0.20	0.08	15.64
		S	1.93	3.49	1.67	1.65	0.40	13.80	0.18	0.19	0.75	1.59	0.06	0.53	0.20	0.03	0.05	0.20	0.08	26.79
	SW	P	2.84	3.55	1.90	1.69	0.31	11.43	0.20	0.13	0.84	1.98	0.07	0.86	0.15	0.04	0.10	0.38	0.12	26.58
		S	1.20	1.89	1.17	1.02	0.18	4.74	0.09	0.08	0.28	1.28	0.04	0.36	0.12	0.04	0.05	0.14	0.05	12.74
Durango	SS	P	2.04	3.61	1.09	1.36	0.45	7.40	0.13	0.16	0.35	1.60	0.05	0.50	0.20	0.02	0.05	0.21	0.09	19.30
		S	2.15	3.03	2.00	1.65	0.53	8.88	0.20	0.31	0.66	1.85	0.05	0.61	0.11	0.03	0.07	0.29	0.10	22.52
	SW	P	2.87	4.27	1.11	1.60	0.62	5.88	0.11	0.11	0.30	1.95	0.05	0.73	0.09	0.03	0.06	0.27	0.09	20.14
		S	1.19	2.24	1.38	0.96	0.56	9.01	0.11	0.10	0.46	1.32	0.04	0.64	0.15	0.02	0.05	0.33	0.08	18.64
G. Valiant	SS	P	1.67	2.88	1.49	1.41	0.57	4.58	0.16	0.13	0.17	1.79	0.04	0.39	0.11	0.02	0.05	0.15	0.07	15.68
		S	1.04	1.97	1.27	1.23	0.70	6.80	0.14	0.13	0.32	1.63	0.04	0.33	0.04	0.02	0.04	0.13	0.06	15.89
	SW	P	2.12	3.23	1.18	1.32	0.94	7.85	0.11	0.11	0.38	1.28	0.06	0.45	0.09	0.04	0.05	0.20	0.08	19.50
		S	1.89	2.70	2.58	1.19	0.66	8.81	0.12	0.08	0.55	1.28	0.05	0.58	0.21	0.04	0.08	0.27	0.08	21.16
Legend	SS	P	1.71	3.86	1.60	1.09	0.57	12.96	0.17	0.13	0.60	2.27	0.04	0.54	0.09	0.03	0.05	0.18	0.09	25.97
		S	1.79	3.15	1.80	0.94	0.69	11.77	0.12	0.16	0.56	1.35	0.06	0.54	0.12	0.02	0.06	0.21	0.09	23.43
	SW	P	2.57	3.75	1.68	1.11	0.99	15.93	0.13	0.08	0.80	1.85	0.05	0.73	0.36	0.03	0.08	0.32	0.10	30.56
		S	1.86	2.98	2.27	0.95	1.02	16.73	0.13	0.09	0.93	1.45	0.05	0.69	0.27	0.04	0.07	0.33	0.08	29.94
Marathon	SS	P	1.81	3.44	1.04	1.25	0.60	6.67	0.15	0.15	0.11	1.35	0.04	0.43	0.13	0.03	0.04	0.14	0.06	17.43
		S	1.77	3.65	1.45	1.62	0.94	11.99	0.26	0.14	0.47	1.75	0.07	0.66	0.11	0.03	0.06	0.22	0.10	25.29
	SW	P	2.53	3.88	1.13	1.13	0.54	7.39	0.13	0.10	0.26	1.71	0.05	0.71	0.15	0.03	0.07	0.23	0.09	20.13
		S	1.34	2.46	1.16	0.82	0.52	7.27	0.08	0.09	0.25	0.93	0.04	0.41	0.14	0.02	0.04	0.18	0.06	15.80
Senshi	SS	P	2.22	4.73	1.12	1.86	1.06	12.63	0.21	0.19	0.47	1.92	0.05	0.66	0.08	0.03	0.05	0.25	0.09	27.62
		S	1.42	2.93	1.06	1.17	0.48	9.40	0.15	0.15	0.38	1.70	0.03	0.43	0.14	0.02	0.03	0.16	0.06	19.70
	SW	P	2.38	3.88	1.06	1.38	0.81	9.32	0.13	0.11	0.48	1.63	0.04	0.63	0.08	0.02	0.04	0.26	0.07	22.32
		S	1.67	2.89	1.50	1.17	0.88	9.55	0.12	0.13	0.40	1.27	0.04	0.62	0.22	0.02	0.05	0.27	0.07	20.87
Shogun	SS	P	1.89	4.75	1.94	1.59	1.59	27.01	0.26	0.19	0.68	2.32	0.06	0.76	0.23	0.02	0.06	0.31	0.11	43.76
		S	1.88	3.46	2.40	1.69	1.05	19.58	0.24	0.29	0.60	1.90	0.05	0.67	0.18	0.05	0.05	0.31	0.10	34.50
	SW	P	2.27	5.12	1.46	1.62	0.89	11.85	0.16	0.13	0.38	2.68	0.05	0.90	0.10	0.03	0.08	0.33	0.08	28.13
		S	1.36	2.35	1.46	0.78	0.96	13.49	0.11	0.07	0.36	1.27	0.04	0.43	0.16	0.02	0.04	0.22	0.06	23.18
Sk3	SS	P	1.80	3.42	1.01	1.47	0.29	6.85	0.16	0.12	0.14	1.74	0.04	0.46	0.08	0.03	0.05	0.17	0.07	17.89
		S	1.18	2.46	1.55	1.50	0.44	9.76	0.18	0.24	0.48	2.21	0.05	0.69	0.10	0.03	0.05	0.26	0.10	21.29
	SW	P	1.90	2.76	1.07	1.17	0.18	5.90	0.11	0.11	0.47	1.29	0.04	0.48	0.19	0.02	0.06	0.19	0.07	16.00
		S	1.14	1.94	1.23	0.91	0.71	7.39	0.08	0.10	0.49	0.74	0.04	0.45	0.15	0.02	0.05	0.24	0.07	15.76
Sk4	SS	P	1.73	3.37	0.87	1.26	0.43	8.80	0.16	0.14	0.24	1.89	0.04	0.50	0.13	0.02	0.04	0.15	0.06	19.83
		S	1.74	2.84	1.28	1.44	0.34	8.32	0.18	0.20	0.42	1.59	0.05	0.62	0.13	0.02	0.06	0.26	0.09	19.59
	SW	P	2.46	4.04	1.29	1.82	0.73	11.14	0.19	0.26	0.58	2.11	0.05	0.84	0.08	0.03	0.06	0.29	0.08	26.05
		S	1.91	3.08	1.83	1.34	1.00	15.36	0.15	0.14	0.63	1.48	0.04	0.72	0.31	0.04	0.04	0.35	0.08	28.48
Tokyodome	SS	P	1.73	3.07	0.98	1.14	0.35	6.31	0.10	0.10	0.44	1.38	0.03	0.36	0.09	0.02	0.04	0.11	0.05	16.30
		S	1.76	3.57	1.59	1.66	0.44	10.36	0.17	0.16	1.08	1.81	0.04	0.42	0.18	0.02	0.05	0.15	0.08	23.53
	SW	P	2.93	4.93	2.44	1.72	0.46	14.58	0.19	0.16	1.54	1.93	0.06	0.91	0.14	0.05	0.09	0.40	0.09	32.63
		S	2.04	3.14	3.36	1.39	1.05	15.69	0.13	0.10	1.54	1.26	0.05	0.71	0.22	0.05	0.10	0.36	0.10	31.30



