

Aus dem Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung des Instituts
für Oenologie und Getränkeforschung der Forschungsanstalt
Geisenheim

Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften

Influence of processing techniques on polyphenols and antioxidative
capacity of apple- and berry juices

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich 09
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

Andreas Rechner

aus Mühlheim am Main

Giessen 2000

Für meine Eltern

Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften

1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Zielsetzung	4
2. Grundlagen	5
2.1. Polyphenole	5
2.1.1. Allgemeine Klassifizierung der Polyphenole	5
2.1.2. Biosynthese der Polyphenole	10
2.1.3. Reaktionen der Polyphenole	12
2.1.4. Polyphenole im Apfel und im Apfelsaft	17
2.1.5. Polyphenole in schwarzen Johannisbeeren und im schwarzen Johannisbeersaft	21
2.1.6. Polyphenole in Brombeeren, Holunderbeeren, Erdbeeren, Stachelbeeren, Moosbeeren und Sauerkirschen	24
2.1.7. Polyphenole und Gesundheit	32
2.2. Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität	37
2.2.1. Die antioxidative Kapazität von Polyphenolen, Fruchtsäften, -extrakten und -weinen	39
3. Methoden	44
3.1. Polyphenolanalytik	44
3.1.1. Polyphenolmuster und -gehalte mittels HPLC	44
3.1.2. Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu	46
3.1.3. Farbmessungen	47
3.1.4. Extraktionsmethode für Maischeproben	47
3.2. Präparative Isolierung einzelner Polyphenole aus Fruchtsäften	48
3.2.1. Anthocyane aus schwarzem Johannisbeersaft	49
3.2.2. Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid aus Apfelsaft	50
3.2.3. Isolierung von Polyphenolen aus Apfelsaft mittels Gelchromatographie an einer Säule mit Sephadex LH 20	52
3.3. Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode	53
3.4. Allgemeine Analysenmethoden	56
4. Verarbeitungsstudien	57
4.1. Apfel	58
4.1.1. Herstellung eines naturtrüben Apfelsaftes	58
4.1.2. Einfluss der Apfelsorte und des Polyphenolgehaltes auf die antioxidative Kapazität naturtrüber Apfelsäfte	58
4.1.3. Einfluss der Maischestandzeit	59
4.1.4. Einfluss von Entsaftungssystemen und Maischestandzeit auf Apfelsaft	59
4.1.5. Einfluss der Saftstandzeit auf Apfelsaft	59
4.1.6. Versuche zur Inaktivierung der fruchteigenen Polyphenoloxidasen	59
4.1.7. Einfluss der Schönung mit Gelatine auf Apfelsaft	60
4.1.8. Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe von Kieselsol und der Zugabemenge von Gelatine bei der Gelatine / Kieselsol-Schönung von Apfelsaft	60
4.1.9. Einfluss der Ultrafiltration auf Apfelsaft	60
4.1.10. Stabilisierung von mikrofiltriertem Apfelsaft mit PVPP oder Adsorberharz	61
4.1.11. Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Laccase-Behandlung und Ultrafiltration	62

4.1.12.	Einfluss der Erhitzungsdauer: Kurzzeiterhitzung (KZE) und Flaschenpasteurisation	63
4.1.13.	Einfluss der Lagerung.....	63
4.2.	Beeren.....	64
4.2.1.	Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft.....	64
4.2.2.	Einfluss der Sorte auf die antioxidative Kapazität von schwarzem Johannisbeersaft	65
4.2.3.	Herstellung eines schwarzen Johannisbeerkonzentrates	65
4.2.4.	Einfluss der Gelatine-Schönung auf schwarzen Johannisbeersaft	65
4.2.5.	Einfluss der Behandlungsmittel PVPP und Bentonit	65
4.2.6.	Herstellung von Brombeersaft, Holundersaft und Sauerkirschsaf.....	66
4.2.7.	Herstellung eines Stachelbeernektars	66
4.2.8.	Einfluss der Reifung auf die antioxidative Kapazität am Beispiel der Reifung verschiedener Erdbeersorten	67
4.2.9.	Entwicklung eines Antioxidansgetränkes auf der Basis verschiedener Beerensäfte.....	68
4.2.10.	Veränderungen der antioxidativen Kapazität während der Herstellung von Fruchtweinen aus verschiedenen Beerenfrüchten	68
4.2.11.	Veränderungen der antioxidativen Kapazität während Herstellung eines Fruchtweinessig aus Moosbeeren.....	68
5.	Ergebnisse.....	69
5.1.	Methoden.....	69
5.1.1.	Polyphenolanalytik mittels HPLC	69
5.1.1.1.	Anthocyan- und Gesamtphenolgehalte verschiedener rotfarbiger Fruchtsäfte	72
5.1.2.	Isolierung von Anthocyane aus schwarzem Johannisbeersaft.....	72
5.1.3.	Isolierung von Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid aus Apfelsaft	73
5.1.4.	Isolierung von Polyphenole aus Apfelsaft mittels Gelchromatographie an einer Säule mit Sephadex LH 20	76
5.1.5.	Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode.....	77
5.1.5.1.	Antioxidative Kapazität (TEAC-Wert) von Fruchtsäften, alkoholischen und nicht alkoholischen Getränken	79
5.2.	Verarbeitungsstudien.....	81
5.2.1.	Apfel.....	81
5.2.1.1.	Polyphenole im Apfelsaft	81
5.2.1.2.	Antioxidative Kapazität von Apfelsaft.....	83
5.2.1.3.	Herstellung eines naturtrüben Apfelsaftes	84
5.2.1.4.	Einfluss der Apfelsorte und des Polyphenolgehaltes auf die antioxidative Kapazität naturtrüber Apfelsäfte	86
5.2.1.5.	Polyphenolbilanz beim Entsaften einer Apfelmaische.....	89
5.2.1.6.	Maischestandzeit.....	91
5.2.1.7.	Entsaftungssysteme und Maischestandzeit	91
5.2.1.8.	Einfluss der Saftstandzeit	92
5.2.1.9.	Versuche zur Inaktivierung der fruchteigenen Polyphenoloxidasen	93
5.2.1.10.	Einfluss der Schönung mit Gelatine.....	95
5.2.1.11.	Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe von Kieselol und der Zugabemenge von Gelatine bei der Gelatine / Kieselol-Schönung.....	96
5.2.1.12.	Einfluss der Ultrafiltration.....	97
5.2.1.13.	Stabilisierung von mikrofiltriertem Apfelsaft mit PVPP oder Adsorberharz.....	98
5.2.1.14.	Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Laccase-Behandlung und Ultrafiltration.....	100

5.2.1.15.	Einfluss der Erhitzungsdauer: Kurzzeiterhitzung (KZE) und Flaschenpasteurisation.....	102
5.2.1.16.	Einfluss der Lagerung.....	103
5.2.2.	Beeren.....	104
5.2.2.1.	Polyphenole im schwarzen Johannisbeersaft	104
5.2.2.2.	Antioxidative Kapazität von Beerensäften.....	105
5.2.2.3.	Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft.....	106
5.2.2.4.	Einfluss der Sorte auf die antioxidative Kapazität von schwarzem Johannisbeersaft	108
5.2.2.5.	Polyphenolbilanz beim Entsaften von schwarzer Johannisbeermaische ...	108
5.2.2.6.	Herstellung eines schwarzen Johannisbeerkonzentrates.....	109
5.2.2.7.	Einfluss der Gelatine-Schönung auf Brombeer- und schwarzen Johannisbeersaft	110
5.2.2.8.	Einfluss der Behandlungsmittel PVPP und Bentonit auf schwarzen Johannisbeersaft	111
5.2.2.9.	Herstellung und Lagerung von Holundersaft.....	111
5.2.2.10.	Herstellung von Brombeersaft	115
5.2.2.11.	Herstellung von Sauerkirschsafte	117
5.2.2.12.	Herstellung eines Stachelbeernektars	118
5.2.2.13.	Einfluss der Reifung auf die antioxidative Kapazität am Beispiel der Reifung verschiedener Erdbeersorten	119
5.2.2.14.	Entwicklung eines Antioxidansgetränkes auf der Basis verschiedener Beerensäfte	120
5.2.2.15.	Veränderungen der antioxidativen Kapazität während der Herstellung von Fruchtweinen aus verschiedenen Beerenfrüchten.....	122
5.2.2.16.	Veränderungen der antioxidativen Kapazität während der Herstellung eines Fruchtweinessig aus Moosbeeren	124
6.	Diskussion	125
6.1.	Antioxidative Kapazität von Fruchtsäften	125
6.2.	Polyphenole in Apfel- und Beerensäften.....	127
6.3.	Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die antioxidative Kapazität und den Polyphenolgehalt.....	128
6.3.1.	Apfel.....	129
6.3.2.	Schwarze Johannisbeere	135
6.3.3.	Holunder.....	138
6.3.4.	Brombeere	139
6.3.5.	Sauerkirsche	139
6.3.6.	Stachelbeeren	140
6.3.7.	Fruchtweine.....	140
6.3.8.	Bedeutung der Ergebnisse für die Herstellung von Fruchtsaft.....	141
6.4.	Wirtschaftliche Bedeutung der Ergebnisse	142
7.	Zusammenfassung.....	143
8.	Summary.....	145
9.	Literatur.....	147

Verzeichnis der Abbildungen und Diagramme:

Abbildung 1: Struktur der wichtigsten Hydroxyczimtsäuren und –derivate in Früchten	6
Abbildung 2: Die Strukturen der wichtigsten Hydroxybenzoesäure-Verbindungen in Früchten	7
Abbildung 3: Teil 1: Strukturen der wichtigsten Flavonoide in Früchten	8
Abbildung 4: Teil 2: Strukturen der wichtigsten Flavonoide in Früchten	10
Abbildung 5: Biosynthesewege der Polyphenole in Pflanzen	11
Abbildung 6: Reaktionen von o-Chinonen mit Polyphenolen	13
Abbildung 7: Reaktionen von o-Chinonen mit verschiedenen Substanzen	14
Abbildung 8: Entstehung von 3-Hydroxyphloridzin in Apfelsaft durch Katalyse einer Tyrosinase	15
Abbildung 9: Arrhenius-Diagramm der Anthocyane in schwarzen Johannisbeersaft	24
Abbildung 10: Verlauf der Farbreaktion im TEAC-Test bei verschiedenen Trolox-Konzentrationen	54
Abbildung 11: Eichgerade des TEAC-Testes, Messzeitpunkt 6 min	55
Abbildung 12: Struktur des Fluorkohlenwasserstoffes der Fluofix-Phase	69
Abbildung 13: Chromatogramm der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches auf der Fluofix-Säule mit amperometrischer Detektion bei 500 mV	69
Abbildung 14: Chromatogramm der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches mit UV-Detektion bei 280 nm nach der Methode nach RITTER et al. 1994	70
Abbildung 15: Vergleich der Chromatogramme der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches. UV-Detektion bei 280 nm und amperometrischer Detektion bei 500 mV	71
Abbildung 16: Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC und Gesamtphenolgehalt verschiedener Buntsäfte	72
Abbildung 17: Chromatogramm der präparativen Trennung des ethanolischen Extraktes von schwarzem Johannisbeersaft bei 280 nm	73
Abbildung 18: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes (Verdünnung 1:10) aus laccasebehandeltem Apfelsaft bei 280 nm	73
Abbildung 19: Chromatogramm der präparativen Trennung bei 280 nm	74
Abbildung 20: Chromatogramm des präparativ isolierten Phloretin-2'-xyloglucosid-Peaks bei 280 nm	74
Abbildung 21: Chromatogramm des präparativ isolierten Coumaroylchinasäure-Peaks bei 320 nm	75
Abbildung 22: Zucker des Phloretin-2'-xylosylglucosid-Peaks nach saurer Hydrolyse ...	75
Abbildung 23: Extinktion bei 280 nm der gesammelten Fraktionen der Trennung eines Apfelsaftextraktes an einer Säule mit Sephadex LH 20 (Gelchromatogramm)	76
Abbildung 24: Chromatogramm von Fraktion 54 bei 280 nm	77
Abbildung 25: Vergleich der Messprinzipien Lagphase-Bestimmung und Extinktionsbestimmung nach 6 Minuten zur Ermittlung des TEAC-Wertes (n = 14)	77
Abbildung 26: Vergleich der Farbreaktion einer Apfelsaftprobe im TEAC-Test bei 20 und bei 37 °C	78
Abbildung 27: Vergleich der Farbreaktion einer Apfelsaftprobe im TEAC-Test bei Verdünnung der Probe mit entmineral. Wasser (pH 6,3) und PBS-Probenpuffer (pH 7,3)	78
Abbildung 28: Mittlerer Anteil der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert von schwarzem Johannisbeersaft (n = 10), Orangensaft (n = 14) und naturtrübem Apfelsaft (n = 10)	80
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm eines Apfelsaftes (Adsorberharz-Extraktes) bei 280 nm	82
Abbildung 30: Ausschnitt 46 – 56 min des obigen Chromatogramms eines Apfelsaftes (Adsorberharz-Extraktes) bei 280 nm	82
Abbildung 31: Die antioxidative Kapazität von klarem und naturtrübem Apfelsaft aus dem Handel	83
Abbildung 32: Anteil einzelner Polyphenole am TEAC-Wert eines frischen Apfelpresssaftes	84

Abbildung 33: Veränderung des TEAC-Wertes von Apfelsaft bei der Zugabe von L-Ascorbinsäure	84
Abbildung 34: Veränderung von Gesamtphenolgehalt, TEAC-Wert und L-Ascorbinsäuregehalt bei einer L-Ascorbinsäurezugabe von 200 mg/L bei der Herstellung von naturtrübem Apfelsaft.....	85
Abbildung 35: Veränderung der wichtigsten einzelnen Polyphenole während der Herstellung von naturtrübem Apfelsaft, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)	86
Abbildung 36: Antioxidative Kapazität naturtrüber Apfelsäfte aus verschiedenen Apfelsorten	87
Abbildung 37: Chromatogramm der Polyphenole eines naturtrüben Apfelsaftes der Sorte „Bohnapfel“ bei 280 nm.....	88
Abbildung 38: Chromatogramm der Polyphenole eines naturtrüben Apfelsaftes der Sorte „Jonagold“ bei 280 nm (gleicher Maßstab wie Abb. 35)	88
Abbildung 39: Absolute TEAC-Werte und Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu von Presssaft und Maischeextrakt aus der gleichen Maischemenge sowie die Ausbeuten in Prozent für den Presssaft	90
Abbildung 40: Prozentuale Anteile der wichtigsten Polyphenole am Fingerprintmuster von Presssaft und Extrakt	90
Abbildung 41: Abnahme des TEAC-Wertes und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu während der Standzeit (60 min) von Apfelmaische mit und ohne Pectinasezugabe, bezogen auf die frische Maische (100%).....	91
Abbildung 42: Einfluss der Maischestandzeit auf den Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und den TEAC-Wert in Apfelsaft bei zwei verschiedenen Entsaftungssystemen.....	91
Abbildung 43: Abnahme des TEAC-Wertes und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu von Apfelsaft während einer Standzeit von 6 Stunden	93
Abbildung 44: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt von Apfelpresssaft bei zwei Varianten der Maischeerhitzung nach einer Standzeit von 4 Stunden.....	94
Abbildung 45: Veränderung der Gehalte einzelner Polyphenole und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu bei der Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels einer Schönung mit 14 g/hL Gelatine + 140 mL/hL Kieselsol (15%).....	95
Abbildung 46: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu während der Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Gelatine/Kieselsol-Schönung	96
Abbildung 47: Einfluss der Kieselsolzugabe bei der Gelatineschönung auf den TEAC-Wert von Apfelsaft, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%)	97
Abbildung 48: Einfluss des Zeitpunktes der Kieselsolzugabe bei der Gelatineschönung auf den TEAC-Wert und den Gesamtphenolgehalt von Apfelsaft, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%).....	97
Abbildung 49: Abnahme von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu nach einer Ultrafiltration von naturtrübem enzymiertem Apfelsaft mit verschiedenen Trenngrößen, bezogen auf den unfiltrierten Saft (100%).....	98
Abbildung 50: Abnahme des TEAC-Wertes, des Gesamtphenolgehaltes und des Farbwertes E 420 nm von mikrofiltriertem Apfelsaft bei der Behandlung mit PVPP Divergan F und Adsorberharz XAD 16 HP (65 BV bei 25 BV/h), bezogen auf den mikrofiltrierten Apfelsaft (100%)	99
Abbildung 51: Abnahme einzelner Polyphenole nach der Stabilisierung von mikrofiltriertem Apfelsaft mittels PVPP und Adsorberharzsäule, bezogen auf den mikrofiltrierten Saft (100%)	99
Abbildung 52: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu während des Laccase-Versuchs	100
Abbildung 53: Abnahme von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu eines mit verschiedenen Laccasekonzentrationen behandelten, ultrafiltrierten Apfelsaftes, bezogen auf den ultrafiltrierten, unbehandelten Saft (100%).....	101
Abbildung 54: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-	

Ciocalteu und Summe der einzelnen Polyphenole mittels HPLC während der Flaschenpasteurisation.....	102
Abbildung 55: TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von klarem und trübem Apfelsaft der Sorte Boskoop vor und nach einer einjährigen Lagerung bei 37°C	103
Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm eines schwarzen Johannisbeersaftes (frischer Presssaft) an einer Fluofix-Säule bei 280 nm.....	105
Abbildung 57: Anteil einzelner Polyphenole und der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert von frischem schwarze Johannisbeerpresssaftes.....	105
Abbildung 58: Anteil einzelner Polyphenole und der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert von frischem Holunderpresssaft.....	106
Abbildung 59: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtphenolgehalt und –anthocyangehalt mittels HPLC, E 520/mm (pH < 1), L-Ascorbinsäuregehalt und Extraktgehalt während der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.....	107
Abbildung 60: TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, L-Ascorbinsäuregehalt, Farbwert E 520/cm (pH < 1) sowie die Summen der Gehalte an Anthocyanen, farblosen Polyphenole und aller Polyphenole mittels HPLC von Nachextrakt und umgerechneten Nachextrakt einmal entsafteter schwarzer Johannisbeeren, bezogen auf den frischen Presssaft (100%).....	107
Abbildung 61: Absoluter TEAC-Werte und absoluter Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu von Presssaft und Maischeextrakt aus 100 g schwarzer Johannisbeermasche sowie die Ausbeuten in Prozent für den Presssaft.....	109
Abbildung 62: Abnahme einzelner Polyphenole und Anthocyane sowie des TEAC-Wertes, des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu, der Extinktion bei 520 nm (pH < 1) und des L-Ascorbinsäuregehaltes von schwarzem Johannisbeersaft nach dem Konzentratherstellungsprozess, bezogen auf den Saft vor dem Prozess (100%).....	110
Abbildung 63: Abnahme von TEAC-Wert, Farbwert E 520 nm und Gesamtphenolgehalt nach einer Schönung von schwarzem Johannisbeersaft und Brombeersaft mit 15 g/hL Gelatine bezogen auf den ungeschönten Saft (100%).....	110
Abbildung 64: Abnahme von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der Extinktion bei 520 nm/cm (pH < 1) nach der Behandlung von schwarzem Johannisbeersaft mit verschiedenen Mengen an PVPP und Bentonit.....	111
Abbildung 65: HPLC-Chromatogramm eines frischen Holunderpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm.....	112
Abbildung 66: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Gesamtphenol- und Gesamtanthocyangehalt mittels HPLC während der Herstellung von Holundersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.....	113
Abbildung 67: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu sowie Gesamtphenol- und Gesamtanthocyangehalt mittels HPLC von steril eingelagertem Holundersaft nach 6 Monaten Tanklagerung.....	114
Abbildung 68: Prozentuale Abnahme von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtphenol- und Gesamtanthocyangehalt mittels HPLC sowie der einzelnen Polyphenole mittels HPLC über den gesamten Herstellungs- und Lagerungsprozess von Holundersaft, bezogen auf den frischen Presssaft (100%).....	115
Abbildung 69: HPLC-Chromatogramm eines Brombeerpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm.....	115
Abbildung 70: Abnahme von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Farbwert E 520 nm/cm (pH < 1) sowie Summe der Anthocyane und Summe der Polyphenole mittels HPLC bei der Herstellung von Brombeersaft.....	116
Abbildung 71: HPLC-Chromatogramm eines Sauerkirschpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280nm.....	117
Abbildung 72: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu Und Farbwert E 520 nm/cm (pH < 1) während der Herstellung von Sauerkirschsaft.	

Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.118

Abbildung 73: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu während der Herstellung von Stachelbeernektar, bezogen auf den frischen Presssaft (100%).....119

Abbildung 74: Anthocyanfingerprints verschiedener Erdbeersorten.....120

Abbildung 75: HPLC-Chromatogramm des Antioxidansgetränkes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm121

Abbildung 76: HPLC-Chromatogramm des Antioxidansgetränkes an einer Fluofix-Säule bei 525 nm, Ausschnitt 30 – 60 min.....122

Abbildung 77: Abnahme einzelner Polyphenole sowie der Summe der Anthocyane und der Summe der Polyphenole mittels HPLC von Sauerkirschsaft während der Vergärung zu Wein123

Abbildung 78: HPLC-Chromatogramm eines Apfelessig an einer Fluofix-Säule bei 280 nm124

Diagramm 1: Herstellung von naturtrübem Apfelsaft58

Diagramm 2: Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft64

Diagramm 3: Herstellung eines Stachelbeernektars.....67

Diagramm 4: Herstellungsschema für trüben und klaren Apfelsaft unter dem Aspekt einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität135

Verzeichnis der Tabellen:

Tabelle 1: Bisher identifizierte Polyphenole in der frischen Apfelfrucht sowie die Gehalte als Durchschnitt und Schwankungsbreite	18
Tabelle 2: Schwankungsbreite der Gehalte der wichtigsten Polyphenol mittels HPLC in Apfelsaft verschiedener Sorten und Herstellungsverfahren	20
Tabelle 3: Anthocyane der schwarzen Johannisbeere und ihr prozentualer Anteil am Gesamtanthocyanengehalt	22
Tabelle 4: Farblose Polyphenole und ihre Gehalte in frischen schwarzen Johannisbeeren fünf verschiedener Sorten	22
Tabelle 5: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihre Gehalte in frischen Brombeeren	25
Tabelle 6: Anthocyanmuster von frischen Holunderbeeren und einem Farbstoffkonzentrat	26
Tabelle 7: Prozentuale Anteile der einzelnen Anthocyane in zehn Holundersäften	27
Tabelle 8: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihre Gehalte in frischen Erdbeeren	28
Tabelle 9: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in Stachelbeere	29
Tabelle 10: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in Sauerkirschen	30
Tabelle 11: Kinetische Daten des Anthocyanabbaus bei der Lagerung von Sauerkirschsaft, -halbkonzentrat und -konzentrat	31
Tabelle 12: Negativen Wirkungen von Polyphenolen.....	33
Tabelle 13: Antioxidative Schutzmechanismen zur Beseitigung aggressiver Sauerstoffspezies.....	34
Tabelle 14: Antioxidative Kapazität einiger Polyphenole mit zwei verschiedenen Testsystemen.....	40
Tabelle 15: Inhibition der LDL-Oxidation durch Extrakte von verschiedenen Beerenfrüchten und verschiedenen Traubensorten	41
Tabelle 16: Antioxidative Kapazität von Weinen und einigen Fruchtsäften und -nektaren.....	42
Tabelle 17: Hemmkonstante IC_{50} der LDL-Oxidation der Polyphenole einiger Getränke	43
Tabelle 18: Hemmung der Peroxidbildung von Methyllinolat durch aufgearbeitete Fruchtweine bei zwei verschiedenen Probenmengen sowie Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu der Fruchtweine und der Polyphenolgehalt in 50 μ L Probe berechnet als Gallussäure-Equivalente (GAE)	43
Tabelle 19: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einiger Polyphenole bei einem Injektionsvolumen von 10 μ L	45
Tabelle 20: Standardabweichung des Mittelwertes im TEAC-Test bei jeweils 16 Wiederholungen	56
Tabelle 21: TEAC-Werte einiger Frucht- und Gemüsesäfte sowie alkoholischer Getränke	79
Tabelle 22: Mittelwerte und Schwankungsbreiten der Gehalte der wichtigsten Polyphenole mittels HPLC in den untersuchten Apfelsäften (n = 49).....	81
Tabelle 23: Analysendaten der naturtrüben sortenreinen Apfelsäfte.....	87
Tabelle 24: Konzentration der Polyphenole in den naturtrüben Apfelsäften.....	89
Tabelle 25: Gehalte der Hauptpolyphenole sowie ihre Summe mittels HPLC von Apfelsäften hergestellt mit Dekanter und Horizontalpresse mit und ohne Maischestandzeit....	92
Tabelle 26: Gehalte einzelner Polyphenole und deren Summe von den Presssäften der beiden Maischeerhitzungsvarianten	94
Tabelle 27: Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC während des Laccase-Versuchs	101

Tabelle 28: Mittelwerte und Schwankungsbreiten der Gehalte der wichtigsten Polyphenole in schwarzem Johannisbeersaft (n = 9).....	104
Tabelle 29: Extraktgehalt (°Oechsle), Gesamtsäuregehalt (pH 8,1), L-Ascorbinsäuregehalt, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und TEAC-Wert von schwarzen Johannisbeersäften verschiedener Sorten	108
Tabelle 30: Gehalte einzelner Polyphenole und Summe der Polyphenole und Anthocyane von Holundersaft (frischer Presssaft) mittels HPLC.....	112
Tabelle 31: Veränderung einzelne Polyphenole mittels HPLC von steril eingelagertem Holundersaft nach 6 Monaten Tanklagerung.....	114
Tabelle 32: Gehalte einzelner Polyphenole und Summe der bestimmten Polyphenole mittels HPLC sowie das Anthocyanmuster von frischem Brombeerpresssaft.....	116
Tabelle 33: Gehalte an einzelnen Polyphenolen sowie die Summe der Anthocyane und die Summe der Polyphenole mittels HPLC von frischem Sauerkirschpresssaft.....	117
Tabelle 34: Extrakt, Gesamtsäuregehalt (pH 8,1), L-Ascorbinsäuregehalt, TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC berechnet als Pelargonidin von Erdbeeren der Sorte „Elsanta“ an drei Ernteterminen	119
Tabelle 35: Analysendaten des Antioxidansgetränktes.....	121
Tabelle 36: Gehalte der Hauptpolyphenole mittels HPLC des Antioxidansgetränktes.....	121
Tabelle 37: TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu verschiedene Fruchtsäfte bzw. -weine vor und nach der Vergärung.....	123
Tabelle 38: TEAC-Werte und Gesamtphenolgehalte von Moosbeerensaft, -wein und -essig im Verlauf einer Fruchtweinessigerstellung	124

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABTS	: 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
CaCo-2	: human colon adeno carcinoma
Cya-3-rut	: Cyanidin-3-rutinosid
DAD	: Diode array detection
DMPD	: N,N-Dimethyl-p-phenyldiamin dihydrochlorid
DPPH	: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
ECD	: Electrochemical detection
FRAP	: Ferric reducing/antioxidant power
GAE	: gallic acid equivalents
HMF	: 5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	: High performance liquid chromatography
IC ₅₀	: Concentration of 50% inhibition
i.D.	: im Durchmesser
KZE	: Kurzzeiterhitzung
LC/MS	: Liquid chromatography/mass spectrometry
LDL	: Low-density lipoprotein
MF	: Mikrofiltration
MHD	: Mindesthaltbarkeitsdatum
NADPH	: Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
n.b.	: nicht bestimmt
NMR	: Nuclear magnetic resonance
n.n.	: nicht nachweisbar
ORAC	: Oxygen radical absorbance capacity
PAD	: Pulsed amperometric detection
PBS	: Phosphate buffered saline
PPO	: Polyphenoloxidase
PVPP	: Polyvinylpolypyrrolidon
RP	: Reversed phase
TEAC	: Trolox equivalent antioxidative capacity
TRAP	: Total-Radical-Trapping-Antioxidant-Parameter
UV-Vis	: Ultraviolet-visible
V	: Volumen
VdF	: Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Einleitung

Die Ergebnisse verschiedener epidemiologischer Studien legen die Schlussfolgerung nahe, dass hoher Obst- und Gemüseverzehr die Inzidenz von Herz- und Kreislauferkrankungen beim Menschen deutlich reduzieren können (RENAUD und DE LORGERIL 1992, HERTOGE et al. 1993). Für diese Effekte werden zum Teil antioxidativ wirksame *Phytochemikalien* verantwortlich gemacht. Als wirksame Substanzen wurden neben der L-Ascorbinsäure und den Carotinoiden auch die phenolischen Inhaltsstoffe (im weiteren Polyphenole genannt) von Obst und Gemüse identifiziert (KÜHNAU 1976). Schon in den dreißiger Jahren postulierten SZENT-GYÖRGY und Mitarbeiter, dass Polyphenole vitaminähnliche Eigenschaften aufweisen können und prägten den Begriff Vitamin P (BENTHSATH et al. 1936, RUSZNYAK und SZENT-GYÖRGY 1936, BENTHSATH et al. 1937). Aber erst heute, über sechzig Jahre später, wird die wichtige Rolle der Polyphenole in der Ernährung des Menschen für dessen Gesundheit genauer untersucht. Die Polyphenole sollen dem Entstehen verschiedener Erkrankungen des Menschen, wie Herz- und Kreislauferkrankungen und bestimmten Krebsarten, prophylaktisch entgegenwirken (COOK und SAMMAN 1996, RICE-EVANS und PACKER 1998, BÖHM et al. 1998). Als Antioxidantien und Radikalfänger können sie wichtige Biomoleküle im Organismus vor der Schädigung durch freie Radikale schützen und vor sog. „oxidativen Stress“ (SIES 1985, 1991) schützen. Die antioxidativen Schutzmechanismen des menschlichen Körper lassen sich in enzymatische und nicht enzymatische Systeme unterteilen. Polyphenole sind vermutlich neben anderen antioxidativ wirksamen Substanzen, wie die Vitamine A, C und E, Glutathion, Harnsäure, ein Bestandteil dieser Schutzsysteme. Die Arterioskleroseverhütung wird beispielsweise hauptsächlich mit der Protektion humaner LDL vor Lipidperoxidation erklärt (RANKIN et al. 1988, JIALAL und GRUNDY 1992, DEIGNER und WOLF 1994). Die genannten gesundheitlich positiven Wirkungen der Polyphenole wurden fast ausschließlich bei Untersuchungen *in vitro* festgestellt oder sind Hypothesen auf der Basis epidemiologischer Daten, konnten aber bisher kaum *in vivo* am Menschen nachgewiesen werden. Es existieren daher keine Empfehlungen für die tägliche Aufnahme von Polyphenolen, wie es sie beispielsweise für Vitamine oder andere Lebensmittelinhaltsstoffe gibt. Das weitgehende Fehlen von Daten zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen nach ihrer Aufnahme und ihrer genauen Wirkung bzw. ihrer Metaboliten im menschlichen Organismus lassen eine solche Empfehlung nicht zu. Ebenfalls ist nicht bekannt, ob eine sehr hohe Aufnahme von Polyphenolen eventuell negative oder gar schädliche Wirkungen haben kann.

Polyphenole sind in Pflanzen weit verbreitet. Bisher sind mehr als 4000 verschiedene Substanzen bekannt (MACHEIX et al. 1990). Ihnen werden alle Verbindungen zugeordnet, die sich in ihrer chemischen Struktur auf das Phenol zurückführen lassen. Die phenolischen Verbindungen zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, da sie nicht im Primärstoffwechsel der Pflanze gebildet und verbraucht werden. Bei vielen Obst- und Gemüsearten tragen sie zu Farbe und Geschmack bei (MACHEIX et al. 1990). Die Gehalte an Polyphenolen in Obst und Gemüse sind sehr unterschiedlich (HARBORNE 1988), wobei neben der Obst- oder Gemüseart die Sorte und die physiologische Reife ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (MACHEIX et al. 1990, BURDA et al. 1990, HERRMANN 1992).

Erste grundlegende Untersuchungen über phenolische Substanzen in Früchten gehen auf KELHÖFER 1908 und FISCHER 1919 zurück. In der älteren Literatur werden sie häufig unter den Sammelbegriffen „Tannine“ oder „Gerbstoffe“ zusammengefasst, was auf die Fähigkeit zurückgeht, mit Eiweiß unlösliche Komplexe zu bilden. Die qualitative und quantitative Untersuchung der Polyphenole ist aufgrund ihrer hohen Reaktivität und großen strukturellen Vielfalt schwierig. Lange Zeit standen keine geeigneten Analysemethoden zur Bestimmung und Trennung der Polyphenole zur Verfügung. Ältere halbquantitative Aussagen über die Gehalte an Polyphenolen, basierend auf kolorimetrischen Bestimmungen, besitzen aufgrund ihrer großen Reaktionsvielfalt als Summenparameter nur eine beschränkte Aussagekraft (SPANOS und WROLSTAD 1990a, HERRMANN 1993, RITTER 1994). Durch die gerätetechnischen Fortschritte der letzten beiden Jahrzehnte, wie

der Verbesserung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), empfindlicheren UV-Vis-Detektoren oder dem Einsatz von Dioden-Array-Detektoren (DAD), wurde es möglich, die Strukturen und Gehalte einzelner Polyphenole in Früchten, Fruchtsäften und -weinen genauer zu untersuchen (LEA 1979, OLESZEK et al. 1988, SPANOS et al. 1990, SPANOS und WROLSTAD 1990a+b, EDER et al. 1990; RITTER 1994).

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität als Messgröße für den Gehalt an gesundheitlich relevanten Substanzen existieren diverse Methoden, die verschiedene chemische Reaktionen zur Grundlage haben (MARCO 1968, WHITEHEAD et al. 1992, FRANKEL et al. 1993, CAO et al. 1993, GHISELLI et al. 1994, FOGLIANO et al. 1999, MASUDA et al. 1999, NATELLA et al. 1999). Zudem gibt es bei den einzelnen Methoden zusätzlich Variationen im Messprinzip, was beispielsweise den gemessenen Parameter, die Konzentrationsverhältnisse der Reaktionspartner, die Verwendung einer Kalibriersubstanz usw. betrifft (SOLEAS et al. 1997). Dies führt häufig zu unterschiedlichen Werten der antioxidativen Kapazität für eine Probe.

Im Hinblick auf die Zufuhr antioxidativ wirksamer Inhaltsstoffe in der menschlichen Ernährung kommen neben Obst und Gemüse selbst primär deren Säfte in Frage. In Fruchtsäften sind die antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe, Polyphenole und L-Ascorbinsäure, der Rohware bei schonender Verarbeitung enthalten (KORTH 1994) und können möglicherweise besser resorbiert werden als aus pflanzlichem Gewebe, wie es für L-Ascorbinsäure bereits nachgewiesen wurde (DIETZ und BITSCH 1995). Sie stellen daher eine interessante Quelle für Polyphenole in der menschlichen Ernährung dar, zumal der Pro-Kopf-Verbrauch an Fruchtsaft und Nektar in Deutschland mit 40,8 L für 1998 weltweit der Höchste ist (Quelle: VdF). Die antioxidative Kapazität von Fruchtsäften kann recht hoch sein und ist primär von der Frucht abhängig (WHITEHEAD et al. 1995, MILLER und RICE-EVANS 1997, RECHNER et al. 1997, HENN und STEHLE 1998).

Für eine hohe Zufuhr von antioxidativ wirksamen Stoffen in Form von Fruchtsaft sollte demnach der Gehalt an Polyphenolen im Fruchtsaft möglichst hoch sein. Ein hoher Gehalt an Polyphenolen im Fruchtsaft ist aus qualitativen und sensorischen Gesichtspunkten allerdings problematisch. Hohe Mengen an Polyphenolen sind häufig die Ursache von Nachtrübungen bei klaren Fruchtsäften (HEATHERBELL 1984, LEA 1984), sind an deren Bräunung beteiligt (NICOLAS 1994) und können bei hohen Gehalten einen adstringierenden und bitteren Geschmack verursachen (LEA und ARNOLD 1978). Aus Sicht der Saftqualität und –stabilität ist es daher sinnvoll, hohe Polyphenolgehalte in Fruchtsäften zu vermeiden und Polyphenole partiell aus dem Saft zu entfernen. Die Reduktion der Polyphenole im Saft zum Erreichen einer hohen Saftqualität und –stabilität stellt den genauen Gegensatz zu dem aus der gesundheitlichen Bedeutung der Polyphenole folgenden Ziel dar, nämlich des Erreichens eines möglichst hohen Polyphenolgehaltes in einem Fruchtsaft. Beide Betrachtungsweisen der Polyphenole müssten für die Herstellung von Fruchtsaft angemessen berücksichtigt werden.

Bisher war es Ziel der Fruchtsafforschung, neue Verfahren zu entwickeln (MAIER 1994, RITTER 1994) oder bereits bekannte Verfahren zu optimieren (HEATHERBELL 1984, DIETRICH und SCHÄFER 1991), die den Gehalt an Polyphenolen in Fruchtsäften effektiv reduzieren, um dadurch die Saftqualität und –stabilität zu steigern. Eine vollständige Entfernung der Polyphenole ist allerdings nicht erwünscht, da sie entscheidend zur sensorischen Qualität eines Fruchtsaftes beitragen (LEA 1992, BINNIG 1992). Besonders bei der Herstellung von klaren Säften und Getränken, bei denen es oft während der Lagerung zu unerwünschten, durch Polyphenole verursachten Nachtrübungen und –bräunungen kommen kann, sind Maßnahmen zur Stabilisierung, d.h. Reduzierung von Polyphenolen, unvermeidbar. Eine befriedigende Stabilität von klaren Säften und Getränken kann mit den klassischen Schönungsmitteln (Gelatine, Gelatine/Kieselsol, Bentonit) oder dem Entfernen des Trubes durch eine alleinige Ultrafiltration oft nicht erreicht werden (NAGEL und SCHOBINGER 1985). Zu den neueren Entwicklungen zur Reduzierung des Polyphenolgehaltes in Fruchtsäften gehören Adsorbentien wie PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) (VOGT 1987, FUSSNEGGER 1993) und spezielle Adsorberharze (COUTURE und ROUSEFF 1992, LAFLAMME und WEINAND 1993) und die gezielte Oxidation der Polyphenole mittels einer mikrobiell gewonnenen Laccase und anschließender

Ultrafiltration (CANTARELLI et al. 1989, DIETRICH et al. 1990). Die genannten Verfahren sind bisher rechtlich nicht zugelassen, aber ihre Zulassung wird diskutiert.

Über die Veränderungen der antioxidativen Kapazität von Fruchtsäften im Verlauf ihres Herstellungsprozesses und der Lagerung ist im Gegensatz zu den Veränderungen der Polyphenole (SPANOS und WROLSTAD 1990 a+b, SPANOS et al. 1990, SCHOLS et al. 1991, ROMMEL et al. 1992, SKREDE et al. 1992, BOYLES und WROLSTAD 1993, CEMEROGLU et al. 1994, EDER 1996a+c, IVERSEN 1999) kaum etwas bekannt. Es zeigt sich dabei eine starke Abhängigkeit der Gehalte und Zusammensetzung der Polyphenole im Fruchtsaft vom Herstellungsprozess. Die Lagerung führt immer zu einer Abnahme der monomeren Polyphenole im Fruchtsaft, die sehr stark von den Lagerbedingungen, vor allem der Temperatur, abhängt. Weitere den Polyphenolgehalt eines Fruchtsaftes beeinflussende Faktoren wurden ebenso untersucht. Dazu zählen Sortenunterschiede einer Frucht (HERRMANN 1973, PÉREZ-ILZARBE et al. 1991, SPANOS und WROLSTAD 1990a+b, SPANOS et al. 1990, BAKKER et al. 1994, DIETRICH et al. 1994, RITTER 1994, RITTER et al. 1996, PICINELLI et al. 1997) und die Reifung der Frucht (BURDA et al. 1990, LISTER et al. 1994, MAYR et al. 1996). Die umfassendsten Untersuchungen liegen über Apfelsaft vor, der mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 11,7 L 1998 der am häufigsten in Deutschland getrunkene Fruchtsaft ist (Quelle: VdF). Apfelsaft hat allerdings einen vergleichsweise geringen Polyphenolgehalt, so dass er auch eine geringe antioxidative Kapazität aufweist (MILLER und RICE-EVANS 1997, RECHNER et al. 1997, HENN und STEHLE 1998), wohingegen Säfte aus Beerenfrüchten mit einem hohen Polyphenolgehalt, wie schwarze Johannisbeeren, Holunderbeeren, Brombeeren, Erdbeeren (HERRMANN 1992, EDER 1996b, HÄKKINEN et al. 1997), als Quelle für antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe interessant sind (RECHNER et al. 1997, HEINONEN et al. 1998b).

Eine umfassende Betrachtung von Verarbeitungstechnik, Lagerung, Sorte und Reifezustand als Einflussfaktoren auf die antioxidative Kapazität eines Fruchtsaftes wurde bisher noch nicht vorgenommen. Im Hinblick auf die Erkenntnisse über die antioxidative und gesundheitlich positive Wirkung der Polyphenole sollte bei der Beurteilung dieser Einflussfaktoren nicht mehr nur eine hohe Saftqualität und –stabilität, sondern viel mehr auch ein hoher Gehalt an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen im Vordergrund stehen. Es geht also nicht mehr nur um eine Reduzierung der Polyphenole im Fruchtsaft, sondern um eine Optimierung ihres Gehaltes, so dass beide Ziele verwirklicht werden.

Ein Fruchtsaft mit einem hohen Polyphenolgehalt ist eine gute Quelle für antioxidativ wirksame Stoffe in der menschlichen Ernährung und kann daher wegen des hohen Gehaltes an bioaktiven Substanzen als ein „gesundes“ Produkt gelten.

1.2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch Stufenkontrollen bei der Herstellung von Fruchtsäften zu klären, welchen Einfluss klassische und moderne Verfahrenstechnologien auf die antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe von Apfel- und Beerensäften haben. Neben der Verfahrenstechnik der Fruchtsaftherstellung werden der Einfluss der Sorte, des Reifeszustandes und der Lagerung auf die antioxidative Kapazität im Fruchtsaft untersucht. Die wichtigsten antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe in Apfel- und Beerensäften sind die Polyphenole und bei einigen Beerensäften die L-Ascorbinsäure, vor allem beim schwarzen Johannisbeersaft. Die beiden hauptsächlich untersuchten Fruchtsäfte Apfel- und schwarzer Johannisbeersaft werden exemplarisch ausgewählt, da sie sich deutlich im Spektrum und Gehalt der Polyphenole sowie im L-Ascorbinsäuregehalt und im Herstellungsprozess unterscheiden. Weiterhin werden Stufenkontrollen bei der Herstellung von Holunder-, Brombeer-, Stachelbeer- und Sauerkirschsafte sowie bei der Herstellung von Fruchtweinen vorgenommen und die Veränderung von antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen bei der Reifung von Erdbeeren untersucht.

Um das Produktziel einer hohen antioxidativen Kapazität bei hoher Produktqualität und -stabilität in den Säften zu erreichen, wird die Verfahrenstechnik zur Herstellung von Fruchtsäften auf die Beeinflussung des Polyphenolgehaltes in den Säften untersucht. Die Beurteilung der Prozessstufen bei der Herstellung von Fruchtsäften und der Behandlungsmaßnahmen zur Stabilisierung und Qualitätsverbesserung der Fruchtsäfte wird aus einem neuen Sichtwinkel erfolgen. Dabei wird nicht mehr wie bisher üblich die Reduzierung der Polyphenole als Qualitätsverbesserung angesehen, sondern ein unter Berücksichtigung von Saftqualität und -stabilität möglichst hoher Polyphenolgehalt, ein "optimierter" Polyphenolgehalt, angestrebt. Ein geringer Polyphenolgehalt oder eine zu starke Reduzierung des Polyphenolgehaltes durch verfahrenstechnische Maßnahmen wird daher als negativ betrachtet. Die in der Theorie proklamierte hohe Zufuhr von Polyphenolen durch die Ernährung wird für Fruchtsäfte durch die Optimierung von Polyphenolgehalt und Qualität auf die Praxis der Fruchtsaftherstellung übertragen. Basierend auf den Ergebnissen werden Empfehlungen für die Herstellung von Apfel- und Beerensäften mit hoher antioxidativer Kapazität ausgesprochen, um unter dem gesundheitlichen Aspekt verbesserte Fruchtsäfte und neuartige Getränke mit einer hohen antioxidativen Kapazität entwickeln zu können. Solche Fruchtsäfte mit hoher antioxidativer Kapazität werden im Rahmen eines AIF-Projektes, in dem diese Arbeit eingebunden ist, als Grundlage für Studien über die Bioverfügbarkeit und Wirkung von Polyphenolen im Menschen verwendet, um damit den Weg der Polyphenole von der Frucht über den Fruchtsaft bis in den Menschen zu verfolgen und die gesundheitliche Relevanz von Fruchtsaft zu beweisen.

Zur detaillierten analytischen Beurteilung der Polyphenole bei den Stufenkontrollen wird aufgrund des Fehlens geeigneter und befriedigender Methoden eine neue HPLC-Methode zur gleichzeitigen und empfindlichen Analyse von farblosen Polyphenolen und farbigen Anthocyanen entwickelt.

Zur Quantifizierung einiger Hauptpolyphenole in Apfel- und schwarzen Johannisbeersaft, die kommerziell nicht erhältlich sind, werden präparative Verfahren zu deren Gewinnung als Reinsubstanz aus Äpfeln und schwarzen Johannisbeeren entwickelt. Die isolierten Standardsubstanzen werden ebenfalls für Bioverfügbarkeitsstudien verwendet.

Zur schnellen Beurteilung der Veränderung der antioxidativen Kapazität bei der Stufenkontrollen im Verlauf der Herstellung von Fruchtsäften wird eine einfache und schnelle Bestimmungsmethode für diesen Parameter basierend auf der bereits von MILLER et al. 1993 publizierten Methode für die Anforderungen des Projektes modifiziert.

2. Grundlagen

2.1. Polyphenole

2.1.1. Allgemeine Klassifizierung der Polyphenole

Phenolische Verbindungen sind im Pflanzenreich weit verbreitete Inhaltsstoffe. Ihnen werden alle Verbindungen zugeordnet, die sich in ihrer chemischen Struktur auf das Phenol zurückführen lassen. Die phenolischen Verbindungen zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, da sie nicht im Primärstoffwechsel der Pflanze gebildet und verbraucht werden. Ihre genauen Funktionen in der Pflanze sind noch Gegenstand der Forschung, wobei Schutz gegen Pilz- und Bakterieninfektionen, Regelung des pflanzlichen Hormonhaushaltes und die Verwendung als Signalsubstanz bewiesen sind (MATERN und GRIMMIG 1993, RHODES 1998). In vielen Obstarten tragen sie zu Geschmack und Aussehen bei und prägen daher auch wesentlich den Charakter von Fruchtsäften und -weinen. Sie bestimmen maßgeblich deren Farbe, Geschmack und Stabilität und damit auch letztendlich ihre Qualität. Heute werden für die phenolischen Verbindungen der Pflanzen in Wissenschaftskreisen die verwandten Bezeichnungen „Pflanzenphenole“, „Polyphenole“ oder kurz „Phenole“ verwendet.

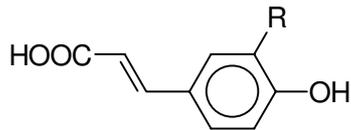
Die wichtigsten Polyphenole in Früchten kann man in drei Gruppen einteilen:

- **Phenolcarbonsäuren und ihre Derivate („Nichtflavonoide“)**
- **Flavonoide**
- **Niedermolekulare Phenole**

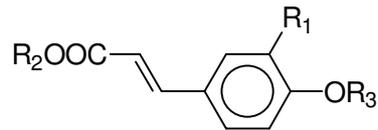
Auf die niedermolekularen, meist flüchtigen Phenole, die zum Teil wichtige Aromastoffe sind, wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Die Polyphenole lassen sich anhand ihres molekularen Aufbaus einteilen. Hydroxybenzoesäure-Verbindungen haben einen C_1-C_6 -Grundkörper, die Hydroxymitsäure-Verbindungen einen C_3-C_6 -Grundkörper und die Flavonoide einen $C_6-C_3-C_6$ -Grundkörper. Daher lassen sich die Phenolcarbonsäuren weiter in die Hydroxymitsäure- und Hydroxybenzoesäure-Verbindungen unterteilen.

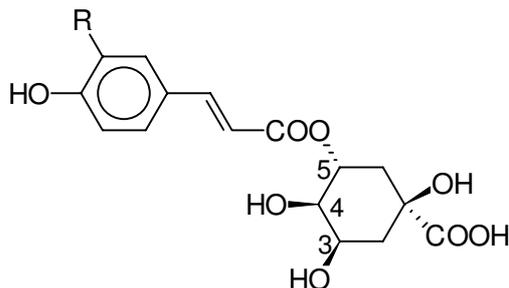
In Abbildung 1 sind die Strukturen der wichtigsten **Hydroxymitsäure-Verbindungen** in Früchten dargestellt. Als Hydroxymitsäure-Verbindungen kommen hauptsächlich die p-Coumarinsäure, die Kaffeesäure und Ferulasäure vor, die in Pflanzen üblicherweise in gebundener Form vorliegen. Bei der Biosynthese wird die Carboxylgruppe der Hydroxymitsäuren mit Alkoholen, Kohlenhydraten, Hydroxycarbonsäuren und anderen Phenolen verestert oder mit Aminen zu Amiden umgesetzt. Die freien Säuren entstehen erst während der Verarbeitung der Frucht durch enzymatische oder nicht enzymatische Hydrolyse der Esterbindung. Die Chlorogensäure, ein Ester aus Kaffeesäure und L-Chinasäure, und ihre beiden Stellungsisomere, die Neochlorogensäure und die Kryptochlorogensäure, sind die am weitesten verbreiteten Hydroxymitsäure-Verbindungen in Früchten. Im Apfelsaft beispielsweise stellt die Chlorogensäure das wichtigste monomere Polyphenol dar. Zudem kommen Ester der Hydroxymitsäuren mit Äpfelsäure (Birnen), Weinsäure (Trauben), Shikimisäure (Palmen) und Zuckersäuren (Citrusfrüchte) vor. Seltener sind Glykoside der Hydroxymitsäuren, bei denen eine glykosidische Bindung zwischen einem Zucker, meist D-Glucose, und einer der phenolischen Hydroxylgruppen vorliegt (SCHUSTER und HERRMANN 1985).



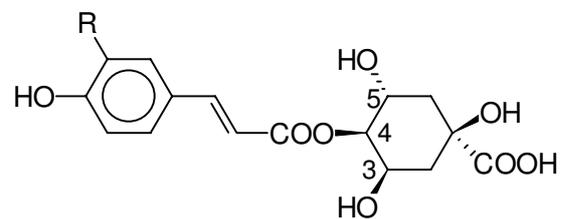
p-Coumarsäure (R = H)
 Kaffeesäure (R = OH)
 Ferulasäure (R = OCH₃)



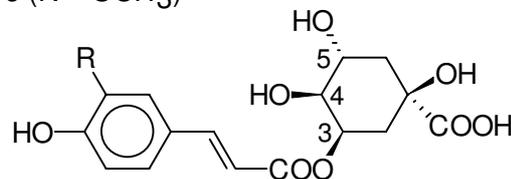
p-Coumaroylglucose (R₁ = H ; R₂ = D-Glucose ; R₃ = H)
 Caffeoylglucose (R₁ = OH ; R₂ = D-Glucose ; R₃ = H)
 Feruloylglucose (R₁ = OCH₃ ; R₂ = D-Glucose ; R₃ = H)
 p-Coumarsäureglucosid (R₁ = H ; R₂ = H ; R₃ = D-Glucose)
 Kaffeesäure-4-glucosid (R₁ = OH ; R₂ = H ; R₃ = D-Glucose)
 Ferulasäureglucosid (R₁ = OCH₃ ; R₂ = H ; R₃ = D-Glucose)



5-p-Coumaroyl-L-(-)-chinasäure (R = H)
 5-p-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure (R = OH)
 "Chlorogensäure"
 5-Feruloyl-L-(-)-chinasäure (R = OCH₃)



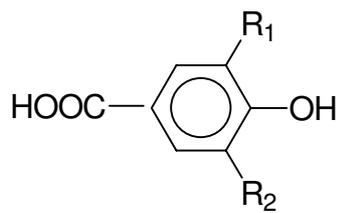
4-p-Coumaroyl-L-(-)-chinasäure (R = H)
 4-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure (R = OH)
 "Kryptochlorogensäure"
 4-Feruloyl-L-(-)-chinasäure (R = OCH₃)



3-p-Coumaroyl-L-(-)-chinasäure (R = H)
 3-p-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure (R = OH)
 "Neochlorogensäure"
 3-Feruloyl-L-(-)-chinasäure (R = OCH₃)

Abbildung 1: Struktur der wichtigsten Hydroxycimtsäuren und -derivate in Früchten

Hydroxybenzoesäure-Verbindungen kommen in Früchten im Gegensatz zu den Hydroxycimtsäure-Verbindungen, wenn überhaupt, nur in geringen Konzentrationen vor (meist < 1 mg/kg), z. B. in Beerenfrüchten, und liegen meist als freie Säuren vor. Die Ellagsäure, das Dilacton der Hexahydroxydiphensäure, das sich im Prinzip aus zwei Molekülen Gallussäure zusammensetzt, hat in einigen Beerenfrüchten, vor allem der Familie der Rosaceae, einen großen Anteil am Polyphenolgehalt (HÄKKINEN et al. 1997). In Abbildung 2 sind die Strukturen der wichtigsten Hydroxybenzoesäure-Verbindungen in Früchten dargestellt.

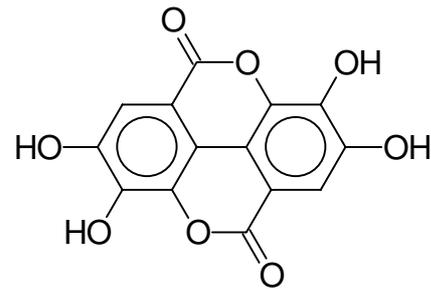


p-Hydroxybenzoesäure ($R_1 = H$; $R_2 = H$)

Protocatechusäure ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)

Vanillinsäure ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$)

Gallussäure ($R_1 = OH$; $R_2 = OH$)



Ellagsäure

Abbildung 2: Die Strukturen der wichtigsten Hydroxybenzoesäure-Verbindungen in Früchten

Die **Flavonoide** haben die größte Bedeutung unter den Polyphenolen in Pflanzen. Sie leiten sich strukturell vom Flavan (2-Phenyl-benzo-dihydropyran) ab. Bisher wurden über 4000 Verbindungen von Flavonoiden aus Pflanzen isoliert und identifiziert. Aufgrund unterschiedlicher Grundstrukturen ist es sinnvoll und notwendig, eine weitere Unterteilung dieser Gruppe vorzunehmen. Die wichtigsten Untergruppen und ihre Vertreter in Früchten sind (HERRMANN 1992, BELITZ und GROSCH 1992):

Anthocyanidine

Pelargonidin, Delphinidin, Cyanidin, Päonidin, Petunidin, Malvidin

Flavone

Apigenin, Luteolin, Chrysoeriol, Tricin

Flavonole

Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin

Flavanone

Naringin, Hesperitin

Dihydrochalkone

Phloretin

Flavan-3-ole (Catechine)

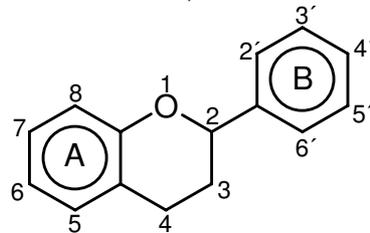
(+)-Catechin, (-)-Epicatechin, (+)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechin-3-O-gallat

Proanthocyanidine

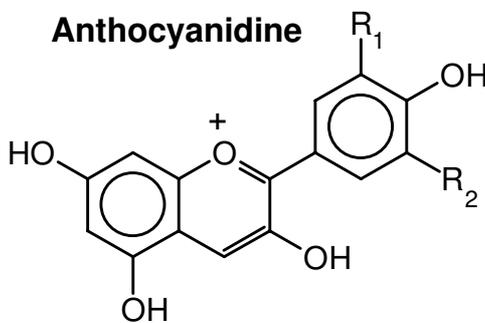
Procyanidine ($B_1 - B_4$)

In Abbildung 3 und 4 sind die Strukturen der wichtigsten Flavonoide in Früchten dargestellt. Auf die Gruppe der **Flavone** und **Flavanone** soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie in Kern-, Beeren- und Steinobst nicht vorkommen (HERRMANN 1992). Die **Anthocyanidine** kommen in Pflanzen nur glykosidisch an verschiedenen Zuckern gebunden vor. Die Glykoside der Anthocyanidine, die **Anthocyanine**, liegen bei pH-Werten < 4 teilweise und bei einem pH-Wert < 1 vollständig als Benzopyrylium- oder Flavyliumkationen vor, die eine rote, blaue oder violette Farbe aufweisen. Sie kommen in vielen heimischen Obstarten, speziell in einigen Beerenfrüchten und auch Südfrüchten, teils in beträchtlichen Mengen vor und sind für die Farbe dieser Früchte verantwortlich. Die häufigsten Zuckerreste, bevorzugt am C3-Atom über eine Sauerstoffbrücke gebunden, sind die Glucose, die Galaktose, die Rhamnose und die Arabinose, wobei Di- und Trisaccharide, die aus Kombinationen dieser vier Zucker bestehen, ebenfalls oft gefunden werden. In Abhängigkeit vom pH-Wert treten bei den Anthocyanen starke Farbveränderungen auf. Das

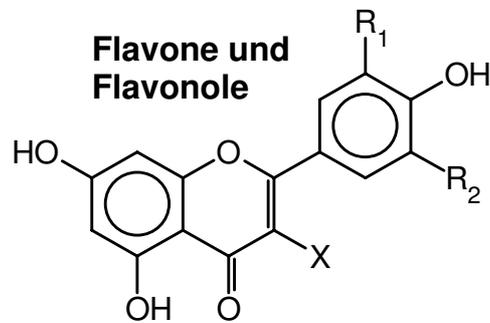
Flavyliumkation ist nur bei sehr niedrigen pH-Werten stabil. Mit steigendem pH-Wert geht es zunehmend durch Anlagerung eines Hydroxid-Anions an das C2-Atom (siehe Abbildung 3) in die farblose Carbinolbase über. Bei den physiologischen pH-Werten der Früchte besteht ein Gleichgewicht der Anthocyane zwischen farbigem Flavyliumkation und farbloser Carbinolbase. Je tiefer der pH-Wert ist, um so mehr liegt das Gleichgewicht auf Seite des Flavyliumkations. Bei höheren pH-Werten > 6 kommt es zur Bildung der chinoiden Form bzw. ionischen Anhydrobase durch Abspaltung von Wasser wieder zu einer Farbvertiefung. Bei pH-Werten > 7 kann die ionische Anhydrobase durch Ringöffnung in das gelbe Chalkon übergehen (MAZZA und MINIATI 1993).



Flavan-Grundkörper



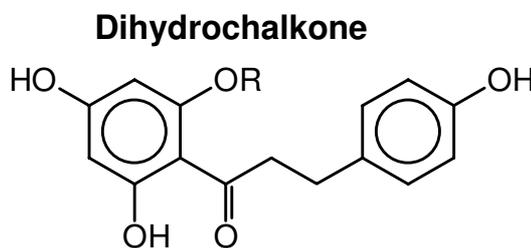
- Pelargonidin ($R_1 = H$; $R_2 = H$)
- Cyanidin ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)
- Delphinidin ($R_1 = OH$; $R_2 = OH$)
- Päonidin ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$)
- Petunidin ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$)
- Malvidin ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCH_3$)



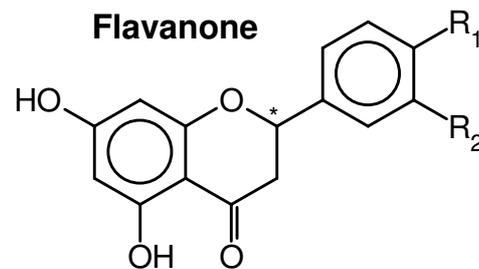
X = H: Flavon X = OH: Flavonol

- Flavone:
- Apigenin ($R_1 = H$; $R_2 = H$)
 - Luteolin ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)
 - Chrysoeriol ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$)
 - Tricin ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCH_3$)

- Flavonole:
- Kaempferol ($R_1 = H$; $R_2 = H$)
 - Quercetin ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)
 - Myricetin ($R_1 = OH$; $R_2 = OH$)
 - Isorhamnetin ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$)



- Phloretin ($R = H$)
- Phloridzin ($R = \beta$ -D-Glucopyranosid)
- Phloretin-2'-xyloglucosid
($R = \beta$ -D-Glucopyranosyl- β -D-Xylopyranosid)



- Naringenin ($R_1 = OH$; $R_2 = H$)
- Hesperetin ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$)

Abbildung 3: Teil 1: Strukturen der wichtigsten Flavonoide in Früchten

Flavonole kommen in vielen heimischen Obstarten meist als Glykoside vor. Wie bei den Anthocyanen ist das C3-Atom der bevorzugte Bindungsort für die Sauerstoffbrücke. Die häufigsten Zuckerreste sind die Glucose und die Galaktose sowie das Disaccharid Rutinose (Rhamnosyl-(1-6)-glucosid), während Rhamnose, Arabinose, Xylose und die Zuckersäure Glucuronsäure weniger häufiger sind. Die Bildung der hellgelben Flavonolglykoside ist von der Lichtzufuhr abhängig (HERRMANN 1976), so dass es nicht erstaunt, dass diese Substanzgruppe hauptsächlich in der Schale von Früchten vorgefunden wird. Das wichtigste Aglykon der Flavonole in Früchten ist das Quercetin.

Seltener in Früchten zu finden sind die schwach gelben **Dihydrochalkone**. Eine Ausnahme ist der Apfel, für den die Phloretin-glykoside Phloridzin (Phloretin-2'- β -glucosid) und Phloretin-2'-xyloglucosid charakteristisch sind und zum Nachweis von Apfelprodukten verwendet werden (WALD und GALENSA 1989). Die **Flavan-3-ole** kommen in allen heimischen Früchten vor. Das Diastereomerenpaar (+)-Catechin (2R, 3S) und (-)-Epicatechin (2R, 3R) sind die wichtigsten monomeren Flavan-3-ole, während (+)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin und deren O-3-Gallate weniger häufig sind (chemische Strukturen in Abbildung 4).

Die **Proanthocyanidine** sind Dimere, Oligomere und Polymere der Flavan-3-ole, die durch enzymatische oder chemische Kondensation der Flavan-3-ol-Grundeinheiten entstehen. Die chemischen Strukturen sind in Abbildung 4 dargestellt. Als „kondensierte Gerbstoffe“ tragen sie zum adstringierenden Geschmack von Früchten bei. Bei geringem Polymerisationsgrad sind sie farblos und haben einen bitteren Geschmack, erst bei höherem Polymerisationsgrad entsteht eine gelbliche bis braune Farbe und der adstringierende Geschmack tritt auf (LEA und ARNOLD 1978). Reine Catechin-/Epicatechin-Kondensate werden als **Procyanidine** bezeichnet und sind die verbreitetste Gruppe der Proanthocyanidine, aber auch Prodelphinidine (Gallocatechin-/Epigallocatechin-Kondensate) kommen vor. Bis zu einem Molekulargewicht von etwa 7000 Dalton, entsprechend ca. 20 Flavan-3-ol-Einheiten, sind die Proanthocyanidine im wässrigen Medium löslich. Pflanzengewebe enthalten auch unlösliche, höher polymere Formen, die vielfach sogar den überwiegenden Teil der pflanzlichen Proanthocyanidine darstellen und kovalent an die Polysaccharidmatrix der Zelle gebunden sein können. Die Proanthocyanidinmoleküle sind meist über eine 4- β -8- oder 4- β -6-Interflavanverknüpfung gekoppelt. Obwohl das 4-verknüpfte Proanthocyanidinmolekül drei chirale Zentren im heterocyclischen Ring besitzt, ist die Position 2 ausschließlich R-konfiguriert und die Position 4 scheint immer trans-ständig zur Hydroxylgruppe am C3-Atom zu sein (HEMINGWAY 1989). Die beiden Verknüpfungsmöglichkeiten der Proanthocyanidine sind in Abbildung 4 dargestellt. Der Name Proanthocyanidine, früher auch Leucoanthocyanidine, besagt, dass es sich um farblose Vorstufen der Anthocyanidine handelt, da aus den Proanthocyanidinen beim Erhitzen in saurer Lösung unter Spaltung der Interflavan-Verknüpfung und Freisetzung der Flavaneinheiten als Carbokation und dessen anschließende Oxidation durch Luftsauerstoff farbige Anthocyanidine entstehen. Als Leucoanthocyanidine werden heute die biosynthetischen Vorstufen der Anthocyane, die Flavan-3,4-diole, bezeichnet (LEA 1979).

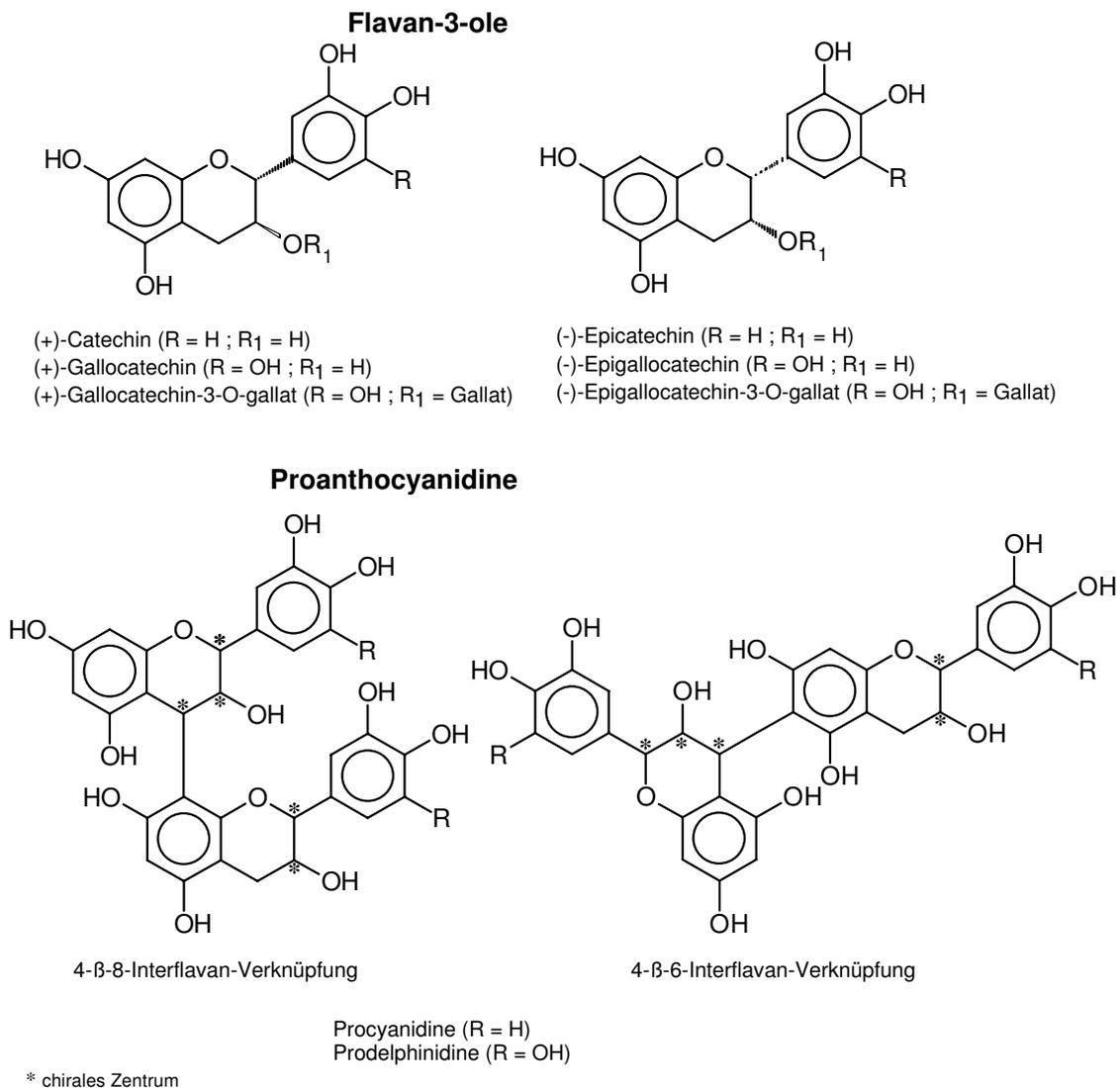


Abbildung 4: Teil 2: Strukturen der wichtigsten Flavonoide in Früchten

2.1.2. Biosynthese der Polyphenole

Alle Precursoren der Biosynthese der Polyphenole entstammen dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Die Biosynthese der aromatischen Verbindungen in der Pflanze setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Segmenten zusammen: Das Shikimisäure-Segment, das die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan produziert, das Phenylpropanoid-Segment, das die Hydroxyzimtsäurederivate produziert, die Precursoren für die Flavonoide und die Strukturkomponente Lignin, sowie das Flavonoid-Segment, das diverse Flavonoide produziert.

Die Biosynthese der Polyphenole ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Die Shikimisäure entsteht durch enzymatische Synthese aus den vom Kohlenhydrat-Stoffwechsel stammenden Vorstufen Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat über die Zwischenstufen 3-Desoxyarabinoheptulosonat-Phosphat, Dehydrochinasäure und Dehydroshikimisäure. Im Shikimisäure-Segment führt der Syntheseweg über Shikimisäure-Phosphat, Enolpyruvylshikimat-Phosphat zu Chorismat, aus dem auch die Aminosäure Tryptophan gebildet wird, weiter über Prephenat zu Arogenat, aus dem die beiden Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin entstehen. Durch Katalyse der Phenylalanin-Amino-Lyase entsteht aus dem Phenylalanin die Zimtsäure, aus der nach enzymatischer Hydroxylierung die p-Coumarsäure gebildet wird. Die p-Coumarsäure kann durch

fortschreitende Hydroxylierung und Methylierung in Kaffeesäure, aus der weiter Lignin, ein wichtiger Bestandteil von Holz, synthetisiert werden kann, und Ferulasäure umgewandelt werden.

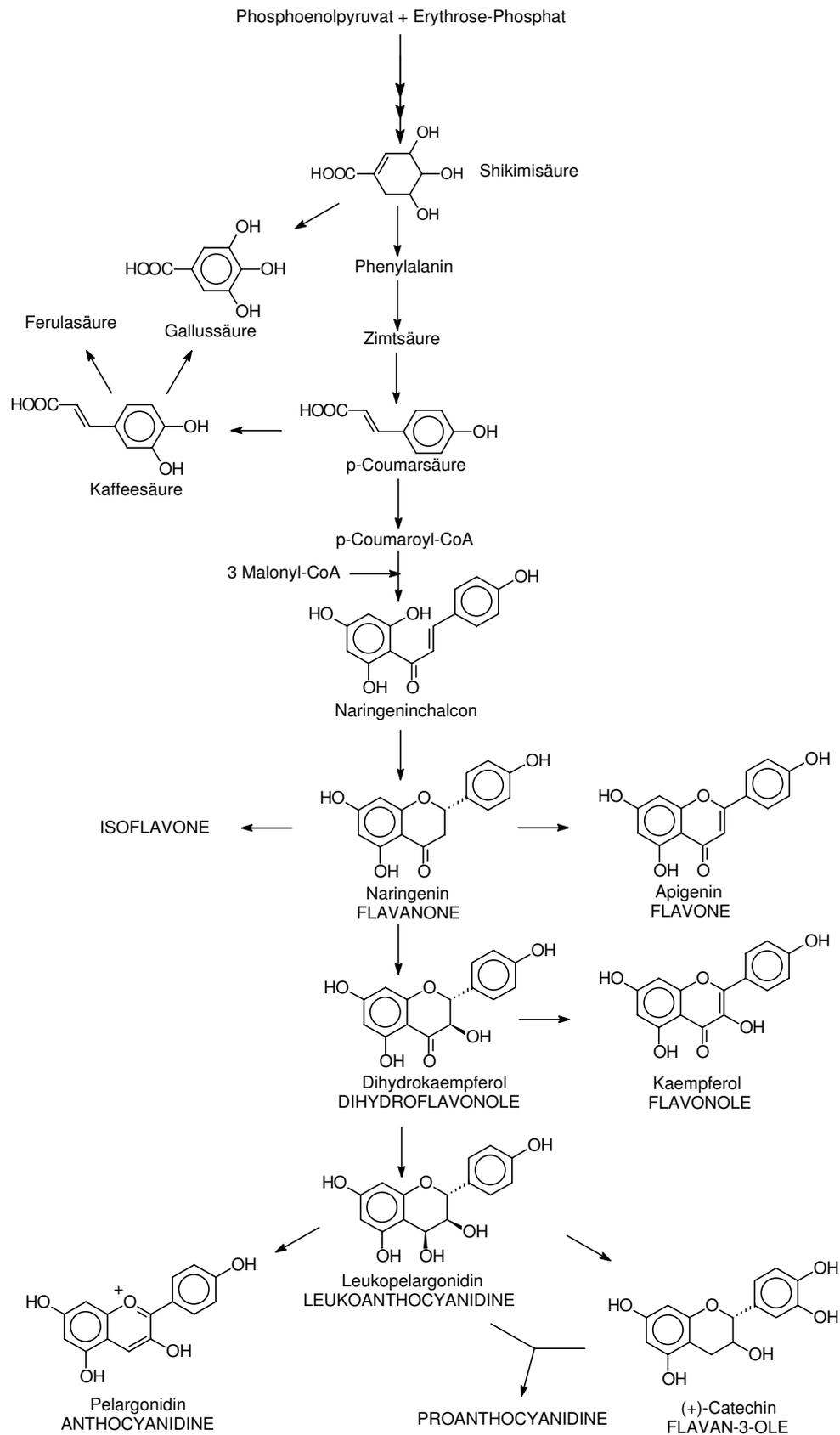


Abbildung 5: Biosynthesewege der Polyphenole in Pflanzen

Die an Coenzym A gebundene p-Coumarsäure (p-Coumarsäure-CoA) kann durch eine von der Chalcon-Synthase katalysierten Reaktion mit Malonyl-CoA zum Naringenin-chalcon, dem 4,2',4',6'-Tetrahydrochalcon, weiterreagieren. Dies stellt nun das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst dar, von dem sich alle Flavanoide ableiten. Nach Ringschluss durch die Chalcon-Isomerase entsteht das Naringenin, von dem sich die Flavone, Isoflavone und das Dihydrokaempferol ableiten. Das Dihydrokaempferol kann durch Katalyse der Flavonol-Synthase, die eine Doppelbindung zwischen C2-Atom und C3-Atom ausbildet, in ein Flavonol, in diesem Fall das Kaempferol, umgewandelt werden oder durch katalytische Reduktion der Dihydroflavonol-Reduktase zu einem Flavan-3,4-diol (Leucoanthocyanidin) umgewandelt werden. Die Flavan-3,4-diole werden als kurzlebige Vorstufen der Anthocyane und Flavan-3-ole sowie deren Kondensationsprodukten, den Proanthocyanidinen, angesehen. Die Synthese der Anthocyane, der Flavan-3-ole und der Proanthocyanidine ist bisher im Detail noch nicht geklärt. Ein Zusammenspiel verschiedener Enzyme ist wahrscheinlich (FORKMANN 1993). Bei den Flavan-3-olen wird die Bildung eines Carbokations durch Entfernung der Hydroxylgruppe am C4-Atom als Hydroxid-Anion angenommen, das dann zum Flavan-3-ol reduziert wird. Wenn das Reduktans, z.B. NADPH, limitiert ist, kann das Kation mit Flavan-3-olen zu Dimeren und höheren Oligo- und Polymeren, den Proanthocyanidinen, reagieren (BELITZ und GROSCH 1992). Die Einführung der Hydroxylgruppen am B-Ring der Flavonoide wird von Hydroxylasen katalysiert, wobei der Zeitpunkt noch nicht genau geklärt ist. Die Bildung von Glykosiden erfolgt in der Pflanze meist erst sekundär (HARBORNE 1988). Die Hydroxybenzoesäuren werden in Pflanzen aus den entsprechenden Hydroxyzimtsäuren gebildet, in dem ein Acetatrest nach Oxidation der Seitenkette der Hydroxyzimtsäuren entfernt wird. Über den genauen Mechanismus wird noch diskutiert (GROSS 1992).

2.1.3. Reaktionen der Polyphenole

Die Polyphenole und vor allem ihre Oxidationsprodukte, die Chinone, gehören zu den reaktivsten Inhaltsstoffen in Früchten und deren Produkten. Sie vermögen mit anderen Stoffgruppen, wie Proteinen und Kohlenhydraten, und innerhalb der eigenen Stoffgruppe mannigfaltige Reaktionen einzugehen. Während der gesamten Dauer der Getränkeherstellung, wie auch später während der Lagerung, unterliegen die Polyphenole durch enzymatische und nicht enzymatische Reaktionen ständigen Veränderungen (MACHEIX et al. 1990, SPANOS und WROLSTAD 1990a, SPANOS et al. 1990). Von der Zerstörung der Zellen durch Mahlen und Entsaften an und der damit verbundenen Freisetzung der Polyphenole stellen sie potentielle Reaktionspartner für andere Saftinhaltsstoffe dar, was die Qualität des Produktes beeinflussen kann. Daher unterscheidet sich die Zusammensetzung der Polyphenole von Fruchtsäften immer von der Zusammensetzung in den Früchten, aus denen sie hergestellt wurden. Diese Veränderungen der Polyphenole in Fruchtsäften beeinflussen nicht nur die Qualität des Produktes, sondern sicherlich auch ihre biologischen Eigenschaften, wie die Bioverfügbarkeit und die antioxidative Kapazität. Die ortho-Chinone sind die wichtigsten Reaktionszwischenstufen der Polyphenole und vermögen sowohl mit Polyphenolen als auch mit anderen organischen Saftinhaltsstoffen zu reagieren, wie in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

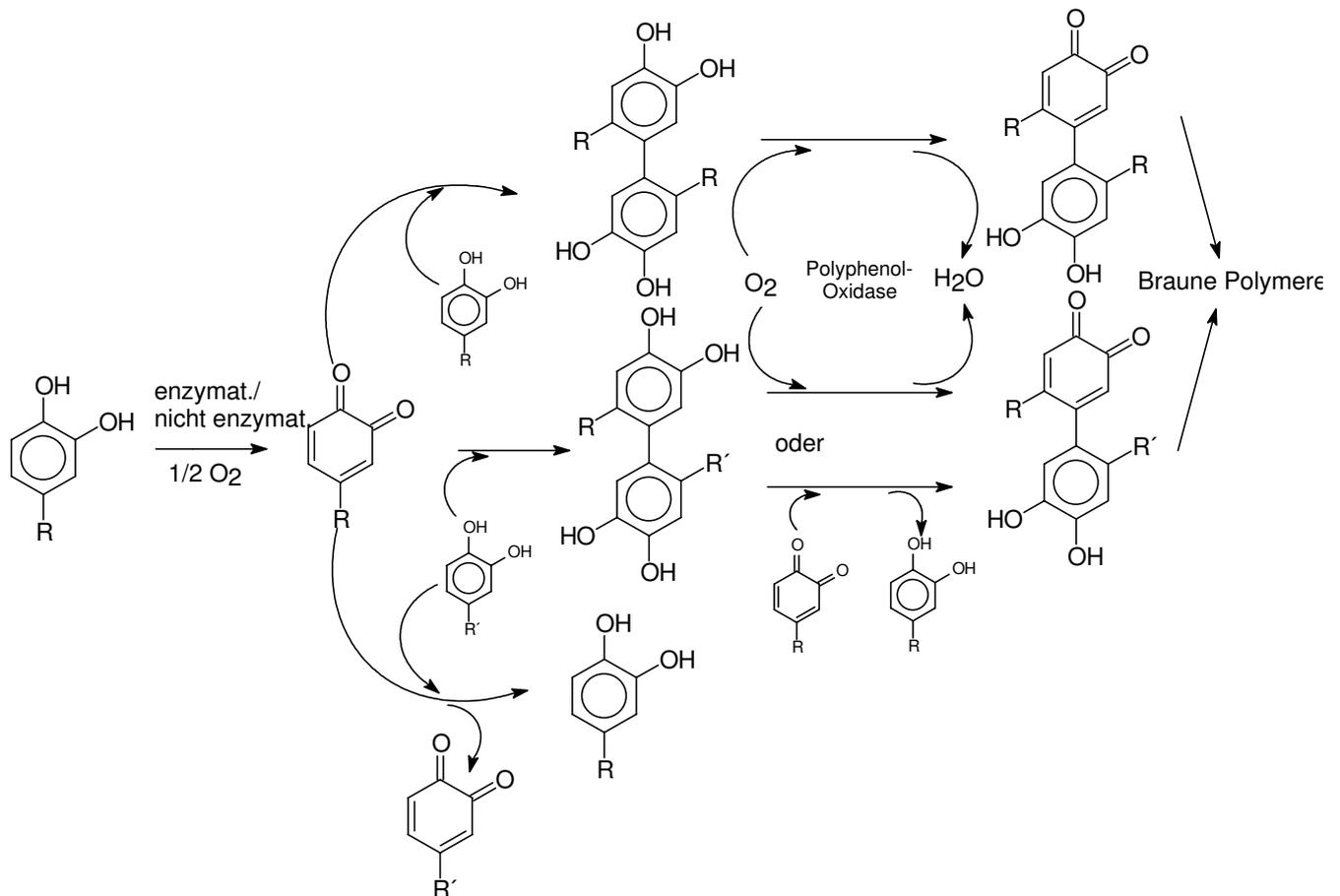


Abbildung 6: Reaktionen von o-Chinonen mit Polyphenolen

Die enzymatische oder nicht enzymatische Bildung des o-Chinons ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt aller nachfolgenden Reaktionen. Enzyme, die Polyphenole zu oxidieren vermögen, werden als Polyphenoloxidasen (PPO) bezeichnet. Die Reaktionen der dargestellten primären Reaktionsprodukte sind aufgrund der Vielfalt sehr komplex, führen aber häufig zu höheren Polymeren mit brauner Farbe. Die wichtigsten Reaktionen der Polyphenole können daher wie folgt eingeteilt werden.

