

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).

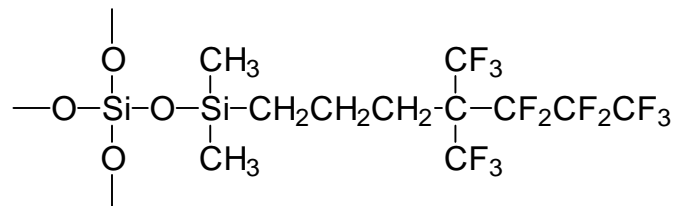


Abbildung 12: Struktur des Fluorkohlenwasserstoffes der Fluofix-Phase

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.

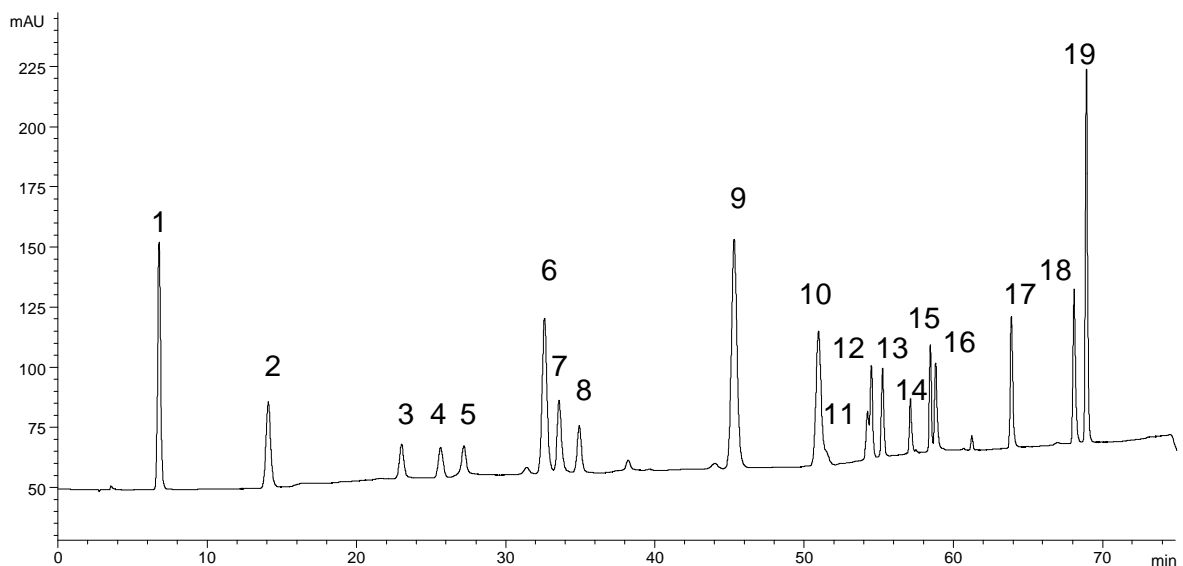


Abbildung 13: Chromatogramm der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches auf der Fluofix-Säule mit amperometrischer Detektion bei 500 mV

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)

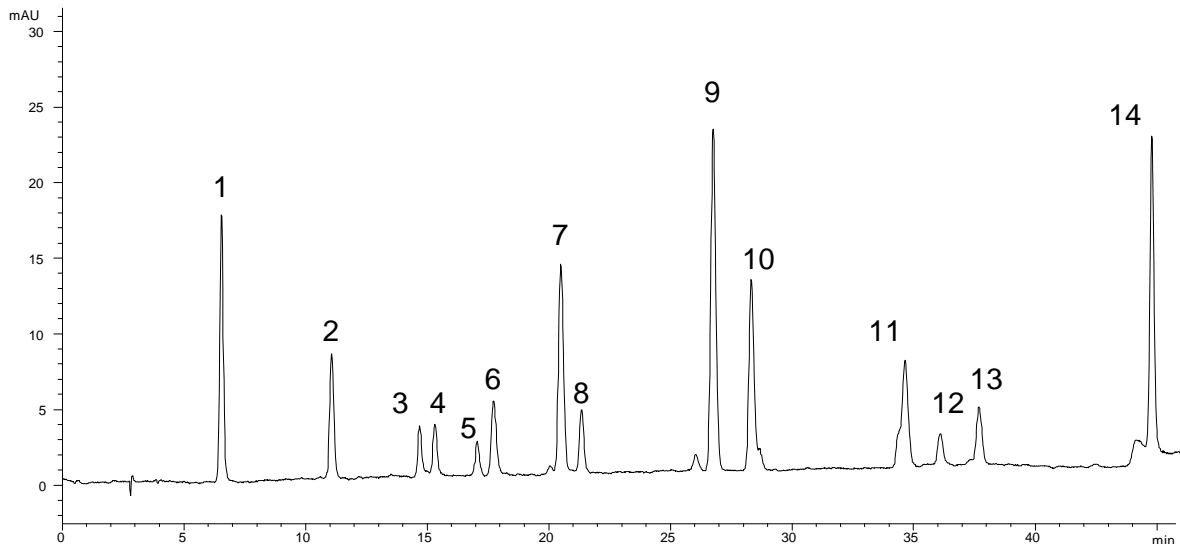


Abbildung 14: Chromatogramm der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches mit UV-Detektion bei 280 nm nach der Methode nach RITTER et al. 1994

Gallussäure (1), Protocatechusäure (2), Tyrosol (3), (+)-Catechin (4), Procyanidin B2 (5), Kaffeesäure (6), Chlorogensäure (7), (-)-Epicatechin (8), p-Coumarsiäure (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.

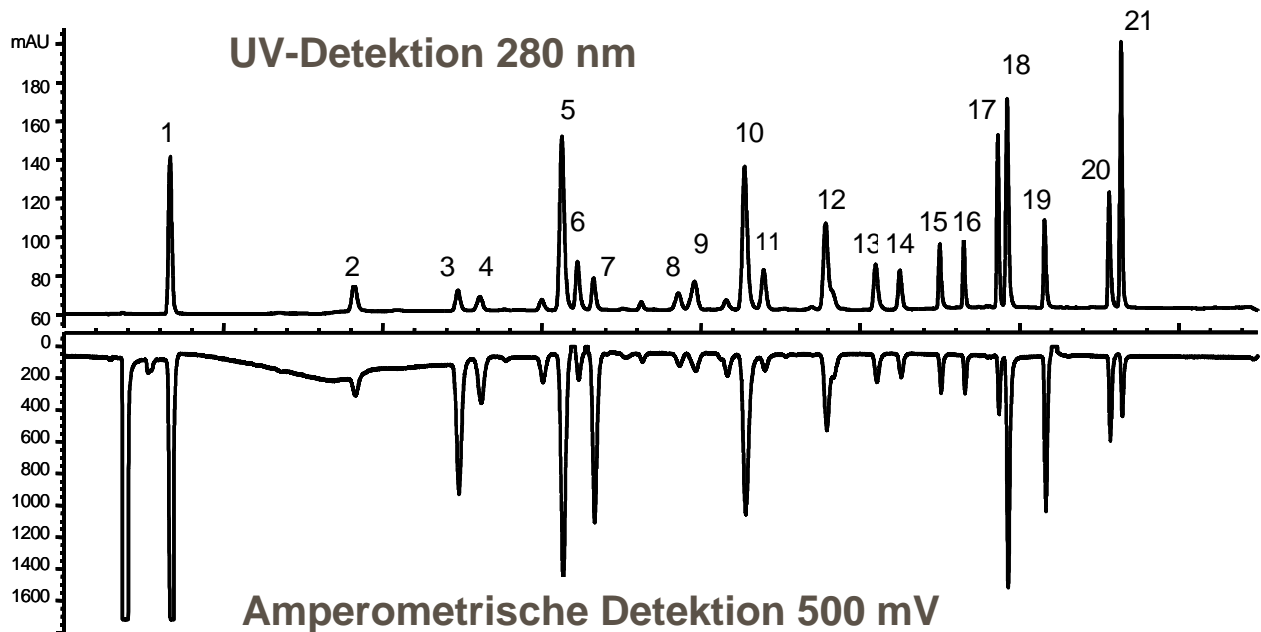


Abbildung 15: Vergleich der Chromatogramme der Trennung eines Polyphenolstandardgemisches. UV-Detektion bei 280 nm und amperometrischer Detektion bei 500 mV
 Gallussäure (1), Neochlorogensäure (2), (+)-Catechin (3), Procyanidin B2 (4), Kaffeesäure (5), Chlorogensäure (6), (-)-Epicatechin (7), Delphinidin-3-glucosid (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%.