## Standard Referenzmaterialien zur Bestimmung von Gesamt-Schwefel und Gesamt-Glucosinolaten

*Ewald Schnug<sup>1</sup>, Silvia Haneklaus<sup>1</sup>, Hans Schimmel<sup>2</sup>, Thomas Lisinger<sup>2</sup>, Nicolas Mabon<sup>3</sup>, Michel Marlier<sup>3</sup>, Jean-Paul Wathelet<sup>3</sup> und Christine Sator<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institut fuer Pflanzenernaehrung und Bdenkunde, FAL Braunschweig, [ewald.schnug@fal.de](mailto:ewald.schnug@fal.de)

<sup>2</sup> Europaeische Kommission, Directorate General JRC, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurement (IRMM), Geel Belgium, [heinz.schimmel@irmm.jrc.be](mailto:heinz.schimmel@irmm.jrc.be)

<sup>3</sup> Department d'ingenierie des bio-systems, Unite de chimie generale et organique, Gembloux, Belgique, [wathelet.jp@fsagx.be](mailto:wathelet.jp@fsagx.be)

### ***Standard Reference Materials for Total Sulfur and Glucosinolates in Oilseed Rape***

#### ***Abstract***

*Standard reference materials for the determination of total sulfur content and content of glucosinolates in oilseed rape are described. This material can be used for calibration over a wide range from 3.31 - 10.3 mg sulfur / g dry matter or for 11.9 - 98.9 μmol glucosinolate / g dry matter.*

#### **Zusammenfassung**

Drei Standard-Referenzmaterialien fuer die Bestimmung von Gesamtschwefel und Gesamt-Glucosinolaten werden vorgestellt. Das Material eignet sich zur Kalibrierung ueber einen Bereich von 3,31 – 10,3 mg Schwefel / g Trockensubstanz bzw. 11,9 – 98,9 μmol Glucosinolate / g Trockensubstanz.

