

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, HERTOEG 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 Fruchtsaffforschung, 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/Kieselöl, 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 Sauerkirschsaft 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.