- **Enzymatische Oxidation** (Mostoxidation)
- **Nichtenzymatische Reaktionen** (Kondensation, Polymerisation)
- **Polyphenol-Protein Bindung**
- **Polyphenol-Polysaccharid Bindung**

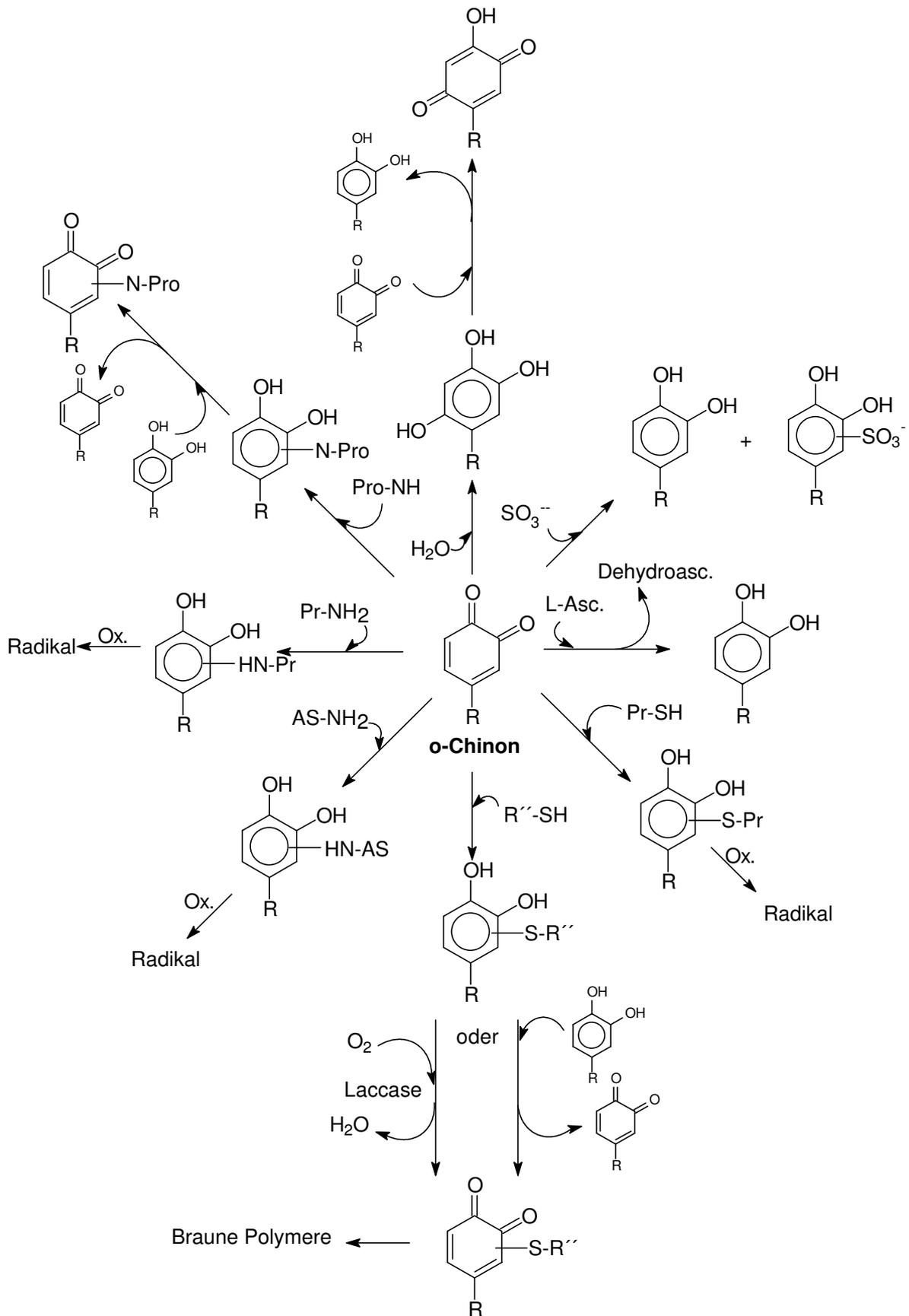


Abbildung 7: Reaktionen von o-Chinonen mit verschiedenen Substanzen (L-Asc. = L-Ascorbinsäure, Dehydroasc. = Dehydroascorbinsäure, AS-NH₂ = Aminosäure, Pr-NH₂ und Pr-SH = Protein, Pro-NH = Prolin, R''-SH = z.B. Cystein, Glutathion, Ox. = weitere Oxidation)

Enzymatische Oxidation

Die Mostoxidation umfasst sowohl enzymatische (katalysiert durch PPO's wie Laccase oder Tyrosinase) als auch nicht enzymatische Redoxreaktionen (Abbildung 6). Die Startreaktion ist immer die durch Enzyme katalysierte Oxidation zum o-Chinon, während die Reaktionen, die schließlich zur Bildung von braunen Pigmenten führen, hauptsächlich nichtenzymatischer Natur sind. Die Mostoxidation ist die Hauptursache der Abnahme des Gehaltes an Polyphenolen während der Herstellung eines Fruchtsaftes. Die tätigen Enzyme weisen dabei eine besonders hohe Affinität zu Hydroxymethylsäureverbindungen, vor allem Kaffeesäure-Verbindungen, auf, während die Flavonoide weniger schneller umgesetzt werden (CHEYNIER et al. 1988, 1991). Procyanidine sind schlechte Substrate für Polyphenoloxidasen. Neben der Oxidation von o-Diphenolen zu o-Chinonen können Polyphenoloxidasen auch die Hydroxylierung eines Monophenols, wie Coumarsäurederivate, Phloretinderivate, Pelargonidinderivate usw., zu einem o-Diphenol katalysieren. Durch diese Reaktionen entsteht beispielsweise im Apfelsaft 3-Hydroxyphloridzin, das in der Apfelfrucht nicht vorkommt und durch die Hydroxylierung von Phloridzin im Saft gebildet wird, wie in Abbildung 8 gezeigt (GOODENOUGH et al. 1983).

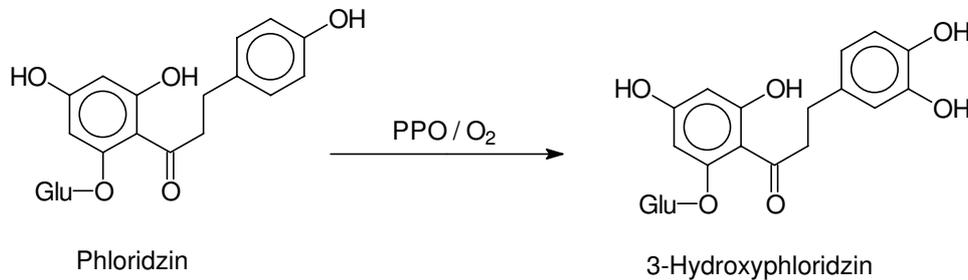


Abbildung 8: Entstehung von 3-Hydroxyphloridzin in Apfelsaft durch Katalyse einer Tyrosinase

Polyphenoloxidasen aus verschiedenen Früchten weisen meist auch verschieden ausgeprägte Aktivitäten (Oxidation, Hydroxylierung) und Substratspezifitäten auf. Zudem unterscheiden sich verschiedene Früchte, wie auch verschiedene Sorten einer Frucht, in ihrer relativen Polyphenoloxidase-Aktivität, was sich beim Fruchtsaftherstellungsprozess in der Geschwindigkeit der Bräunung des Saftes und des Abbaus von Polyphenolen im Saft widerspiegelt.

Der limitierende Faktor einer enzymatischen Oxidation unter praktischen Bedingungen ist bei ausreichender Enzymaktivität und Polyphenolgehalt die Sauerstoffkonzentration und die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs in der Lösung.

Gekoppelte Oxidation

Das Chinon ist ein starkes Oxidans und kann durch in Säften vorkommende Reduktionsmittel, wie L-Ascorbinsäure oder andere Reduktone, wieder reduziert werden. Sind diese allerdings verbraucht oder nur in geringer Konzentration vorhanden, besteht die Möglichkeit, mit einem anderen o- oder p-Diphenol („Gekoppelte Oxidation“) zu reagieren (Abbildung 6). Durch diese Reaktion können auch Polyphenole, die keine oder schlechte Substrate für Polyphenoloxidasen sind, wie beispielsweise Procyanidine, oxidiert werden. Die gekoppelte Oxidation zwischen Chinonen und Phenolen läuft ohne die Katalyse von Enzymen und ohne Sauerstoff ab. Daher unterliegen beim Herstellungsprozess von Fruchtsaft alle Polyphenole enzymatischen und nicht enzymatischen Oxidationsprozessen, die ihren Gehalt im Saft entsprechend der Ausprägung der Oxidationsprozesse, insbesondere der enzymatischen Oxidation, verändern.

Kondensationsreaktionen

Des Weiteren kann ein Chinon mit anderen Polyphenolen, mit Proteinen, einzelnen Aminosäuren, mit Glutathion oder mit Polysacchariden reagieren und Kondensationsprodukte bilden (Abbildung 7). Dabei kommt es zur Ausbildung einer irreversiblen, kovalenten Bindung, so dass ein neues Molekül entsteht. Durch die Fortsetzung von Oxidation und Kondensation können so größere Moleküle entstehen, deren Löslichkeit mit höherem Kondensationsgrad sinkt und die eine braune Farbe aufweisen. Bei hinreichend großen Kondensationsprodukten führt dies im Fruchtsaft zur Ausscheidung als Pigmente (MOUTOUNET et al. 1990).

Copigmentierung von Anthocyanen

Intermolekulare Copigmentierung von Anthocyanen mit anderen Polyphenolen verursacht einen Anstieg der Farbintensität (hyperchromer Effekt) und eine Verschiebung des Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt), was zu violetter bis blauer Farbe führt. Viele Moleküle, wie Polyphenole, Alkaloide, Aminosäuren, organische Säuren etc. und die Anthocyane selbst, besitzen die Fähigkeit, als Copigment mit Anthocyanen zu interagieren, wobei bisher nur wenige Substanzen detaillierter untersucht wurden (MAZZA und BROUILLARD 1990). Das Copigment verschiebt durch die intermolekulare Interaktion mit der farbigen Form des Anthocyan, dem Flavyliumkation, das Gleichgewicht zwischen diesem und der durch Wassereinlagerung entstehenden farblosen Carbinolbase mehr auf die Seite des Flavyliumkations. Die Stärke des Copigmentierungseffektes hängt von der Art und Konzentration des Anthocyan, Art und Konzentration des Copigments sowie dem pH-Wert und der Temperatur des Lösungsmittels ab. So führt beispielsweise eine Erhöhung der Konzentration des Copigments in einem roten Fruchtsaft zu einer Farbintensivierung (WILSKA-JESZKA und KORZUCHOWSKA 1996). Der Copigmentierungseffekt findet nicht nur in den Pflanzenzellen selbst statt, sondern auch in Produkten wie Säften und Weinen, wo sie zur Stabilisierung der Anthocyane beitragen (MAZZA und BROUILLARD 1987).

Alterung von Polyphenolen bei der Lagerung von Fruchtsaft

Die Veränderungen der Polyphenole während der Lagerung von Fruchtsaft sind von Interesse, da die empfohlene Mindesthaltbarkeit bei Fruchtsäften üblicherweise 12 – 24 Monate von der Abfüllung an beträgt. Bei der Lagerung von Fruchtsäften kommt es zu einem Abbau der monomeren Polyphenole durch Oxidations-, Polymerisations- und Kondensationsreaktionen, die stark von der Lagertemperatur abhängig sind

Reaktionskinetik von Anthocyanabbau und nichtenzymatischer Bräunung

Für den Anthocyanabbau in rotfarbigen Säften oder den Bräunungsanstieg in nicht rotfarbigen Säften ergibt sich eine Reaktionskinetik erste Ordnung der Formel:

$$C/C_0 = e^{-kt}$$

wobei C die Anthocyankonzentration zur Zeit t, C_0 die Anthocyankonzentration zu Beginn, t = Zeit in h und $k = K_0 e^{-E_a/RT}$ (K_0 = Frequenzfaktor in h^{-1} , E_a = Aktivierungsenergie in $Jmol^{-1}$, R = Gaskonstante $8,31441 JK^{-1}mol^{-1}$, T = Temperatur in K) die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ist (CEMEROGLU et al. 1994, EDER 1996a+c, IBARZ et al. 1992). Zur Berechnung der wichtigen kinetische Größe Aktivierungsenergie (J/mol), die die Menge an Energie in J beschreibt, die zur Aktivierung einer bestimmten Reaktion eines Moles eines bestimmten Stoffes benötigt wird, bildet man den Logarithmus von k. Man erhält so die Gleichung $\ln k = \ln K_0 - E_a/RT$. k selbst lässt sich aus der oben beschriebenen Gleichung berechnen. Ermittelt man k bei verschiedenen Temperaturen und trägt $\ln k$ gegen

$1/T$ auf, ergibt sich eine Gerade, deren Steigung E_a/R ist, woraus die Aktivierungsenergie berechnet werden kann. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse bei $1/T = 0$ ergibt $\ln K_0$. Diese Darstellung wird als Arrhenius-Diagramm bezeichnet und dient vor allem bei Lagerungsstudien der Beurteilung des Einflusses der Temperatur. Die Ermittlung der Konstanten im Arrhenius-Diagramm erfolgt durch Lagerung von Säften oder Konzentraten bei definierten Temperaturen über längere Zeiträume und regelmäßiger Bestimmung der Konzentrationsveränderung der Substanz oder des Parameters, deren Abbaukinetik bestimmt werden soll, in möglichst kurzen Zeiträumen, um durch viele Messpunkte die Genauigkeit zu erhöhen. Es zeigte sich bei Lagerungsstudien, dass die Lagertemperatur den größten Einfluss auf die Veränderungen während der Lagerung hat. Beim Anthocyanabbau spielt auch die Ausgangskonzentration der Anthocyane und anderer Saftinhaltsstoffe eine Rolle, da sich die Aktivierungsenergie des Farbabbaus mit dem Extraktgehalt bei Sauerkirschsaft (15, 45, 71 °Brix) verändert (CEMEROGLU et al. 1994). Mit Erhöhung des Extraktgehaltes steigt auch die Aktivierungsenergie. Da die Aktivierungsenergie die Steigung der Geraden darstellt (siehe Abbildung 9 Seite 24), bedeutet dies für die Reaktion, dass eine Erhöhung um eine bestimmte Temperatur (z.B. 10 K) bei hohen Aktivierungsenergien eine stärkere Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit verursacht als bei niedrigeren Aktivierungsenergien (EDER 1996a).

Auf die bisher bekannten Veränderungen in den Gehalten an Polyphenolen in Fruchtsäften und genaue kinetische Daten wird nachfolgend bei den einzelnen Obstarten näher eingegangen.

2.1.4 Polyphenole im Apfel und im Apfelsaft

Apfel

Die phenolischen Inhaltsstoffe des Apfels (*Malus Domestica L.*) und seiner Produkte sind in der Vergangenheit oft untersucht worden. In der frischen Frucht machen die phenolischen Inhaltsstoffe etwa 0,01 – 1% des Frischgewichtes aus, wobei Mostäpfel einen bis zu zehnmal höheren Gesamtphenolgehalt aufweisen als Tafeläpfel (HERRMANN 1973, LEA 1984). Von den verschiedenen Klassen an pflanzlichen Polyphenolen finden sich im Apfel sechs: Hydroxyzimtsäurederivate, Flavonole, Dihydrochalkone, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine und Anthocyane. In Tabelle 1 sind die bisher für die Apfelfrucht beschriebenen Polyphenole und ihre bisher beschriebenen Gehalte in der frischen reifen Frucht aufgeführt.

Die wichtigsten Hydroxyzimtsäurederivate im Apfel sind die Chinasäureester der Kaffeesäure und der p-Coumarsäure, wobei die Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure) und die 4-p-Coumaroylchinasäure klar dominieren (WHITING und COGGINS 1975, RISCH UND HERRMANN 1988, PÉREZ-ILZARBE et al. 1991, AMIOT et al. 1992). Die anderen beschriebenen Hydroxyzimtsäurederivate gehören im Polyphenolmuster des Apfels zu den Minor Komponenten. Ein Chinasäureester der Ferulasäure konnte bisher im Apfel nicht nachgewiesen werden, wurde aber bei Biosynthesestudien in Zellsuspensionenkultur aus Apfelfrüchten nachgewiesen (KOU MBA-KOU MBA und MACHEIX 1982). Ebenso finden sich keine glykosidisch gebundenen Glucoside der Hydroxyzimtsäuren, dafür aber Ester mit Glucose, im Apfel.

Die wichtigsten Flavonole im Apfel sind die Glykoside des Quercetins (OLESZEK et al. 1988). Die Gehalte der einzelnen Glykoside und ihr Verhältnis zueinander schwanken stark in Abhängigkeit der Sorte (WALD und GALENSA 1989, BURDA et al. 1990, PÉREZ-ILZARBE et al. 1991).

Ähnliches gilt auch für die Gehalte und die Verhältnisse der Anthocyane im Apfel, die z. B. bei Sorten mit grüner Schale völlig fehlen und bei rotschaligen Sorten oder seltenen Sorten mit rotem Fruchtfleisch in durchaus größeren Mengen enthalten sein können. Als wichtigstes Anthocyan in der Schale wird das Cyanidin-3-galaktosid genannt, gefolgt von erheblich geringeren Mengen Cyanidin-3-arabinosid und Cyanidin-3-glucosid (MAZZA und MINIATI 1993). Sorten mit rotem Fruchtfleisch haben einen Anthocyan Gehalt von 95 – 100 mg/kg, wobei ein Anthocyanmuster von Cyanidin-3-galaktosid (39,1%), Cyanidin-3-glucosid

(27,0%), Cyanidin-3-arabinosid (23,3%), Cyanidin-3-xylosid (10,5%) bestimmt wurde (MAZZA und VEGLIOGLU 1992).

Die wichtigsten monomeren Flavan-3-ole sind das (-)-Epicatechin und das (+)-Catechin, wobei die Gehalte an (-)-Epicatechin deutlich höher sind (RISCH und HERRMANN 1988). Die Polymere der Catechine, die Procyanidine, sind im Apfel in beträchtlichen Mengen enthalten. Sie machen nach neueren Erkenntnissen 40 – 60% des Gesamtphenolgehaltes des Apfels aus (MAYR et al. 1996, GUYOT et al. 1998). Als wichtigstes Procyanidin wird das dimere Procyanidin B2, das aus zwei 4 – 8 verknüpften (-)-Epicatechineinheiten besteht, genannt.

Tabelle 1: Bisher identifizierte Polyphenole in der frischen Apfelfrucht sowie die Gehalte als Durchschnitt und Schwankungsbreite (RISCH und HERRMANN 1988¹ (n = 16), WALD und GALENSA 1989² (n = 16), ³LEA und TIMBERLAKE 1974, ⁴MAYR et al. 1996, ⁵LAZARUS et al. 1999, ⁶WILSKA-JESZKA und PODSÉDEK 1996 (n = 8), ⁷GUYOT et al. 1998 (n = 1), ⁸LANCASTER 1992, ⁹LISTER et al. 1993 (n = 1), ¹⁰MAYR und TREUTTER 1996 (n = 9))

Nachgewiesene Polyphenole	Gehalte in mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate	
Chlorogensäure (5-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure)	62 – 385 (Mittelwert 139) ¹
Kryptochlorogensäure (4-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure)	0 – 12 (Mittelwert 2) ¹
4-Coumaroyl-L-(-)-chinasäure)	Spuren – 32 (Mittelwert 14) ¹
5-Coumaroyl-L-(-)-chinasäure	Spuren – 9 (Mittelwert 2) ¹
Caffeoylglucose	0 – 6 (Mittelwert 1) ¹
Coumaroylglucose	1 – 19 (Mittelwert 4) ¹
Feruloylglucose	0 – 9 (Mittelwert 3) ¹
Flavonole	
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	5 – 39 ²
Quercetin-3-glucosid (Isoquercitrin)	3 – 16 ²
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	1 – 10 ²
Quercetin-3-arabinosid (Avicularin)	8 – 25 ²
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	3 – 19 ²
Quercetin-3-xylosid	4 – 10 ²
Dihydrochalkone	
Phloridzin (Phloretin-2'-glucosid)	10 – 158 ²
Phloretin-2'-xylosylglucosid	11 – 230 ²
Flavan-3-ole	
(+)-Catechine	Spuren – 27 (Mittelwert 9) ¹
(-)-Epicatechin	2 – 129 (Mittelwert 46) ¹
Procyanidine	
B1	0,07 – 0,42 mg/Apfel ¹⁰
B2	0,67 – 2,50 mg/Apfel ¹⁰
B5	0,06 – 0,22 mg/Apfel ¹⁰
C1	0,33 – 1,29 mg/Apfel ¹⁰
diverse Polymere ^{3,4,5}	n.b.
Σ Procyanidine ^{6,7}	1420 - 3240
Anthocyane ⁸	
Cyanidin-3-galaktosid	0,1 – 8 mg/g Apfelschale
Cyanidin-3-xylosid	n.b.
Cyanidin-3-arabinosid	n.b.
Cyanidin-3-glucosid	n.b.
Acylierte Cyanidin-3-glykoside	n.b.
Σ Cyanidin-3-glykoside ⁹	1 mg/g Apfelschale

n.b. = nicht bestimmt

Über die Gehalte einzelner Substanzen ist aufgrund der schwierigen Analytik dieser Gruppe der Polyphenole wenig bekannt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die oben

genannten und quantifizierten Procyanidine B1, B2, B3, B5, C1 längst nicht alle im Apfel vorkommenden Procyanidine sind (LEA 1984, PÉREZ-ILZARBE et al. 1992, GUYOT et al. 1998, LAZARUS et al. 1999). Die wichtigsten Dihydrochalkone, die für den Genus *Malus* charakteristisch sind, stellen das Phloridzin (Phloretin-2'-glucosid) und das Phloretin-2'-xyloglucosid dar (OLESZEK et al. 1998). Die Verteilung der einzelnen Klassen an Polyphenolen in der Frucht ist sehr inhomogen und verändert sich während der Reifung (RISCH UND HERRMANN 1988, BURDA et al. 1990, PÉREZ-ILZARBE et al. 1991, MAYR et al. 1996, GUYOT et al. 1998). So finden sich die Hydroxyzimtsäurederivate hauptsächlich im Fruchtfleisch, die Flavonole und Anthocyane in der Schale, die Dihydrochalkone in den Kernen und die monomeren Flavan-3-ole und die Procyanidine in Fruchtfleisch und Schale. Dabei sind die Konzentrationen an Polyphenolen in Schale und Kernen erheblich höher als im Fruchtfleisch.

Eine Kaltlagerung der Äpfel über 6 Monate verändert den Polyphenolgehalt der Äpfel nicht (BURDA et al. 1990).

Apfelsaft

Das Polyphenolmuster und die Polyphenolgehalte von Apfelsaft unterscheiden sich von denen des Apfels. Schlecht wasserlösliche Polyphenole, wie Quercetin-3-glykoside, Phloridzin und höher polymere Procyanidine gehen unvollständig in den Saft über und verbleiben im Trester, was Muster und Gehalt der Polyphenole im Saft gegenüber der Frucht verändert. In Tabelle 2 sind die Schwankungsbreiten der Gehalte der wichtigsten Polyphenole mittels HPLC im Apfelsaft aus einigen Veröffentlichungen der letzten Jahre aufgeführt.

Durch eine Extraktion mit warmem Wasser kann der Gehalt dieser schlecht wasserlöslichen Polyphenole erhöht werden (SPANOS et al. 1990). Zudem entstehen durch enzymatische Aktivitäten im Saft die unveresterten Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure, p-Coumarsäure und Ferulasäure (Esterase-Aktivität fruchteigener oder zugesetzter Enzyme) und das 3-Hydroxyphloridzin (Polyphenoloxidase-Aktivität fruchteigener Enzyme) und lassen sich im Saft nachweisen (SPANOS et al. 1990, BURDA et al. 1990, RITTER 1994). In Abhängigkeit von Rohware und Herstellungsverfahren kann Apfelsaft verschieden große Mengen an Polyphenolen enthalten (LEA und TIMBERLAKE 1978, LEE und WROLSTAD 1988, SPANOS et al. 1990, SCHOLS et al. 1991, RITTER 1994, PICINELLI et al. 1997). Die starke Abhängigkeit der Gehalte der einzelnen Polyphenole von Rohware und Herstellungsprozess zeigt sich deutlich anhand der in Tabelle 2 aufgeführten großen Schwankungsbreiten. Der Vergleich der Schwankungsbreiten für die Gehalte einzelner Polyphenole der verschiedenen Autoren miteinander zeigt teilweise erhebliche Unterschiede. Vermutlich spielen Unterschiede in den verwendeten HPLC-Methoden zur Polyphenolanalytik neben Rohware und Herstellungsprozess eine nicht unbedeutende Rolle bei diesen Differenzen. Dazu muss angemerkt werden, dass 8 der in Tabelle 2 aufgeführten 20 Polyphenole kommerziell als Standardsubstanzen nicht erhältlich sind. Die Unterschiede in Polyphenolmuster und -gehalten von Apfelsäften haben ihre Ursache auch in der inhomogenen Verteilung der einzelnen Polyphenole im Apfel. Die Art des Mahlens und das Entsaftungsverfahren begünstigen den Eintrag der einzelnen Polyphenole in den Presssaft auf verschiedene Weise. SCHOLS et al. 1991 fanden bei der Entsaftung von unbehandelter Maische, kalt enzymierter Maische (20°C, 1 Stunde) und warm enzymierter, verflüssigter Maische (45°C, 4 Stunden) erhebliche Unterschiede in der Ausbeute an Polyphenolen im Saft. Die höchste Ausbeute wies der Saft der warm enzymierten Maische auf, die geringste Ausbeute der kalt enzymierte Saft, während der Saft der unbehandelten Maische etwa in der Mitte lag. Im Polyphenolmuster zeigten sich Unterschiede beim Saft aus warm enzymierter Maische, wobei insbesondere die Gehalte an Phloridzin, Epicatechin und Catechin, das in den beiden anderen Säften nicht nachweisbar war, stark erhöht waren. Ähnliche Ergebnisse fanden mit älteren Analysetechniken LEA und TIMBERLAKE 1978 für den Gehalt und das Muster der Polyphenole von Saft aus kalt und warm enzymierter Maische. Allerdings stellten

die Autoren auch einen Anstieg der Bitterkeit und Adstringenz in der Sensorik des Saftes aus der warm enzymierten Maische fest.

Tabelle 2: Schwankungsbreite der Gehalte der wichtigsten Polyphenole mittels HPLC in Apfelsaft verschiedener Sorten und Herstellungsverfahren

Substanz	SPANOS et al. 1990 (n = 30)	SUÁREZ-VALLÉS et al. 1994 (n = 3)	RITTER et al. 1996 (n = 38)	PICINELLI et al. 1997 (n = 9)
Chorogensäure	2,3 – 113,7	n.b.	11,2 – 177,6	10,8 – 557,4
Neochlorogensäure	n.b.	n.b.	Spuren – 1,3	n.b.
Kryptochlorogensäure	n.n. – 14,5	n.b.	2,3 – 12,9	n.b.
4-Coumaroylchinasäure	n.n. – 34,0	n.b.	3,3 – 49,1	1,1 – 76,1
Kaffeesäure	0,7 – 9,6	n.b.	Spuren – 13,9	n.b.
p-Coumarsäure	0,3 – 6,2	n.b.	Spuren – 2,1	n.b.
Ferulasäure	n.b.	n.b.	Spuren – 1,6	n.b.
Σ Hydroxyzimtsäureder.	6,9 – 191,8	n.b.	26,9 – 224,1	n.b.
(+)-Catechin	n.n. – 16,9	36,0 – 69,5	1,1 – 11	n.n. – 17,0
(-)-Epicatechin	n.n. – 34,0	159,7 – 225,6	2,9 – 30,3	n.n. – 171,5
Procyanidin B2	n.n. – 3,1	90,0 – 138,7	3,4 – 58,5	n.n. – 147,5
Procyanidin B1	n.n. – 12,7	10,8 – 27,5	n.b.	n.n. – 39,6
Procyanidin B5	n.b.	n.b.	n.b.	n.n. – 27,8
Procyanidin C1	n.b.	66,5 – 119,8	n.b.	n.n. – 124,9
Σ Flavan-3-ole	n.n. – 114,6	n.b.	n.b.	n.n. – 556,5
Phloridzin	1,3 – 56,0	82,8 – 196,1	2,0 – 45,1	3,4 – 31,7
Phloretin-2'-xyloglucosid	n.n. – 18,6	14,2 – 38,0	0,3 – 8,6	n.n. – 95,3
Σ Dihydrochalkone	1,3 – 74,6	n.b.	n.b.	n.b.
Quercetin-3-galaktosid	1,0 – 14,4	n.b.	n.b.	n.b.
Quercetin-3-rutinosid	n.b.	7,0, - 12,5	n.b.	n.b.
Quercetin-3-glucosid	n.n. – 9,1		0,3 – 8,6	n.b.
Quercetin-3-arabinosid	n.n. – 16,0	Spuren	n.b.	n.b.
Quercetin-3-rhamnosid	n.n. – 13,8	5,8 – 33,6	n.b.	n.n. – 1,8
Σ Flavonole	3,6 - -51,8	n.b.	n.b.	n.b.
Σ Polyphenole HPLC	12,5 – 332,8	n.b.	48,4 – 318,0	n.b.

n: Probenzahl, n.b.: nicht bestimmt, n.n.: nicht nachweisbar

Eine Diffusionsextraktion von Apfelsaft unter Zusatz von warmem Wasser erhöht ebenfalls deutlich den Polyphenolgehalt und verändert das Polyphenolmuster, wobei insbesondere die Gehalte der in kaltem Wasser schlecht löslichen Quercetin-3-glykoside und des Phloridzins ansteigen (SPANOS et al. 1990). Eine Enzymierung der Maische führt allerdings auch zu einer deutlichen Erhöhung der Saftausbeute (LEA und TIMBERLAKE 1978, SCHOLS et al. 1991). Eine direkte Pasteurisation des frischen Presssaftes unterbindet eine weitere enzymatische Oxidation der Polyphenole im Saft durch Inaktivierung fruchteigener Enzyme, da diese Oxidation bei langen Zeiträumen zwischen Entsaftung und Pasteurisation des Saftes im Verlauf des Herstellungsprozesses zu deutlichen Verlusten an Polyphenolen führen kann (SPANOS et al. 1990). Diese Behandlung führte auch zu einer deutlichen Zunahme des Gesamtphenolgehaltes und des Gehaltes an monomeren Polyphenolen gegenüber dem frischen Presssaft, was die Autoren allerdings hauptsächlich auf die fortschreitende Oxidation des Presssaftes nach der Probennahme zurückführen.

Zur Klärung von trübem Apfelsaft und Herstellung eines stabilen klaren Apfelsaftes existieren klassische und neue Verfahren. Die Saftenzymierung mit pektolytischen Enzymen gefolgt von einer Filtration zur Klärung des Saftes, d.h. Entfernung des Trubes aus dem Saft, führt zu einer Abnahme von Gesamtphenolgehalt und den Gehalten an monomeren Polyphenolen im Apfelsaft (SPANOS et al. 1990). Einige dieser Verfahren entfernen relativ selektiv bestimmte Polyphenole oder eine bestimmte Klasse an Polyphenolen aus dem Saft. Die

Schönung mit Gelatine/Kieselöl entfernt beispielsweise hauptsächlich die polymeren Polyphenole, wie die Procyanidine (LEA und TIMBERLAKE 1978, HEATHERBELL 1984), während die Gehalte an monomeren Polyphenolen kaum verändert werden, was erst bei der zusätzlichen Verwendung von Bentonit (Gelatine/Kieselöl/Bentonit-Schönung) in geringem Maß der Fall ist (SPANOS et al. 1990, RITTER 1994). RITTER 1994 beziffert die Reduktion des Gesamtphenolgehaltes von Apfelsaft durch eine Gelatine/Kieselöl/Bentonit-Schönung mit 17%, wobei die Gehalte der Hauptpolyphenole des Apfelsaftes außer Procyanidin B2 ähnlich stark bzw. geringer abnehmen. Andere Behandlungsmaßnahmen von Apfelsaft führen sowohl im Gesamtphenolgehalt wie auch im Gehalt an monomeren Polyphenolen zu deutlich höheren Verlusten. Die Behandlung mit PVPP reduziert den Gesamtphenolgehalt von Apfelsaft um 50% und die Gehalte an monomeren Polyphenolen mit 15 – 57% unterschiedlich stark (RITTER 1994). Die Behandlung von trübem Apfelsaft mit Laccase/O₂ und folgender Ultrafiltration entfernt einen großen Teil der Polyphenole mit o- und p-Diphenolstruktur, was zu einer Reduktion des Gesamtphenolgehaltes von 80% führt (RITTER 1994). Einen ähnlich hohen Verlust an Polyphenolen verursacht die Behandlung von klarem Apfelsaft mit Adsorberharz (RITTER 1994).

Die Lagerung des Saftes hat ebenso einen Einfluss auf Polyphenolmuster und -gehalte. Eine neunmonatige Lagerung von Apfelsaftkonzentrat bei 25°C vermindert die Hydroxymethylsäurederivate um ca. 36%, die Flavonole und Dihydrochalkone um ca. 60% und führte bei den Procyanidinen zu einem vollständigen Verlust (SPANOS et al. 1990). Im Hinblick auf das übliche Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) von Fruchtsaft von 12 – 24 Monaten kann geschlossen werden, dass der Saft von der Herstellung bis zum Ende des MHD deutlichen Veränderungen im Bereich der Polyphenole unterliegt.

Bei der Untersuchung der Bräunung von Apfelsaftkonzentrat während der Lagerung ergab sich bei Konzentraten aus drei verschiedenen Apfelsorten eine Kinetik 1. Ordnung mit Aktivierungsenergien zwischen 100,3 und 105,0 kJmol⁻¹ für die Entstehung von HMF als Indikatorsubstanz für die nichtenzymatische Bräunung. K₀ lag zwischen 2,81x10¹⁵ und 2,95 10¹⁶ Tage⁻¹. Die Bräunung selbst, bestimmt durch die Extinktion bei 440 nm, passt eher zu einer Kinetik 0. Ordnung der Formel C = kt, was bedeutet, dass der Anstieg der Bräunung mit der Zeit linear verläuft. Die Kinetik-Konstante k in Tage⁻¹ stieg für die Konzentrate aus den drei Sorten mit steigender Temperatur von 1,66x10⁴, 1,90x10⁴ und 3,94x10⁴ bei 4°C über 18,41x10⁴, 26,87x10⁴ und 31,97x10⁴ bei 20°C und 55,46x10⁴, 92,95x10⁴ und 135,42x10⁴ bei 37°C. Praktisch bedeutet dies, dass im Falle der ersten aufgeführten Konstante bei einer Lagertemperatur von 4°C an einem Tage die Extinktion bei 440nm um 1,66x10⁻⁴ Extinktionseinheiten zunimmt.

2.1.5. Polyphenole in schwarzen Johannisbeeren und im schwarzen Johannisbeersaft

Schwarze Johannisbeeren

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der schwarzen Johannisbeere (*Ribes nigrum* L.) und deren Gehalte in der frischen Frucht ist im Vergleich zum Apfel relativ wenig bekannt. Sie wird vor allem wegen ihres hohen Gehaltes an L-Ascorbinsäure geschätzt und zeichnet sich durch vergleichsweise hohe Gehalte an Polyphenolen und Anthocyanen aus. Genaue Angaben zum Gesamtphenolgehalt von frischen schwarzen Johannisbeeren wurden nicht gefunden. Sechs Klassen an pflanzlichen Phenolen wurden bisher in schwarzen Johannisbeeren identifiziert (HERRMANN 1997a): Anthocyane, Hydroxymethylsäurederivate, Hydroxybenzoesäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine, Flavonolderivate. Die meisten Daten sind über die Anthocyane der schwarzen Johannisbeere verfügbar. Reife Beeren enthalten etwa 2500 mg/kg Anthocyane und die Beerenhaut besteht zu mind. 2,5% des Frischgewichtes aus diesen Farbstoffen (KOEPPEN und HERRMANN 1977). IVERSEN 1999 gibt für schwarze Johannisbeeren der Sorte „Ben Lomond“ einen durchschnittlichen Gesamtanthocyanengehalt von 4100 mg/kg an, EDER 1996b nennt Gehalte zwischen 1,5 – 3,9 g/kg Frischgewicht und CLIFFORD 2000 gibt eine Spannweite von 1300 – 4000 mg/kg an. In

Tabelle 3 sind die bisher identifizierten Anthocyane und ihre prozentualen Anteile am Gesamtanthocyangehalt der frischen schwarzen Johannisbeere aufgeführt. Die in geringeren Mengen vorkommenden Anthocyane Pelargonidin-3-rutinosid, Cyanidin-3-sophorosid und Delphinidin-3-sophorosid wurden bisher nur von LE LOUS et al. 1975 beschrieben.

Tabelle 3: Anthocyane der schwarzen Johannisbeere und ihr prozentualer Anteil am Gesamtanthocyangehalt (LE LOUS et al. 1975)

Anthocyan	Prozentualer Anteil am Gesamtanthocyangehalt
Delphinidin-3-glucosid	13
Delphinidin-3-rutinosid	30
Cyanidin-3-glucosid	17
Cyanidin-3-rutinosid	35
Pelargonidin-3-rutinosid	3
Delphinidin-3-sophorosid	1
Cyanidin-3-sophorosid	1

Die bisher identifizierten farblosen Polyphenole und ihre Gehalte in der frischen Frucht sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Farblose Polyphenole und ihre Gehalte in frischen schwarzen Johannisbeeren fünf verschiedener Sorten (¹SCHUSTER und HERRMANN 1985, ²STÖHR und HERRMANN 1975a (n = 5), ³KOEPPEN und HERRMANN 1977)

Nachgewiesene Polyphenole	mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate¹	
Neochlorogensäure	38 – 48
Kryptochlorogensäure	3 – 5
Chlorogensäure	1 – 2
3-p-Coumaroylchinasäure	13 – 21
4-Feruloylchinasäure	2 – 3
5-Feruloylchinasäure	1 – 2
Caffeoylglucose	19 – 30
p-Coumaroylglucose	10 – 14
Feruloylglucose	11 – 15
Kaffeesäure-4-glucosid	2
p-Coumarsäureglucosid	4 – 10
Ferulasäureglucosid	2 – 4
Hydroxybenzoessäurederivate¹	
4-Hydroxybenzoessäureglucosid	4 – 13
Galloylglucose	4 – 7
Flavan-3-ole²	
(+)-Catechin	~5
(-)-Epicatechin	~5
(+)-Gallocatechin	~5
(-)-Epigallocatechin	~5
Flavonole³	
Myrecetin-3-glucosid	n.b.
Myrecetin-3-rutinosid	n.b.
Quercetin-3-glucosid	n.b.
Quercetin-3-rutinosid	n.b.
Kaempferol-3-glucosid	n.b.
Kaempferol-3-rutinosid	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Bei den farblosen Polyphenolen weisen die Hydroxyzimtsäurederivate, Ester mit Chinasäure und Glucose sowie Glucoside, die höchsten Gehalte auf. Die Gehalte an Hydroxybenzoesäurederivaten und Flavan-3-olen sind vergleichsweise gering. Über die Gehalte an Flavonolderivaten, Glykoside des Myricetins, Quercetins und Kaempferols, werden keine detaillierten Angaben gemacht, allerdings ein Gesamtflavonolgehalt von 9 mg/kg angegeben (WILDANGER und HERRMANN 1973). Über die Gehalte an Procyanidinen ist bisher kaum etwas bekannt. WILSKA-JESZKA und PODSÉDEK 1996 geben für fünf untersuchte Sorten Gesamtgehalte an Procyanidinen von 372 – 619 mg/kg Frischgewicht an.

Schwarzer Johannisbeersaft

Über die Gehalte der aufgeführten Polyphenole im schwarzen Johannisbeersaft gibt es ebenfalls wenig Informationen. Eine ältere Arbeit von MORTON 1968 nennt einen Gesamtanthocyangehalt von 1450 mg/L Saft. DIETRICH et al. 1994 untersuchten in einem seit 1990 laufenden Sortenscreening die Eignung von mehr als 25 schwarze Johannisbeersorten zur Saft- bzw. Nektarherstellung. Hierbei wurden signifikante Unterschiede u. a. in der Sensorik, der Farbintensität, in den Gehalten an Säure, L-Ascorbinsäure und Polyphenolen festgestellt. Der mittels HPLC ermittelte Anthocyangehalt der Säfte (ohne Nachextraktion) lag im Bereich von 333 – 1952 mg/L (Mittel 842 mg/L) und schwankte somit um mehr als den Faktor 5. In Übereinstimmung mit der Literatur wurden in allen Sorten im wesentlichen nur 4 Anthocyane gefunden: Delphinidin-3-rutinosid (43 - 53%), Cyanidin-3-rutinosid (30 - 40%), Delphinidin-3-glucosid (10 - 15%) und Cyanidin-3-glucosid (3 - 6%). Die Enzymierung von schwarzer Johannisbeermasse mit pektolytischen Enzymen führt neben der Erhöhung der Saftausbeute auch zu einer Erhöhung der Farbe im Saft (DONGOWSKI und BOCK 1987), woraus eine höhere Ausbeute an Anthocyanen und anderen Polyphenolen geschlossen werden kann. IVERSEN 1999 untersuchte die Veränderung des Anthocyangehaltes bei der Herstellung eines schwarzen Johannisbeernektars von den Beeren über Maische und Rohsaft zum Nektar. Eine Maischestandzeit von 2 Stunden bei 50°C mit pektolytischen Enzymen führte zu einem Verlust an Anthocyanen von 3%. Nach dem Entsaftungsvorgang verblieben 21% der Anthocyane im Trester. Eine Standzeit des Presssaftes von einer Stunde bei ca. 35°C verursachte erheblich höhere Verluste an Anthocyanen als die Maischestandzeit. Nach Nektarabmischung und Pasteurisation betrug der Verlust gegenüber dem frischen Rohsaft 9%.

Die Stabilität der Anthocyane im schwarzen Johannisbeersaft, –nektar, -konzentrat oder –sirup, besonders in Wechselwirkung mit der L-Ascorbinsäure, wurde mehrfach untersucht (MORTON 1968, SKREDE et al. 1992, EDER 1996a, IVERSEN 1999). Danach stabilisieren die Anthocyane der schwarzen Johannisbeere die L-Ascorbinsäure im Produkt, was aber andererseits zu einem stärkeren Verlust des Gehaltes an monomeren Anthocyanen führt. Nach einer Lagerzeit eines schwarzen Johannisbeernektars von 6 Monaten bei 20°C im Dunkeln betrug der Verlust an monomeren Anthocyanen mehr als 50%, wobei in der Abnahme der einzelnen Anthocyane keine signifikanten Unterschiede auftraten (IVERSEN 1999). Bei einem üblichen Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) für Fruchtsäfte und –nektare von 12 – 24 Monaten bedeutet dies eine erhebliche Abnahme an monomeren Anthocyanen im Zeitraum von Herstellung über die Standzeiten vor und nach dem Verkauf bis zum Konsum bzw. Ablauf des MHD. Die Reaktionskinetik der Abnahme der Anthocyane wurde annähernd mit einer Reaktion 1. Ordnung beschrieben (EDER 1996a). Das Arrhenius-Diagramm des Abbaus der einzelnen Anthocyane ist in Abbildung 9 dargestellt.

Die Aktivierungsenergien betragen für Delphinidin-3-rutinosid 53,97 kJmol⁻¹, für Delphinidin-3-glucosid 52,54 kJmol⁻¹, für Cyanidin-3-rutinosid 55,40 kJmol⁻¹, für Cyanidin-3-glucosid 53,58 kJmol⁻¹ und für Pelargonidin-3-rutinosid von 91,07 kJmol⁻¹. Aufgrund der hohen Aktivierungsenergie ist das Pelargonidin-3-rutinosid bei niedrigen Temperaturen deutlich stabiler als die anderen Anthocyane des schwarzen Johannisbeersaftes, was sich allerdings mit steigender Temperatur zunehmend ändert, so dass die Stabilität der Anthocyane bei

30°C etwa gleich ist. Nach EDER 1996a bestehen demnach kaum Unterschiede in der Stabilität der vier Hauptanthocyane des schwarzen Johannisbeersaftes.

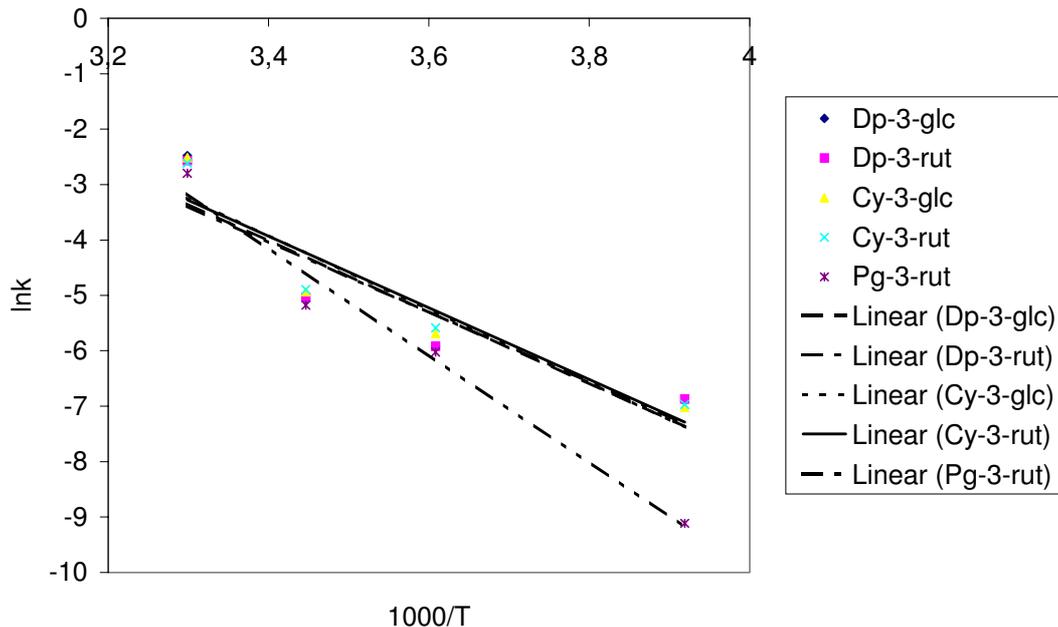


Abbildung 9: Arrhenius-Diagramm der Anthocyane in schwarzem Johannisbeersaft (EDER 1996a)

TAYLOR 1989 hingegen fand bei der Lagerung vakuumverpackter, pasteurisierter Säfte bei 20°C Unterschiede in der Stabilität der einzelnen Anthocyane. Delphinidin-3-rutinosid und Cyanidin-3-rutinosid waren danach erheblich stabiler als die entsprechenden Glucoside, wobei Delphinidin-3-rutinosid das stabilste Anthocyan darstellte. IVERSEN 1999 konnte zudem zeigen, dass Licht ebenfalls einen Einfluss auf die Kinetik-Konstante beim Abbau der Anthocyane in schwarzem Johannisbeernektar hat. Für eine Lagertemperatur von 20°C ergab sich bei Lagerung im Dunkeln eine Kinetik-Konstante von $k = 3,2 \times 10^3 \text{ Tage}^{-1}$ und bei Lagerung im Licht von $k = 4,2 \times 10^3 \text{ Tage}^{-1}$, was bedeutet, dass Licht den Abbau der Anthocyane beschleunigt. Die Kinetik-Konstanten des L-Ascorbinsäureabbaus unter den selben Lagerungsbedingungen betragen $1,0 \times 10^3$ (Licht) bzw. $1,1 \times 10^3$ (Dunkel), also nur etwa ein Viertel der Werte für die Anthocyane, und zeigten keine signifikante Veränderung durch den Lichteinfluss.

2.1.6. Polyphenole in Brombeeren, Holunderbeeren, Erdbeeren, Stachelbeeren, Moosbeeren und Sauerkirschen

Brombeere

Frucht

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Brombeere (*Rubus spp.*) und deren Gehalte in der frischen Frucht gibt es wenig Informationen. Es gibt weltweit viele verschiedene Brombeersorten, die sich in ihren Gehalten an phenolischen Inhaltsstoffen teilweise erheblich unterscheiden können. Sechs Klassen an pflanzlichen Polyphenolen wurden bisher in Brombeeren identifiziert (HERRMANN 1996a): Anthocyane, Hydroxyzimtsäurederivate, Hydroxybenzoesäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine, Flavonolderivate. In Tabelle 5 sind die bisher identifizierten Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in frischen Brombeeren aufgeführt. Über das Vorkommen und die Identität der Anthocyane herrscht keine völlige Klarheit. Sicher identifiziert sind bisher Cyanidin-3-

glucosid als Hauptanthocyan sowie Cyanidin-3-rutinosid in kleineren Mengen. Es wurden zwar in verschiedenen Sorten noch andere Anthocyane nachgewiesen, konnten aber nicht eindeutig charakterisiert werden (TORRE und BARRIT 1977, SAPERS et al. 1986). Sicher ist bisher nur, dass es sich um Cyanidinderivate handelt. Es werden auch acylierte Cyanidinglykoside vermutet (SAPERS et al. 1986).

Tabelle 5: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in frischen Brombeeren (¹SCHUSTER und HERRMANN 1985 (n = 3), MOSEL und HERRMANN 1974 (n = 6), ³THOMPSON et al. 1972, ⁴HENNING 1981 (n = 5), ⁵TORRE und BARRIT 1977 (n = 19), ⁶SAPERS et al. 1986, ⁷WILSKA-JESZKA und PODSÉDEK 1996 (n = 1))

Nachgewiesene Polyphenole	mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate¹	
Neochlorogensäure	41 – 52
Chlorogensäure	Spuren – 3
3-p-Coumaroylchinasäure	2 – 5
3-Feruloylchinasäure	2 – 4
Caffeoylglucose	3 – 6
p-Coumaroylglucose	4 – 11
Feruloylglucose	2 – 6
p-Coumarsäureglucosid	2 – 5
Hydroxybenzoesäurederivate¹	
p-Hydroxybenzoesäureglucosid	4 – 21
Protocatechusäureglucosid	2 – 6
Gallussäureglucosid	0 – 2
Galloylglucose	2 – 3
Flavan-3-ole²	
(+)-Catechin	65 – 150 (Mittelwert 111)
(-)-Epicatechin	8 – 38 (Mittelwert 19)
Procyanidine³	
B4, B5, B8	n.b.
Σ Procyanidine⁷	527
Flavonole⁴	
Quercetin-3-glucuronid	22 – 96 (Mittelwert 62)
Quercetin-3-glucosid	36 – 55 (Mittelwert 47)
Quercetin-3-galaktosid	22 – 80 (Mittelwert 42)
Quercetin-3-xyloglucuronid	18 – 30 (Mittelwert 23)
Quercetin-3-rutinosid	12 – 25 (Mittelwert 21)
Kaempferol-3-glucuronid	6 – 19 (Mittelwert 12)
Kaempferol-3-galaktosid	12 – 40 (Mittelwert 22)
Kaempferol-3-xyloglucuronid	14 – 90 (Mittelwert 41)
Anthocyane^{5,6}	
Cyanidin-3-glucosid ^{5,6}	756 – 2216 (Hauptsächlich 1300 – 1700) ⁵
Cyanidin-3-rutinosid ^{5,6}	n.b.
acylierte Cyanidin-3-glykoside ⁶	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Saft

Über die Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen in Brombeersaft existieren nur wenige Informationen. ROMMEL et al. 1992 nennt für einen Saft aus der Sorte „Evergreen“ eine prozentuale Verteilung der Anthocyane von 67% Cyanidin-3-glucosid, 7,7% Cyanidin-3-rutinosid, 7,9% Cyanidinderivat, 7,8% eines acylierten Cyanidinderivates, 6,7% eines weiteren acylierten Cyanidinderivates, 1% eines polymeren Anthocyan, 1% Cyanidin. Zu farblosen Polyphenolen werden keine Angaben gemacht. Untersuchungen zur Stabilität und

Veränderungen der Anthocyane in Saft und Wein während der Herstellung und Lagerung zeigten, dass vor allem das Cyanidin-3-glucosid sehr instabil ist (ROMMEL et al. 1992). Die Presssäfte nach einer Maischeenzymierung mit pektolytischen Enzymen bei ca. 50°C einerseits und nach einer KZE der Maische mit anschließender Maischeenzymierung mit pektolytischen Enzymen bei ca. 50°C andererseits wurden auf ihren Gesamtanthocyangehalt mittels HPLC untersucht. Es zeigte sich, dass der Presssaft aus der zuvor pasteurisierten Maische einen deutlich höheren Gesamtanthocyangehalt aufwies (638 mg/L gegenüber 396 mg/L). Die Ursache dafür liegt einerseits an der Enzyminaktivierung beispielsweise der Polyphenol-Oxidasen in der Maische und andererseits an der Thermoplasmolyse der Zellen (Aufplatzen) und der durch diesen Zellaufschluss verbesserten Extraktion der Polyphenole aus der Maische. Eine Schönung mit Gelatine / Bentonit verringerte den Gesamtanthocyangehalt der beiden Varianten um 14 bzw. 18%. Die anschließende Gärung reduzierte den Anthocyangehalt um über 80% und eine weitere Lagerung bei 20°C führte schließlich zu einem völligen Verlust an monomeren Anthocyanen. Der Wein der Prozesslinie Maische-KZE, Maischeenzymierung, Vergärung des ungeschönten Saftes besaß nach der Abfüllung den höchsten Gesamtanthocyangehalt. Der Wein aus der Prozesslinie Maischeenzymierung, Vergärung des geschönten Saftes hatte den niedrigsten Gesamtanthocyangehalt, während der Gesamtanthocyangehalt des Weines aus einer Maischegärung mit oder ohne Schönung etwas höher war. Der Anteil von Polymeren an der Farbe nimmt während der Vergärung mit 38 – 48% deutlich zu und steigt im Verlauf der Lagerung weiter an. Eine höhere Lagertemperatur (20°C gegenüber 2°C) führt zu stärkeren Verlusten an Anthocyanen und einem höheren Anteil von Polymeren an der Farbe der Weine.

Holunderbeere

Frucht

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der schwarzen Holunderbeere (*Sambucus nigra L.*) und deren Gehalte in der frischen Frucht gibt es wie bei den meisten Beerenfrüchten wenig Informationen. Bisher wurden vier Klassen an Polyphenolen beschrieben (HERRMANN 1996b, WILSKA-JESZKA und PODSÉDEK 1996): Hydroxyzimtsäurederivate, Flavonolderivate, Anthocyane und Procyanidine. Zu Flavan-3-olen oder anderen Polyphenolen in Holunderbeeren wurden keine Informationen gefunden. Die Anthocyane der schwarzen Holunderbeere sind am besten untersucht. EDER 1996c nennt für sieben Holunderbeerensorten bei zehn Proben Anthocyangehalte von 5707 – 10046 mg/kg Frischgewicht und CLIFFORD 2000 gibt eine Spannweite von 2000 – 10000 mg/kg an. Aufgrund dieser hohen Anthocyangehalte werden schwarze Holunderbeeren als Quelle für Farbstoffkonzentrate in der Lebensmittelindustrie verwendet (DRDAK und DAUCIK 1990, PHILIPP et al. 1996). Tabelle 6 zeigt die bisher identifizierten Anthocyane und ihre prozentuale Verteilung.

Tabelle 6: Anthocyanmuster von frischen Holunderbeeren und einem Farbstoffkonzentrat.

Anthocyan	FrISCHE Beeren nach BRONNUM- HANSEN und HANSEN 1983	FrISCHE Beeren nach DRDAK und DAUCIK 1990	Farbstoffkonzentrat nach DRDAK und DAUCIK 1990
Cyanidin-3-glucosid	65,7%	32,6%	19,1%
Cyanidin-3-sambubiosid	32,4%	55,2%	68,8%
Cyanidin-3-sambubiosyl- 5-glucosid	1,1%	10,2%	10,8%
Cyanidin-3,5-diglucosid	0,8%	2,0%	1,3%

Als farblose Polyphenole werden von HERRMANN 1996b Chlorogensäure und andere nicht genau beschriebene Hydroxyzimtsäurederivate sowie Quercetin-3-rutinosid und Quercetin-3-glucosid aufgeführt. Gehalte oder genauere Angaben wurden nicht gefunden. Der Gehalt an Procyanidinen wird von WILSKA-JESZKA und PODSÉDEK 1996 für eine untersuchte Sorte mit 1350 mg/kg Frischgewicht angegeben, kann aber wegen der geringen Probenzahl nur als Richtwert angesehen werden.

Saft

Über die Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen im Saft sind nur Daten zu den Anthocyanen vorhanden (EDER 1996c). Die Gesamtanthocyangehalte von zehn Säften betragen zwischen 1941 und 6576 mg/L. Es zeigten sich auch große Unterschiede in den sieben untersuchten Sorten. In Tabelle 7 sind die Schwankungsbreiten der prozentualen Anteile am Gesamtanthocyangehalt dargestellt.

Tabelle 7: Prozentuale Anteile der einzelnen Anthocyane in zehn Holundersäften (EDER 1996c)

Anthocyane	Anteil am Gesamtanthocyangehalt (n = 10)
Cyanidin-3-glucosid	26,1 – 54,2%
Cyanidin-3-sambubiosid	40,7 – 66,7%
Cyanidin-3-sambubiosyl-5-glucosid	3,2 – 7,7%
Cyanidin-3,5-diglucosid	0,5 – 1,3%

Bei Produktions- und Lagerungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Cyanidinsambubioside stabiler sind als die Cyanidinglucoside (DRDAK und DAUCIK 1990, EDER 1996c). Zudem kommt es zu erheblichen Verlusten an Anthocyanen bei der Produktion und Lagerung eines Holundernektars (EDER 1996c). Der Anthocyanabbau während der Lagerung folgte, wie beim schwarzen Johannisbeersaft, einer Kinetik 1. Ordnung (EDER 1996c). Die Aktivierungsenergien der einzelnen Anthocyane lagen zwischen 50,84 kJmol⁻¹ und 55,14 kJmol⁻¹. Bezogen auf 100% Anthocyangehalt in den frischen Beeren ergaben sich bei den einzelnen Verarbeitungsschritten folgende Verluste:

Abbeeren	: - 4,7%
Maischeerhitzung	: - 8,9%
Entsaftung (Hydropresse)	: - 43,9%
Schönung und Filtration (Gelatine / Kieselsol / Bentonit)	: - 3,4%
Konzentrierung (3 Varianten)	: - 4,0%
Lagerung der Halbkonzentrate (90 Tage bei 4°C)	: - 10,8%
Rückverdünnung und Pasteurisation	: - 3,6%
Lagerung des Nektars (55 Tage bei 4°C)	: - 16,6%

Besonders hohe Verluste werden bei der Entsaftung verzeichnet, wobei fast die Hälfte der Anthocyane im Trester verbleiben. Mahlen, Maischeerhitzung und –enzymierung verursachen ebenfalls mit insgesamt ca. 14% erhebliche Verluste. Der Einfluss der Schönung ist mit einem Verlust von 3,4% gering. Die Lagerung hat den größten Einfluss auf die Anthocyane im Halbkonzentrat beziehungsweise im Nektar. Eine Lagerung bei 30°C hatte einen völligen Verlust der monomeren Anthocyane zur Folge. Zudem zeigte sich, dass es im Verlauf des Herstellungsprozesses zu Veränderung des Anthocyanmusters kommt. Die Anteile von Cyanidin-3-sambubiosid und den beiden Cyanidin-3,5-diglykoside nehmen zu und der Anteil an Cyanidin-3-glucosid dementsprechend ab.

Der Holundernektar wies am Ende der Prozesslinie (Lagerung des Nektars) nur noch 4,0% des in den frischen Beeren vorhandenen Gesamtanthocyangehaltes auf.

Erdbeeren

Frucht

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Erdbeere (*Fragaria x ananassa Duch.*) und ihre Gehalte in den frischen Beeren gibt es einige Informationen. Bisher wurden sechs Klassen an Polyphenolen nachgewiesen (HERRMANN 1996c): Hydroxyzimtsäurederivate, Hydroxybenzoesäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine, Flavonole, Anthocyane. In Tabelle 8 sind die bisher identifizierten Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in frischen Erdbeeren aufgeführt. Die Identität einiger nachgewiesener Anthocyane ist noch nicht eindeutig geklärt (MAZZA und MINIATI 1993).

Tabelle 8: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in frischen Erdbeeren (¹SCHUSTER und HERRMANN 1985 (n = 5), ²STÖHR und HERRMANN 1975b (n = 16), ³THOMPSON et al. 1972, ⁴HENNING 1981 (n = 20), ⁵FULEKI 1969, ⁶BAKKER et al. 1994 (nachgewiesen im Saft), ⁷MAAS et al. 1991 (n = 50), ⁸WILSKAJESZKA und PODSÊDEK 1996 (n = 1), ⁹WROLSTAD et al. 1990 (n = 1))

Nachgewiesene Polyphenole	mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate¹ p-Coumaroylglucose Caffeoylglucose Feruloylglucose p-Coumarsäureglucosid	14 – 27 Spuren – 2 Spuren – 2 Spuren
Hydroxybenzoesäurederivate¹ p-Hydroxybenzoesäureglucosid Galloylchinasäure Ellagsäure ⁷	6 1 43 – 464
Flavan-3-ole² (+)-Catechin (-)-Epicatechin (+)- Gallocatechin	30 – 40 (in 16 von 16 untersuchten Sorten) Spuren – 12 (in 9 von 16 untersuchten Sorten) Spuren – 8 (in 4 von 16 untersuchten Sorten)
Proanthocyanidine³ B3 Σ Procyanidine ⁸	n.b. 304
Flavonole⁴ Quercetin-3-galaktosid Quercetin-3-glucosid Quercetin-3-glucuronid Quercetin-3-xyloglucuronid Kaempferol-3-galaktosid Kaempferol-3-glucosid Kaempferol-3-glucuronid Kaempferol-3-xyloglucosid Kaempferol-3-xyloglucuronid	n.n. – 15 2 – 15 - 1 – 16 Spuren – 16 - 8 – 42 n.n. – 5 2 – 10
Anthocyane^{5,6} Pelargonidin-3-glucosid ^{5,6} Pelargonidin-3-rutinosid ⁶ Pelargonidin-3-glucosid-succinat ⁶ Cyanidin-3-glucosid ^{5,6} Cyanidin-3-glucosid-succinat ⁶ diverse Pelargonidinglykoside ^{5,7} Σ Anthocyane ⁹	n.b. n.b. n.b. n.b. n.b. n.b. n.b. 300

n.b. = nicht bestimmt, n.n. = nicht nachweisbar

Die Gehalte an Anthocyanen in den frischen Früchten werden von CLIFFORD 2000 mit einer Spannweite von 150 – 350 mg/kg Frischgewicht angegeben, während HERRMANN 1996c mit einen Wert von um die 300 mg/kg Frischgewicht für eine Sorte nennt.

Saft

In Erdbeersäften aus 39 verschiedenen Sorten finden BAKKER et al. 1994 mittels einfacher photometrischer Bestimmung Gesamtphenolgehalte von 28,8 – 728 mg/L und Gesamtanthocyanengehalte von 20,7 – 333,0 mg/L, wobei das Anthocyanmuster der untersuchten Erdbeersäfte im Bereich der Anthocyane mit geringeren Gehalten stark variierte. Der Anteil des Pelargonidin-3-glucosids am Gesamtanthocyanengehalt schwankte zwischen 82,0 und 100%. Es wurden dreizehn verschiedene Anthocyane nachgewiesen, von denen allerdings nur fünf eindeutig identifiziert werden konnten (siehe auch Tabelle 8).

Stachelbeeren

Frucht

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Stachelbeere (*Ribes uva-crispa* L.) und ihrer Gehalte in den frischen Beeren gibt es sehr wenig Informationen. Die Stachelbeere wird nach ihrem Aussehen in grüne, gelbe und rote Sorten eingeteilt. Aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft zu den Johannisbeeren ähneln die phenolischen Inhaltsstoffe denen der Johannisbeeren. Bisher wurden fünf Klassen an Polyphenolen in Stachelbeeren beschrieben (HERRMANN 1997b): Hydroxyzimtsäurederivate, Hydroxybenzoesäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Flavonole und Anthocyane (nur in roten Sorten). In Tabelle 9 sind die bisher identifizierten Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte aufgeführt.

Tabelle 9: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in Stachelbeeren (¹SCHUSTER und HERRMANN 1985 (n = 2), ²STÖHR und HERRMANN 1975a (n = 6), ³WILDANGER und HERRMANN 1973, ⁴MAZZA und MINIATI 1993)

Nachgewiesene Polyphenole	mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate¹	
Neochlorogensäure	3 – 4
3-p-Coumaroylchinasäure	Spuren – 1
3-Feruloylchinasäure	1
Caffeoylglucose	5 – 13
p-Coumaroylglucose	7
Feruloylglucose	Spuren – 6
Kaffeesäure-4-glucosid	2
p-Coumaronsäureglucosid	4 – 6
Ferulasäureglucosid	2 – 4
Hydroxybenzoesäurederivate¹	
4-Hydroxybenzoesäureglucosid	9 – 14
Protocatechusäure-4-glucosid	2 – 7
Gallussäure-4-glucosid	2
Flavan-3-ole²	
(+)-Catechin	150 – 280
(-)-Epicatechin	30 – 80
Flavonole³	
Quercetin- und Kaempferolderivate	n.b.
Anthocyane⁴	
Cyanidin-3-glucosid	n.b.
Cyanidin-3-rutinosid	n.b.
Delphinidin-3-glucosid	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Die Gegenwart von Procyanidinen wird angenommen, ist allerdings nicht bewiesen. Daten über die Polyphenole und deren Gehalte in Stachelbeersaft oder –nektar konnten nicht gefunden werden.

Sauerkirschen

Frucht

Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Sauerkirsche (*Prunus cerasus L.*), einer Steinfrucht, und ihrer Gehalte in den frischen Kirschen gibt es ebenfalls wenig und teils verwirrende Informationen. Bisher wurden fünf Klassen an Polyphenolen nachgewiesen (HERRMANN 1996e): Hydroxyzimtsäurederivate, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine, Flavonole, Anthocyane. In Tabelle 10 sind die bisher identifizierten Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in frischen Sauerkirschen aufgeführt.

Tabelle 10: Bisher identifizierte Polyphenole und die Schwankungsbreiten ihrer Gehalte in Sauerkirschen (¹RISCH UND HERRMANN 1988 (n = 6), ²THOMPSON et al. 1972, ³HENNIG 1980 (n = 3), ⁴HONG und WROLSTAD 1990 (n = 3))

Nachgewiesene Polyphenole	mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate¹	
Chlorogensäure	5,0 – 14,0
Neochlorogensäure	8,6 – 53,6
3-p-Coumaroylchinasäure	4,0 – 22,6
Flavan-3-ole¹	
(+)-Catechin	0,8 – 1,5
(-)-Epicatechin	0,4 – 15,2
Proanthocyanidine²	
B1	n.b.
B2	n.b.
B5	n.b.
C1	n.b.
E	n.b.
Flavonole³	
Quercetin-3-rutinosid	0,9 – 1,8
Quercetin-3-glucosid	0,2 – 0,3
Quercetin-3-rutinosyl-4'-diglucosid	n.n. – 0,5
Kaempferol-3-rutinosid	1,2 – 1,9
Kaempferol-3-glucosid	0,1
Kaempferol-3- rutinosyl-4'-diglucosid	0,1 – 0,3
Anthocyane⁴	
Cyanidin-3-glucosid	n.b. (3 – 15%)
Cyanidin-3-glucosylrutinosid	n.b. (69 – 77%)
Cyanidin-3-sophorosid	n.b. (1 – 3%)
Cyanidin-3-rutinosid	n.b. (11 – 16%)

n.b. = nicht bestimmt
n.n. = nicht nachweisbar

Der Gesamtanthocyanengehalt von Süß- und Sauerkirschen wird von CLIFFORD 2000 mit einer Spannweite von 50 – 4500 mg/kg Frischgewicht angegeben.

Saft

CEMEROGLU et al. 1994 untersuchten die Abnahme der Anthocyane in Sauerkirschsaft und -konzentrat während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen langen Lagerzeiten. Die Abnahme der Anthocyane zeigte sich als eine Reaktion annähernd 1. Ordnung, wie es auch für die Anthocyane in schwarzem Johannisbeerkonzentrat nachgewiesen wurde (siehe 2.1.5.). Unterschiede zwischen dem Saft (15°Brix) und den Konzentraten (45 und 71°Brix) bei gleichen Lagerbedingungen wurden festgestellt. Den größten Einfluss hatte allerdings die Temperatur. Die kinetischen Daten sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Kinetische Daten des Anthocyanabbaus bei der Lagerung von Sauerkirschsaft, -halbkonzentrat und -konzentrat

Extrakt in °Brix	Temperatur in °C	k (Kinetik-Konstante)	E _a (Aktivierungsenergie)	K ₀ (Frequenzfaktor)
15	50	3,99x10 ³ h ⁻¹	68,49 kJmol ⁻¹	3,37x10 ¹² h ⁻¹
	60	5,25x10 ³ h ⁻¹		
	70	12,29x10 ³ h ⁻¹		
	80	33,97x10 ³ h ⁻¹		
45	5	1,0x10 ³ d ⁻¹	65,17 kJmol ⁻¹	3,31x10 ¹³ d ⁻¹
	20	5,29x10 ³ d ⁻¹		
	37	18,44x10 ³ d ⁻¹		
	50	5,15x10 ³ h ⁻¹		
	60	10,99x10 ³ h ⁻¹	75,86 kJmol ⁻¹	2,88x10 ¹³ h ⁻¹
	70	24,31x10 ³ h ⁻¹		
	80	57,19x10 ³ h ⁻¹		
	71	0,82x10 ³ d ⁻¹		
20	6,55x10 ³ d ⁻¹			
37	23,89x10 ³ d ⁻¹			
50	7,50x10 ³ h ⁻¹	80,08 kJmol ⁻¹	8,29x10 ¹³ h ⁻¹	
60	18,75x10 ³ h ⁻¹			
70	40,47x10 ³ h ⁻¹			
80	97,14x10 ³ h ⁻¹			

Bei einer Temperatur von 80°C waren nach 8,1 Stunden die Hälfte der Anthocyane im Sauerkirschsaft, bestimmt mit einer photometrischen pH-shift-Methode, verschwunden, während dies bei einer Temperatur 50°C erst nach 70,54 Stunden der Fall war. Für die beiden Konzentrate war diese Halbwertszeit der Anthocyane mit steigendem Brixgrad bei den Temperaturen 80 und 50°C noch geringer (45°Brix: 4,4 bzw. 52,0 Stunden und 71°Brix: 2,8 bzw. 35,4 Stunden). Bei einer Lagerung des 71°Brix-Konzentrates bei 5°C war die Halbwertszeit der Anthocyane fast ein Jahr, was den starken Temperatureinfluss auf die Stabilität der Anthocyanen widerspiegelt.

Moosbeeren

Frucht

Die Moosbeere ist eine in nördlichen Breiten wildwachsende Beere, die zur botanischen Gattung *Vaccinium* (*V. oxycoccus* L.) gehört, zu der auch die Cranberry (*V. macrocarpon* Ait.), Hochbusch-Kulturheidelbeere (*V. corymbosum* L.), Waldheidelbeere (*V. myrtillus* L.), Preiselbeere (*V. vitis idaea* L.) und Moorbeere (*V. uliginosum* L.) gehören. Sie wird von manchen Autoren auch als wilde Cranberry angesehen (HÄKKINEN et al. 1999). Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Moosbeere ist kaum etwas bekannt. Da sich die Polyphenolmuster der oben genannten anderen *Vaccinium*-Arten stark unterscheiden

(HERRMANN 1996d), besonders bei den Anthocyanen, können wenig Rückschlüsse auf die phenolischen Inhaltsstoffe gezogen werden.

HÄKKINEN et al. 1999 geben für *V. oxycoccus* L. (dort als Cranberry bezeichnet) einen Gehalt an Quercetin von 83 – 121 mg/kg und Myricetin von 74 – 142 mg/kg Beeren nach Hydrolyse (n = 2) an. Im Gegensatz zur Cranberry wurden zur Moosbeere ansonsten keine verlässlichen Angaben in der Literatur gefunden.

2.1.7. Polyphenole und Gesundheit

Aufnahme der Polyphenole mit der Nahrung

Einer Reihe von Polyphenolen werden physiologische und pharmakologische Auswirkungen auf den menschlichen und tierischen Organismus zugeschrieben. Bisher sind über 4000 Polyphenole bekannt. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme an Flavonoiden, hauptsächlich durch Obst- und Gemüseprodukte sowie Tee, wird in einer älteren Arbeit mit insgesamt 1 g/Tag als Glykoside bzw. 650 mg/Tag als Aglykone angegeben (KÜHNAU 1976). Neuere Studien hingegen beziffern die tägliche Aufnahme von Flavonoiden für die Niederlande mit durchschnittlich 23 mg/Tag Flavonole und Flavone als Aglykone (HERTOG et al. 1993) und für Dänemark mit 75 – 150 mg/Tag Flavonoide als Glykoside (DRAGSTED et al. 1996) an. Relativ wenig ist über die Veränderungen der Polyphenole im menschlichen Körper nach der oralen Aufnahme bekannt. Oral aufgenommene Polyphenole unterliegen katabolischen Veränderungen, die in den unteren Regionen des gastro-intestinal Traktes stattfinden.

Epidemiologische Studien

In diversen epidemiologischen Studien wurden negative Korrelationen zwischen dem Polyphenolkonsum und verschiedenen chronischen Krankheiten, wie Herz- und Kreislauferkrankungen und Krebs, festgestellt (NEGRI et al. 1991, BLOCK et al. 1992, HERTOG et al. 1993, GOLDBERG et al. 1995). Diese Studien waren der Auslöser für die anhaltende Diskussion über die gesundheitlichen Wirkungen von Polyphenolen.

Bisherige epidemiologische Studien konnten keinen sicheren Nachweis für die positiven Effekte der Polyphenole auf die menschliche Gesundheit liefern. Sie sind sehr wahrscheinlich, werden aber auch kontrovers diskutiert (MULDOON und KRITCHEVSKI 1996).

Gesundheitliche Wirkung der Polyphenole

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich sehr widersprüchliche Aussagen zur gesundheitlichen Wirkung von Polyphenolen. Quercetin beispielsweise wird einerseits als Anticancerogen und Antioxidans in Säften und Weinen beschrieben (HERTOG 1998) und andererseits wird auf seine mutagenen (BJEDANES und CHANG 1977, MAC GREGOR 1984) und cancerogenen Eigenschaften (DUNNICK und HAILEY 1992) hingewiesen. Diese unterschiedlichen Bewertungen lassen sich auf die verschiedenen Testsysteme zurückführen, mit denen die Wirkungen der Polyphenole untersucht werden.

Viele der Effekte, die den Polyphenolen nachgesagt werden, sind als spekulativ anzusehen, da sie von *in vitro* Tests oder Modellversuchen hergeleitet werden. Für viele der beschriebenen Wirkungen fehlen Nachweise für die Wirkung *in vivo*.

Negative Effekte der Polyphenole

Aus einer Vielzahl von Untersuchungen lassen sich diverse Wirkungen von Polyphenolen ableiten, die in negative und positive Effekte eingeteilt werden können. In Tabelle 12 sind die negativen Effekte von Polyphenolen aufgezählt.

Der Einfluss von Polyphenolen auf die Absorption anderer Nahrungsmittelinhaltsstoffe kann je nach Sichtweise positiv oder negativ angesehen werden. Beispielsweise reagieren die Polyphenole mit Proteinen, so dass diese nicht umgesetzt und resorbiert werden können oder, im Fall von Enzymen, ihre Funktion nicht mehr ausüben können und so die Verdauung anderer Nahrungsmittelinhaltsstoffe, wie Polysaccharide, verringern (BUTLER und ROGLER 1992). So führt die Fütterung von grünen und schwarzen Teeblättern über einen Zeitraum von 75 Tagen bei Ratten zu einer Abnahme des Glucose- und Triglyceridgehaltes im Blut und zu einer Verringerung des Gewichtes im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (ZEYUAN et al. 1998).

Tabelle 12: Negative Wirkungen von Polyphenolen

Verringerung der Eisenverfügbarkeit	in Korrelation zum Polyphenolgehalt (DISLER et al. 1975, HALLBERG und ROSSANDER 1982, HURRELL 1990, HURRELL et al. 1997)
Mutagenität von Flavonolen: Quercetin	Quercetin ist mutagen (BJELDANES und CHANG 1977, MACGREGOR 1984), Quercetinglykoside sind nicht mutagen (GASPAR et al. 1993)
Hemmung von Verdauungsenzymen	(BUTLER und ROGLER 1992)
Deutliches Allergiepotehtial Kontaktdermatitis	Haptenwirkung (BENEZRA 1990)

Positive Effekte der Polyphenole

Die positiven Effekte einzelner Polyphenole auf die menschliche Gesundheit gründen sich zum Großteil auf die Wirkung der Polyphenole als Antioxidantien. Es existieren zahlreiche Veröffentlichungen und Monographien (HO et al. 1992, KUMPULAINEN und SALONEN 1995, RICE-EVANS und PACKER 1998) zu den positiven Wirkungen von Polyphenolen. Einige der teils angenommenen und teils bewiesenen positiven Wirkungen von Polyphenolen sind nachfolgend aufgeführt.

- **Antioxidative Wirkung**
- **Fänger von freien Radikalen und aggressiven Sauerstoffformen**
- **Schutz der Blutgefäße**
- **Hemmung der LDL-Oxidation**
- **Anticancerogene und antimutagene Wirkung**
- **Anti-entzündliche Eigenschaften**
- **Schutz vor UV- und ionisierender Strahlung**
- **Anti-bakterielle Eigenschaften**
- **Anti-virale Eigenschaften**
- **Anti-cariogene Eigenschaften**
- **Anti-Histamin-Wirkung**
- **antiallergene Wirkung**

- **Unterstützung der Vitamin C Wirkung**

Einige der aufgeführten Wirkungen sollen kurz näher beschrieben werden.

Antioxidative Wirkungen

Schutz vor oxidativem Stress

Bei sehr vielen biochemischen Prozessen in der Zelle und damit auch im menschlichen Organismus entstehen aus dem lebensnotwendigen Sauerstoff aggressive Formen, Radikale, die den Organismus schädigen können und daher rasch beseitigt werden müssen. Die Zelle hat effiziente Mechanismen zur Zerstörung und Beseitigung der aggressiven Sauerstoffspezies entwickelt. Diese antioxidativen Schutzmechanismen zur Beseitigung der schädlichen Sauerstoffspezies lassen sich in enzymatische und nicht enzymatische Entgiftungssysteme einteilen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Antioxidative Schutzmechanismen zur Beseitigung aggressiver Sauerstoffspezies

Antioxidativ wirksame Enzyme	Antioxidativ wirksame Substanzen
Superoxiddismutase	β-Carotin (Provitamin A), Carotinoide
Katalase	Vitamin C (L-Ascorbinsäure)
Peroxidasen	Vitamin E (Tocopherole)
Glutathionperoxidase	Glutathion
Enzymatische Reparaturmechanismen	Harnsäure
	Flavonoide
	Phenolcarbonsäuren
	andere Phenole
	Chlorophyllderivate

Die zur Eliminierung der aggressiven Sauerstoffspezies eingesetzten Enzyme kooperieren miteinander und werden von antioxidativ wirksamen Substanzen unterstützt.

Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung von aggressiven Sauerstoffspezies und den körpereigenen Abwehrmechanismen während der Stoffwechselfvorgänge im Körper, kann sogenannter „oxidativer Stress“ entstehen (SIES 1986, 1991). Dieser kann vor allem bei einem Mangel an antioxidativen Substanzen, wie in Tabelle 13 aufgezählt, entstehen. Die aggressiven Sauerstoffspezies, hauptsächlich verschiedene Sauerstoffradikale, sind durch die Oxidation und Schädigung von Lipoproteinen (Transportform von Lipiden im Blutkreislauf), Deoxyribonukleinsäuren (Träger der Erbinformation), Proteine (Enzyme, Strukturprotein), Kohlenhydrate (Zucker) und Lipiden (Fette) die Ursache für viele Krankheiten. Beispielsweise gilt die Oxidation von Low-Density Lipoprotein (LDL) durch aggressive Sauerstoffspezies als erste Stufe zur Entstehung der Arteriosklerose (STEINBERG et al. 1989). Andere Erkrankungen wie unterschiedliche entzündliche Prozesse, Gelenkerkrankungen wie Arthritis und Arthrosen, die Hyperlipoproteinämie bei chronischen Nierenerkrankungen, chronisches Leberversagen im Kindesalter, Pankreatitis und Morbus Crohn, Lungenerkrankungen und Krebserkrankungen etc. werden ebenfalls auf solche Schädigungen zurückgeführt (BÖHLES 1991).

Rolle und Wirkung der Polyphenole

Die positiven Effekte der Polyphenole auf die menschliche Gesundheit werden hauptsächlich auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt. Durch diese vermögen sie, auf zellulärer Ebene im menschlichen Körper schädliche Radikale abzufangen und so Radikal-Ketten-Reaktionen zu unterbrechen.