#### **Einleitung**

Eine gute Wiederholbarkeit der Ergebnisse muss nicht gleichbedeutend sein mit einer guten Genauigkeit der Ergebnisse (siehe hierzu Abbildung 1).

Das Problem der Reproduzierbarkeit von Analysenwerten kann durch entsprechende Labordisziplin und Kontrolle innerhalb des Hauses behoben werden, waehrend die Richtigkeit vollstaendig auf dem Gebrauch von zertifizierten Standard Referenzmaterialien (SRM) beruht (Hanlon, 1995; Houba et al., 1995).

Die Kalibrierung Analytischer Methoden mit SRM's ist eine Grundvoraussetzung fuer die Qualitaetsgarantie von Versuchsergebnissen nicht nur in Industrie- sondern auch in Forschungslaboratorien. Massenbilanzen von einzelnen Mineralstoffen z.B. Schwefel in agrarischen Oekosystemen oder in einzelnen Pflanzen und die Vergleichbarkeit von einzelnen Ergebnissen innerhalb und zwischen Versuchsanstellungen verlangen absolute Werte.

Tabelle 1

Standardabweichung des Gesamtschwefelgehaltes in den drei Referenzmaterialien

CRM-Nr.	Gesamtschwefelgehalt (mg/kg)	
	zwischen den Proben	innerhalb der Proben
190	42	34
366	22	25
367	31	103

Das Referenzmaterial blieb ueber zwei Jahre lang stabil.

Fuer die Zertifizierung des Gesamtschwefelgehaltes wurden nass-chemische Methoden unter Verwendung von ICP-MS, ICP-OES, Isotopen-Verduennungs-Massenspektrometrie und Ionenchromatographie fuer die Analysen eingesetzt. Der Gesamt-Glucosinolatgehalt wurde mittels HPLC und ueber die Bestimmung der freigesetzten Glucose sowie ueber enzymatisch abgespaltenes Sulfat bestimmt. Die zertifizierten Werte der Standard-Referenzmaterialien sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Zertifizierte Gesamtschwefel- und -Glucosinolatgehalte in drei Rapsreferenzmaterialien

CRM-Nr.	Gesamtschwefelgehalt in mg/g	Gesamtglucosinolatgehalt in $\mu\text{mol/g}$
190 R	4,72 + 0,16	23,0 + 1,0
366 R	3,31 + 0,12	11,9 + 0,5
367 R	10,30 + 0,25	98,9 + 1,8

Die drei Referenzmaterialien wurden kuerzlich wieder aufgefuellt und erneut zertifiziert, was durch „R“ hinter der Nummer gekennzeichnet wurde (Tabelle 2).

Ein spezieller Vorteil, der mit den zertifizierten Rapsproben verbunden ist, liegt darin, dass sowohl fuer den Gesamtschwefelgehalt wie auch fuer den Gesamtglucosinolatgehalt zertifiziertes Material mit der selben biologischen Matrix aber mit sehr unterschiedlichen Gehalten vorliegt.

Als Hilfe fuer die Benutzer der Referenzproben werden bei der Lieferung entscheidende Details fuer die Durchfuehrung der Analysen mitgeliefert, sowie Angaben ueber Gehalte an einzelnen Glucosinolaten und zu Gesamtstickstoffgehalten gemacht. Wobei fuer den Gesamtglucosinolatgehalt die Werte zertifiziert sind, nicht jedoch fuer die 9 einzelnen Glucosinolat-verbindungen.

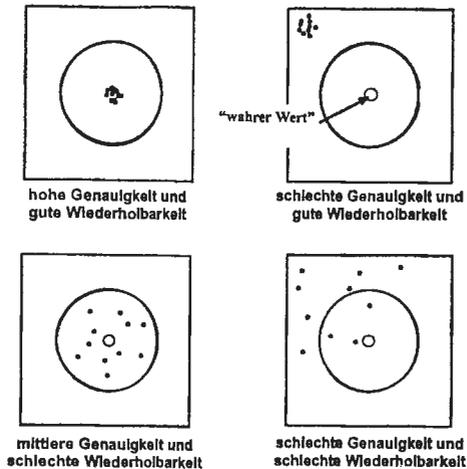


Abbildung 1 Analytische Qualitaet: Reproduzierbarkeit und Genauigkeit  
(Schnug and Haneklaus, 1996)

### Zertifiziertes Referenzmaterial

Das Institut fuer Reference Materials and Measurement (IRMM) gehoert zu dem Bureau of Reference (BCR) der Europaeischen Gemeinschaft gab drei Raps-Referenzmaterialien heraus, die sowohl fuer den Gesamtschwefelgehalt wie auch fuer den Glucosinolatgehalt zertifiziert sind. Der Zertifizierungsprozess wurde in Zusammenarbeit zwischen wissenschaftlichen Laboratorien in Belgien, England, Frankreich Deutschland und den Niederlanden durchgefuehrt. Die CRM's sind bei der IRMM in Geel (Belgien) erhaeltlich (Wagstaff et al. 1992).