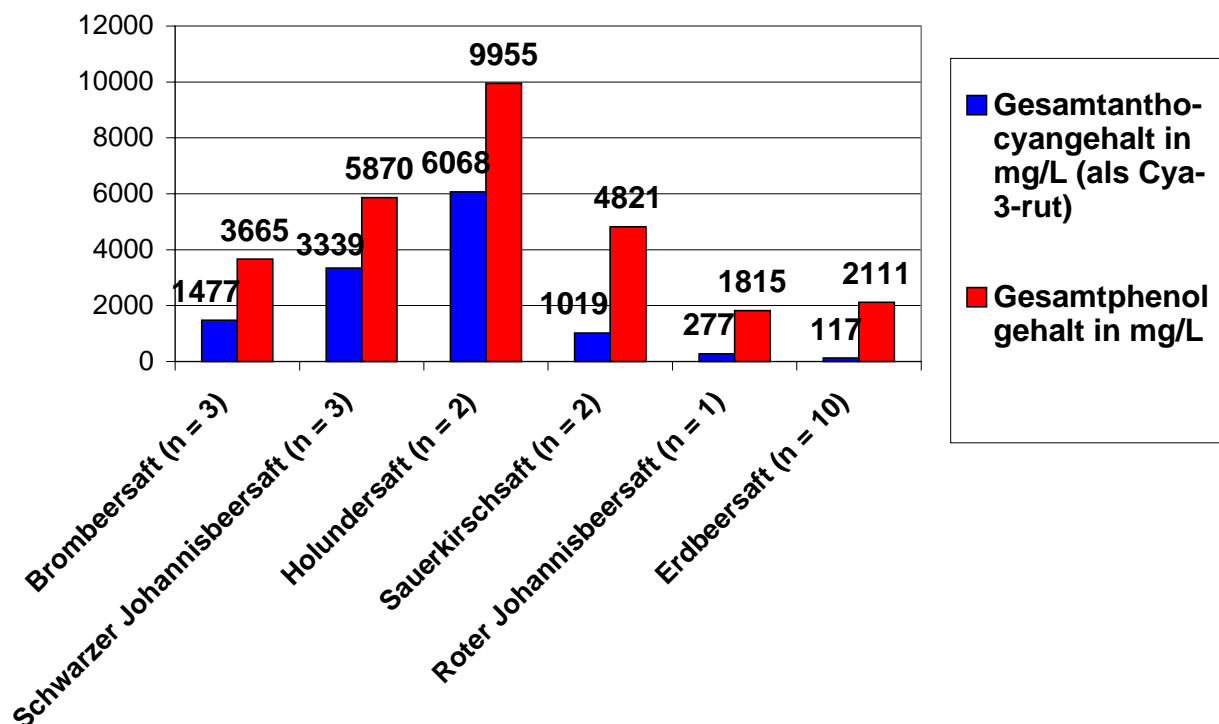


Abbildung 16: Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC und Gesamtphenolgehalt verschiedener Buntsäfte

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).

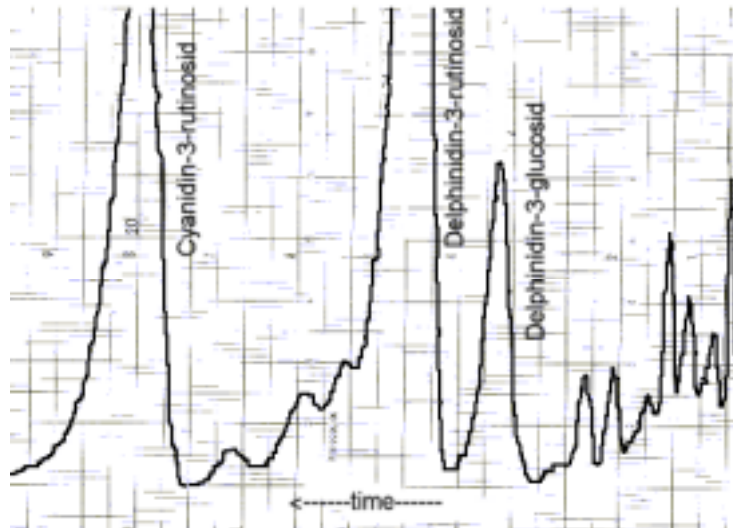


Abbildung 17: Chromatogramm der präparativen Trennung des ethanolischen Extraktes von schwarzem Johannisbeersaft bei 280 nm

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.

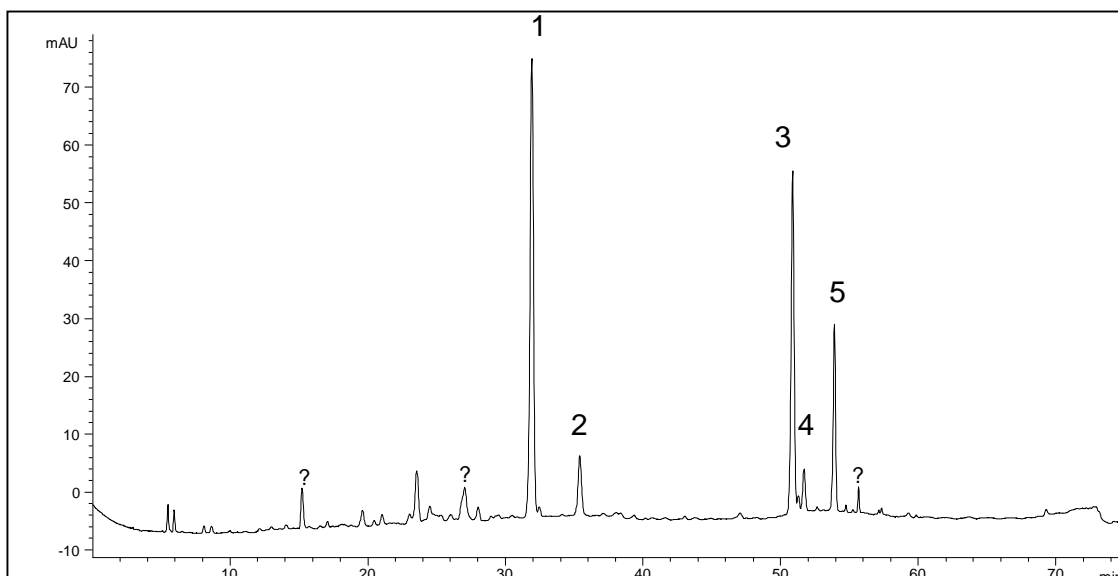


Abbildung 18: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes (Verdünnung 1:10) aus laccasebehandeltem Apfelsaft bei 280 nm
4-p-Coumaroylchinasäure (1), 5-p-Coumaroylchinasäure (2), Phloretin-2'-xyloglucosid (3), Phloretin-2'-xylogalaktosid (4), Phloridzin (5)