Damit schützen sie vermutlich Lipoproteine (RANKIN et al. 1988, LEAKE 1998), Lipide (HUANG und FRANKEL 1997, TERAO und PISKULA 1998), die DNA (ARIMOTO-KOBAYASHI et al. 1999, SAINT-CRICQ DE GAULEJAC et al. 1999), Proteine, wie das Strukturprotein Kollagen (KATO et al. 1997) und Kohlenhydrate vor Oxidation und Schädigung. Einige synergistische Effekte der Polyphenole mit den antioxidativen Vitaminen C (L-Ascorbinsäure) und E (α -Tocopherol) sowie Provitamin A (β -Carotin) werden ebenfalls angenommen (MUKAI et al. 1996, TERAO et al. 1994, UNTEN et al. 1997)

Die Polyphenole unterstützen also vermutlich aktiv (z.B. als Radikalfänger) und als Reaktionspartner (z.B. als Redukton) auf vielfältige Art die antioxidativen Schutzmechanismen des menschlichen Organismus und können so dem Auftreten von oxidativem Stress und seinen vielfältigen Folgen entgegenwirken.

In Fütterungsversuchen von Ratten mit Blättern des grünen Tee konnte diese unterstützende Wirkung bereits für einige Enzymsysteme (Superoxiddismutase, Katalase) nachgewiesen werden (LIN et al. 1998, ZEYUAN et al. 1998).

Antibakterielle und antivirale Wirkung

Die antibakterielle und antivirale Wirkung der Polyphenole hängt mit einer ihrer Hauptaufgaben in der Physiologie der Pflanzen, dem Schutz vor Infektionen durch Bakterien, Pilze und Viren (RHODES 1998), zusammen. Diese Wirkung beruht auf der Änderung der Permeabilität der Zellmembran und auf der Bindung und Denaturierung von lebenswichtigen Enzymen in den Bakterien, Pilzen oder Viren (SCALBERT 1991).

Die antimikrobielle Wirkung der Polyphenole ist vermutlich auch der Grund für die Wirkung gegen Zahnkaries (HATTORI et al. 1990).

Antiallergene und anti-Histamin Wirkung

Polyphenole wird zwar einerseits ein allergenes Potential zugeschrieben (BENEZRA 1990) andererseits werden aber auch antiallergene Wirkungen beschrieben (WAGNER 1989, OHMORI et al. 1995). Beispielsweise hemmen Polyphenole das Entstehen von Histamin, das eine wichtige Rolle beim Auftreten von Allergien besitzt (MATSUO et al. 1997).

Anticancerogene und antimutagene Wirkung

Umstrittener ist die Wirkung der Polyphenole als Anticancerogene und Antimutagene. Bisher ist die chemopräventive Wirkung verschiedener Polyphenole nachgewiesen, die sich auf der Hemmung der Aktivierung von präcancerogenen Vorstufen zu aktiven Cancerogenen durch Radikale zurückführen lassen. Die meisten anticancerogenen und -mutagenen Eigenschaften wurden für einzelne Polyphenole, Säfte oder Extrakte in verschiedenen *in vitro* Tests für bestimmte Krebsarten oder Krebsauslöser (Carcinogene) nachgewiesen (PERCHELLET et al. 1992, KANSANEN et al. 1995, SO et al. 1996, SIESS et al. 1997, SUSCHETET et al. 1998, CAROLL et al. 1998, SAMEJIMA et al. 1998, MIYAZAWA et al. 1999, IKKEN et al. 1999, ARIMOTO-KOBAYASHI et al. 1999)

Aufgrund der komplexen Vorgänge bei der Entstehung von Krebs und dem Krebsgeschehen, die bis heute nicht vollständig bekannt sind, sind die beschriebenen Effekte der Polyphenole schwer zu beurteilen. Daher werden ihre anticancerogenen und antimutagenen

Eigenschaften, die in einzelnen Bereichen der Cancerogenese festgestellt wurden, kontrovers diskutiert.

Absorption, Metabolismus und Bioverfügbarkeit von Polyphenolen

Über die Absorption, den Metabolismus und die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen im Menschen weiß man trotz zahlreicher Veröffentlichungen noch relativ wenig, obwohl diese Parameter entscheidend für die Entfaltung einer Wirkung von Polyphenolen im menschlichen Körper sind. Jede beschriebene Wirkung von bestimmten Polyphenolen bei *in vitro* Tests ist hinfällig, wenn diese Polyphenole vom menschlichen Organismus nicht oder nur in geringer Menge resorbiert werden oder nach oder während ihrer Aufnahme im Organismus metabolisch verändert werden. Sie würden dann nicht, in zu geringerer Konzentration oder in veränderter Form an ihren theoretischen Wirkungsort gelangen können. Die hohe Reaktivität der Polyphenole macht es zudem schwierig, die Übertragung von Erkenntnissen *in vitro* auf die Wirkung *in vivo* zu beurteilen, da die wichtigen Parameter Absorptionsrate, Bioverfügbarkeit, Eliminierungsgeschwindigkeit, Konjugatbildung etc. berücksichtigt und beurteilt werden müssen. Die Ergebnisse von *in vivo* Studien zur antioxidativen Kapazität des Serums und der Verringerung der LDL-Oxidation von Menschen nach der Gabe von Tee oder Rotwein sind widersprüchlich. SERAFINI et al. 1996 fanden nach einer Aufnahme von 300 mL schwarzem oder grünem Tee eine Zunahme der antioxidativen Kapazität des Serums, während MAXWELL und THORPE 1996 keine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Serums nachweisen konnten. Die Aufnahme von Rotwein konnte ebenfalls die antioxidative Kapazität des Serums erhöhen (MAXWELL et al. 1994, WHITEHEAD et al. 1995) und die Anfälligkeit des LDL für Oxidation verringern (FUHRMAN et al. 1995), was allerdings wiederum von DE RIJKE et al. 1996 in einer ähnlichen Studie nicht bestätigt werden konnte.

Im Rahmen des der Arbeit zu Grunde liegenden AIF-Projektes konnte ein Anstieg der antioxidativen Kapazität im Serum von Menschen nach der Applikation von 200 mL polyphenolreichem schwarzem Johannisbeersaft und 700 mL polyphenolreichem naturtrübem Apfelsaft nachgewiesen werden (NETZEL et al. 1999b). Dieses Ergebnis widerspricht allerdings den Ergebnissen von YOUNG et al. 1999, die in einer größeren Studie nach Gabe eines 1:1 Gemisches von Apfel- und schwarzem Johannisbeersaft keinen Anstieg der antioxidativen Kapazität im Serum fanden.

Dass auch oligo- und polymere Polyphenole wahrscheinlich für den Organismus verwertbar sind und zur Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Serums beitragen, konnte im Tierversuch an Ratten nach Gabe eines proanthocyanidinreichen Traubenkernextraktes bereits nachgewiesen werden (KOGA et al. 1999). Untersuchungen mit menschlichen Zelllinien von Darmwandzellen (CaCo-2) zur Bioverfügbarkeit von Procyanidinen zeigten eine Absorption von dimeren und trimeren Procyanidinen, was allerdings in *in vivo* Untersuchungen noch bestätigt werden muss (SANTOS-BUELGA und SCALBERT 2000).

In Studien, in denen hohe Dosen eines Flavonoids als Aglykon (Quercetin, Epicatechin, Catechin) oral verabreicht und anschließend die mit dem Urin ausgeschiedene Menge bestimmt wurden, ergaben sich je nach Flavonoid Absorptionsraten zwischen 4 und 58%. Nach der oralen Gabe von Kaffeesäure konnten im Urin Kaffeesäure, Ferulasäure, Isoferulasäure, p-Coumarsäure und Vanillinsäure nachgewiesen werden (JACOBSON et al. 1983). Die unphysiologisch hohen Dosen und die Verabreichung von Quercetin, das in der Nahrung nicht als Aglykon vorkommt, wie auch der Kaffeesäure lassen allerdings Zweifel an der Relevanz der Daten aufkommen. Über die Absorption von Polyphenolen aus der normalen Ernährung gibt es nahezu keine Informationen. In der Nahrung liegen bis auf die Flavan-3-ole alle Flavonoide glykosidisch gebunden vor. Lange Zeit wurde angenommen, dass nur Aglykone aufgenommen werden können und Flavonoidglykoside erst durch die intestinale Darmflora mikrobiell in Aglykon und Glykosid gespalten werden müssten, um für den Organismus verfügbar zu sein. Neuere Studien scheinen aber zu belegen, dass beispielsweise Quercetinglykoside ebenso und sogar besser als das entsprechenden Aglykon Quercetin aufgenommen werden (HOLLMAN et al. 1995). Dies wurde am Beispiel

von Zwiebeln nachgewiesen. Die unveränderte Aufnahme von Anthocyanglykosiden aus polyphenolreichem schwarzen Johannisbeersaft und Holunderbeersaft, die im Rahmen des AIF-Projektes für diese Studien hergestellt wurden (siehe 1.2.), konnte erstmals nachgewiesen werden (NETZEL et al. 1999, 1999a). Für die Anthocyanglykoside aus Rotwein (LAPIDOT et al. 1998) sowie Cyanidinglykoside (MIYAZAWA et al. 1999a) wurde dies kürzlich ebenfalls nachgewiesen. Ebenfalls im Rahmen des AIF-Projektes wurde die Aufnahme von Kaffeesäure, dem Spaltprodukt der Chlorogensäure, aus polyphenolreichen Apfelsäften nachgewiesen. Diese Ergebnisse belegen, dass Polyphenole mit der Nahrung und speziell aus Fruchtsaft vom Menschen aufgenommen werden, was die Grundvoraussetzung für die Entfaltung einer Wirkung im Organismus ist. Des Weiteren konnte die Bioverfügbarkeit von Gallussäure (BITSCH et al. 1997), den Flavan-3-olen, Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechin-3-O-gallat Epicatechin-3-O-gallat (LEE et al. 1995, UNNO et al. 1996) und Phloridzin (PAGANGA und RICE-EVANS 1997) nachgewiesen werden.

Eine Beeinflussung der Flavonoidabsorption durch Bindung an Proteine in der Nahrung wird angenommen (HASLAM 1989) und konnte für Flavan-3-ole aus Tee, der mit und ohne Milch getrunken wurde, nachgewiesen werden (SERAFINI et al. 1996).

Der Metabolismus der Polyphenole findet hauptsächlich im Dickdarm durch Bakterien und nach der Absorption in der Leber statt (HOLLMAN und KATAN 1998). Dabei werden die Polyphenole von der Dickdarmmikroflora in einfachere Substanzen umgewandelt, wie etwa Benzoesäure, Hydroxybenzoesäure und Hydroxyphenylelessigsäuren, die dann absorbiert, metabolisiert und ausgeschieden werden (BOOTH et al. 1957, SCHELINE 1991, GRAEFE und VEIT 1999, CLIFFORD 2000a). Ob und welche Rolle andere Organe, wie Niere oder Darmwand, eine Rolle spielen, wurde bisher nicht untersucht. In der Leber werden aufgenommene Polyphenole oder ihre Metabolite aus der Dickdarmflora glucuronisiert und sulfatiert. Auch eine Methoxylierung von phenolischen Hydroxylgruppen wurde nachgewiesen. Nur geringe Mengen werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden, was sich bei den oben erwähnten Studien im Rahmen des AIF-Projektes ebenfalls zeigte, da nur maximal 0,06% der Anthocyanglykoside aus schwarzem Johannisbeersaft unverändert ausgeschieden wurden. Nicht aufgenommene Polyphenole werden im Dickdarm von Bakterien abgebaut und die Abbauprodukte ausgeschieden. Die wichtigsten Reaktionen der Bakterien sind die Hydrolyse von Konjugaten und Glykosiden sowie die Ringspaltung der Aglykone bei Flavonoiden. Zum Teil werden im Dickdarm entstandene Metabolite der Polyphenole absorbiert und ausgeschieden. Auch werden bisher die Aspekte der Stabilität und chemischen Veränderungen der Polyphenole bei physiologischen pH-Werten (> 7) im Intestinaltrakt und Serum des Menschen (ZHU et al. 1997) kaum betrachtet. So ändert sich beispielsweise bei Catechinen aus Tee (NANJO et al. 1996) und Anthocyanen aus Rotwein (LAPIDOT et al. 1999) die antioxidative Kapazität mit steigenden pH-Wert signifikant.

Um den Einfluss der Polyphenole auf die menschliche Gesundheit besser und genauer beurteilen zu können, werden mehr Informationen über die Absorption, die Bioverfügbarkeit, den Metabolismus einzelner Polyphenole sowie die Einflüsse der Matrix in der Nahrung auf einzelne Polyphenole benötigt. Dies ist aufgrund des Fehlens genügend genauer und selektiver analytischer Methoden zum Nachweis von Polyphenolen und ihren Metaboliten in Blutplasma, Gewebe und Urin schwierig und eine Aufgabe für die Zukunft.

2.2. Bestimmung der antioxidative Kapazität

Die antioxidative Wirkung der Polyphenole nimmt eine zentrale Stellung in deren gesundheitlich positiven Wirkungen auf den Menschen ein. Zur Bewertung der antioxidativen Wirkung von Polyphenolen oder anderen Antioxidantien existieren in der Praxis diverse Methoden zur Bestimmung der **antioxidativen Kapazität** einer Probe, als ein **Maß für den Gehalt an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen**. Zur Beurteilung einer Veränderung des Gehaltes an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen bei den Stufenkontrollen während der Herstellung von Fruchtsaftproben wird eine schnelle Bestimmungsmethode für die

antioxidative Kapazität der Proben vor Ort benötigt, um die Veränderungen in den Proben durch längere Lagerung zu vermeiden.

Es existieren allerdings diverse Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität, die sich in Messprinzip, der chemischen Zusammensetzung und Funktionsweise des Testsystems und dem Reaktionsmechanismus, der zur Erfassung der antioxidativen Kapazität benutzt wird, unterscheiden. Die Methoden dienen im Prinzip der Beschreibung des Einflusses der Probe auf den „Redoxstatus“ eines Systems. Nachfolgend sind die wichtigsten Methoden und die Literatur zu den wichtigsten Varianten der Tests aufgeführt.

- **LDL-Oxidations-Test** (FRANKEL et al. 1993, KANNER et al. 1994, LARANJINHA et al. 1995, NATELLA et al. 1999)
- **Liposom-Oxidations-Test** (HUANG et al. 1997, MIYAKE et al. 1997)
- **ABTS⁺-Radikalfänger-Test** (Trolox-Äquivalent-Antioxidative-Capacity TEAC-Methode) (MILLER et al. 1993, MILLER et al. 1996, MILLER und RICE-EVANS 1997a)
- **DMPD-Test** (N,N-Dimethyl-p-phenyldiamin dihydrochlorid) (FOGLIANO et al. 1999)
- **DPPH-Test** (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) (BLOIS 1958, MASUDA et al. 1999)
- **Chemilumineszenz-Test** (WHITEHEAD et al. 1992, KONDO et al. 1999)
- **Hypoxanthin/Xanthinoxidase Test** (SAINT-CRICQ DE GAULEJAC et al. 1999)
- **ORAC_{ROO}-Test** (Oxygen-Radical-Absorbance-Capacity) (CAO et al. 1993) bzw. **TRAP-Test** (Total-Radical-Trapping-Antioxidant-Parameter) (GHISELLI et al. 1994)
- **Kinetischer Crocin-Bleichungs-Test** (TUBARO et al. 1996, NATELLA et al. 1999)
- **Tests zur Hemmung der Linolsäureoxidation auch β -Carotin-Bleichungs-Test** (MARCO 1968, MIYAKE et al. 1997, HEINONEN et al. 1998a, KUO et al. 1999, LAPIDOT et al. 1999)
- **Eisen reduzierender/antioxidativ Test** (Ferric Reducing/Antioxidant Power FRAP-Test) (BENZIE und STRAIN 1996)

Bei den meisten Tests wird eine Bezugssubstanz für die antioxidative Kapazität verwendet, wobei das wasserlösliche Tocopherol Trolox, ein Vitamin E-Analogon, am weitesten verbreitet ist. Eine andere Möglichkeit zur Beschreibung der antioxidativen Kapazität ist die Bestimmung des IC₅₀-Wertes, d.h. die Konzentration Antioxidans oder Probe, bei der die Hemmung der Oxidation 50% beträgt. Je kleiner der IC₅₀ in einem gegebenen Testsystem ist, desto besser ist die antioxidative Wirkung der Probe. Der LDL-Oxidations-Test, der wegen seiner Nähe zum Geschehen bei der Entstehung der Arteriosklerose im menschlichen Organismus auch als ein *ex vivo* Test bezeichnet wird, und der ABTS⁺-Radikalfänger-Test sind, in ihren verschiedenen Varianten, die in der Literatur am häufigsten verwendeten Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität. Allerdings ist der LDL-Oxidations-Test erheblich material- und zeitaufwendiger als der ABTS⁺-Radikalfänger-Test, der sich deswegen besser für die in der Arbeit vorliegende Problemstellung der Verarbeitungsstudien eignet. Für schwarzen Johannisbeersaft wurde im Rahmen des AIF-Projektes zudem eine gute Korrelation zwischen LDL-Oxidations-Test und ABTS⁺-Radikalfänger-Test gefunden.

Aufgrund der Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden können die Ergebnisse der Methoden für dieselbe Probe häufig sehr unterschiedlich sein. So ergab ein Vergleich der antioxidativen Kapazität von sieben Substanzen, die bestimmte Gruppen von Antioxidantien repräsentieren sollen (L-Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Trolox, Kaftarsäure, Catechin, Quercetin, Rutin), bestimmt mit vier verschiedenen *in vitro* Methoden, deutliche Unterschiede von Methode zu Methode (BADERSCHNEIDER et al. 1999). Die Gründe für diese Unterschiede liegen einerseits in der Art der zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität verwendeten Reaktion, die meist nur eine bestimmte antioxidative Eigenschaft erfasst, und andererseits im Medium (wässrig oder organisch), in dem die Methode durchgeführt wird. Dabei spielen lipo- bzw. hydrophile Eigenschaften der untersuchten Antioxidantien eine wichtige Rolle. Wenn eine andere Methode andere antioxidative Eigenschaften erfasst, sind die Ergebnisse daher meist unterschiedlich und nicht miteinander vergleichbar. Selbst bei einer Methode kann sich die antioxidative Kapazität eines Polyphenols durch Variation einiger Parameter im Testsystem stark verändern und zwar sogar so stark, dass eine Probe plötzlich prooxidative Eigenschaften aufweist (SATUÉ-GRACIA et al. 1997). Deshalb sollte die Aussagekraft der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität nicht überbewertet werden, zumal grundlegende Informationen über Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Wirkung im Organismus der Polyphenole kaum vorhanden sind (siehe 2.1.7.).

2.2.1. Die antioxidative Kapazität von Polyphenolen, Fruchtsäften, -extrakten und –wein

Einzelne Polyphenole

Die antioxidative Kapazität einzelner Polyphenole ist stark vom verwendeten Testsystem und vor allem von der molekularen Struktur abhängig. In Tabelle 14 sind die antioxidativen Kapazitäten einiger Polyphenole und antioxidativer Vitamine mit zwei verschiedenen Testsystemen aufgeführt. Die Unterschiede der antioxidativen Kapazität eines Polyphenols in den drei Testsystemen zeigt deutlich die Schwierigkeit und Problematik bei der Beurteilung der antioxidativen Kapazität. Zudem lässt die Betrachtung von Einzelsubstanzen Wechselwirkungen und Synergismen der Polyphenole untereinander oder mit anderen Inhaltsstoffen eines Lebensmittels außer acht.

Einige Untersuchungen versuchen Beziehungen zwischen der Struktur und der antioxidativen Kapazität von Polyphenolen in einem Test herzuleiten. So konnten beispielsweise für den ABTS⁺-Test klare Beziehungen zwischen bestimmten Strukturelementen von Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren, wie Hydroxylgruppen, Methoxygruppen an den aromatischen Ringen, Ketogruppen, Hydroxylgruppen, Doppelbindungen am Pyranring, und der antioxidativen Kapazität der einzelnen Polyphenole gefunden werden (RICE-EVANS et al. 1996, RICE-EVANS und MILLER 1998a).

Über die antioxidative Kapazität von polymeren Polyphenolen, Tanninen und Proanthocyanidinen, die analytisch schwer zu erfassen sind, aber in vielen Früchten vermutlich in größeren Mengen enthalten sind (siehe 2.1.4. – 2.1.6.), ist bisher wenig bekannt. Neuere Untersuchungen über die antioxidative Kapazität einiger dimerer Procyanidine zeigen, dass ihre antioxidative Kapazität im Hypoxanthin/Xanthinoxidase-Test teilweise niedriger und teilweise höher als die ihrer monomeren Bausteine Catechin und Epicatechin ist (SAINT-CRICQ DE GAULEJAC et al. 1999). Die teils recht großen Unterschiede werden von den Autoren auf die verschiedenen Interflavanverknüpfungen (4- β -8- oder 4- β -6-) und die stereochemischen Unterschiede zurückgeführt.

Tabelle 14: Antioxidative Kapazität einiger Polyphenole mit zwei verschiedenen Testsystemen

Nachgewiesene Polyphenole	TEAC in mmol/L Trolox (RICE-EVANS et al. 1996, RICE-EVANS und MILLER 1998a, MILLER und RICE-EVANS 1997)	ORAC _{ROO} in mmol/L Trolox (GUO et al. 1997)
Flavanol		
Catechin	2,40 ± 0,05	2,49 ± 0,07
Epicatechin	2,50 ± 0,02	2,36 ± 0,13
Epigallocatechin	3,80 ± 0,06	n.b.
Epicatechingallat	4,90 ± 0,02	n.b.
Epigallocatechingallat	4,80 ± 0,06	n.b.
Flavonol		
Quercetin	4,70 ± 0,1	3,29 ± 0,12
Quercetin-3-rutinosid	2,40 ± 0,06	0,56 ± 0,07
Myricetin	3,10 ± 0,3	n.b.
Kaempferol	1,34 ± 0,08	2,67 ± 0,13
Anthocyanidine		
Delphinidin	4,44 ± 0,11	n.b.
Cyanidin	4,40 ± 0,12	n.b.
Cyanidin-3-rutinosid	3,25 ± 0,1	n.b.
Cyanidin-3-galaktosid	2,90 ± 0,03	n.b.
Päonidin	2,22 ± 0,2	n.b.
Malvidin	2,06 ± 0,1	n.b.
Pelargonidin	1,30 ± 0,1	0,96 ± 0,02
Hydroxyzimtsäuren		
Kaffeesäure	1,26 ± 0,01	2,23 ± 0,25
Chlorogensäure	1,24 ± 0,02	n.b.
p-Coumarsäure	2,22 ± 0,06	1,09 ± 0,06
Ferulasäure	1,90 ± 0,02	1,33 ± 0,06
Hydroxybenzoesäuren		
Gallussäure	3,01 ± 0,05	1,74 ± 0,08
Protocatechusäure	1,19 ± 0,04	2,06 ± 0,21
p-Hydroxybenzoesäure	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Vitamine		
L-Ascorbinsäure (Vit. C)	1,00 ± 0,04	n.b.
α-Tocopherol (Vit. E)	n.b.	n.b.
β-Carotin (Provitamin A)	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Fruchtextakte und Einfluss des Polyphenolmusters

Die antioxidative Kapazität der Extrakte diverser Früchte, Gemüse und Pflanzen wurde mit verschiedenen Methoden untersucht (GUO et al. 1997, MEYER et al. 1997, HEINONEN et al. 1998b, BENZIE und SZETO 1999, MASUDA et al. 1999), um die Einflüsse des Polyphenolmusters, also eventuelle synergistische und antagonistische Effekte, auf die antioxidative Kapazität zu klären. Ein Teil der Ergebnisse ist in Tabelle 15 dargestellt.

Die Extrakte der Beerenfrüchte wurden mit Aceton/Wasser (70/30 v/v) und die Extrakte der Traubensorten mit Methanol/Wasser (60/40 v/v) hergestellt.

Tabelle 15: Inhibition der LDL-Oxidation durch Extrakte von verschiedenen Beerenfrüchten und verschiedenen Traubensorten

Beerenfrüchte (HEINONEN et al. 1998b)	Inhibition der LDL-Oxidation in % bei 10 µM GAE	Gesamtphenolgehalt der Extrakte in mg/L GAE
Brombeere	83,9 ± 0,2	4350
Heidelbeere	64,8 ± 1,0	3480
Himbeere	78,8 ± 0,2	3030
Erdbeere	53,9 ± 4,1	2940
Süßkirsche	72,7 ± 2,8	839
Rebsorte (MEYER et al. 1997)		
Petit Sirah	39,0 ± 2,5	963
Cabernet Sauvignon	44,3 ± 3,4	575
Cabernet Franc	47,2 ± 6,3	529
Merlot	47,0 ± 1,2	497
Sauvignon Blanc	44,2 ± 3,2	272
Chardonnay	46,0 ± 0,9	218
Thompson seedless	30,2 ± 2,6	242

GAE = Gallussäure-Equivalente

Nach Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu wurden die Extrakte für die Untersuchungen der Inhibition der LDL-Oxidation so verdünnt, dass im Testsystem eine einheitliche Konzentration 10 µM GAE vorhanden war. Weder HEINONEN et al. 1998b noch MEYER et al. 1997 konnten eine ausreichende Korrelation zwischen den mittels HPLC ermittelten Anteilen der einzelnen Polyphenolgruppen, Anthocyanen, Hydroxymitsäurederivaten, Flavan-3-olen, Flavonolen, und der relativen antioxidativen Kapazität feststellen. Bei den Traubensorten zeigte sich nur, dass Tafeltraubensorten (z.B. Thompson seedless) im Vergleich eine geringere antioxidative Kapazität aufwiesen als die klassischen Traubensorten zur Weinbereitung (z.B. Chardonnay) und dass die Anthocyane, die nur bei den roten Traubensorten vorhanden sind, keinen signifikanten Einfluss zu haben scheinen. Bei den Beerenfrüchten waren die Unterschiede in der relativen antioxidativen Kapazität größer, da auch die Unterschiede in den Polyphenolmustern größer sind.

Fruchtsäfte

Um die antioxidativen Kapazitäten der Getränke miteinander vergleichen zu können, muss zur Angabe ihrer antioxidativen Kapazität eine Bezugssubstanz verwendet werden. Das wasserlösliche Tocopherol und Vitamin E-Analogon Trolox hat sich als Bezugssubstanz in den meisten Testsystemen durchgesetzt, so dass die Angabe der antioxidativen Kapazität unabhängig vom verwendeten Testsystem als TEAC-Wert erfolgt. In Tabelle 16 sind die antioxidativen Kapazitäten einiger Weine, Fruchtsäfte und –nektare, mit verschiedenen Testsystemen ermittelt, aufgeführt.

In zwei der Untersuchungen wurde eine deutliche Korrelation der antioxidativen Kapazität mit dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu nachgewiesen (RECHNER et al. 1997, HENN und STEHLE 1998).

MILLER und RICE-EVANS 1997 versuchten die Anteile der einzelnen Polyphenole sowie der L-Ascorbinsäure an der antioxidativen Kapazität eines Orangensaftes, eines Apfelsaftes und eines schwarzen Johannisbeer-Getränk (Ribena) zu bestimmen. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgte mit dem ABTS⁺-Radikalfänger-Test. Der Anteil der L-Ascorbinsäure betrug beim Apfelsaft 6%, beim Orangensaft 87% und beim schwarze Johannisbeer-Getränk 74%. Beim Apfelsaft hatte die Chlorogensäure mit 41% den größten Anteil an der antioxidativen Kapazität, gefolgt von p-Coumaroylchinasäure (20%), Phloretin-2'-xyloglucosid (10%), Phloridzin (7%) und Epicatechin (4%). Die übrigen 13% der antioxidativen Kapazität konnten keiner Substanz zugeordnet werden. Beim Orangensaft

stellten die Hauptpolyphenole Hesperidin 6% und Narirutin 2% der antioxidativen Kapazität, während 5% nicht zugeordnet werden konnten. Beim schwarzen Johannisbeer-Getränk stellten die vier Hauptanthocyane zusammen genommen 5,1% der antioxidativen Kapazität, während 21% nicht zugeordnet werden konnten.

Tabelle 16: Antioxidative Kapazität von Weinen, einigen Fruchtsäften und -nektaren

Getränk	TEAC in mmol/L Trolox (RECHNER et al. 1997)	TEAC in mmol/L Trolox und (HENN STEHLE 1998)	Chemoluminiszenz-Test in mmol/L Trolox (WHITEHEAD et al. 1995)
Apfelsaft	1,4 – 2,1 (n = 2)	1,3 – 2,0 (n = 4)	7,89 (n = 1)
Orangensaft	3,0 (n = 1)	2,1 – 4,0 (n = 4)	2,00 (n = 1)
Weißer Traubensaft	0,2 – 0,6 (n = 2)	n.b.	0,68 (n = 1)
Roter Traubensaft	2,2 – 14,1 (n = 6)	3,5 – 5,9 (n = 4)	n.b.
Weißwein	n.b.	0,4 – 2,4 (n = 9)	0,87 – 1,28 (n = 4)
Rotwein	11,1 – 14,7 (n = 4)	6,8 – 21,4 (n = 41)	10,00 – 20,73 (n = 9)
Schwarzer Johannisbeernektar	6,8 – 12,0 (n = 7)	6,2 – 11,2 (n = 3)	n.b.
Schwarzer Johannisbeersaft	24,6 – 39,1 (n = 10)	n.b.	n.b.
Grapefruitsaft	2,2 (n = 1)	3,0 – 3,7 (n = 2)	n.b.
Sauerkirschnektar	4,1 – 12,7 (n = 5)	n.b.	n.b.
Brombeernektar	5,8 (n = 1)	n.b.	n.b.
Heidelbeernektar	11,9 (n = 1)	n.b.	n.b.
Speierlingsaft	146,0 (n = 1)	n.b.	n.b.

n = Probenzahl, n.b. = nicht bestimmt

Neben der Betrachtung der antioxidativen Kapazität eines Getränkes als absoluten Wert, bezogen auf eine Bezugssubstanz (quantitativ), ist eine Beurteilung des Einflusses der Polyphenolzusammensetzung des Saftes (qualitativ) ebenfalls interessant. VINSON et al. 1999 untersuchten diesen Einfluss bei einigen Getränken mittels der Hemmung der LDL-Oxidation (Tabelle 17).

Daraus ergibt sich für die „antioxidative Qualität“ der Getränke: Schwarzer Tee > Kaffee > Pflaumensaft = Bier > Grüner Tee > Orangensaft > Rotwein > Mandarinsaft > Roter Traubensaft > Weißer Traubensaft > Grapefruitsaft. Die L-Ascorbinsäure hat in diesem Testsystem einen wesentlich geringeren Einfluss als beim ABTS⁺-Test (siehe Tabelle 14).

Tabelle 17: Hemmkonstante IC₅₀ der LDL-Oxidation der Polyphenole einiger Getränke (VINSON et al. 1999)

Getränk	Hemmkonstante IC ₅₀ der LDL-Oxidation in µM
Orangensaft	0,42
Mandarinensaft	0,50
Grapefruitsaft	0,95
Pflaumensaft	0,30
Kaffee	0,26
Schwarzer Tee	0,23
Grüner Tee	0,38
Weißer Traubensaft	0,70
Roter Traubensaft	0,65
Rotwein	0,45
Lagerbier	0,30

Fruchtweine

Die antioxidative Kapazität von einigen Fruchtweinen aus verschiedenen Beerenfrüchten wurden von HEINONEN et al. 1998a untersucht. Als Testsystem wurde die Hemmung der Oxidation von Methyllinolat in der Wärme (40°C im Dunkeln) verwendet, die durch Messung der Extinktion bei 234 nm (Hydroperoxide) bestimmt wurde. Die Hemmung durch 50 bzw. 200 µL aufgearbeiteten Fruchtwein wurde in Prozent bezogen auf die Kontrolle nach Erreichen eines Hydroperoxidgehalt von 400 bzw. 800 mmol/kg angegeben (Tabelle 18).

Tabelle 18: Hemmung der Peroxidbildung von Methyllinolat durch aufgearbeitete Fruchtweine bei zwei verschiedenen Probenmengen sowie Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu der Fruchtweine und der Polyphenolgehalt in 50 µL Probe berechnet als Gallussäure-Equivalente (GAE)

Fruchtwein	Gesamtphenolgehalt der Weine in mg/L GAE	µM GAE in 50 µL	Hemmung in % von 50 µL (800 mmol/kg)	Hemmung in % von 200 µL (800 mmol/kg)
Schw. Johannisbeer-Heidelbeerwein (2/1)	1060	275	91	97
Schw. Johannisbeerwein (n = 5)	520 – 1820	120 – 880	5 – 65	13 – 98
Schw. Johannisbeer-Erdbeerwein (4/1)	950	225	8	97
Roter Johannisbeerwein (n = 2)	440 – 470	100 – 110	39 – 41	44 – 96
Roter u. schw. Johannisbeerwein (3/4)	515	205	48	85
Cranberrywein	680	160	92	52
Apfelwein (n = 4)	240 – 470	38 – 110	22 – 84	42 – 90

GAE = Gallussäure-Equivalente

Zur Untersuchung war eine Festphasenextraktion der Polyphenole aus den Fruchtweinen nötig, um die den Test störenden Zucker zu entfernen. Es konnte von den Autoren keine Korrelation mit dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der Hemmung der Oxidation des Methyllinolat festgestellt werden.

3. Methoden

Eine detaillierte Betrachtung und Bewertung der Einflüsse der Verarbeitungstechnik auf antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe bei der Fruchtsaftherstellung erfordert gut reproduzierbare und leistungsfähige Analysenmethoden zur Untersuchung der Proben. Für die Stufenkontrollen sind eine schnelle und einfache Aufarbeitung und Messung der Proben notwendig, um Veränderungen der Proben durch Lagerung und lange Wartezeiten zu vermeiden.

3.1. Polyphenolanalytik

3.1.1. Polyphenolmuster und -gehalte mittels HPLC

Die qualitative und quantitative Bestimmung der in Proben enthaltenen Polyphenole kann wichtige Ergebnisse über Sortenunterschiede und die Art und Weise der Einflussnahme der angewendeten Verarbeitungstechnik liefern.

Für die Polyphenolanalytik in den anfallenden Proben lag keine Methode vor, die diese Bedingungen ausreichend erfüllt, so dass eine neue Methode für die notwendige Analyse der einzelnen Polyphenole in Säften entwickelt wurde. Ziel sollte eine einfache Probenvorbereitung, eine gute Trennung der Substanzen, eine gleichzeitige Bestimmung von farblosen Polyphenolen und Anthocyanen, eine kurze Analysendauer sowie eine hohe Empfindlichkeit sein. Viele in der Literatur beschriebenen Methoden erfüllen diese Zielsetzung nicht ausreichend. Daher wurde bei der Entwicklung zur Verbesserung der Polyphenolanalytik mittels HPLC eine neue fluorierte RP-Phase und zusätzlich zur üblichen UV/Vis-Detektion eine elektrochemische Detektion verwendet.

Geräte:

HPLC-System	: Hewlett Packard HP 1090 Series II HPLC System
Detektor 1	: DAD Hewlett Packard HP 1090 Series II HPLC System
Wellenlängen	: Kanäle frei wählbar von 190-600 nm Polyphenole allgemein 280 nm Hydroxyzimtsäurederivate 320 nm Flavonole 360 nm Anthocyane 525 nm
Detektor 2	: Trace TED 4020
Elektrode	: silanierte Platinelektrode
DC-Amperometrie	: 500 mV, Messbereich: 200 nA, Offset: 20 nA
PAD	: 0.00 - 0.39 min 500 mV (Delay-Phase) 0.40 - 0.70 min 500 mV (Integrationsphase) 0.71 - 0.79 min 900 mV (Oxidation) 0.80 - 0.85 min -100 mV (Reduktion) Messbereich: 2000 nC, Offset: 0,
Säule	: Fluofix 120 E; 250 - 4,6; 5 µm, NEOS Company Ltd., Kobe, Japan

Chemikalien:

Acetonitril gradient grade; o-Phosphorsäure 85%; doppelt entmineral. Wasser
Polyphenol Standards von Roth ; Extrasynthese, Genay, Frankreich; Aldrich; Fluka; Sigma Chemicals Co., Steinheim

Fließmittel:

- A. Doppelt entmineral. Wasser / 85%ige o-Phosphorsäure (99,5 / 0,5 v/v)
- B. Acetonitril / doppelt entmineral. Wasser / 85%ige o-Phosphorsäure (50 / 49,5 / 0,5 v/v/v)
- C. Acetonitril / doppelt entmineral. Wasser (50 / 50 v/v)

Die Fließmittel müssen vor ihrer Verwendung membranfiltriert (0,45 µm) und entgast werden. Fließmittel C dient zum Spülen der Säule.

Die Mischungsverhältnisse sind additiv, d. h. 1 Liter Fließmittel A setzt sich aus 995 mL doppelt entmineral. Wasser und 5 mL 85%iger o-Phosphorsäure zusammen. Die Fließmittel sollten nicht länger als 5 Tage aufbewahrt werden. Wird das Gerät länger nicht benutzt, sind die Fließmittelbehälter sowie der Abfallbehälter zu entfernen und die Ansaugfritten zu reinigen.

Der Fließmittel-Abfall wird in einer Plastikwanne als Schutzunterlage zur Entsorgung mit NaOH-Plätzchen auf ca. pH>9 gebracht und mit ca. 25ml Perhydrol (Wasserstoffperoxid 30%ig) versetzt. Dabei den Deckel der Flasche nicht zuschrauben. Am nächsten Tag kann der Abfall bei fließendem Wasser in den Abguss entsorgt werden.

Chromatographie-Bedingungen:

Säulentemperatur : 25 °C
Fluss : 1 mL/min

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	A	B
0.0	100%	0%
5.0	100%	0%
45.0	75%	25%
65.0	0%	100%
70.0	0%	100%
70.1	100%	0%
89.9	100%	0%

Standardabweichung und Nachweisgrenzen:

Die Bestimmung der Standardabweichung erfolgte durch fünfmaliges Injizieren von 10 µL einer Standardlösung einzelner Polyphenole. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden durch eine Verdünnungsreihe der Standardlösungen bei einem Injektionsvolumen von 10 µL bestimmt. Als Nachweisgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 2:1 angenommen, als Bestimmungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 5:1.

Standardabweichung der Bestimmung (n = 5): ± 2%

Tabelle 19: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einiger Polyphenole bei einem Injektionsvolumen von 10 µL

	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
Flavan-3-ole (280 nm)	1 mg/L	2 mg/L
Chlorogensäure (320 nm)	0,5 mg/L	1 mg/L
Phloridzin (280 nm)	0,2 mg/L	0,5 mg/L
Cyanidin-3-rutinosid (525 nm)	1 mg/L	2 mg/L

Identifizierung und Quantifizierung:

Zur Identifizierung von Chromatogrammpeaks wurden Standardsubstanzen verwendet. Durch Vergleich der Retentionszeit, Addieren von Standardsubstanz zur Probe und dem Vergleich der UV/Vis-Spektren mittels Dioden-Array-Detektion (DAD) bzw. der Reaktion bei der elektrochemischen Detektion wurde die Identifikation eines Chromatogrammpeaks verifiziert. Waren keine Standardsubstanzen erhältlich, wurde eine tendenzielle Identifikation anhand von Retentionszeit, UV/Vis-Spektrum sowie Verhalten bei der elektrochemischen Detektion basierend auf Angaben in der Literatur vorgenommen.

Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls über Standardsubstanzen. Bei tendenziell identifizierten Chromatogrammpeaks wurde die Quantifizierung relativ zu einer chemisch und strukturell möglichst nahe verwandten Standardsubstanzen durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Allgemein:

Flüssige Proben (trüb und klar) werden membranfiltriert (0,45 µm) und anschließend direkt injiziert. Das Injektionsvolumen beträgt je nach Polyphenolgehalt 5-25 µL.

Erdbeeren:

Die kleingeschnittenen Erdbeeren werden nach Zugabe von Fructozym BE (Erbslöh, Geisenheim, Germany) mit einem Stabmixer homogenisiert, 1 Stunde stehen gelassen und anschließend bei 4500 U/min zentrifugiert. Der membranfiltrierte Überstand wird zur HPLC-Analyse verwendet.

Maische siehe 3.1.4.

3.1.2. Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu**Chemikalien**

- Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Merck, Darmstadt)
- Natriumcarbonatlösung, gesättigt bei Raumtemperatur
- (+)-Catechin

Probenvorbereitung

Proben mit einem hohen Gesamtphenolgehalt (> 1g/L) werden verdünnt. Störende L-Ascorbinsäure, natürlich oder zugesetzt, wird vor der Bestimmung enzymatisch durch Eintauchen von L-Ascorbat Oxidase-Spateln in 1 mL Probe oder durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (10 µL auf 5 mL Probe) beseitigt.

Messung

(modifizierte Vorschrift nach RITTER 1994 basierend auf SINGLETON und ROSSI 1965)

- 8,4 mL entmineralisiertes Wasser
(bei Reagenzienblindwert 8,5 mL entmineral. Wasser)
- + 0,1 mL Probe
- + 0,5 mL Folin-Ciocalteu-Reagenz
mischen und 3 – 6 Minuten stehen lassen
- + 1,0 mL gesättigte Natriumcarbonatlösung
nach 60 Minuten die Extinktion bei 720 nm in 1 cm Einmalküvetten gegen den Reagenzienblindwert messen

Berechnung

Die Berechnung erfolgte anhand einer Eichgerade der Bezugssubstanz (+)-Catechin, die zwischen 40 und 1000 mg Catechin/L linear ist ($r^2 > 0,998$). Die Ergebnisse werden in mg Catechin/L angegeben.

Reproduzierbarkeit

Nach RITTER 1994 beträgt die Standardabweichung des Mittelwertes der Bestimmung $\pm 2,2\%$. Sie wurde durch zehnmahlige Bestimmung eines Apfelsaftes ermittelt.

3.1.3. Farbmessungen**Chemikalien**

0,1 n HCl

Messungen

Klarer Apfelsaft:

Zur Bestimmung der Bräunung wird die Extinktion bei 420 nm der Proben in 1 cm Glasküvetten gegen entmineral. Wasser gemessen.

Schwarzer Johannisbeersaft und andere stark gefärbten Säfte:

Zur Bestimmung der Farbintensität werden die Proben mit 0,1 n HCl 1:100 verdünnt ($\text{pH} < 1$) und die Extinktion bei 520 nm in 1 cm Glasküvetten gegen entmineral. Wasser gemessen. Die Messung erfolgte in dieser Variante wegen der einfacher Handhabung der 1 cm Küvetten gegenüber den üblichen 1 mm Küvetten. Die aufgrund der Farbintensität der Proben nötige Verdünnung wurde mit 0,1 n HCl vorgenommen, um einen Fehler durch einen verdünnungsbedingten pH-Wert-Anstieg zu vermeiden. Die pH-Wert-Erhöhung würde das Gleichgewicht der Anthocyane (siehe 2.1.1.) verschieben, was die Farbintensität um mehr als den Verdünnungsfaktor reduzieren würde, während bei einem pH-Wert < 1 die Anthocyane in der Lösung vollständig als Flavyliumkationen vorliegen.

Die Resultate werden als E 420 nm/cm bzw. E 520/cm oder E 520/mm ($\text{pH} < 1$) angegeben.

3.1.4. Extraktionsmethode für Maischeproben**Screening-Variante :**

Zweck der Screening-Variante war eine schnelle Extraktion und vor allem eine sofortige Unterbindung jeglicher Enzymtätigkeit in der Maische. Ziel dieser Extraktionsmethode war es, grobe Veränderungen in der Maische selbst durch Prozesse, z.B. Oxidation der Polyphenole und damit verbundene Verluste an Polyphenolen, schnell feststellen und analysieren zu können. Diese Variante stellt keine vollständige Extraktion der Polyphenole aus der Maische dar, so dass die Analysendaten der erhaltenen Extrakte nur aufgrund der gleichen Vorgehensweise miteinander vergleichbar sind.

Die Maische wird mittels eines Stabmixers homogenisiert. Von der homogenisierten Maische werden etwa 100g in einem 400 mL Becherglas abgewogen und das selbe Gewicht wie die Maischeeinwaage an 0,1 n HCl in Ethanol hinzugefügt (Gewichtsverhältnis Maische:Extraktionsmittel = 1:1). Das salzsaure Ethanol dient zur Extraktion der Polyphenole und zur Inhibierung der Enzymaktivität in der Maische. Das Maische-Extraktionsmittel-Gemisch wird 45 min auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend durch ein normalen Laborpapierfilter (185 mm Durchmesser) filtriert. Die Maische wird am Ende der Filtration manuell noch mal im Filtertrichter ausgedrückt. Das Filtrat wird für die Bestimmungen verwendet.

Komplett-Extraktions-Variante:

Mit der Komplettextraktion sollen die gesamten Polyphenole aus der Maische extrahiert werden. Ziel ist der Vergleich der Polyphenolgehalte und Gehalte an antioxidativ wirksamen Substanzen eines aus der Maische im technischen Maßstab hergestellten frischen Presssaftes mit den maximal möglichen Gehalten, die im Extrakt enthalten sind. Daraus kann eine Bilanz über die Verteilung der ursprünglich in der Maische enthaltenen Polyphenole oder Antioxidantien, die durch die Extraktionsprozedur vollständig extrahiert werden sollen, in Saft und Trester nach dem Entsaftungsvorgang erstellt werden. Dazu wird der absolute Gehalt an Polyphenolen mittels Folin-Ciocalteu und antioxidativer Kapazität von Extrakt und Presssaft aus 100 g Maische bestimmt. Die Saftausbeute und das Volumen an Extrakt werden zur Berechnung verwendet.

Der Vergleich der absoluten Gehalte von Presssaft und Extrakt ergibt die prozentuale Bilanz des Übertrags an Polyphenolen und antioxidativer Kapazität in den Presssaft beim angewendeten Entsaftungssystem.

Apfel

Frisch gemahlene Apfelmaische (Rätzmühle) wird nach Konservierung und Oxidationsschutz mit SO_2 mit einem Stabmixer homogenisiert und sieben mal mit salzsaurem Ethanol zum Erreichen einer vollständigen Extraktion (farblose Maische) extrahiert. Das Extraktionsmittel wird durch Zentrifugation bei 4500 U/Min von den festen Bestandteilen der Maische abgetrennt, dekantiert und anschließend der Vorgang wiederholt. Die extrahierte Maischeprobe wird nach der letzten Extraktion durch einen normalen Laborpapierfilter (185 mm Durchmesser) filtriert und am Ende nochmals manuell ausgepresst. Die vereinigten Extrakte werden gewogen (Extraktionsausbeute) und nach Bestimmung der Dichte $d_{20/20}$ zur Analyse verwendet.

Der Rest der Maische wurde mit einem Dekanter (Flottweg Dekanter, Vilsbiburg; Drehzahl: 5300 U/Min, Differenzdrehzahl: 3 U/Min) entsaftet.

Schwarze Johannisbeeren

Frisch gequetschte schwarze Johannisbeermaische (Walzenmühle) wird wie oben beschrieben ohne die Zugabe von SO_2 extrahiert.

Der Rest der erwärmten Maische wurde nach einstündiger Enzymierung mit Fructozym MB (Erbslöh Geisenheim, Geisenheim) in einer Horizontalpresse (Bucher HPL 200) entsaftet.

Von den Extrakten und dem frischen Presssäften wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

3.2. Präparative Isolierung einzelner Polyphenole aus Fruchtsäften

Für eine reproduzierbare Polyphenolanalytik der anfallenden Proben mittels HPLC erwies sich das Fehlen von Standardsubstanzen zur Quantifizierung und Identifizierung der enthaltenen Polyphenole als Problem für die genaue Beurteilung der Veränderungen der Polyphenole bei den vorgenommenen Stufenkontrollen. So sind beispielsweise die Hauptphenole des schwarzen Johannisbeersaftes, die Anthocyane Delphinidin-3-glucosid, Delphinidin-3-rutinosid und Cyanidin-3-rutinosid, sowie zwei der Hauptphenole des Apfelsaftes, 4-p-Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid, kommerziell nicht erhältlich. Zur Beurteilung der schwarzen Johannisbeersaftproben war das Vorhandensein von Standardsubstanzen der Anthocyane essentiell, da diese den quantitativen Hauptteil der analysierbaren Polyphenole in den Proben darstellten. Daher wurde ein Lösungsweg zur Isolierung der Substanzen im präparativen Maßstab erarbeitet.

Die isolierten Reinsubstanzen wurden auch als Standards bei Bioverfügbarkeitsstudien der Fruchtsäfte verwendet. Die beiden Apfelpolyphenole konnten bedauerlicherweise erst so

spät isoliert werden, dass sie in der Polyphenolanalytik mittels HPLC keine Verwendung mehr fanden.

3.2.1. Anthocyane aus schwarzem Johannisbeersaft

Aufarbeitung für die präparative HPLC

Die Aufarbeitung des schwarzen Johannisbeersaftes soll der Isolierung und Konzentrierung der Polyphenole aus dem Saft dienen, um für die nachfolgende präparative HPLC die Polyphenole des schwarzen Johannisbeersaftes möglichst frei von anderen störenden Saftinhaltsstoffen und in einer hohen Konzentration vorliegen zu haben.

Probenvorbereitung

Schwarzer Johannisbeersaft wird mit Fructozym P (Erbslöh, Geisenheim) depektinisiert und anschließend 10 Min bei 4000 U/Min zentrifugiert.

Probenmenge:

1L klarer, depektinierter, schwarzer Johannisbeersaft

Säule:

Eine Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Länge von ca. 80 cm wird mit etwa 8 g Adsorberharz XAD 16 HP (Rohm and Haas S.A., Chauny, France) befüllt, was einem Bettvolumen von etwa 80 mL entspricht.

Konditionierung:

3 Bettvolumen Ethanol, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Probenaufgabe: 1L Probe wird bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde über die Säule gegeben

Spülen:

10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn zur Entfernung von Zuckern, Mineralstoffen, Proteinen etc.

Elution:

3 Bettvolumen salzsaures Ethanol bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde

Reinigung:

3 Bettvolumen entmineral. Wasser, 4 Bettvolumen 2 %ige NaOH-Lösung, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Nach der Reinigung kann die Säule wieder für eine Probenaufarbeitung, beginnend mit der Probenaufgabe, verwendet werden.

Extrakt:

Das gewonnene ethanolische Eluat wird im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 10 – 20 mL eingengt, bei 4°C gelagert und nach Membranfiltration für die präparative HPLC verwendet.

Isolierung der einzelnen Polyphenole mittels präparativer HPLC:

Nach manueller Injektion des Extraktes auf die HPLC-Säule werden die entsprechenden Substanzpeaks per Hand in Rundkolben gesammelt. Die über 15 Chromatographieläufe gesammelten Fraktionen werden bei 40°C und 30 mbar am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend gefriergetrocknet.

HPLC-Bedingungen:

Pumpe	: Merck-Hitachi L-6200 mit präparativem Pumpenkopf
Detektor	: Philips Pye Unicam PU 4020 UV detector
Schreiber	: Philips PM 8251 single-pen recorder
Säule	: Merck Prepar 250 x 25, LiChrospher RP 18, 12 µm
Injektion	: Rheodyne 7125
Injektionsvolumen	: 1 mL (Loop)

Wellenlänge	: 280 nm
Fliessmittel	: Doppelt entmineral. Wasser / Essigsäure (82,5 / 17,5 v/v)
Elution	: isokratisch

Überprüfung der Reinheit mittels analytischer HPLC

Die Überprüfung der Reinheit der isolierten Substanz erfolgt durch Auflösen der gewonnenen gefriergetrockneten Substanz in doppelt entmineral. Wasser und anschließender Analyse mittels HPLC (siehe 3.1.1.).

3.2.2. Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid aus Apfelsaft

Aufarbeitung für die präparative HPLC

Probenvorbereitung

Ein komplexes Polyphenolmuster ist aufgrund möglicher Koelutionen und Überlappungen der Zielsubstanzen mit unerwünschten Substanzen für eine saubere Isolierung der Zielsubstanz ungünstig. Ein einfaches Polyphenolmuster mit wenigen, in großem Abstand zueinander eluierende Substanzpeaks ist ideal. Um dies für die Isolierung der Coumaroylchinasäure und des Phloretin-2'-xyloglucosids zu erreichen, wird der Apfelsaft vor der Aufarbeitung einer Laccase/O₂-Behandlung unterzogen. In anderen Untersuchungen wurde festgestellt, dass durch die Laccase Coumarsäure- und Phloretinderivate kaum oxidiert werden, während Polyphenole, die eine o-Dihydroxyphenol-Struktur besitzen, wie Kaffeesäurederivate (Chlorogensäure), Quercetinderivate, Flavan-3-ole und Procyanidine, oxidiert werden. Die bei vorangegangenen Versuchen störende Chlorogensäure und andere störende Substanzen können so aus dem Saft entfernt werden.

Probenmenge:

1,5L klarer, depektinierter, Laccase/O₂-behandelter Apfelsaft einer polyphenolreichen Sorte

Säule:

Eine Chromatographiesäule mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Länge von ca. 80 cm wird mit etwa 10 g Adsorberharz Purolite MN 200 befüllt, was einem Bettvolumen von etwa 100 mL entspricht.

Konditionierung:

3 Bettvolumen Ethanol, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Probenaufgabe: 1,5L Probe wird bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde über die Säule gegeben

Spülen:

10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Elution:

3 Bettvolumen Ethanol bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 3 Tropfen pro Sekunde

Reinigung:

3 Bettvolumen entmineral. Wasser, 4 Bettvolumen 2 %ige NaOH-Lösung, 10 Bettvolumen entmineral. Wasser bei voll geöffnetem Hahn

Nach der Reinigung kann die Säule wieder für eine Probenaufarbeitung, beginnend mit der Probenaufgabe, verwendet werden.

Extrakt:

Das gewonnene ethanolische Eluat wird im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 10 – 20 mL eingengt, bei 4°C gelagert und nach Membranfiltration für die präparative HPLC verwendet.

Isolierung der einzelnen Polyphenole mittels präparativer HPLC:

Nach manueller Injektion des Extraktes auf die HPLC-Säule werden die entsprechenden Substanzpeaks per Hand im Rundkolben gesammelt. Die über 15 Chromatographieläufe gesammelten Fraktionen werden bei 45°C und 30 mbar am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend gefriergetrocknet.

HPLC-Bedingungen:

Pumpe	: Merck-Hitachi L-6200 mit präparativem Pumpenkopf
Detektor	: Merck-Hitachi L 4250 UV-Vis Detector
Schreiber	: Kipp & Zonen Bd 40
Säule	: ReproSil Pur C18-Aq, 10 µm. 250 x 40 (Dr. A. Maisch, Ammerbuch)
Injektion	: Rheodyne 7125
Injektionsvolumen	: 2 mL (Loop)
Fluss	: 6 mL/min
Wellenlänge	: 280 nm
Fliessmittel	: A. Methanol / doppelt entmineral. Wasser / Essigsäure (50 / 49 / 1 v/v/v) B. Methanol

Gradientenprogramm:

Time [min]	A	B	Flow [ml/min]
0.0	100%	0%	6.0
10.0	100%	0%	6.0
50.0	50%	50%	6.0
65.0	0%	100%	7.5
80.0	0%	100%	9.0
80.1	100%	0%	6.0

Überprüfung der Identität sowie der Reinheit mittels analytischer HPLC

Die Überprüfung der Reinheit der isolierten Substanz erfolgte durch Auflösen der gewonnenen gefriergetrockneten Substanz in doppelt entmineral. Wasser und anschließender Analyse mittels HPLC (siehe 3.1.1.). Weiterhin erfolgte eine Identifizierung der beiden isolierten Substanzen mittels LC/MS und beim Phloretin-2'-xyloglucosid durch Hydrolyse und anschließender Bestimmung der freigesetzten Zucker und des Phloretins.

Identifizierung der isolierten Substanzen durch Bestimmung der Zuckerbausteine mittels HPAEC

Zur Bestimmung der monomeren Zuckerbausteine der isolierten Substanz, die hypothetisch als Phloretin-2'-xyloglucosid bezeichnet wurde, müssen diese vom gebundenen Polyphenol und voneinander getrennt werden. Dazu wird die in entmineral. Wasser gelöste Substanz nach Zugabe von Salzsäure bei 70°C sauer hydrolysiert. Im Hydrolysat befinden sich dann die monomeren Zuckerbausteine. Für Phloretin-2'-xyloglucosid sollten Xylose und Glucose im Mengenverhältnis 1:1 nachweisbar sein.

Hydrolyse:

1 mL einer wässrigen Lösung der isolierten Substanz (verbliebene Reste im Rundkolben nach der Gefriertrocknung) wurde mit 1 mL 4 N HCl versetzt und 1 Stunde bei 70°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach Verdünnung zur Analyse verwendet.

Prinzip der Zuckernalytik:

Die Identifizierung und Quantifizierung monomere Zucker erfolgt in wässriger, alkalischer Lösung im Hochdruckbereich an einer Trennsäule, die einen schwachen Anionentauscher darstellt. Durch die stark alkalischen Eluenten gehen die Monomere in ihre anionische Form über, die mit dem Material der Trennsäule in Wechselwirkung tritt. Die Elution erfolgt mittels geeigneter Gradienten verschiedener Ionenstärke, die Detektion auf elektrochemischem Wege. Die mitgeschickten Referenzsubstanzen ermöglichen über das Auswerteprogramm

sowohl die Identifikation bzgl. Retentionszeiten, als auch eine Quantifizierung durch Ein- bzw. Mehrpunktkalibrierung.

HPAEC-Bedingungen:

Gerät	: DIONEX BIO-LC
Säule	: 4 x 250 mm (CARBO PAC PA-100)
Vorsäule	: 4 x 50 mm (CARBO PAC PA-100)
Pumpe	: Gradientenpumpe LCM-2 und Gradientenmischer GM-2
Detektor	: PED mit Gold-Arbeits Elektrode, Gegenelektrode Stahl, Kombination pH-Ag/AgCl- Referenzelektrode
Injektor	: Autosampler Spectra Physics AS 3500
Injektionsvolumen	: 20 µl über Probenschleife
Säulentemperatur	: 15°C
Eluenten	1. Doppelt entmineral. Wasser 2. 0,5 M NaOH 3. Doppelt entmineral. Wasser 4. 0,1 M NaOH
Standardsubstanzen	: Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galaktose, Glucose, Xylose

Gradientenprogramm:

Time [min]	Flow [ml/min]	Eluent
0 - 3	1,0	16 mmol NaOH
3,1 - 22,5	1,0	Doppelt entmineral. Wasser
22,6 - 28,0	1,0	20 mmol NaOH
28,1 - 40,0	1,0	500 mmol NaOH
40,1 - 45,0	1,0	Doppelt entmineral. Wasser
45,1 - 75,0	1,0	16 mmol NaOH
75,0 - ∞	0,1	16 mmol NaOH

3.3.3. Isolierung von Polyphenolen aus Apfelsaft mittels Gelchromatographie an einer Säule mit Sephadex LH 20

Die Gelchromatographie wurde als alternatives Verfahren zur Isolierung der einzelnen Polyphenole aus Apfelsaft untersucht. Der Vorteil der Gelchromatographie gegenüber der präparativen HPLC ist die erheblich größere Probenaufgabemenge.

Chromatographie-Bedingungen:

Probe	: Ethanolischer Polyphenolextrakt von einem zuvor mit Laccase enzymierten Apfelsaft, gewonnen an einer Adsorberharzsäule mit dem Adsorberharz XAD 16 HP (siehe 3.2.2.)
Injektionsvolumen	: 10 mL
Fliessmittel	: Isopropanol
Fluss	: 0,8 mL/min
Säulenmaterial	: Sephadex LH 20
Säule	: 100 cm x 2,2 cm i.D.
Bettvolumen	: 65cm x 2,2 cm i.D., etwa 125 ml
Fraktionsgrösse	: 10 mL
Dauer	: ca. 13 Stunden

Von den gesammelten Fraktionen wurde die Extinktion bei 280 nm photometrisch bestimmt. Anschließend wurde von ausgewählten Fraktionen ein Polyphenolmuster mittels HPLC ermittelt.

3.4. Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode

Mit der TEAC-Methode (Trolox-Equivalent-Antioxidative-Capacity) lässt sich die antioxidative Kapazität von wässrigen Lösungen bestimmen. Die von MILLER et al. 1993 beschriebene Methode wurde zur Vereinfachung und besseren Handhabung modifiziert.

Chemikalien

ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)), Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) (Aldrich), di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhexacyanoferrat-(III), Natriumchlorid, Wasserstoffperoxid 30%ig (Merck, Darmstadt), Myoglobin (Sigma), Sephadex G-15

Geräte

Chromatographie-Säule 100 cm x 2,2 cm i.D. (Pharmacia) Spektralphotometer, Stoppuhr, 1.5 mL Halbmikro -Küvetten (Schichtdicke 1 cm)

Lösungen

PBS-Puffer

0,714 g di-Kaliumhydrogenphosphat + 0,123 g Kaliumdihydrogenphosphat + 8,766 g NaCl mit doppelt entmineral. Wasser auf 1 L auffüllen, pH-Wert kontrollieren (pH=7,2-7,4)

PBS-Probenpuffer

7,14 g di-Kaliumhydrogenphosphat + 1,23 g Kaliumdihydrogenphosphat + 8,766 g NaCl mit doppelt entmineral. Wasser auf 1 L auffüllen. pH-Wert kontrollieren (pH=7,2-7,4)

ABTS-Stammlösung (5000 µmol/L)

55 mg ABTS mit PBS-Puffer im Messkolben auf 20 mL auffüllen

ABTS-Arbeitslösung (500 µmol/L)

von der ABTS-Stammlösung die benötigte Menge in einer 1:10-Verdünnung (500 µM/L) herstellen

Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/L)

64 mg Trolox in 100 mL-Messkolben mit PBS-Puffer auffüllen, am besten zum Anlösen in wenigen Tropfen Ethanol aufnehmen

Wasserstoffperoxid-Lösung (450 µmol/L)

10µL Wasserstoffperoxid (30%ig) auf 200ml doppelt entmineral. Wasser geben; im Kühlschrank max. 2 Tage haltbar, am besten täglich frisch ansetzen

Herstellung der Metmyoglobinlösung

Das in PBS-Puffer gelöste Myoglobin (142 mg/20 mL) wird durch eine K-Hexacyanoferrat-(III)-Lösung (5 mg/20 mL) zu Metmyoglobin oxidiert. Diese Mischung wird anschließend auf eine vorbereitete Chromatographiesäule (Füllmaterial: Sephadex G-15, 70 cm x 2 cm, mind. 60 cm Trennlänge, vorher mit 2fachem Säulenvolumen PBS-Puffer bei 2 mL/min gespült) mit einem Fluss von 2 mL/min gegeben, um das Metmyoglobin vom K-Hexacyanoferrat abzutrennen. Es wird dann die braune Fraktion aufgesammelt. Dabei ist darauf zu achten, dass das danach eluierende KHCF(III) (gelb) nicht mit aufgesammelt wird!

Die aufgesammelte Metmyoglobinlösung wird nun auf ihren Gehalt an Metmyoglobin überprüft: Hierzu wird in einer 1 cm-Kunststoffküvette die Absorption bei 490, 560 und 580nm gegen PBS-Puffer gemessen. Die Konzentration errechnet sich nach:

$$c[\mu\text{M/L}] = 146 \cdot E_{490} - 108 \cdot E_{560} + 2,1 \cdot E_{580}$$

Die Lösung sollte Konzentrationen um 140 $\mu\text{M/L}$ besitzen. Zum Schutz vor Licht mit Alufolie umwickeln und im Kühlschrank aufbewahren.

TEAC-Testlösung:

300 μL ABTS-Arbeitslösung
50 μL Metmyoglobin-Lösung
400 μL PBS-Puffer

Die Testlösung kann in größeren Mengen angesetzt werden und ist ca. 1 Woche im Kühlschrank haltbar.

Messprinzip:

Die Messung beruht auf der Hemmung der Bildung des Radikalkations ABTS^+ über die Reduktion des Ferrylmyoglobinradikals, das in wässriger Lösung durch die Oxidation von Metmyoglobin durch Wasserstoffperoxid gebildet wird. Die Hemmung erfolgt durch in der Messlösung enthaltene Radikalfänger (z. B. Polyphenole) aus der zugegebenen Probe. Das entstandene Farbstoffradikal wird bei 734 nm photometrisch bestimmt. Die Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations ABTS^+ durch die Reduktion des Ferrylmyoglobinradikals ist konstant und ergibt daher einen nahezu linearen Anstieg der Extinktion in der Testlösung. Je länger nun die durch eine antioxidative Probe bewirkte „lag“-Phase ist, desto geringer ist die Extinktion zu einem festgelegten Messzeitpunkt, da die Bildung des Radikalkations ABTS^+ verzögert nach dem Verbrauch der antioxidativ wirksamen Substanzen einsetzt. Da diese Verzögerung der Farbreaktion proportional zur Konzentration der antioxidativen Substanz ist, entspricht die Extinktion zum Messzeitpunkt bei gleicher Steigung bzw. Kurvenverlauf der Farbreaktion dem Gehalt an antioxidativ wirksamen Substanzen in der Messlösung. Zur Kalibrierung der Methode wird das wasserlösliche Tocopherol und Vitamin E-Analogen Trolox verwendet. Bei steigenden Troloxkonzentrationen resultiert durch die Verlängerung der lag-Phase eine Kurvenschar, deren Extinktionsabstände zum Messzeitpunkt der Konzentration entsprechen, was bedeutet, dass eine Erhöhung der Troloxkonzentration um 0,5 mmol/L zu einer Verringerung der Extinktion zum Messzeitpunkt um 0,08 - 0,1 Extinktionseinheiten führt (Abbildung 10).

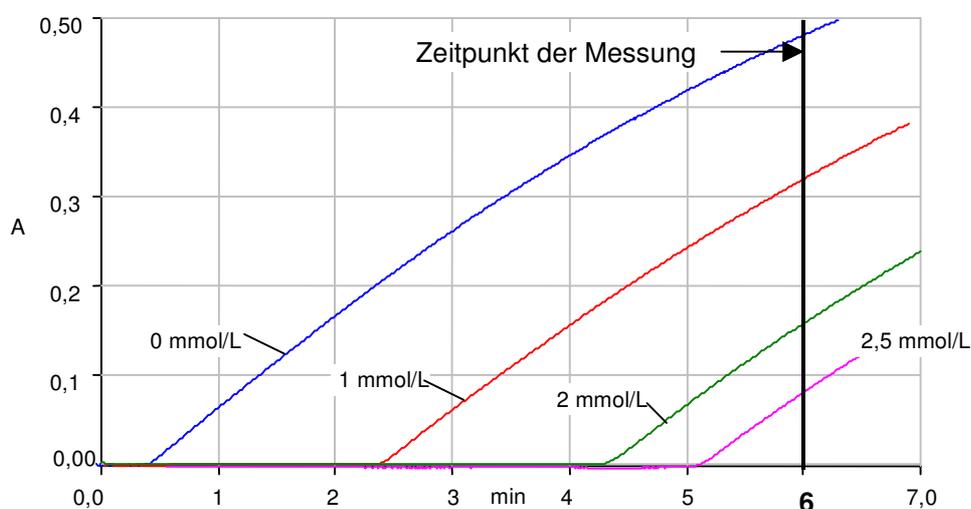


Abbildung 10: Verlauf der Farbreaktion im TEAC-Test bei verschiedenen Trolox-Konzentrationen

Die Bestimmung der Länge der Lagphase stellt als Variation des Testes ebenfalls eine Möglichkeit zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität einer Probe dar.

Bei der Kalibrierung ergibt sich eine Gerade mit negativer Steigung, da die Extinktion um so niedriger ist, je höher die Troloxkonzentration ist (Abbildung 11). Die Messgröße ist mmol/L Trolox.

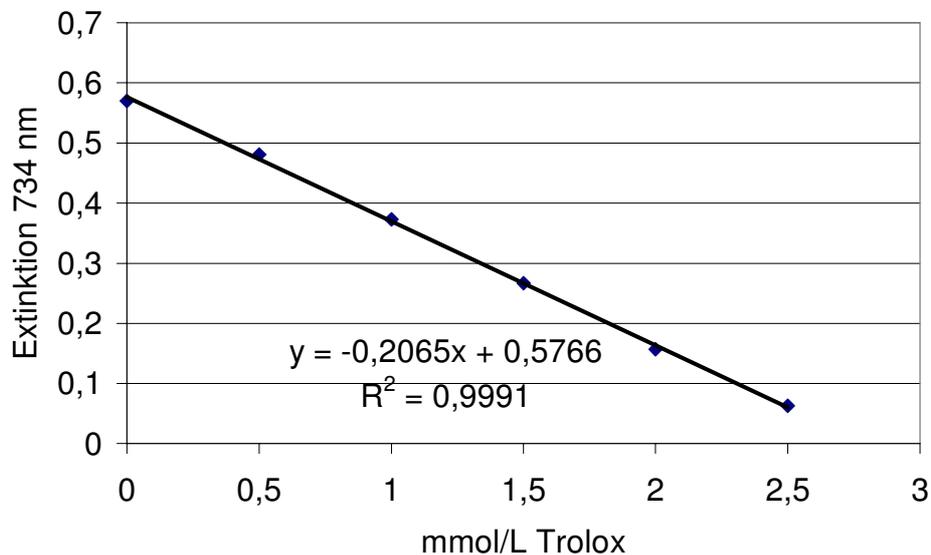


Abbildung 11: Eichgerade des TEAC-Testes, Messzeitpunkt 6 min

Um den TEAC-Wert von Proben aus deren Extinktion am Messzeitpunkt mittels der erstellten Eichgerade zu berechnen, wird die Geradengleichung nach x (Konzentration in mmol/L Trolox[®]) aufgelöst (z. B. $y = -0,2065x + 0,5766$ wird zu $x = -4,8426y + 2,7923$) und die Extinktion der untersuchten Probe (y-Wert) in die umgestellte Gleichung eingesetzt.

Testdurchführung:

Wellenlänge: 734nm

Zur einfacheren Handhabung wurde das Probenvolumen im Test von ursprünglich 10 µL unverdünnte Probe durch eine Verdünnung der Probe um den Faktor 10 auf 100 µL erhöht. Dabei ist zu beachten, dass die 1:10 verdünnte Probe bei 100 µL Volumen das ursprüngliche Probenvolumen von 10 µL enthält, also die Probe zwar 1:10 verdünnt wurde, aber das Probenvolumen im Test auch um den Faktor 10 erhöht wurde, was sich gegenseitig aufhebt. Dies muss bei der Berechnung beachtet werden. Auch die Trolox-Standardlösung muss deshalb zur Bestimmung einer Eichgerade 1:10 verdünnt werden. Erst bei Verdünnungen größer 1:10 muss diese in der späteren Berechnung verwendet werden (1:50 Verdünnung der Probe bedeutet einen Verdünnungsfaktor in der Berechnung von 5! nicht von 50). Die Proben werden entsprechend der folgenden Aufzählung mit entmineral. Wasser bzw. PBS-Probenpuffer verdünnt (richtet sich nach dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu):

Gesamtphenolgehalt bis 750 mg/L	: 1:10 (PBS-Probenpuffer)
Gesamtphenolgehalt bis 1500 mg/L	: 1:25 (PBS-Probenpuffer)
Gesamtphenolgehalt bis 5000 mg/L	: 1:100
Gesamtphenolgehalt bis 10000 mg/L	: 1:200

Vor einer Testserie bzw. mehreren Testserien an einem Tag sollte eine Eichgerade mit sechs Messpunkten der Trolox-Standardlösungen mit Konzentrationen von 0 – 2,5 mmol/L (0,5 mmol/L Schritte) aufgenommen werden. Die Eichgerade dient dann zur Berechnung des

TEAC-Wertes. In einer Testserie können 11 Proben (Doppelbestimmung) sowie ein Leerwert gemessen werden, insgesamt 24 Einzelproben. Sind die Extinktionen der Leerwerte in Testserie und Eichgerade unterschiedlich (max. 0,05 Extinktionseinheiten), werden die gemessenen Extinktionen im Test um die Differenz der beiden Leerwerte korrigiert.

Die Lösungen müssen auf 20°C temperiert werden. Zum Test werden die Halbmikro-Küvetten wie folgt befüllt:

TEAC-Testlösung:	750 µL
+	
Leerwert:	100 µL PBS-Puffer
oder	
Probe (mind. 1:10 verdünnt)	100 µL (entspricht 10 µL Probe)
oder	
Standardlösung (1:10 verdünnt):	100 µL (entspricht 10 µL Standardlösung)

Die Extinktion des Leerwertes vor dem Reaktionsstart wird als Abgleich verwendet. Zum Starten der Reaktion werden nun im 15 Sekunden-Abstand 200 µL Wasserstoffperoxidlösung der Reihe nach in die Küvetten gegeben. Nach genau 6 min werden die Küvetten wieder im 15 Sekunden-Abstand der Reihe nach im Photometer gemessen, so dass jede Probe nach genau 6 min Reaktionszeit bestimmt wird. Bei zu hohen (Extinktionsdifferenz von Blindwert und Probe kleiner 0,020) oder zu niedrigen Extinktionen (< 0,020) der untersuchten Proben muss anders verdünnt werden.

Man berechnet den TEAC-Wert in der Einheit mmol/L Trolox durch Einsetzen der Extinktion im Test (eventuell korrigiert) in eine umgestellte Eichgerade.

Standardabweichung

Die Standardabweichung des Mittelwertes innerhalb einer Testserie wurde für eine Trolox®-Standardlösung, einen Apfelsaft und einen schwarzen Johannisbeernektar bestimmt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Standardabweichung des Mittelwertes im TEAC-Test bei jeweils 16 Wiederholungen

Probe	Standardabweichung des Mittelwertes
Trolox®-Standardlösung (n = 16)	2,2%
Schwarzer Johannisbeernektar (n = 16)	3,5%
Naturtrüber Apfelsaft (n = 16)	3,3%

Der Standardabweichung des Mittelwertes der Methode lag bei allen Bestimmungen unter ± 3,5%. Die Messgenauigkeit kann daher als befriedigend bezeichnet werden.

3.4. Allgemeine Analysen

Die folgenden Analysenparameter wurden nach RENTSCHLER und TANNER 1976 bestimmt.

- pH-Wert
- titrierbare Gesamtsäure
- Dichte d 20/20 bzw. °Oechsle (d 20/20 – 1)
- Extraktgehalt in °Brix
- L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch)

4. Verarbeitungsstudien

Die Stufenkontrollen bei der Herstellung von Fruchtsäften wurden im halbtechnischen Maßstab im Fruchtsaftbetrieb des Fachgebiets für Weinanalytik und Getränkeforschung der Forschungsanstalt Geisenheim vorgenommen. Dieser Maßstab wurde gewählt, da sich die Ergebnisse von technischem Maßstab und Labormaßstab aufgrund unterschiedlicher Verhältnisse zwischen Volumen und Oberfläche stark unterscheiden können und daher nicht übertragbar sind. Die hauptsächlich verwendeten Geräte sind nachfolgend aufgeführt.

Geräte:

Mahlen:

- Rätzmühle, Amos
- Walzenmühle, Amos
- Schleuderfräse, Kleemann KM 201/F

Entsaftung:

- Horizontalpresse, Bucher HPL 200
- Packpresse Wahler HPP 400
- Flottweg Dekanter

Separator:

- Tellerseparator Westfalia SA R 3036

Kurzzeiterhitzung (KZE):

- Schmidt Sigmatherm

Wurden andere Geräte verwendet, werden Typ und Bezeichnung in der entsprechenden Versuchsbeschreibung angegeben. Dasselbe gilt für die verwendeten Enzyme, Hilfsstoffe und Behandlungsmittel.

Probennahme

Fruchtsaftbetrieb des Fachgebiets für Weinanalytik und Getränkeforschung der Forschungsanstalt Geisenheim

Rohware

Fachgebiet für Obstbau der Forschungsanstalt Geisenheim

Wurde Rohware einer anderen Herkunft verwendet, wird diese genannt.

Säfte

Aus der regulären Produktion des Fruchtsaftbetriebs des Fachgebiets für Weinanalytik und Getränkeforschung der Forschungsanstalt Geisenheim

4.1. Apfel

4.1.1. Herstellung von naturtrübem Apfelsaft

In Diagramm 1 ist die Verarbeitung von naturtrübem Apfelsaft und die Probenahme schematisch als Fließdiagramm dargestellt. Bei der Herstellung wurde zum Schutz vor Oxidation und zur Stabilisierung des Trubes 200 mg/L L-Ascorbinsäure zugesetzt, die ebenfalls eine antioxidative Kapazität besitzt. Der instabile sogenannte "Grobtrub" wird mittels Separation entfernt.

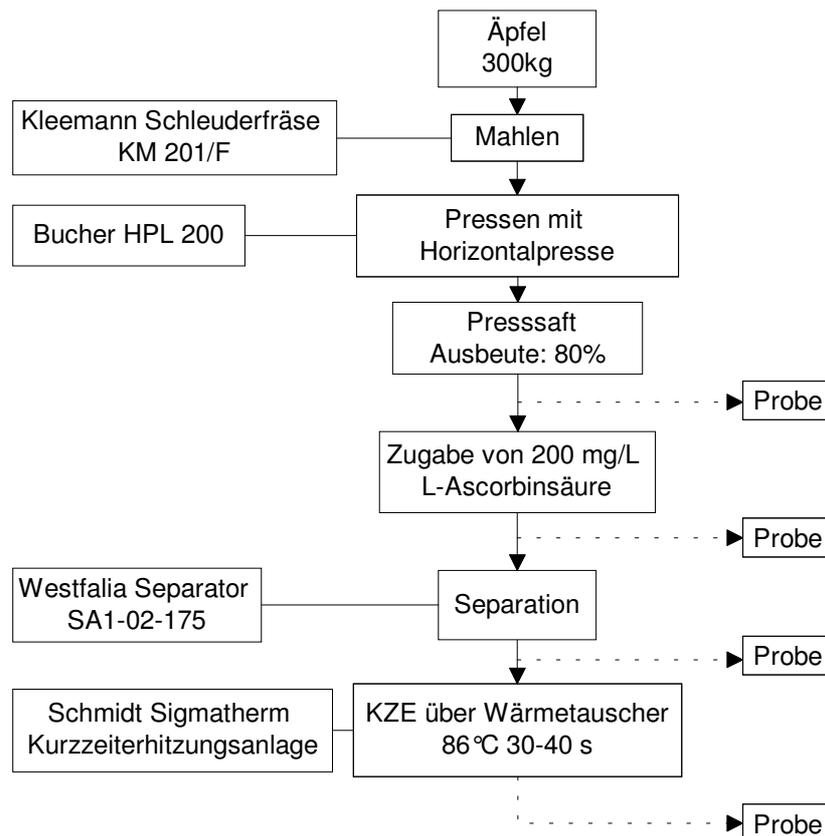


Diagramm 1: Herstellung von naturtrübem Apfelsaft

Von den Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, der L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch) und die Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

Um den Einfluss der L-Ascorbinsäure als Zusatzstoff auf die antioxidative Kapazität von Apfelsaft zu klären, wurden einem pasteurisierten, trübem Apfelsaft zusätzlich steigende Mengen an L-Ascorbinsäure zugesetzt und anschließend der TEAC-Wert bestimmt.

4.1.2. Einfluss der Apfelsorte und des Polyphenolgehaltes auf die antioxidative Kapazität naturtrüber Apfelsäfte

Die Differenzen in der antioxidativen Kapazität zwischen polyphenolreichen Mostapfelsorten und polyphenolarmen Tafelapfelsorten wurden untersucht. Für die Untersuchungen standen Äpfel der Sorten Bohnapfel, Brettacher, Kaiser Wilhelm, Boskoop, Topas und Jonagold zur Verfügung. Die Chargengröße betrug 200 kg. Die Äpfel wurden gewaschen, verlesen, mit einer Schleuderfräse gemahlen und mit einer Horizontalpresse gepresst. Nach Zugabe von 200 mg/L Ascorbinsäure wurde der Saft mit einem Tellerseparator zentrifugiert und bei 85°C in der Flasche pasteurisiert (siehe auch 4.1.2. Diagramm 1). Die Bohnäpfel wurden von P. Possmann zur Verfügung gestellt.

Von den Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, die Gesamtsäure (pH 7,0), der L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch), die relative Dichte 20/20 und die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.1.3. Einfluss der Maischestandzeit

Um die Veränderung der antioxidativen Kapazität von Apfelmaische während der Standzeit zu untersuchen, wurde frisch gemahlene Apfelmaische (Rätzmühle) direkt ($t = 0$ min) einmal mit ethanolischer 0,1 n HCl extrahiert (3.1.4. Screening-Variante). Ein anderer Teil der Maische wurde mit Fructozym P versetzt. Nach der gleichen Extraktionsmethode wurde nach 30 min und 60 min ein Extrakt von der enzymierten und von der nicht enzymierten Maische hergestellt.

Von den insgesamt fünf Proben wurden der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

4.1.4. Einfluss von Entsaftungssystemen und Maischestandzeit auf Apfelsaft

Zur Entsaftung von Maische existieren verschiedene Möglichkeiten. In der Fruchtsaftindustrie ist das weitverbreitetste Entsaftungssystem die Horizontalpresse. Als ein alternatives Entsaftungssystem findet der Dekanter Anwendung, bei dem die Maische durch Zentrifugalkräfte entsaftet wird. Die Vorteile des Dekanters sind eine schnelle Entsaftung der Maische und die Möglichkeit des kontinuierlichen Betriebs (HAMATSCHEK und NAGEL 1993). Die Extraktion von Polyphenolen aus der Maische durch die beiden verschiedenen Entsaftungssysteme und damit auch der Einfluss auf die antioxidative Kapazität des Presssaftes sowie Unterschiede durch eine einstündige Maischestandzeit wurden untersucht. In einem größeren Fruchtsaftbetrieb wurde dazu im technischen Maßstab frisch gemahlene Apfelmaische (Hammermühle) einmal ohne Standzeit und einmal nach einer Standzeit von 1 Stunde parallel in einer Bucherpresse (HP 10000) und in einem Dekanter (Westfalia CA 505) entsaftet.