Das Rapsmaterial CRM 366(R) ist von der 00 Rapssorte CERES und stammt aus Deutschland.

Das CRM 190(R) Material stammt von der 00 Rapssorte DARMOR und das Material CRM 367(R) stammt von der 0 Rapssorte JET NEUF; letztere kommen aus Frankreich.

Das zertifizierte Material wird in 20g Portionen als ganze Samen abgegeben, in Stickstoffatmosphaere in kunststoffbeschichteten Aluminiumverpackungen eingeschweisst.

Die Homogenitaet wird durch die 20g Menge garantiert, die daher ganz im analytischen Prozess eingesetzt werden muss. Die Variabilitaet innerhalb einer Referenzprobe und zwischen den Referenzproben wurde mittels Roentgenfluoreszenz-Spektroskopie bestimmt; die Ergebnisse fuer die drei Referenzmaterialien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Literatur**

Hanlon, E.A. 1996. Laboratory quality. A method for change. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27 (3&4):307-325

Houba, V. Novozamsky, I. and J.J. van der Lee 1996. Quality aspects of laboratories for soil and plant analysis. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27 (3&4): 327-348

Schnug, E. and S. Haneklaus, 1996. Quality of soil and plant analysis in relation to sustainable agriculture. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27 (3&4): 277-288



## Bestimmung leichter Elemente in vegetativem Pflanzenmaterial und des Gesamtglucosinolatgehaltes in *Brassica* Samen mittels Roentgenfluoreszenz-Analyse

Schnug, E., Haneklaus, S. und Sator, C.

Institut fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde, Bundesforschungsanstalt fuer Landwirtschaft, Braunschweig Voelkenrode, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig  
[ewald.schnug@fals.de](mailto:ewald.schnug@fals.de)

### *Diagnosis of the Nutritional Status and Quality Assessment of Oilseed Rape by X-Ray Spectroscopy*

#### **Abstract**

*Severe sulfur deficiency is at present, the most important nutrient disorder shown by northern European oilseed rape crops. The determination of the sulfur nutritional status by instrumental X-ray fluorescence spectroscopy provides a high level of accuracy, precision and performance in comparison with other methods. Performed on multi-channel spectrometers this technique can also provide data for other light elements such as calcium, chlorine, magnesium, phosphorus, potassium, silicon and sodium in the same run. Furthermore this procedure enables the indirect determination of the total glucosinolate content in seeds of Brassica species which is a standardized ISO method (ISO/CD 9167.2). Special sample preparation techniques for small sample sizes of vegetative tissues and seed material have been developed.*

#### **Zusammenfassung**

Schwefelmangel ist gegenwaertig in Nordeuropa der ernstzunehmende Naehrstoffmangel bei Oelraps. Die Bestimmung des Schwefelernaehrungszustandes durch Roentgenfluoreszenz-Spektroskopie bietet ein hohes Mass an Genauigkeit, Wiederholbarkeit und Schnelligkeit im Vergleich mit anderen Methoden. Mit Mehr-Kanalinstrumenten koennen auch andere Elemente wie Kalzium, Chlor, Magnesium, Phosphor, Kalium, Silizium und Natrium in einem Analysengang bestimmt werden. Darueberhinaus kann in einer indirekten Bestimmung der Gesamtglucosinolatgehalt in Samen von *Brassica* Arten gemessen werden. Dies ist eine standardisierte ISO Methode (ISO/CD 9167.2). Spezielle Probenvorbereitungstechniken wurden entwickelt fuer kleine Probenmengen vegetativer und generativer Herkunft.

#### **Einleitung**

Die Hauptnaehrstoffe Kalzium, Magnesium, Kalium, Schwefel und Phosphor koennen ebenso wie die Mikronaehrstoffe Silizium, Chlor und Natrium schnell und genau mittels Roentgenfluoreszenz-Spektroskopie bestimmt werden. Normalerweise werden fuer eine Bestimmung Probenmengen von 1 Gramm eingesetzt. Oft stehen aber nur geringe Mengen

fuer analytische Zwecke zur Verfuegung. Daher wurde eine spezielle Praeparationstechnik fuer kleine Probenmengen bis zu 40 mg vegetatives Material entwickelt. Der Glucosinolatgehalt ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal von *Brassica*-Samen fuer dessen Bestimmung ueblicher weise bis zu 20 g Saatgut eingesetzt werden. Es wurde jedoch eine Technik entwickelt, die es erlaubt, in kleineren Mengen Glucosinolatgehalte zu messen, bis hin zur Bestimmung in einzelnen Samen.