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

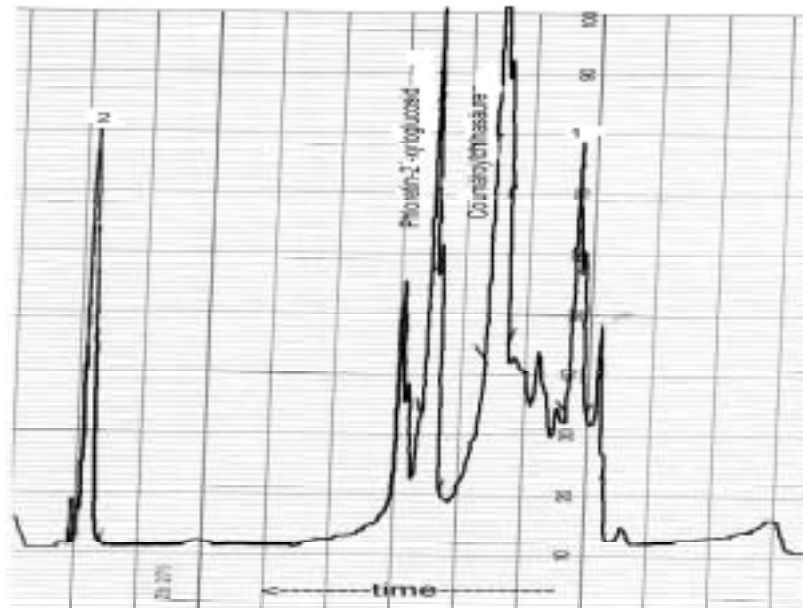


Abbildung 19: Chromatogramm der präparativen Trennung bei 280 nm

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).

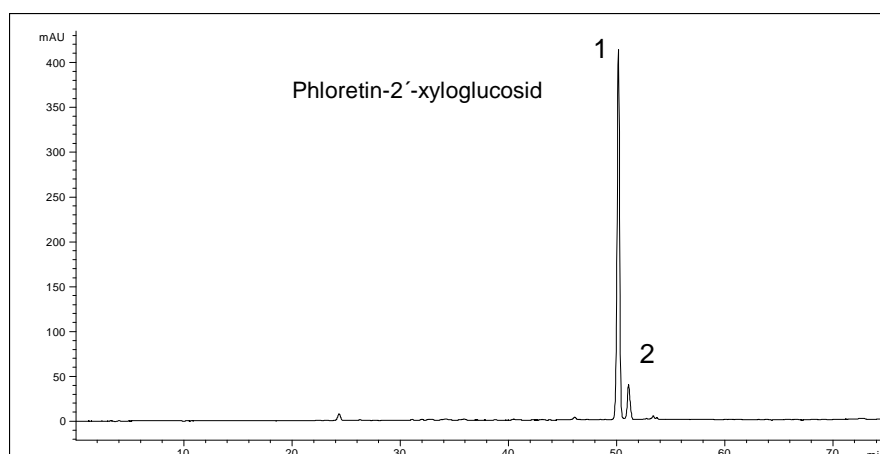


Abbildung 20: Chromatogramm des präparativ isolierten Phloretin-2'-xyloglucosid-Peaks bei 280 nm

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

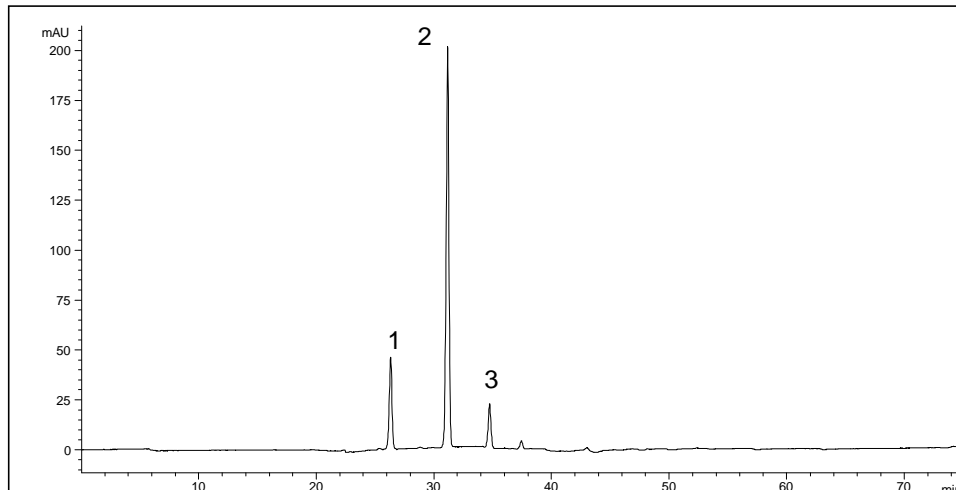


Abbildung 21: Chromatogramm des präparativ isolierten Coumaroylchinasäure-Peaks bei 320 nm

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).

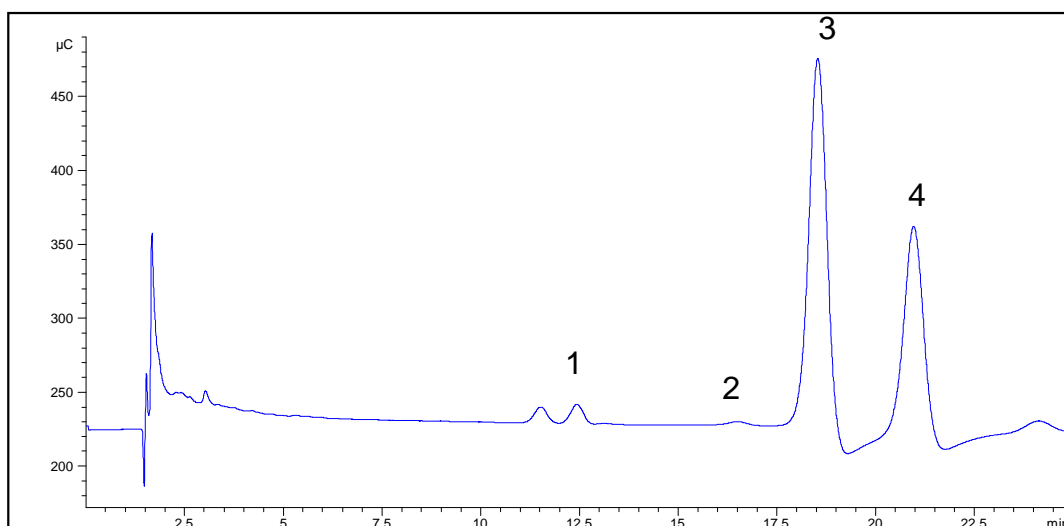


Abbildung 22: Zucker des Phloretin-2'-xylosylglucosid-Peaks nach saurer Hydrolyse Rhamnose (1), Galaktose (2), Glucose (3), Xylose (4)

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).