Von den vier Varianten wurden Proben gezogen und der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.1.5. Einfluss der Saftstandzeit auf Apfelsaft

Die fruchteigenen Polyphenoloxidasen des Apfels gehen zum Teil in den Presssaft über, wo sie ihre Wirkung weiter entfalten. Da es bei der Herstellung von Apfelsaft häufig zu längeren Standzeiten zwischen den einzelnen Prozessstufen des Saftes kommt, wurde der Einfluss dieser Standzeiten auf die antioxidative Kapazität des Saftes untersucht. Dazu wurde zur groben Beurteilung des Effektes ein frisch gepresster Apfelsaft in einem Becherglas offen stehen gelassen. Nach einer Standzeit von 0, 1, 2 und 6 Stunden wurden Proben genommen und sofort der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

4.1.6. Versuche zur Inaktivierung der fruchteigenen Polyphenoloxidasen

Fruchteigene Polyphenoloxidasen verursachen sowohl in der Maische als auch im Saft einen Verlust an Polyphenolen und antioxidativer Kapazität (siehe 4.1.4. und 4.1.5.). Die Enzyme können durch Hitzeeinwirkung inaktiviert werden (WALKER 1964). Daher wurde Apfelmaische zur Vermeidung dieser Verluste auf zwei verschiedene Arten erhitzt und anschließend die Stabilität der antioxidativen Kapazität des Presssaftes untersucht.

Weiterhin wurde nach dem üblichen Entsaftungsvorgang (Diagramm 1) eine Erhitzung des Presssaftes auf 55 °C vorgenommen und dessen Stabilität ebenfalls untersucht.

1. Ansatz:

Frisch gemahlene Maische wurde über einen Röhrenerhitzer auf 60 °C erhitzt und nach einer Standzeit von 30 min wieder heruntergekühlt.

2. Ansatz:

Frisch gemahlene Maische wurde über einen Röhrenerhitzer auf 90 °C erhitzt und anschließend sofort wieder heruntergekühlt.

3. Ansatz

Frischer Presssaft von nicht erhitzter Maische wurde über einen Röhrenerhitzer auf 55 °C erhitzt.

Nach der sofort erfolgenden Entsaftung mittels Horizontalpresse wurden von den Proben des frischen Presssaftes direkt und nach einer Standzeit von 4 Stunden bei Raumtemperatur im verschlossenen Erlenmeyerkolben der TEAC-Wert sowie der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

4.1.7. Einfluss der Schönung mit Gelatine auf Apfelsaft

Ein klassisches Verfahren zur Entfernung des Trubes und der Vermeidung von Nachtrübungen ist die Schönung des depektinisierten trüben Saftes mit Gelatine und dem Hilfsstoff Kieselol (HEATHERBELL 1984). Während der Herstellung von diversen klaren Apfelsäften im technischen Maßstab (Mostobst sowie Tafelobst) wurden Proben vor und nach der Gelatine/Kieselol-Schönung genommen. Für die Filtration im technischen Maßstab wurde ein Schichtenfilter (Seitz Typ 40/14) und Beco BM 40x40 Filterschichten verwendet. Die optimale Menge der Schönungsmittel wurde in Vorversuchen ermittelt und lag zwischen 8 und 14 g/hL. Außerdem wurden Schönungen im Labormaßstab vorgenommen. Der trübe Apfelsaft wurde vor der Zugabe der Schönungsmittel mit einem Pektinase-Präparat (Fructozym P, Erbslöh, Geisenheim) bis zum negativen Alkoholtest enzymiert. Exemplarisch wird die Veränderungen von antioxidativer Kapazität und Gesamtphenolgehalt in einer Verarbeitungslinie zur Herstellung von klarem Apfelsaft betrachtet.

Aus den erhaltenen Werten für TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu der technischen Varianten wurde ein prozentualer Mittelwert gebildet.

Die Veränderung der monomeren Polyphenole wurde mittels HPLC untersucht.

4.1.8. Einfluss der Zugabemenge von Gelatine sowie des Zeitpunktes der Zugabe von Kieselol bei der Gelatine/Kieselol-Schönung

Trüber enzymierter Apfelsaft wurde mit verschiedenen Mengen Gelatine und Kieselol geschönt, wobei die Zudosierung des Kieselols vor oder nach der Gelatinezugabe erfolgte. Von den Proben wurde der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

4.1.9. Einfluss der Ultrafiltration auf Apfelsaft

Die Ultrafiltration stellt eine rein physikalische Abtrennung des Trubes aus dem Apfelsaft dar. Daher kann mit diesem Filtrationsverfahren der Anteil des Trubes an der antioxidativen Kapazität von naturtrübem Apfelsaft beurteilt werden.

Dazu wurde enzymierter und nicht enzymierter naturtrüber Apfelsaft mit drei verschiedenen Filtrationsmodulen an einer Ultrafiltrationsanlage bei Temperaturen zwischen 12 und 18 °C

ultrafiltriert. Die Module Romicon PM 100 (Trenngrenze 100000 Dalton), PM 50 (Trenngrenze 50000 Dalton) und PM 10 (Trenngrenze 10000 Dalton) wurden für den enzymierten Saft und nochmals Romicon PM 50 (Trenngrenze 50000 Dalton) für den nicht enzymierten Saft (rein physikalisch Trubentfernung) verwendet. Die Probennahme erfolgte vor und nach der Ultrafiltration.

Anlage: Romicon/Koch UF-Filtrationsanlage

1. Modul: Romicon PM 100, Serien-Nr. 4PC 1189 1
Fluxrate, Anfang: 143 L/m²*h bei 13°C

2. Modul: Romicon PM 50, Serien-Nr. 4PL 1419 1
Fluxrate, Anfang: 48 L/m²*h bei 18°C

3. Modul: Romicon PM 10, Serien-Nr. 4PX 1212
Fluxrate, Anfang: 30 L/m²*h bei 12°C

Von den Proben wurde der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

4.1.10. Stabilisierung von mikrofiltriertem Apfelsaft mit PVPP oder Adsorberharz

Ultrafiltrierte Apfelsäfte sind meistens nicht stabil und bilden Nachtrübungen, die im wesentlichen aus phenolischen Substanzen (NAGEL und SCHOBINER 1985) bestehen. Daher werden die Säfte mit Adsorbentien behandelt, um jene phenolischen Substanzen zu entfernen.

Der Einfluss des PVPP wurde durch Einrühren des vorgequollenen Materials und einer Filtration durch ein normales Laborpapierfilter (185 mm Durchmesser) nach einer Einwirkdauer von mind. 15 min untersucht.

Bei der Adsorberharz-Behandlung wird der Saft über eine Säule geleitet. Über Flussrate und das Volumen des behandelten Saftes kann der Grad der Entfernung phenolischer Substanzen gesteuert werden (LAFLAMME und WEINAND 1993).

Keines der beiden Behandlungsmittel ist jedoch bisher in Deutschland zugelassen.

Es wurde ein Saft aus der Sorte Bohnapfel verwendet, die von P. Possmann zur Verfügung gestellt wurde.

Vorbereitung:

Enzymierung des trüben, frischen Presssaftes mit Fructozym P (Erbslöh, Geisenheim) bis zum negativen Alkoholtest, Mikrofiltration mit Memcor 0,2 µm Porenweite, Ausbeute bei der Cross Flow Filtration: 95% vol.

a. PVPP

Der klare Saft wurde mit 20, 40 und 60 g/hL in Wasser vorgequollenem PVPP versetzt und 15 min gerührt. Anschließend wurde der Saft durch ein Faltenfilter filtriert und eine Probe entnommen.

b. Adsorberharz

65 L klarer Saft (entspricht 65 Bettvolumen) wurde durch eine zuvor mit Adsorberharz gepackte Säule mit einem Bettvolumen von 1 L bei einer Geschwindigkeit von 25 Bettvolumen/Stunde gepumpt. Die Durchschnittsprobe wurde aus den vereinigten Bettvolumen 2 - 65 L genommen.

Von den Proben wurden der TEAC-Wert, der Farbwert E 420 nm und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Der Gehalt einzelner Polyphenole wurde mittels HPLC ermittelt.

Material

a. PVPP

Material : Divergan F (BASF Ludwigshafen) als 10%ige Suspension in entmineral. Wasser

b. Adsorberharz

Material : XAD 16 HP, Laboratoires Chauny, Rohm and Haas S.A., Chauny
Bettvolumen : 1 L

4.1.11. Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Laccase-Behandlung und Ultrafiltration

Die Kombination von Laccase-Behandlung und anschließender Ultrafiltration ist eine weitere Möglichkeit zur Herstellung eines stabilen klaren Apfelsaftes (MAIER 1994, RITTER 1994). Dabei werden die trübungsverursachenden Polyphenole durch enzymatische Oxidation nach Belüftung des Saftes mit Sauerstoff und anschließender Ultrafiltration entfernt. Die Laccase oxidiert o- und p-Diphenolgruppen zu den analogen Chinonen, die zu hochpolymeren Verbindungen weiter reagieren und sich an die Trubpartikel des Saftes binden, so dass sie mit einer Ultrafiltration entfernt werden können (siehe auch 2.1.3.). Der so behandelte Saft ist klar, hell und nachtrübungsstabil.

Die trübe, pasteurisierte Probe wurde in einem Rührtank mit 100 Laccase Units/L (empfohlene Dosage der Fa. Novo Nordisk) versetzt und mit reinem Sauerstoff etwa 15 Minuten belüftet und gerührt. Nach Beendigung des Rührens (ca. 3 Stunden) erfolgte eine Ultrafiltration des so behandelten Saftes. Leider war der großtechnische Versuch teils von gerätetechnischen Problemen begleitet.

Während der Behandlung wurden Proben genommen und der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

Laccase: Enzympräparat von Novo Nordisk *Ferment* Ltd., Neumatt, Schweiz

a. Prozess

Probe:

Rumänisches Apfelsaftkonzentrat (trüb) ca. 70°Brix rückverdünnt auf 22°Brix

b. Einfluss der Enzymkonzentration

Proben:

Laccasebehandelter und ultrafiltrierter Apfelsaft von Novo Nordisk *Ferment* Ltd., Neumatt, Schweiz

Ein trüber Apfelsaft wurde mit verschiedenen Enzymkonzentrationen behandelt (25, 35 und 50 LacU/L) und anschließend ultrafiltriert.

Von den klaren, ultrafiltrierten Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.1.12. Einfluss der Erhitzungsdauer: Kurzzeiterhitzung (KZE) und Flaschenpasteurisation

Die Pasteurisation ist ein zentraler Schritt bei der Herstellung eines haltbaren Fruchtsaftes. Der Einfluss einer KZE und einer längeren Erhitzungsdauer auf die antioxidative Kapazität eines trüben Apfelsaftes wurde untersucht.

Dazu wurde ein Teil eines frisch gepressten, trüben Apfelsaftes nach der Separation in 0,7 L VdF-Flaschen gefüllt. Während der Flaschenpasteurisation bei 85°C in einem Wasserbad wurde jeweils nach 10, 20, 45, 60, 75 und 90 min eine Flasche herausgenommen und auf 4°C abgekühlt. Der Rest des Saftes wurde mittels einer Kurzzeiterhitzungsanlage (Schmidt Sigmatherm) mit 40 Sekunden Heißhaltezeit bei 85°C in einen Edeltank eingelagert. Die Probenahme erfolgte nach der KZE.

Von den Proben wurde der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch) bestimmt.

4.1.13. Einfluss der Lagerung

Bei einer längeren Lagerung von klarem wie auch trübem Apfelsaft finden starke chemische und sensorische Veränderungen statt, die sich u. a. in größeren Verlusten an Polyphenolen im Saft äußern (SPANOS et al. 1990).

Ein klarer und ein trüber Apfelsaft aus der Sorte Boskoop wurde 1 Jahr bei 37°C gelagert, was sehr extremen Lagerungsbedingungen entspricht. Dies führte zu entsprechend starken Veränderungen in dem jeweiligen Produkt. Unter diesen Extrembedingungen sollte geklärt werden, ob sich die Polyphenole und die antioxidative Kapazität bei der Lagerung ähnlich oder unterschiedlich verändern.

Von den Proben wurden vor und nach der Lagerzeit der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Gehalte der einzelnen Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.2 Beeren

4.2.1. Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft

Die Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft benötigt eine andere Verfahrenstechnologie als die Herstellung von Apfelsaft. Die Beeren werden schonend gemahlen, um den Eintrag von Bitterstoffen aus den Kernen zu vermeiden. Zudem enthalten schwarze Johannisbeeren wie die meisten Beeren verhältnismäßig große Mengen Pektin, was eine effektive Entsaftung der Maische stört. Um das Pektin zu entfernen, wird die Maische auf 50°C erwärmt und mit Enzympräparaten versetzt, die pektinabbauende Pektinasen enthalten. Die Erwärmung ist notwendig, da Pektinasen bei dieser Temperatur die höchste Aktivität besitzen. Ein speziell bei schwarzen Johannisbeeren angewandter Produktionsschritt ist die Nachextraktion des Tresters mit heißem Wasser, um die Farbausbeute zu verbessern.

Die Herstellung eines schwarzen Johannisbeersaftes ist in Diagramm 2 schematisch dargestellt.

Der Einfluss der verschiedenen Verarbeitungsstufen auf die antioxidative Kapazität des schwarzen Johannisbeersaftes wurde untersucht. Dazu wurden während der Herstellung eines schwarzen Johannisbeersaftes nach jedem Verarbeitungsschritt Proben genommen. Der Nachextrakt wurde getrennt ausgebaut und untersucht.

Von den Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, der L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch) und die Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

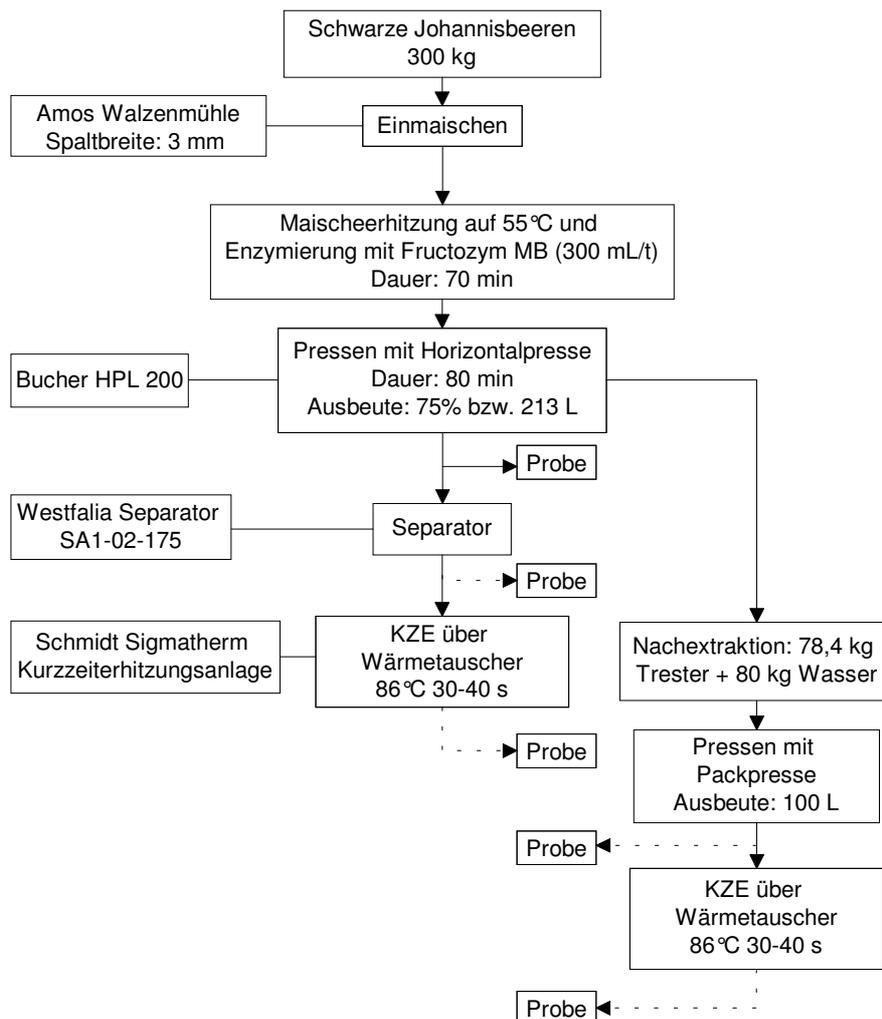


Diagramm 2: Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft

4.2.2. Einfluss der Sorte auf die antioxidative Kapazität von schwarzem Johannisbeersaft

Die Unterschiede der Gehalte an verschiedenen Inhaltsstoffen in Säften aus unterschiedlichen schwarze Johannisbeersorten wurden bereits von DIETRICH et al. 1994 untersucht. Die wichtigsten antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe sind die Polyphenole und die L-Ascorbinsäure.

Zehn Sorten schwarze Johannisbeeren wurden innerhalb einer Woche geerntet und verarbeitet. Die Beeren wurden gemahlen (Walzenmühle), 90 min mit Fructozym MB enzymiert, auf der Packpresse entsaftet und anschließend in der Flasche 30 min bei 85°C pasteurisiert.

Von den pasteurisierten Säften wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, der L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch), der Gesamtsäuregehalt pH 8,1 (berechnet als Citronensäure) und der Extrakt in °Oechsle bestimmt.

4.2.3. Herstellung eines schwarzen Johannisbeerkonzentrates

Im großtechnischen Maßstab wurde ein schwarzer Johannisbeer-Muttersaft direkt nach der Herstellung von 9,62°Brix auf 74°Brix konzentriert. Dazu wurden die Beeren gemahlen, im Röhrenwärmetauscher auf ca. 45°C erwärmt, 2 Stunden enzymiert, in einer Bucher Horizontalpresse (HP 5000) gepresst und zweimal mit warmem Wasser nachextrahiert. Das Aroma des gewonnenen Muttersaftes wurde abgedampft und aufgefangen, der entaromatisierte Muttersaft depektinisiert, mit Gelatine/Kieselöl geschönt und filtriert, anschließend im vierstufigen Fallstromverdampfer (Unipektin) konzentriert, auf 10°C heruntergekühlt und nach Zugabe des Aromas auf 74°Brix eingestellt. Konzentratherstellung und Probenahme erfolgte in einem großen Fruchtsaftbetrieb.

Das Konzentrat wurde zur vergleichenden Analyse anschließend wieder auf 9,62°Brix rückverdünnt.

Von beiden Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, der L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch), die Extinktion bei 520 nm/cm (pH < 1) und der Gehalt einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.2.4. Einfluss der Gelatine-Schönung auf schwarzen Johannisbeer- und Brombeersaft

Zur Herstellung eines klaren schwarzen Johannisbeersaftes ist die Schönung mit Gelatine wie auch beim Apfelsaft das klassische Verfahren. Der Einfluss der Gelatine-Schönung auf die antioxidative Kapazität von schwarzem Johannisbeer- und Brombeersaft wurde untersucht.

Dazu wurden separierter schwarzer Johannisbeer- und Brombeersaft bis zum negativen Alkoholtest mit Fructozym P (200mL/t) enzymiert. Anschließend wurden beide Säfte mit 15 g/hL Gelatine im Labormaßstab geschönt.

Von den Proben wurde der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der Farbwert E 520/cm (pH = 1) bestimmt.

4.2.5. Einfluss der Behandlungsmittel PVPP und Bentonit auf schwarzen Johannisbeersaft

PVPP und Bentonit, das häufig in Kombination mit Gelatine und Kieselöl verwendet wird, sind in der Fruchtsaftherstellung verwendete Behandlungsmittel, wobei PVPP allerdings rechtlich noch nicht zugelassen ist. In der Praxis der Fruchtsaftherstellung werden diese Behandlungsmittel allerdings kaum verwendet. Ihr Einfluss auf die antioxidative Kapazität

von schwarzem Johannisbeersaft wurde untersucht. Dazu wurden den depektinisierten Proben die verschiedenen Behandlungsmittel in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach 15 min Rühren wurden die Proben bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand untersucht.

Von den Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der Farbwert E 520/cm bestimmt.

4.2.6. Herstellung von Brombeersaft, Holundersaft und Sauerkirschsaf

Die Einflüsse der Herstellung anderer polyphenolreicher, farbiger Säfte auf deren antioxidative Kapazität wurde untersucht, um unter anderem die Einflussnahme der unterschiedlichen Polyphenolmuster und Gehalte an Inhaltsstoffen, z.B. L-Ascorbinsäure, abzuschätzen.

Dazu wurde während der Herstellung der Säfte nach jedem Verarbeitungsschritt eine Probe genommen. Die Herstellung von Brombeer- und Holundersaft ist vergleichbar mit der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft allerdings ohne Nachextraktion (siehe 4.2.1. Diagramm 2). Bei der Herstellung von Sauerkirschsaf entfällt die Maischeerhitzung und -enzymierung. Die Holunderbeeren wurden vom Haus Rabenhorst O. Lauffs GmbH & Co. KG, Unkel zur Verfügung gestellt. Die Probenahme bei der Herstellung von Sauerkirschsaf wurde beim Haus Rabenhorst O. Lauffs GmbH & Co. KG, Unkel vorgenommen.

Von dem steril eingelagerten Holundersaft wurden nach 6 Monaten Lagerung im 500 L Stahltank bei 10 – 15 °C eine Probe genommen und erneut untersucht.

Von den Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, der Farbwert E 520/cm (pH = 1) und die Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.2.7. Herstellung eines Stachelbeernektars

Die Verluste an antioxidativer Kapazität und Polyphenolen während der Herstellung eines Stachelbeernektars wurden untersucht. Die Verarbeitung und Probenahme erfolgte gemäß Diagramm 3.

Von den Proben wurden der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

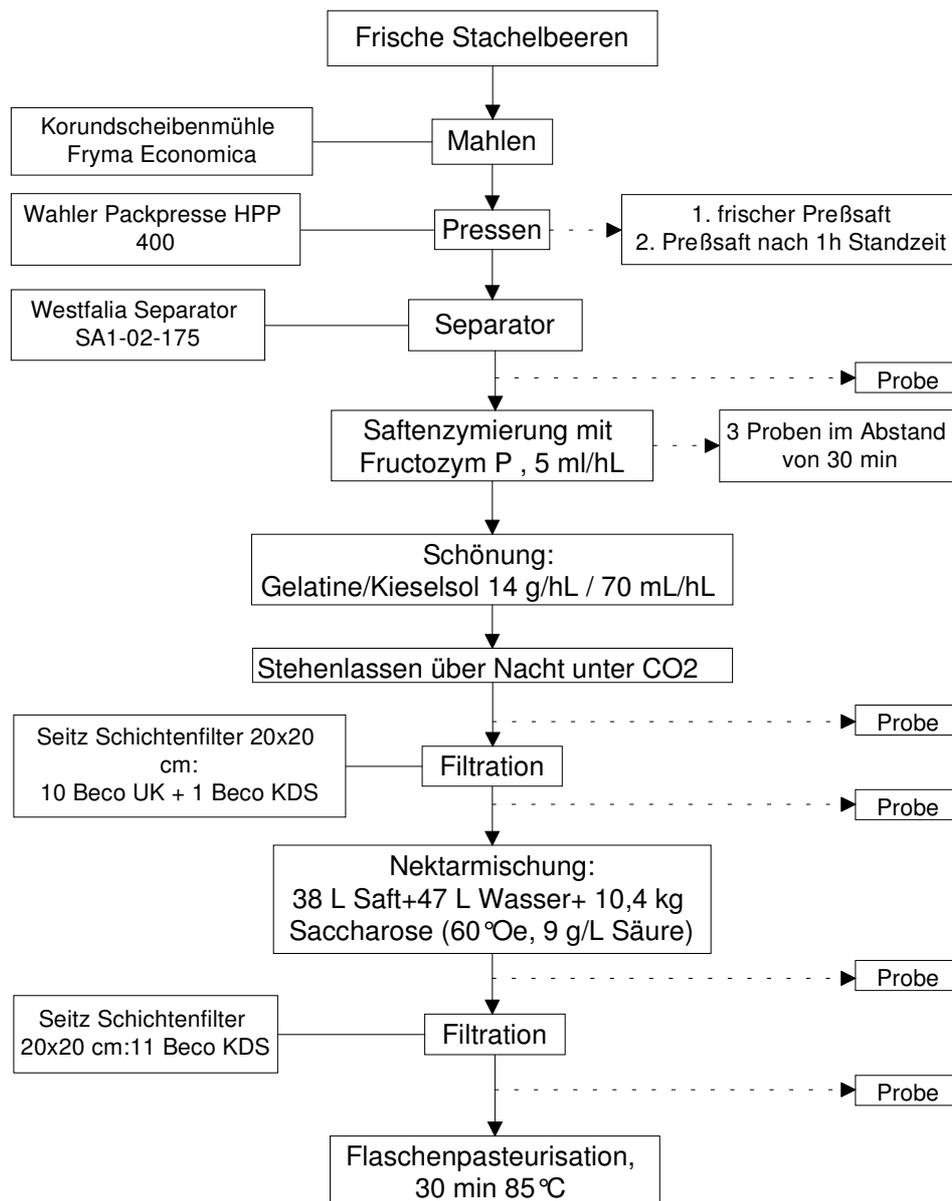


Diagramm 3: Herstellung eines Stachelbeernektars

4.2.8. Einfluss der Reifung auf die antioxidative Kapazität am Beispiel der Reifung verschiedener Erdbeersorten

Während der Reifung einer Frucht unterliegen die Gehalte der Fruchtinhaltsstoffe einem starken Wandel (BELITZ und GROSCH 1992). Die Veränderungen der antioxidativen Kapazität sowie der antioxidativ wirksamen Substanzen der Säfte wurde in zehn verschiedene Erdbeersorten untersucht. Dazu wurden die Erdbeeren nach Sorten getrennt, zu vier verschiedenen Terminen innerhalb von 15 Tagen geerntet und verarbeitet.

Die klein geschnittenen Erdbeeren wurden nach Zugabe von Fructozym BE (Erbslöh, Geisenheim) mit einem Stabmixer homogenisiert, 1 Stunde stehen gelassen und anschließend bei 4500 U/min zentrifugiert.

Von dem Überstand wurde der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, der L-Ascorbinsäuregehalt (jodometrisch) und nach Membranfiltration das Polyphenolmuster mittels HPLC bestimmt.

4.2.9. Entwicklung eines Antioxidansgetränkes auf der Basis verschiedener Beerensäfte

Als Konsequenz der Untersuchungen des Forschungsprojektes wurde auf Basis der ermittelten Ergebnisse ein bekömmliches Antioxidansgetränk entwickelt. Ziel war das Erreichen einer antioxidativen Kapazität, die deutlich höher ist als die mittlere antioxidative Kapazität von Rotwein (8 – 12 mmol/L Trolox), der durch Bekannt werden des „French Paradoxon“ die Diskussion über die Rolle der Polyphenole und ihrer antioxidativen Wirkung in Gang gebracht hat. Neben der antioxidativen Kapazität waren bei der Entwicklung eine gute Bekömmlichkeit, ein interessanter Geschmack und ein hoher Gehalt an natürlichem Vitamin C weitere Kriterien. Das Produkt sollte ein funktionelles Lebensmittel ohne Zusatzstoffe darstellen. Zum Erreichen des Produktziels wurden verschiedene zur Verfügung stehende Fruchtsäfte aus schwarzen Johannisbeeren, Holunderbeeren, Sauerkirschen, Brombeeren, Aronia, weißen Trauben, Äpfeln und Vogelbeeren in diversen Verhältnissen und Anteilen vermischt und sensorisch beurteilt. Als Basis für die Entwicklung des Getränkes waren die Beerensäfte vorgesehen. Von den sensorisch am positivsten beurteilten Proben wurde der TEAC-Wert bestimmt.

Von dem entwickelten Getränk wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, der Gesamtsäuregehalt (pH 8,1), der Extrakt in °Oechsle und das Polyphenolmuster sowie die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.2.10. Herstellung von Fruchtweinen aus verschiedenen Kern-, Beeren- und Steinfrüchten

Aus 7 verschiedenen Kern-, Beeren- und Steinfrüchten wurden nach üblichem Verarbeitungsschema (siehe 4.1.1. und 4.2.1.) Säfte hergestellt. Nach Bestimmung von Gesamtsäuregehalt (pH 8,1) und Extrakt in °Oechsle wurden die Säfte mit entmineral. Wasser und Zucker so verdünnt, dass sie 7,5 g/L Gesamtsäure und 65°Oechsle aufwiesen. Die eingestellten Proben wurden nach Zugabe von Reinzuchthefer vergoren.

Zudem wurden aus Konzentraten von 8 verschiedenen Kern-, Beeren- und Steinsäften mit der gleichen Einstellung (7,5 g/L Gesamtsäure und 65°Oechsle) Fruchtwein hergestellt.

Von den Proben wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

4.2.11. Herstellung eines Fruchtweinessigs aus Moosbeeren

Ein Moosbeerensaft wurde nach der Herstellung mit Zucker (40 g/L) und Reinzuchthefer versetzt und vergoren. Der fertig vergorene Wein wurde nach Zugabe einer Essigbakterienkultur weiter vergoren.

Von Saft, Wein und Essig wurden der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und das Polyphenolmuster sowie die Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC bestimmt.

5. Ergebnisse

5.1. Methoden

5.1.1. Polyphenolanalytik mittels HPLC

Bei der hier vorgestellten Methode wird als stationäre Phase ein neuartiges Reversed Phase Material verwendet, bei dem an einem hochreinen Silicagel ein verzweigter Fluorkohlenwasserstoff gebunden ist (Abbildung 12).

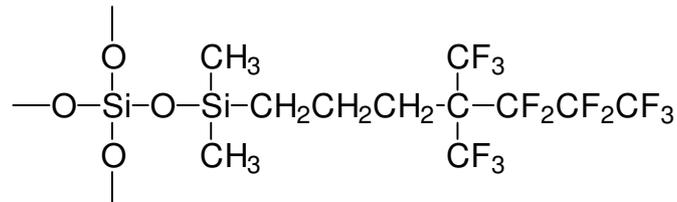


Abbildung 12: Struktur des Fluorkohlenwasserstoffes der Fluofix-Phase

Diese neue stationäre Phase besitzt gegenüber üblichen RP-18-Phasen bessere Trenneigenschaften, gute Säurestabilität und ein günstigeres Druckverhalten. Der Vergleich der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches mit der neuen Methode und einer publizierten Methode an einer RP-18-Phase (RITTER et al. 1994) zeigt die verbesserte Trennung deutlich (Abb. 13 und 14). Vor allem im Bereich der apolareren Polyphenole (Flavonole, Dihydrochalkone usw.), zu denen beispielsweise die im Apfel in größeren Mengen enthaltenen Quercetin- und Phloretinderivate gehören, konnte eine höhere Auflösung erreicht werden.

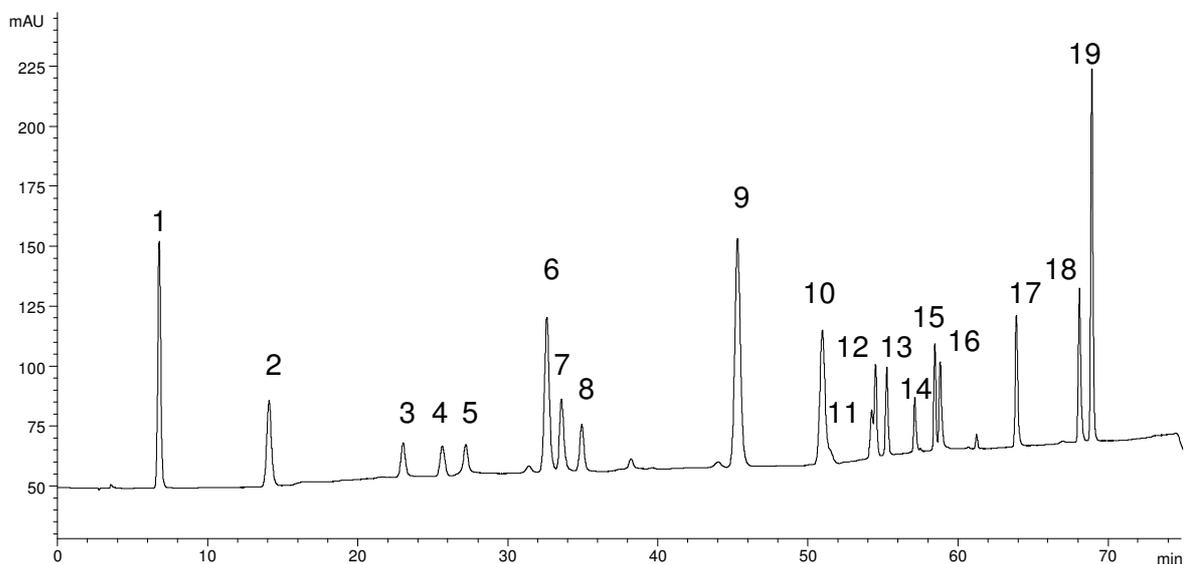


Abbildung 13: Chromatogramm der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches auf der Fluofix-Säule mit amperometrischer Detektion bei 500 mV

Gallussäure (1), Protocatechusäure (2), Tyrosol (3), (+)-Catechin (4), Procyanidin B2 (5), Kaffeesäure (6), Chlorogensäure (7), (-)-Epicatechin (8), p-Coumarsäure (9), Ferulasäure (10), Quercetin-3-galactosid(11), Quercetin-3-rutinosid (12), Quercetin-3-glucosid (13), Quercetin-3-arabinosid (14), Quercetin-3-rhamnosid (15), Phloridzin (16), Quercetin (17), tr-Resveratrol (18), Phloretin (19)

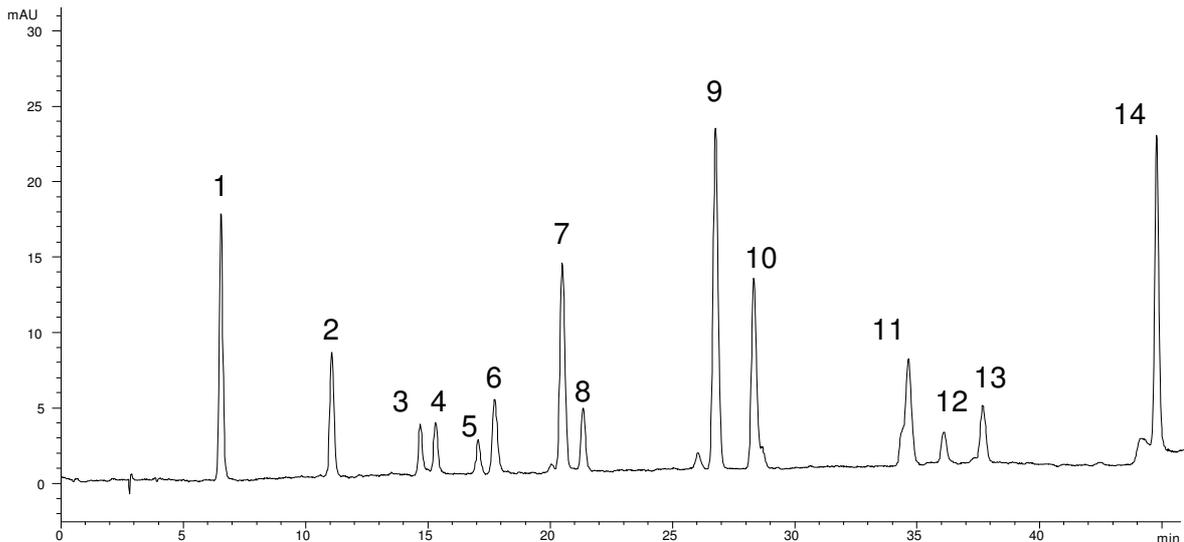


Abbildung 14: Chromatogramm der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches mit UV-Detektion bei 280 nm nach der Methode nach RITTER et al. 1994

Gallussäure (1), Protocatechusäure (2), Tyrosol (3), (+)-Catechin (4), Procyanidin B2 (5), Kaffeesäure (6), Chlorogensäure (7), (-)-Epicatechin (8), p-Coumarsäure (9), Ferulasäure (10), Quercetin-3-galactosid + Quercetin-3-rutinosid + Quercetin-3-glucosid (11), Phloridzin + Quercetin-3-arabinosid (12), Quercetin + Quercetin-3-rhamnosid (13), tr-Resveratrol + Phloretin (14)

Mit dem verwendeten Phosphorsäure/Acetonitril-Gradient konnte während 75 Minuten eine gute Trennung der wichtigsten Polyphenole (19 bzw. 21 Standardsubstanzen) und Anthocyane (Abb. 15) erreicht werden. Um die Anthocyane gleichzeitig mit den Polyphenolen analysieren zu können, musste der Eluent auf einen pH-Wert von 1,8 eingestellt werden. Bei höheren pH-Werten ergeben die Anthocyane bedingt durch ihre chemische Struktur (siehe 2.1.1.) in der Chromatographie mittels HPLC sehr breite, nicht auswertbare Peaks. Zur Probenvorbereitung war eine Membranfiltration ausreichend.

Ein weiteres Ziel der Methodenentwicklung war die Erhöhung der Empfindlichkeit und der Selektivität. Dies konnte durch die Verwendung eines elektrochemischen Detektors erreicht werden. Dazu wurde im Eluenten Acetonitril als organische Komponente verwendet, da es wie die Phosphorsäure bei dem gewählten Potential keine Reaktion an der Elektrode zeigte. Die Detektion erfolgt bei einem Potential von 500 mV an einer Platinelektrode. Neben der Empfindlichkeitserhöhung zeigten sich bei dem gewählten Potential recht unterschiedliche, jedoch charakteristische Empfindlichkeiten für die einzelnen Stoffgruppen unter den Polyphenolen, z. B. Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und Anthocyane. Besonders die Stoffgruppe der Flavan-3-ole und deren Oligo- und Polymere den Procyanidinen lassen sich aufgrund ihres dominanten Potentials, das im Bereich des verwendeten Detektionspotentials liegt (GUO 1997), sehr empfindlich detektieren. Ein Vergleich der Chromatogramme einer Probe mit üblicher UV-Detektion und nachfolgender elektrochemischer Detektion (Abbildung 15) zeigt diese Empfindlichkeitserhöhung und die Unterschiede in der Signalintensität einzelner Polyphenole.

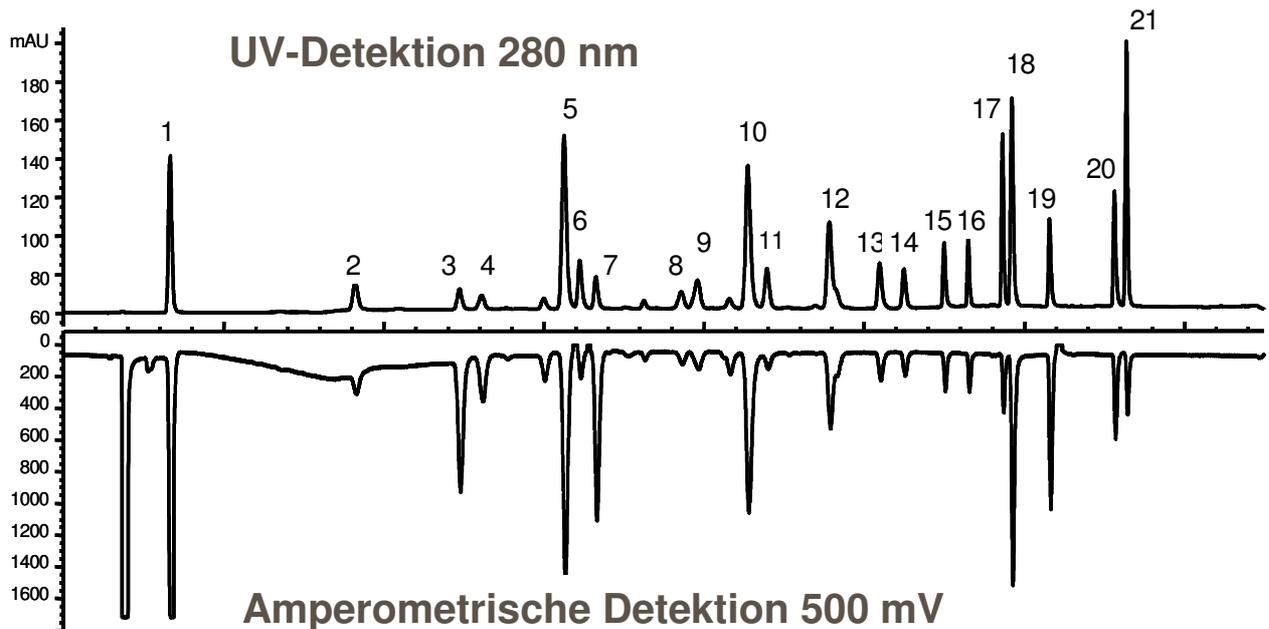


Abbildung 15: Vergleich der Chromatogramme der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches. UV-Detektion bei 280 nm und amperometrischer Detektion bei 500 mV
 Gallussäure (1), Neochlorogensäure (2), (+)-Catechin (3), Procyanidin B2 (4), Kaffeesäure (5), Chlorogensäure (6), (-)-Epicatechin (7), Delphinidin-3-glucosid (8), Delphinidin-3-rutinosid (9), p-Coumarsäure (10), Cyanidin-3-rutinosid (11), Ferulasäure (12), Quercetin-3-galactosid (13), Quercetin-3-glucosid (14), Quercetin-3-arabinosid (15), Quercetin-3-rhamnosid (16), Phloridzin (17), tr-Resveratrol (18), Quercetin (19), Kaempferol (20), Phloretin (21)

Es wurden noch andere HPLC-Methoden zur Polyphenolanalytik veröffentlicht, die ebenfalls eine elektrochemische Detektion verwenden (BERNWIESER et al. 1994, GUO et al. 1997). Allerdings handelt es sich dabei um eine coulometrische Elektroden-Array-Detektion, bei der in Mehrkanaltechnik (max. 12) bei verschiedenen Potentialen gemessen wird, wodurch eine Potentialkurve der detektierten Substanz erhalten wird, die zur Identifizierung der Substanz verwendet werden kann. Da bei diesen Methoden der apparative Aufwand sowie die Kosten für eine Standardmethode sehr hoch sind, wurde eine Alternative gesucht und in dem benutzten elektrochemischen Detektorsystem gefunden, das durch Verwendung von Elektroden in „Chipbauweise“ in der Anwendung sehr kostengünstig und bedienungsfreundlich ist.

Durch Kombination mit einer UV/Vis-Detektion mittels DAD konnten so in einem Analysenlauf bei höherer Empfindlichkeit mehr Aussagen über die einzelnen Polyphenole der analysierten Probe getroffen werden. Allerdings sind die Daten aus dem UV-Vis-Spektrum mittels DAD und der elektrochemischen Detektion häufig nicht genügend aussagekräftig. Beispielsweise kann die Gruppe der Procyanidine, Oligo- und Polymere der Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin, mit diesen zur Verfügung stehenden Mitteln nicht unterschieden werden. Ein Problem der Polyphenolanalytik ist auch das Fehlen von Standardsubstanzen, die als Referenz dienen könnten.

Die Methode eignet sich zur Analyse von trüben und klaren Fruchtsäften (Kern- und Beerenobst, Traubenmost, Zitrusfrüchte) sowie von Weiß- und Rotwein und anderen Getränken.

Die Detektion mittels gepulster Amperometrie (PAD) wurde ebenfalls untersucht. Diese ist aufgrund des Verlustes an Empfindlichkeit als weniger geeignet beurteilt worden.

5.1.1.1. Anthocyan- und Gesamtphenolgehalte verschiedener rotfarbiger Fruchtsäfte

Der Gesamtphenolgehalt wie auch der Gehalt an monomeren Anthocyanen mittels HPLC ist bei Früchten sehr verschieden. Zur Analyse wurden frische Presssäfte verwendet. Der Saft der Holunderbeere hat sowohl den höchsten Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu als auch den höchsten Anthocyanengehalt mittels HPLC. Auch der Anteil der Anthocyane am Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu ist bei den Früchten sehr verschieden (Abbildung 16). Bei Holundersaft sind es etwa 60%, bei schwarzem Johannisbeersaft ca. 56%, bei Brombeersaft ca. 40%, bei Sauerkirschsafft ca. 21%, bei rotem Johannisbeersaft nur ca. 15% und bei Erdbeersaft gar nur 6%.

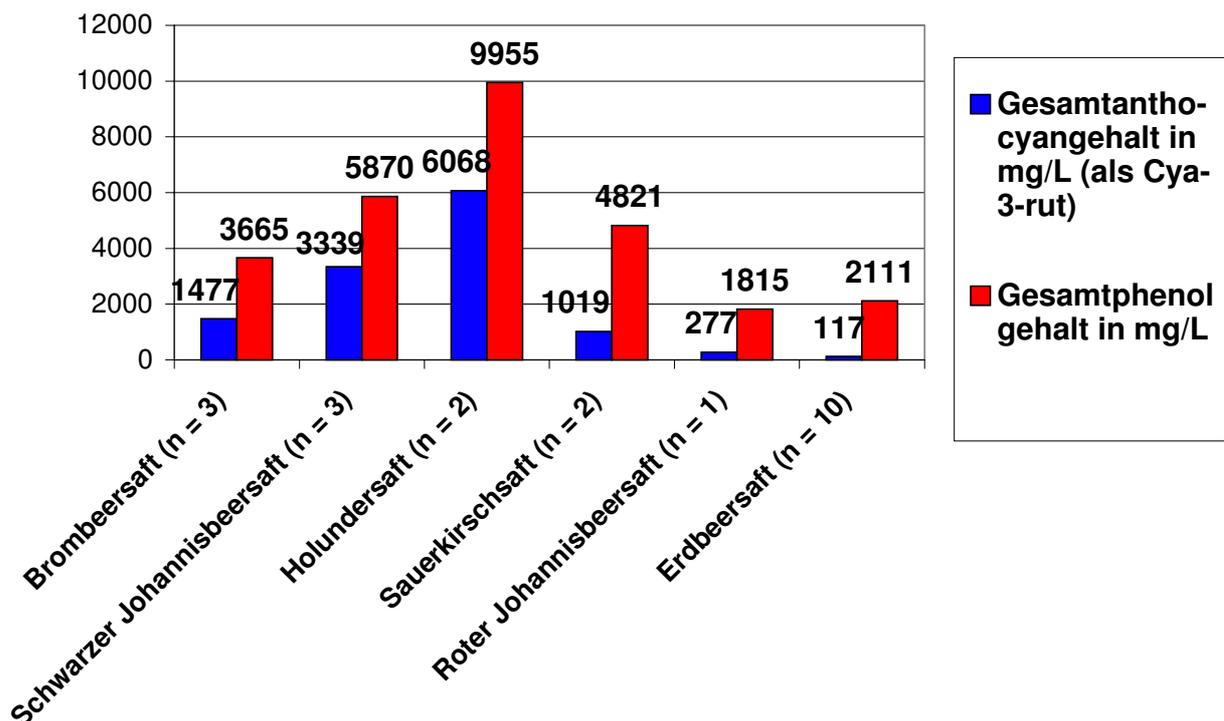


Abbildung 16: Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC und Gesamtphenolgehalt verschiedener Buntsäfte

Allgemein haben die Buntsäfte vergleichsweise hohe Gesamtphenol- und Anthocyanengehalte, was sich auch in ihrer hohen antioxidativen Kapazität widerspiegelt (siehe 5.1.5.1.). Auf das Polyphenolmuster und die Gehalte an monomeren Polyphenolen der Buntsäfte wird bei schwarzem Johannisbeersaft, Holundersaft, Brombeersaft und Sauerkirschsafft nachfolgend detaillierter eingegangen.

5.1.2. Isolierung von Anthocyanen aus schwarzem Johannisbeersaft

Es konnte eine Methode zur Isolierung der Anthocyane aus schwarzem Johannisbeersaft erarbeitet werden. Durch Herstellung eines Adsorberharzextraktes und anschließender Isolierung mittels präparativer HPLC und Gefriertrocknung der gesammelten Fraktionen konnten die drei Anthocyane Delphinidin-3-glucosid, Delphinidin-3-rutinosid und Cyanidin-3-rutinosid aus schwarzen Johannisbeeren gewonnen werden. Dazu konnte eine ausreichende Trennung der Anthocyane mittels präparativer HPLC erreicht werden (Abbildung 17).

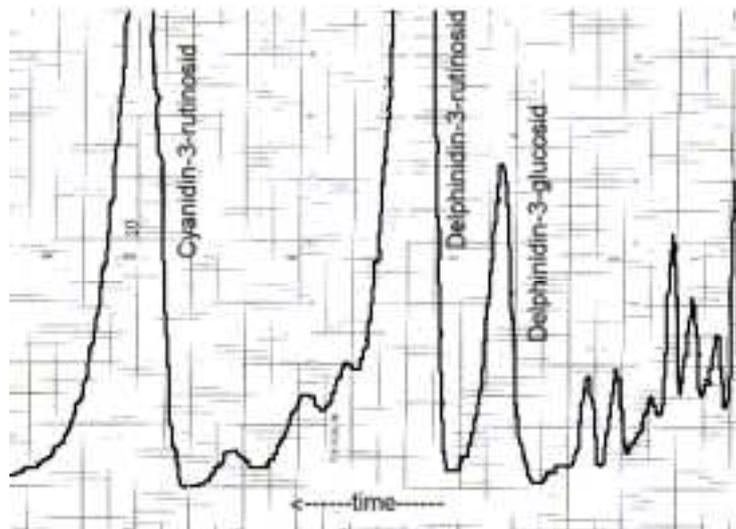


Abbildung 17: Chromatogramm der präparativen Trennung des ethanolischen Extraktes von schwarzem Johannisbeersaft bei 280 nm

Die Überprüfung der Reinheit mittels HPLC ergab eine Reinheit > 90% für alle drei isolierten Substanzen. Die isolierten Anthocyane wurden zur Identifizierung und Quantifizierung in der Polyphenolanalytik mittels HPLC verwendet.

5.1.3. Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid aus Apfelsaft

Nach Behandlung des Apfelsaftes mit Laccase/O₂ und Herstellung eines Adsorberharzextraktes konnten nach anschließender Isolierung mittels präparativer HPLC und Gefriertrocknung der gesammelten Fraktionen die Polyphenole Coumaroylchinasäure und Phloretin-2'-xyloglucosid aus Apfelsaft gewonnen werden. Durch die Vorbehandlung des Apfelsaftes mit Laccase konnten die Isolierung störende Polyphenole aus dem Polyphenolmuster entfernt werden. Abbildung 18 zeigt das Polyphenolmuster des Extraktes.

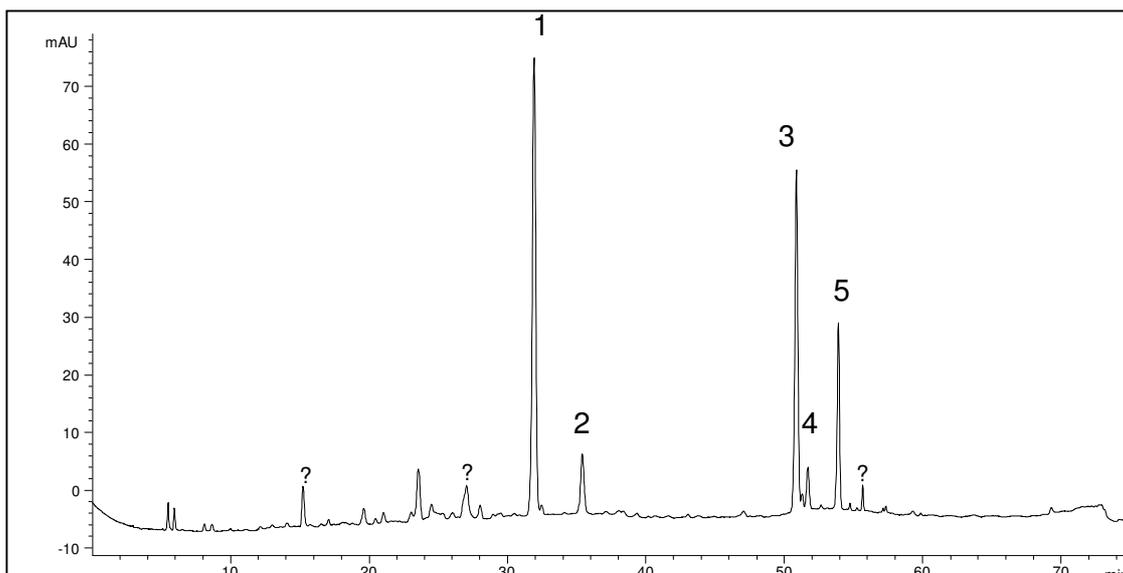


Abbildung 18: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes (Verdünnung 1:10) aus laccasebehandeltem Apfelsaft bei 280 nm
4-p-Coumaroylchinasäure (1), 5-p-Coumaroylchinasäure (2), Phloretin-2'-xyloglucosid (3), Phloretin-2'-xylogalaktosid (4), Phloridzin (5)

Mit der präparativen HPLC konnte eine ausreichende Trennung der einzelnen Polyphenole erreicht werden (Abbildung 19).

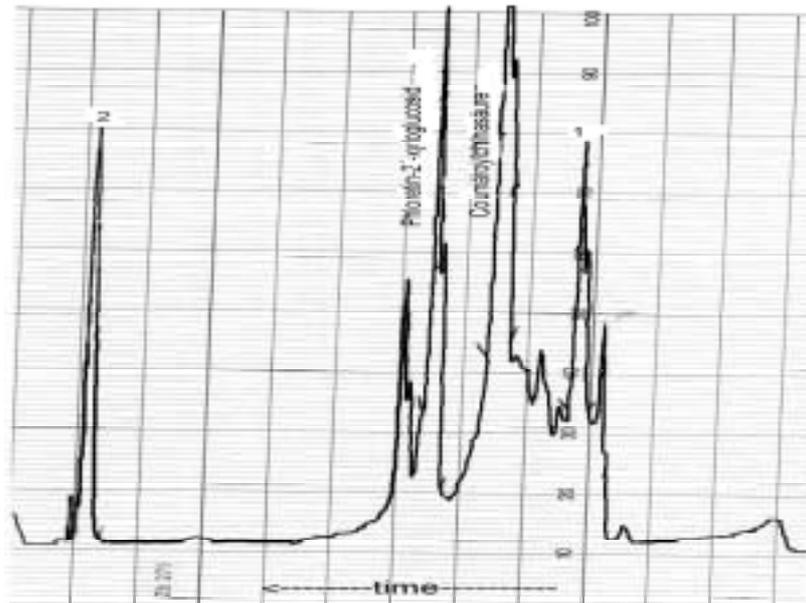


Abbildung 19: Chromatogramm der präparativen Trennung bei 280 nm

Aufgrund des späten Zeitpunktes der Isolierung der Substanzen und den Überprüfungen der Identität konnten diese nicht mehr für die Polyphenolanalytik mittels HPLC verwendet werden.

Überprüfung der Reinheit mittels der analytischen HPLC

Die Überprüfung ergab für das Phloretin-2'-xyloglucosid (Abbildung 20) eine befriedigende Reinheit, während die Coumaroylchinasäure im Laufe der Isolierung zu den drei Isomeren 3-4- und 5-p-Coumaroylchinasäure isomerisierte, eine Reaktion wie sie in der Literatur für Hydroxyzimtsäure-Chinasäureester beschrieben ist (CLIFFORD et al. 1989) (Abbildung 21).

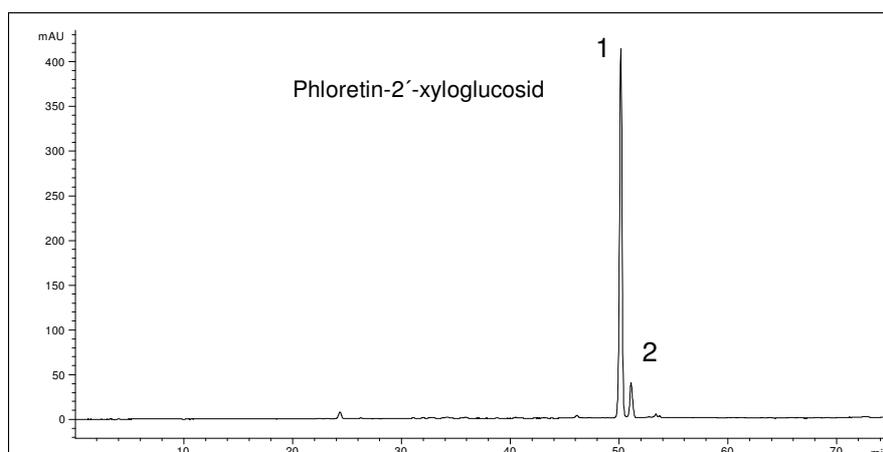


Abbildung 20: Chromatogramm des präparativ isolierten Phloretin-2'-xyloglucosid-Peaks bei 280 nm

Prozentuale Peakflächenverhältnisse:
 Phloretin-2'-xyloglucosid (1): 91%
 Phloretin-2'-xylogalaktosid (2): 9%

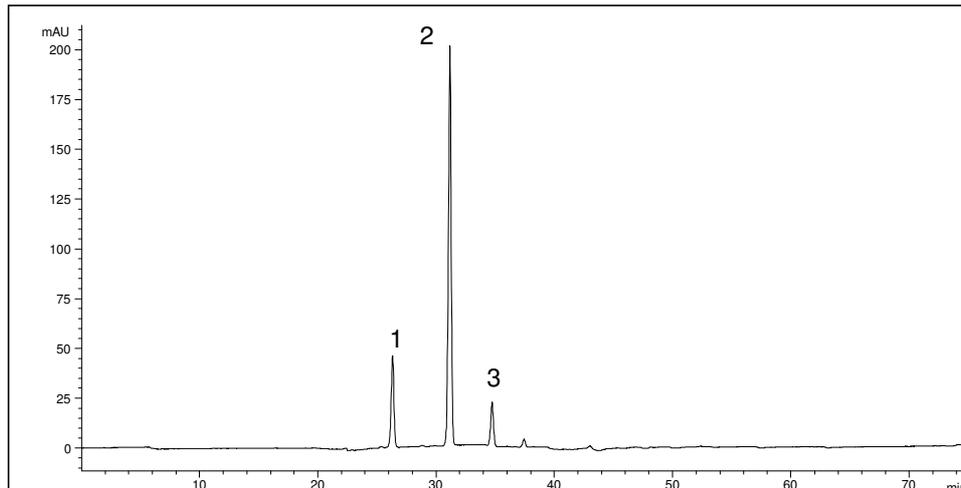


Abbildung 21: Chromatogramm des präparativ isolierten Coumaroylchinasäure-Peaks bei 320 nm

Prozentuale Peakflächenverhältnisse:

3-p-Coumaroylchinasäure (1):	17%
4-p-Coumaroylchinasäure (2):	74%
5-p-Coumaroylchinasäure (3):	8%

Identifizierung des Phloretin-2'-xyloglucosids durch saure Hydrolyse und Bestimmung der Zucker mittels HPAEC

Nach der Hydrolyse der Probe konnten mittels HPAEC die Zucker Glucose und Xylose nachgewiesen werden. Die Annahme, dass es sich bei den Zuckerresten der isolierten Substanz um die Zucker Xylose und Glucose handelt, bestätigt sich damit (Abbildung 22).

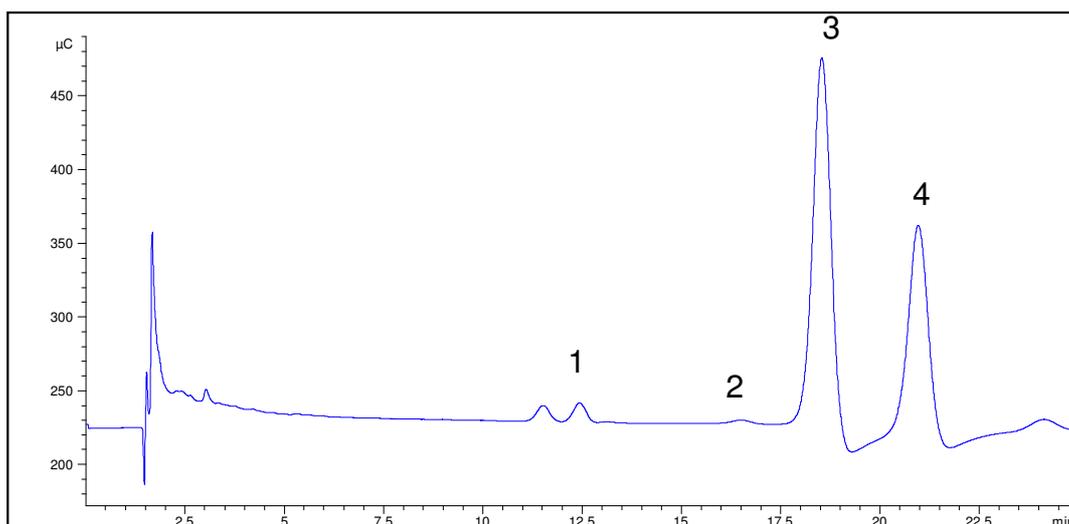


Abbildung 22: Zucker des Phloretin-2'-xylosylglucosid-Peaks nach saurer Hydrolyse Rhamnose (1), Galaktose (2), Glucose (3), Xylose (4)

Die Spuren von Rhamnose und Galaktose werden auf geringe Verunreinigungen nicht phenolischer Substanzen zurückgeführt.

Identifizierung mittels LC-MS

Eine weitere Bestätigung für die Annahme, dass es sich bei den isolierten Substanzen um Phloretin-2'-xyloglucosid und Coumaroylchinasäure handelt, wurde durch eine LC-MS-Analyse der beiden Substanzen durch Frau Dr. Eberhardt, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Lebensmittelchemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gegeben.

Die Molmassenpeaks: Coumaroylchinasäure (m/z 337 [M-H]⁻) und Phloretin-2'-xyloglucosid (m/z 567 [M-H]⁻).

Fragmentierungsmuster: Coumaroylchinasäure in p-Coumarsäure (m/z 163 [M-H]⁻) und Chinasäure (m/z 191[M-H]⁻ bzw. m/z 173 [M-H-H₂O]⁻) sowie das Phloretin-2'-xyloglucosid in Phloretin (m/z 273 [M-H]⁻) der beiden isolierten Substanzen bestätigen die vermutete Identität.

5.1.4. Versuch der Isolierung von Polyphenolen aus Apfelsaft mittels Gelchromatographie an einer Säule mit Sephadex LH 20

Es wurden insgesamt 95 Fraktionen gesammelt und von ihnen photometrisch die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Das daraus ermittelte Gelchromatogramm wies drei Peaks und eine Schulter auf, die mittels analytischer HPLC weiter untersucht wurden (Abbildung 23).

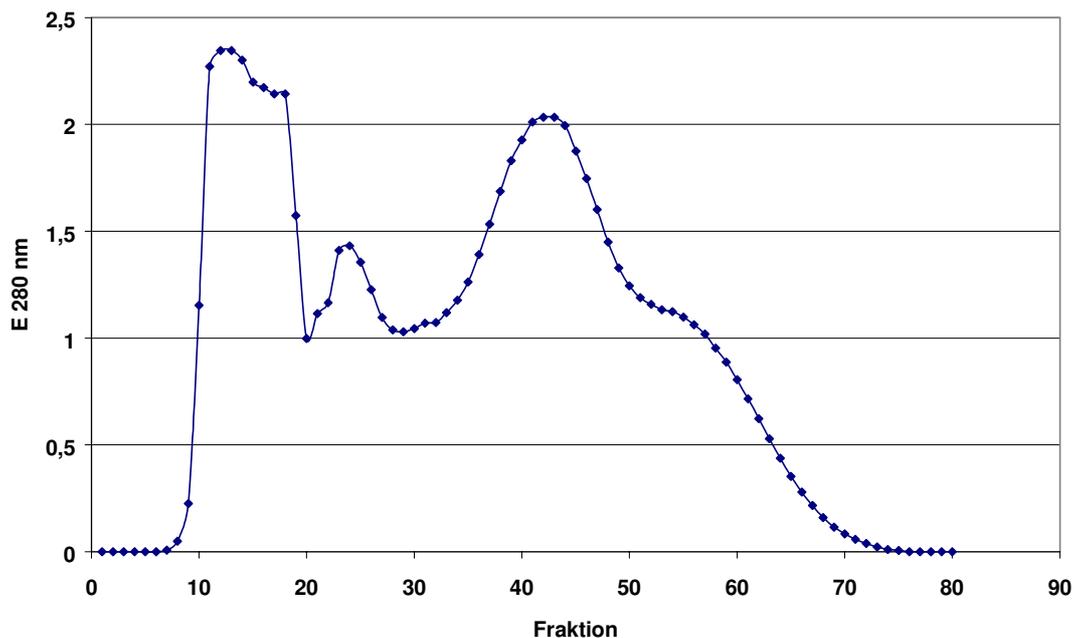


Abbildung 23: Extinktion bei 280 nm der gesammelten Fraktionen der Trennung eines Apfelsaftextraktes an einer Säule mit Sephadex LH 20 (Gelchromatogramm)

Von den Fraktionen 12, 24, 42 und 54, die jeweiligen Maxima der drei Peaks und der Schulter im Gelchromatogramm, wurden eine 1:10 Verdünnung mit entmineral. Wasser hergestellt und ein Polyphenolmuster mittels HPLC bestimmt.

Die HPLC Analyse zeigte, dass sich Peak 2 (Fraktion 22 – 27) der Gelchromatographie zur präparativen Isolierung der Coumaroylchinasäure zu eignen scheint, während sich Peak 3 (Fraktionen 36 – 50) zur präparativen Isolierung des Phloretin-2'-xyloglucosides geeignet scheint. Die Trennung war allerdings nicht vollständig, was auf das nicht ausreichende Bettvolumen der verwendeten Säule zurückgeführt wird.

Die Analyse von Fraktion 54 (fast ausschließlich Phloretin-2'-xyloglucosid) zeigt, dass eine Verlängerung des Gelbettes eventuell zu einer vollkommenen Auftrennung der vier im

Extrakt enthaltenen Polyphenole in der Elutionsreihenfolge Coumaroylchinasäure, Chlorogensäure, Phloridzin und Phloretin-2'-xyloglucosid führen könnte (Abbildung 24).

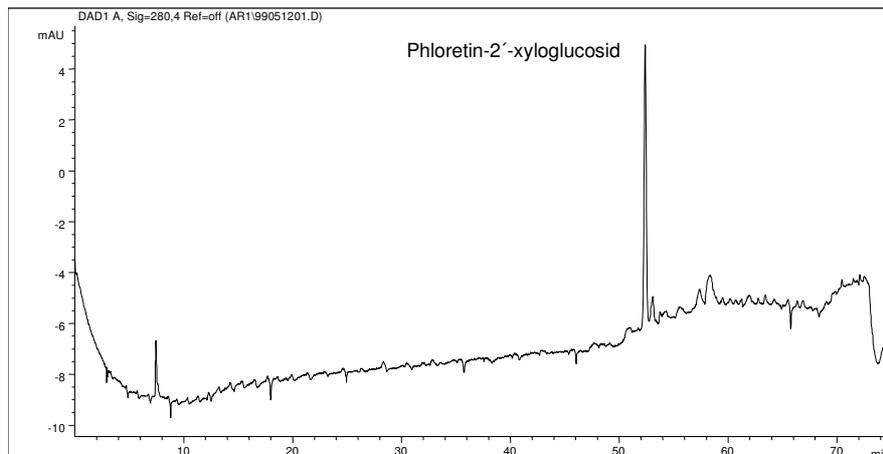


Abbildung 24: Chromatogramm von Fraktion 54 bei 280 nm

Daher könnte die Methode wegen der erheblich höheren Aufgabemenge des zu trennenden Extraktes eine interessante Alternative zur präparativen HPLC darstellen.

5.1.5. Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode

Vergleich verschiedener Messprinzipien

Neben dem in Abschnitt 3.3. beschriebenen Messprinzip gibt es eine weitere Möglichkeit den TEAC-Wert nach dieser Methode zu bestimmen. Dies ist die Messung der Lagphase und die Berechnung des TEAC-Wertes aus der ermittelten Zeit der Lagphase. Ein Problem bei der Bestimmung der Lagphase ist die exakte Bestimmung des Beginns der Farbreaktion, da der Beginn der Reaktion zögerlich ist (vergl. Abbildung 10 S. 55). Es ergeben sich unterschiedliche Zeiten für die Lagphase, wenn der Zeitpunkt der ersten Veränderung der Extinktion zur Berechnung verwendet wird oder die entstehende Gerade des Extinktionsanstiegs extrapoliert wird, um den Schnittpunkt mit der Zeitachse als Beginn der Reaktion für die Berechnung zu ermitteln. Ein Vergleich der beiden Messprinzipien zur Bestimmung des TEAC-Wertes ergab eine Korrelation der Werte von $R^2 = 0,9936$ ($n = 14$), aber einen ca. 20% höheren TEAC-Wert der vorgestellten Methode gegenüber der Methode, die sich auf die Bestimmung der Lagphase stützt (Abbildung 25).

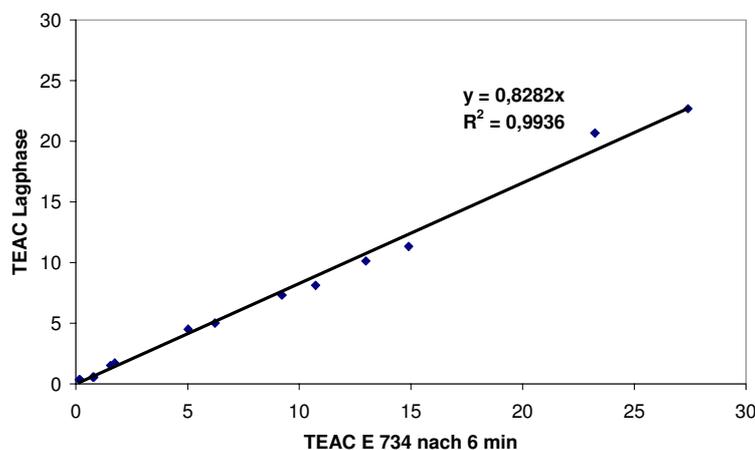


Abbildung 25: Vergleich der Messprinzipien Lagphase-Bestimmung und Extinktionsbestimmung nach 6 Minuten zur Ermittlung des TEAC-Wertes ($n = 14$)

Daraus wird geschlossen, dass beide Messprinzipien zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Ein Nachteil der Lagphase-Methode ist der erheblich höhere Zeitaufwand, da immer nur eine Probe gemessen werden kann, während bei dem in der vorgestellten Methode verwendeten Messprinzip innerhalb von 12 Minuten 11 Proben in Doppelbestimmung gemessen werden können.

Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren

Als wichtige Einflussfaktoren und Fehlerquellen stellten sich die Temperatur sowie der pH-Wert der Testlösung heraus.

Je höher die Temperatur ist, desto höher ist die Bildungsgeschwindigkeit des Ferrylmyoglobinradikals und damit auch des $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Radikalkations, so dass sich die Lagphase und der Kurvenverlauf verändern (Abbildung 26).

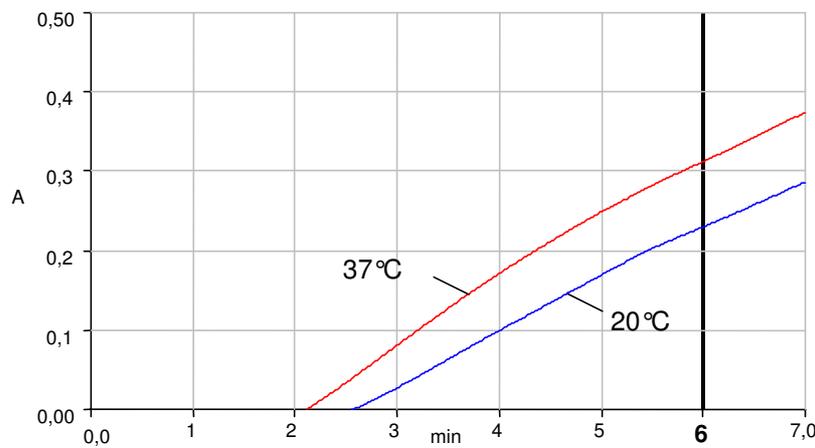


Abbildung 26: Vergleich der Farbreaktion einer Apfelsaftprobe im TEAC-Test bei 20°C und bei 37°C

Ein Messfehler durch diesen Einflussfaktor lässt sich bei der Ausführung des Tests durch eine Temperierung der Testlösung sowie der Probenlösungen auf 20°C minimieren.

Eine Verringerung des pH-Wertes der Testlösung durch säurereiche Proben führt zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit der Farbreaktion und einer Verkürzung der Lagphase. Das bedeutet, dass die Steigung der Farbreaktion erhöht wird und die Grundvoraussetzung des Messprinzips, gleiche Steigung bzw. Geschwindigkeit der Farbreaktion, nicht mehr gewährleistet ist (Abbildung 27).

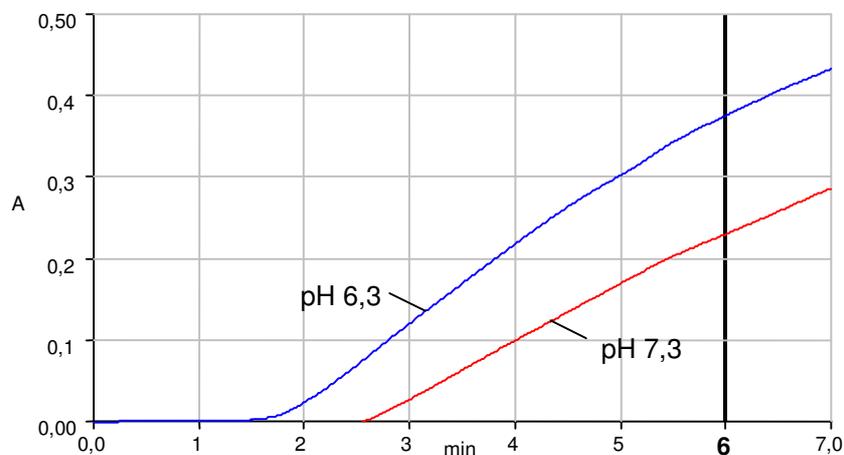


Abbildung 27: Vergleich der Farbreaktion einer Apfelsaftprobe im TEAC-Test bei Verdünnung der Probe mit entmineral. Wasser (pH 6,3) und PBS-Probenpuffer (pH 7,3)

Zur Lösung dieses Problems wird ein gegenüber dem normalen PBS-Puffer zehnfach konzentrierter PBS-Puffer (pH 7,2-7,4) bei der Verdünnung von säurereichen Proben wie beispielsweise Beerenobstsäfte oder Säfte aus säurereichen Apfelsorten verwendet, so dass der pH-Wert der Testlösung stabil bleibt.

5.1.5.1. Antioxidative Kapazität (TEAC-Wert) von Fruchtsäften, alkoholischen und nicht alkoholischen Getränken

Die TEAC-Werte verschiedener Frucht- und Gemüsesäfte sowie anderer wässriger Proben wurden im Verlauf der Arbeit bestimmt. Einige Daten sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: TEAC-Werte einiger Frucht- und Gemüsesäfte sowie alkoholischer Getränke

Probe	Probenanzahl	TEAC-Wert [mmol/L Trolox] Mittelwert (Schwankungsbreite)
Apfelsaft	71	2,9 (0,5 – 7,0)
Schwarzer Johannisbeersaft	29	32,4 (25 – 40)
Schwarzer Johannisbeernektar	9	9,3 (7 – 14)
Roter Johannisbeersaft	3	8,7 (7 – 10)
Brombeersaft	3	12,2 (10 – 15)
Holundersaft	2	55 (50 – 60)
Holundersaft*	2	30 (29 – 31)
Erdbeersaft	10	14,2 (10 – 20)
Stachelbeersaft	2	2,5 (2 – 3)
Moosbeersaft	3	11,2 (10 – 12)
Cranberrysaft	7	11,6 (9 – 14)
Vogelbeersaft	4	8,5 (6 – 10)
Sauerkirschsaft	3	23,2 (20 – 25)
Sauerkirschnektar	7	7,5 (4 – 12,5)
Roter Traubensaft*	15	3,9 (2 – 6)
Weißer Traubensaft*	4	0,5 (0,2 – 1)
Orangensaft*	20	2,4 (2 – 3)
Multivitaminsaft*	10	3,4 (2 – 4,5)
A-C-E Multivitaminsaft*	1	4,5
Tee-Erfrischungsgetränke*	4	4,1 (2,5 – 5,0)
Karottensaft*	3	1,2 (1 – 1,5)
Tomatensaft*	3	1
Rote Beetesaft*	2	7,8 (7,6 – 7,9)
Rotwein*	49	11,1 (7 – 18)
Weißwein*	20	0,6 (0 – 1,5)
Bier*	6	1,3 (1 – 2,5)
Apfelwein*	16	4,2 (2 – 7,5)
Apfelessig*	5	1,8 (0,7 – 3,5)
Traubenweinessig	7	1,7 (0,7 – 3,6)

* nur Handelsproben

Die Untersuchung der antioxidativen Kapazität von Fruchtsäften, Weinen und Getränken mit der TEAC-Methode zeigt große Unterschiede in den ermittelten Werten.

Die in Deutschland am häufigsten getrunkenen Säfte Apfelsaft und Orangensaft siedeln sich im unteren Bereich der ermittelten antioxidativen Kapazitäten an. Ähnlich verhält es sich mit ihren Nachfolgern im jährlichen Pro-Kopf-Verbrauch dem Multivitaminsaft (3 L in 1998) und dem Traubensaft (1,3 L in 1998). Beerensäfte hingegen weisen alle bis auf Stachelbeere und

rote Johannisbeere Werte um und über 10 mmol/L Trolox auf und liegen damit deutlich höher, wobei schwarzer Johannisbeersaft, Sauerkirschsaft und Holundersaft mit besonders hohen Werten hervorgehoben werden sollen.

Die Werte für roten Traubensaft sind gerade im Vergleich zu den Werten für Rotwein enttäuschend niedrig (2 – 6 mmol/L Trolox gegenüber 7 – 18 mmol/L Trolox). Gründe könnten der Verschnitt mit weißem Traubensaft und kurze Maischestandzeiten sein.

Gemüsesäfte haben ebenfalls sehr niedrige antioxidative Kapazitäten, was allerdings höchstwahrscheinlich an der Testmethode liegt, da in ihr die antioxidative Wirkung von lipophilen Carotinoiden kaum erfasst wird.

Bei den alkoholischen Getränken hat der Rotwein den mit Abstand höchsten Wert. Weißwein und Bier haben nur relativ niedrige Werte. Der Apfelwein liegt etwas höher auch im Vergleich zum Apfelsaft, was vermutlich an der Verwendung von mehr polyphenolreichen Mostapfelsorten bei der Herstellung liegt.

Anteil der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert von Orangen-, Apfel- und schwarzem Johannisbeersaft

Ein interessanter Aspekt ist der Anteil der L-Ascorbinsäure an der antioxidativen Kapazität einiger Säfte. Dieser Anteil kann zum Teil erheblich sein. Für schwarzen Johannisbeersaft (n = 10) und Orangensaft (n = 14), die von Natur aus L-Ascorbinsäure enthalten, und für naturtrüben Apfelsaft (n = 10), dem die L-Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel zugesetzt wird, wurde der Anteil der L-Ascorbinsäure (1 mmol/L L-Ascorbinsäure = 0,86 mmol/L Trolox => 1 mg/L L-Ascorbinsäure entspricht 0,0049 mmol/L Trolox) am TEAC-Wert der Säfte berechnet (Abbildung 28).

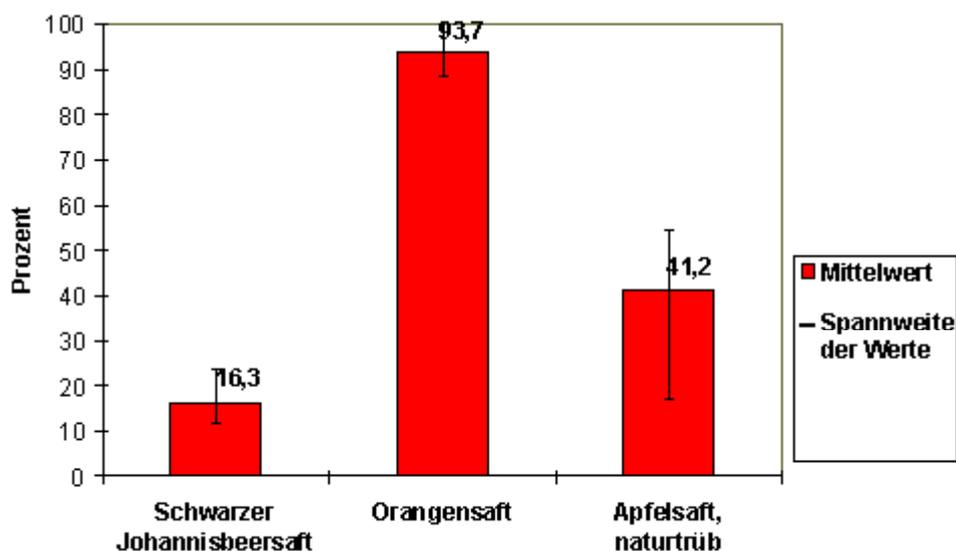


Abbildung 28: Mittlerer Anteil der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert von schwarzem Johannisbeersaft (n = 10), Orangensaft (n = 14) und naturtrübem Apfelsaft (n = 10)

Das Ergebnis zeigt, dass der Anteil der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert gerade beim naturtrübem Apfelsaft zur genaueren Beurteilung der antioxidativen Kapazität der Säfte beachtet werden muss. Beim naturtrübem Apfelsaft ist der Anteil mit 15 – 55% teilweise recht erheblich. Beim Orangensaft ist die antioxidative Kapazität im Prinzip ausschließlich auf den Gehalt an L-Ascorbinsäure zurückzuführen, was mit den Ergebnissen von MILLER und RICE-EVANS 1997 übereinstimmt. Beim schwarzen Johannisbeersaft ist erstaunlich, dass trotz seines hohen Gehaltes an L-Ascorbinsäure ihr Anteil an der antioxidativen Kapazität mit 12 – 24% relativ gering ist. Der Hauptteil der antioxidativen Kapazität von schwarzem

Johannisbeersaft wird von den Polyphenolen gestellt. Dieses Ergebnis weicht deutlich von den Ergebnissen von MILLER und RICE-EVANS 1997, die einen Anteil der L-Ascorbinsäure an der antioxidativen Kapazität eines schwarzen Johannisbeer-Getränkes (Ribena) von 74% angeben. Grund ist vermutlich der erhebliche Unterschied zwischen diesem Getränk und den hier untersuchten frischen Presssäften in Inhaltsstoffkonzentrationen und Herstellung. Das schwarze Johannisbeer-Getränk wurde aus einem nicht näher spezifizierten Konzentrat hergestellt und wies einen TEAC-Wert von 5,1 mmol/L auf, wohingegen die untersuchten schwarzen Johannisbeersäfte TEAC-Werte von 25 – 40 mmol/L Trolox hatten.