### **Probenvorbereitungs-Techniken**

#### *Praeparation von vegetativem Material, groessere Mengen*

Frisches vegetatives Material wird in einem Trockenschrank bei 85°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, anschliessend in einer Ultrazentrifugalmuehle (fuer vegetatives Material eignen sich auch Kaffeemuehlen) bis zu einer Partikelgrosse < 0.12 mm gemahlen. Das zerkleinerte Material wird mit HOECHST-Wachs „C“ in einem Verhaeltnis 1:4 mit einem Magnetruhrer 5 min. gemischt. Die Magnetstaebchen sind so gebaut, dass eine Taumelbewegung entsteht, die zu einer homogenen Mischung des Materials mit dem Wachs fuehrt. Die benoetigte Menge betraegt 0.9 – 1.1 g. Das Homogenat wird anschliessend in Aluminiumkappen ueberfuehrt (Durchmesser: 40 mm) und mit einer Hydraulischen Presse und einem Druck von 1.2 t/cm<sup>2</sup> verfestigt

#### *Probenvorbereitung von vegetativem Material, kleinere Mengen*

Das bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Material wird in einer Schwingmuehle 10 min in Achat- oder Zirconbechern gemahlen. Das Mahlgut wird anschliessend mit HOECHST Wachs „microfine“ im Verhaeltnis 1:40 oder 1:80 mit einem Magnetruhrer 5 min. gemischt. Die eingesetzte Probenmenge muss mindestens 40 mg betragen. Ein Aliquot von 1,25 g des Gemisches wird dann mit einer hydraulischen Presse bei einem Druck von 1.2 t/cm<sup>2</sup> in einer Aluminiumkappe mit 20mm Durchmesser verdichtet.

#### *Probenvorbereitung von Saatgut, groessere Mengen*

Die Saatgut sollte luft-trocken sein, d.h. nicht mehr als 7-9% Feuchtigkeit enthalten. Andernfalls sollten 40 g (= 60 ml) Samen in einer flachen Schicht im Trockenschrank bei 85°C 75 Minuten lang getrocknet werden oder im Mikrowellenofen bei 600W 2 min. lang (Schnug und Haneklaus, 1990a). Vor der weiteren Bearbeitung muessen die Samen auf Raumtemperatur abgekuehlt sein. Etwa 20 g (= 30 ml) Saatgut wird in einer Kaffeemuehle 30 Sekunden lang gemahlen. Material, welches evtl. an der Muehlenwandung haengt, muss abgekratzt werden und mit dem restlichen Material 1 Sekunde lang homogenisiert werden. Das Mehl wird entweder in Aluminiumkappen oder in Fluessigkuevetten von jeweils 40 mm Durchmesser gefuehrt. Proben in Aluminiumkappen werden mit einer hydraulischen Presse und einem Druck von 1.0 t/cm<sup>2</sup> in den Kappen fixiert; Proben in Fluessigkuevetten werden mit einer Handpresse auf 35 % (±10%) ihres Ausgangsvolumens gedrueckt. Eine detaillierte Beschreibung des Praeparationsvorgangess ist bei Anon (1991) sowie bei Schnug und Haneklaus (1990b) zu finden.

#### *Probenvorbereitung von Saatgut, kleinere Mengen*

Fuer Probenmengen kleiner 15 g bis hin zu 250 mg eignen sich zur Zerkleinerung des Materials Pfeffermuehlen besser als Kaffeemuehlen. Details zu dieser Praeparation sind bei Schnug et al. (1993) zu finden. Nach dem Mahlen muss das Material in Porzellantiegeln homogenisiert werden und in einer duennen Schicht gleichmaessig auf den Boden einer Fluessigkuvette (Durchmesser: 20 mm) ausgebreitet und mit einer Handpresse vorsichtig komprimiert werden. Wenn die zu untersuchende Probenmenge weniger als 1 g betraegt, wird

empfohlen, eine duenne Wachsschicht ueber das Material zu schichten, um ein Auseinanderbrechen der Probe waehrend der Messung zu vermeiden.