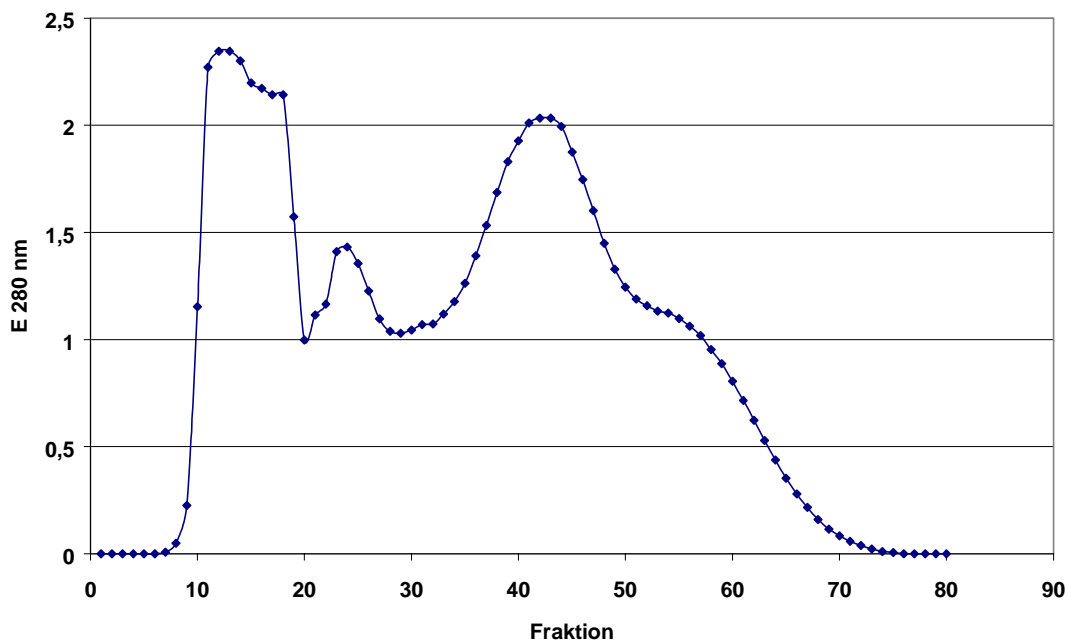


Abbildung 23: Extinktion bei 280 nm der gesammelten Fraktionen der Trennung eines Apfelsaftextraktes an einer Säule mit Sephadex LH 20 (Gelchromatogramm)

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).

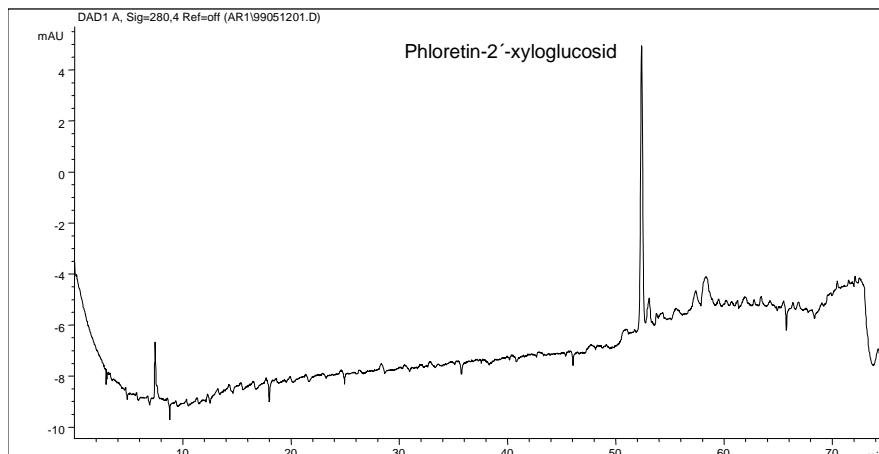


Abbildung 24: Chromatogramm von Fraktion 54 bei 280 nm

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).

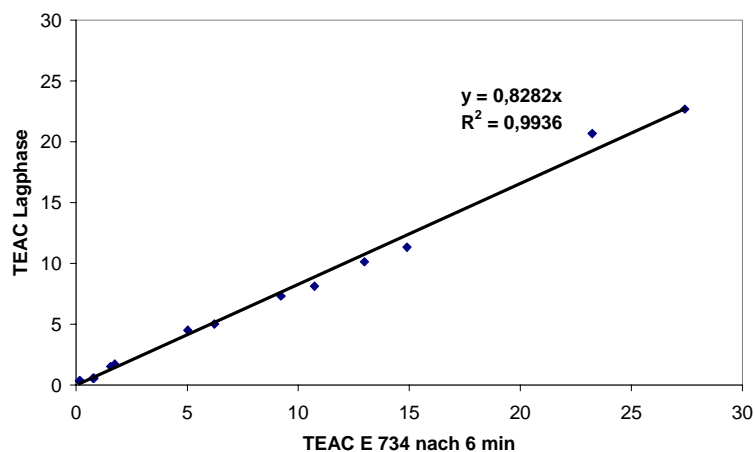


Abbildung 25: Vergleich der Messprinzipien Lagphase-Bestimmung und Extinktionsbestimmung nach 6 Minuten zur Ermittlung des TEAC-Wertes ($n = 14$)

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).

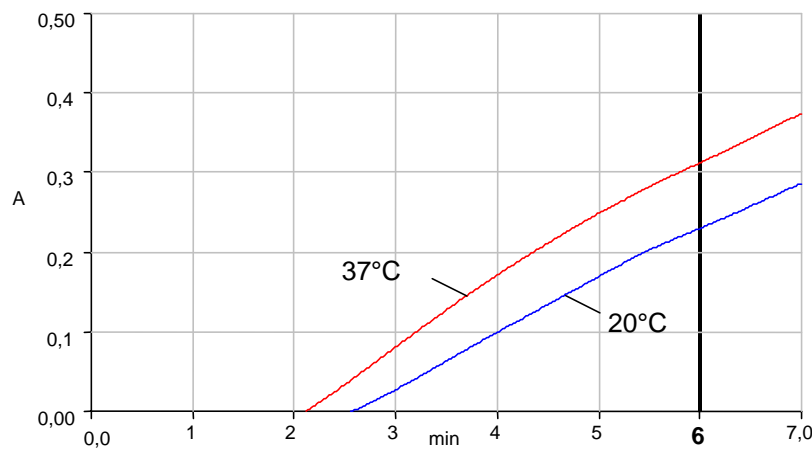


Abbildung 26: Vergleich der Farbreaktion einer Apfelsaftprobe im TEAC-Test bei 20°C und bei 37°C

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).

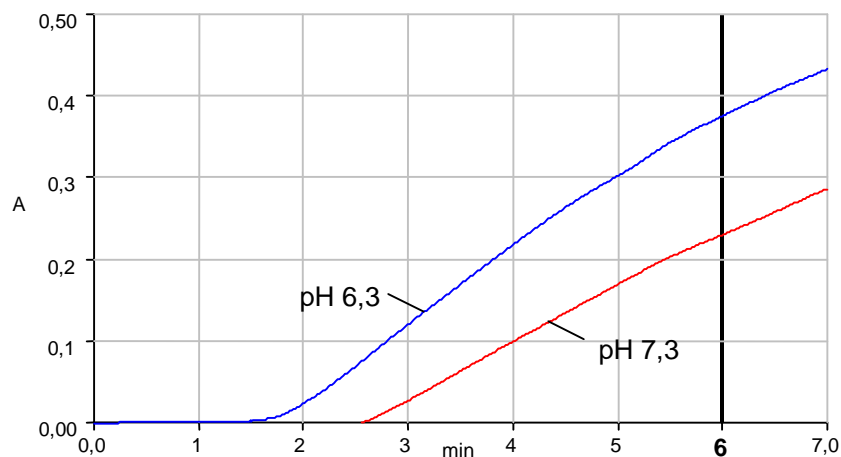


Abbildung 27: Vergleich der Farbreaktion einer Apfelsaftprobe im TEAC-Test bei Verdünnung der Probe mit entmineral. Wasser (pH 6,3) und PBS-Probenpuffer (pH 7,3)

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)
Moosbeerensaft	3	11,2 (10 – 12)
Cranberrysaft	7	11,6 (9 – 14)
Vogelbeerensaft	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, Sauerkirschsafte und Holundersafte 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 Johannisbeersafte

Ein interessanter Aspekt ist der Anteil der L-Ascorbinsäure an der antioxidativen Kapazität einiger Säfte. Dieser Anteil kann zum Teil erheblich sein. Für schwarzen Johannisbeersafte (n = 10) und Orangensaft (n = 14), die von Natur aus L-Ascorbinsäure enthalten, und für naturtrüben Apfelsafte (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).