5.2. Verarbeitungsversuche

5.2.1. Apfel

5.2.1.1. Polyphenolanalytik von Apfelsaft mittels HPLC

Im Rahmen der Arbeit wurden mit der entwickelten HPLC-Methode zur Polyphenolanalytik diverse Apfelsäfte untersucht und ausgewertet. Bei den Proben handelte es sich um Handelsproben, Proben aus den Verarbeitungsstudien und Proben reinsortig ausgebauter Äpfel aus Tafelobst- und Mostobstsorten.

In den frischen Presssäften konnten die vier Polyphenole Chlorogensäure, 4-p-Coumaroylchinasäure, Phloretin-2'-xyloglucosid und Phloridzin immer nachgewiesen werden. Phloretin-2'-xyloglucosid wurde dabei als Phloridzin und 4-p-Coumaroylchinasäure als Chlorogensäure berechnet, da diese Hauptkomponenten kommerziell nicht erhältlich waren. Bei geringerer Oxidation der Säfte konnten Procyanidin B₂ und Epicatechin teils in größeren Mengen nachgewiesen werden. Die Mittelwerte der Gehalte der wichtigsten Polyphenole in Apfelsaft aus 49 analysierten Proben aus den Verarbeitungsstudien sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Mittelwerte und Schwankungsbreiten der Gehalte der wichtigsten Polyphenole mittels HPLC in den untersuchten Apfelsäften (n = 49)

Polyphenol	Nachweisbar in n Proben von 49 Proben	Gehalte in mg/L (Schwankungsbreiten)
Procyanidin B ₂	24	24,9 (n.n. – 68)
Chlorogensäure	49	112,6 (18 – 311)
Epicatechin	27	33,3 (n.n. – 84)
4-p-Coumaroylchinasäure*	49	29,3 (7 – 54)
Phloretin-2'-xyloglucosid*	49	24,0 (1 – 86)
Phloridzin	49	13,2 (1 – 30)
Σ Polyphenole HPLC		223,7 (43 – 675)

n.n. = nicht nachweisbar

*Coumaroyl-chinasäure berechnet als Chlorogensäure

Phloretin-2'-xylosylglucosid berechnet als Phloridzin

Verschiedene Quercetin-3-glykoside, 3-Hydroxyphloridzin (vermutet) und Cyanidin-3-galaktosid (vermutet) (< 5 mg/L) konnten in einigen Proben in geringen Mengen nachgewiesen und quantifiziert werden. Die meisten kleineren Substanzpeaks oder Minor Komponenten konnten mit den zur Verfügung stehenden Mitteln, d.h. Vergleiche mit Standardsubstanzen, Retentionszeiten und UV-Spektren, nicht eindeutig identifiziert werden. Für die große Gruppe der Procyanidine existieren keine kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen. Die UV-Spektren gleichen denen ihrer Untereinheiten Catechin und Epicatechin und mit den zur Verfügung stehenden Mitteln waren Information betreffend Struktur und Molmasse nicht erhältlich. Substanzpeaks mit einem solchen UV-Spektrum, die in einigen Säften durchaus in größer Anzahl gefunden wurden, konnten nur als „Procyanidin“

beschrieben werden. Einige Substanzpeaks konnten den Gruppen der Hydroxycimtsäurederivate und Phloretinderivate zugeordnet werden und wurden nach Literaturangaben hypothetisch zugeordnet (Abbildung 29 und 30).

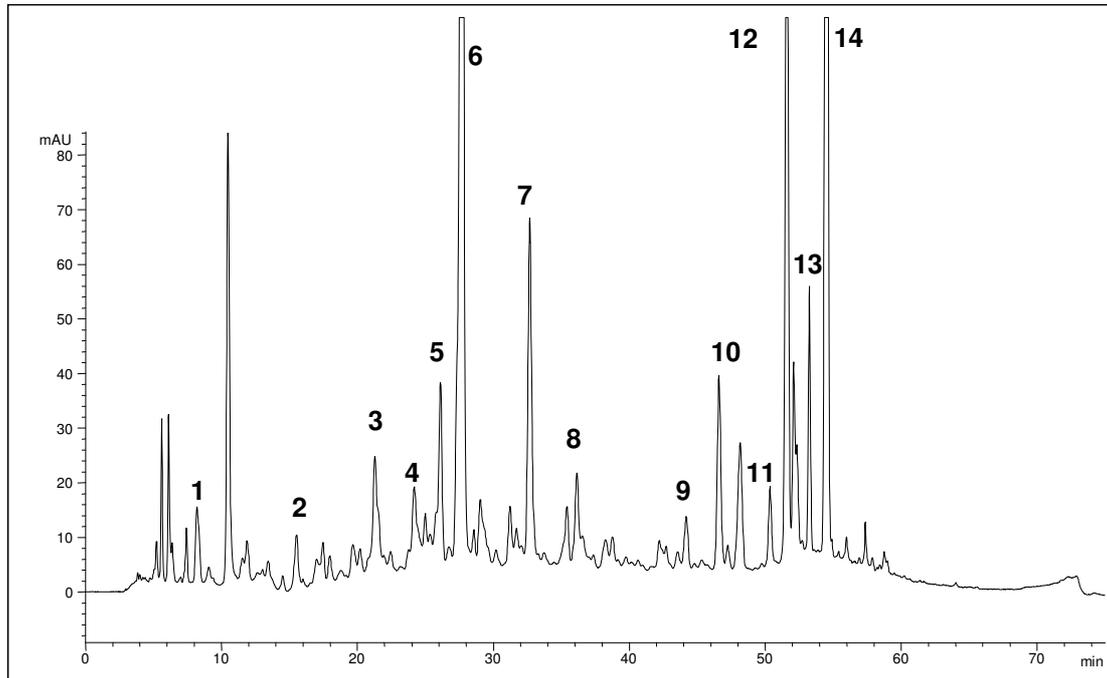


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm eines Apfelsaftes (Adsorberharz-Extrakt) an einer Fluofix-Säule bei 280 nm
 Procyanidin (1), Procyanidin (2), Procyanidin B₂ (3), Coumaroylglucose (4), Kryptochlorogensäure (5), Chlorogensäure (6), 4-Coumaroylchinasäure (7), 5-Coumaroylchinasäure (8), 3-Hydroxyphloridzin (9), Quercetin-3-galaktosid (10), Quercetin-3-glykosid (11), Phloretin-2'-xyloglucosid (12), Quercetin-3-rhamnosid (13), Phloridzin (14)

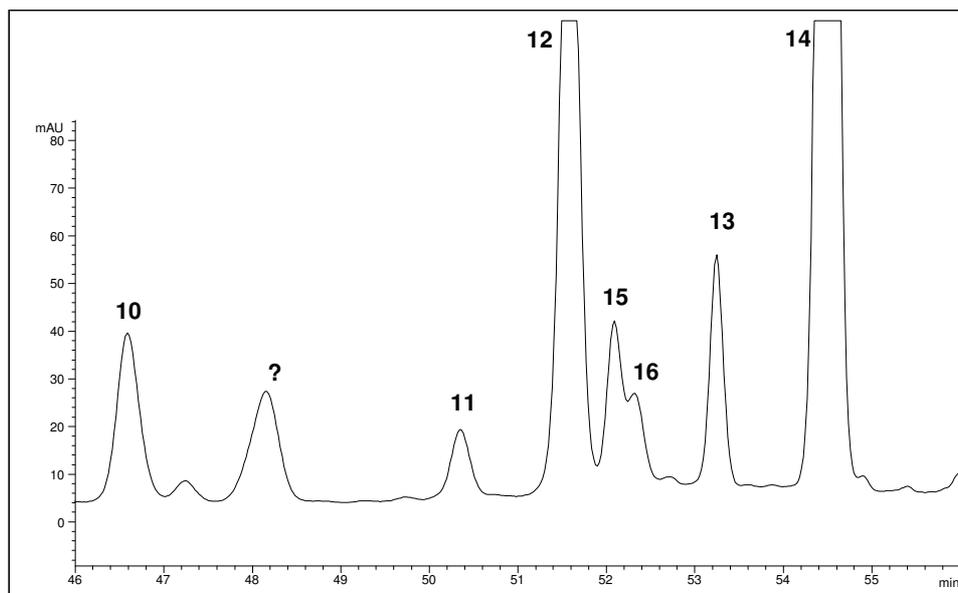


Abbildung 30: Ausschnitt 46 – 56 min des obigen Chromatogramms eines Apfelsaftes (Adsorberharz-Extrakt) bei 280 nm
 Quercetin-3-galaktosid (10), Quercetin-3-glykosid (11), Phloretin-2'-xyloglucosid (12), Quercetin-3-rhamnosid (13), Phloridzin (14), Quercetin-3-glykosid (15), Phloretin-2'-xylogalaktosid (16)

Insgesamt konnten auf diese Weise in dem Extrakt eines Apfelsaftes 16 Polyphenole zugeordnet werden. Die Vergrößerung in Abbildung 30 zeigt Minorkomponente im Bereich der Quercetin- und Phloretinderivate. Alle unbezeichneten Peaks im Chromatogramm sind nicht zuzuordnen. Dies verdeutlicht das Problem der Polyphenolanalytik, nämlich das weitgehende Fehlen von Standardsubstanzen, die eine Identifizierung und Quantifizierung erlauben würden. Eine Kopplung der HPLC Analytik mit Analysetechniken zur Strukturaufklärung, wie Massenspektrometrie und NMR, könnte hier vieles zur Klärung der Identität jener unbekanntenen Peaks beitragen.

Die Gruppen der Flavan-3-ole und Procyanidine sowie der Flavonole ist häufig in Säften, die einer starken Oxidation durch lange Maische- und/oder Saftstandzeiten ausgesetzt sind, nicht mehr nachweisbar. Am wenigsten anfällig für enzymatische und nicht enzymatische Oxidation erwiesen sich die Coumarsäurederivate und die Dihydrochalkone.

Erhitzungsprozesse mit langer Hitzeeinwirkung auf den Saft wie Flaschenpasteurisation und Konzentratherstellung reduzieren die Gehalte aller monomeren Polyphenole, wobei sich die oben genannten Gruppen wieder am anfälligsten zeigen. Daher konnten in Übereinstimmung mit anderen Autoren (PICINELLI et al. 1997) in den meisten Apfelsäften aus dem Handel nur noch die vier Hauptkomponenten nachgewiesen werden. Die übliche Herstellungspraxis in der Fruchtsaftindustrie scheint die Polyphenole der Gruppen der Flavanole und Procyanidine sowie der Flavonole nicht im Saft erhalten zu können.

5.2.1.2. Antioxidative Kapazität von Apfelsaft

Die antioxidative Kapazität von Apfelsaft ist im Vergleich zu anderen Säften relativ niedrig (siehe 5.1.5.1.). In Abbildung 31 sind der Mittelwert sowie die Spannweite der antioxidativen Kapazität von klarem Apfelsaft (n = 12) und naturtrübem Apfelsaft (n = 28) aus dem Handel aufgeführt.

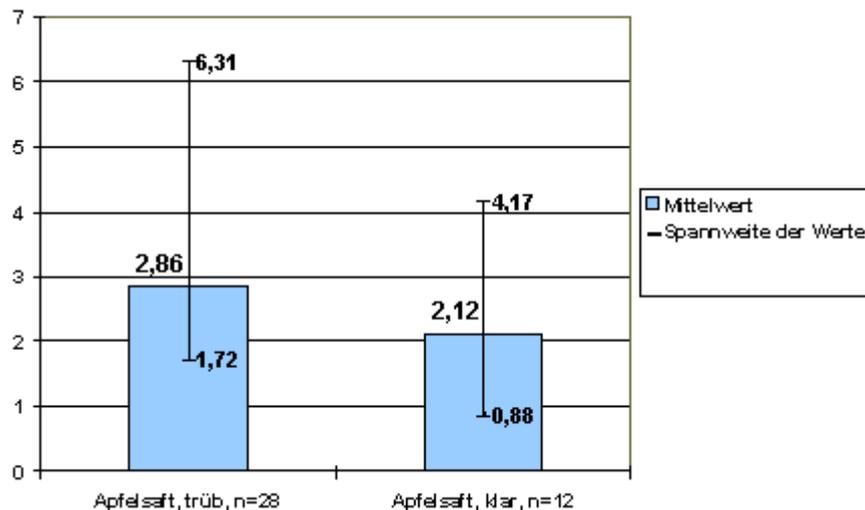


Abbildung 31: Die antioxidative Kapazität von klarem und naturtrübem Apfelsaft aus dem Handel

Die antioxidative Kapazität von trübem Apfelsaft ist im Mittel etwas höher als die des klaren Apfelsaftes. Die Spannweiten erklären sich durch unterschiedliche Rohware und unterschiedliche Gehalte an zugesetzter L-Ascorbinsäure.

Bei einem frischen mit SO₂ konservierten Presssaft aus der polyphenolreichen Sorte Bohnapfel wurde der Anteil der identifizier- und quantifizierbaren Polyphenole mittels HPLC an dessen TEAC-Wert berechnet (Abbildung 32).

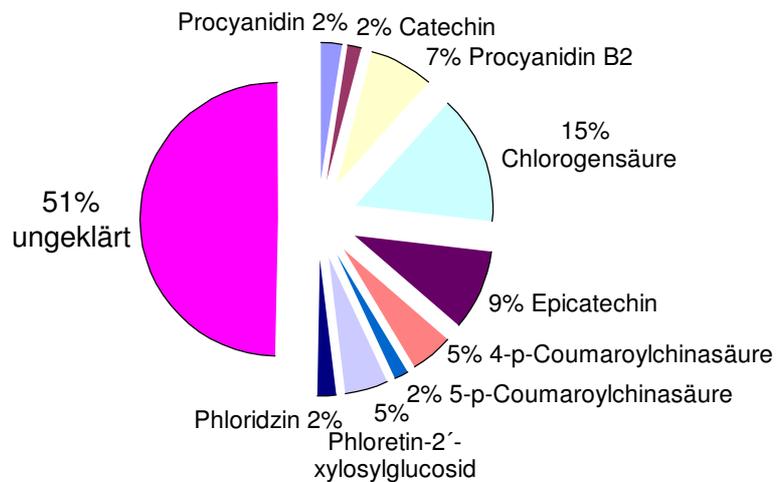


Abbildung 32: Anteil einzelner Polyphenole am TEAC-Wert eines frischen Apfelpresssaftes

Die Berechnung erfolgte aus Molmasse, molarem TEAC-Wert (siehe 2.2.1. Tabelle 14) und dem Gehalt der Polyphenole im frischen Presssaft. Der Anteil der Coumaroylchinasäuren wurde mit dem molaren TEAC-Wert der p-Coumarsäure berechnet, der des Phloretin-2'-xyloglucosid aus dem des Phloridzins, die der Procyanidine aus dem des Epicatechins. Natürliche L-Ascorbinsäure konnte in dem Presssaft nicht nachgewiesen werden.

5.2.1.3. Herstellung von naturtrübem Apfelsaft

Die Zugabe von steigenden Mengen L-Ascorbinsäure zu einem pasteurisierten naturtrübem Apfelsaft zeigt eine lineare (Regressionsgerade) Zunahme der antioxidativen Kapazität des Saftes, die der antioxidativen Kapazität der zugegebenen Menge L-Ascorbinsäure entspricht (Abbildung 33).

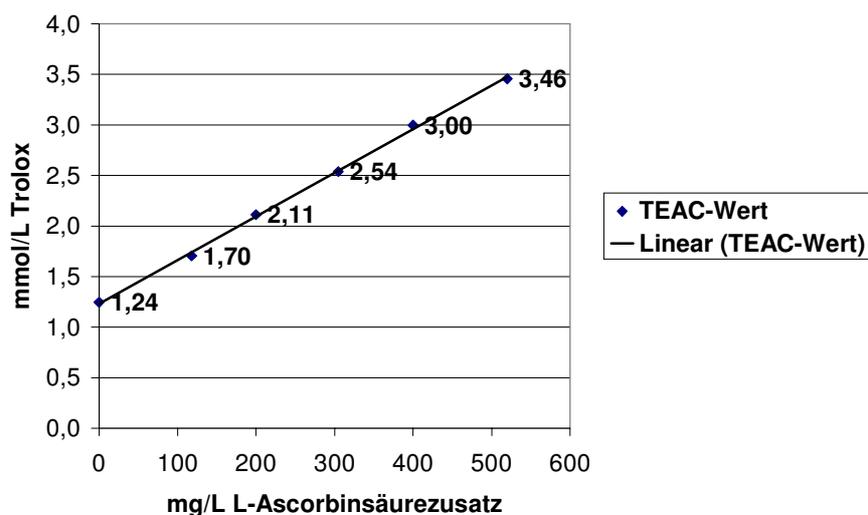


Abbildung 33: Veränderung des TEAC-Wertes von Apfelsaft bei der Zugabe von L-Ascorbinsäure

Beim Herstellungsprozess erhöht die Zugabe der L-Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel erwartungsgemäß die antioxidative Kapazität des Presssaftes, allerdings mit 0,07 mmol/L

Trolox bei weitem nicht so stark wie es bei der zugegebenen Menge, 200 mg/L L-Ascorbinsäure entsprechen nämlich 0,87 mmol/L Trolox, zu erwarten wäre (siehe Abbildung 33). Von den 200 mg/L zugegebener L-Ascorbinsäure waren im Saft nur noch 33 mg/L nachweisbar (Abbildung 34). Zudem zeigt sich nach Zugabe von L-Ascorbinsäure eine Aufhellung des Saftes.

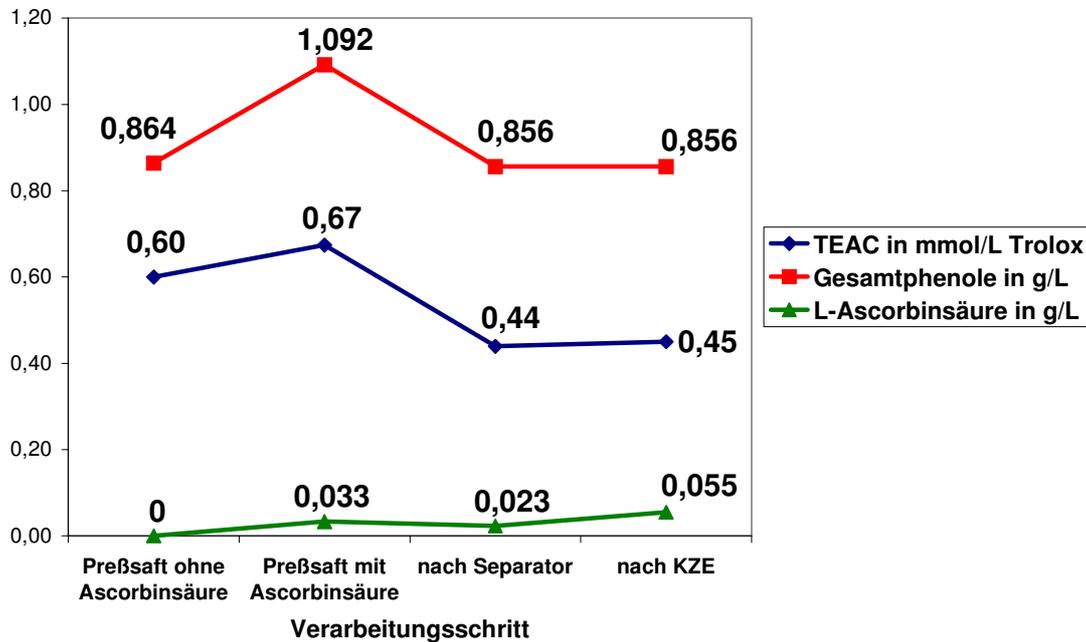


Abbildung 34: Veränderung von Gesamtphenolgehalt, TEAC-Wert und L-Ascorbinsäuregehalt bei einer L-Ascorbinsäurezugabe von 200 mg/L bei der Herstellung von naturtrübem Apfelsaft

Nach der Zugabe des Antioxidationsmittels L-Ascorbinsäure nimmt während den nächsten Herstellungsschritten die antioxidative Kapazität des Saftes weiter ab (Abbildung 34). Dies lässt sich einerseits auf die Entfernung des Grobtrubes durch die Separation und andererseits auf fortlaufende Oxidationsprozesse durch im Saft enthaltene Polyphenoloxidasen zurückführen, was bei der Analyse der wichtigsten monomeren Polyphenole mittels HPLC bestätigt wurde. Die starke Oxidation des Saftes zeigt sich optisch auch anhand der zunehmenden Bräunung. Ausgehend vom frischen Presssaft vor der L-Ascorbinsäurezugabe (0,6 mmol/L Trolox) beträgt die Abnahme der antioxidativen Kapazität, nach L-Ascorbinsäurezugabe, Separation und KZE des Saftes (0,45 mmol/L Trolox) immerhin 25%, obwohl mit der L-Ascorbinsäure ein Antioxidationsmittel zugegeben wurde. Bei einer vergleichbaren Verarbeitungslinie, bei der auf die Zugabe von L-Ascorbinsäure verzichtet wurde, betrug die Abnahme von Presssaft zu pasteurisiertem naturtrübem Saft sogar 40%. Die Entfernung des Grobtrubes durch die Separation ist dabei der entscheidende Schritt. Hierbei vermischen sich die Oxidationsprozesse im frischen Presssaft bis zum Zeitpunkt der Separation, die je nach Länge dieser Zeitspanne erheblich sein können, und der Effekt des Entfernens des Grobtrubes selbst, der ebenfalls eine nicht zu unterschätzende antioxidative Kapazität, ca. 15 – 20% des frischen Presssaftes, aufweist (andere Verarbeitungslinie: Separatorzulauf und -ablauf eines Saftes mit zuvor inaktivierten Polyphenoloxidasen). Die Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu war bei beiden Versuchen erheblich geringer als die der antioxidativen Kapazität (20% gegenüber 40% bzw. 7,5% gegenüber 25%). Dies wird zum einen auf die Unterschiede der beiden Analysenparameter und zum anderen auf die starke oxidationsbedingte Entfernung antioxidativ potenter polymerer Polyphenole zurückgeführt. Die hohe antioxidative Kapazität jener polymeren Polyphenole bedeutet nämlich auch, dass sie leicht oxidierbar sind. Außerdem werden vermutlich bei der Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu Substanzen miterfasst, die keine antioxidative Kapazität mehr besitzen, wie

beispielsweise bestimmte Oxidationsprodukte der Polyphenole oder anderer Saftinhaltsstoffe.

Bei den vier Hauptpolyphenolen des Saftes, Chlorogensäure, 4-p-Coumaroylchinasäure, Phloretin-2'-xyloglucosid und Phloridzin, ergaben sich bei der Analyse mittels HPLC bezogen auf den frischen Presssaft (100%) während des Herstellungsprozesses folgende Veränderungen (Abbildung 35). Flavan-3-ole und Quercetinglykoside waren in keiner der Proben nachweisbar.

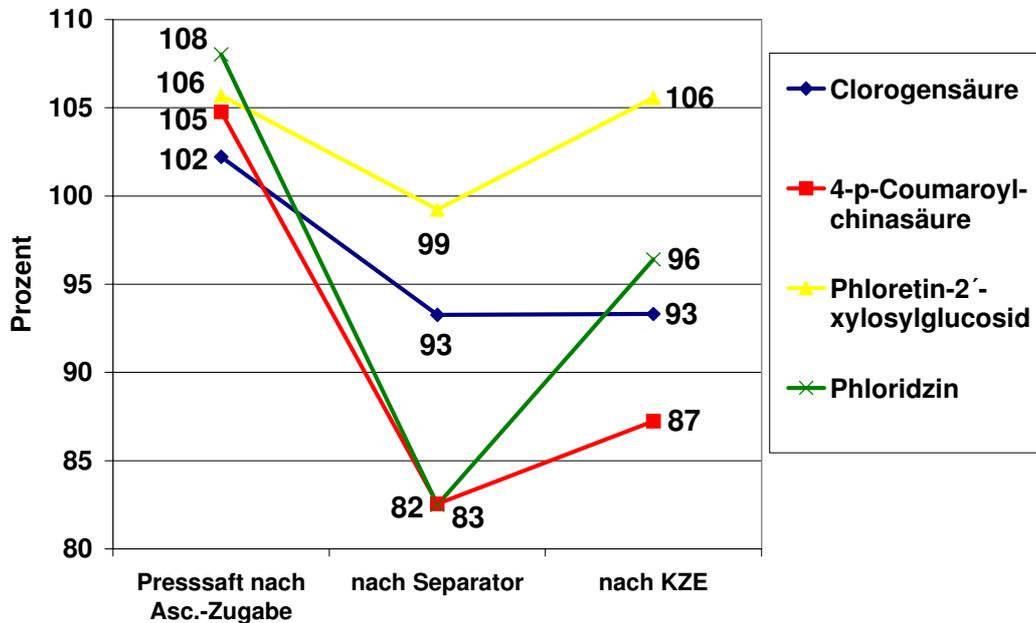


Abbildung 35: Veränderung der wichtigsten einzelnen Polyphenole während der Herstellung von naturtrübem Apfelsaft, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)

Sowohl die Zugabe der reduzierenden L-Ascorbinsäure wie auch die KZE führen zu einer deutlichen Zunahme der Gehalte der wichtigsten Polyphenole, während in der Zwischenzeit die Gehalte der wichtigsten Polyphenole stark abnehmen. Die Rückbildung der Polyphenole nach Zugabe von L-Ascorbinsäure beruht auf der Reduktion im Saft vorhandener Chinone der entsprechenden Polyphenole. Ein ähnlicher Vorgang liegt vermutlich dem Anstieg nach der KZE zu Grunde, wobei diesmal in der Wärme im Saft entstehende reduktiv wirksame Substanzen für den Anstieg sowohl der einzelnen Polyphenole wie auch des reduktometrischen L-Ascorbinsäuregehaltes verantwortlich sein dürften. Eine weitere Möglichkeit ist die Spaltung von chemischen Bindungen durch die Wärmeeinwirkung, wodurch eventuell gebundene Polyphenole oder reduktiv wirksame Substanzen freigesetzt werden. Eine weitere Effekt der Wärmeeinwirkung könnte das Aufspaltung farbiger während des Herstellungsprozesses entstandener höherpolymerer Pigmenten sein, aus denen dann wieder kleinere farblose Substanzen entstehen (Aufhellung).

5.2.1.4. Antioxidative Wirkung von naturtrübem Apfelsäften: Einfluss der Apfelsorte und des Polyphenolgehaltes

Die antioxidative Kapazität der sortenreinen naturtrübem Apfelsäfte aus Mostapfel- und Tafelapfelsorten sowie der durchschnittliche TEAC-Wert einiger Handelsproben ist in Abbildung 36 gezeigt. Der Anteil der zugesetzten L-Ascorbinsäure an der gesamten antioxidativen Aktivität wurde hierbei rechnerisch berücksichtigt (siehe auch S. 80). Es zeigt sich, dass sich die einzelnen Apfelsorten signifikant unterscheiden und die Mostapfelsorten Bohnapfel, Brettacher und Kaiser Wilhelm erheblich höhere TEAC-Werte liefern als die Tafelapfelsorten oder die Handelsapfelsäfte (bis zu Faktor 5 höher!).

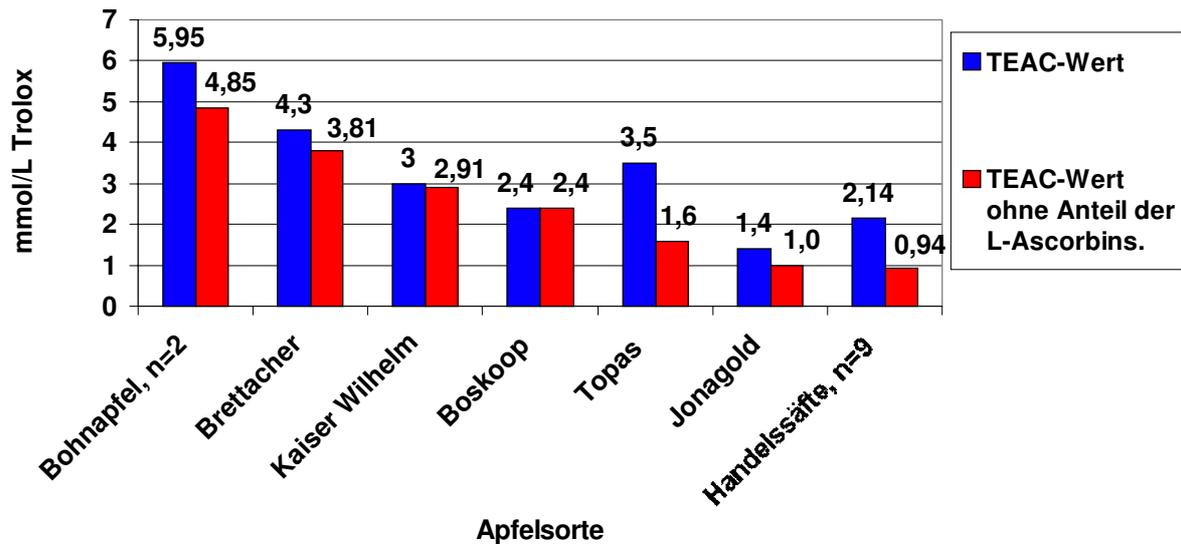


Abbildung 36: Antioxidative Kapazität naturtrüber Apfelsäfte aus verschiedenen Apfelsorten

In Tabelle 23 sind weitere Analysenparameter der Säfte dargestellt.

Tabelle 23: Analysendaten der naturtrüben sortenreinen Apfelsäfte

Parameter	Bohnapfel (n = 2)	Brettacher	Kaiser Wilhelm	Boskoop	Topas	Jonagold
Erntezeitpunkt	Ende Oktober	Anfang Oktober	Anfang Oktober	Anfang September	Anfang September	Ende September
Relative Dichte 20/20	1,0472	1,0476	1,0548	1,0569	1,0539	1,0513
Gesamtsäure pH 7,0, als WS g/L	7,3	6,25	9,69	10,5	10,6	4,9
L-Ascorbinsäure mg/L	255	57	9,0	n. n.	218	42
Gesamtphenole Folin, als (+)- Catechin, mg/L	1623	1243	1018	953	901	312
Antioxidative Kapazität Mit L-Asc. ohne L-Asc., (mmol/L Trolox)	5,95 4,85	4,3 3,81	3,0 2,91	2,4 2,4	3,5 1,6	1,4 0,99

Auffällig ist vor allem die große Bandbreite in den Gehalten an Polyphenolen. Der naturtrübe Apfelsaft aus Jonagold enthält 312 mg/L Gesamtphenole, während der Saft aus dem Tafelapfel Topas 901 mg/L Polyphenole enthält. Den Spitzenreiter bildet die Mostapfelsorte Bohnapfel mit 1623 mg/L Polyphenolen. Diese deutliche Unterschiede machen sich in der antioxidativen Aktivität bemerkbar.

In den Abbildungen 37 und 38 sind die HPLC-Chromatogramme der naturtrüben Apfelsäfte aus Bohnapfel und Jonagold nach Direktinjektion des gleichen Volumens dargestellt. Bei gleichem Maßstab sind die Unterschiede in der Intensität der Peaks deutlich zu erkennen, was auch für die größere Komplexität des Polyphenolmusters des Saftes aus Bohnapfel gilt.

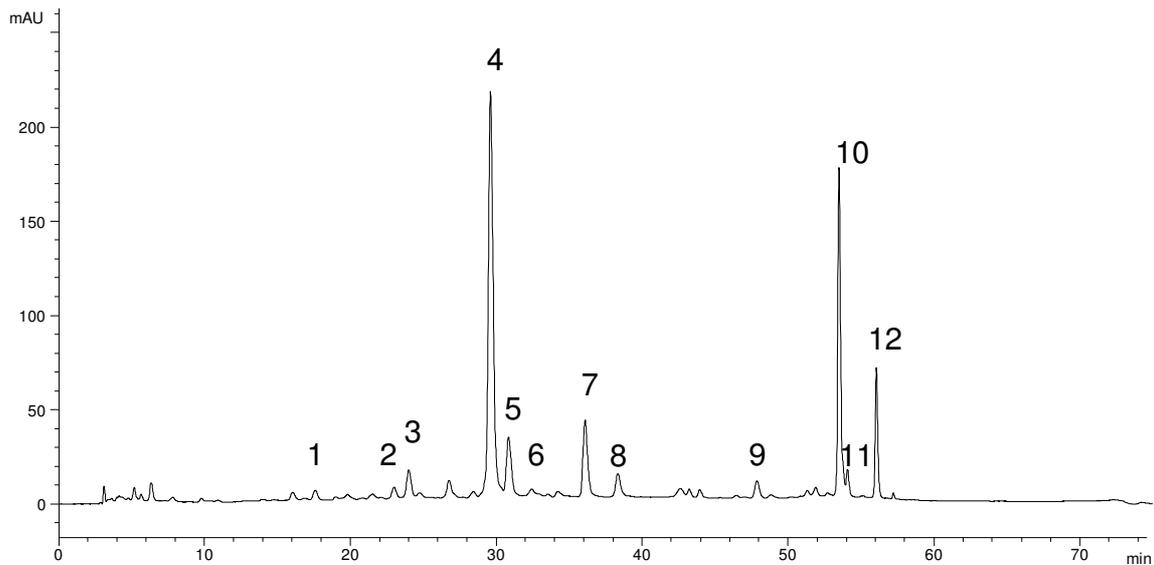


Abbildung 37: Chromatogramm der Polyphenole eines naturtrüben Apfelsaftes der Sorte „Bohnapfel“ bei 280 nm
Procyanidin (1), Catechin (2), Procyanidin B₂ (3), Chlorogensäure (4), Epicatechin (5), Procyanidin (6), 4-p-Coumaroylchinasäure (7), 5-p-Coumaroylchinasäure (8), Quercetin-3-galaktosid (9), Phloretin-2'-xyloglucosid (10), Quercetin-3-glykosid (11), Phloridzin (12)

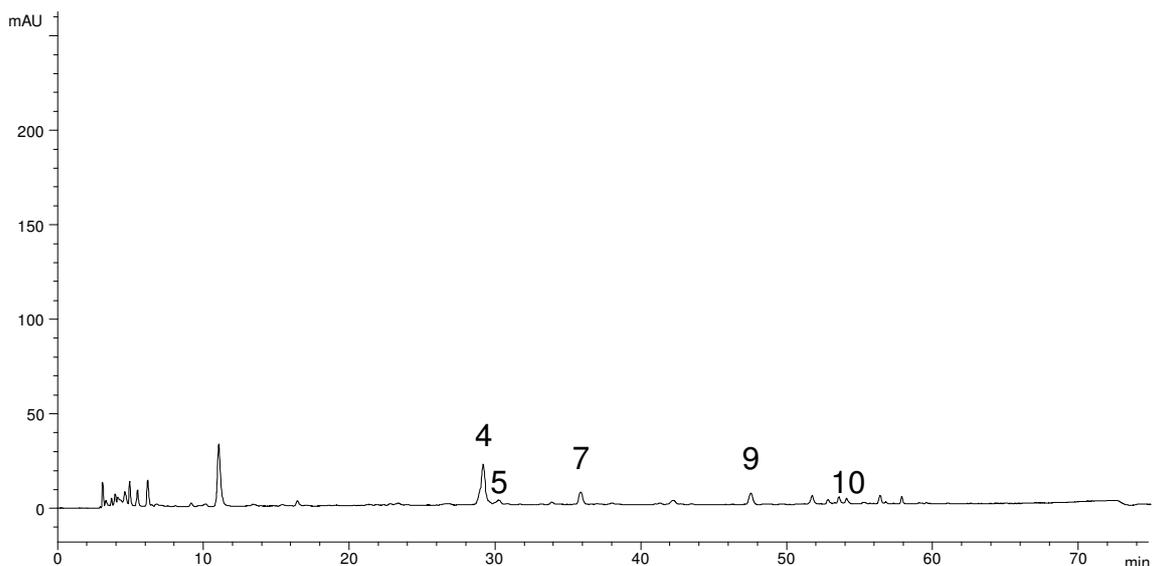


Abbildung 38: Chromatogramm der Polyphenole eines naturtrüben Apfelsaftes der Sorte „Jonagold“ bei 280 nm (gleicher Maßstab wie Abb. 37)
Chlorogensäure (4), Epicatechin (5), 4-p-Coumaroylchinasäure (7), Quercetin-3-galaktosid (9), Phloretin-2'-xyloglucosid (10)

Das Polyphenolmuster von Früchten ist genetisch kontrolliert. Bei allen untersuchten Apfelsäften ist das typische Muster der Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide erkennbar, wenngleich bei Tafeläpfeln die Gehalte einzelner Polyphenole an oder unter der Nachweisgrenze liegen. Bei Bohnapfel fällt vor allem der hohe Gehalt an Chlorogensäure, der wichtigsten Hydroxyzimtsäure des Apfels, und an Dihydrochalconen auf. Weiterhin erkennt man Procyanidin B₂ sowie zwei weitere Procyanidine (eventl. B₁ und C₁). Höhere Procyanidine (Gerbstoffe) lassen sich mit der eingesetzten HPLC-Methode nicht erfassen. Die Gehalte der quantifizierbaren Polyphenole sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Konzentration der Polyphenole in den naturtrüben Apfelsäften. Angaben in mg/L

Polyphenol in mg/L	Bohnapfel	Kaiser Wilhelm	Brettacher	Boskoop	Topas	Jonagold
Procyanidin B2	41,2	11,6	8,6	n.n.	32,2	n.n.
Chlorogensäure	349,2	221,7	178,2	125,4	48,8	34,2
Epicatechin	68,2	22,3	7,5	37,8	36,3	3,2
Coumaroylchinasäure*	62,9	47,6	94,6	27,2	0	8,2
Phloretin-2'-xylosylglucosid*	86,8	28,2	30,5	10,7	2,5	1,4
Phloridzin	30,1	13,3	13,6	12,5	3,4	1,4

n.n. = nicht nachweisbar

*Coumaroyl-chinasäure berechnet als Chlorogensäure
Phloretin-2'-xylosylglucosid berechnet als Phloridzin

Die Gehalte der einzelnen Polyphenole sind demnach sortenabhängig und variieren z.T. um Größenordnungen. Mostsorten enthalten im Vergleich zu Tafeläpfeln sowohl mehr Phenolcarbonsäuren als auch Flavonoide. Das wichtigste saure Polyphenol in allen Sorten ist die Chlorogensäure, gefolgt von der 4-p-Coumaroylchinasäure. Bei den apfeltypischen Dihydrochalconen liegt das Phloretin-2'-xyloglucosid bei den drei Mostsorten Bohnapfel, Kaiser Wilhelm und Brettacher deutlich über der Konzentration von Phloridzin.

Die Untersuchungen zeigen, dass das antioxidative Potential von naturtrübem Apfelsaft signifikant von der Sorte (d.h. dem Polyphenolgehalt des Apfels) abhängig ist und durch die Auswahl der Rohware entscheidend beeinflusst werden kann. Um die antioxidative Kapazität von Apfelsaft zu steigern, müssen für seine Herstellung polyphenolreiche Mostapfelsorten verwendet werden.

5.2.1.5. Polyphenolbilanz beim Entsaften einer Apfelmaische

Der Übergang von antioxidativ wirksamen Polyphenolen aus der Apfelmaische in den Saft bei einem üblichen Entsaftungsprozess (Flottweg Dekanter) während der laufenden Produktion des Fruchtsaftbetriebes des Fachgebietes für Weinanalytik und Getränkforschung der Forschungsanstalt Geisenheim ist in Abbildung 39 aufgeführt (siehe 3.1.4. Komplett-Extraktions-Variante). Die Bilanz des Übergangs von Polyphenolen und antioxidativ wirksamen Substanzen aus der Maische in den Saft wurde durch den Vergleich der absoluten Gehalte an antioxidativer Kapazität und des Gesamtphenolen nach Folin-Ciocalteu im Saft und im Extrakt ermittelt, die jeweils aus der gleichen Menge einer Apfelmaische hergestellt wurden. Aber es zeigen sich nicht nur quantitative Unterschiede zwischen den Polyphenolen in Presssaft und Extrakt, sondern auch qualitative (Abbildung 40).

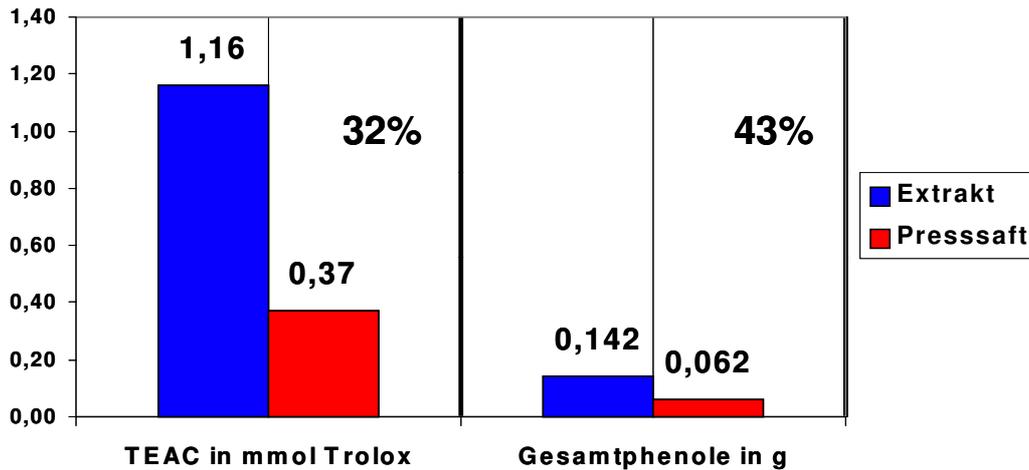


Abbildung 39: Absolute TEAC-Werte und Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu von Presssaft und Maischeextrakt aus der gleichen Maischemenge sowie die Ausbeuten in Prozent für den Presssaft

Die Ergebnisse zeigen, dass 43% der möglichen Polyphenolausbeute und 32% der möglichen Ausbeute an antioxidativ wirksamen Substanzen bei einem üblichen Entsaftungsprozess in den Presssaft übergehen. Zudem zeigt sich eine deutliche Veränderung des Polyphenolmusters im Maischeextrakt gegenüber dem Saft. Zum einen treten erheblich mehr Substanzpeaks im Chromatogramm auf, die häufig für Procyanidine charakteristische UV-Spektren aufweisen, und zum anderen verschieben sich die Verhältnisse der wichtigsten Polyphenole zueinander, vor allem zu Gunsten von Phloridzin, Procyanidin B₂ und Catechin (Abbildung 40). Diese genannten Polyphenole sind relativ schlecht wasserlöslich, weshalb sie bei der Entsaftung im Vergleich zu den anderen Hauptpolyphenolen nur sehr unvollständig in den Saft übergehen.

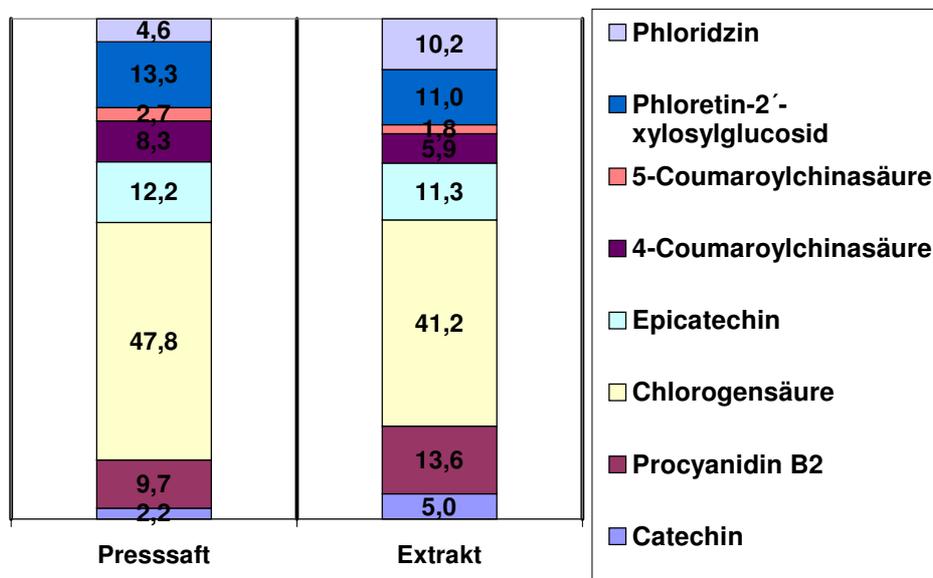


Abbildung 40: Prozentuale Anteile der wichtigsten Polyphenole am Fingerprintmuster von Presssaft und Extrakt

Die Summe der mittels HPLC erfassbaren Polyphenole im Vergleich zum Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu (100%) beträgt beim Saft 38% und beim Extrakt 40%.

5.2.1.6. Maischestandzeit

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass während einer einstündigen Standzeit von Apfelmaische erhebliche Verluste an antioxidativer Kapazität und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu auftreten (Abbildung 41).

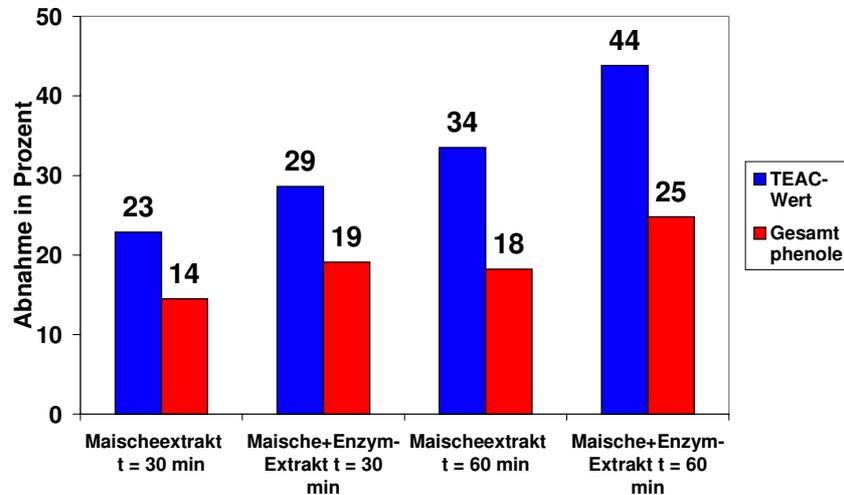


Abbildung 41: Abnahme des TEAC-Wertes und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu während der Standzeit (60 min) von Apfelmaische mit und ohne Pectinasezugabe, bezogen auf die frische Maische (100%)

Ursache für die Verluste sind die durch die Zellzerstörung beim Mahlen freiwerdenden fruchteigenen Polyphenoloxidasen, die mit dem eingetragenen Sauerstoff die Polyphenole oxidieren (siehe 2.1.3.). Das Ergebnis dieser einfachen Maischeextraktion zeigt, dass längere Standzeiten der Maische zu signifikanten Verlusten an antioxidativ wirksamen Substanzen führen. Es muss dabei beachtet werden, dass es sich hierbei um eine Extraktion nicht wie nachfolgend um eine Entsaftung handelt.

5.2.1.7. Entsaftungssysteme und Maischestandzeit

Ein Vergleich der Werte der Säfte von Bucher Horizontalpresse und Dekanter mit derselben Maische im industriellen Maßstab (t = 0 min bzw. t = 60 min) ergibt nur geringe Unterschiede in den beiden Entsaftungsverfahren, aber große Unterschiede bei den Werten für die Maischestandzeit (Abbildung 42).

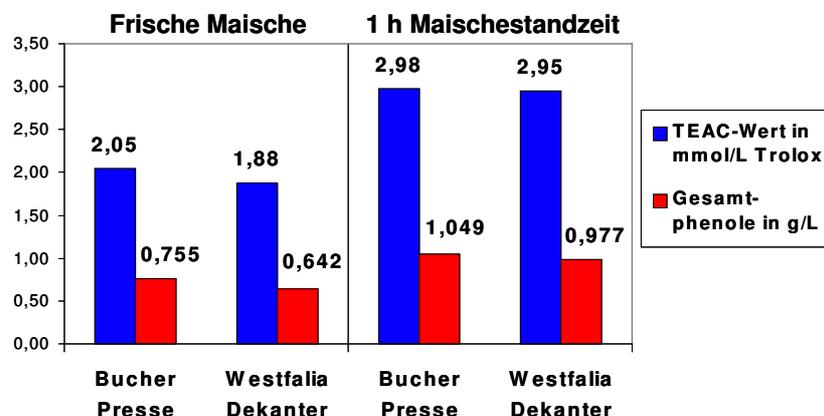


Abbildung 42: Einfluss der Maischestandzeit auf den Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und den TEAC-Wert in Apfelsaft bei zwei verschiedenen Entsaftungssystemen (Bucher HP 10000 und Westfalia Dekanter CA 505)

Diese nahezu identischen Ergebnisse der beiden Entsaftungssysteme im Hinblick auf die antioxidative Kapazität bei beiden Maischestandzeiten erstaunen, da durch die schnellere Entsaftung im Dekanter die Oxidation in Maische und Saft geringer und damit der Polyphenolgehalt wie auch die antioxidative Kapazität höher sein sollten. Das Ergebnis lässt vermuten, dass der Luftertrag und die Oxidation beim Mahlen, dem Transport der Maische und der Entsaftungsvorgang im Versuch für den Dekanter und die Horizontal Bucherpresse trotz der erheblich schnelleren Entsaftung durch den Dekanter vergleichbar zu sein scheinen.

Nach den Ergebnissen sind die beiden Entsaftungssysteme unter den untersuchten Aspekten, TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, als gleichwertig zu beurteilen.

Die Analyse der einzelnen Hauptpolyphenole zeigt hingegen deutliche Unterschiede sowohl im Bezug auf die Entsaftungssysteme als auch auf die Maischestandzeit (Tabelle 25).

Tabelle 25: Gehalte der Hauptpolyphenole sowie ihre Summe mittels HPLC von Apfelsäften hergestellt mit Dekanter und Horizontalpresse mit und ohne Maischestandzeit

	Chlorogen- säure	4-p-Coumaroyl- chinasäure	Phloretin-2'- xyloglucosid	Phloridzin	Summe
Dekanter frische Maische	45,7 mg/L	23,7 mg/L	10,6 mg/L	6,6 mg/L	86,6 mg/L
Dekanter 1 Std Maischestandzeit	51,8 mg/L	34,5 mg/L	14,2 mg/L	14,7 mg/L	115,1 mg/L
Bucherpresse frische Maische	34,7 mg/L	16,0 mg/L	6,7 mg/L	9,1 mg/L	66,6 mg/L
Bucherpresse 1Std Maischestandzeit	97,6 mg/L	41,0 mg/L	21,0 mg/L	24,3 mg/L	183,9 mg/L

Bei der Entsaftung von frischer Maische werden mit dem Dekanter höhere Ausbeuten an den einzelnen Hauptpolyphenolen erreicht, während nach einer Standzeit der Maische zwar die Ausbeute bei beiden Entsaftungssystemen ansteigt, allerdings bei der Horizontalpresse erheblich stärker. Die längere mechanische Belastung der Maische bei der Entsaftung mittels Horizontalpresse scheint die Extraktion der monomeren Polyphenole nach einer Standzeit der Maische stark zu verbessern, während dies beim Dekanter durch die schnelle Entsaftung nicht geschieht. Es erstaunt allerdings, dass sich die doch erheblichen Unterschiede in den Gehalten an monomeren Polyphenolen weder in der antioxidativen Kapazität noch im Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu widerspiegeln.

Auf die gegensätzlichen Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Maischestandzeit, in 5.2.1.6. eine Abnahme von antioxidativer Kapazität und Gesamtphenolgehalt hier eine Zunahme nach einer Standzeit der Maische, wird in der Diskussion näher eingegangen.

5.2.1.8. Einfluss der Saftstandzeit

Die Aktivität der im Saft enthaltenen Polyphenoloxidasen führt unter Laborbedingungen während eines Zeitraumes von 6 Stunden neben der Bräunungszunahme zu einer Abnahme der antioxidativen Kapazität um 20% und einer Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu um 5% (Abbildung 43).

Die geringere Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu wird darauf zurückgeführt, dass bei der Bestimmung eventuell auch Oxidations- und Kondensationsprodukte der Polyphenole miterfasst werden. Die Analyse der einzelnen Hauptpolyphenole mittels HPLC ergab nämlich eine Abnahme der Summe ihrer Gehalte von fast 50% nach 6 Stunden. Besonders stark nahmen dabei die Flavan-3-ole (Procyanidin B2 85%, Epicatechin 52%) und die Chlorogensäure (50%) ab.

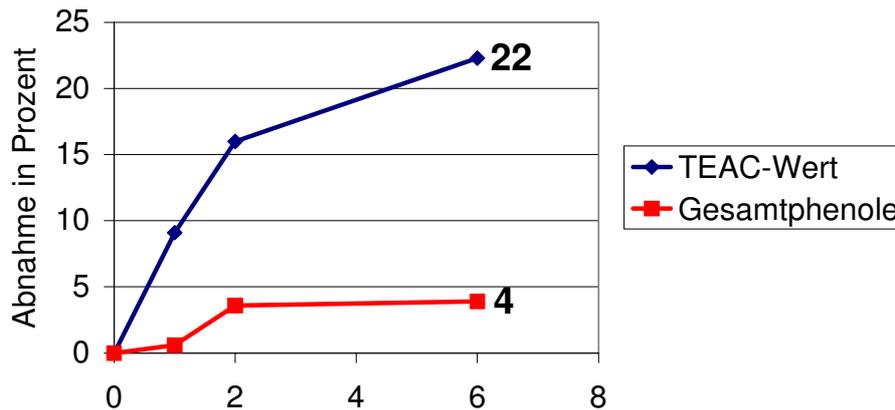


Abbildung 43: Abnahme des TEAC-Wertes und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu von Apfelsaft während einer Standzeit von 6 Stunden

Trotz der Unterschiede zwischen Labormaßstab und technischem Maßstab bezüglich des Verhältnisses von Volumen zu Oberfläche kann angenommen werden, dass bei der Apfelsaftherstellung ähnlich große Verluste an antioxidativer Kapazität und Polyphenolen durch längere Saftstandzeit auftreten, da Enzymkonzentration und der Sauerstoffgehalt im Saft vergleichbar sein dürften. Die starke Abnahme der antioxidativen Kapazität durch die fruchteigenen Polyphenoloxidasen gab Anlass zu Versuchen, ihre Aktivität durch Maische- oder Safterhitzung zu unterbinden.

5.2.1.9. Versuche zur Inaktivierung der fruchteigenen Polyphenoloxidasen

Die Erhitzung der Maische für kurze Zeit auf 90°C und für 30 Minuten auf 60°C sowie eine Erwärmung des frischen Presssaftes auf 55°C sollten die Aktivität der fruchteigenen Polyphenoloxidasen unterbinden, so dass die antioxidative Kapazität und der Gehalt an Polyphenolen des Presssaftes nach einer Standzeit von 4 Stunden sich nicht verändert haben sollten.

Nach einer Standzeit von 4 Stunden des Presssaftes aus den beiden erhitzten Maischen trat keine Veränderung der untersuchten Parameter gegenüber dem frischen Presssaft auf (Abbildung 44).

Daraus lässt sich schließen, dass bei beiden Varianten der Maischeerhitzung die fruchteigenen Polyphenoloxidasen inaktiviert werden konnten und somit weitere Verluste durch Oxidation während der Verarbeitung vermieden werden können.

Die Analyse der Hauptpolyphenole mittels HPLC bestätigt dieses Ergebnis. Es zeigt sich kein Verlust der Hauptpolyphenole nach der Standzeit.

Die Erhitzung eines Presssaftes direkt nach der Presse auf 55°C, hergestellt aus nicht erhitzter Maische, bringt ein übereinstimmendes Ergebnis, also keine Veränderung der antioxidativen Kapazität während einer Saftstandzeit.

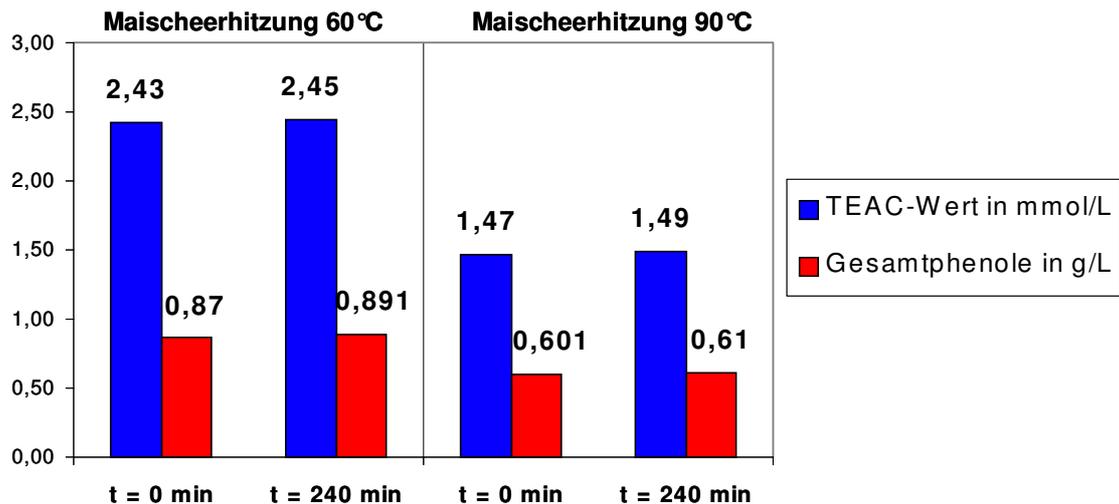


Abbildung 44: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt von Apfelpresssaft bei zwei Varianten der Maischeerhitzung nach einer Standzeit von 4 Stunden

Weiterhin zeigt sich, dass die Variante mit der Temperatur von 60°C eine höhere Ausbeute an Polyphenolen und antioxidativer Kapazität bringt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei 60°C während 30 min zwar die fruchteigenen Polyphenoloxidasen inaktiviert werden (WALKER 1964), aber die Zellen in der Apfelmaische durch die thermische Behandlung auch einer Thermoplasmolyse unterzogen werden. D.h. die Zellen platzen durch die Wärmeeinwirkung auf, so dass der gesamte Zellinhalt inklusive der Polyphenole freigesetzt wird und extrahiert werden kann. Bei einer Temperatur von 90°C hingegen werden zwar alle im Apfel vorkommenden Enzyme inaktiviert (SPANOS et al. 1990) und es kommt ebenfalls zu einer Thermoplasmolyse der Zellen, aber auch zu einem verstärkten Abbau der Polyphenole. Grund für diesen Abbau sind thermisch induzierte Spaltungs-, Kondensations- und Oxidationsreaktionen der Polyphenole untereinander oder mit anderen Saftinhaltsstoffen, z.B. denaturierten Proteinen, Polysacchariden etc. Der Vergleich der Gehalte an einzelnen Polyphenolen mittels HPLC zwischen den Presssäften der beiden Erhitzungsvarianten zeigt dies noch deutlicher (Tabelle 26).

Tabelle 26: Gehalte einzelner Polyphenole und deren Summe von den Presssäften der beiden Maischeerhitzungsvarianten

	60°C Maischeerhitzung	90°C Maischeerhitzung
Procyandin B2	76,9 mg/L	26,6 mg/L
Chlorogensäure	72,9 mg/L	41,0 mg/L
Epicatechin	39,9 mg/L	20,9 mg/L
4-p-Coumaroylchinasäure	10,7 mg/L	8,5 mg/L
Cyanidin-3-galaktosid	18,1 mg/L	13,5 mg/L
Phloretin-2'-xyloglucosid	9,3 mg/L	8,4 mg/L
Quercetin-3-glykosid	21,9 mg/L	19,2 mg/L
Phloridzin	24,3 mg/L	22,6 mg/L
Summe	274,0 mg/L	160,8 mg/L

Die Maischeerhitzung auf 60°C scheint ein geeigneter Weg zur möglichst effektiven Extraktion der Polyphenole während der Entsaftung zu sein. Die Oxidation der Polyphenole in der Maische wird gehemmt, während die Erhitzung einen Zellaufschluss durch Thermoplasmolyse verursacht. Es bleibt allerdings zu bedenken, dass aus erhitzter Maische hergestellte Apfelsäfte sensorisch stark abweichend sind. Sowohl in Geruch und Geschmack werden solche Apfelsäfte als untypisch beurteilt (ZIMMER 1996). Daher ist die einzige

praktikable Möglichkeit zur Inaktivierung der fruchteigenen Polyphenoloxidasen die Erhitzung des frischen Saftes direkt nach der Entsaftung.

5.2.1.10. Einfluss der Schönung mit Gelatine

Eine Schönung mit Gelatine/Kieselsoil verringert die antioxidative Kapazität und den Gesamtphenolgehalt von separiertem Apfelsaft um 10 - 20%. Die Mittelwerte des Verlustes aus zehn verschiedenen Verarbeitungsstudien mit unterschiedlicher Rohware, in denen der Apfelsaft zum Teil oder ganz mit Gelatine/Kieselsoil geschönt wurde, liegen für die antioxidative Kapazität bei 14% und für den Gesamtphenolgehalt bei 19%. Die Dosagen an Gelatine und Kieselsoil lagen dabei zwischen 8 g/hL und 14 g/hL (Gelatine) bzw. 80 g/hL und 140 g/hL (Kieselsoil 15%ig). Die Verluste durch die Schichtenfiltration zur Entfernung des Schönungstrubes sind darin enthalten.

Zu diesem Verlust kommen im Herstellungsprozess die Verluste an antioxidativer Kapazität durch die Separation (siehe 5.2.1.3.) und die Oxidation während der Saftstandzeit, die sortenbedingt etwas variieren können. Bezogen auf den frischen Presssaft wird daher ein Gesamtverlust an antioxidativer Kapazität von 25 – 40% bei der Herstellung von klarem Apfelsaft mittels einer Gelatine/Kieselsoil-Schönung beobachtet. Die zusätzliche Zugabe von 50 g/hL Bentonit vor der Zugabe von Gelatine/Kieselsoil ergibt eine weitere Abnahme der antioxidativen Kapazität um maximal 4%.

Die Analyse mittels HPLC ergibt keine Veränderung in den Gehalten der monomeren Polyphenole durch die Schönung (Abbildung 45). Daraus lässt sich schließen, dass bei der Schönung mit Gelatine nur polymere Substanzen, wie höhermolekulare Polyphenole und deren Oxidationsprodukte, gefällt und aus dem Saft entfernt werden.

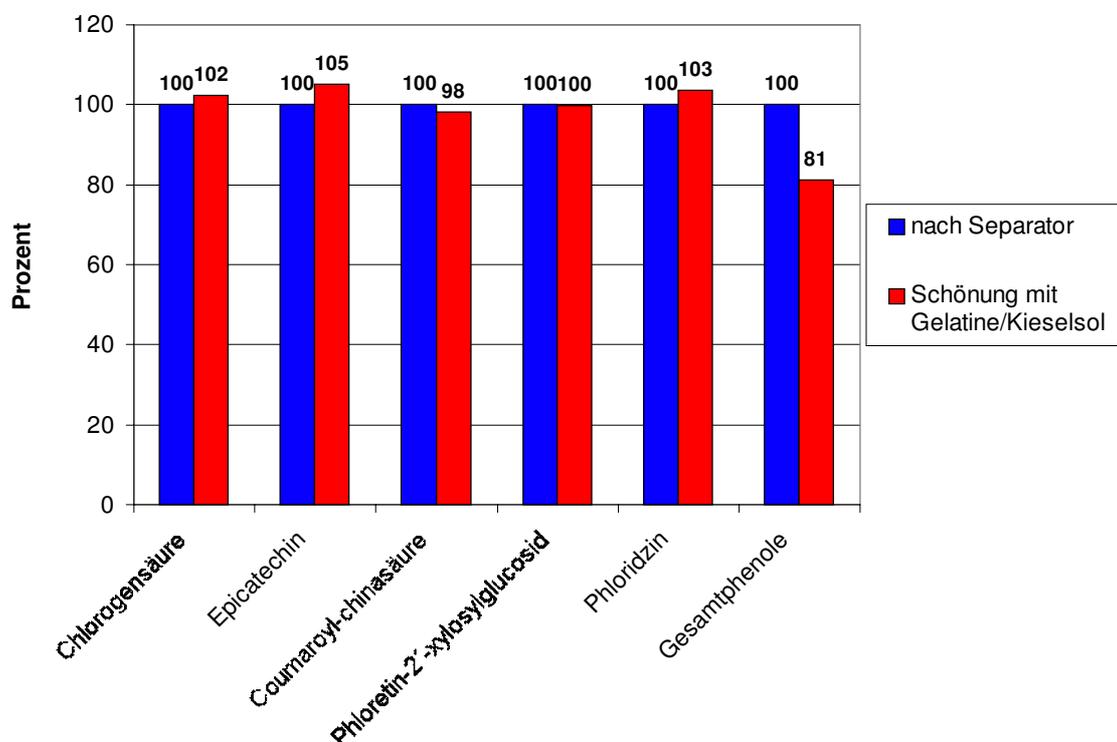


Abbildung 45: Veränderung der Gehalte einzelner Polyphenole und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu bei der Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels einer Schönung mit 14 g/hL Gelatine + 140 mL/hL Kieselsoil (15%)

Die Erhaltung der monomeren Polyphenole des Apfelsaftes bei einer Gelatine/Kieselsoil-Schönung bei einer gleichzeitigen deutlichen Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach

Folin-Ciocalteu zeigt, dass die Gelatine nur mit höhermolekularen Polyphenolen reagiert und sie schließlich entfernt. Dieser Gruppe der Polyphenole wird ein großer Beteiligung am Auftreten von Nachtrübungen zugesprochen (WUCHERPFENNIG et al. 1985).

Betrachtet man eine komplette Prozesslinie für die Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Gelatine/Kieselol-Schönung mit Pressen, L-Ascorbinsäurezugabe, Separation, Enzymierung mit einem Pectinasepräparat, einer Gelatine/Kieselol-Schönung über Nacht, eine erneute Separation gefolgt von einer Schichtenfiltration (6 Schichten Beco BM, 40x40) und der Pasteurisation mittels KZE, nehmen sowohl die antioxidative Kapazität wie auch der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu ab (Abbildung 46).

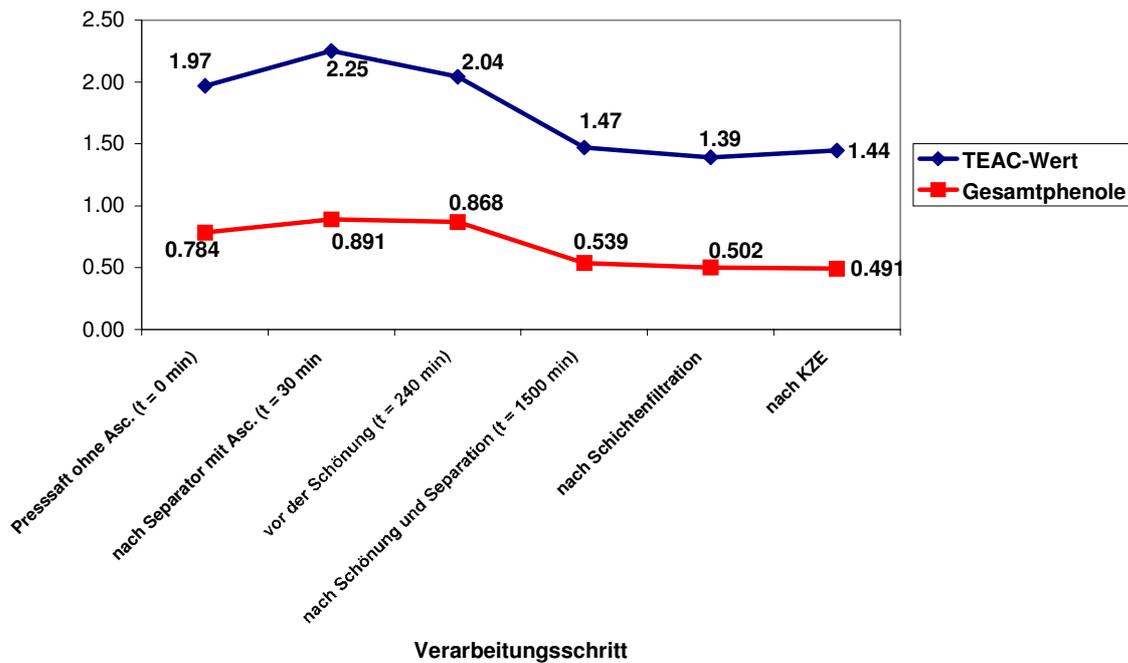


Abbildung 46: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu während der Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Gelatine/Kieselol-Schönung

Die prozentuale Abnahme über den gesamten Prozess beträgt 27% von Presssaft ohne L-Ascorbinsäure zu pasteurisiertem klarem Saft. Wichtige Faktoren für die Höhe der Abnahme sind neben den eingesetzten Behandlungsmittel und Verarbeitungsschritten die zugegebene Menge L-Ascorbinsäure und die Aktivität der fruchteigenen Polyphenoloxidasen, die von Apfelsorte zu Apfelsorte stark schwanken kann.

5.2.1.11. Einfluss der Zugabemenge von Gelatine sowie des Zeitpunktes der Zugabe von Kieselol bei der Gelatine/Kieselol-Schönung

Die Zugabe des Kieselols führt zu einem besseren Schönungsergebnisse (besserer Klärgrad), verursacht aber eine stärkere Abnahme der antioxidativen Kapazität (Abbildung 47).

Der Zeitpunkt der Kieselolzugabe spielte ebenfalls eine Rolle. Die Abnahme der antioxidativen Kapazität wie auch des Gesamtphenolgehaltes war bei einer Zugabe des Kieselols nach der Gelatinezugabe höher (Abbildung 48).

Dies ist zu erwarten, da die Gelatine bei Anwesenheit von Kieselol nicht nur mit Polyphenolen reagiert, sondern auch teilweise mit dem Kieselol. Ebenfalls zu erwarten ist, dass mit Erhöhung der Menge der zugegebenen Gelatine die Abnahme von antioxidativer Kapazität und Gesamtphenolgehalt ansteigt. Die Vervielfachung der Gelatinemenge verursacht allerdings nur eine Verdopplung des Verlustes an antioxidativer Kapazität.

Höhere Gelatinedosagen verursachen keine weiteren Verluste, da vermutlich im Saft keine Reaktionspartner für die Gelatine mehr vorhanden sind.

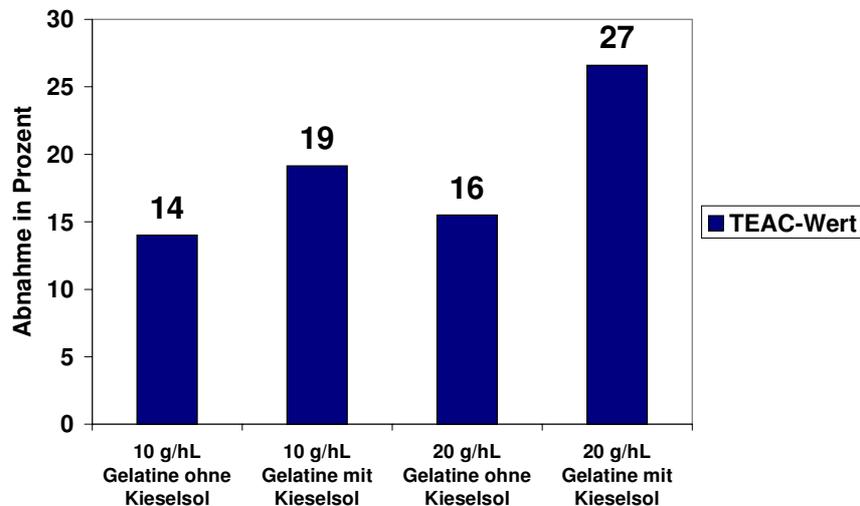


Abbildung 47: Einfluss der Kieselzolzugabe bei der Gelatineschönung auf den TEAC-Wert von Apfelsaft, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%)

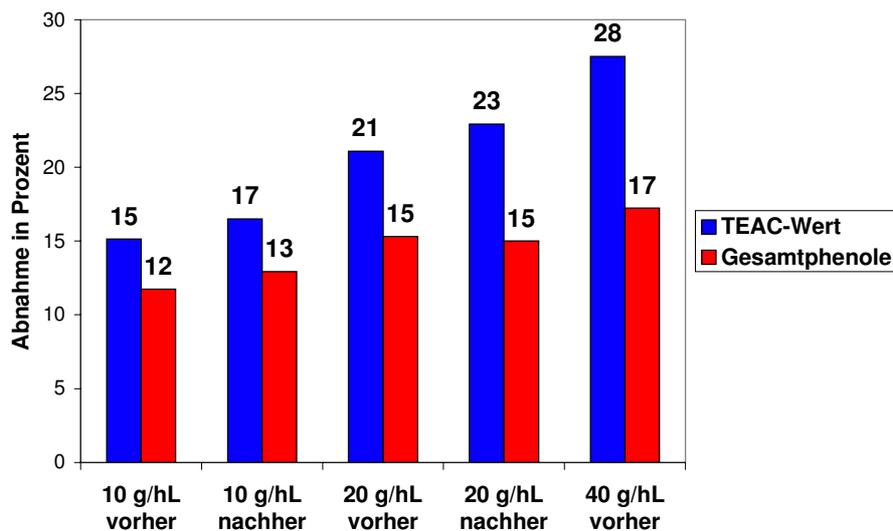


Abbildung 48: Einfluss des Zeitpunktes der Kieselzolzugabe bei der Gelatineschönung auf den TEAC-Wert und den Gesamtphenolgehalt von Apfelsaft, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%)

5.2.1.12. Einfluss der Ultrafiltration

Die Ultrafiltration eines trüben enzymierten Apfelsaftes führt zu einer deutlichen Abnahme der antioxidativen Kapazität sowie des Gesamtphenolgehaltes im klaren Saft, wobei der Gesamtphenolgehalt nur um 10%, die antioxidative Kapazität allerdings um 30% abnimmt. (Abbildung 49).

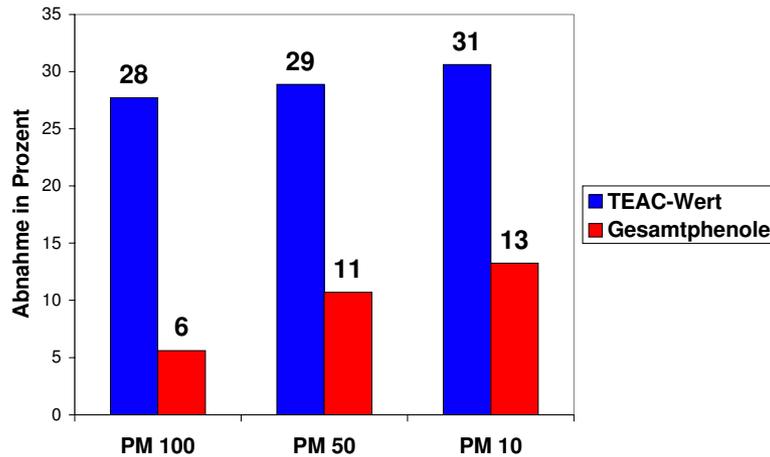


Abbildung 49: Abnahme von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu nach einer Ultrafiltration von naturtrübem enzymiertem Apfelsaft mit verschiedenen Trenngrößen, bezogen auf den unfiltrierten Saft (100%)

Die verschiedenen Trenngrenzen der Module im Bereich von 100.000 – 10.000 Dalton haben nur einen geringen Einfluss auf die Abnahme der antioxidativen Kapazität, während sich die Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu von 100.000 Dalton zu 10.000 Dalton verdoppelt. Für das Modul PM 50 (Trenngrenze 50.000 Dalton) ergibt die Ultrafiltration des nicht enzymierten Teils des Saftes dasselbe Ergebnis wie die Ultrafiltration des enzymierten Teils des Saftes. Die Filtrationsleistung war allerdings beim nicht enzymierten Saft erwartungsgemäß wesentlich schlechter (ALVAREZ et al. 1998).

Aus den Untersuchungsergebnissen lässt sich schließen, dass im Apfelsafttrüb, der nur einen Gewichtsanteil am trübigen Saft von etwa 3 - 5% hat (Gewicht des Schleudertrübes), ca. 30% der antioxidativen Kapazität des trübigen Saftes lokalisiert ist. Dies könnte auch der Grund für die Diskrepanz zwischen der Höhe der Abnahme der antioxidativen Kapazität und der Höhe der Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu sein. Die Folin-Ciocalteu-Methode erfasst die im Trüb lokalisierten antioxidativ wirksamen Substanzen, vermutlich hochmolekulare Antioxidantien, gar nicht oder kaum, so dass ihr Verlust durch die Entfernung des Trübes weniger ins Gewicht fällt als bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität. Eine Messung des antioxidativen Potentials des verbliebenen Retentates der Ultrafiltration bestärkt mit einer Verdreifachung des TEAC-Wertes gegenüber dem unfiltrierten Saft diese Schlussfolgerung (unfiltrierter Saft 2,4 mmol/L Trolox, Retentat 7,4 mmol/L Trolox).

5.2.1.13. Stabilisierung von mikrofiltriertem Apfelsaft mit PVPP oder Adsorberharz

a. Adsorberharz XAD 16 HP

Die Stabilisierung mittels einer Adsorberharzsäule führt zu einer hohen Abnahme des Gesamtphenolgehaltes, des TEAC-Wertes und des Farbwertes E 420 nm. TEAC-Wert und Farbwert E 420 nm/cm nehmen mit 48% bzw. 45% gegenüber dem klaren unbehandelten Saft am stärksten ab, während der Gesamtphenolgehalt um 29% weniger deutlich sinkt (Abbildung 50).

b. PVPP Divergan F

Generell zeigt sich, dass die Abnahme der Untersuchungsparameter gegenüber dem unbehandelten Saft zur eingesetzten Menge PVPP proportional ist. Bei der maximal eingesetzten Menge von 60 g/hL PVPP nimmt der TEAC-Wert mit 18% am stärksten ab, während der Gesamtphenolgehalt und der Farbwert E 420 nm mit 9% bzw. 11% eine geringere Abnahme aufweisen (Abbildung 50).

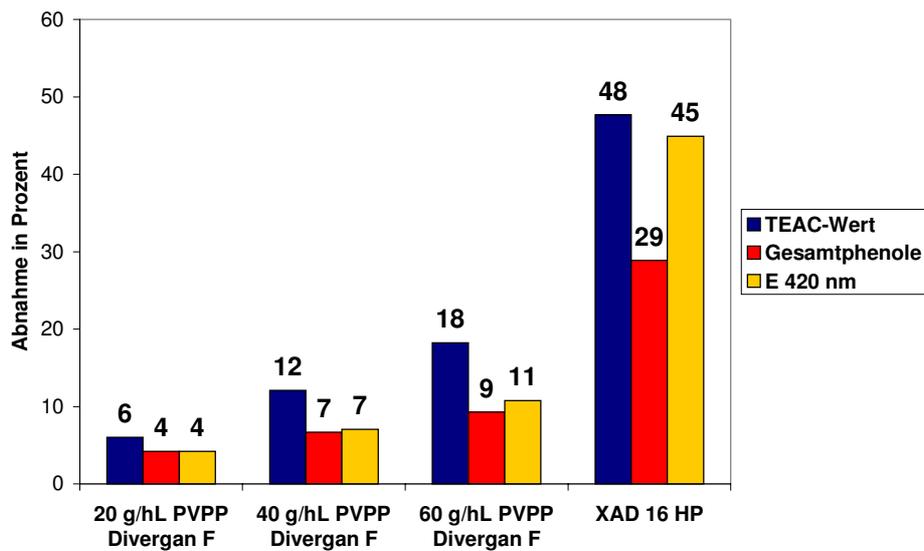


Abbildung 50: Abnahme des TEAC-Wertes, des Gesamtphenolgehaltes und des Farbwertes E 420 nm von mikrofiltriertem Apfelsaft bei der Behandlung mit PVPP Divergan F und Adsorberharz XAD 16 HP (65 BV bei 25 BV/h), bezogen auf den mikrofiltrierten Apfelsaft (100%)

Die Stabilisierung des mikrofiltrierten Apfelsaftes mittels einer Adsorberharzsäule XAD 16 HP führt zu einer deutlichen Abnahme der Untersuchungsparameter. Die Abnahme der antioxidativen Kapazität mit fast 50% ist im Vergleich zur Stabilisierung mit PVPP mit 18% Verlust bei 60 g/hL sehr hoch. In der Gesamtheit bedeutet dies für einen separierten, ultrafiltrierten und mit PVPP stabilisierten klaren Apfelsaft eine Abnahme der antioxidativen Kapazität gegenüber dem frischen Presssaft um 45 – 55%. Wurde zur Stabilisierung eine Adsorberharzsäule verwendet, beträgt die Abnahme gegenüber dem frischen Presssaft 65%. Damit sind die Verluste an antioxidativer Kapazität deutlich höher als bei der klassischen Gelatine/Kieselsohl-Schönung.