#### *Probenvorbereitung, einzelne Samen*

Spezielle Samenhalterungen muessen vorbereitet werden, wenn einzelne Samen untersucht werden sollen. Fuenf Gramm HOECHST Wachs „C“ werden in eine Aluminiumkappe gefuellt und mit einem Druck von 1,2 t /cm<sup>2</sup> zusammengedruickt. Mit einem heissen Metallstab wird eine Aushoehlung in das Wachs gebrannt. Der Durchmesser sollte etwas grosser sein als der des Samens. Ein Schwefel-freier Klebstoff wird aus Glucose hergestellt, indem diese 1 Stunde in Essigsaeure eingeweicht wird und anschliessend leicht gekocht wird. Mittels einer erhitzten Pipettnadel wird ein Tropfen dieser Loesung in die Wachshoehlung getropft. Mit einer Pinzette wird sofort ein Samen auf den Klebstoff plaziert. Nachdem der Klebstoff erkaltet und ausgehaertet ist, wird der Samen mit einer Rasierklinge entlang der Wachsschichtoberflaeche halbiert. Der Durchmesser des halbierten Samens sollte genau bestimmt werden.

#### *Probenvorbereitung von Extraktionsschrot*

Extrahiertes Samenmehl muss im Mikrowellenofen bei 600 W 60 Sekunden lang erhitzt werden und entweder in einer Zentrifugalmuehle oder einer Kaffeemuehle zerkleinert werden.. Das Mehl kann direkt in Aluminiumkappen oder. Fluessigkuevetten zusammengedruickt werden, wie oben beschrieben.

### **Einstellungen am Roentgenfluoreszenz-Spektrometer**

Grundlegende Voraussetzungen der Roentgenfluoreszenz zur Analyse pflanzlichen Materials wurden von Norrish und Chapell (1967) beschrieben. Die Spektrometer Einstellungen und Messbedingungen sind fuer einige Mineralstoffe in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1  
Messbedingungen und Nachweisgrenzen fuer leichte Elemente

Spektrometertyp: Philips PW 1400										
Roentgenroehre: Rh Detektor: Flusszaehlung (Ar/CH4) Kollimator: fein (0,15 mm grob (0,55 mm)										
Element	Linie	Winkel (2-theta)	+offset	-offset	kV	mA	Kolli-mator	X-tal	Konz.bereich (mg/g)	u Ng <sup>1</sup> (µg/g)
Mg	K <sub>α</sub>	23,600	1,30	1,30	50	55	fein	PX1	0,4 – 12,0	68,9
Na	"	28,530	1,30	1,56	50	55	grob	PX1	0,04 – 7,6	32,5 <sup>2</sup>
Cl	"	65,505	0,64	0,84	60	30	fein	PE	0,3 – 8,0	54,9
S	"	75,835	1,22	1,06	60	30	grob	PE	0,5 - 20,0	20,8
P	"	89,535	0,66	1,22	60	30	fein	PE	0,2 – 11,0	37,7
Si	"	109,290	0,70	1,00	60	45	grob	PE	0,5 – 19,0	26,3
Ca	"	113,215	1,92	1,56	60	30	fein	LiF200	0,1 – 50,0	21,3
K	"	136,815	2,62	2,02	60	30	fein	LiF200	1,0 – 27,0	45,1

Bemerkung: <sup>1</sup> u Ng = untere Nachweisgrenze, Messdauer 20 sec ; <sup>2</sup> Messdauer = 200 sec

Mit der Ausnahme von Natrium betraegt die Messdauer bei Proben normaler Groesse 20 Sekunden. Die Messdauer bei Proben kleiner Mengen muss auf 40 oder gar 400 Sekunden erhoht werden. Daher ist eine Natriumbestimmung in kleinen Proben nicht moeglich.

**Kalibrierung des Roentgenfluoreszenz- Spektrometers fuer die Bestimmung leichter Elemente in Blattmaterial**

Korrekturen wegen des Matrixeffektes sind durch die Verduennung mit dem Wachs nicht notwendig. Standardreferenzmaterial (SRM's; siehe Abbildung 1 und 2) verschiedenen Ursprunges wurden mit oben beschriebenen Methoden aufgearbeitet, Kalibrationskurven fuer Silizium und Chlor sind in Abbildung 1 dargestellt.

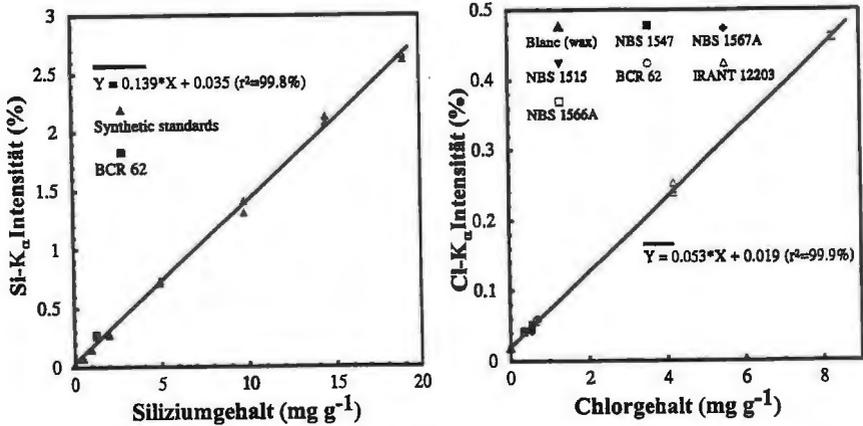


Abbildung 1: Beziehungen zwischen zertifizierten Gehalten an Silizium bzw. Chlor und Si-K<sub>α</sub> bzw. Cl-K<sub>α</sub> Intensitaet in Standardreferenzmaterialien  
 Fuer kleine Probenmengen wird eine dreifache Wiederholung empfohlen, um eventuelle Inhomogenitaet des Materials zu kompensieren.