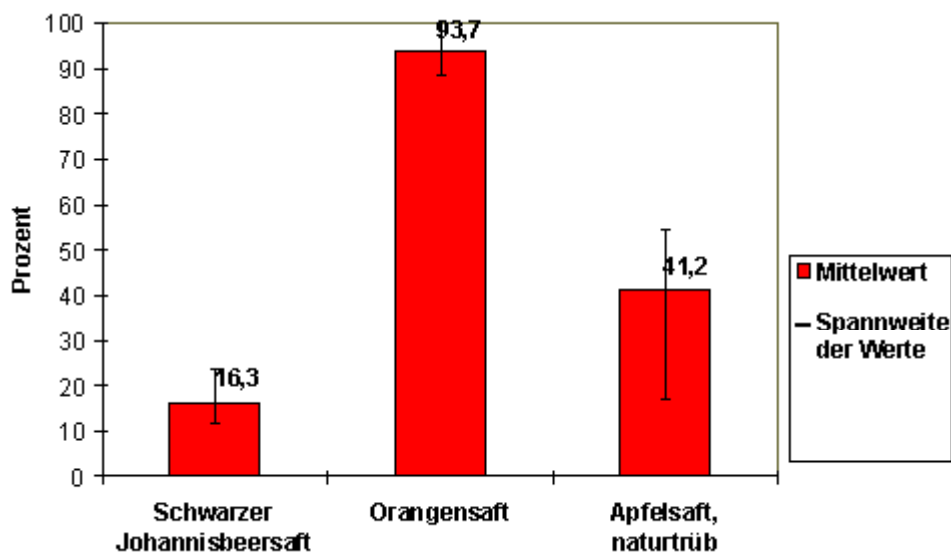


Abbildung 28: Mittlerer Anteil der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert von schwarzem Johannisbeersafte (n = 10), Orangensaft (n = 14) und naturtrübem Apfelsafte (n = 10)

Das Ergebnis zeigt, dass der Anteil der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert gerade beim naturtrübem Apfelsafte zur genaueren Beurteilung der antioxidativen Kapazität der Säfte beachtet werden muss. Beim naturtrübem Apfelsafte 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 Johannisbeersafte 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).

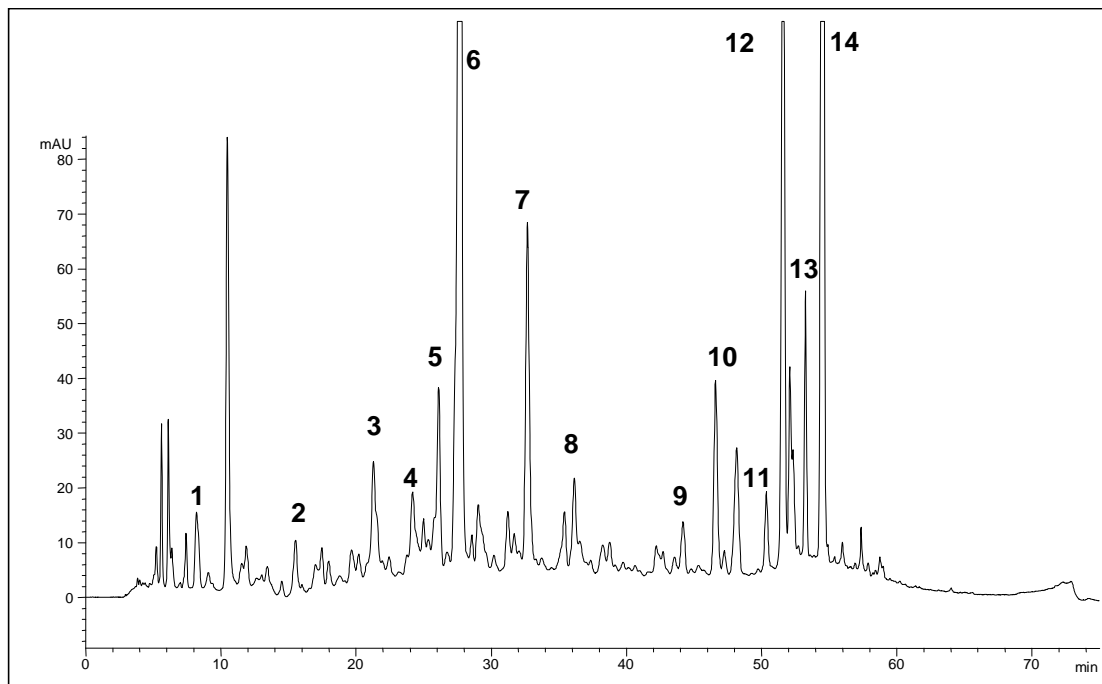


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm eines Apfelsaftes (Adsorberharz-Extrakt) an einer Fluofix-Säule bei 280 nm
Procyanidin (1), Procyanidin (2), Procyanidin B₂ (3), Coumaroylglucose (4), Kryptochlorogensäure (5), Chlorogensäure (6), 4-Coumaroylchinasäure (7), 5-Coumaroylchinasäure (8), 3-Hydroxyphloridzin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

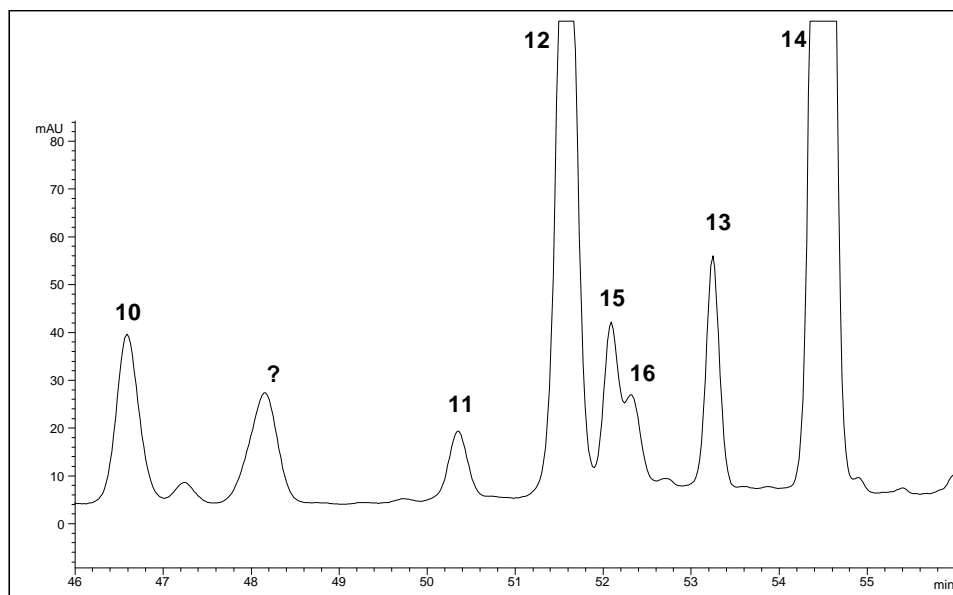


Abbildung 30: Ausschnitt 46 – 56 min des obigen Chromatogramms eines Apfelsaftes (Adsorberharz-Extrakt) bei 280 nm
Quercetin-3-galaktosid (10), Quercetin-3-glykosid (11), Phloretin-2'-xyloglucosid (12), Quercetin-3-rhamnosid (13), Phloridzin (14), Quercetin-3-glykosid (15), Phloretin-2'-xylogalaktosid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