Die Ergebnisse der Untersuchung der einzelnen Polyphenole mittels HPLC zeigen auch in diesem Bereich starke Veränderungen (Abbildung 51).

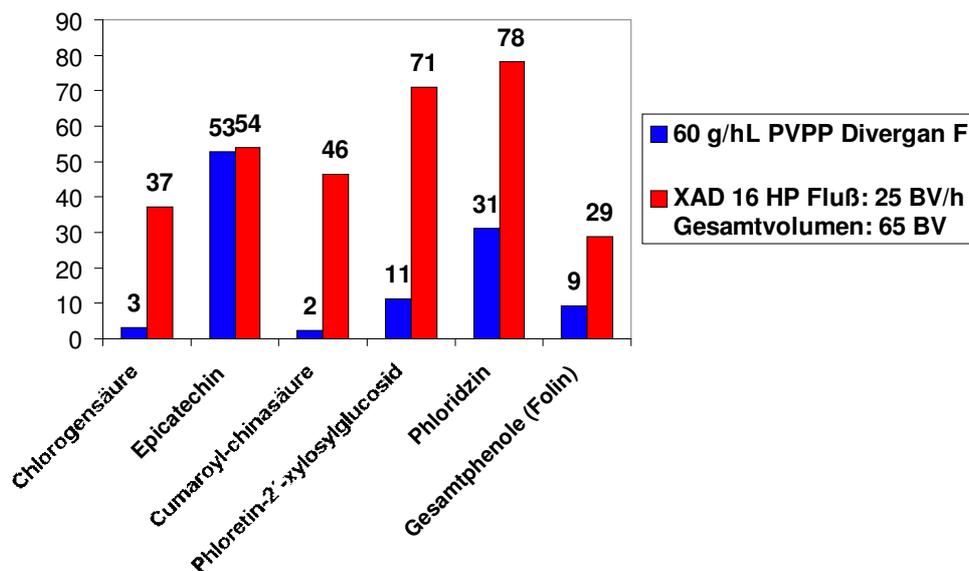


Abbildung 51: Abnahme einzelner Polyphenole nach der Stabilisierung von mikrofiltriertem Apfelsaft mittels PVPP und Adsorberharzsäule, bezogen auf den mikrofiltrierten Saft (100%)

Im Gegensatz zur Gelatine/Kieselol-Schönung kommt es zu einer Abnahme der monomeren Polyphenole im Saft. Die Abnahme der einzelnen Polyphenole ist bei der PVPP-Behandlung weniger stark als bei der Adsorberharz-Behandlung. Es lässt sich bei beiden Behandlungsarten die Tendenz erkennen, dass die Abnahme des Polyphenols um so größer ist, je lipophiler bzw. apolarer die Substanz ist.

5.2.1.14. Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Laccase-Behandlung und Ultrafiltration

Eine Laccase-Behandlung von trübem Apfelsaft (rückverdünntes trübes Konzentrat, 22°Brix) im technischen Maßstab führt erwartungsgemäß zu einer starken Verminderung der antioxidativen Kapazität und des Polyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu sowie mittels HPLC des ultrafiltrierten Saftes (Abbildung 52).

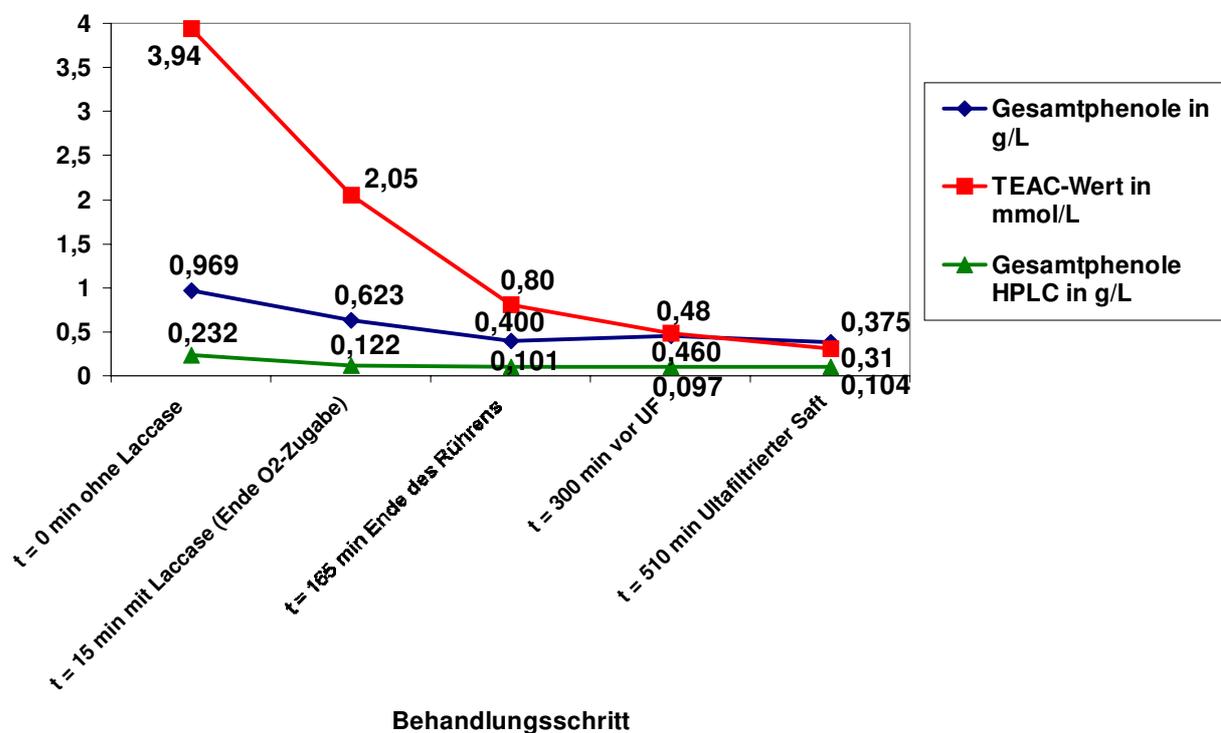


Abbildung 52: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu sowie mittels HPLC während des Laccase-Versuchs

Durch Probleme während des Versuchs war die Dauer der Belüftung mit Sauerstoff erheblich etwas länger als die empfohlenen 15 min (RITTER 1994). Der Wert nach 15 min mit 35% Verlust an antioxidativer Kapazität kann daher bei korrekter Prozessführung als reell angenommen werden. Auch die verspätete Ultrafiltration und die dadurch entstandene lange Standzeit des Saftes verursacht weitere starke Verlusten, die am Ende 90% betragen. Unter Berücksichtigung der angeschlossenen Ultrafiltration wird der Gesamtverlust auf etwa 55 – 65% kalkuliert. Proben ultrafiltrierter, mit verschiedenen Konzentration an Laccase behandelter Apfelsäfte (Novo Nordisk) bestätigen diese Kalkulation (Abbildung 53).

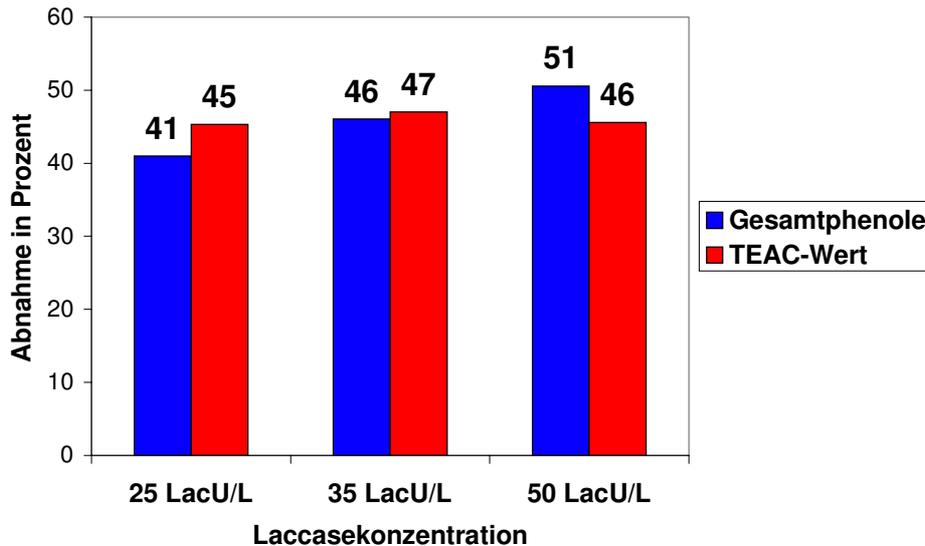


Abbildung 53: Abnahme von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu eines mit verschiedenen Laccasekonzentrationen behandelten, ultrafiltrierten Apfelsaftes, bezogen auf den ultrafiltrierten, unbehandelten Saft (100%)

Eine höhere Konzentration an Laccase zur Behandlung führt auch zu einer höheren Abnahme der antioxidativen Kapazität. Der in Abbildung 52 dargestellte Prozessverlauf zeigt, wie wichtig eine korrekte Handhabung der Laccase/O₂-Behandlung ist. Bei zu langer Wirkzeit und langer Sauerstoffzugabe wurde die antioxidative Kapazität des Saftes nahezu vollständig vernichtet.

Aufgrund ihrer Struktur (o-Diphenolgruppen) werden die meisten im Saft enthaltenen Polyphenole, die Hauptträger der antioxidativen Kapazität von Apfelsaft sind, oxidiert und durch die Ultrafiltration schließlich entfernt. Die Veränderungen in den Gehalten einzelner Polyphenole während der Behandlung zeigt dies deutlich (Tabelle 27).

Tabelle 27: Gehalte einzelner Polyphenole mittels HPLC während des Laccase-Versuchs

Verarbeitungsschritt	Chlorogensäure	4-p-Coumaroylchinasäure	Phloretin-2'-xyloglucosid	Phloridzin
vor Laccasezugabe (t = 0 min)	134,7 mg/L	54,3 mg/L	22,3 mg/L	20,5 mg/L
mit Laccase (t = 15 min)	31,9 mg/L	52,2 mg/L	19,1 mg/L	18,8 mg/L
Ende Sauerstoffzufuhr (t = 165 min)	12,5 mg/L	52,3 mg/L	18,3 mg/L	17,5 mg/L
vor Ultrafiltration (t = 300 min)	9,9 mg/L	52,3 mg/L	17,9 mg/L	16,9 mg/L
ultrafiltrierter Saft (t = 510 min)	10,3 mg/L	56,2 mg/L	18,9 mg/L	18,6 mg/L

Die einzigen nach der Behandlung im Saft verbleibenden Polyphenole sind Phloretin- und Coumarsäurederivate. Am Beispiel der Chlorogensäure zeigt sich die starke Verminderung von Polyphenolen, die o-Diphenolstrukturen besitzen. Dazu zählen auch die analytisch schwer fassbaren Procyanidine, die für einen Teil der antioxidativen Kapazität von Apfelsaft verantwortlich sein dürften (siehe 5.2.1.2. Abbildung 32).

Eine Laccase-Behandlung mit anschließender Ultrafiltration zur Herstellung eines klaren Apfelsaftes ist unter Berücksichtigung der Erhaltung der antioxidativen Kapazität des Saftes nur bedingt zu empfehlen. Zur Herstellung eines stabilen, klaren Apfelsaftes ist das

Verfahren der klassischen Gelatine/Kieselsohl-Schönung klar unterlegen, was den Verlust an antioxidativer Kapazität betrifft.

5.2.1.15. Einfluss der Erhitzungsdauer: Kurzzeiterhitzung (KZE) und Flaschenpasteurisation

Die KZE verursacht in den untersuchten Parametern bis auf ein Ansteigen der Gehalte einzelner Polyphenole, dem leichten Ansteigen des reduktometrisch bestimmten L-Ascorbinsäuregehaltes und eine Aufhellung des Saftes keine Veränderung der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu. Ansätze für eine Erklärung werden bereits in Abschnitt 5.2.1.3. gegeben. Eine längere Erwärmung von Apfelsaft, wie bei der Flaschenpasteurisation, führt zu einer Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu und zu einem leichten Anstieg der antioxidativen Kapazität wie auch der Summe der einzelnen Polyphenole mittels HPLC. (Abbildung 54). Es werden exemplarisch die Ergebnisse für 30 min Heißhaltezeit, die empfohlene Dauer für eine Flaschenpasteurisation, und für 90 min Heißhaltezeit als ein Beispiel für eine sehr lange Hitzeeinwirkung aufgeführt.

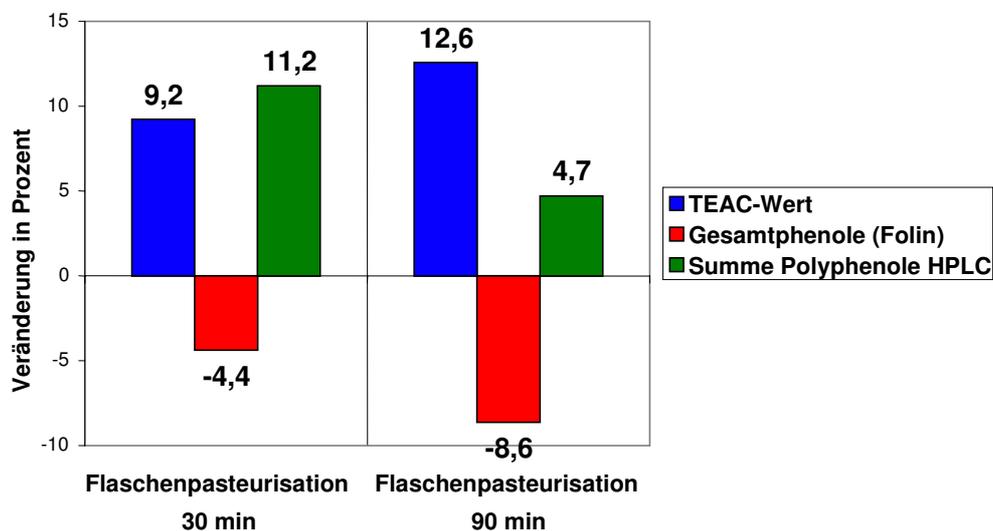


Abbildung 54: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Summe der einzelnen Polyphenole mittels HPLC während der Flaschenpasteurisation, bezogen auf den Saft vor der Pasteurisation (100%)

Im Saft vor der Pasteurisation war reduktometrisch keine L-Ascorbinsäure mehr nachweisbar, während nach der KZE (42 mg/L) und nach der Flaschenpasteurisation (23 – 28 mg/L) ein Gehalt festgestellt werden konnte. Ob es sich dabei um die L-Ascorbinsäure selbst handelt oder andere in der Bestimmung reduzierend wirkende Substanzen, konnte nicht festgestellt werden. Wahrscheinlich ist, dass durch die längere Wärmeeinwirkung reduzierende Substanzen aus Saftinhaltsstoffen entstehen oder freigesetzt werden. Diese Substanzen könnten im Saft vorhandene Chinone der Polyphenole reduzieren, was den Anstieg der monomeren Polyphenole mittels HPLC erklären würde. Zudem scheinen sie selbst antioxidativ wirksam zu sein oder bereits oxidierte antioxidativ wirksame Substanzen wieder rückzubilden, was den Anstieg der antioxidativen Kapazität erklären würde.

Die Verringerung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu könnte ihre Ursache in der thermisch bedingten Kondensation und Polymerisation von Polyphenolen und anderen Saftinhaltsstoffen haben. Diese sind zwar antioxidativ wirksam, werden aber von der Methode nicht erfasst, so dass sich auch der Anstieg der monomeren Polyphenole nicht in der Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu niederschlägt.

Die kurze und schonende KZE ist aufgrund der Ergebnisse klar der Flaschenpasteurisation vorzuziehen, da die bei längerer Hitzeeinwirkung beobachteten Effekte Ausdruck starker chemischer Veränderungen im Saft sind, was im Hinblick auf die zukünftige sensorische Qualität und Trubstabilität des Saftes als negativ beurteilt werden muss.

5.2.1.16 Einfluss der Lagerung

Während der Lagerungszeit unter Extrembedingungen, die zeigen sollte, ob die antioxidative Kapazität von Apfelsaft bei einer Lagerung erhalten bleibt oder verändert wird, zeigen sich erwartungsgemäß optisch extreme Veränderungen des klaren und des trüben Apfelsaftes. Beide sind stark gebräunt, der klare Saft weist eine deutliche Nachtrübung auf, während der Trub des naturtrüben Saftes komplett ausgefallen war. Die ausgefallene Trübung des trüben Apfelsaftes fällt auch nach kräftigem Aufschütteln sofort wieder aus. Die Proben wurden direkt nach dem Aufschütteln genommen und gemessen. Der TEAC-Wert des klaren Saftes verändert sich durch die Lagerung kaum, während der TEAC-Wert des trüben Saftes erheblich (-20%) absinkt (Abbildung 55).

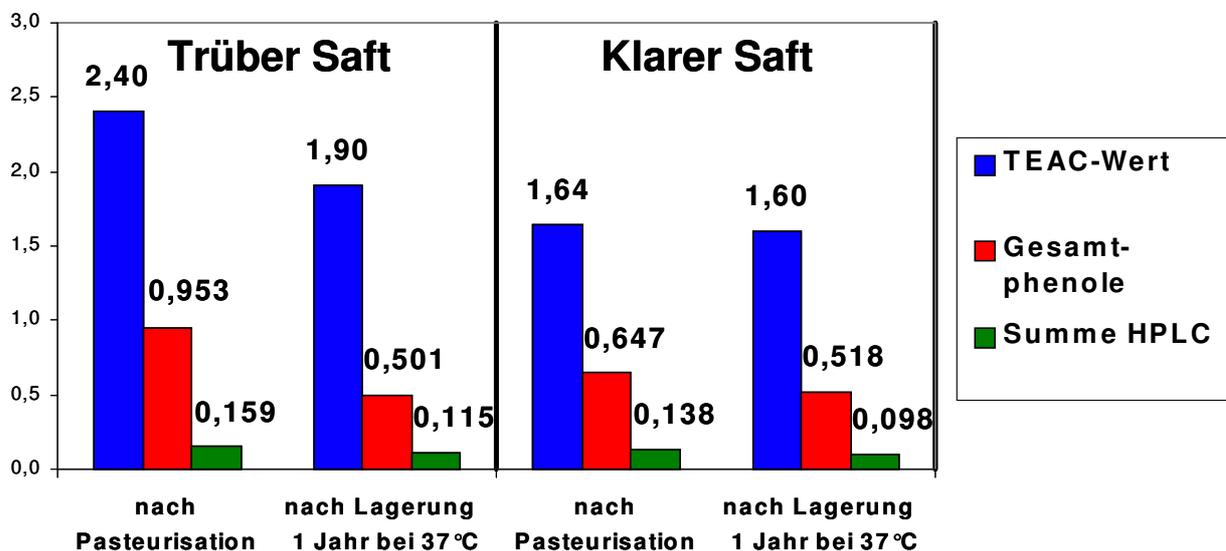


Abbildung 55: TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von klarem und trübem Apfelsaft der Sorte Boskoop vor und nach einer einjährigen Lagerung bei 37°C

Beim Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu zeigen beide Säfte Verluste, der trübe Saft allerdings wiederum deutlich stärkere (-47%), als der klare Saft (-20%). Die Abnahme der einzelnen Polyphenole (Summe HPLC) war bei beiden Säften mit ca. 30% etwa vergleichbar, wobei die Abnahme der Chlorogensäure mit ca. 20% geringer war als bei den drei anderen Hauptpolyphenolen, 4-p-Coumaroylchinasäure, Phloretin-2'-xyloglucosid und Phloridzin mit 40 – 50%.

Die starke Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu wie auch die Abnahme der antioxidativen Kapazität beim trüben Apfelsaft ist vermutlich auf das Ausfallen des Trubes zurückzuführen. Es zeigt sich zudem, dass die antioxidative Kapazität zwar häufig mit dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und dem Polyphenolgehalt korreliert, aber nicht deckungsgleich ist.

5.2.2. Beeren

5.2.2.1. Polyphenole im schwarzen Johannisbeersaft

Die mittels HPLC bestimmten Gesamtpolyphenolgehalte betragen zwischen 1805 und 4126 mg/L, wobei der Anteil der Anthocyane allein bei über 90% liegt. Mittelwerte und Schwankungsbreiten der Gehalte der wichtigsten Polyphenole in 9 schwarzen Johannisbeersäften, frische Presssäfte aus verschiedenen Verarbeitungsstudien im Verlauf der Arbeit, sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Mittelwerte und Schwankungsbreiten der Gehalte der wichtigsten Polyphenole in schwarzem Johannisbeersaft (n = 9)

Polyphenol	Mittelwert des Gehaltes in mg/L (Schwankungsbreite)
Neochlorogensäure	42,5 (26 – 62)
Caffeoylglucose*	45,6 (25 – 73)
3-p-Coumaroylchinasäure*	44,3 (34 – 54)
Coumaroylglucose*	46,3 (33 – 60)
Delphinidin-3-glucosid**	402,8 (268 – 619)
Delphinidin-3-rutinosid	1146,1 (759 – 1693)
Cyanidin-3-glucosid***	163,7 (103 – 250)
Cyanidin-3-rutinosid	887,0 (558 – 1284)
Σ Anthocyane HPLC	2599,6 (1688 – 3846)
Σ Polyphenole HPLC	2791,0 (1805 – 4126)

*berechnet als Chlorogensäure

**berechnet als Delphinidin-3-rutinosid

***berechnet als Cyanidin-3-rutinosid

Die Gehalte der vier Hauptanthocyane zusammengenommen, sind mit 1688 – 3846 mg/L sehr hoch. Es wurden insgesamt sieben Anthocyanpeaks im Chromatogramm festgestellt. Neben den bekannten vier Hauptanthocyanen, Delphinidin-3-glucosid (15%), Delphinidin-3-rutinosid (43%), Cyanidin-3-glucosid (5%) und Cyanidin-3-rutinosid (32%), sind noch drei in wesentlich geringerer Konzentration vorliegende Anthocyane (ca. 3 – 4% der Gesamtanthocyane) nachweisbar, deren Identität allerdings mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht eindeutig geklärt werden konnte. Das Polyphenolmuster eines schwarzen Johannisbeersaftes (frischer Presssaft) ist in Abbildung 56 gezeigt.

Die mit einem Stern gekennzeichneten Substanzen sind hypothetische Zuordnungen anhand von UV-Spektren und Literaturvergleichen. Außer der Neochlorogensäure stand keines der in schwarzen Johannisbeeren beschriebenen Hydroxyzimtsäurederivate als Standardsubstanz zur Verfügung.

Das HPLC-Chromatogramm wird zwar von den Peaks der Anthocyane dominiert (über 80% der integrierten Peakfläche), aber es zeigen sich auch viele kleinere Peaks von Minor Komponenten, deren Identität mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht geklärt werden konnte.

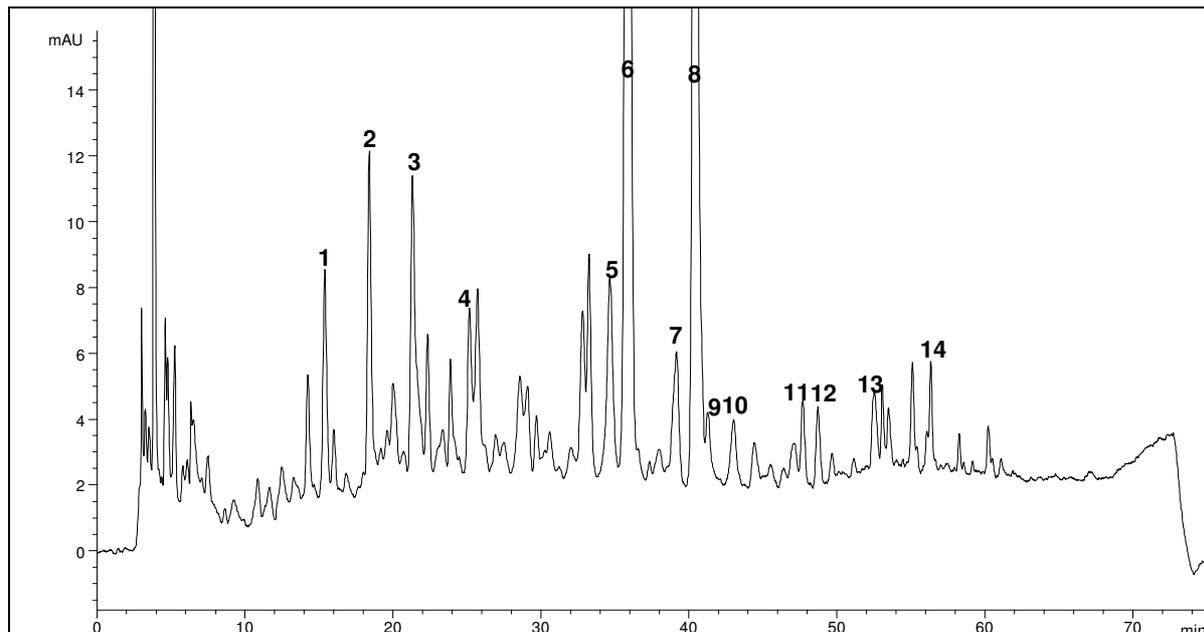


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm eines schwarzen Johannisbeersaftes (frischer Presssaft) an einer Fluofix-Säule bei 280 nm
 Caffeoylglucose (1)*, Neochlorogensäure (2), Coumaroylglucose (3)*, 3-p-Coumaroylchinasäure (4)*, Delphinidin-3-glucosid (5), Delphinidin-3-rutinosid (6), Cyanidin-3-glucosid (7), Cyanidin-3-rutinosid (8), Myricetin-3-rutinosid (9)*, Anthocyan (10)*, Quercetin-3-rutinosid (11), Quercetin-3-glucosid (12), Kaempferol-3-rutinosid (13)*, Anthocyan (14)*

5.2.2.2. Antioxidative Kapazität von Beerensäften

Die antioxidativen Kapazitäten von Beerensäften sind bereits in Abschnitt 5.1.5.1. Tabelle 21 aufgeführt. Der Anteil der einzelnen Polyphenole und der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert eines schwarzen Johannisbeersaftes (Abbildung 57) und eines Holundersaftes (Abbildung 58) sind mit den zur Verfügung stehenden Daten berechnet worden (siehe 2.2.1. Tabelle 14).

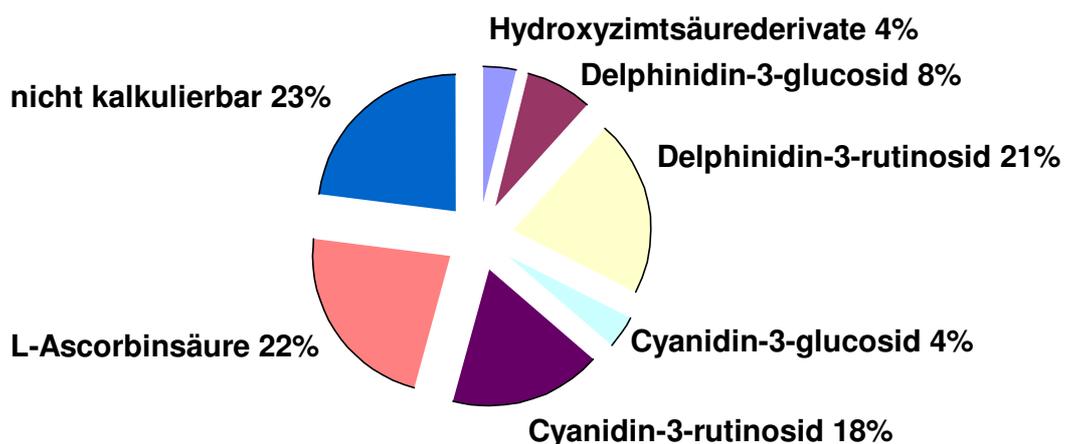


Abbildung 57: Anteil einzelner Polyphenole und der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert eines frischen schwarzen Johannisbeersaftes

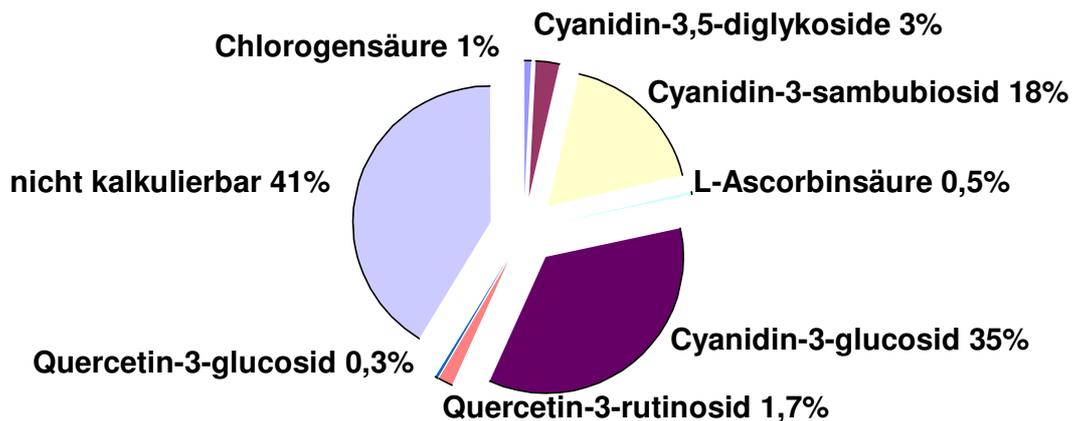


Abbildung 58: Anteil einzelner Polyphenole und der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert eines frischen Holunderpresssaftes

Die dargestellten Ergebnisse sind als Näherung anzusehen, da für die meisten der Hauptpolyphenole der Beerensäfte keine molaren TEAC-Werte vorliegen. Bei den Cyanidin- und Delphinidinglykosiden wurde zur Berechnung der molare TEAC-Wert von Cyanidin-3-rutinosid verwendet, bei den Kaffeesäureester derjenige der Chlorogensäure, bei Coumarsäureester derjenige der p-Coumarsäure.

Bei beiden Säften bleibt ein größerer Anteil des TEAC-Wertes nicht kalkulierbar. Wie beim Apfelsaft könnte es sich dabei um Procyanidine handeln, die mit der verwendeten HPLC-Analytik der Polyphenole nicht erfasst werden.

5.2.2.3. Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft

Die Veränderungen von antioxidativer Kapazität, von Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, von Gesamtphenolgehalt und -anthocyanengehalt mittels HPLC, des L-Ascorbinsäuregehalt, des Farbwertes E 520 nm (pH < 1) und des Extraktgehaltes in °Oechsle während der Herstellung eines schwarzen Johannisbeersaftes (siehe Abschnitt 4.2.1. Diagramm 2) ist in Abbildung 59 dargestellt. Wird die unvermeidliche Verdünnung während des Herstellungsprozesses (Abnahme des Extraktgehaltes) herausgerechnet, nehmen nach Separation und KZE die antioxidative Kapazität, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der L-Ascorbinsäuregehalt des frischen Johannisbeerpresssaftes (100%) insgesamt um etwa 10% ab, während der Farbwert bei 520 nm/cm (pH < 1) insgesamt um 25% abnimmt. Die stärkste Abnahme der untersuchten Parameter wird durch die Separation verursacht. Die KZE hingegen hat kaum einen Effekt auf die untersuchten Parameter.

Bei der Analyse der einzelnen Polyphenole wurde ein Ansteigen der Gehalte nach dem Separator festgestellt, was hypothetisch darauf zurückgeführt wird, dass die im Saft weiterhin tätigen Pektinasen im Verlauf des Prozesses Polyphenole aus kleinen Zellfragmenten freisetzen, so dass diese sich im Saft lösen können. Die im Vergleich zu den anderen Parametern stärkere Abnahme nach der KZE, die sich fast ausschließlich auf die Anthocyane beschränkte, wird auf deren Hitzeempfindlichkeit zurückgeführt (siehe auch 2.1.5.).

Die Abnahmen der verschiedenen Parameter ist im Vergleich zu Apfelsaft (siehe 5.2.1.3.) gering, was als eine größere Stabilität des schwarzen Johannisbeersaftes gegenüber den Einflüssen der Verarbeitungstechnik interpretiert werden kann.

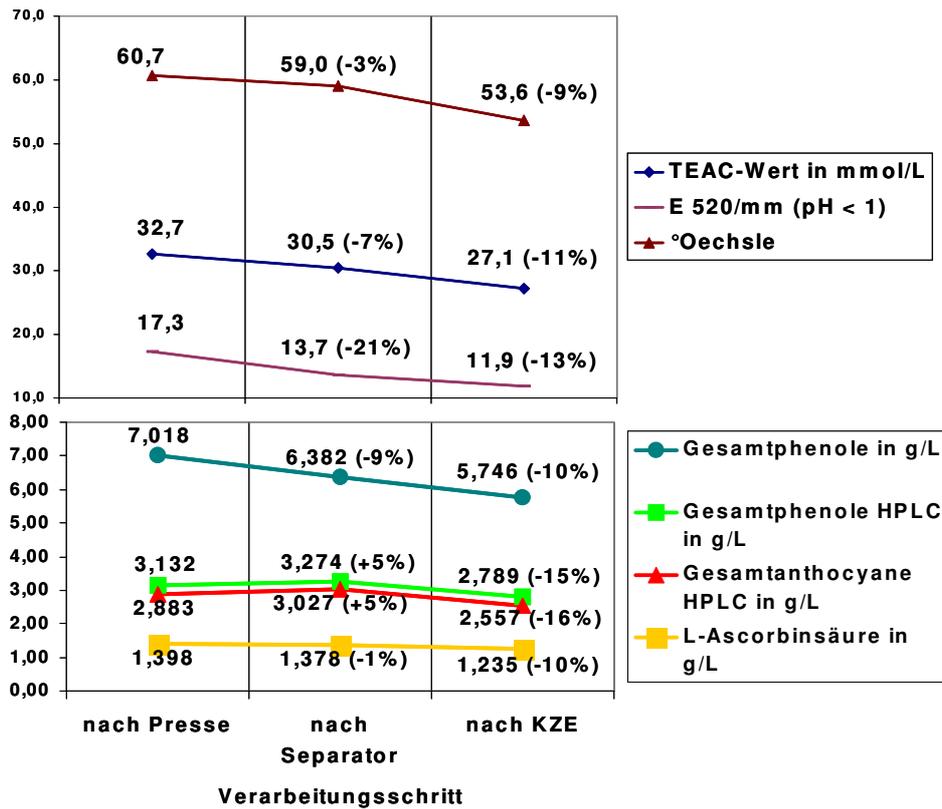


Abbildung 59: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtphenolgehalt und –anthocyanengehalt mittels HPLC, E 520/mm (pH < 1), L-Ascorbinsäuregehalt und Extraktgehalt während der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.

Der getrennt ausgebaute Nachextrakt hat geringere Gehalte an den untersuchten Inhaltsstoffen, einen wesentlich geringeren Farbwert und eine geringere antioxidative Kapazität (Abbildung 60).

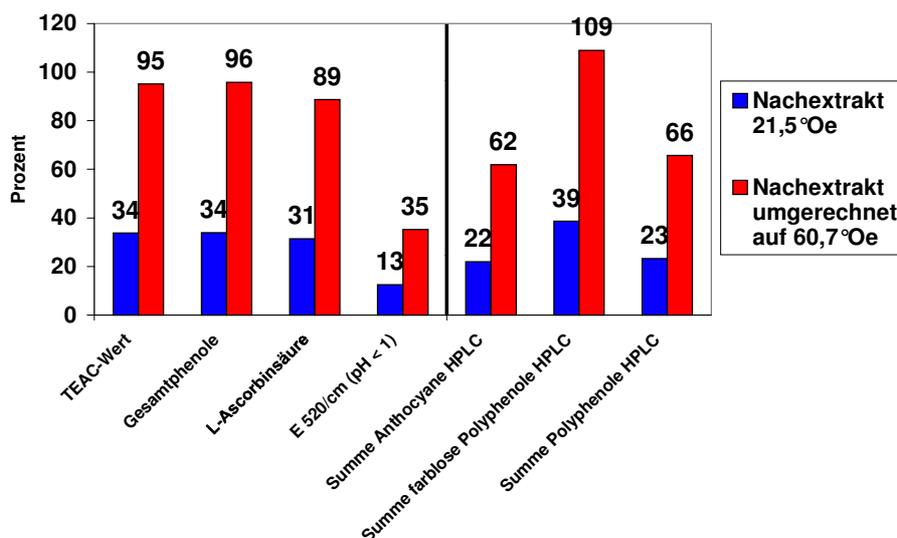


Abbildung 60: TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, L-Ascorbinsäuregehalte, Farbwert E 520/cm (pH < 1) sowie die Summen der Gehalte an Anthocyanen, farblosen Polyphenole und aller Polyphenole mittels HPLC von Nachextrakt und umgerechneten Nachextrakt einmal entsafteter schwarzen Johannisbeeren, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)

Die Werte für den Nachextrakt wurden auch auf die Dichte des Presssaftes umgerechnet, um beide miteinander vergleichen zu können. Danach sind der TEAC-Wert, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der L-Ascorbinsäuregehalt annähernd so hoch wie beim Presssaft, während die Farbausbeute deutlich niedriger ist. Der Vergleich der Gehalte an einzelnen Polyphenolen mittels HPLC ergibt beim umgerechneten Nachextrakt etwas höhere Gehalte an farblosen Polyphenolen, aber geringere Gehalte bei den Anthocyanen (Abbildung 60).

Die Summe der Polyphenole mittels HPLC nimmt ebenfalls ab, da die Anthocyane etwa 90% der analysierbaren Polyphenole mittels HPLC stellen (siehe 5.2.2.1.). Aus den Daten der Anthocyanengehalt in Nachextrakt und Presssaft lässt sich schließen, dass die Anthocyane beim Entsaftungsvorgang stärker in den Saft übergehen als die anderen Polyphenole.

Die umgerechneten Werte zeigen, dass sich die praxisübliche Nachextraktion des Tresters lohnt.

5.2.2.4. Einfluss der Sorte auf die antioxidative Kapazität von schwarzem Johannisbeersaft

Es zeigen sich große Unterschiede in den Gehalten einzelner Saftinhaltsstoffen und –parameter bei Säften aus verschiedenen schwarze Johannisbeersorten (Tabelle 29).

Die großen Differenzen in den untersuchten Parametern zeigen, wie wichtig die Wahl der richtigen Rohware für die Saftproduktion ist. Das Ziel einer hohen antioxidativen Kapazität in einem trinkbaren schwarzen Johannisbeernektar kann durch einen möglichst hohen Fruchtgehalt und einen hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen erreicht werden. Diese Kriterien erfüllen beispielsweise die Sorten Ben Lomond und Tsema erheblich besser als die Sorte Titania, die zur Zeit in Deutschland häufigsten angebaute Sorte.

Tabelle 29: Extraktgehalt (°Oechsle), Gesamtsäuregehalt (pH 8,1), L-Ascorbinsäuregehalt, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und TEAC-Wert von schwarzen Johannisbeersäften verschiedener Sorten

Sorte	Grad Oechsle [°Oe]	Gesamtsäure [g/L Citronensäure]	L-Ascorbinsäure [mg/L]	Gesamtphenole [mg/L Catechin]	TEAC [mmol/L Trolox]
Omota	68,5	33,6	660	5713	27,9
Rosenthals	63,2	36,5	1020	5627	27,2
Ben Lomond	64,5	34,7	1180	5940	33,2
Titania	65,6	37,7	830	3950	24,6
Ben Nevis	61,5	39,6	1305	5939	26,8
Blackdown	65,2	37,7	1043	5968	37,7
Tsema	58,4	36,8	1267	7758	33,3
Ben Tirran	70,7	41,1	1345	8719	39,0
Ben More	73,5	38,2	961	7417	35,6

5.2.2.5. Polyphenolbilanz beim Entsaften von schwarzer Johannisbeermaische

Der Übergang von antioxidativ wirksamen Polyphenolen aus schwarzer Johannisbeermaische in den Saft bei einem üblichen Entsaftungsprozess (Bucher Horizontalpresse) während der laufenden Produktion des Fruchtsaftbetriebes des Fachgebietes für Weinanalytik und Getränkeforschung der Forschungsanstalt Geisenheim ist in Abbildung 61 aufgeführt (siehe 3.1.4. Komplett-Extraktions-Variante). Die Bilanz des Übergangs von Polyphenolen und antioxidativ wirksamen Substanzen aus der Maische in

den Saft wird durch den Vergleich von absoluter antioxidativer Kapazität und absolutem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von Saft und Extrakt aus 100 g Maische ermittelt.

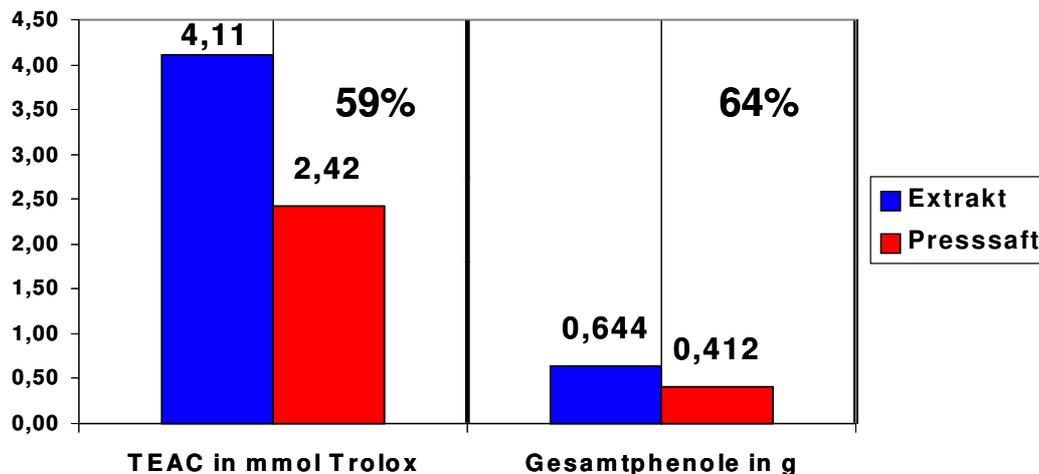


Abbildung 61: Absoluter TEAC-Werte und absoluter Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu von Presssaft und Maischeextrakt aus 100 g schwarzer Johannisbeermasche sowie die Ausbeuten in Prozent für den Presssaft

Die Ergebnisse zeigen, dass 64% der möglichen Polyphenol-Ausbeute und 59% der möglichen Ausbeute an antioxidativ wirksamen Substanzen bei einem üblichen Entsaftungsprozess für schwarze Johannisbeeren in den Presssaft übergehen.

Diese Werte liegen deutlich über denen beim Apfelsaft, was daran liegen kann, dass bei den Polyphenolen des Apfels vermutlich ein höherer Anteil an höher polymeren Polyphenolen (z.B.: Procyanidine) vorliegt (siehe 2.1.4. und 2.1.5.). Diese höher polymeren Polyphenolen sind schlecht oder gar nicht wasserlöslich und gehen daher bei einem Entsaftungsvorgang nicht in den Saft über.

5.2.2.6. Herstellung eines schwarzen Johannisbeerkonzentrates

Die Abnahme der Parameter TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Extinktion bei 520 nm/cm (pH < 1) und L-Ascorbinsäuregehalt sowie einzelner Polyphenole und Anthocyane mittels HPLC von schwarzem Johannisbeersaft nach dem Konzentratherstellungsprozess (Schema siehe 4.3.2.) sind in Abbildung 62 dargestellt.

Es werden der Muttersaft vor der Konzentrierung (100%) und das auf den gleichen Extraktgehalt rückverdünnte Konzentrat miteinander verglichen.

Antioxidative Kapazität und Gesamtphenolgehalt verändern sich während des Konzentratherstellungsprozesses kaum, während der L-Ascorbinsäuregehalt leicht und die Farbe um fast 30% abnehmen. Der Farbverlust zeigt sich in der Abnahme der einzelnen Anthocyane, die erheblich größer ist als die der farblosen Hydroxyzimtsäurederivate. Diese starken Verluste an Anthocyanen zeigen die hohe Wärmeempfindlichkeit der Anthocyane und decken sich mit kinetischen Daten zum Abbau von Anthocyanen (CEMEROGLU et al. 1994, EDER 1996a).

Im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit ist der hohe Verlust an monomeren Anthocyanen von ca. 50% durch den Konzentrationsprozess im Vergleich zum direkt hergestellten Saft als negativ zu beurteilen.

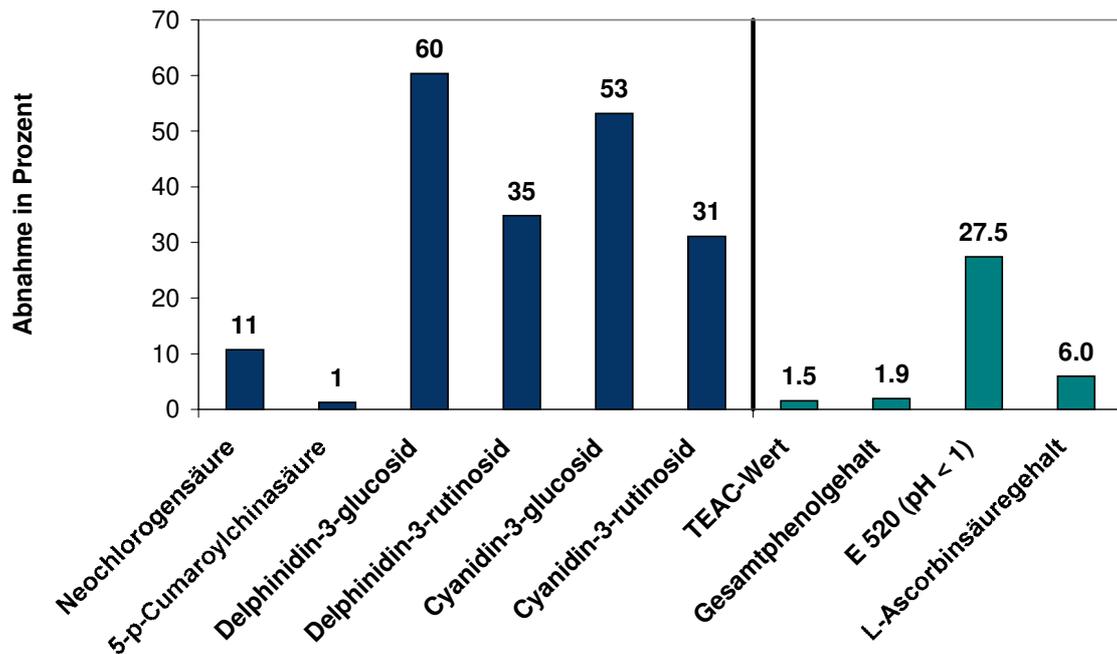


Abbildung 62: Abnahme einzelner Polyphenole und Anthocyane sowie des TEAC-Wertes, des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu, der Extinktion bei 520 nm (pH < 1) und des L-Ascorbinsäuregehaltes von schwarzem Johannisbeersaft nach dem Konzentratherstellungsprozess, bezogen auf den Muttersaft vor dem Konzentrierungsprozess (100%)

5.2.2.7. Einfluss der Gelatineschönung auf Brombeer- und schwarzen Johannisbeersaft

Die Abnahme der antioxidativen Kapazität und der anderen beiden Parameter durch die Gelatine-Schönung betrug bei schwarzem Johannisbeersaft und Brombeersaft nur etwa 5% (Abbildung 63).

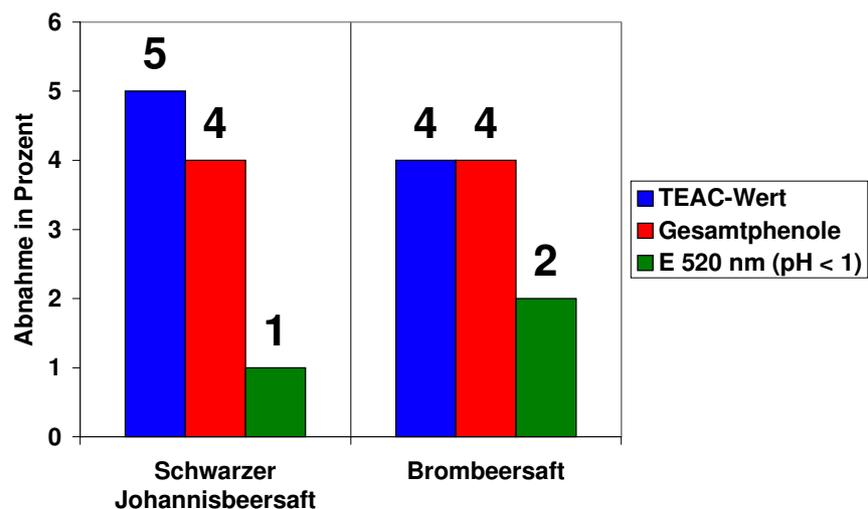


Abbildung 63: Abnahme von TEAC-Wert, Farbwert E 520 nm und Gesamtphenolgehalt nach einer Schönung von schwarzem Johannisbeersaft und Brombeersaft mit 15 g/hL Gelatine, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%)

Die Analyse der monomeren Polyphenole ergab bei beiden Säften keinerlei signifikante Veränderungen in den Gehalten durch die Gelatine-Schönung. Als Vorteil einer Gelatineschönung zeigt sich auch, dass der Farbwert der Buntsäfte kaum vermindert wird. Sie ist, wie schon beim Apfelsaft, das günstigste Verfahren zur Herstellung von klaren Beerensäften.

5.2.2.8. Einfluss der Behandlungsmittel PVPP und Bentonit auf schwarzen Johannisbeersaft

Andere Stoffe zur Stabilisierung und Behandlung, wie PVPP und Bentonit, zeigen einen größeren Effekt auf die untersuchten Parameter als die Gelatine (Abbildung 64). Vor allem der Farbverlust ist erheblich höher.

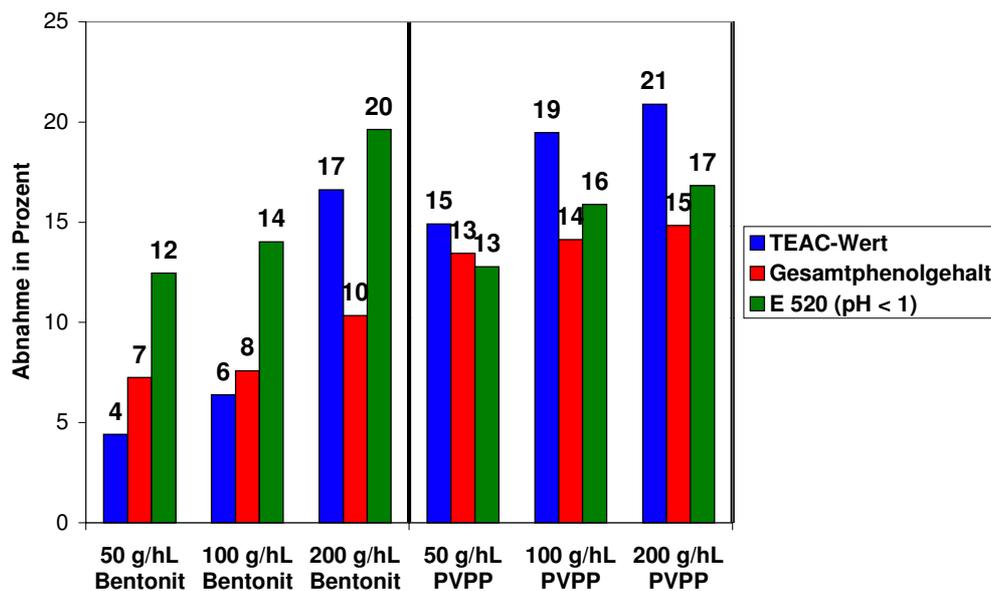


Abbildung 64: Abnahme von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der Extinktion bei 520 nm/cm (pH < 1) nach der Behandlung von schwarzem Johannisbeersaft mit verschiedenen Mengen an PVPP und Bentonit.

Der hohe Farbverlust durch eine Behandlung mit PVPP bzw. Bentonit erklärt sich durch die chemische Struktur der beiden Behandlungsmittel. PVPP adsorbiert die Anthocyane, während Bentonit mit negativ geladenen Gruppen (Si-O⁻) die als Flavylumkationen vorliegenden Anthocyane bindet. Die Behandlung von schwarzem Johannisbeersaft mit PVPP bzw. Bentonit ist daher nicht zu empfehlen und auch nicht praxisüblich.

5.2.2.9. Herstellung und Lagerung von Holundersaft

Polyphenole im Holundersaft

Der frische Holunderpresssaft (Verarbeitung analog Diagramm 2 Seite 64, allerdings ohne die Nachextraktion) weist mit fast 10 g/L die höchsten Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu aller untersuchten Säfte auf. Die Hauptpolyphenole mittels HPLC sind die vier Anthocyane mit folgender Anthocyanverteilung:

Cyanidin-3-sambubiosid (37%), Cyanidin-3-glucosid (57%), Cyanidin-3,5-diglucosid und Cyanidin-3-sambubiosyl-5-glucosid (zusammen 6%).

Das Cyanidin-3-sambubiosid und das Cyanidin-3-sambubiosyl-5-glucosid wurden dabei hypothetisch nach Literaturangaben (siehe 2.1.6.), UV/Vis-Spektren und Retentionszeiten

zugeordnet. Die Polyphenole, Quercetin-3-rutinosid, Quercetin-3-glucosid und Chlorogensäure konnten ebenfalls identifiziert werden (Abbildung 65).

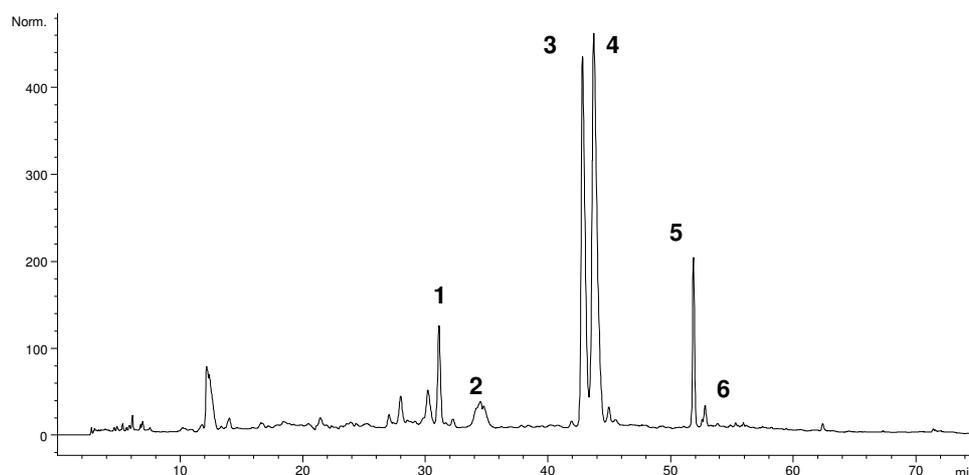


Abbildung 65: HPLC-Chromatogramm eines frischen Holunderpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm
Chlorogensäure (1), Cyanidin-3,5-diglucosid + Cyanidin-3-sambubiosyl-5-glucosid (2), Cyanidin-3-sambubiosid (3), Cyanidin-3-glucosid (4), Quercetin-3-rutinosid (5), Quercetin-3-glucosid (6)

Die Gehalte der einzelnen Polyphenole sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Gehalte einzelner Polyphenole und Summe der Polyphenole und Anthocyane von Holundersaft (frischer Presssaft) mittels HPLC

	Gehalt in mg/L
Chlorogensäure	151
Cyanidin-3,5-diglucosid + Cyanidin-3-sambubiosyl-5- glucosid*	300
Cyanidin-3-sambubiosid*	1914
Cyanidin-3-glucosid*	2899
Quercetin-3-rutinosid	268
Quercetin-3-glucosid	27
Summe der Anthocyane	5113
Summe Polyphenole	5532

*berechnet als Cyanidin-3-rutinosid

Der Anteil der Anthocyane am Gesamtpolyphenolgehalt mittels HPLC beträgt ca. 90%.

Herstellung

Der TEAC-Wert der frischen Holunderpresssäfte (n = 2) lag zwischen 60,4 und 60,6 mmol/L Trolox und der Farbwert E 520 nm/cm (pH < 1) zwischen 276 und 277. Beim Herstellungsprozess (analog Diagramm 2 S. 64, allerdings ohne Nachextraktion) Holundersaft ergaben sich insgesamt ähnliche Verluste an antioxidativer Kapazität und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu wie bei der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft. Es gab aber Unterschiede bei den Verlusten an Farbe und monomeren Polyphenolen, vor allem durch die Separation (Abbildung 66).

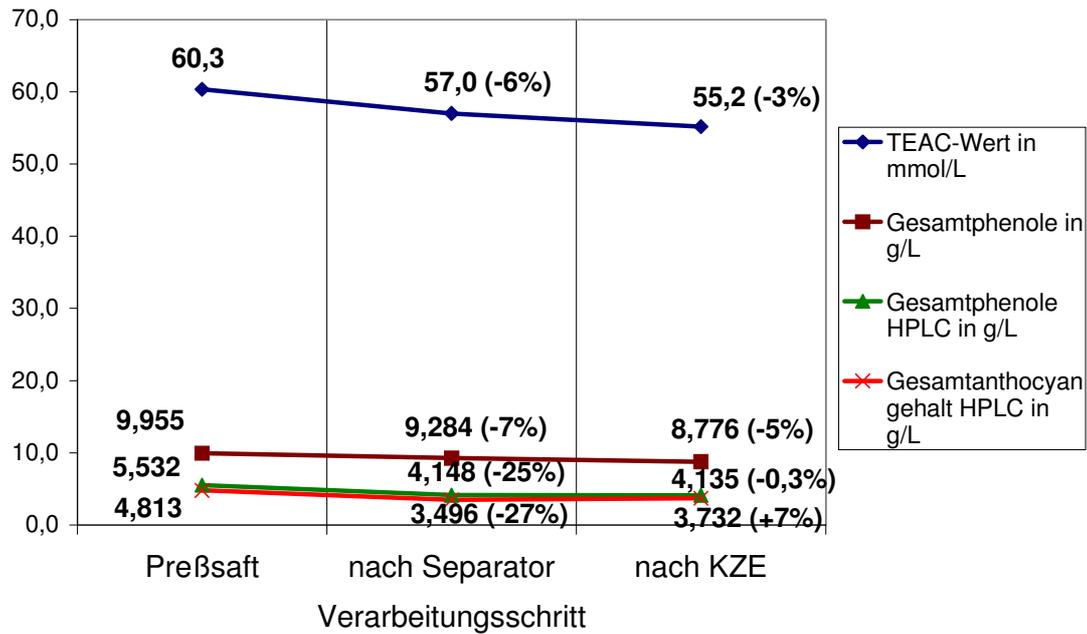


Abbildung 66: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Gesamtphenol- und Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC während der Herstellung von Holundersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.

Hier sind die Abnahmen, verursacht durch Separator und KZE, im Gegensatz zum schwarzen Johannisbeersaft etwa gleich groß, aber nach der KZE in der Summe mit denen beim schwarzen Johannisbeersaft vergleichbar. Es ist aber zu vermuten, dass die ermittelten Verluste nach der KZE auf die längere Standzeit des Saftes zwischen Separation und KZE (2 – 3 Stunden) während des Prozesses zurückzuführen ist.

Auffällig ist hier die starke Abnahme der monomeren Anthocyane im Verlauf der Herstellung, was sich aber im Farbwert kaum niederschlägt, der im Herstellungsprozess nur um ca. 8% bezogen auf den Presssaft abnimmt. Dieses Ergebnis zeigt genau die entgegen gesetzte Tendenz wie bei der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft, wo der Farbwert stark absinkt, aber der Gehalt an monomeren Anthocyanen kaum.

Insgesamt ist die Erhaltung der antioxidativen Kapazität und die Stabilität während des Herstellungsprozesses als gut zu bezeichnen.

Lagerung

Der Holundersaft wies nach der sechsmonatigen Tanklagerung (bei ca. 10 – 15°C) in allen Parametern verschiedene hohe Abnahmen auf (Abbildung 67). Die Veränderung der einzelnen Polyphenole des Saftes mittels HPLC vor und nach der Lagerung sind in Tabelle 31 dargestellt.

Besonders stark ist die Abnahme der Chlorogensäure mit fast 50% während der Lagerung. Bei den beiden Cyanidin-3-glykosiden ist die Abnahme des Cyanidin-3-glucosids erheblich höher als die des Cyanidin-3-sambubiosids, so dass sich das Anthocyan- und damit auch das Polyphenolmuster des gelagerten Holundersaftes signifikant von dem des frisch eingelagerten Saftes unterscheidet. Der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu nehmen bei der Lagerung stärker ab als im Verlauf des Herstellungsprozesses.

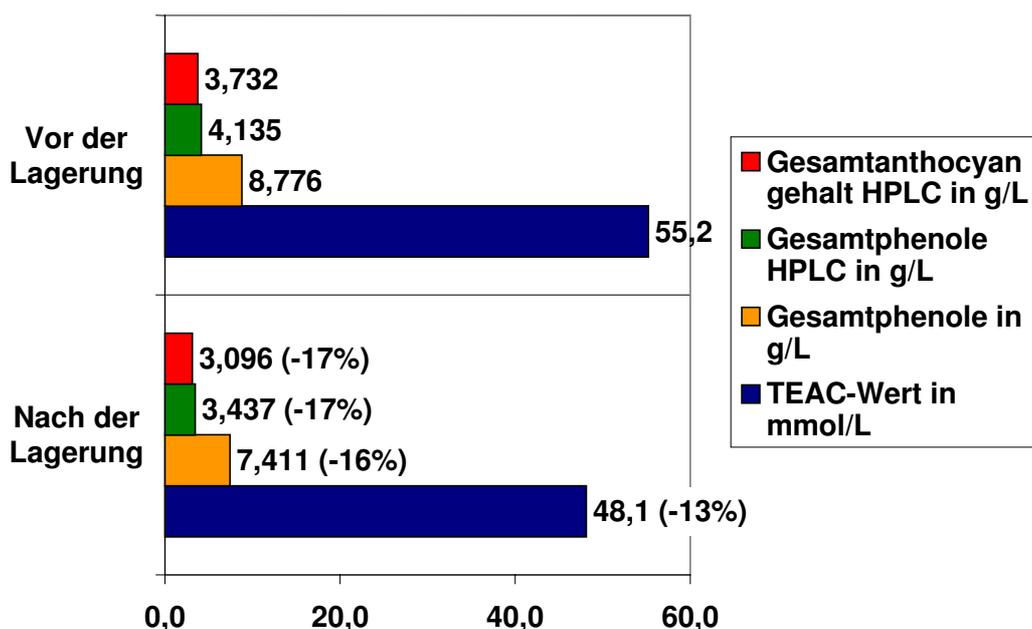


Abbildung 67: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu sowie Gesamtphenol- und Gesamtanthocyan gehalt mittels HPLC von steril eingelagertem Holundersaft nach 6 Monaten Tanklagerung

Tabelle 31: Veränderung einzelne Polyphenole mittels HPLC von steril eingelagertem Holundersaft nach 6 Monaten Tanklagerung

	Vor der Lagerung	Nach der Lagerung	Abnahme in Prozent
Chlorogensäure	146 mg/L	74 mg/L	49%
Cyanidin-3,5-diglucosid + Cyanidin-3-sambubiosyl-5-glucosid*	257 mg/L	191 mg/L	26%
Cyanidin-3-sambubiosid*	1388 mg/L	1233 mg/L	11%
Cyanidin-3-glucosid*	2087 mg/L	1672 mg/L	20%
Quercetin-3-rutinosid	233 mg/L	234 mg/L	0%
Quercetin-3-glucosid	24 mg/L	23 mg/L	3%

*berechnet als Cyanidin-3-rutinosid

Werden die prozentualen Abnahmen auf den frischen Presssaft, also auf den gesamten Herstellungs- und Lagerungsprozess bezogen, betragen die Verluste (Abbildung 68).

Bei den einzelnen Polyphenolen ist die Chlorogensäure am wenigsten stabil, gefolgt vom Cyanidin-3-glucosid, während die beiden Cyanidin-3,5-diglykosiden und das Cyanidin-3-sambubiosid etwas stabiler sind und die Quercetinglykoside im Herstellungs- und Lagerungsprozess am stabilsten sind. Aufgrund dieser unterschiedlich starken Veränderungen kommt es zu einer Veränderung im Polyphenolmuster des Holundersaftes während der Herstellung und vor allem während der Lagerung.

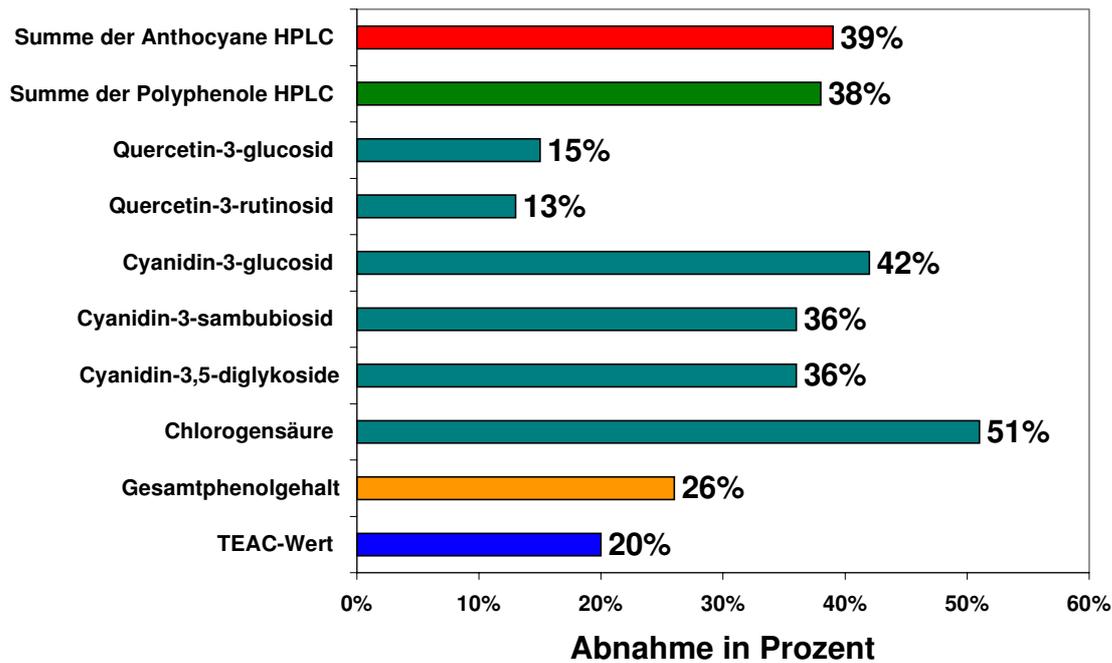


Abbildung 68: Prozentuale Abnahme von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtphenol- und Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC sowie der einzelnen Polyphenole mittels HPLC über den gesamten Herstellungs- und Lagerungsprozess von Holundersaft, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)

5.2.2.10. Herstellung von Brombeersaft

Polyphenole im Brombeersaft

Die Brombeersäfte (n = 3) hatten als frischer Presssäfte einen Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von 3640 – 4090 mg/L. Die Hauptpolyphenole mittels HPLC waren ausschließlich Anthocyane, während farblose Polyphenole nur in geringen Mengen nachweisbar waren und nicht identifiziert werden konnten (Abbildung 69).

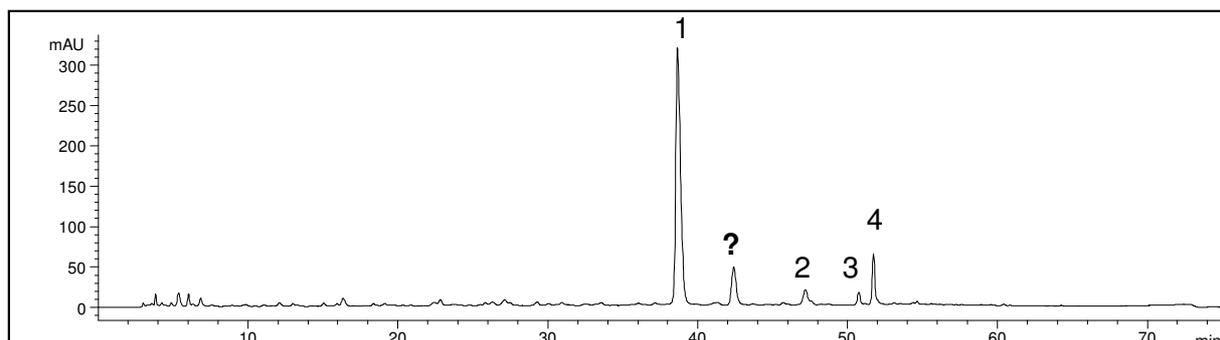


Abbildung 69: HPLC-Chromatogramm eines Brombeerpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm

Cyanidin-3-glucosid (1), Cyanidinderivat 1 (2), Cyanidinderivat 2 (3), Cyanidinderivat 3 (4)

In Tabelle 32 sind die Gehalte der einzelnen Anthocyanen und die Summe der Polyphenole mittels HPLC, die mit der Summe der Anthocyane identisch ist, in einem frischen Brombeerpresssaft angegeben. Bei den Anthocyanen handelt es sich um Cyanidinderivate (UV/Vis-Spektrum), wobei nur das Cyanidin-3-glucosid zweifelsfrei zugeordnet werden konnte.

Tabelle 32: Gehalte einzelner Polyphenole und Summe der bestimmten Polyphenole mittels HPLC sowie das Anthocyanmuster von frischem Brombeerpresssaft

	Gehalt in mg/L (berechnet als Cyanidin-3-rutinosid)	Anthocyanmuster
Cyanidin-3-glucosid*	1207,3	81,7%
Cyanidinderivat 1*	75,0	5,1%
Cyanidinderivat 2*	43,5	2,9%
Cyanidinderivat 3*	151,6	10,3%
Summe Polyphenole HPLC*	1477,4	

*berechnet als Cyanidin-3-rutinosid

In einem der untersuchten Brombeerpresssäfte wurde noch ein weiteres in geringer Menge vorliegendes Cyanidinderivat nachgewiesen, das allerdings nicht identifiziert werden konnte.

Herstellung

Der TEAC-Wert der frischen Brombeerpresssäfte ($n = 3$) lag zwischen 12,9 und 19,9 mmol/L Trolox und der Farbwert E 520 nm/cm ($\text{pH} < 1$) zwischen 63 und 91. Die Veränderungen in den untersuchten Parameter, TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, E 520 nm/mm ($\text{pH} < 1$) sowie der Summe der Polyphenole mittels HPLC, die mit der Summe der Anthocyane mittels HPLC identisch ist (siehe oben), während der Herstellung von Brombeersaft sind in Abbildung 70 aufgeführt.

Die Verluste in den untersuchten Parametern bei der Herstellung liegen um die 20%, also etwas höher als bei den beiden anderen untersuchten rotfarbigen Beerensäften. Wie bei der Herstellung des schwarzen Johannisbeersaftes verursacht auch hier die Separation höhere Verluste an antioxidativer Kapazität, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Farbwert E 520 nm/cm ($\text{pH} < 1$) als die KZE. Für die Veränderungen nach der KZE gilt dieselbe Vermutung wie bei der Herstellung von Holundersaft (Seite 113), nämlich die Saftstandzeit zwischen Separation und KZE.

Auf den Einfluss einer Schönung mit Gelatine auf Brombeersaft ist in 5.2.2.7. eingegangen worden.

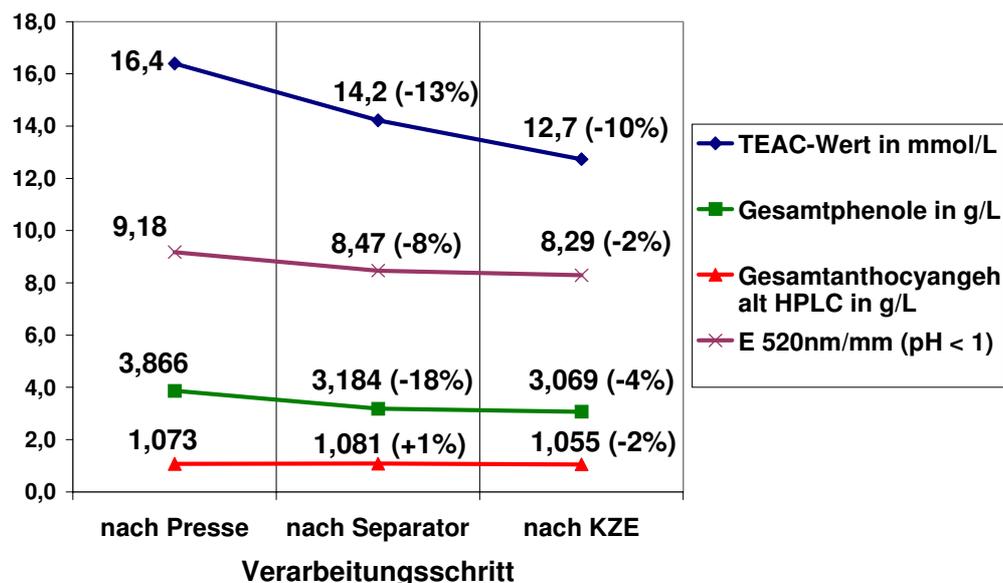


Abbildung 70: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC und Farbwert E 520 nm/cm ($\text{pH} < 1$) während der Herstellung von Brombeersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.

5.2.2.11. Herstellung von Sauerkirschsaft

Polyphenole im Sauerkirschsaft

Der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von frischem Sauerkirschpresssaft ($n = 2$) betrug 3885 – 4821 mg/L. Das Polyphenolmuster des Sauerkirschsaftes, der zwar kein Beerensaft ist, aber ebenfalls einen stark gefärbten Saft darstellt, hat zehn Hauptpolyphenole (Abbildung 71).

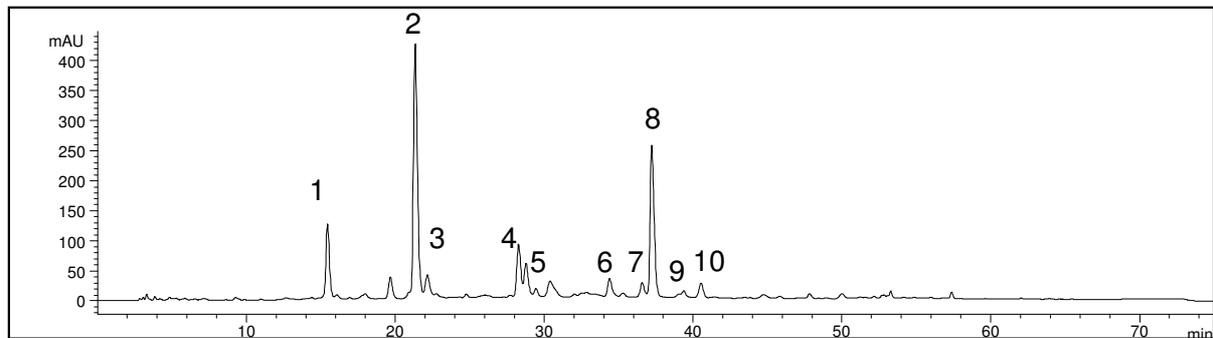


Abbildung 71: HPLC-Chromatogramm eines Sauerkirschpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280nm

Neochlorogensäure (1), 3-p-Coumaroylchinasäure (2), (+)-Catechin (3), Chlorogensäure (4), (-)-Epicatechin (5), 5-p-Coumaroylchinasäure (6), Cyanidinglykosid (7), Cyanidin-3-(2G-glucosylrutinosid) (8), Anthocyan (9), Cyanidin-3-rutinosid (10)

Die farblosen Polyphenole, Neochlorogensäure, Chlorogensäure, 3-p-Coumaroylchinasäure, 5-p-Coumaroylchinasäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin konnten zugeordnet werden, wobei die beiden Coumaroylchinasäuren hypothetisch über Retentionszeit und UV-Spektrum identifiziert wurden. Die Anthocyane, Cyanidin-3-rutinosid (9%), Cyanidin-3-(2G-glucosylrutinosid) (80%), ein weiteres Cyanidinglykosid (6%) und ein nicht identifizierbares Anthocyan konnten zugeordnet werden, wobei die Zuordnung von Cyanidin-3-(2G-glucosylrutinosid) und des Cyanidinglykosids hypothetisch nach Literaturangaben (siehe 2.1.6.), UV/Vis-Spektren und Retentionszeiten erfolgte. Die Gehalte der einzelnen Polyphenole sowie der Summe der Anthocyane und die Summe der Polyphenole sind in Tabelle 33 angegeben.

Tabelle 33: Gehalte an einzelnen Polyphenolen sowie die Summe der Anthocyane und die Summe der Polyphenole mittels HPLC von frischem Sauerkirschpresssaft

	Gehalt in mg/L
Neochlorogensäure	69
Chlorogensäure	42
3-p-Coumaroylchinasäure*	246
5-p-Coumaroylchinasäure*	20
(+)-Catechin	151
(-)-Epicatechin	140
Cyanidin-3-(2G-glucosylrutinosid)**	818
Cyanidin-3-rutinosid**	88
Cyanidinglykosid**	64
Anthocyan**	49
Summe Anthocyane HPLC	1019
Summe Polyphenole HPLC	1687

*berechnet als Chlorogensäure

**berechnet als Cyanidin-3-rutinosid

Der Anteil der Anthocyane am Gesamtpolyphenolgehalt mittels HPLC beträgt 60%.

Herstellung

Der TEAC-Wert des frischen Presssaftes betrug 22,1 mmol/L Trolox und der Farbwert E 520 nm/cm (pH < 1) 13,4. Die Verluste in den untersuchten Parameter, TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und E 520 nm/cm (pH < 1), während der Herstellung von Sauerkirschsafft (von Presssaft (100%) über Separator bis zur KZE) sind in Abbildung 72 aufgeführt.

Die Verluste der untersuchten Parameter liegen um die 15%.

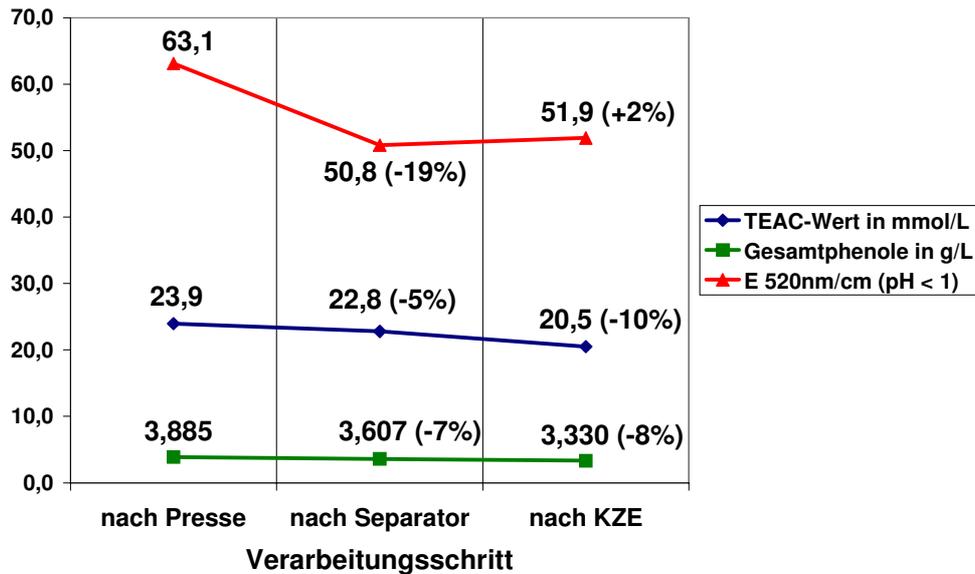


Abbildung 72: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Farbwert E 520 nm/cm (pH < 1) während der Herstellung von Sauerkirschsafft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.

Hier sind die Abnahmen, verursacht durch Separator und KZE, ähnlich wie bei der Herstellung von Holundersaft etwa gleich groß. Es ist auch hier zu vermuten, dass die ermittelten Verluste nach der KZE auf die längere Standzeit des Saftes zwischen Separation und KZE (2 – 3 Stunden) während des Prozesses zurückzuführen sind.

5.2.2.12. Herstellung eines Stachelbeernektars

Der frische Presssaft wies einen TEAC-Wert von 2,79 mmol/L Trolox und einen Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von 770 mg/L auf, was im Vergleich zu den rotfarbigen Beerensäften niedrig ist und im Bereich von Apfelsaft liegt. Während des Herstellungsprozesses (Diagramm 3 Seite 66) zum Stachelbeernektar nahmen die untersuchten Parameter TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu deutlich ab (Abbildung 73).

Die Verdünnung bei der Herstellung des Nektars wurde herausgerechnet. Die Verluste an antioxidativer Kapazität waren mit gesamt fast 73% erheblich höher, als die Abnahme des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu mit 40%. Grund hierfür könnte sein, dass bei der Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu Substanzen mit erfasst werden, die keine antioxidative Wirkung haben. Bei der Herstellung des Stachelbeernektars ging somit der Grossteil der antioxidativen Kapazität verloren.

Außerdem ging die leicht rosa Farbe des frischen Presssaftes im Herstellungsprozess gänzlich verloren. Der fertige Stachelbeernektar hat eine schwach gelbe Farbe.