**Kalibrierung des Roentgenfluoreszenz-Spektrometers fuer Schwefel- und Glucosinolatbestimmung**

Die Kalibrierung des Geraetes sollte mit dreifacher Wiederholung der Messung der Referenzmaterialien (CRM 190, CRM 366 und CRM 367)(Schnug et al. 1992) durchgefuehrt

werden. Die Strahlungsintensitaet der S-K $\alpha$  Linie des Referenzmaterials wird bestimmt (Abbildung 2) mit den fuer das Geraet angegebenen Einstellungen (s. Tab.1).

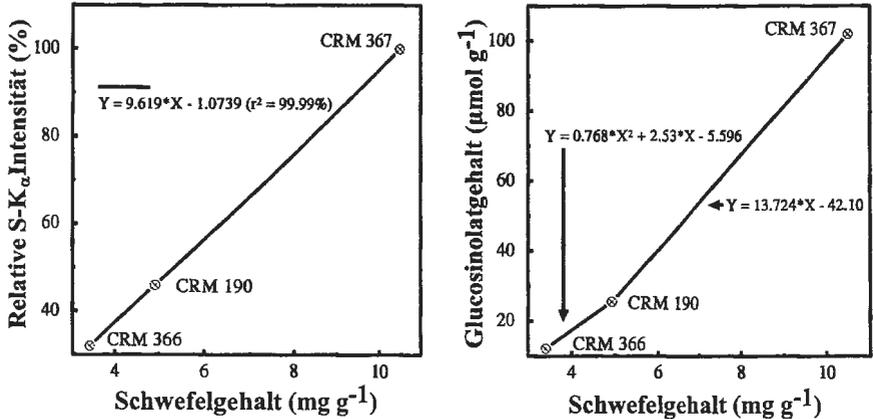


Abbildung 2: Beziehung zwischen Schwefelgehalt und Strahlungsintensitaet (links) in den Referenzproben und Beziehung zwischen Schwefelgehalt un Gesamtglucosinolatgehalt (rechts)

Der Gesamtglucosinolatgehalt ( $\mu\text{mol/g}$ ) in unbekanntem Proben wird bis zu Schwefelgehalten von 4,93 mg/g ueber eine polynome Funktion ermittelt, bei hoeheren Schwefelgehalten ueber eine lineare Funktion (Abbildung 2).

### Schlussfolgerung

Roentgenfluoreszenz-Spektroskopie eignet sich besonders fuer schnelle und genaue Bestimmungen von leichten Elementen in Pflanzenmaterial. Neben einer direkten Bestimmung einzelner Mineralstoffe koennen in indirektem Verfahren ueber Schwefelbestimmung Glucosinolatgehalte ermittelt werden.

### Literatur

Anon. 1991. ISO/CD (1991) 9167.2 Rapeseed-Determination of total glucosinolates – Part 2: X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF).

Haneklaus, S. and E. Schnug. 1993. Determination of total and destroyed glucosinolates in processed oilseed rape meal. Landbauforschung Voelkenrode 43: 73 – 76.

Norrish, K. and B.W. Chappell. 1967. X-ray fluorescence spectroscopy. In: J.Zusaman (ed.) Physical methods in determinative minerlogy. Academic Press, London and New York.

- Schnug, E. and S. Haneklaus.** 1990a. Quantitative glucosinolate analysis in Brassica seeds by X-ray fluorescence spectroscopy. *Phytochemical Analysis* 1: 40 - 43.
- Schnug, E, and S. Haneklaus.** 1990b. A systematical study on factors influencing the determination of the total glucosinolate content in rapeseed by the X-RF method. *Fat. Sci. Technol.* 92: 101 – 106.
- Schnug, E., Boenke, A., Wagstaffe, P.J. and A.S. Lindsey.** 1992. The characterisation of three rapeseed reference materials and their utilisation in the indirect determination of total glucosinolates in rapeseed by X-RF. *Fat. Sci. Technol.* 94: 297 – 301.
- Schnug, E., Murray, F. and S. Haneklaus,** 1993. Preparation techniques of small sample sizes for sulphur and indirect total glucosinolate analysis in Brassica seeds by X-ray fluorescence spectroscopy. *Fat Sci. Technol.* 95: 334 - 336