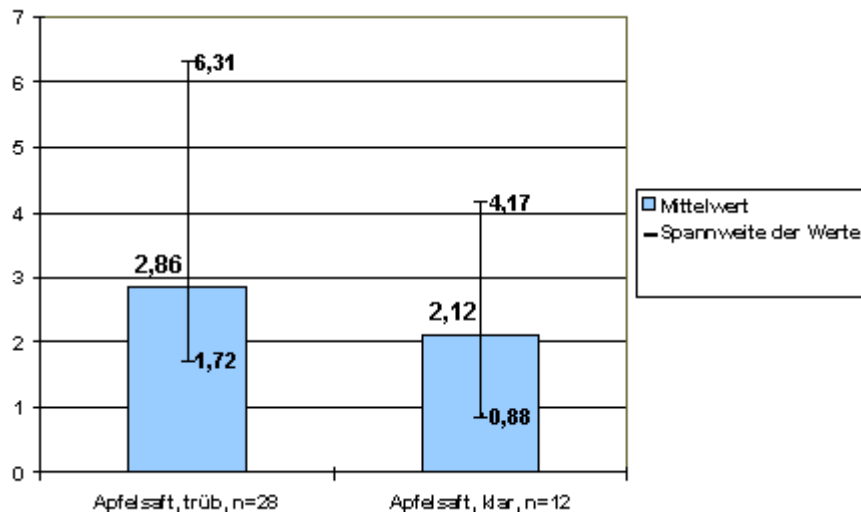


Abbildung 31: Die antioxidative Kapazität von klarem und naturtrübem Apfelsaft aus dem Handel

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).

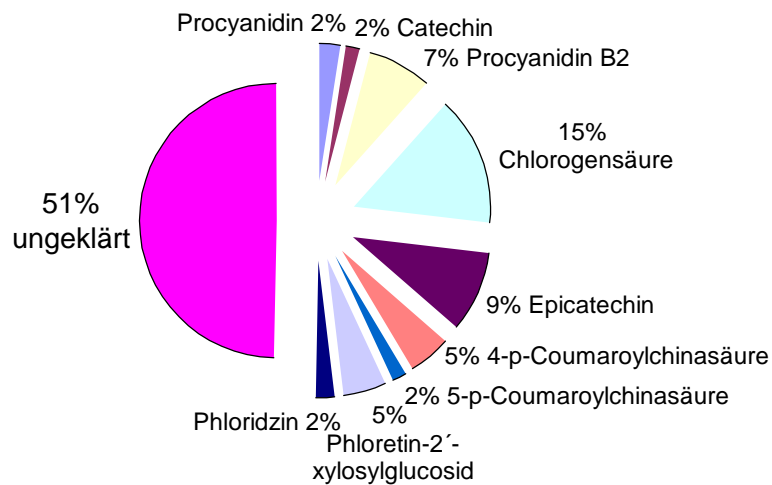


Abbildung 32: Anteil einzelner Polyphenole am TEAC-Wert eines frischen Apfelpresssaftes

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).

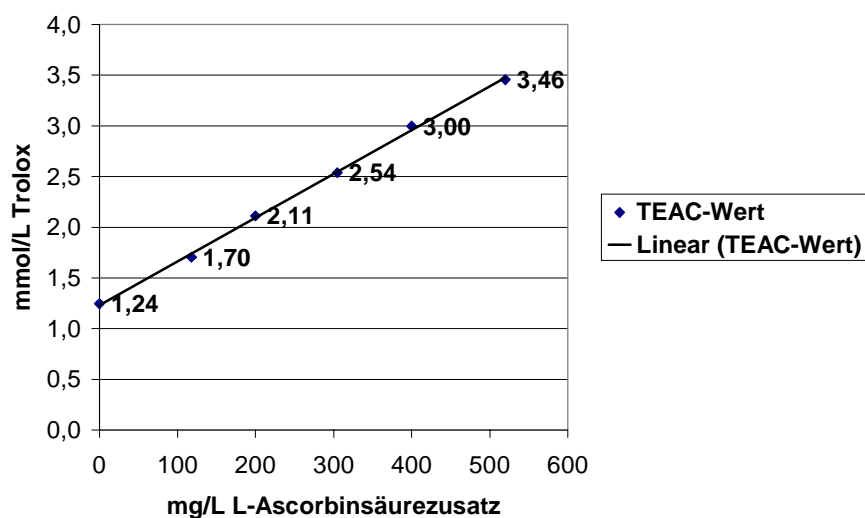


Abbildung 33: Veränderung des TEAC-Wertes von Apfelsaft bei der Zugabe von L-Ascorbinsäure

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.

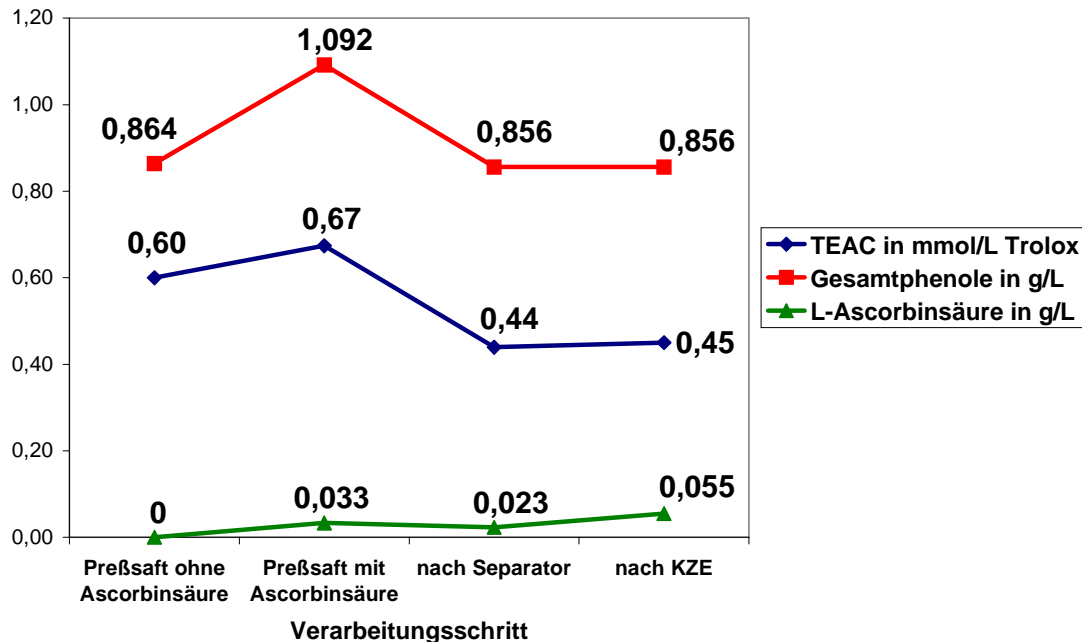


Abbildung 34: Veränderung von Gesamtphenolgehalt, TEAC-Wert und L-Ascorbinsäuregehalt bei einer L-Ascorbinsäurezugabe von 200 mg/L bei der Herstellung von naturtrübem Apfelsaft

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.