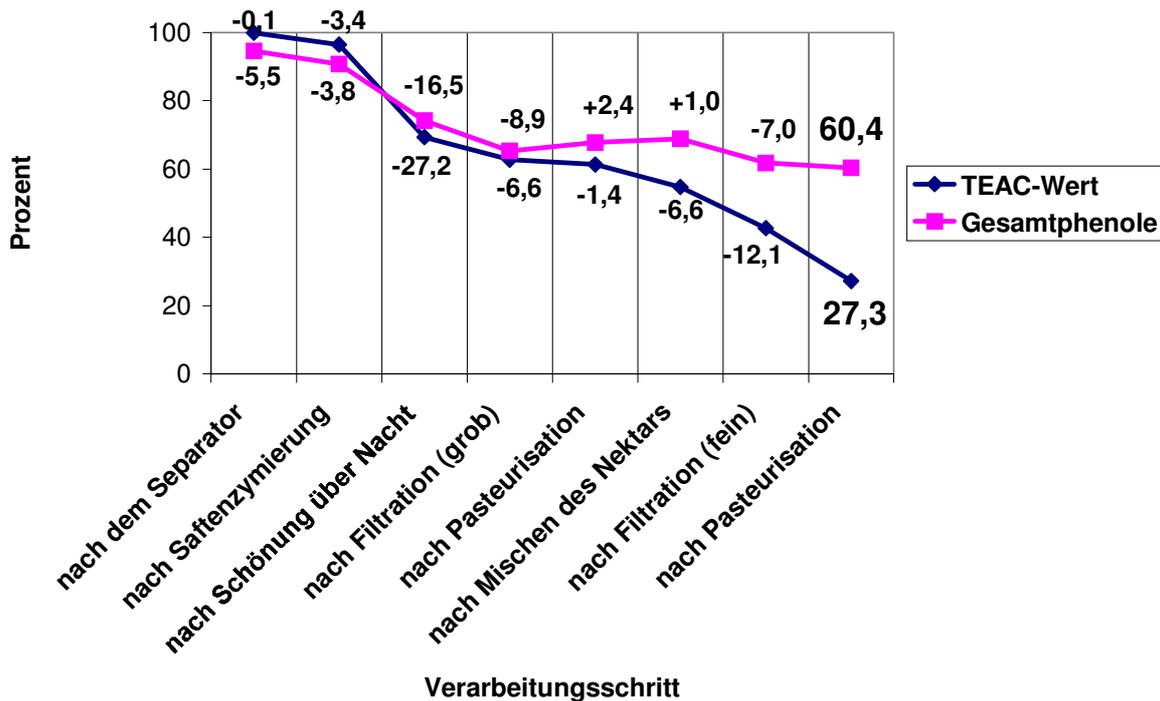


Abbildung 73: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu während der Herstellung von Stachelbeernektar, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)

5.2.2.13. Einfluss der Reifung auf die antioxidative Kapazität am Beispiel von Erdbeersorten

Einige Analysenergebnisse der in Deutschland meist angebaute Erdbeersorte „Elsanta“ zu drei Ernteterminen ist in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Extrakt, Gesamtsäuregehalt (pH 8,1), L-Ascorbinsäuregehalt, TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC berechnet als Pelargonidin von Erdbeeren der Sorte „Elsanta“ an drei Ernteterminen

Datum	Extrakt [g/L]	Säure [g/L]	Ascorbinsäure gehalt [mg/L]	TEAC-Wert [mmol/L Trolox]	Gesamtphenol gehalt [mg/L]	Gesamtanthocyane [mg/L]
31.05.99	95,9	7,0	735	12,6	2075	65
07.06.99	87,6	7,7	681	14,3	2203	78
10.06.99	82,6	9,6	516	12,8	2503	100

Während der Reifung nehmen der Extrakt (!) und der L-Ascorbinsäuregehalt ab, während die Gesamtsäure, der Gesamtphenolgehalt und der Gesamtanthocyanengehalt zunehmen. Der TEAC-Wert zeigt keine eindeutige Tendenz, da sich abnehmender L-Ascorbinsäuregehalt und zunehmender Gesamtphenolgehalt gegenseitig aufzuheben scheinen. Daher ist die antioxidative Kapazität zum mittleren Erntetermin am höchsten, während der letzte und der erste Erntetermin nahezu den gleichen Wert haben. Für die Abnahme des Extraktes könnte eine vermehrte Einlagerung von Wasser während der Reifung und dem damit verbundenen Wachstum der Frucht verantwortlich sein.

Bei der Polyphenolanalytik zeigten sich neben unterschiedlich hohen Gesamtanthocyangehalten (60 – 190 mg/L berechnet als Pelargonidin) der einzelnen Sorten auch klare Unterschiede im Anthocyanmuster der Sorten (Abbildung 74).

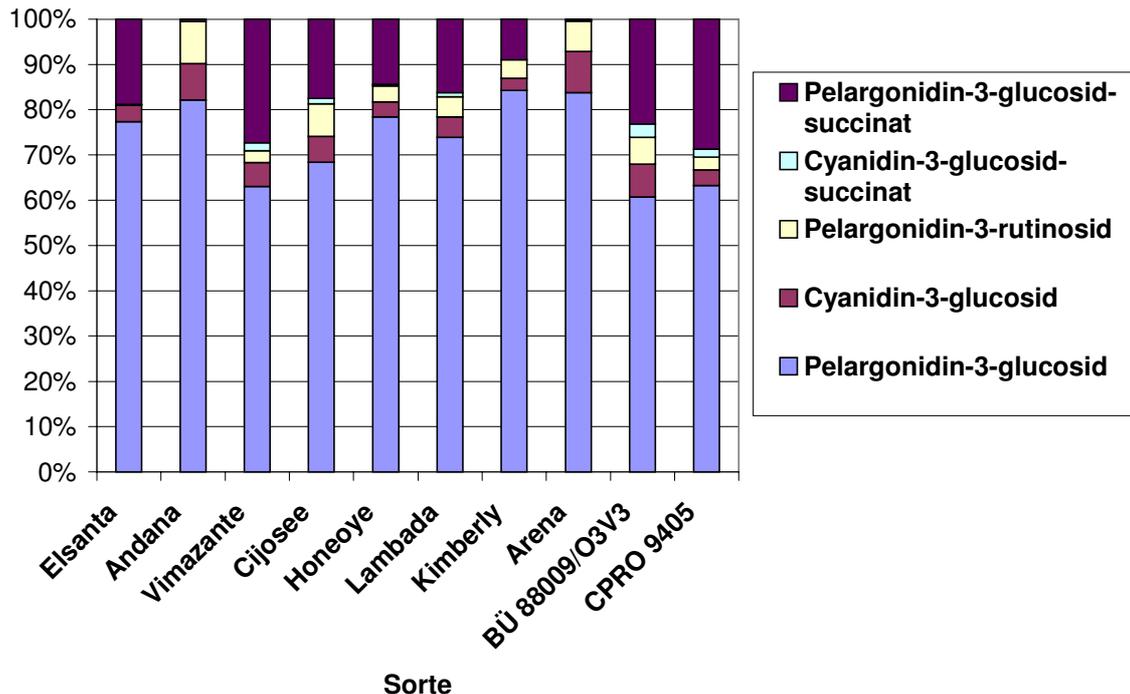


Abbildung 74: Anthocyanfingerprints verschiedener Erdbeersorten

Die Zuordnung der Anthocyane erfolgte durch Vergleich der UV-Spektren mit Standards und nach Literaturangaben (siehe 2.2.6.). Das Anthocyanmuster kann daher zur Identifizierung von Erdbeersorten herangezogen werden. Das Anthocyanmuster der Sorten veränderte sich während der Reifung nicht.

Der Einfluss der Reifung auf die antioxidative Kapazität von Säften aus verschiedenen Erdbeersorten zeigt keine klare Tendenz. Die Bestandteile der antioxidativen Kapazität von Erdbeersaft, Polyphenole und L-Ascorbinsäure, verhielten sich gegenläufig, die Polyphenole nahmen zu, die L-Ascorbinsäure ab. Beide Effekte hoben sich im Bezug auf die antioxidative Kapazität auf, so dass diese nahezu konstant blieb.

5.2.2.14. Entwicklung eines Antioxidansgetränkes auf der Basis verschiedener Beerensäfte

Das Ziel der Entwicklung eines Antioxidansgetränkes, das eine höher antioxidative Kapazität aufweist als Rotwein (11,1 mmol/L Trolox), konnte mit folgender Fruchtsaftmischung befriedigend verwirklicht werden:

- 15% Holundersaft
- 25% Schwarzer Johannisbeersaft aus Konzentrat
- 10% Sauerkirschsaft aus Konzentrat
- 10% Brombeersaft
- 30% Weißer Traubensaft
- 10% Aroniasaft aus Konzentrat

Bei dem entwickelten Antioxidansgetränk handelt es sich um einen Mischfruchtsaft mit einem Fruchtgehalt von 100%. Durch Austausch des weißen Traubensaftes durch roten Traubensaft wäre eine noch höher antioxidative Kapazität möglich.

Tabelle 35: Analysendaten des Antioxidansgetränkes

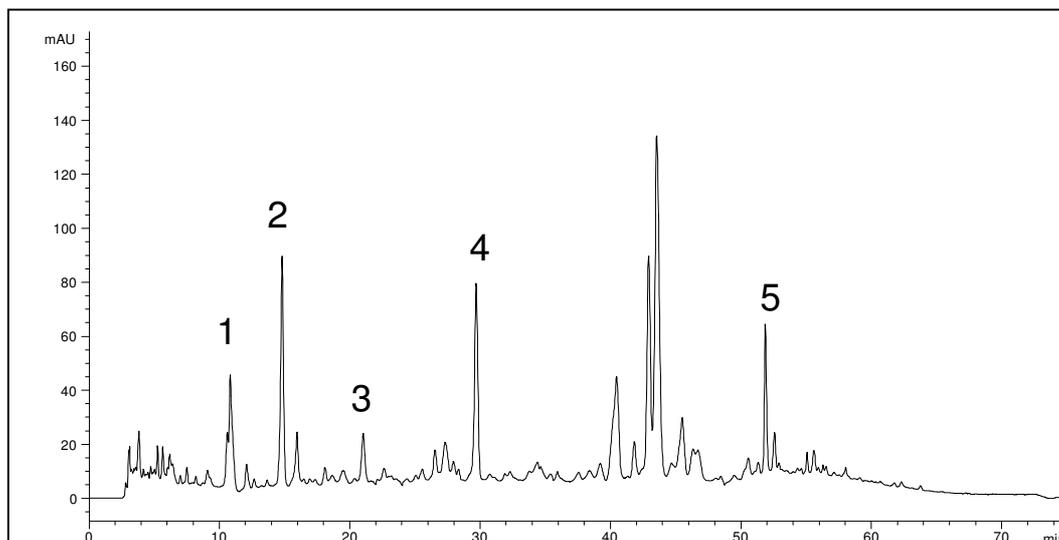
Parameter	Wert
Extrakt	45,6°Oechsle
Gesamtsäure (als Citronensäure)	11 g/L
Gesamtphenolgehalt (als Catechin)	2573 mg/L
TEAC-Wert	18,2 mmol/L Trolox

Die HPLC-Analyse ergab ein komplexes Polyphenolmuster. Einzelne Polyphenole und Anthocyane konnten zugeordnet (Abbildungen 75 und 76) und quantifiziert werden (Tabelle 36). Die Anthocyanpeaks, die im Bereich zwischen 30 und 50 min liegen, sind in Abbildung 75 wegen ihrer großen Zahl nicht bezeichnet, und werden im verkleinerten Abschnitt in Abbildung 76 zugeordnet.

Tabelle 36: Gehalte der Hauptpolyphenole mittels HPLC des Antioxidansgetränkes

Polyphenol	Gehalt in mg/L
Neochlorogensäure	24,3
Chlorogensäure	24,6
Quercetin-3-rutinosid	39,9
Gesamtanthocyane (als Cya-3-rut)	482,4

An farblosen Polyphenolen enthält das Getränk deutliche Mengen an Hydroxizimsäurederivaten, Flavonolglykosiden und Procyanidinen. Viele Peaks konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

**Abbildung 75:** HPLC-Chromatogramm des Antioxidansgetränkes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm

Procyanidin (1), Neochlorogensäure (2), 3-p-Coumaroylchinasäure (3), Chlorogensäure (4), Quercetin-3-rutinosid (5)

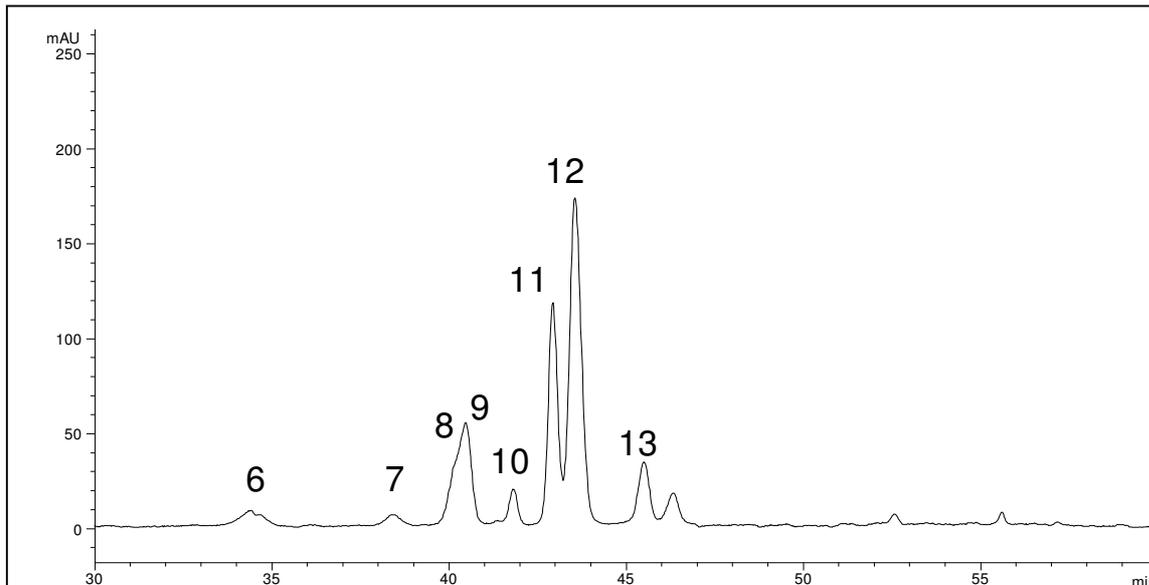


Abbildung 76: HPLC-Chromatogramm des Antioxidansgetränkes an einer Fluofix-Säule bei 525 nm, Ausschnitt 30 – 60 min

Cyanidin-3,5-diglucosid + Cyanidin-3-sambubiosyl-5-glucosid (6), Delphinidin-3-glucosid (7), Delphinidin-3-rutinosid (8), Cyanidin-3-glucosylrutinosid (9), Cyanidin-3-galaktosid (10), Cyanidin-3-sambubiosid (11), Cyanidin-3-glucosid + Cyanidin-3-rutinosid (12), Cyanidin-3-arabinosid (13)

Das Anthocyanmuster ist aufgrund der verschiedenen verwendeten Buntsäfte erwartungsgemäß sehr komplex. Die Zuordnungen der Peaks erfolgten durch Spektrenvergleich und nach Literaturangaben.

Die relativ geringen Gehalte der einzelnen quantifizierbaren Polyphenole weisen im Hinblick auf die anderen Analysendaten auf einen hohen Anteil an polymerisierten Polyphenolen im Getränk hin.

5.2.2.15. Herstellung von Fruchtweinen aus verschiedenen Beerenfrüchten

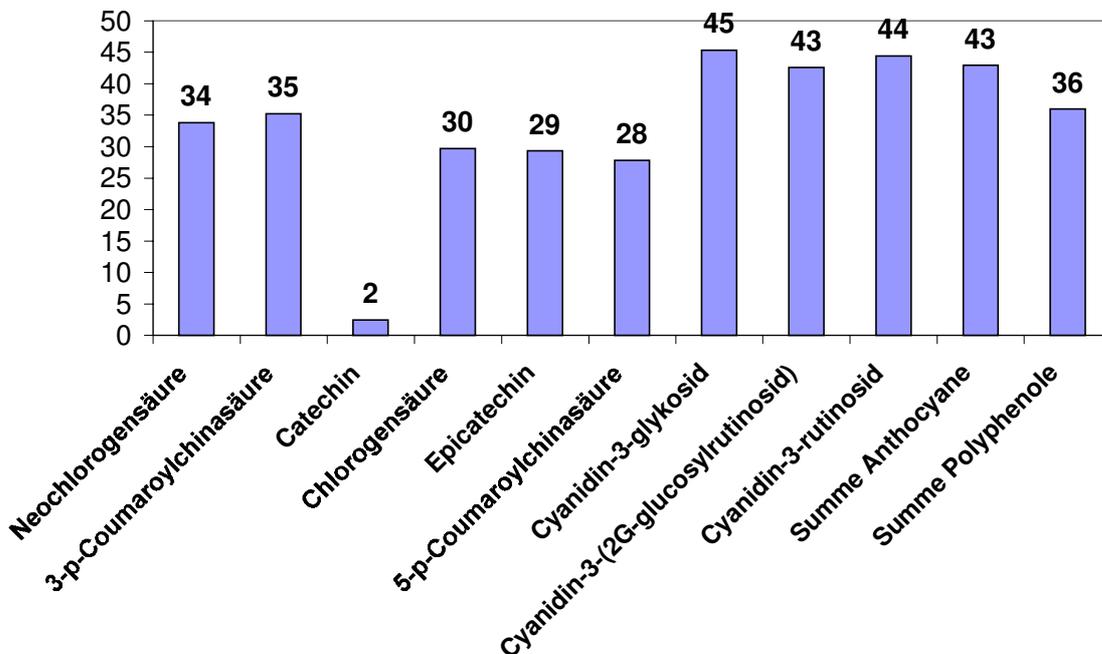
Der Einfluss der alkoholischen Gärung auf die antioxidative Kapazität und die Polyphenole von Beerensäften bei der Herstellung von Fruchtweinen wurde untersucht. Die Veränderungen der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehaltes bei der Vergärung von Fruchtsäften zu Fruchtweinen sind gering und ohne eine einheitliche Tendenz (Tabelle 37). Bei den Proben, die vor der Vergärung verdünnt wurden, ist die Verdünnung für die Werte des Weines herausgerechnet worden. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Vergärung zur Herstellung eines Fruchtweines die antioxidative Kapazität des Ausgangsmaterials nicht entscheidend verändert. Fruchtwein der Früchte Sauerkirsche, schwarze Johannisbeere, rote Johannisbeere, Brombeere, die aus demselben Ausgangsobst mittels einer dreitägigen Maischegärung hergestellt wurden, unterscheiden sich von den saftvergorenen Varianten, aber ohne einheitliche Tendenz. Maischevergorene Brombeer- und Sauerkirschweine hatten eine etwas höhere antioxidative Kapazität und einen etwas höheren Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, wobei die Unterschiede bei der Brombeere am größten waren. Die maischevergorenen schwarzen und roten Johannisbeerweine hingegen besaßen eine geringere antioxidative Kapazität und einen geringeren Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, wobei die Unterschiede beim roten Johannisbeerwein gering und beim schwarzen Johannisbeerwein deutlich waren.

Tabelle 37: TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu verschiedene Fruchtsäfte bzw. -weine vor und nach der Vergärung

Frucht	Verarbeitungsschritt	TEAC-Wert [mmol/L Trolox]	Gesamtphenole [mg/L]
Sauerkirsche	Presssaft vor der Vergärung	23,2	4821
Sauerkirsche	Wein nach 1. Abstich	22,9	3555
Brombeere	Presssaft vor der Vergärung	13,2	2532
Brombeere	Wein nach 1. Abstich	12,3	2451
Rote Johannisbeeren	Presssaft vor der Vergärung	7,4	1815
Rote Johannisbeeren	Wein nach 1. Abstich	4,0	1192
Schwarze Johannisbeeren	Presssaft vor der Vergärung	32,8	5619
Schwarze Johannisbeeren	Wein nach 1. Abstich	30,6	4424
Apfel	Presssaft vor der Vergärung	4,8	1535
Apfel	Wein nach 1. Abstich	5,4	1219
Heidelbeere	Konzentratsaft vor der Vergärung	25,7	4012
Heidelbeere	Wein nach 1. Abstich	25,4	4023
Holunder	Konzentratsaft vor der Vergärung	41,9	8134
Holunder	Wein nach 1. Abstich	42,1	8145

Allerdings haben die meisten Beerenfruchtweine aufgrund der nötigen Verdünnung und Anreicherung im Vergleich zu Rotwein (11,1 mmol/L Trolox siehe 5.1.5.1. Tabelle 21) eine niedrigere antioxidative Kapazität. Ausnahmen sind Holunder- und Heidelbeerwein, deren antioxidative Kapazität deutlich über der von Rotwein liegt.

Die HPLC-Analytik der Polyphenole zeigte, dass die Gehalte der einzelnen monomeren Polyphenole während der Gärung stark abnehmen. Abbildung 77 zeigt die Abnahme der Hauptphenole der Sauerkirsche durch Vergleich von Saft und Wein (Verdünnung herausgerechnet).

**Abbildung 77:** Abnahme einzelner Polyphenole sowie der Summe der Anthocyane und der Summe der Polyphenole mittels HPLC von Sauerkirschsäften während der Vergärung zu Wein

Den höchsten Verlust an monomeren Anthocyanen durch die Gärung zeigt der Brombeerwein mit 80%. Die Abnahme beruht vermutlich auf Kondensations- und Polymerisationsreaktionen der monomeren Polyphenole im Verlauf der Gärung. Auffällig ist die besonders starke Abnahme der Anthocyane. Da die antioxidative Kapazität trotz der erheblichen Verluste an monomeren Polyphenolen konstant bleibt, kann daraus geschlossen werden, dass die aus den Monomeren entstehenden Polymere und Kondensationsprodukt ebenfalls antioxidativ wirksam sein müssen.

5.2.2.16. Herstellung eines Fruchtweinessig aus Moosbeeren

Der TEAC-Wert und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von Saft, Wein und Essig sind in Tabelle 38 aufgeführt. Die Verdünnung durch die Zuckerzugabe wurde herausgerechnet.

Tabelle 38: TEAC-Werte und Gesamtphenolgehalte von Moosbeersaft, -wein und -essig im Verlauf einer Fruchtweinessigherstellung

Verarbeitungsschritt	TEAC-Wert in mmol/L	Gesamtphenole in mg/L
Saft nach Separator t = 0 Tage	9,42	2266
nach Vergärung t = 65 Tage	7,99	2163
nach Essiggärung t = 223 Tage	8,29	1760

Während der alkoholischen Gärung nimmt die antioxidative Kapazität um ca. 15% und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu um nur ca. 5% ab. Durch die Essiggärung verändert sich die antioxidative Kapazität nicht signifikant, während der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu weiter abnimmt. Bei den einzelnen Polyphenolen kommt es während des Herstellungsprozesses zu einer starken Verminderung der monomeren Anthocyane. Im Moosbeerenessig sind schließlich nach einem Zeitraum von 7 Monaten sowie einer alkoholischen Gärung und einer Essiggärung keine monomeren Anthocyane mehr nachweisbar.

Die Gehalte der farblosen Polyphenole (exemplarisch Chlorogensäure und Protocatechusäure) ändern sich während der Essiggärung kaum. Allerdings kommt es zu einer Isomerisierung der Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure) zu Kryptochlorogensäure (4-Caffeoylchinasäure). Dieses Phänomen lässt sich gut am Polyphenolmuster eines Apfelessig aufzeigen (Abbildung 78).

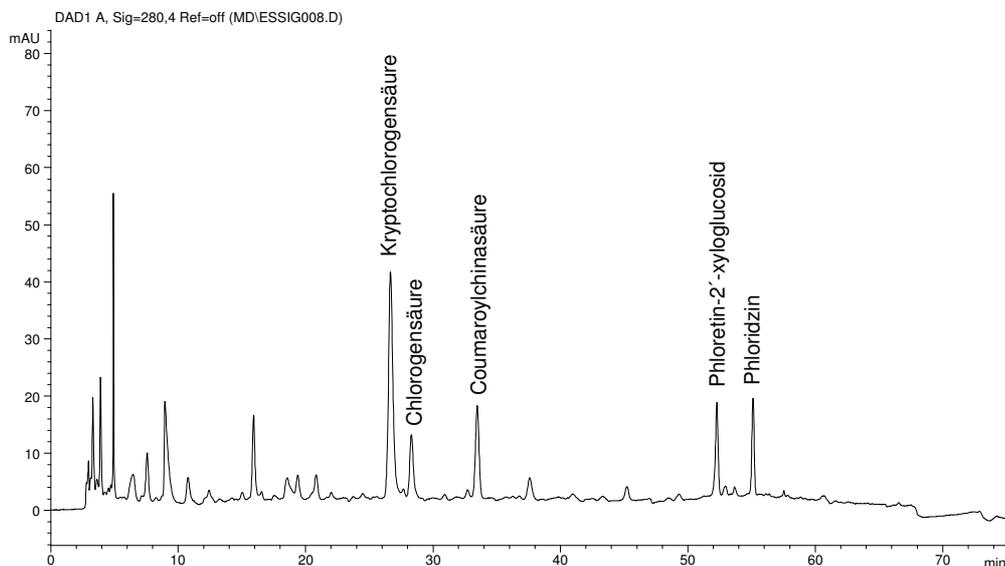


Abbildung 78: HPLC-Chromatogramm eines Apfelessig an einer Fluofix-Säule bei 280 nm

6. Diskussion

6.1. Antioxidative Kapazität

Die ABTS⁺-Methode (TEAC-Methode)

Der ABTS⁺-Radikalfänger-Test in der hier verwendeten Variante stellt ein geeignetes Mittel zur Erfassung der antioxidativen Kapazität von Getränken dar. Das angewendete Messprinzip besitzt im Vergleich zu anderen Methoden (z.B. MARCO 1968, WHITEHEAD et al. 1992, FRANKEL 1993, CAO et al. 1993, GHISELLI et al. 1994, FOGLIANO et al. 1999, MASUDA et al. 1999, NATELLA et al. 1999) zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität einen geringeren Zeit- und Materialaufwand und erlaubt daher einen höheren Probendurchsatz. Diese Vorteile kommen bei Stufenkontrollen während der Fruchtsaftherstellung zum Tragen, so dass sich die Methode zur Kontrolle des neuen Qualitätsfaktors antioxidative Kapazität in der Routine der Fruchtsaftherstellung gut eignen könnte. Die antioxidative Kapazität nach der angewendeten Methode korreliert mit dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu der Proben ($r^2 = 0,936$). Diese gute Korrelation sollte aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die beiden Methoden oft unterschiedliche Ergebnisse liefern. Zum einen sind nicht alle mit der Folin-Ciocalteu-Methode erfassten Substanzen antioxidativ wirksam, und zum anderen werden nicht alle antioxidativ wirksamen Substanzen von der Folin-Ciocalteu-Methode erfasst.

Bei vergleichenden Untersuchungen im Rahmen des AIF-Projektes wurden für Apfel- und schwarzen Johannisbeersaft ebenfalls gute Korrelationen zum LDL-Oxidationstest (siehe 2.1.8.), des einzigen sogenannten *ex vivo* Testes, gefunden. Probleme macht die Bestimmung von Proben mit einem höheren Anteil an organischen Lösungsmitteln, da diese das Metmyoglobin denaturieren und dadurch die Bildung des Ferrylmyoglobinradikals durch Wasserstoffperoxid verhindern. Eine Modifikation des Tests durch Verwendung eines anderen Oxidationsmittels zur direkten Bildung des ABTS⁺-Radikalkations könnte diese Einschränkung beheben. Mögliche Oxidationsmittel wären Kaliumpersulfat oder Mangandioxid (MILLER et al. 1996). Kaliumpersulfat wird in einer neuen Version des Testes als Oxidationsmittel zur Darstellung einer stabilen ABTS⁺-Radikalkation-Lösung verwendet, deren durch Antioxidation verursachte Farbabnahme dann bestimmt wird (RE et al. 1999). Allerdings bleibt zu beachten, dass mit dem Test nur eine bestimmte Facette der antioxidativen Kapazität (Radikalfängereigenschaften) erfasst wird (siehe 2.1.8.) und dass nur hydrophile Antioxidantien im Test eine Aktivität zeigen.

Apfelsaft

Apfelsaft gilt als vergleichsweise schlechte Quelle für antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe (MILLER und RICE-EVANS 1997, RECHNER et al. 1997, HENN und STEHLE 1998). Die ermittelten Werte für Apfelsaft mit 2,9 mmol/L Trolox für naturtrübe Handelsproben, 2,1 mmol/L Trolox für klare Handelsproben und 2,9 (0,5 – 7) mmol/L für aus verschiedenen Sorten hergestellte Apfelsäfte bestätigen diese Wertung. Berücksichtigt man den Anteil der zugesetzten L-Ascorbinsäure, sind die Werte sogar noch niedriger. Allerdings konnten durch Auswahl polyphenolreicher Mostäpfel und schonende Verarbeitung Apfelsäfte mit bisher nie erreichten antioxidativen Kapazitäten hergestellt werden (7,0 mmol/L Trolox gegenüber dem Durchschnittswert von naturtrübem Apfelsaft von 2,9 mmol/L Trolox). Dies wird als eine deutliche Qualitätsverbesserung angesehen, da zudem aus solchen Apfelsäften erstmals die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Apfelsaft und eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Serums beim Menschen durch den Konsum von Apfelsaft festgestellt werden konnte (NETZEL et al. 1999b). Die Herkunft von über der Hälfte der antioxidativen Kapazität in einem frischen Apfelpresssaft kann nicht geklärt werden. In anderen Untersuchungen zu antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen von Apfelsaft konnten sogar nur 20% der antioxidativen Kapazität auf analytisch erfassbare Komponenten des Saftes zurückgeführt werden (DEKKER et al. 1999). Vermutlich kommen die Trubpartikel und in ihnen enthaltenen oder an ihnen anhaftende antioxidativ wirksame Substanzen sowie höher polymere Polyphenole und andere antioxidativ wirksame Substanzen in der wässrigen Phase des Saftes dafür in Frage,

da der nicht erklärbare Anteil im Saft nach Separation und Schöpfung mit Gelatine/Kieselöl, also Behandlungsmaßnahmen, die genau diese beiden mutmaßlichen Quellen reduzieren, auf 32% absinkt. Dies zeigt zudem, dass die Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode auch Veränderungen in diesen Bereichen zu erfassen vermag, während die Polyphenolanalytik mittels HPLC dies nicht kann. Als wichtigstes Polyphenol für die antioxidative Kapazität im Saft erweist sich die Chlorogensäure mit einem Anteil von 15%.

Diese Ergebnisse widersprechen allerdings den Ergebnissen von MILLER und RICE-EVANS 1997, die nur 13% der antioxidativen Kapazität, die mit dem gleichen Testsystem bestimmt wurde, nicht zuordnen konnten. Auch die Anteile der einzelnen Polyphenole sind unterschiedlich. Der Grund dafür ist vermutlich die unterschiedliche Zusammensetzung der untersuchten Apfelsäfte bedingt durch Einflüsse des Herstellungsprozesses. MILLER und RICE-EVANS 1997 untersuchten einen klaren „long life apple juice“, der diverse nicht näher spezifizierte Verarbeitungsschritte hinter sich hatte, während in der vorliegenden Arbeit der frische Presssaft einer polyphenolreichen Apfelsorte untersucht wurde.

In einem anderen Test zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität besitzt Apfelsaft eine deutliche höhere antioxidative Kapazität von 7,89 mmol/L Trolox (WHITEHEAD et al. 1995), wobei allerdings nur eine Probe untersucht wurde. Grund hierfür sind die unterschiedlichen Messprinzipien der beiden Tests.

Schwarzer Johannisbeersaft

Schwarzer Johannisbeersaft besitzt mit 32,4 (25 – 40) mmol/L Trolox einen deutlich höheren Gehalt an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen als Apfelsaft. Der aus ihm hergestellte Nektar besitzt mit durchschnittlich 9,3 mmol/L für Handelsproben immer noch einen vergleichsweise hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen, was sich mit den Angaben anderer Autoren deckt (MILLER und RICE-EVANS 1997, HENN und STEHLE 1998). Der schwarze Johannisbeernektar liegt damit im Bereich von Rotwein (11,1 mmol/L Trolox im Durchschnitt). Werden Säfte aus Sorten mit einem hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen und einem moderaten Gesamtsäuregehalt zur Nektarherstellung verwendet, sind schwarze Johannisbeernektare mit antioxidativen Kapazitäten bis zu 15 mmol/L möglich. Hierbei stellt besonders der Gesamtsäuregehalt ein Problem dar, da hohen Gesamtsäuregehalten zahnschädigende Eigenschaften durch Angriff des Zahnschmelzes zugesprochen werden (HUGHES et al. 1998) und daher schwarze Johannisbeergetränke mit sehr niedrigem, „zahnschonenden“ Gesamtsäuregehalt angestrebt werden (WEST et al. 1999). Ein Verfahren zur schonenden Entsäuerung des schwarzen Johannisbeersaftes könnte hier beide Aspekte miteinander in Einklang bringen. Die Herkunft von ca. 23% der antioxidativen Kapazität in einem frischen schwarzen Johannisbeerpresssaft konnte nicht geklärt werden. Ähnlich wie beim Apfelsaft dürften höher polymere Polyphenole und andere antioxidativ wirksame Substanzen für diesen nicht zuzuordnenden Anteil in Frage kommen. Die monomeren Anthocyane des schwarzen Johannisbeersaftes stellen etwa die Hälfte der antioxidativen Kapazität. Der Anteil der L-Ascorbinsäure betrug im untersuchten Saft ca. 22% und lag im Mittel bei ca. 16% (n = 10). Im Vergleich zu Orangensaft, der einen vergleichbaren L-Ascorbinsäuregehalt mit dem Endprodukt schwarzer Johannisbeernektar hat, aber nur relativ geringe Gehalte an Polyphenolen aufweist, liefert ein schwarzer Johannisbeernektar zusätzlich zur L-Ascorbinsäure noch eine beträchtliche Menge an antioxidativ wirksamen Polyphenolen.

Auch diese Ergebnisse liegen im Widerspruch zu MILLER und RICE-EVANS 1997, die zwar einem schwarzen Johannisbeertrunk (RIBENA, TM Smith Kline Beecham) einen ähnlich großen Anteil der antioxidativen Kapazität nicht zuordnen konnten, aber den monomeren Anthocyanen nur einen Anteil von rund 5% und der L-Ascorbinsäure einen Anteil von 74% zusprachen. Grund hierfür ist ebenfalls die unterschiedliche Zusammensetzung der untersuchten Proben bedingt durch Einflüsse des Herstellungsprozesses. Die von MILLER und RICE-EVANS 1997 untersuchte Probe war ein auf einen Fruchtgehalt von 16,7% rückverdünntes Konzentrat, hinter dem diverse nicht spezifizierte Verarbeitungsschritte lagen, während in der vorliegenden Arbeit ein frischer Presssaft untersucht wurde.

Andere Beeren- und Steinobstsäfte

Die meisten Beerensäfte bzw. -nektare wie auch Steinobstsäfte und –nektare weisen eine hohe antioxidative Kapazität (TEAC-Wert > 5) auf. Eine Ausnahme bilden Beeren- und Steinobstsäfte, die nur wenig oder gar nicht rot gefärbt sind, wie beispielsweise Stachelbeersaft oder roter Johannisbeersaft. Eine kräftige rote Farbe und damit ein hoher Gehalt an Anthocyanen bedingt eine hohe antioxidative Kapazität, was sich am Spitzenreiter der untersuchten Beerensäfte, dem Holundersaft, und dem schon besprochenen schwarzen Johannisbeersaft deutlich zeigt. Beim Holundersaft liegt der Anteil der monomeren Anthocyane an der antioxidativen Kapazität, wie beim schwarzen Johannisbeersaft, bei etwa 50%, wobei der Anteil des nicht zuzuordnenden Anteils mit ca. 41% etwas höher ist. Mit diesen Werten für die antioxidative Kapazität liegen die stark rot gefärbten Beeren- und Steinobstsäfte im allgemeinen deutlich höher als die in Deutschland 1998 meist konsumierten Säfte Apfelsaft und Orangensaft (Quelle: VdF).

Die hohe antioxidative Kapazität von stark rot gefärbten Beerenfrüchten wurde auch mit einem anderen Testsystem (LDL-Oxidation) bestätigt (HEINONEN et al. 1998b).

Diese Beeren- und Steinobstsäfte stellen daher eine exzellente Quelle für antioxidativ wirksame Fruchthaltstoffe in der täglichen Ernährung des Menschen dar und sind die Alternative zum viel diskutierten Rotwein. Außerdem enthalten sie einerseits im Vergleich zum Rotwein keinen Alkohol und sind deshalb für Bevölkerungsgruppen, die keinen Alkohol zu sich nehmen wollen, dürfen oder können, konsumierbar, und enthalten andererseits zusätzlich noch teilweise beträchtliche Mengen an anderen ernährungsphysiologisch wichtigen Inhaltsstoffen wie Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente. Sie stellen die ideale Basis zur Herstellung von Getränken dar, die als „funktionelle“ Lebensmittel bezeichnet werden können, ohne Zusatzstoffen zugeben zu müssen.

6.2. Polyphenole in Apfel- und Beerensäften

Die entwickelte Methode zur Analytik der Polyphenole an einer fluorierten RP-Phase und einer Detektion mittels DAD und ECD ist für die Analytik wässriger Proben gut geeignet. Die Methode weist eine gute Reproduzierbarkeit und eine gute Trennung der Polyphenole auf, ermöglicht die gleichzeitige Analyse von Anthocyanen und anderen Polyphenolen und ist durch die Verwendung der beiden Detektionssysteme empfindlich und aussagekräftig.

Die Polyphenolanalytik mittels HPLC der Apfelsäfte ergab vergleichbare Gehalte und Verhältnisse für die wichtigsten Polyphenole gegenüber bisherigen Veröffentlichungen (RITTER et al. 1996, PICINELLI et al. 1997). Säfte aus Mostapfelsorten wiesen hohe Gehalte an monomeren Polyphenolen auf und unterschieden sich von Säften aus Tafeläpfeln außerdem noch in den Verhältnissen einzelner Polyphenole. Säfte aus Mostäpfeln enthielten mehr Phloretin-2'-xyloglucosid als Phloridzin, während Säfte aus Tafeläpfeln weniger oder etwa gleich viel Phloretin-2'-xyloglucosid als Phloridzin enthielten. Allerdings konnten viele der auftretenden kleineren Peaks in den Chromatogrammen der Apfelsäfte nicht identifiziert werden. Ebenso bleibt der Gehalte an Procyanidinen in den Säften unklar, da diese Oligo- und Polymere der Flavan-3-ole mit der benutzten Methode und anderen Methoden zur Polyphenolanalytik mittels HPLC an einer RP-Phase nicht erfasst werden können. Ihre Analytik ist aufgrund ihrer Struktur und Molekülgröße schwierig, was sich auch in aktuelleren Veröffentlichungen zu diesem Thema zeigt (GUYOT et al. 1998, HAMMERSTONE et al. 1999, ADAMSON et al. 1999, SANTOS-BUELGA und SCALBERT 2000).

Der Vergleich der festgestellten Gesamtgehalte an monomeren Anthocyanen mit den Angaben in der Literatur ergibt bei schwarzem Johannisbeersaft einen mehr als doppelt so hohen Wert von 3058 mg/L gegenüber 1450 mg/L (MORTON 1968), wobei der festgestellte Anthocyanengehalt der Säfte etwa in dem Bereich liegt, der für den Gesamtanthocyanengehalt der Beeren (1300 – 4000 mg/kg) angegeben wird (EDER 1996b, IVERSEN 1999, CLIFFORD 2000). Beim Holundersaft wird eine Übereinstimmung mit den Angaben von EDER 1996c und beim Erdbeersaft eine Übereinstimmung mit den Angaben von BAKKER et al. 1994 gefunden.

Die monomeren Hauptpolyphenole von schwarzem Johannisbeer-, Holunder-, Sauerkirsch- und Brombeersaft konnten teilweise durch Literaturvergleich identifiziert oder hypothetisch zugeordnet werden.

Bei Erdbeeren bestätigte sich die Möglichkeit der Sortendifferenzierung mittels des Anthocyanmusters (BAKKER et al. 1994). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Anthocyanmuster während der Reifung stabil ist. Das Ansteigen des Anthocyangehalt mit zunehmender Reife deckt sich mit den Angaben zum zeitlichen Verlauf der Biosynthese der Anthocyane (CHENG und BREEN 1991).

Als größte Schwierigkeit bei der Analytik der Polyphenole mittels HPLC zeigte sich das Fehlen von Reinsubstanzstandards vieler Polyphenole, was teilweise eine detailliertere Betrachtung der Veränderung einzelner Polyphenole während Prozessstudien beeinträchtigte. Viele in Früchten beschriebene Polyphenole (siehe 2.1.4. – 2.1.6.) sind kommerziell nicht erhältlich, so dass die Identifizierung und vor allem die exakte Quantifizierung vieler Polyphenole bzw. Peaks in den Chromatogrammen von untersuchten Proben nicht möglich war. So stehen bis auf wenige Ausnahmen die beschriebenen Polyphenole in schwarzer Johannisbeere, Holunder, Brombeere, Sauerkirsche, Stachelbeere nicht zur Verfügung.

Mit den entwickelten Methoden zur Isolierung einiger Hauptpolyphenole aus Apfelsaft (4-p-Coumaroylchinasäure, Phloretin-2'-xyloglucosid) und aus schwarzem Johannisbeersaft (Delphinidin-3-glucosid, Delphinidin-3-rutinosid, Cyanidin-3-rutinosid) konnten einige dieser Substanzen gewonnen werden. Die Abtrennung der Polyphenole durch Adsorption an Adsorberharzen und anschließender Elution mit Ethanol ist zudem ein interessantes Verfahren zur Herstellung konzentrierter Polyphenolextrakte aus Fruchtsäften (z.B. minderer Qualität). Die Vorbehandlung des Apfelsaftes mit Laccase/O₂ erwies sich für die Isolation der Zielsubstanzen als äußerst günstig. Zur Isolierung der einzelnen Polyphenole aus den gewonnenen Extrakten eignete sich die präparative HPLC gut, wobei allerdings die geringere Probenaufgabemenge ein Manko darstellte. Die Gelchromatographie, die wesentlich höhere Probenaufgabemenge erlaubt und früher schon zur präparativen Isolierung von Polyphenolen verwendet wurde (LEA und TIMBERLAKE 1974), könnte eine interessante Alternative zur Isolierung der einzelnen Polyphenole sein.

6.3. Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die antioxidative Kapazität und den Polyphenolgehalt

Die Polyphenole werden als Saftinhaltsstoff neu beurteilt. Sie werden nicht mehr als störender, zu entfernender Inhaltsstoff, sondern als wertgebender, zu erhaltender Inhaltsstoff betrachtet. Der Widerspruch zwischen der klassischen Lehrbuchmeinung, die die Saftstabilität und die Verminderung der Polyphenole als eine Qualitätsverbesserung in den Vordergrund gestellt hat und den neuesten Erkenntnissen zur gesundheitlichen Bewertung der Polyphenole, macht es notwendig, die Polyphenole in Getränken neu zu bewerten. Eine Folge dieser neuen Bewertung ist, den Erhalt der Polyphenole in den Getränken zu propagieren (DIETRICH 1995). Noch in der jüngeren Vergangenheit war man bei der Fruchtsaftherstellung durch Entwicklung neuer Technologien bemüht, den Gehalt an Polyphenolen wegen ihrer für die Saftqualität negativen Eigenschaften möglichst gering zu halten (LEA 1992, BINNIG 1992, MAIER 1994, RITTER 1994). Die Ergebnisse der Arbeit bieten Auswege aus diesem Dilemma. Sie liefern neue Erkenntnisse, die zur Optimierung des Polyphenolgehalt in Fruchtsäften bei der Fruchtsaftherstellung verwendet werden können. Basierend auf den Ergebnissen aus den Stufenkontrollen während der Fruchtsaftherstellung werden Empfehlungen für die Herstellung eines hochwertigen Fruchtsaftes mit guter Saftqualität und –stabilität und hoher antioxidativer Kapazität ausgesprochen.

Aus den Ergebnissen lässt sich klar schließen, dass jede Maßnahme während der Verarbeitung einer Frucht zu Fruchtsaft die antioxidative Kapazität absenkt.

Allerdings ist das Ausmaß der Absenkung durch die unterschiedlichen Verarbeitungsmaßnahmen bei der Herstellung eines Fruchtsaftes sehr verschieden.

6.3.1. Apfel

Apfelsorten

Die Untersuchungen von Apfelsäften aus verschiedenen Apfelsorten zeigen deutlich, dass die Wahl der richtigen Sorte bei dem Vorhaben ein Saft herzustellen, der einen hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Fruchtinhaltsstoffen besitzt, die wichtigste Rolle spielt. Bei Säften aus verschiedenen Apfelsorten wurden Differenzen von bis zu 500% für die antioxidative Kapazität und den Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu (1,0 mmol/L Trolox und 5,0 mmol/L Trolox bzw. 312 mg/L Catechin und 1623 mg/L Catechin) gefunden. Wie stark der Polyphenolgehalt von Apfelsäften von der Sorte abhängig sein kann, zeigen auch die Ergebnisse von PICINELLI et al 1997, die den Polyphenolgehalt von kommerziellen Säften und im Labormaßstab aus spanischen Mostapfelsorten hergestellten Säften untersuchten. In den Untersuchungen von SPANOS et al. 1990 zeigten sich bei gleicher Herstellung ebenfalls deutlich Unterschiede in den Polyphenolgehalten mittels HPLC sowie nach Folin-Ciocalteu von Apfelsäften (frischer Presssaft) aus den Sorten Red Delicious, Granny Smith, McIntosh and Spartan. Die großen Unterschiede in den Polyphenolgehalten von verschiedenen Sorten eines Obstes, die sich in den Ergebnissen widerspiegeln, zeigte HERRMANN 1992 für Beeren-, Kern- und Steinobst. Um das Ziel eines hohen Gehaltes an antioxidativ wirksamen Fruchtinhaltsstoffen im Saft zu erreichen, der deutlich über den Durchschnittswerten für trüben (2,9 mmol/L Trolox) und klaren Apfelsaft (2,1 mmol/L Trolox) aus dem Handel liegt, müssen bei der Wahl der Apfelsorte möglichst hohe Gehalte an Polyphenolen angestrebt werden. So konnte beispielsweise aus der polyphenolreichen Mostapfelsorte „Bohnapfel“ ein naturtrüber Apfelsaft hergestellt werden, der eine antioxidative Kapazität inklusive der zugesetzten L-Ascorbinsäure von 7 mmol/L Trolox aufwies. Für den Einkauf zur Apfelsaftherstellung und in Konsequenz für den Anbau von Apfelsorten bedeutet dies, eine Bevorzugung der polyphenolreichen Mostapfelsorten gegenüber den in Mode gekommenen Tafelapfelsorten, wie in einigen Publikationen unter anderen Gesichtspunkten bereits gefordert (KOLB 1989, Anonymus 1997). Trotz der deutlich höheren antioxidativen Kapazität von trübem Apfelsaft gegenüber dem klaren Saft aus dem selben Obst (Trubentfernung), kann durch die Verwendung polyphenolreicher Mostapfelsorten bei der Herstellung von klarem Apfelsaft eine höhere antioxidative Kapazität erreicht werden, als bei trüben Apfelsäften aus Tafelapfelsorten. Zwar sind auch bei Verwendung von polyphenolreichen Mostapfelsorten die antioxidativen Kapazitäten von Beerensäften und –nektaren für Apfelsaft nicht erreichbar, aber der Saft wird durch die höheren Gehalte an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen wirtschaftlich aufgewertet und das Produktimage wird verbessert.

Entsaftung und Maischebehandlung

Die größten Verluste an antioxidativer Kapazität und Polyphenolen, die potentiell in der Apfelfrucht enthalten sind, treten bei der Entsaftung der Apfelmaische auf. Ein frischer Presssaft, mit einem Dekanter entsaftet, weist nur 43% der möglichen Polyphenolausbeute und 32% der möglichen Ausbeute an antioxidativ wirksamen Substanzen auf. Zum einen verbleibt ein Teil der Polyphenole in der wässrigen Phase des Tresters und ist adsorbtiv an die Feststoffteilchen des Tresters gebunden, und zum anderen sind einige Polyphenole (z.B. Phloridzin, Quercetinderivate) und höher polymere Polyphenole, vor allem die Procyanidine, schlecht wasserlöslich und gehen nicht in den Saft über. Die Apfelfrucht weist sehr hohe Gehalte an oligo- und polymeren Procyanidinen auf (LEA 1979, MAYR et al. 1996, WILSKAJESZKA und PODSÊDEK 1996, GUYOT et al. 1998, LAZARUS et al. 1999). Der Einfluss der Wasserlöslichkeit der Polyphenole auf den Übergang in den Saft zeigt sich auch beim Vergleich des Polyphenolmusters, wobei die beiden Phloretin-2'-glykoside, Phloridzin (Phloretin-2'-glucosid) und Phloretin-2'-xyloglucosid, exemplarisch betrachtet werden sollen. Der Anteil des Phloridzins, das mit einem Monosaccharid glykosidisch verbunden ist, am Polyphenolmuster ist im ethanolischen Maischeextrakt doppelt so hoch wie im Saft, während der Anteil des besser wasserlöslichen Phloretin-2'-xyloglucosids, das mit ein Disaccharid glykosidisch verbunden ist, etwa gleich bleibt. Wird die Maische erwärmt, erhöht sich die Löslichkeit der schlecht wasserlöslichen Polyphenole und führt damit zu einem Anstieg des Gehaltes an Polyphenolen, wie von LEA und TIMBERLAKE 1978, SPANOS et al. 1990 und

SCHOLS et al. 1991 beschrieben. Mit dem Polyphenolgehalt steigt dann ebenfalls die antioxidative Kapazität des Saftes. Allerdings nimmt auch die Bitterkeit und Adstringenz des Saftes zu (LEA und TIMBERLAKE 1978). Generell wird Apfelsaft, der aus einer erwärmten Maische hergestellt wurde, sensorisch als fehlerhaft und untypisch beschrieben (ZIMMER 1996).

Ein weiterer Einflussfaktor für den Übergang der Polyphenole aus der Apfelfrucht in den Saft ist die Maischevorbehandlung und das verwendete Entsaftungssystem. Bei einer Standzeit wie auch einer Maischeerwärmung ist Apfelmaische vielfältigen enzymatischen Umsetzungen und physikalischen Veränderungen ausgesetzt (NAGEL 1992, ZIMMER 1996). Daher ist man bei der Fruchtsaftherstellung bestrebt, eine möglichst kurze Standzeit der Maische zu erreichen (BINNIG 1992, NAGEL 1992). Es zeigt sich jedoch, dass die positiven Effekte der Zellauflösung durch den Abbau fruchteigener Pektinasen während einer Maischestandzeit und die dadurch bedingte bessere Extrahierbarkeit der Polyphenole aus der Maische, die negativen Effekte der enzymatischen und nicht-enzymatischen Oxidation während der Standzeit und die dadurch bedingten Verluste an Polyphenolen, mehr als aufwiegen. Trotz des Verlustes an antioxidativer Kapazität durch die Oxidation von etwa 30% (siehe 5.2.1.6.) ist die Steigerung der Extraktion der Polyphenole (Gesamtphenolgehalt) bei einer Maischestandzeit von etwa 100% so groß, dass insgesamt eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Presssaftes um etwa 50% herauskommt. Hier zeigt sich auch der methodische Unterschied zwischen einer Extraktion der Maische mit Ethanol, die in ihrer Effektivität durch die enzymatischen Veränderungen in der Maische nicht beeinflusst wird, und einem Entsaftungsverfahren, das durchaus von den Prozessen in der Maische beeinflusst wird. Eine Maischestandzeit von max. 1 Stunde bei der Apfelsaftherstellung aus frischen Äpfeln erbringt eine höhere antioxidative Kapazität des Presssaftes und beeinflusst die Saftqualität nicht negativ, da sich die mit Maischestandzeit hergestellten Säfte trubstabil und sensorisch fehlerlos zeigten. Eine Erhitzung der Apfelmaische auf 60°C für dreißig Minuten verhindert die enzymatische Oxidation, da bei dieser Temperatur die fruchteigenen Polyphenoloxidasen inaktiviert werden (WALKER 1964). Außerdem kommt es in der Maische zu einer Thermoplasmodese, zu einer thermisch bedingten Aufplatzen der Zellen, wodurch die Polyphenole freigesetzt und bei der Entsaftung besser extrahiert werden. Dadurch und durch die erhöhte Löslichkeit schlecht wasserlöslicher Polyphenole bei höheren Temperaturen wird ein höherer Polyphenolgehalt im Saft erreicht, was sich mit den Untersuchungen von SPANOS et al. 1990 deckt. Zudem besitzt der Saft bei einer Maischeerhitzung ein komplexeres Polyphenolmuster. Höhere Temperaturen bedingen eine Inaktivierung aller in der Maische enthaltenen Enzyme (SPANOS et al. 1990) und führen ebenfalls zu dem Effekt der Zellauflösung durch Thermoplasmodese, verursachen aber einen starken thermisch induzierten Abbau von Polyphenolen. Die Erhitzung der Maische auf 60°C für 30 min scheint aufgrund der erhöhten Polyphenolabgabe und der Inaktivierung der Polyphenoloxidasen günstig zu sein, führt aber zu sensorisch inakzeptablen Säften (ZIMMER 1996). Durch eine Erhitzung des frischen Presssaftes auf 55°C konnte ebenfalls eine Inaktivierung der Polyphenoloxidasen erreicht und der Abbau von Polyphenolen im Verlauf des weiteren Herstellungsprozesses bis zur KZE verhindert werden.

Bei der Herstellung eines trüben Apfelsaftes sollte der Presssaft aber auf 80 - 90°C erhitzt werden, um alle fruchteigenen Enzyme (inkl. Pektinasen) zu inaktivieren, und anschließend sofort wieder stark heruntergekühlt werden (KZE des Presssaftes), um weitere thermische Schädigungen des Saftes zu unterbinden. Bei der Herstellung von klarem Apfelsaft kann die Temperatur des Presssaftes (50 - 60°C durch die Inaktivierung) für die nötige Enzymierung des Saftes zum Pektinabbau genutzt werden, der bei den zu erwartenden Temperaturen von ca. 40 - 50°C erheblich schneller stattfindet als bei einem nicht erhitzten Saft (10 - 20°C). Die Maische- oder Presssafterhitzung ist eine alte Technik zur Verhinderung der Oxidation von Apfelsaft und wurde schon unter verschiedenen Zielsetzungen, z.B. Trubstabilisierung, Bräunungsvermeidung, Verhindern von Nachtrübungen, empfohlen (WUCHERPENNIG et al. 1990, NAGEL 1992, BINNIG 1992, GENOVESE et al. 1997).

Die industriellen Entsaftungssysteme, Horizontal Bucherpresse und Dekanter, ergeben bei Verwendung der gleichen, nicht enzymierten Maische, trotz der wesentlich schnelleren Entsaftung durch den Dekanter, ähnliche Ergebnisse bezüglich antioxidativer Kapazität und

Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu. HAMATSCHEK und NAGEL 1993 finden bezüglich des Gesamtphenolgehaltes vergleichbare Ergebnisse. Bei dem Versuch wurde der Dekanter nicht mit Schutzgas belegt oder ummantelt, wie dies zur Vermeidung von Oxidation vorgeschlagen wird (NAGEL 1992), und die Maische wurde nur einmal entsaftet (einstufiges Verfahren). Der Luftertrag beim Mahlen, dem Transport der Maische und der Entsaftung selbst scheinen im Versuch für den Dekanter und die Horizontal Bucherpresse trotz der erheblich schneller Entsaftung durch den Dekanter vergleichbar zu sein. Die unterschiedlich hohen Gehalte an monomeren Polyphenolen bei den beiden Entsaftungssystemen sprechen bei keiner oder einer kurzen Standzeit der Maische für den Dekanter und bei einer längeren Standzeit für die Horizontalpresse. Warum sich die unterschiedlich hohen Gehalte an monomeren Polyphenolen in den Säften der beiden Entsaftungssysteme im Gesamtphenolgehalt und der antioxidativen Kapazität nicht widerspiegeln, kann nur spekuliert werden, hängt aber vermutlich mit den verschiedenen Entsaftungsprinzipien zusammen.

Standzeiten des Saftes während der Herstellung

Apfelsaft verliert bei Standzeiten im Herstellungsprozess durch die Aktivität der fruchteigenen Polyphenoloxidasen deutlich an antioxidativer Kapazität. Diese Abnahme zeigt sich vor allem bei den monomeren Polyphenolen, da beispielsweise die Chlorogensäure durch im Saft vorhandene Polyphenoloxidasen oxidiert wird, und das entstandene Chlorogensäurechinon durch die nicht enzymatische, gekoppelte Oxidation andere Polyphenole zu oxidieren vermag (siehe auch 2.1.3.). Alle Versuche, diese Aktivität durch Erhitzung der Maische oder des Saftes zu unterbinden, waren erfolgreich. Als günstigstes Verfahren stellte sich die oben beschriebene Maischeerhitzung auf ca. 60°C für etwa 30 min und die Erhitzung des frischen Presssaftes auf ca. 55°C dar. Wegen der zu erwartenden sensorischen Mängel des Saftes bei der Maischeerhitzung kommt allerdings nur die Erhitzung des frischen Presssaftes in Frage. Durch die Behandlungen wurden die Polyphenoloxidasen inaktiviert und die antioxidative Kapazität wie auch der Gehalt an Polyphenolen blieben nach einer längeren Standzeit konstant. Aufgrund der hohen Aktivität von Polyphenoloxidasen in den meisten Apfelsorten (NICOLAS et al. 1994, WILSKA-JESZKA und PODSÉDEK 1996) ist eine Inaktivierung durch Erwärmung des frischen Presssaftes während der Herstellung von Apfelsaft zum Erhalt der antioxidativen Kapazität notwendig.

Zugabe von L-Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel

Die Zugabe von L-Ascorbinsäure zum frischen Presssaft erhöht die antioxidative Kapazität, allerdings nicht in dem Maße, wie es die zugegebene Menge erwarten lässt. Ein großer Teil der L-Ascorbinsäure wird verbraucht, was bedeutet, dass sie im Saft vorliegende, eventuell bei der Herstellung entstandene Substanzen reduziert und dabei selbst oxidiert wird. Dies zeigt sich optisch in der deutlichen Aufhellung des Saftes nach der Zugabe der L-Ascorbinsäure. So steigen die Gehalte an monomeren Polyphenolen nach der Zugabe an. Das Phänomen der Rückbildung von einzelnen Polyphenolen beruht auf der Reduktion von im Saft vorliegenden Chinonen der Polyphenole durch die L-Ascorbinsäure, die dadurch verbraucht wird.

Der Anteil der L-Ascorbinsäure an der antioxidativen Kapazität von Apfelsaft kann je nach Zugabemenge beträchtlich sein. Bei Handelsproben lag dieser Anteil bei trüben Apfelsäften zwischen 17 und 55 % mit ein Mittel von immerhin 42%. Aus naturtrüben Apfelsäften mit einem L-Ascorbinsäuregehalt von 14 bzw. 38 mg/L, die im Rahmen des AIF-Projektes hergestellt wurden, konnte die Aufnahme von über 90% der gegebenen Dosis L-Ascorbinsäure beim Menschen nachgewiesen werden.

Die Zugabe der L-Ascorbinsäure kann nicht nur unter dem Aspekt der Produktqualität und –stabilität, sondern auch zum Erreichen einer höheren antioxidativen Kapazität befürwortet werden, zumal eine hohe Aufnahme von L-Ascorbinsäure positive Effekte auf die menschliche Gesundheit und im speziellen auf Risikofaktoren für Herz- und Kreislauferkrankungen hat (HEMILÄ 1992, RATH 1992).

Apfelsafttrub

Über die Zusammensetzung von Apfelsafttrub sind in den letzten Jahren neue Erkenntnisse gewonnen worden (ZIMMER 1996). Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Apfelsafttrub eine verhältnismässig hohe antioxidative Kapazität besitzt. Bei einem Gewichtsanteil von 3 – 5%Gew (Schleudertrub) hat er einen Anteil von 30% an der antioxidativen Kapazität des trüben Saftes. Die antioxidative Wirksamkeit des Trubes beruht vermutlich zum großen Teil auf in Wasser schlecht lösliche, höher molekulare Polyphenole mit hoher antioxidativer Kapazität, z.B. oligomere oder polymere Procyanidine, die an die Trubteilchen adsorptiv oder chemisch gebunden sind. Schon die bei der Apfelsaftherstellung notwendige Entfernung des Grobtrubes durch den Separator führt mit etwa 15 – 20% zu einer deutlichen Abnahme der antioxidativen Kapazität, verringert aber auch deutlich die Geschwindigkeit der Bräunung des Saftes, die als ein Indikator für oxidative Prozesse im Saft angesehen werden kann. Diese Abnahme entspricht etwa 50 – 70% der oben beschriebenen Abnahme bei Entfernung des gesamten Trubes. Der mittlere Polyphenolgehalt von Apfelsafttrub wurde mit 18,5% bestimmt, wobei der Anteil höher molekularer Procyanidine etwa 20 – 60% betrug (ZIMMER 1996). Auch andere in den Trubteilchen enthaltenen Stoffe, wie Peptide, Fette, Fettbegleitstoffe, Carotinoide, Polysaccharide etc. (ZIMMER 1996), könnten eine antioxidative Kapazität besitzen. Seine Entfernung bedingt daher eine deutliche Abnahme der antioxidativen Kapazität des Saftes. Unter dem Gesichtspunkt einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität ist dies ein klares Argument für den trüben Apfelsaft.

Das bestätigt der Produktvergleich klarer Apfelsaft gegen trüben Apfelsaft, bei dem der trübe Saft klar im Vorteil ist, da er nicht nur wegen des Trubanteils, sondern auch wegen dem höheren Polyphenolgehalt, der schnelleren und schonenderen Herstellung und dem zulässigen und notwendigen Zusatz von L-Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel, eine deutlich höhere antioxidative Kapazität besitzt.

Saftklärung

Zur Herstellung von klarem Apfelsaft, der immer noch den Hauptteil des in Deutschland konsumierten Apfelsaftes stellt, müssen neben dem Trub auch noch gelöste höher polymere Polyphenole entfernt werden, die zu Nachtrübungen führen können (NAGEL 1985, SIEBERT 1999). Das beste Verfahren zur schonenden Klärung eines Fruchtsaftes ist die klassische Schönung mit Gelatine. Alle anderen Verfahren, wie Ultrafiltration mit anschliessender Stabilisierung mit PVPP (45 – 55%) oder Adsorberharz (55 – 65%) und die Behandlung des trüben Saftes mit Laccase/O₂ mit anschliessender Ultrafiltration (60 – 70%), verringern die antioxidative Kapazität und den Polyphenolgehalt erheblich stärker als die Gelatineschönung (25 – 35%). RITTER 1996 findet ähnliche Ergebnisse für die Abnahme an Polyphenolen durch die vier Behandlungsmittel zur Herstellung von klarem Apfelsaft. Vor allem die Ultrafiltration an verschiedenen Membranmaterialien mit oder ohne Verbindung von Behandlungsmaßnahmen des filtrierten Saftes wird als ein alternatives Verfahren zur Herstellung angesehen (CONSTENLA und LOZANO 1995, MANGAS et al. 1997, GOKMEN et al. 1998, ALVAREZ et al. 1998, GIRARD und FUKUMOTO 1999, ZARATE-RODRIGUEZ et al. 2000). Die möglichst effiziente Entfernung der Polyphenole wird dabei als positiv angesehen (MANGAS et al. 1997, GOKMEN et al. 1998, GIRARD und FUKUMOTO 1999). Ein weiterer Vorteil der Gelatine-Schönung ist die gezielte Entfernung der höher polymeren Polyphenole, während die monomeren Polyphenole, die keine Trübungen verursachen (LEA und TIMBERLAKE 1978, HEATHERBELL 1984, SIEBERT 1999), mit der Gelatine nicht reagieren und im Saft verbleiben. Zudem besitzt ein mit Gelatine geschönter Apfelsaft eine ausreichende Nachtrübungsstabilität auch im Vergleich mit ultrafiltriertem Säften (CONSTENLA und LOZANO 1995, RITTER 1996). Wenn also ein klarer Apfelsaft hergestellt werden soll, ist unter dem Aspekt des bestmöglichen Erhaltes der antioxidativen Kapazität des Presssaftes die klassische Schönung mit Gelatine die Methode der Wahl.

Pasteurisation und Wärmeeinwirkung

Die notwendige Pasteurisation des Saftes mittels KZE zeigte keinen messbaren Effekt in den Parametern antioxidative Kapazität und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu. Die

beiden festgestellten Phänomene der deutlichen Erhöhung der einzelnen Polyphenole, wie auch der Erhöhung des reductometrischen L-Ascorbinsäuregehaltes und die damit verbundene Aufhellung des Saftes nach der Pasteurisation mittels KZE, wurde auch von SPANOS et al. 1990 bei frischem Presssaft festgestellt. Die Ergebnisse widersprechen allerdings den von HERNANDEZ et al. 1997 beschriebenen Abnahmen der Gehalte einzelner Polyphenole nach Wärmebehandlung (120°C, 20 min und 105°C, 45s). Die Autoren finden eine deutliche Reduktion nach beiden Behandlungen, wobei speziell die Flavan-3-ole nach einer Wärmebehandlung nicht mehr nachweisbar sind. Erstaunlicherweise ist die Reduktion nach der kurzen Wärmebehandlung bei 105°C wesentlich geringer als bei der längeren Behandlung von 20 min bei der höheren Temperatur von 120°C. Die Autoren führen dies auf eine „Aktivierung“ von Enzymen durch die kurze Wärmebehandlung zurück. Grund für diese erheblichen Unterschiede in den Ergebnissen könnten in der Herstellung des untersuchten Saftes liegen. Die Autoren benutzten einen Haushaltsensaft, keine Separation und keine L-Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel. Daher könnte der beschriebene Effekt durch die Reaktion der monomeren Polyphenole mit den Trubpartikeln (Oxidation durch Enzyme, Adsorption etc.) gefolgt von einem Ausfallen der in der Wärme präzipitierenden Partikel liegen, zudem der Saft in einem nicht geschlossenen System (keine Limitierung des Sauerstoffs) erhitzt wurde. Dies ist aber bei der KZE sowie der Flaschenpasteurisation weitgehend der Fall. Aufgrund der Herstellungsweise des Saftes, die äußerst praxisfern ist, werden die Ergebnisse als unrealistisch angesehen.

Der in der vorliegenden Arbeit gefundene Effekt beruht vermutlich auf in der Wärme entstehende Reduktone, die sowohl die im Saft vorhandene L-Dehydroascorbinsäure als auch, ähnlich wie die L-Ascorbinsäure selbst, die durch oxidative Prozesse entstandenen Chinone der Polyphenole wieder zu reduzieren vermögen. Weiterhin werden wahrscheinlich durch die Wärmeeinwirkung zuvor gebundene Polyphenole oder reduktiv wirksame Substanzen freigesetzt. Eine längere Wärmeeinwirkung auf Apfelsaft stützt die Annahme über die Rolle von durch Wärmeeinwirkung entstehenden Produkten, da hier die antioxidative Kapazität des Saftes ansteigt, aber der Gesamtphenolgehalt sinkt. Die Verringerung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu könnte ihre Ursache in der thermisch bedingten Kondensation und Polymerisation von Polyphenolen und anderen Saftinhaltsstoffen haben. Diese sind zwar antioxidativ wirksam, werden aber von der Methode nicht erfasst, so dass sich auch der Anstieg der monomeren Polyphenole nicht in der Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu niederschlägt. Allerdings ist bei längerer Wärmeeinwirkung in einem offenen System, wie etwa bei einem Konzentrationsprozess, eine Umkehrung des Effektes zu erwarten. Diese Vermutung bestätigt sich bei der Untersuchung von aus Konzentrat hergestellten Säften, in denen keine Flavan-3-ole mehr nachweisbar waren, wie von HERNANDEZ et al. 1997 in ihren Experimenten beschrieben. Die bei längerer Wärmeeinwirkung im Saft entstehenden Produkte aus Zuckern, Eiweißen und eventuell auch Polyphenolen, wie Maillard-Produkte oder Reduktone, scheinen antioxidativ wirksam zu sein (ANESE et al. 1996, PISCHETSRIEDER et al. 1998, MONTI et al. 1999), und zwar in stärkerem Maße als die monomeren Polyphenole allein, was das leichte Ansteigen der antioxidativen Kapazität erklären könnte. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität eines im Handel erhältlichen Zuckerkulörs, dessen tiefschwarze Farbe auf Maillard-Produkte von Zucker zurückzuführen ist, war ein weiterer Beleg für diese Vermutung. Im Gegensatz zu einer Zuckerlösung, die keine antioxidative Kapazität besitzt, hatte der Zuckerkulör eine antioxidative Kapazität von extrem hohen 273 mmol/L Trolox. Ähnliche Mechanismen könnten für die scheinbare Erhöhung des L-Ascorbinsäuregehaltes bei einer reductometrischen Bestimmung (Erfassung entstandener Reduktone) nach einer Pasteurisation verantwortlich sein. Ob diese bei Wärmeeinwirkung entstehenden und im verwendeten Testsystem antioxidativ wirksamen Substanzen auch eine antioxidative Wirkung im biologischen System besitzen, ist bisher nicht geklärt.

Längere Hitzeeinwirkung führte zwar zu einer leichten Erhöhung der antioxidativen Kapazität, verschlechterte aber die Produktqualität durch Bräunung (LOZANO und IBARZ 1997) und Trubdestabilisierung erheblich. Die KZE ist die schonendste und geeignetste Methode.

Lagerung

Während der Lagerung kommt es zu weitreichenden Veränderungen im Saft, was sich an einer zunehmenden Bräunung und bei trübem Apfelsaft zusätzlich in einer steigenden Instabilität des Trubes zeigt. Die meisten Untersuchungen zur Lagerung von Apfelsaft fokussieren auf den Anstieg der Bräunung und die Stabilität des Trubes bzw. das Auftreten von Trübungen nach einer bestimmten Behandlung des Saftes (CONSTENLA und LOZANO 1995, ALVAREZ et al. 1996, GAO et al. 1997, BEVERIDGE 1997, GOKMEN et al. 1998). Diese Bräunung während der Lagerung folgt nach IBARZ et al. 1992, bestimmt durch die Messung der Extinktion bei 440 nm, einer Kinetik 0. Ordnung (linearer Anstieg der Bräunung mit der Zeit), während die Bildung des Bräunungsindikator HMF (5-Hydroxymethylfurfural) einer Kinetik 1. Ordnung (exponentieller Anstieg mit der Zeit) folgt. Bei klarem Apfelsaft verändert sich die antioxidative Kapazität auch bei einer Lagerung unter extremen Bedingungen nicht signifikant, obwohl der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu wie auch die Gehalte der monomeren Polyphenole deutlich abnehmen. Beim trüben Saft ist zwar eine deutliche Abnahme festzustellen, die aber vermutlich nur auf das Ausfallen des ebenfalls antioxidativ wirksamen Trubes zurückzuführen ist. Die Ergebnisse in Bezug auf die antioxidative Kapazität entsprechen den Lagerungsversuchen von MILLER et al. 1995, die bei der Lagerung von Apfelsaft ohne L-Ascorbinsäure ebenfalls einen konstanten Wert für die antioxidative Kapazität fanden und bei Apfelsaft mit L-Ascorbinsäurezusatz eine Abnahme der antioxidativen Kapazität, die mit der Abnahme der L-Ascorbinsäure im Saft korrelierte. Die deutliche Reduktion der Polyphenole im Verlauf der Lagerung bestätigt die Ergebnisse von SPANOS et al. 1990, die nach einer neunmonatigen Lagerung von Apfelsaft bei 25°C eine Abnahme der Hydroxycimtsäuren um 36%, der Phloretinderivate um 60% und einen völlig Verlust der Procyanidine feststellten. Um so mehr erstaunt trotz der extremen Lagerbedingungen und die darausfolgende deutliche Abnahme der Polyphenole im Saft die Konstanz der antioxidativen Kapazität beim klaren Apfelsaft. Dies ist vermutlich auf ähnliche Phänomene zurückzuführen, wie die Erhöhung der antioxidativen Kapazität beim längeren Erhitzen des Apfelsaftes (Kondensation und Polymerisation der Polyphenole etc.). Die während der Lagerung unter anderem entstehenden Maillard- und Bräunungsprodukte weisen wahrscheinlich eine antioxidative Kapazität auf (ANESE et al. 1996), die die Verluste an einzelnen Polyphenolen und deren antioxidativer Kapazität zu kompensieren vermögen. Des Weiteren kommt es während der Lagerung durch eine langsame Oxidation zu Kondensations- und Polymerisationsreaktionen der Polyphenole untereinander. Diese Polymere besitzen eventuell eine höhere antioxidative Kapazität als die Summe ihrer einzelnen Bausteine, was ebenfalls ein Grund für die Konstanz der antioxidativen Kapazität sein könnte.

Ob derartige durch Erhitzung oder längere Lagerung im Apfelsaft entstehenden antioxidativ wirksamen Substanzen, z. B. Maillardprodukte, höher polymere oder kondensierte Polyphenole, auch im biologischen System antioxidativ wirksam sind, ob sie überhaupt bioverfügbar und wenn ja, auch im Organismus eine antioxidative Wirkung entfalten, bleibt noch zu klären.

Schlußfolgerungen

Zur Herstellung eines Apfelsaftes mit einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität bei guter Saftqualität und –stabilität kommt als Endprodukt nur trüber Apfelsaft in Frage. Basierend auf den Untersuchungsergebnissen wird folgendes Herstellungsschema für trüben und klaren Apfelsaft vorgeschlagen (Diagramm 4):

Der naturtrübe Apfelsaft ist zudem in Hinblick auf Geschmack (BINNIG 1992, NAGEL 1992) und Verträglichkeit (HOEKSTRA et al. 1995) dem klaren Apfelsaft vorzuziehen.

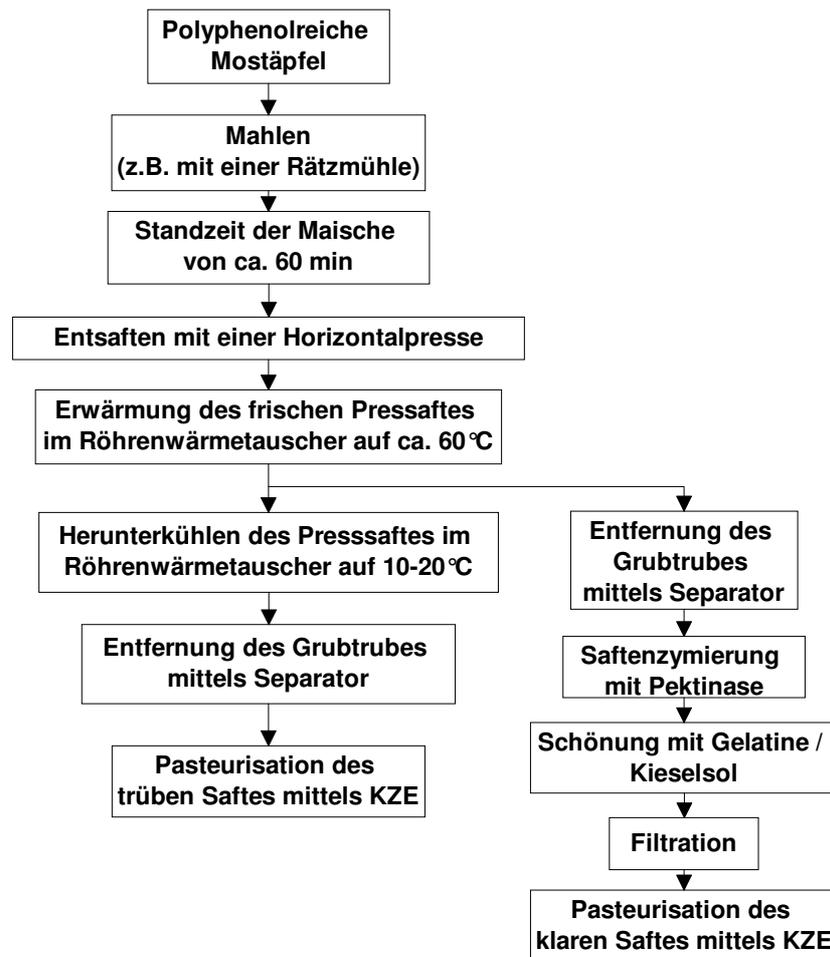


Diagramm 4: Herstellungsschema für trüben und klaren Apfelsaft unter dem Aspekt der Erhaltung einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität

6.3.2. Schwarze Johannisbeere

Generell ist anzumerken, dass sich der schwarze Johannisbeersaft während der Herstellung als stabiler und weniger anfällig für Veränderungen erweist als Apfelsaft. Grund hierfür könnte einerseits die Schutzfunktion der L-Ascorbinsäure sein, und andererseits die Inaktivierung fruchteigener Polyphenoloxidasen durch die Maischeerhitzung im Zuge der Maischeenzymierung. Zudem ist der Saft wegen seines hohen Polyphenol- und L-Ascorbinsäuregehaltes, auch nach der nötigen Verdünnung zum Nektar, eine deutlich bessere Quelle für antioxidativ wirksame Substanzen als der Apfelsaft. Bei den Bioverfügbarkeitsstudien im Rahmen des AIF-Projektes konnte sowohl der Aufnahme der Anthocyanglykoside wie auch der L-Ascorbinsäure aus einem schwarzem Johannisbeersaft, der hohe Gehalten an diesen antioxidativ wirksamen Substanzen besaß, in den menschlichen Organismus nachgewiesen werden.

Schwarze Johannisbeersorten

Die Säfte aus verschiedenen Johannisbeersorten unterscheiden sich bei gleicher Herstellung teilweise recht deutlich. Die antioxidative Kapazität variiert zwischen 25 und 40 mmol/L (Mittelwert 32,4 mmol/L Trolox). Der zweite wichtige Faktor zur Nektarherstellung der Gesamtsäuregehalt schwankt zwischen 34 g/L und 41 g/L berechnet als Citronensäure. Zur Herstellung eines genießbaren Nektars mit einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität sind ein möglichst hoher Fruchtgehalt und ein möglichst hoher Gehalt an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen, Polyphenole und L-Ascorbinsäure, notwendig. Für den

Johannisbeermuttersaft bedeutet dies, einen niedrigen Gesamtsäuregehalt und hohe Gehalte an Polyphenolen und L-Ascorbinsäure. Für zwei Nektare, die auf einen Gesamtsäuregehalt von 10 g/L eingestellt werden, hat derjenige Nektar aus einer Sorte die diese Vorgaben gut erfüllt, wie etwa Ben Lomond, eine 50% höher antioxidative Kapazität als derjenige Nektar aus einer Sorte, etwa Titania, die diese Vorgaben weniger gut erfüllt. Ein zu hoher Gesamtsäuregehalt muss dabei allerdings unter zahnmedizinischen Gesichtspunkten als kritisch angesehen werden (HUGHES et al. 1998, WEST et al. 1999). Die Wahl der richtigen Sorte ist auch beim schwarzen Johannisbeersaft bzw. dem genießbaren Produkt schwarzer Johannisbeernektar am wichtigsten für das Ziel einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität.

Herstellungsprozess

In einem Herstellungsprozess von Entsaftung (Horizontalpresse) der enzymierten Maische über Separation zur Pasteurisation mittels KZE betragen die Verluste von antioxidativer Kapazität, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und L-Ascorbinsäuregehalt nur zwischen 2 und 10%, während der Farbwert bei 520 nm/cm um 24% erheblich stärker abnimmt. Die Verluste werden hauptsächlich durch die Separation des Saftes verursacht. Der Farbverlust spiegelt sich allerdings nicht in den Gehalten der monomeren Anthocyane wider, die wiederum bei der KZE eine erheblich stärkere Abnahme zeigen als die anderen Parameter, was auf deren starke Wärmeempfindlichkeit zurückgeführt wird (EDER 1996a, CLIFFORD 2000). Wie beim Apfelsaft wird die antioxidative Kapazität durch eine Pasteurisation mittels KZE nicht signifikant verändert.

Dass der Gehalt der monomeren Anthocyane bis zur KZE relativ konstant ist und sogar ansteigt, kann einerseits auf den Oxidationsschutz durch die L-Ascorbinsäure und andere Polyphenole und andererseits auf die kontinuierliche Freisetzung von monomeren Anthocyanen aus Zellfragmenten durch im Saft weiterhin tätige Pektinasen zurückgeführt werden. Der Grund für den Farbverlust kann daher nicht bei den monomeren Anthocyanen liegen, sondern bei polymerisierten und kondensierten Anthocyanen und Anthocyanderivaten. Über die Wechselwirkungen von Anthocyanen und L-Ascorbinsäure in schwarzen Johannisbeerprodukten, die bei diesem Phänomen sicherlich eine Rolle spielen, ist bereits mehrfach berichtet worden (MORTON 1968, SKREDE et al. 1992, EDER 1996a, IVERSEN 1999).

Bei der Bewertung der prozentual geringeren Verluste an antioxidativer Kapazität und Polyphenolen beim schwarzen Johannisbeersaft und auch den nachfolgenden stark rotgefärbten Fruchtsäften im Vergleich zum Apfelsaft ist zu beachten, dass diese Säfte erheblich höhere Gehalte an antioxidativ wirksamen Substanzen haben, so dass gleiche oder höhere Verluste als absoluter Wert (z.B. -1 mmol/L Trolox) einen wesentlich geringeren prozentual Verlust ergeben als beim Apfelsaft.

Entsaftung und Nachextraktion

Die Ausbeute an antioxidativer Kapazität und Polyphenolen ist bei der Entsaftung von Johannisbeermaische deutlich höher als beim Apfelsaft. Bei der antioxidativen Kapazität ist die Ausbeute fast doppelt so hoch. Dies liegt zum einen an der Erwärmung der Maische und der Zugabe von pektinabbauenden Enzymen, was zu einer verbesserten Extraktion der Polyphenole durch die enzymbedingte Zellauflösung (DONGOWSKI und BOCK 1987) führt. Zum anderen sind die antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe der schwarzen Johannisbeere, die Polyphenole, speziell die Anthocyane, und die L-Ascorbinsäure, besser wasserlöslich als die antioxidativ wirksamen Substanzen des Apfels, was außerdem durch die Entsaftung bei höherer Temperatur noch begünstigt wird. Beispielsweise liegen Anthocyane bei dem im Saft herrschenden pH-Wert (pH \sim 3) zum Teil kationisch (Flavyliumkation siehe 2.1.1.) vor und sind daher sehr gut wasserlöslich. Die Maischeerwärmung und -enzymierung ist daher auch unter dem Aspekt der Saftausbeute und der Extraktion antioxidativ wirksamer Polyphenole empfehlenswert. Zudem werden wahrscheinlich durch die Temperatur von 55°C über 60 min auch fruchteigene Polyphenoloxidasen inaktiviert.