## Autorenindex

Adam	57, 193	Keusgen	235	Stankovic	197
Ajdic	247	Kleber	57	Stecher	175, 181
Baab	229	Kolb	145	Steuer	256
Balko	201	Krüger	235	Stöggel	169
Basener	175	Krumbein	47, 261	Stolz	213
Bauer	217, 223	Lacher	229	Strass	111, 133
Bergmann	201	Lalic	197, 247	Streif	127, 207
Betsche	157	Lämmerhirt	250	Strube	213
Bitsch I.	111, 133, 145	Lippmann	201	Tauscher	57, 273
Bitsch R.	111, 133	Lisinger	283	Treutter	121
Bognar	57, 193	Löhnertz	139	Vuckovic	247
Böhm	111, 145	Loos	139	Wagner	17
Bonn	169, 175, 181, 187	Lotz	157	Walter	267
Bors	3	Luckas	101	Wathelet	283
Buchmann	213	Mabon	283	Wichmann	107
Butz	273	Marlier	283	Widell	47
Carle	133	Mascher	201	Wisker	29, 117
Chenman	207	McLaughlin	250	Xuan	127
Dietrich	91	Miletic	197, 247		
Djordjevic	197, 247	Miric	197, 247		
Dongowski	67	Müller	121		
Edenharder	79	Münzing	145		
Elmadfa	17	Netzel	111, 133		
Feldheim	39, 117	Nimmannit	117		
Felski	157	Oh	151		
Fernández García	273	Paschold	57		
Fickler	79	Patz	91		
Flamme	67, 163	Pavlovic	197		
Flaschel	157	Pawelzik	151		
Gebhardt	67	Popp	169, 181, 187		
Gollner	79	Pour Nikfardjam	91, 139		
Gomes	277	Puderbach	229		
Guggenbichler	175	Rauhut	139		
Habegger	241	Rosa	277		
Hagel	217, 223	Rühl	91		
Haneklaus	217, 223, 283, 287	Sator	277, 283, 287		
Hentschel	145	Schaller	267		
Herbst	111, 133	Scherz	169, 187		
Herchert	235	Schimmel	283		
Hiss	213	Schmitt	91		
Hornung	229	Schnitzler	241, 267		
Huck	169, 175, 181, 187	Schnug	217, 223, 277, 283, 287		
Jacobi	67	Schön	250		
Jansen	67, 163	Schonhof	47, 261		
Joubert	256	Schulz	117, 235, 256		
Kasel	107	Schütze	256		
Keller	235	Shefford	139		
Kesenheimer	133	Sobajic	197, 247		

## Stichwortverzeichnis

<i>Allium</i>	235	Kaffee	197
Aminosäuren	213, 277	Kartoffel	201
Antioxidantien 3, 79, 107, 133, 139, 267		Kartoffelfruchtwasser	157
Apfel	207, 229	Kohlenhydrate	29, 67
Apfelessig	121	Lagerstress	127
Apfelsaft	121, 133	Lebensmittelrecht	101
Apfelwein	121	Leinsamen	39
Aroma	235, 241	Lignane	39
Ascorbinsäure	207	Lipide	247
Ballaststoffe	29	Mangold	250
Bewässerung	57	Mikrowellenbehandlung	151
Birnen	127	Möhren	217, 223, 241
Biotechnologie	157	N-Düngung	57
Bohnen	213	Paramylon	157
<i>Brassicaceae</i> 47, 57, 193, 261, 277, 287		Phenolische Verbindungen	91, 107 111, 117, 121, 181, 201
Brokkoli	57, 193, 261, 277	Resveratrol	91, 175, 201
<i>Camellia</i>	117	Rotbuschtee	256
Carotinoide	187, 261	Schwefel	47, 283
Catechin	117, 121	Stärke	151, 163
Cd	107, 250	Stilbene	181
Chlorophylle	261	Sulforaphan	57, 193
Cholesterin	29	Teeblätter	117
<i>Cystus</i>	107	Teigwarenherstellung	145
Dehydroascorbinsäure	207	Terpenoide	17
diätetische Lebensmittel	67	Tocopherol	3, 169
Durumweizen	145	Tomatenpüree	273
Flavonoide	111, 117, 121, 175, 181	Traubenmost	139
Fruchtfleischverbräunungen	127	Traubensäfte	91
Fruchtsäfte	91, 111, 121, 133	Urin	111
Gerste	67, 163	Vitamin C	261
Glucosinolate	47, 283, 287	Vitamin E	3, 169
Haselnuss	247	Wein	91, 139, 175, 181
Hochdruckbehandlung	273		
Holundersaft	111		