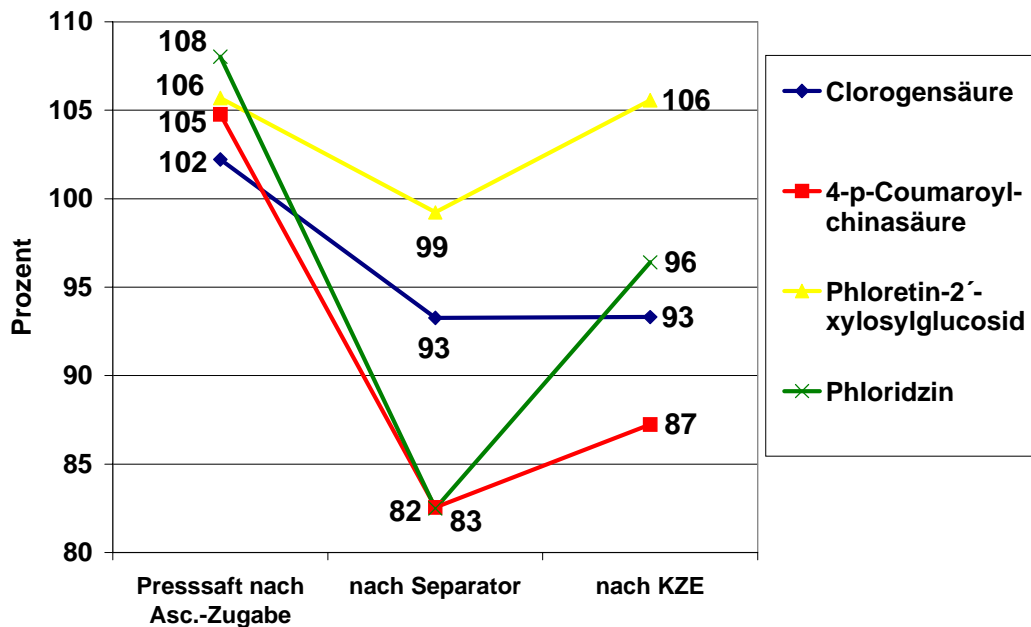


Abbildung 35: Veränderung der wichtigsten einzelnen Polyphenole während der Herstellung von naturtrübem Apfelsaft, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)

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!).

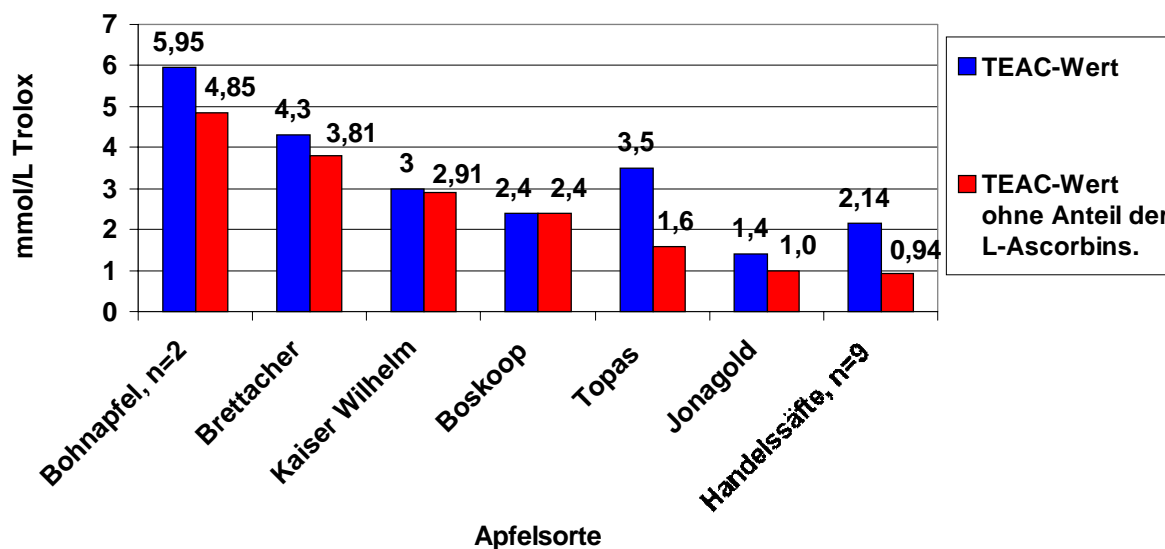


Abbildung 36: Antioxidative Kapazität naturtrüber Apfelsäfte aus verschiedenen Apfelsorten

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.

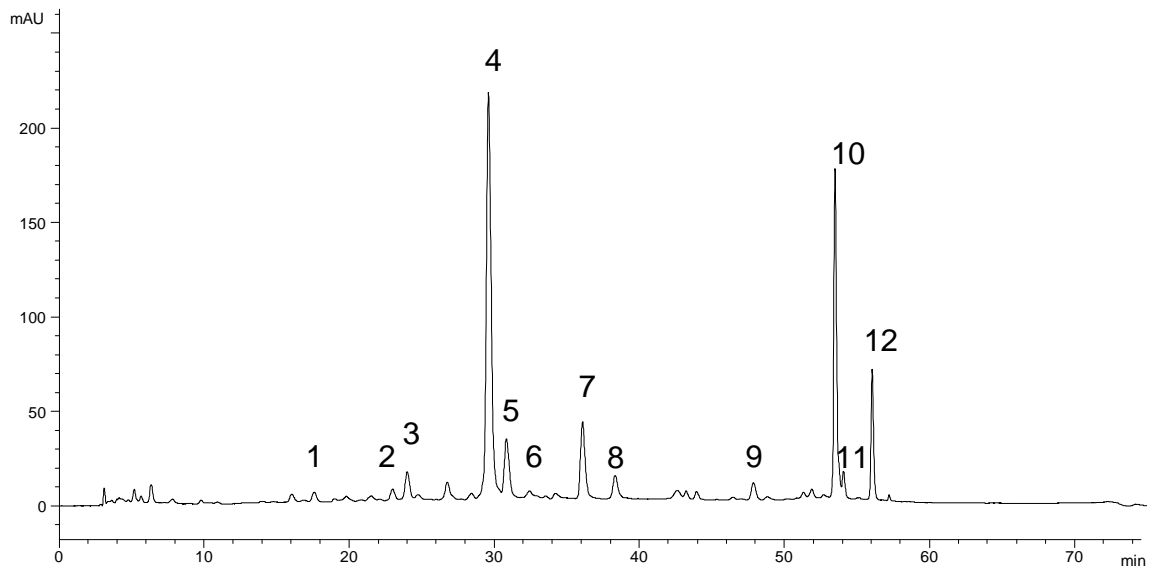


Abbildung 37: Chromatogramm der Polyphenole eines naturtrüben Apfelsaftes der Sorte „Bohnapfel“ bei 280 nm
 Procyanidin (1), Catechin (2), Procyanidin B₂ (3), Chlorogensäure (4), Epicatechin (5), Procyanidin (6), 4-p-Coumaroylchinasäure (7), 5-p-Coumaroylchinasäure (8), Quercetin-3-galaktosid (9), Phloretin-2'-xyloglucosid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