Bei der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft ist die Extraktion des Tresters üblich. Es konnte gezeigt werden, dass beträchtliche Menge Polyphenole im Nachextrakt enthalten sind, allerdings in einer anderen Zusammensetzung als im Presssaft.

Durch die Zuführung der relativ gesehen höheren Menge farbloser Polyphenole zu einem schwarzen Johannisbeersaft bei der Vereinigung mit dem Nachextrakt zu schwarzem Johannisbeer-Muttersaft nimmt der Anteil der farblosen Polyphenole gegenüber den Anthocyanen zu. Aufgrund der Stabilisierung der Anthocyane und Erhöhung der Farbintensität durch die farblosen Polyphenole mittels Copigmentierung (MAZZA und BROUILLARD 1987, MACCARONE und PASSERINI 1990, LIAO et al. 1992, WILSKAJESZKA und KROZUCHOWSKA 1996a, CLIFFORD 2000) wird die Praxis der Nachextraktion im Hinblick auf die Produktqualität befürwortet, obwohl die antioxidative Kapazität des Muttersaftes (Presssaft + Nachextrakt) gegenüber dem Presssaft abfällt.

Trubentfernung (Separation und Schönung)

Die Separation verursacht beim schwarzen Johannisbeersaft eine geringere Abnahme der antioxidativen Kapazität als beim Apfelsaft. Dies beruht auf der im Verhältnis zum Trub höheren Konzentration der in der wässrigen Phase gelösten antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe im schwarzen Johannisbeersaft. Der Anteil des Trubes an der antioxidativen Kapazität von Beerensäften ist geringer als beim Apfelsaft. Unterschiede in der Zusammensetzung des Trubes könnten ebenfalls eine Rolle spielen.

Auch die Schönung mit Gelatine zeigt einen geringeren Effekt (-5%) als beim Apfelsaft, was auf dieselben Gründe zurückzuführen ist. Ein weiterer Vorteil der Gelatine-Schönung ist die Erhaltung der Farbe der Beerensäfte, was sich unter anderem daran zeigt, dass die Gehalte an monomeren Anthocyanen durch die Gelatine nicht verändert werden, was sich mit anderen Untersuchungen deckt (HEATHERBELL 1984). Andere mögliche Behandlungsmittel, wie PVPP und Bentonit, haben diesen Vorteil nicht und führen zudem zu einer stärkeren Abnahme der antioxidativen Kapazität. Sie finden allerdings auch in der Praxis der schwarzen Johannisbeersaftherstellung keine Verwendung. Bei anderen in der Literatur vorgenommenen Schönungen von farbigen Beerensäften mit Gelatine (ROMMEL et al. 1992, EDER 1996c) wurde zusätzlich noch Bentonit eingesetzt, was die dort beschriebene Abnahme von Farbe und Anthocyanengehalt verursacht.

Die Gelatine-Schönung ist zur Herstellung eines klaren schwarzen Johannisbeersaftes eine geeignete und schonende Methode.

Konzentratherstellung

Die Herstellung von Konzentrat verursacht, wenn der Ausgangssaft und der aus dem Konzentrat hergestellte Saft bei gleicher Dichte verglichen werden, keine Veränderung der antioxidativen Kapazität. Allerdings hat der Saft aus Konzentrat eine deutlich geringere Farbintensität und weist eine erhebliche Abnahme in den Gehalten an monomeren Polyphenolen, insbesondere Anthocyanen, auf. Die Anthocyane gehen besonders stark wärmeinduzierte Polymerisations- und Kondensationsreaktion ein, was zu dem Farbverlust im Saft aus Konzentrat führt. Der gebundene Zucker scheint eine wichtige Rolle für die Stabilität des Anthocyanglykosids zu spielen. Die Anthocyanrutoside sind stabiler als die Anthocyanoglucoside. Als Vergleichsdaten zur Stabilität der Anthocyane im schwarzen Johannisbeersaft soll die Abnahme der einzelnen Anthocyane bei Lagerungsversuchen dienen. Bei Lagerversuchen von schwarzen Johannisbeersäften fand TAYLOR 1989 ähnliche Ergebnisse, während in neueren Untersuchungen zur Stabilität von Anthocyanen bei der Lagerung nur geringfügige (EDER 1996a) oder gar keine (IVERSEN 1999) Unterschiede in der Stabilität der einzelnen Anthocyane des schwarzen Johannisbeersaftes gefunden wurden, wobei EDER 1996a eine unterschiedlich starke Abhängigkeit der Stabilität der einzelnen Anthocyane von der Temperatur fand. Die Abnahme der Anthocyane folgte dabei einer Kinetik 1. Ordnung.

Die Abnahme durch den Konzentrierungsprozess ist ähnlich hoch wie bei einer sechsmonatigen Lagerung von schwarzem Johannisbeernektar bei 20°C (IVERSEN 1999). Die Konstanz der antioxidativen Kapazität zeigt allerdings, dass bei den durch Hitze- und Sauerstoffeinwirkung bedingten Reaktionen der Anthocyane mit anderen Substanzen zwar

die Farbe verloren geht, aber ihre antioxidative Kapazität nicht. Allerdings bleibt zu bedenken, dass über die Bioverfügbarkeit wie auch die antioxidative Wirkung im biologischen System höher polymerer Polyphenole nichts bekannt ist. Daher wird die starke Reduktion der monomeren Anthocyane durch den Konzentrationsprozess als negativ angesehen und nicht für die Produktion von schwarzem Johannisbeernektar empfohlen. Hierfür ist der Direktsaft die deutlich bessere Basis. Es ist sehr wahrscheinlich, dass höhermolekulare Polyphenole schlechter bioverfügbar sind als niedermolekulare Polyphenole. Allerdings ist über die Rolle des gastro-intestinal Traktes, in dem eine Spaltung der höherpolymeren Polyphenole möglich wäre, kaum etwas bekannt. Der saure Magensaft könnte ein möglicher Ort für eine Spaltung solcher polymerer Substanzen sein, wie es für Procyanidine bereits nachgewiesen wurde (SPENCER et al. 2000).

6.3.3. Holunder

Holundersaft ist eine ausgezeichnete Quelle für antioxidativ wirksame Substanzen. Sein Vorteil im Vergleich zu allen anderen stark rot gefärbten Fruchtsäften liegt zudem in seinem geringen Gesamtsäuregehalt, der es erlaubt, den Saft unverdünnt zu sich zu nehmen, wobei das eigenwillige Aroma des Holunders Geschmackssache ist. So werden mit einem Glas frisch hergestelltem Holundersaft (0,2 L) etwa 1,5 g Polyphenole aufgenommen. Das die Anthocyane des Holundersaftes bioverfügbar sind, ist bereits berichtet worden (MIYAZAWA et al. 1999a, NETZEL 1999a). In einigen neueren Untersuchungen über die Bioaktivität und den Metabolismus von Anthocyanen wurden Extrakte des Holunders wegen des hohen Gehaltes an Anthocyanen verwendet (MIYAZAWA et al. 1999a, YODIM et al. 2000)

Herstellungsprozess

Holundersaft zeigt sich während des Herstellungsprozesses ähnlich stabil wie schwarzer Johannisbeersaft. Von Entsaftung (Horizontalpresse) über Separation bis zur Pasteurisation mittels KZE liegen die Verluste an antioxidativer Kapazität, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Farbwert E 520 nm/cm zwischen 8 und 12%. Die Gehalte der monomeren Anthocyane nehmen während des Herstellungsprozesses stark ab (-28%), was sich aber nicht in ähnlichem Maß im Farbwert E 520 nm/cm (-8%) widerspiegelt. Grund hierfür könnte die im Vergleich zum schwarzen Johannisbeersaft fehlende Wechselwirkung mit der L-Ascorbinsäure sein. Die monomeren Anthocyane reagieren im Holundersaft zu höher molekularen Derivaten, die scheinbar eine stärkere Farbtintensität als die Monomere besitzen.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit den Ergebnissen der Untersuchung über die Anthocyanverluste bei Herstellung von Holundernektar EDER 1996c ist wegen des unterschiedlichen Prozessschema, der anderen Bezugsgröße (die frischen Holunderbeeren) und der ausschließlichen Betrachtung der Anthocyane schwierig, stimmen aber in der Tendenz etwa überein, wenn der hohe Anteil der Anthocyane am Gesamtphenolgehalt und der antioxidativen Kapazität (ca. 50%) berücksichtigt wird.

Der außerordentlich hohe Polyphenol- und Anthocyanengehalt des Holundersaftes macht ihn zu einer ausgezeichneten Quelle ebendieser Substanzen in der menschlichen Ernährung.

Lagerung

Nach einer längeren Lagerung im Stahltank nehmen die antioxidative Kapazität, der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu wie auch die Gehalt der einzelnen Polyphenole ab. Die Abnahme von antioxidativer Kapazität wie auch Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu beruht zum Teil, ähnlich wie beim trüben Apfelsaft, auf einem Ausfallen von Trub aus dem Saft, der nur separiert und nicht geschönt war.

Besonders stark bei den monomeren Polyphenolen ist die Abnahme der Chlorogensäure, während sich die Gehalte der Quercetin-3-glykoside kaum verändern. Diese starke Abnahme der Chlorogensäure könnte durch eine Reaktion mit den Anthocyanen bedingt sein, was aber nur eine vage Hypothese ist. Es ist bekannt, dass die Chlorogensäure mit Anthocyanen Copigmentierungsreaktionen eingeht (WILSKA-JESZKA und KROZUCHOWSKA 1996), also

den im Holundersaft in großer Menge vorhandenen Anthocyanen durch die molekulare Nähe durchaus auch für andere Reaktionen zur Verfügung stehen könnte. Die Gehalte der beiden monomeren Hauptanthocyane nehmen unterschiedlich stark ab, wobei der Verlust des Cyanidin-3-glucosid im Verhältnis deutlich höher ist als der Verlust an Cyanidin-3-sambubiosid. Diese Unterschiede in der Stabilität der beiden Anthocyane decken sich mit Untersuchungsergebnissen anderer Autoren (EDER 1996c, YOAV et al. 1996). Auch der bestimmte Verlust der Summe aller monomeren Anthocyane (-17%) stimmen ungefähr mit den Daten von EDER 1996c überein, wobei dort die prozentuale Abnahme nicht auf den Gehalt an monomeren Anthocyanen im eingelagert Saft, sondern auf den Gehalt an monomeren Anthocyanen in den Beeren berechnet wurde.

5.3.4. Brombeere

Die antioxidative Kapazität und der Polyphenolgehalt von Brombeersaft sind erheblich niedriger als die der bereits diskutierten Beerensäfte, aber immer noch deutlich höher, auch als Endprodukt Brombeernektar, als die entsprechenden Werte von Apfelsaft.

Herstellungsprozess

Brombeersaft ist während des Herstellungsprozesses von Entsaftung (Horizontalpresse) über Separation zur Pasteurisation mittels KZE weniger stabiler als die beiden zuvor diskutierten Beerensäfte. Die Verluste an antioxidativer Kapazität, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Farbwert E 520 nm/cm und der Gehalt an monomeren Polyphenolen, der im Falle des Brombeersaftes mit dem Gehalt an monomeren Anthocyanen identisch ist, liegen um die 20%. Die Abnahme der Anthocyane, die auch die Hauptursache für die Abnahme der anderen Parameter zu sein scheint, begründet sich wie beim Holundersaft eventuell auf das weitgehende Fehlen des Oxidationsschutzes durch L-Ascorbinsäure und das Fehlen von anderen monomeren farblosen Polyphenolen, die die Anthocyane im Brombeersaft durch Copigmentierung zu stabilisieren vermögen. Auf die geringe Stabilität der Anthocyane im Brombeersaft weisen auch die Ergebnisse bei der Herstellung und Lagerung von Brombeersaft und –wein von ROMMEL et al. 1992 hin.

Schönung

Die Schönung mit Gelatine beeinflusst die antioxidative Kapazität und den Polyphenolgehalt nur geringfügig (-5%). Vor allem der Farbwert E 520 nm/cm und die Gehalte an monomeren Polyphenolen (Anthocyanen) werden durch die Schönung nur sehr geringfügig bzw. gar nicht verändert. Wie beim schwarzen Johannisbeersaft ist die Gelatine-Schönung zur Herstellung eines klaren Brombeersaftes eine geeignete und schonende Methode.

6.3.5. Sauerkirsche

Die antioxidative Kapazität und der Polyphenolgehalt von Sauerkirschsafte liegen etwa im Bereich des Brombeersaftes. Wie die Untersuchung von Sauerkirschnektaren aus dem Handel zeigt, ist die antioxidative Kapazität im Endprodukt Sauerkirschnektar durch den im Durchschnitt höheren Fruchtgehalt (bis 60%) etwa mit der von schwarzem Johannisbeernektar vergleichbar.

Herstellungsprozess

Während eines Herstellungsprozesses von Entsaften der gequetschten Kirschen (Horizontalpresse) über Separation und Pasteurisation mittels KZE betragen die Verluste von antioxidativer Kapazität, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und dem Farbwert E 520 nm/cm um die 15%. Damit ist der Sauerkirschsafte während des Herstellungsprozesses etwas stabiler als Brombeersaft, aber weniger stabil als schwarzer Johannisbeersaft und Holundersaft. Eine Pasteurisation des frischen Presssaftes wäre eventuell zur Reduktion der Verluste während der Herstellung zu empfehlen, da bei der Herstellung des

Sauerkirschsafte keine Erwärmung der Maische und damit teilweise Inaktivierung fruchteigener Polyphenoloxidasen vorgenommen wird. Der Sauerkirschsaft oder -nektar stellt wie die meisten stark farbigen Säfte eine gute Quelle für Polyphenole in der menschlichen Ernährung dar.

6.3.6. Stachelbeere

Die antioxidative Kapazität und der Polyphenolgehalt von Stachelbeersaft, ein nicht stark rotgefärbter Beerensaft, sind deutlich niedriger als bei den untersuchten stark rotgefärbten Beerensäften Holunder, schwarze Johannisbeere und Brombeere. Die Werte liegen etwa im Bereich von Apfelsaft.

Herstellungsprozess

Über den gesamten Herstellungsprozess zum pasteurisierten Stachelbeernektar in der Flasche beträgt der Verlust an antioxidativer Kapazität über 70%. Der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu nimmt weniger stark um etwa 40% ab. Grund hierfür könnte die bereits beschriebene Diskrepanz zwischen der Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu und der Bestimmung der antioxidativen Kapazität sein. Die größten Verluste verursachen die Schönung mit Gelatine inklusive der Standzeit über Nacht und die beiden Filtrationen. Die Verluste bei der Schönung werden nur zum Teil auf die Gelatine selbst jedoch hauptsächlich auf die Oxidation im Verlauf der Standzeit über Nacht zurückgeführt. Die hohen Verluste während der Prozessführung zeigen wie wichtig eine zügige Herstellung und die Beachtung bzw. Verhinderung von Oxidationsvorgängen zur Produktion eines unter den hier angewendeten Gesichtspunkten qualitativ hochwertigen Getränkes ist.

6.3.7. Fruchtweine

Nimmt man die antioxidative Kapazität der verbrauchsfertigen Fruchtweine, ergibt sich folgende Reihenfolge mit absteigender antioxidativer Kapazität: Holunderwein aus Konzentrat (40,1 mmol/L Trolox) > Heidelbeerwein aus Konzentrat (23,4 mmol/L Trolox) > Brombeerwein aus Konzentrat (12,1 mmol/L) > schwarzer Johannisbeerwein aus Konzentrat (9,7 mmol/L Trolox) > Sauerkirschwein (9,2 mmol/L Trolox) > schwarzer Johannisbeerwein (7,0 mmol/L Trolox) > Brombeerwein (6,1 mmol/L Trolox) > Apfelwein aus Mostobst (5,4 mmol/L Trolox) > roter Johannisbeerwein aus Konzentrat (3,9 mmol/L Trolox) > Apfelwein aus Konzentrat (1,4 mmol/L Trolox) > roter Johannisbeerwein (1,2 mmol/L Trolox).

Die Ergebnisse stimmen teilweise und in der Tendenz mit den Ergebnissen von HEINONEN et al. 1998a überein, wobei die Autoren ein anderes Testsystem zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität verwendeten.

Bis auf den Holunder- und den Heidelbeerwein liegt die antioxidative Kapazität aller Fruchtweine unter der von Rotwein, aber über der von Weißwein, wobei der Holunderwein eine mehr als doppelt so hohe antioxidative Kapazität als die Spitzenreiter unter den Rotweinen (18 mmol/L Trolox) besitzt.

Die Unterschiede zwischen Fruchtweinen aus Konzentrat und aus frischem Presssaft bei der gleichen Frucht liegen an den geringeren Gesamtsäuregehalte der rückverdünnten Konzentratsäfte bzw. Weine bei vergleichbarem Gesamtphenolgehalt, so dass die verbrauchsfertigen Fruchtweine einen höheren Fruchtgehalt aufwiesen und damit eine höhere antioxidative Kapazität.

Unter dem Aspekt der antioxidativen Kapazität stellen nur der Holunder- und der Heidelbeerwein eine Alternative zum Rotwein dar.

Vergärung

Während der alkoholischen Gärung verändert sich die antioxidative Kapazität und der Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu kaum. Im Polyphenolmuster zeigen sich allerdings deutlich Veränderungen. Die Gehalte aller monomeren Polyphenole nehmen stark (30 –

50%) ab, wobei die Abnahme der Anthocyane besonders stark ist (> 40%). Die Veränderung der Gehalte an monomeren Polyphenolen während der alkoholischen Gärung wurden bisher hauptsächlich für Rotwein untersucht (NAGEL und WULF 1979, GAO et al. 1997), wobei beachtet werden muss, dass Rotwein üblicherweise mittels einer längeren Maischegärung hergestellt wird. ROMMEL et al. 1992 geben die Verluste an Anthocyanen bei Brombeerwein im Vergleich zum Brombeersaft mit 79% - 100% an, was sich mit den festgestellten Ergebnissen bei Brombeerwein (80 – 85%) deckt, wobei die Abnahme beim maischevergorenen Brombeerwein noch etwas höher ausfällt (85%) als beim saftvergorenen Brombeerwein. Der Unterschied in der Abnahme der monomeren Anthocyane bei der Vergärung von Sauerkirschein (40 - 45%) und Brombeerwein (80 – 85%) hat vermutlich zwei Hauptgründe. Zum einen der im Vergleich zu Brombeersaft und –wein hohe Gehalt des Sauerkirschsafte und –weines an farblosen monomeren Polyphenolen. Die farblosen monomeren Polyphenole, wie z.B. Chlorogensäure, vermögen die Anthocyane durch Copigmentierung zu stabilisieren (WILSKA-JESZKA und KROZUCHOWSKA 1996), so dass ihre Abbaurate bei der Vergärung im Vergleich zu den „schutzloseren“ Anthocyanen im Brombeersaft verringert wird. Zum anderen ist die Art und Position des gebundenen Zucker bzw. der gebundenen Zucker wichtig für die Stabilität von Anthocyanglykosiden während der Vergärung von Fruchtweinen (TSUKUI et al. 1996). Die Verluste der monomeren Polyphenole sind auf Kondensations- und Polymerisationsreaktionen während der alkoholischen Gärungen zurückzuführen (BAKKER et al. 1986, FRANCIA-ARICHA et al. 1997, GAO et al. 1997).

Dass sich die deutlichen Verluste an monomeren Polyphenolen kaum in der antioxidativen Kapazität und dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu widerspiegeln, lässt den Schluss zu, dass die bei der Gärung gebildeten Polymerisations- und Kondensationsprodukte ebenfalls antioxidativ wirksam sind. Aber auch hier kann der sehr hohe Verlust an monomeren Polyphenolen, speziell Anthocyanen, im Hinblick auf Bioverfügbarkeit und mögliche *in vivo* Effekte als negativ angesehen werden. Daher ist der Saft dem entsprechenden Wein vorzuziehen, auch wenn im Falle von kommerziell Apfelwein und Apfelsaft, der Wein eine im Durchschnitt deutlich höhere antioxidative Kapazität aufweist.

6.3.8. Bedeutung der Ergebnisse für die Herstellung von Fruchtsaft

Aus den Ergebnissen der Veränderung der antioxidativen Kapazität und des Polyphenolgehaltes bei den verschiedenen untersuchten Herstellungsprozessen für Fruchtsäfte lassen sich fünf grundlegende Thesen für die Herstellung eines Fruchtsaftes mit einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität ableiten:

1. Die Wahl der richtigen, polyphenolreichen Rohware, da diese die Grundlage für eine hohe antioxidative Kapazität im späteren Produkt darstellt.
2. Eine Erhitzung des frischen Presssaftes zur Inaktivierung fruchteigener Polyphenoloxidasen.
3. Möglichst wenig Prozessschritte für die Herstellung eines Fruchtsaftes oder –nektars, da jeder Prozessschritt die antioxidative Kapazität des Fruchtsaft verringert.
4. Ein zügiger und logistisch gut durchdachter Herstellungsprozess, um unnötige Standzeit des Fruchtsaftes, die eine Verringerung der antioxidativen Kapazität durch Oxidation verursachen, möglichst zu vermeiden.
5. Vermeidung von Prozessschritten und Behandlungsmaßnahmen, die eine starke Abnahme der antioxidativen Kapazität verursachen.

Bei Berücksichtigung dieser Thesen kann die antioxidative Kapazität bei der Herstellung von Fruchtsäften erhöht und das in der Frucht enthaltene Potential an antioxidativer Kapazität besser in den Fruchtsaft transferiert und erhalten werden. Dies bedeutet eine deutliche Aufwertung von Fruchtsaft als gesundes Lebensmittel.

Die Entwicklung eines Antioxidansgetränktes auf der Basis polyphenolreicher Beerensäfte zeigt, dass mit Fruchtsäften Produkte mit einer höher antioxidative Kapazitäten als beim Vergleichsmaßstab Rotwein erreicht werden können. Solche Säfte sind sozusagen natürliche „funktionelle“ Lebensmittel ohne Zusatzstoffe.

6.4. Wirtschaftliche Bedeutung der Ergebnisse

Die Fruchtsaftindustrie erhält durch die Ergebnisse die Möglichkeit, die aktuellen Erkenntnisse über die antioxidativen und gesundheitspräventiven Wirkungen von Polyphenolen in der Praxis der Getränkeherstellung umzusetzen. Die Bedeutung der Polyphenole als Fruchtinhaltsstoffe sollte in der Fruchtsaftindustrie zukünftig mehr unter dem Aspekt ihrer positiven Eigenschaften, ihren positiven Wirkungen auf die menschliche Gesundheit, betrachtet werden. Das Image der Polyphenole muss sich weg vom geduldeten Problemstoff hin zum wertgebenden Inhaltsstoff entwickeln.

Es konnten für den in Deutschland meistgetrunkenen Apfelsaft, der eine vergleichsweise niedrige antioxidative Kapazität besitzt, Wege und Möglichkeiten zu Erhöhung und Erhaltung der antioxidativen Kapazität erarbeitet werden. Aber besonders Beerensäfte erhalten unter dem Aspekt des antioxidativen Potentials durch die Ergebnisse eine neue positive Bedeutung und sollten in der Zukunft als hochwertiges Naturprodukt betrachtet werden und mehr Verwendung finden. Beerensäfte sind die geeignete Basis zur Entwicklung neuartiger Getränke mit besonderer Berücksichtigung der antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe. Derartige Getränke könnten zudem interessante sensorische und optische Eigenschaften aufweisen. Hiervon können gerade kleine und mittelständische Herstellerbetriebe profitieren, die wegen ihrer Größe flexibler auf neue Entwicklungen reagieren und wegen kleiner Verarbeitungsmengen leichter durch Auswahl der Rohware Einfluss auf die Zusammensetzungen des Endproduktes nehmen können. Die Verbesserung des gesundheitlichen Nutzen von Fruchtsäften führt, wenn der Verbraucher richtig informiert wird (Werbung), sicherlich zu einem Umsatzzuwachs, da weite Bevölkerungskreise schon aus Bekömmlichkeitsgründen daran interessiert sind, dass gesundheitsprophylaktisch wichtige Fruchtinhaltsstoffe bei der Saftverarbeitung erhalten werden. Das große Marktpotential von Produkten mit einem gesundheitlichem Zusatznutzen, den sogenannten „Wellness-Produkte“ oder von „Functional Food“, wird in vielen Marktanalysen hervorgehoben (Quellen: Informationsschriften der Firmen Wild AG, Haarmann und Reimer AG, H.K.K.W. Trendbüro Hamburg, Anonymus 1998). Ein Getränk, das reich ist an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen, kann mit Sicherheit als „Wellness-Produkt“ oder „Functional Food“ bezeichnet werden.

Der Ansatz des Forschungsprojektes bietet die Möglichkeit, andere Früchte und vor allem Gemüse als Quelle für bioaktive Wirkstoffe, nicht nur Polyphenole, zu entdecken und zu untersuchen. Gerade Gemüse mit seinen vielfältigen bioaktiven Wirkstoffen ist eine interessante Herausforderung. Um Gemüse und seine bioaktiven Wirkstoffe trinkbar und für einen breiteren Konsumentenkreis attraktiv zu machen, bedarf es wegen mangelnder Erfahrung mit der Verarbeitung der meisten Gemüse noch intensiver Versuchsarbeiten zu den Möglichkeiten der Verfahrenstechnologie. Aus einem Gemüseprodukt mit neuen interessanten Eigenschaften könnten z. B. in Verbindung mit Fruchtsaft oder anderen Getränken völlig neuartige Getränke entwickelt werden.

7. Zusammenfassung:

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch Stufenkontrollen bei der Herstellung von Fruchtsäften zu klären, welchen Einfluss klassische und moderne Verfahrenstechnologien auf die antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe von Apfel- und Beerensäften haben. Bei diesen antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen handelt es sich in Fruchtsäften hauptsächlich um die komplexe Stoffgruppe der Polyphenole, der viele positive Effekt auf die menschliche Gesundheit nachgesagt werden. Neben der Verfahrenstechnik der Fruchtsaftherstellung werden der Einfluss der Sorte, des Reifezustandes und der Lagerung auf die antioxidative Kapazität und die Polyphenole im Fruchtsaft untersucht. Die wichtigsten antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe in Apfel- und Beerensäften sind die Polyphenole und bei einigen Beerensäften die L-Ascorbinsäure, vor allem beim schwarzen Johannisbeersaft. Die beiden hauptsächlich untersuchten Fruchtsäfte Apfel- und schwarzer Johannisbeersaft werden exemplarisch ausgewählt, da sie sich deutlich im Spektrum und Gehalt der Polyphenole sowie im L-Ascorbinsäuregehalt und im Herstellungsprozess unterscheiden. Weiterhin werden Stufenkontrollen bei der Herstellung von Holunder-, Brombeer-, Stachelbeer- und Sauerkirschsaft sowie bei der Herstellung von Fruchtweinen vorgenommen und die Veränderung von antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen bei der Reifung von Erdbeeren untersucht.

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in wässrigen Proben wurde der ABTS⁺-Radikalkationen-Test verwendet, der den Anforderungen entsprechend modifiziert wurde. Fehlerquellen der Bestimmung konnten erkannt und beseitigt werden. Das angewendete Messprinzip besitzt zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität einen geringen Zeit- und Materialaufwand und erlaubt daher einen hohen Probendurchsatz.

Eine neue Methode zur Analytik der Polyphenole mittels HPLC an einer fluorierten RP-Phase und einer Detektion mittels DAD und ECD wurde entwickelt. Die Methode weist eine gute Reproduzierbarkeit und eine gute Trennung der Polyphenole auf, ermöglicht die gleichzeitige Analyse von Anthocyanen und anderen Polyphenolen und ist durch die Verwendung der beiden Detektionssysteme empfindlich und aussagekräftig.

Drei Anthocyane aus schwarzem Johannisbeersaft und zwei Polyphenole aus Apfelsaft, die kommerziell nicht erhältlich sind, konnten isoliert werden.

Es konnten klare Aussagen über die Einflüsse der Verarbeitungstechnik auf die antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerensäften getroffen werden. Anhand der Ergebnisse können Empfehlungen für das Erhalten und Erreichen einer möglichst hohen antioxidativen Kapazität und die Optimierung des Polyphenolgehalt bei der Herstellung von Apfel- und Beerensäften ausgesprochen werden. Es zeigt sich grundsätzlich, dass Beerensäfte aufgrund der hohen Polyphenolgehalte eine deutlich bessere Quelle für Antioxidantien in der menschliche Ernährung sind, als Apfelsäfte mit vergleichsweise eher geringen Polyphenolgehalten. Als wichtigste Einflussgröße zum Erreichen einer hohen antioxidativen Kapazität im Endprodukt zeigte sich die Wahl der Rohware. Verschiedene untersuchte Apfel- bzw. schwarze Johannisbeersorten unterscheiden sich teilweise erheblich in ihren Gehalten an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen. Bei der Herstellung von Apfelsaft wurden die Einflüsse auf die antioxidative Kapazität von Maischestandzeit, Entsaftung, fruchteigener Polyphenoloxidasen, industriellen Entsaftungssystemen, Separation, thermischer Belastung, Lagerung, Schönung mit Gelatine, Ultrafiltration, der Stabilisierung von ultrafiltriertem Saft mit PVPP oder Adsorberharz und Laccase/O₂-Behandlung mit anschließender Ultrafiltration untersucht und bewertet. Bei der Entsaftung werden nur 32% der antioxidativen Kapazität und 43% der Polyphenole von der Fruchtmaische in den Saft transferiert, was einen erheblichen Verlust darstellt. Es zeigte sich, dass eine Maischestandzeit von max. 1 Stunde oder eine Maischeerhitzung auf 60°C die Ausbeute an antioxidative wirksamen Substanzen deutlich erhöhen. Horizontalpresse und Dekanter ergaben bei der Entsaftung der gleichen Maische ähnliche Werte für die antioxidative Kapazität, unterschieden sich aber trotz ähnlichem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu in den Gehalten an monomeren Polyphenolen. Bezogen auf den frischen Presssaft wurden bei der Herstellung von naturtrübem Apfelsaft ein Verlust an antioxidativer Kapazität und einzelnen Polyphenolen durch Separation und Oxidation von 20 – 40% festgestellt. Die drei Verfahren zur Herstellung von stabilem klarem

Apfelsaft in Verbindung mit der Ultrafiltration zeigten hohe Verluste an antioxidativer Kapazität von 45 – 75% und waren der klassischen Gelatine-Schönung mit Verlusten von 25 - 40% unterlegen. Bei der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft wurden die Einflüsse auf die antioxidative Kapazität von Entsaftung, Separation, thermischer Belastung, Schönung mit Gelatine, Behandlung mit PVPP oder Bentonit und Konzentratherstellung untersucht und bewertet. Bei allen untersuchten Verarbeitungsschritten zur Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft lag die prozentuale Abnahme der antioxidativen Kapazität und der Polyphenole um 10 – 15% und damit geringer als beim Apfelsaft. Die Maischeerwärmung und –enzymierung erweist sich als günstig, da die Extraktion der Polyphenole verbessert wird und durch die Temperatur fruchteigene Polyphenoloxidasen inaktiviert werden. Holunder-, Brombeer- und Sauerkirschsafft zeigt sich während der Herstellung ähnlich stabil (prozentuale Abnahmen < 20%). Auch bei diesen stark rot gefärbten Säften ist die Schönung mit Gelatine die günstigste Methode zur Klärung des Saftes. Höhere Gehalte an antioxidativ wirksamen Substanzen und der dadurch bedingte geringere Einfluss einer mengenmäßig gleichen Abnahme sowie eine geringere Aktivität von fruchteigenen Polyphenoloxidasen sind der Grund für diesen Unterschied zwischen den untersuchten stark rot gefärbten Säften und dem Apfelsaft.

Thermische Belastung verändert die antioxidative Kapazität trotz Abnahme von Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und den Gehalten an monomeren Polyphenolen nicht. Als Grund hierfür wird vermutet, dass sowohl durch Wärmeeinwirkung entstehende polymere oder kondensierte Polyphenole, wie auch bei längerer Wärmeeinwirkung im Saft entstehende Produkte aus Zuckern, Eiweißen und eventuell auch Polyphenolen, wie Maillard-Produkte oder Reduktone, eine hohe antioxidative Kapazität besitzen.

Die Lagerung verringert die antioxidative Kapazität von trübem Apfelsaft und trübem Holundersaft vor allem durch das Ausfallen des Trubes, verändert sich bei klarem Apfelsaft aber nicht, obwohl deutlich Veränderungen bei den Polyphenolen festgestellt werden. Dafür werden ähnliche Gründe wie bei Wärmeeinwirkung angenommen.

Bei der Herstellung von Fruchtweinen verändert sich während der Vergärung die antioxidative Kapazität kaum, während die Gehalte an monomeren Polyphenolen stark absinken. Die bei der Vergärung entstehenden Kondensations- und Polymerisationsprodukte müssen daher eine mit der Summe der monomeren Bausteinen vergleichbare antioxidative Kapazität aufweisen.

Unter Berücksichtigung der Bioverfügbarkeit ist ein Verlust an monomeren Polyphenolen durch Behandlungsmaßnahmen oder eine Vergärung, auch wenn keine Abnahme der antioxidativen Kapazität beobachtet wird, als negativ zu beurteilen und daher zu vermeiden. Speziell die thermische Belastung sollte daher so gering wie möglich gehalten werden.

Basierend auf den Ergebnissen konnten klare Empfehlungen für die Herstellung von Fruchtsäften mit möglichst hoher antioxidativer Kapazität und einem hohen Gehalt an monomeren Polyphenolen ausgesprochen werden:

1. Die Wahl der richtigen, polyphenolreichen Rohware.
2. Eine Erhitzung des frischen Presssaftes zur Inaktivierung fruchteigener Polyphenoloxidasen
3. Möglichst wenig Prozessschritte für die Herstellung eines Fruchtsaftes oder –nektars,
4. Ein zügiger und logistisch gut durchdachter Herstellungsprozess, um unnötige Standzeit des Fruchtsaftes möglichst zu vermeiden.
5. Vermeidung von Prozessschritten und Behandlungsmaßnahmen, die eine starke Abnahme der antioxidativen Kapazität verursachen.

Es konnte die Möglichkeit zur Entwicklung eines Antioxidansgetränkes auf Basis von Beerensäften aufgezeigt werden.

Die Fruchtsaftinhaltsstoffe Polyphenole wurden auf eine neue Art betrachtet und ihre Veränderungen im Herstellungsprozess beurteilt. Die Ergebnisse können der Fruchtsaftindustrie zur Hinterfragung von Herstellungsprozessen im Hinblick auf die antioxidative Kapazität und zur Entwicklung neuartiger Produkte in Richtung „Antioxidansgetränk“ dienen.

8. Summary:

The objective of the work is the determination of the influence of modern and classic processing techniques on the antioxidant constituents in apple and berry juices by stepwise control during the production process of the fruit juices. Those antioxidant constituents in fruit juices are mainly represented by a group of compounds called polyphenols, which meant to have many positive effect on human health. Further determinations are performed about the influence of the variety, the ripeness and juice storage on the antioxidative capacity of the fruit juices. The most important antioxidative compounds in apple and berry juices are the polyphenols and in some berry juices L-ascorbic acid especially in blackcurrant. Apple and blackcurrant juice were chosen because of their great differences in amount and spectra of polyphenols, the amount of L-ascorbic acid and the production process. Stepwise control in the production of elderberry, blackberry, gooseberry and sour cherry juice are also carried out. The changes in antioxidative capacity and the contents of antioxidative compounds are also determined during fruit wine production and the ripening of strawberry.

The antioxidative capacity was performed by the ABTS⁺-radicalcation-assay which was modified to meet the present demands. Methodological sources of error could be detected and were eliminated. The used principle of measurement for evaluating the antioxidative capacity is fast and effective.

A new method for the analysis of polyphenols by HPLC was developed using a fluorinated RP-phase and Diode-Array-Detection (DAD) and Electrochemical-Detection (ECD). A good separation of the single polyphenols, simultaneous analysis of colourless polyphenols and anthocyanins and a sensitive and informative detection using two detection systems were achieved.

Three anthocyanins from blackcurrant juice and two polyphenols from apple juice, all commercially not available, could be isolated.

Due to their high polyphenol contents, most berry juices are generally a better source of antioxidants in human nutrition than apple juice, which contains lower amounts of polyphenols. The variety has the greatest influence on the antioxidative capacity of apple and blackcurrant juice. The amounts of antioxidative components differ widely in different apple as well as blackcurrant varieties. Choosing a polyphenol-rich variety appeared to be the basis for a high antioxidative capacity in the juice.

The influence of mash treatment, mash extraction, apple polyphenol oxidase, industrial extraction system, separation, thermal treatment, storage, fining with gelatine, ultrafiltration with following stabilisation by PVPP or adsorber resin and laccase/O₂ treatment followed by ultrafiltration on apple juice during processing were studied and discussed. The extraction of the mash transfers only 32% of the potential antioxidative capacity and 43% of the polyphenols into the juice and could be considered as the processing step causing the greatest loss during juice production. Mash treatment, e.g. a hold for one hour or heating to 60°C, improves the yield of antioxidants after extraction. Different extraction systems such as horizontal press and decanter yield the same antioxidative capacity but different amounts of individual polyphenols, even though the total polyphenols (measured by the Folin-Ciocalteu method) are similar. Oxidation processes during production and separation decrease the antioxidative capacity and the polyphenols of freshly pressed apple juice 20 to 40%, which could be inhibited by heating of the freshly pressed juice to 55°C. All modern processing techniques for the production of a clear juice using ultrafiltration strongly reduce antioxidative capacity as well as the polyphenols (40 – 75%), while fining with gelatine is more gentle (25 – 40% decrease). Therefore, fining with gelatine is the favoured method for apple juice clarification. Generally, under the here applied criteria cloudy apple juice could considered to be superior to its clear counterpart.

The influence of mash extraction, separation, thermal treatment, fining with gelatine, treatment with PVPP and bentonite and concentration process on blackcurrant juice during processing were studied and discussed. Decrease of antioxidative capacity and polyphenols during blackcurrant juice processing (extraction, separation, pasteurisation) is 10 to 15%, which is reasonably lower than observed decrease in apple juice processing. Mash heating and depectinisation is recommended due to a better extraction of polyphenols from the mash

(59% antioxidative capacity, 64% polyphenols) and inhibition of polyphenoloxidase activity via temperature induced protein denaturation. Thermal treatment during the concentration process hardly reduces the antioxidative capacity and total polyphenols (Folin-Ciocalteu) but causes a massive decrease in the amounts of individual polyphenols, especially the anthocyanins. Therefore, the concentration process could not be recommended when referring to recent data on the bioavailability of anthocyanins.

Elderberry, blackberry and sour cherry show comparable stability during processing (decrease < 20%). As the generally recommended method for the clarification of berry juices occurs the fining with gelatine.

The higher amounts of antioxidants and a lower activity of polyphenol oxidases are most likely responsible for the difference in stability during processing of high coloured berry juice and apple juice. Storage of clear juices, apple and elderberry juice, reduces the total polyphenols as well as the individual polyphenols while the antioxidative capacity remains constant. Formation of new antioxidative compounds, polymeric phenols, maillard product etc., during storage is suggested as a possible reason for the constant antioxidative capacity. Fermentation during fruit wine processing hardly effects the antioxidative capacity while the amounts of individual polyphenols are drastically reduced. Taking this observation into account condensation and polymerisation products formed during fermentation should possess a similar antioxidative capacity as their basic molecules.

Based on the results, clear recommendations for fruit juice production can be confirmed in order to achieve the highest possible antioxidative capacity and an optimised amount of polyphenols:

1. The choice of polyphenol-rich fruits is the basis for high antioxidative capacity in the juice.
2. Heating of mash or freshly pressed juice to inactivate polyphenol oxidases.
3. A minimisation of processing steps during fruit juice production to avoid unnecessary reductions of antioxidative capacity and polyphenols.
4. Fast and effective processing lines to avoid unnecessary hold time.
5. Avoiding all processing steps and juice treatments causing a high reduction of antioxidative capacity and individual polyphenols.

The possibility of the development of an antioxidant-rich beverage based on various berry juices could be demonstrated.

Polyphenols as fruit juice ingredients were considered from a new point of view and their changes during fruit juice processing were newly valued.

The results represent a useful tool for the fruit juice industry to evaluate fruit juice processing with the focus on antioxidative capacity and individual polyphenols and provide information for the development of new products with a high antioxidative capacity.

9. Literatur

- Adamson GE, Lazarus SA, Mitvhill AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4184-4188
- Alvarez V, Andreas LJ, Riera FA, Alvarez R (1996) Microfiltration of apple juice using inorganic membranes: Process optimisation and juice stability. *Can. J. Chem. Eng.*, 74, 156-162
- Alvarez S, Alvarez R, Riera FA, Coca J (1998) Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloid Surface A*, 138, 377-382
- Amiot MJ, Tacchini M, Aubert S, Nicolas J (1992) Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, 57, 958-962
- Anese M, Nicoli MC, Mastrocola D, Manzocco L, Lerici CR (1996) Antioxidant properties of polyphenol-containing foods in relation to heat treatments and storage conditions. In: *Proceeding of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food colourants and Antioxidants*, Vienna, 15 Nov. 1996, 20-30
- Anonymus (1997) Hochwertiger Apfelsaft von Streuobstwiesen. *Flüssiges Obst* 64, 380
- Anonymus (1998) Getränke-Innovationen. *Brauwelt*, 138, 2316-2319
- Arimoto-Kobayashi S, Sugiyama C, Harada N, Takeuchi M, Takemura M, Hayatsu H (1999) Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 221-230
- Baderschneider B, Luthria D, Waterhouse AL, Winterhalter P (1999) Antioxidants in white wine (cv. Riesling): I. Comparison of different testing methods for antioxidant activity. *Vitis*, 38, 127-131
- Bakker J, Preston NW, Timberlake CF (1986) The determination of anthocyanins in aging red wines: comparison of HPLC and spectral methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 121-126
- Bakker J, Bridle P, Bellworthy SJ (1994) Strawberry Juice Colour: A Study of the Quantitative and qualitative Pigment Composition of Juices from 39 Genotypes. *J. Sci. Food Agric.*, 64, 31-37
- Belitz HD, Grosch W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 4. Aufl., Springer Verlag Berlin, 756-762
- Benezra C (1990) Polyphenol-protein interactions and contactdermatitis. *Bulletin de Liaison, Groupe Polyphénols JIEP XIV*, Straßburg
- Benthath A, Rusznyak S, Szent-György A (1936) Vitamin nature of flavones. *Nature*, 798ff
- Benthath A, Rusznyak S, Szent-György A (1937) Vitamin P. *Nature*, 326ff
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant" power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76
- Benzie IFF, Szeto YT (1999) Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 633-636
- Bernwieser I, Pätzold R, Galensa R, Sontag G (1994) HPLC mit coulometrischer Elektroden-Array-Detektion. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 198, 40-43
- Beveridge T (1997) Haze and cloud in apple juices. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37, 75-91
- Binnig R (1992) Helle, farbstabile naturtrübe Apfelsäfte. *Flüss. Obst*, 59, 540-544
- Bitsch I, Shahrzad S, Borsch C (1997) Absorption and metabolism of gallic acid after oral application in humans. Exerts this plant derived phenolic acid antioxidant activity in vivo? In: *Armadò R, Andersson H, Bardócz S, Serra F (Eds.) Polyphenols in food - Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop*, Aberdeen, Scotland, 195-198
- Bjeldanes LF, Chang GW (1977) Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*, 197, 577-578
- Block G, Patterson B, Subar A (1992) Fruit and vegetable and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18, 12-29

- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
- Böhles HJ (1991) Radikalerkrankungen – die Bedeutung von Sauerstoffradikalen für die klinische Medizin. *Z. Geriatrie*, 4, 358-372
- 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
- Booth A.N., Emerson O.H., Jones F.T., Deeds F. (1957) Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. *J. Biol. Chem.*, 229, 51-59
- Boyles MJ, Wrolstad RE (1993) Anthocyanin composition of red raspberry juice: Influence of cultivar, processing, and environmental factors. *J. Food Sci.*, 58, 1135-1141
- Bronnum-Hansen K, Hansen SH (1983) High-performance liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Sambucus nigra*. *J. Chromatogr.*, 262, 385
- Burda S, Oleszek W, Lee CY (1990) Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 945-948
- Butler LG, Rogler JC (1992) Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. In: Ho CT, Lee CV, Huang MT (Eds.) *Phenolic compounds in food and their effects in health I*, American chemical society, Washington D.C., 298
- Cantarelli C, Brenna O, Giovanelli G, Rossi M (1989) Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. *Food Biotechnology*, 3, 203-213
- Cao G, Alessio HM, Culter RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med* 14, 303-311
- Caroll KK, Guthrie N, So FV, Chambers AF (1998) Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids. In: Rice-Evans CA, Packer L (Eds.) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York, 437-446
- Cemeroglu B, Velioglu S, Isik S (1994) Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.*, 59, 1216-1218
- Cheng GW, Breen PJ (1991) Activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and concentration of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 116, 865-869
- Cheynier V, Osse C, Rigaud J (1988) Oxidation of Grape juice phenolic compounds in model solutions. *J. Food Sci.*, 53, 1729-1732
- Cheynier V, Ricardo Da Silva JM (1991) Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caftaric acid and Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1047-1049
- Clifford MN, Kellard B, Birch GG (1989) Characterisation of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. *Food Chem.*, 33, 115-123
- Clifford MN (2000) Anthocyanins – nature, occurrence, and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1063-1072
- Clifford M.N. (2000a) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1033-1043
- Constenla DT, Lozano JA (1995) Effect of Ultrafiltration on concentrated Apple juice color and turbidity. *Int J. Food Sci. Technol.*, 30, 23-30
- Cook NC, Samman S (1996) Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* 7, 66-76
- Couture R, Rouseff RL (1992) Debitting and deacidifying Sour Orange (*Citrus aurantium*) juice using neutral and anion exchange resins. *J. Food Sci.*, 57, 380-384
- Deigner HP, Wolf G (1994) Oxidativ modifiziertes LDL und seine mögliche Rolle in der Atherogenese. *Bioforum* Nr. 3/95, 38-87
- Dekker M, Verkerk R, Van den Sluis AA, Khokhar S, Jongen WMF (1999) Analysing the antioxidant activity of food products: Processing and matrix effects. *Toxicol. Vitro*, 13, 797-799

- De Rijke YB, Demacker PNM, Assen NA, Sloots LM, Katan MB, Stalenhoef AFH (1996) Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoprotein in volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 329-334
- Dietrich H, Wucherpennig K, Maier G (1990) Lassen sich Apfelsäfte mit Polyphenoloxidasen gegen Nachtrübung stabilisieren? *Flüss. Obst*, 57, 68-73
- Dietrich H, Schäfer E (1991) Optimierung der Schönungsmitteldosage durch Titration mit dem Streaming-Current-Detector. *Mitt. Klosterneuburg*, 41, 160-167
- Dietrich H, Krueger E, Ritter G, Rheinberger A, Lengfeld B (1994) Beitrag zur Charakterisierung von Schwarzen Johannisbeersorten im Hinblick auf die Saft- und Nektarherstellung. Vortragsseminar der GDCH, AG Fruchtsäfte, Holzminden
- Dietrich H (1995) Die Polyphenole des Weins im Spannungsfeld technologischer und gesundheitlicher Aspekte. 4. Int. Symp. Innovationen in der Kellerwirtschaft, Intervitis, Stuttgart, 244-252
- Dietz R, Bitsch I (1995) Die relative Bioverfügbarkeit der Ascorbinsäure pflanzlicher Lebensmittel für den Menschen. in: *Vitamin und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier*, Jena 1995, 284-287
- Disler PB, Lynch SR, Charlton RW, Torrance JD, Bothwell TH, Walker RB, Mayet F (1975) The effect of tea on iron absorption. *Gut*, 16, 193-200
- Dongowski G, Bock W (1987) Untersuchung zur Maischefermentierung von Schwarzen Johannisbeeren. *Lebensmittelindustrie*, 34, 129-133
- Dragsted LO, Knuthsen P, Nielsen SE, Strube M, Justesen U (1996) Polyphenols in Danish Foods and their possible health effects. In: *Proceeding of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food colourants and Antioxidants*, Vienna, 15 Nov. 1996, 35-44
- Drdak M, Daucik P (1990) Changes of elderberry (*Sambucus nigra*) pigments during the production of pigment concentrates. *Acta Aliment.*, 19, 3
- Dunnick JE, Hailey JR (1992) Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of food. *Fund. Appl. Toxicol.*, 19, 423-431
- Eder R, Wendelin S, Barna J (1990) Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC) – Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. *Mitt. Klosterneuburg*, 40, 68-75
- Eder R (1996a) Degradation kinetics of anthocyanins in concentrated juice of black currants (*Ribes nigrum* L.). *Polyphenols Communications 96 XVIII. International Conference on Polyphenols*, Bordeaux, France, July 15-18, 1996), Vol. 2
- Eder R (1996b) Pigments. In: *Food Analysis*, Nollet L Ed., Marcel Dekker, New York, 937-1014
- Eder R (1996c) Changes of anthocyanin content and profile during processing and storage of elderberry juice and nectar. In: *Proceeding of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food colourants and Antioxidants*, Vienna, 15 Nov. 1996, 58-63
- Fischer E (1919) *Untersuchungen über Depside und Gerbstoffe*. Springer Verlag, Berlin
- 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
- Forkmann G (1993) Biosynthesis of flavonoids. In: *Polyphenolic phenomena*, Scalbert A (Ed.), INRA Editions, Paris, 65-71
- Francia-Aricha EM, Guerra MT, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (1997) New anthocyanin pigments after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2262-2266
- Frankel EN, German JB, Davis PA (1992) Headspace gas chromatography to determine human low-density oxidation. *Lipids*, 27, 1047-1051
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341, 454-457
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 549-554

- Fuleki T (1969) The anthocyanins of strawberry, rhubarb, radish and onion. *J. Food Sci.*, 34, 365
- Fussnegger B (1993) Quervernetztes Polyvinylpyrrolidon (PVPP) – Technologischer Hilfsstoff auch für die Fruchtsaferstellung. *Flüss. Obst*, 60, 263-266
- Gao L, Beveridge T, Reid CA (1997) Effects of processing and packaging conditions on haze formation in apple juices. *Food Sci. Technol.-Lebensm. Wiss.*, 30, 23-29
- Gao L, Girard B, Mazza G, Reynolds AG (1997) Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot Noir wines during different vinification processes. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2003-2008
- Gaspar J, Laires A, Monteiro M, Laureano O Ramos E, Rueff J (1993) Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis*, 8, 51-55
- Genovese DB, Elustondo MP, Lozano JE (1997) Color and cloud stabilization in cloudy apple juice by steam heating during crushing. *J. Food Sci.*, 62, 1171-1175
- Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A (1994) A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free radical biology & medicine* 18, 29-36
- Girard B, Fukumoto LR (1999) Apple juice clarification using microfiltration and ultrafiltration polymeric membranes. *Food Sci. Technol.-Lebensm. Wiss.*, 32, 290-298
- Gokmen V, Borneman Z, Nijhuis HH (1998) Improved ultrafiltration for color reduction and stabilization of apple juice. *J. Food Sci.*, 63, 504-507
- Goldberg DM, Hahn SE, Parkes JG (1995) Beyond alcohol: Beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta*, 237, 155-187
- Goodenough PW, Kessel S, Lea AGH, Loeffler T (1983) Mono and diphenolase activity from fruit of *Malus Pumila*. *Phytochemistry*, 22, 359ff
- Graefe E.U., Veit M. (1999) Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomed.*, 6, 239-246
- Gross GG (1992) Enzymes in the Biosynthesis of hydrolyzable tannins. In: Hemingway RW, Laks PE: *Plant Polyphenols*, Plenum Press, New York, 43-60
- Guo C, Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) 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.*, 45:1787-1796
- Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau J-F (1998) Reversed-Phase HPLC following Thiolysis for Quantitative Estimation and Characterisation of the four main Classes of Phenolic Compounds in different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kemerrien). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1698-1705
- Häkkinen S, Mykkänen H, Kärenlampi S, Törrönen R (1997) Phenolic profiles in Finnish berries. In: Armadò R, Andersson H, Bardócz S, Serra F (Eds.) *Polyphenols in food - Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop*, Aberdeen, Scotland, 59-60
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR (1999) Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2274-2279
- Hallberg L, Rossander L (1982) Effect of different drinks on the absorption of non-heme iron from composite meals. *Hum. Nutr. Appl. Nutr.*, 36, 116-123
- Hamatschek J, Nagel B (1993) 100 Jahre Zentrifugenbau und der Einsatz des Dekanters zur Entsaftung von Früchten. *Flüss. Obst*, 60, 249-253
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH (1999) Identification of procyanidins in cocoa and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 490-496
- Harborne JB (1988) *The flavonoids*. Chapman & Hall, London
- Haslam E (1989) *Plant polyphenols – vegetable tannins revisited*. Cambridge University Press, Cambridge

- Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y (1990) Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 717-720
- Heatherbell DA (1984) Fruchtsaftklärung und -schönung. *Confructa*, 28, 192-197
- Henn T, Stehle P (1998): Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. *Ernährungs-Umschau* 45, 308-313
- Heinonen MI, Lehtonen PJ, Hopia AI (1998a) Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 25-31
- Heinonen MI, Meyer AS, Frankel EN (1998b) Antioxidative activity of Berry phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4107-4112
- Hemilä H (1992) Vitamin C and plasma cholesterol. *Food Sci. Nutr.*, 32, 33-57
- Hemingway RW (1989) In: Chemistry and significance of condensed tannins. Hemingway RW, Karchesy JJ (Eds.), Plenum Press, New York, 83-107
- Henning W (1981) Flavonolglykoside der Erdbeeren (*Fragaria x ananassa* Duch.), Himbeeren (*Rubus Ideaus* L.) und Brombeeren (*Rubus fruticosus* L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 173, 180-187
- Hernandez T, Ausin N, Bartolomé B, Bengoechea L, Estrella I, Gómez-Cordovés (1997) Variations in the phenolic composition of fruit juices with different treatments. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 204, 151-155
- Herrmann K (1973) Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. I. Bisherige Kenntnisse über Vorkommen, Gehalte sowie Veränderungen während des Fruchtwachstums. *Lebensm. Unters. Forsch.*, 151, 41-51
- Herrmann K (1976) *J. Food Technol.*, 11, 433
- Herrmann K (1992) Über die Gehalte der hauptsächlichsten Pflanzenphenole im Obst. *Flüss. Obst*, 59, 66-70
- Herrmann K (1993) Zur quantitativen Veränderung phenolischer Inhaltsstoffe bei der Gewinnung von Apfel- und Birnensäften. *Flüss. Obst*, 60, 7-10
- Herrmann K (1996a) Inhaltsstoffe der Himbeeren und Brombeeren. *Ind. Obst- Gemüseverw.*, 81, 186-194
- Herrmann K (1996b) Inhaltsstoffe der schwarzen Holunderbeeren. *Ind. Obst- Gemüseverw.*, 81, 394-397
- Herrmann K (1996c) Inhaltsstoffe der Erdbeeren. *Ind. Obst- Gemüseverw.*, 81, 154-161
- Herrmann K (1996d) Über die Inhaltsstoffe der Heidelbeeren und Preiselbeeren. *Ind. Obst- Gemüseverw.*, 82, 218-223
- Herrmann K (1996e) Inhaltsstoffe der Süß- und Sauerkirschen. *Ind. Obst- Gemüseverw.*, 81, 121-129
- Herrmann K (1997a) Inhaltsstoffe der Johannisbeeren. *Ind. Obst- Gemüseverw.*, 82, 14-20
- Herrmann K (1997b) Inhaltsstoffe der Stachelbeeren. *Ind. Obst- Gemüseverw.*, 82, 34-36
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011
- Hertog MGL (1998) Quercetin in foods, cardiovascular disease, and cancer. in: Rice-Evans CA, Packer L (Eds.) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York, 447-467
- Ho CT, Lee CV, Huang MT (Eds.) (1992) Phenolic compounds in food and their effects in health I+II, American chemical society, Washington D.C.
- Hoekstra JH, Vandemaker JHL, Ghoos YF, Hartemink R, Kneepkens CMF (1995) Fluid intake and industrial processing in apple juice induced chronic non-specific Diarrhea. *Arch. Dis. Child.*, 73, 126-130
- Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1276-1282
- Hollman PCH, Katan MB (1998) Absorption, Metabolism, and Bioavailability of flavonoids. Rice-Evans CA, Packer L (Eds.) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York, 483-522

- Hong V, Wrolstad RE (1990) Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 698
- Huang SW, Frankel EN (1997) Antioxidant activity of tea catechin in different lipid systems. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3033-3038
- Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M (1998) Erosion of enamel: Compared to blackcurrant and orange drinks. *J. Dent. Res.*, 77, 1303-1307
- Hurrell RF (1990) The influence of polyphenol-containing beverages on iron absorption. *Bulletin de Liaison, Groupe Polyphénols, JIEP XIV, Straßburg*
- Hurrell RF, Reddy M, Cook JD (1997) Influence of polyphenol-containing beverages on iron absorption. In: Armadò R, Andersson H, Bardócz S, Serra F (Eds.) *Polyphenols in food - Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop, Aberdeen, Scotland*, 169-172
- Ibarz A, Bellmunt S, Bota E (1992) Unterschiedliche nichtenzymatische Bräunungsprozesse während der Lagerung von Apfelsaftkonzentrat. *Flüss. Obst*, 59, 9-11
- Ikken Y, Morales P, Martinez A, Marin ML, Haza AI, Cambero MI (1999) Antimutagenic effect of fruit and vegetable extracts against N-Nitrosamines evaluated by the Ames test. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3257-3264
- Iversen CK (1999) Black Currant Nectar: Effect of Processing and Storage on Anthocyanin and Ascorbic Acid Content. *J. Food Sci.*, 64, 37-41
- Jacobson EA, Newmark H, Baptista J, Bruce WR (1983) A preliminary investigation of the metabolism of dietary phenolics in humans. *Nutr. Rep. Int.*, 28, 1409-1417
- Jialal I, Grundy SM (1992) Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 669, 237-248
- Kanner J, Frankel EN, Granit R, German JB, Parks E, Kinsella JE (1994) Natural antioxidants in grapes and wines. *J Agric Food Chem*, 42, 64-69
- Kansanen L, Mykkänen H, Törrönen (1995) Flavonoids and extracts of strawberry and black currant are inhibitors of the carcinogen-activating enzyme CYP1A1 in vitro. In: Kumpulainen JT, Salonen JT (Eds.) *Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention. The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 386-388
- Kato Y, Ogino Y, Aoki T, Uchida K, Kawakishi S, Osawa T (1997) Phenolic antioxidants prevent peroxynitrite-derived collagen modification in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3004-3009
- Kelhöfer W (1908) Schweizerisches Landwirtschaftsdepartment (Hrsg.) *Beiträge zur Kenntnis des Birnengerbstoffes und seiner Veränderung bei der Obstbereitung. Jahrbuch der Schweiz 22, Verlag K.J. Mutz, Bern*, 341-409
- Koeppen BH, Herrmann K (1977) Flavonoid glycosids and hydroxycinnamic acid esters of blackcurrants (*Rubus nigrum* L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 164, 263-268
- Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, 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
- Kolb W (1989) Ästhetische und wirtschaftliche Aspekte des Streuobstanbaus. *Flüssig. Obst*, 56, 312-316
- Kondo Y, Ohnishi M, Kawaguchi M (1999) Detection of lipid peroxidation catalyzed by chelated iron and measurement of antioxidant activity in wine by a chemiluminescence analyzer. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1781-1785
- Korth A (1994) Fruchtsäfte verringern das Krebsrisiko. *Ernährungs-Umschau*, 41, 470-471
- Koumba-Koumba D, Macheix JJ (1982) Biosynthesis of hydroxycinnamic derivatives in apple fruit cell suspension culture. *Physiol. Vég.*, 20, 137
- Kühnau J (1976) The flavonoids: A class of semi-essential food components and their role in human nutrition- *World Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117-120
- Kumpulainen JT, Salonen JT (1995) *Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention. The Royal Society of Chemistry, Cambridge*

- Kuo JM, Yeh DB, Sun Pan B (1999) Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3206-3209
- LaFlamme J, Weinand R (1993) Neue Erkenntnisse bei der Kombination von Membranfiltration und Adsorptionstechnik in der Fruchtsaftindustrie. *Flüss. Obst*, 60, 510-516
- Lancaster JE (1992) Regulation of skin color in apples. *Critical reviews in Plant Science*, 10, 487-502
- Lapidot T, Harel S, Granit R, Kanner J (1998) Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4297-4302
- Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J (1999) pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. 47, 67-70
- Laranjinha J, Vieira O, Madeira VMC, Almeida LM (1995) Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs. regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.*, 323, 373-381
- Lazarus SA, Adamson GE, Hammerstone JF, Schmitz HH (1999) High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3693-3701
- Lea AGH, Timberlake CF (1974) The phenolics of cider: 1. Procyanidins. *J. Sci. Food Agric.*, 25, 1537-1545
- Lea AGH, Timberlake CF (1978) The phenolics of cider: Effect of processing conditions. *J. Sci. Food Agric.*, 29, 484-492
- Lea AGH, Arnold GM (1978) The phenolics of ciders: Bitterness and adstringency. *J. Sci. Food Agric.*, 29, 478-483
- Lea AGH (1979) HPLC of cider procyanidins. *J. Sci. Food Agric.*, 29, 833-838
- Lea AGH (1984) Farb- und Gerbstoffe in englischen Mostäpfeln. *Flüss. Obst*, 51, 356-361
- Lea AGH (1992) Flavor, color and stability in fruit products: the effect of polyphenols. In: Hemingway RW, Laks PE: *Plant Polyphenols*, Plenum Press, New York, 827-847
- Leake DS (1998) Effect of flavonoids on the oxidation of low-density lipoprotein. In: Rice-Evans CA, Packer L (Eds.) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York, 253-276
- Lee HS, Wrolstad RE (1988) Apple Juice Composition: Sugar, Nonvolatile Acids and Phenolic Profiles. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 789-794
- Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS (1995) Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 4, 393-399
- Le Lous J, Majoie B, Morinière JL, Wulfert E (1975) Etude des flavonoides de *Ribes nigrum*. *Annales pharmac. franc.*, 33, 393-399
- Liao H, Cai Y, Haslam R (1992) Polyphenol Interactions. Anthocyanins: Co-Pigmentation and Colour Changes in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 299-305
- Lin YL, Cheng CY, Lin YP, Lau YW, Juan IM, Lin JK (1998) Hypolipidemic effect of green tea leaves through induction of antioxidant and phase II enzymes including Superoxid Dismutase, Catalase, and Glutathione S-Transferase in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1893-1899
- Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH (1994) Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *J. Sci. Food Agric.*, 64,
- Lozano JF, Ibarz A (1997) Colour changes in concentrated fruit pulp during heating at high temperatures. *J. Food Eng.*, 31, 365-373
- Maas JL, Wang SY, Galletta GJ (1991) Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. *Hort. Sci.*, 26, 66-68
- MacGregor JT (1984) Genetic and carcinogenic effects of plant flavonoids. An overview. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 177, 497-526
- Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J (1990) *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Ranton, FL

- Maier G (1994) Gewinnung , Reinigung und Einsatz eines mikrobiellen Laccasepräparates zur enzymatischen Stabilisierung von Apfelsäften sowie Farbaufhellung von Konzentraten. Dissertation Universität Giessen
- Mangas JJ, Suarez B, Picinelli A, Moreno J, Blanco D (1997) Differentiation by phenolic profile of apple juices prepared according to two membrane techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4777-4784
- Marco GJ (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem* 45, 594-598
- Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T, Shinohara A, Nakata M (1999) Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1749-1754
- Matern U, Grimmig B (1993) Polyphenols in plant pathology. In: Scalbert A (Ed.) Polyphenolic Phenomena, INRA Editions, Paris, 143-147
- Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M, Sugano M (1997) Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy*, 52, 58-64
- Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G (1994) Red wine and antioxidative activity in serum. *Lancet*, 344, 193-194
- Maxwell S, Thorpe G (1996) Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity. (letter). *Biochem. J.*, 313, 229
- Mayr U, Treutter D (1996) Vorkommen und Gehalte von Flavanolen in Apfelfrüchten und – säften. Deutsche Gesellschaft für Qualitätssicherung (pflanzliche Ernährung) XXXI. Vortragstagung: Die Qualität pflanzlicher Nahrungsmittel als Grundlage richtiger Ernährung, Kiel 1996, 113-119
- Mayr U, Treutter D, Feucht W (1996) Phenolische Inhaltsstoffe des Apfels. *Erwerbsobstbau*, 38, 8-12
- Mazza G, Brouillard R (1987) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.*, 25, 207
- Mazza G, Brouillard R (1990) The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solution. *Phytochemistry*, 29, 1097
- Mazza G, Velioglu YS (1992) Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red-flesh apples. *Food Chem.*, 43, 113ff.
- Mazza G, Miniati E (1993) „Anthocyanins in fruit, vegetables, and grains.“, CRC Press, Boca Raton
- Meyer AS, Yi OS, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN (1997) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis Vinifera*). *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1638-1643
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davis MJ (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84, 407-412
- Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans CA (1995) Evaluation of the Total Antioxidative Activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1794-1801
- Miller NJ, Sampson J, Candeias L, Bramley P, Rice-Evans CA (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 240-242
- Miller NJ, Rice-Evans CA (1997) The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and black currant drink. *Food Chem*, 59, 1-7
- Miller NJ, Rice-Evans CA (1997a) Factors influencing the antioxidant activity determined the ABTS⁺ radical cation assay. *Free Rad. Res.*, 22, 195-199
- Miyake Y, Yamamoto K, Morimitsu Y, Osawa T (1997) Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4619-4623
- Miyazawa M, Sakano K, Nakamura SI, Kosaka H (1999) Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1346-1349
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K (1999a) Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, Cyanidin-3-glucoside and Cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1083-1091

- Monti SM, Ritieni A, Graziani G, Randazzo G, Mannina L, Segre AL, Fogliano V (1999) LC/MS Analysis and Antioxidative Efficiency of Maillard Reaction Products from a Lactose-Lysine Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1506-1513
- Morton AD (1968) The phenolic compounds of blackcurrant juice and their protective effect of ascorbic acid. *J. Food Technol.*, 3, 269-275
- Mosel HD, Herrmann K (1974) Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. IV. Die phenolischen Inhaltsstoffe der Brombeeren und Himbeeren und deren Veränderungen während Wachstum und Reife der Früchte. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 154, 324-327
- Moutounet M, Rigaud C, Souquet JM, Cheyner V (1990) Influence de quelques parametres sur l'oxydation des mouts de raisin. Interpretations technologiques. *Reveu des Œnologues*, 124, 32-38
- Mukai K, Oka W, Egawa Y, Nagaoka S, Terao J (1996) A kinetic study of the free-radical scavenging action of flavonoids in aqueous triton x-100 micellar solution. Proceedings of the International symposium in natural antioxidants. In: Packer L, Traber MG, Xin W (Eds.) *Molecular mechanism and health effects*. AOCS Press, 557-568
- Muldoon MF, Kritchevsky SB (1996) Flavonoids and heart disease. Evidence of benefits still fragmentary. *Br. Med. J.*, 312, 458-459
- Nagel CW, Wulf LW (1979) Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 111-116
- Nagel CW, Schobinger U (1985) Untersuchungen über die Bildung von Trübungen in Apfel- und Birnensaftkonzentraten nach vorheriger Ultrafiltration. *Confructa*, 29, 16-26
- Nagel B (1992) Kontinuierliche Herstellung von hochwertigen naturtrüben Apfelsäften. *Flüss. Obst*, 59, 6-8
- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y (1996) Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biol. Med.*, 21, 895-902
- Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1493-1459
- Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, D'Avanzo B, Parazzini F (1991) Vegetable consumption and cancer risk. *Int. J. Cancer*, 48, 350-354
- Netzel M, Janssen M, Böhm V, Bitsch R, Bitsch I, Rechner A, Patz CD, Dietrich H (1999) Urinexkretion von Anthocyanen beim Menschen nach Genuss von schwarzem Johannisbeersaft. *Proc. Germ. Nutr. Soc.*, Vol 1, 5
- Netzel M, Strass G, Janssen M, Herbst M, Bitsch I, Bitsch R, Böhm V, Rechner A, Dietrich H (1999a) Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von antioxidativ wirksamen Anthocyanen aus Holunder- und schwarzen Johannisbeeren. 5. Werkstattbericht Justus-Liebig-Universität Giessen, 103-104
- Netzel M, Carle E, Kessenheimer B, Strass G, Bitsch I, Möhm V, Bitsch R (1999b) Effect of apple juice intake on antioxidant status in humans. Proceedings 4th Karlsruhe Nutrition Symposium
- Nicolas JJ (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Food Sci. Nutr.*, 34, 109-157
- Ohmori Y, Ito M, Kishi M, Mizutani H, Katada T, Konishi H (1995) Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 683-686
- Oleszek W, Lee YC, Jaworski AW, Price KR (1988) Identification of some phenolic compounds in apples. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 430-432
- Paganga G, Rice-Evans CA (1997) The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, 401, 78-82
- Perchellet JP, Gali HU, Perchellet EM, Klish DS, Armbrust AD (1992) Antitumor-promoting activities of tannic acid, ellagic acid, and several gallic acid derivatives in mouse skin. In: Hemingway RW, Laks PE: *Plant Polyphenols*, Plenum Press, New York, 783-801
- Pérez-Illarbe FJ, Hernández T, Estrella I (1991) Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 192, 551-554

- Pérez-Illzarbe FJ, Martínez V, Hernández T, Estrella I (1992) Liquid Chromatographic Determination of apple pulp procyanidins. *J. Liquid Chromatogr.*, 15, 637-646
- Philipp A, Pircher A, Schrober J, Yoav Y (1996) Die Holunderbeere (*Sambucus nigra* L.) als Rohstoff für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie. In: Proceeding of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food colourants and Antioxidants, Vienna, 15 Nov. 1996, 45-57
- Picinelli A, Suárez B, Mangas JJ (1997) Analysis of polyphenols in apple products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 204, 48-51
- Pischetsrieder M, Rinaldi F, Gross U, Severin T (1998) Assessment of the Antioxidative and prooxydative Activities of Two Aminoreductones Formed during the Maillard Reaction: Effects on the Oxidation of Beta-Carotene, N-Acetylhistidine, and cis-Alkenes. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2945-2950
- Rankin SM, Hoult JRS, Leaks DS (1988) Effects of flavonoids on the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, 95, 727
- Rath M (1992) Lipoprotein-a reduction by ascorbate. *J. Orthomol. Med.*, 7, 81-82
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans CA (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 1231-1237
- Rechner A, Patz CD, Dietrich H (1997): Beitrag zur Bewertung der antioxidativen Kapazität verschiedener Getränke. *Flüss. Obst*, 64, 62-65
- Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox on coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523-1526
- Rentschler H., Tanner H. (1976) Anleitung für die Getränke-Analyse., Eidg. Forschungsanstalt, Wädenswill
- Rhodes MJC (1998) Physiological roles of phenolic compounds in plants and their interaction with microorganisms and humans. In: Vercauteren J, Cheze C, Triaud J (Eds.) Polyphenols 96, Bordeaux, July 15-18, Editions INRA, Paris, 12-30
- Rice-Evans CA, Miller NJ (1995) Antioxidants – the case for fruit and vegetables in the diet. *Brit. Food J.*, 97, 35-40
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-Antioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 933-956
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2, 152-159
- Rice-Evans CA, Packer L (Eds.) (1998) Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker Inc., New York
- Rice-Evans CA, Miller NJ (1998a) Structure-antioxidant activity relationships. Rice-Evans CA, Packer L (Eds.) Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker Inc., New York, 199-219
- Risch B, Herrmann K (1988) Die Gehalte an Hydroxyzimtsäure-Verbindungen und Catechinen in Kern- und Steinobst. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 186, 225-230
- Ritter G (1994) Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben – Der Einfluß moderner Verfahrenstechnologie auf die Qualität des Endproduktes. Dissertation Universität Giessen
- Ritter G, Dietrich H (1996) Der Einfluß moderner Verfahrenstechniken auf den Gehalt wichtiger Pflanzenphenole im Apfelsaft. *Flüss. Obst*, 63, 256-263
- Rommel A, Wrolstad RE, Heatherbell DA (1992) Blackberry juice and wine: processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance. *J. Food Sci.*, 57, 385-410
- Rusznayk S, Szent-György A (1936) Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature*, 27ff
- Saint-Cricq de Gaulejac N, Provost C, Vivas N (1999) Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 425-431
- Samejima K, Kanazawa K, Ashida H, Danno GI (1998) Bay laurel contains kaempferyl coumarate acting against the dietary carcinogen 3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol (Trp-P-2). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4864-4868

- Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1094-1117
- Sapers GM, Hicks KB, Burgher AM, Hargrave DL, Sondey SM, Bilyk A (1986) Anthocyanin pattern in ripening thornless blackberries. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 111, 945ff
- Satué-Gracia MT, Heinonen M, Frankel EN (1997) Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome system. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3362-3367
- Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883
- Scheline R.R. (1991) Metabolism of acids, lactones, and esters. In: *CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds*. CRC Press, Boca Ranton
- Schols HA, in't Veld PH, van Deelen W, Voragen AGJ (1991) The effect of the manufacturing method on the characteristics of apple juice. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 192, 142-148
- Schuster B, Herrmann K (1985) Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*, 24, 2761-2764
- 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
- Sies H (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.*, 98, 1061-1075
- Sies H (Ed.) (1991) *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*. Academic Press, London
- Siess MH, Le Bon AM, Vanivenc-Lavier MC, Martel P, Suschetet M (1997) Potential role of flavonoids in cancer prevention. In: Armadò R, Andersson H, Bardócz S, Serra F (Eds.) *Polyphenols in food - Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop, Aberdeen, Scotland*, 105-112
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vit.*, 37, 144-158
- Skrede G, Wrolstad RE, Lea P, Enersen G (1992) Color stability of strawberry and black currant syrups. *J. Food Sci.*, 57, 172-177
- So FV, Guthrie N, Moussa M, Carroll KK (1996) Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juice. *Nutr. Cancer*, 26, 167-181
- Soleas GJ, Tomlinson G, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Relative contributions of polyphenolic constituents to the antioxidant status of wines: development of a predictive model. *J Agric Food Chem* 45, 3995-4003
- Spanos GA, Wrolstad RE (1990a) Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Thompson Seedless Grape Juice. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1565-1571
- Spanos GA, Wrolstad RE, Heatherbell DA (1990) Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1572-1579
- Spanos GA, Wrolstad RE (1990b) Influence of variety, maturity, processing, and storage on the phenolic composition of pear juice. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 817-824
- Spencer JPE, Chaudry F, Pannala AS, Srani SK, Debnam E, Rice-Evans CA (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 272, 236-241
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989) Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320, 915-924
- Stöhr H, Herrmann K (1975a) Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. VI. Die phenolischen Inhaltsstoffe der Johannisbeeren, Stachelbeeren und Kulturheidelbeeren. Veränderung der Phenolsäuren und Catechine während Wachstum und Reife von Schwarzen Johannisbeeren. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 159, 31-37
- Stöhr H, Herrmann K (1975b) Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obst. V. Die phenolischen Inhaltsstoffe der Erdbeeren und deren Veränderungen während Wachstum und Reife der Früchte. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 158, 341-348
- Suschetet M, Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC (1998) Anticarcinogenic properties of some flavonoids. In: Vercauteren J, Chèze C, Triaud J (Eds.) *Polyphenols 96, Bordeaux, July 15-18 1996, Edition INRA, Paris*, 165-204

- Taylor J (1989) Color stability of blackcurrant (*Rubus nigrum* L.) juice. *J. Sci. Food Agric.*, 49, 487
- Terao J, Piskula M, Yao Q (1994) Protective effect of Epicatechin, Epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 308, 278-284
- Terao J, Piskula MK (1998) Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In: Rice-Evans CA, Packer L (Eds.) *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York, 277-293
- Thompson RS, Jaques D, Haslam E, Tanner RJN (1972) Plant proanthocyanidins. I. Introduction: the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin Transact. I*, 1387-1399
- Torre LC, Barritt BH (1977) Quantitative evaluation of *Rubus* fruit anthocyanin pigments. *J. Food Sci.*, 42, 488-490
- Tsukui A, Suzuki A, Hayashi K, Nishiyama R, Ohara N (1996) Change in anthocyanin pigments during alcohol fermentation of a commercial available apple juice. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 43, 1128-1132
- Tubaro F, Micossi E, Ursini F (1996) The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 173-179
- Unno T, Kondo K, Itakura H, Takeo T (1996) Analysis of (-)-Epigallocatechin gallate in human serum obtained after ingesting green tea. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 2066-2068
- Unten L, Koketsu M, Kim M (1997) Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2009-2012
- Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J (1995) Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2800-2802
- Vinson JA, Jang J, Yang J, Dabbagh Y, Liang X, Serry M, Proch J, Cai S (1999) Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2502-2504
- Vogt K (1987) Neue Möglichkeiten in der Aufarbeitung von trüben Apfelsaftkonzentraten – Ultrafiltration und PVPP-Stabilisierung/-Entfärbung. *Flüss. Obst*, 54, 425-429
- Wagner H (1989) Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. *Planta Med.*, 55, 235-241
- Wald B, Galensa R (1989) Nachweis von Fruchtsaftmanipulationen bei Apfel- und Birnensaft. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 188, 107-114
- Walker JRL (1964) Studies on the enzymic browning of apples. II. Properties of apple polyphenoloxidase. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 360
- West NX, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M (1999) Development and evaluation of low erosive blackcurrant juice drink. *J. Dent.*, 27, 341-350
- Whitehead TP, Thorpe GHG, Maxwell SRJ (1992) Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, 266, 265-277
- Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A (1995) Effect of red wine ingestion on the antioxidative capacity of serum. *Clin. Chem.*, 41, 32-35
- Whiting GC, Coggins RA (1975) Estimation of the monomeric phenolics in ciders. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1833-1838
- Wildanger W, Herrmann K (1973) Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. II. Die Flavonole des Obstes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 151, 103-108
- Wilska-Jeszka J, Podsèdek A (1996) Proanthocyanidins properties and occurrence in fruits. In: *Proceeding of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food colourants and Antioxidants*, Vienna, 15 Nov. 1996, 87-91
- Wilska-Jeszka J, Krozuchowska A (1996) Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation – influence on the colour of strawberry and chokeberry juices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203, 38-42

- Wrolstad RE, Skrede G, Lea P, Enersen G (1990) Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *J. Food Sci.*, 55, 1064-1065
- Wucherpfennig K, Dietrich H, Scholz R (1985) Einfluss der Enzymierung und Schönung von Apfelsaft auf die Fluxrate in Ultrafiltrationsanlagen. *Flüss. Obst*, 52, 324-330
- Wucherpfennig K, Hahn P, Semmler G (Eds.) (1990) *Handbuch Alkoholfreie Getränke: Technologie, Recht, Physiologie*. Behr's Verlag, Hamburg
- Yoah Y (1996) Black elderberry as a source in food- and pharma industry. In: *Proceeding of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food colourants and Antioxidants*, Vienna, 15 Nov. 1996, 45-57
- Youdim KA, Martin A, Joseph JA (2000) Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 29, 51-60
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Crozier A, Sandström B, Dragsted LO (1999) Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 87-94
- Zeyuan D, Bingyin T, Xiaolin L, Jinming H, Yifeng C (1998) Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the triglycerides, and antioxidation in aged rats. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3875-3878
- Zhu QY, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen ZY (1997) Stability of green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4624-4628
- Zarate-Rodriguez E, Ortega-Rivas E, Barbosa-Canovas GV (2000) Quality changes in apple juice as related to nonthermal processing. *J. Food Qual.*, 23, 337-349
- Zimmer E (1996) *Zusammensetzung, physikalische Eigenschaften und Entstehung der Trubpartikel in naturtrüben Apfelsäften sowie Einstellung von Herstellungstechnologie und Rohware auf Trübung und Trübungsstabilität*, Dissertation Universität Giessen

Danksagung

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Dietrich für die Überlassung des Themas, sein großes Engagement für den Fortgang und das Gelingen der Arbeit und die kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Frau Prof. Dr. I. Bitsch, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Giessen, danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Begutachtung und Prüfung dieser Arbeit.

Herr Prof. Dr. R. Bitsch und Herr Dr. V. Böhm, Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena, sowie Prof. Dr. I. Bitsch und Dr. M. Netzel, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Giessen, danke ich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung, v.a. Anja, Petra, Marita, Anja, Michael, Franz, Frau Pendelin, Frau Wilming, Andreas, Jeanette, Martin, In-Sook, Andrea, Katri, Frank, Claus-Dieter, Frau Klyeisen, Frau Kohmann und Frau Schoepplein, danke ich von ganzem Herzen sehr herzlich für ihre vielfältige und tatkräftige Unterstützung, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die schöne gemeinsamen Jahre.

Für die Unterstützung im Rahmen des Forschungsprojektes wird den Firmen Eckes-Granini GmbH, Nieder-Olm, Haus Rabenhorst O. Lauffs GmbH & Co. KG, Unkel, Ernteband Fruchtsaft GmbH, Winnenden, Mainfrucht Obstverwertung GmbH, Gochsheim, Wink Logistik GmbH, Bingen, Novo Nordisk *Ferment* Ltd., Neumatt, Schweiz, Jahncke Fruchtsäfte GmbH, Drochtersen-Assel gedankt.

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (BMW/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) gefördert. Ich danke für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (AiF-FV 11160B).