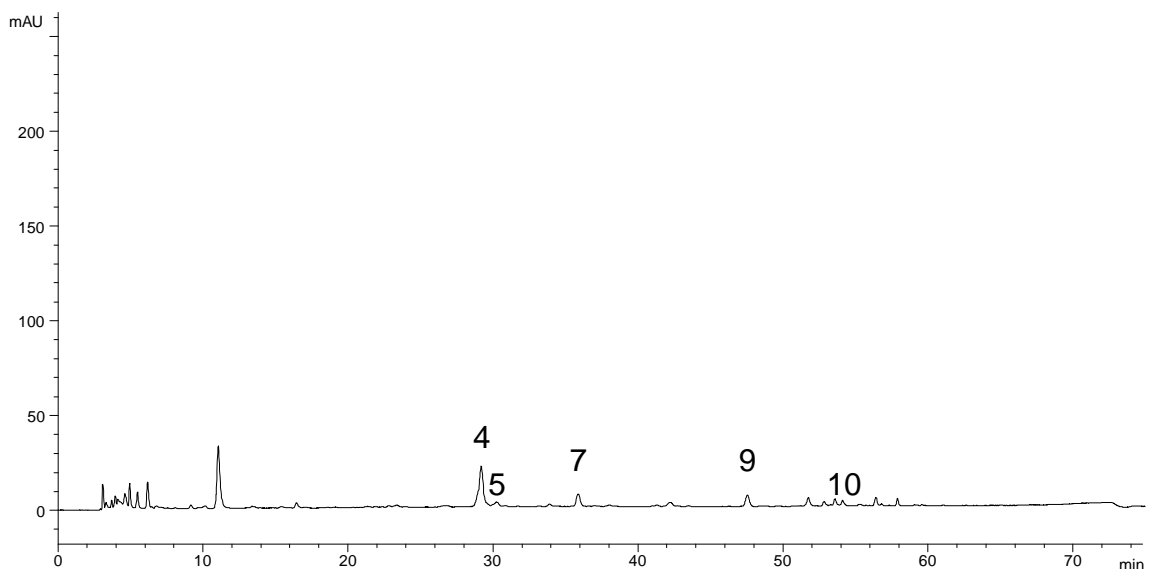


Abbildung 38: Chromatogramm der Polyphenole eines naturtrüben Apfelsaftes der Sorte „Jonagold“ bei 280 nm (gleicher Maßstab wie Abb. 37)
 Chlorogensäure (4), Epicatechin (5), 4-p-Coumaroylchinasäure (7), Quercetin-3-galaktosid (9), Phloretin-2'-xyloglucosid (10)

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).

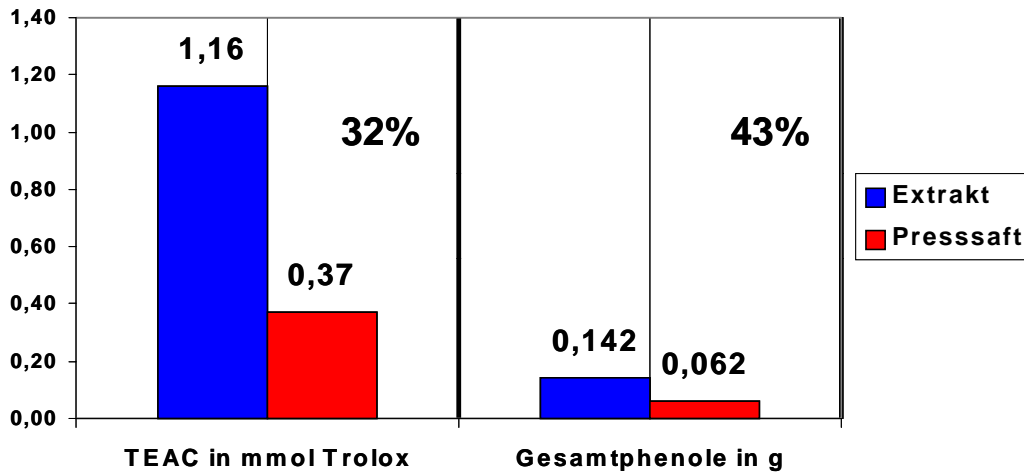


Abbildung 39: Absolute TEAC-Werte und Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu von Presssaft und Maischeextrakt aus der gleichen Maischemenge sowie die Ausbeuten in Prozent für den Presssaft

Die Ergebnisse zeigen, dass 43% der möglichen Polyphenol Ausbeute 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.

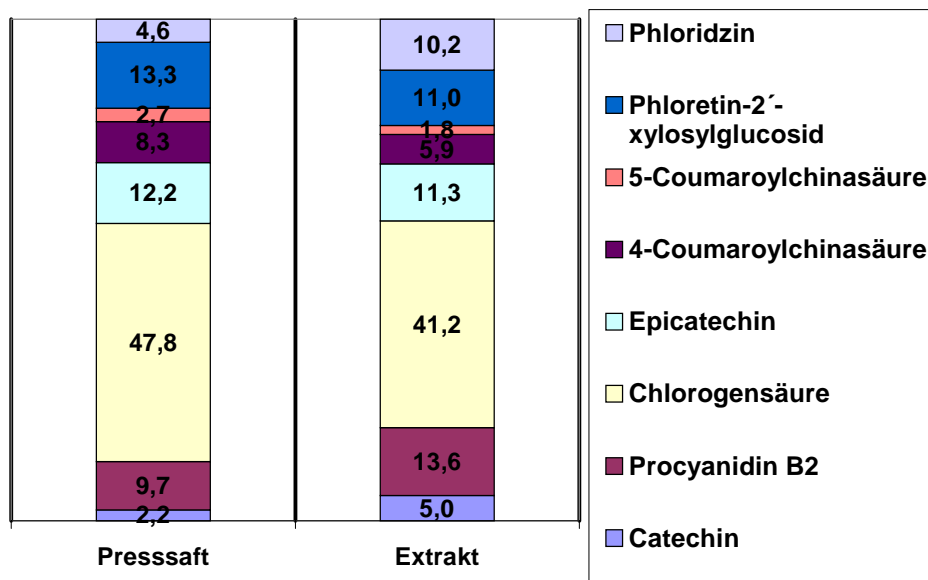


Abbildung 40: Prozentuale Anteile der wichtigsten Polyphenole am Fingerprintmuster von Presssaft und Extrakt

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).

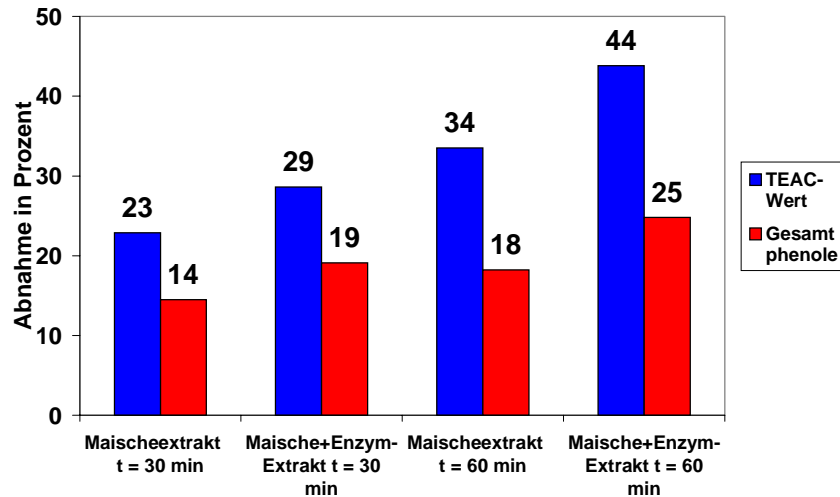


Abbildung 41: Abnahme des TEAC-Wertes und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu während der Standzeit (60 min) von Apfelmaische mit und ohne Pectinasezugabe, bezogen auf die frische Maische (100%)

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).

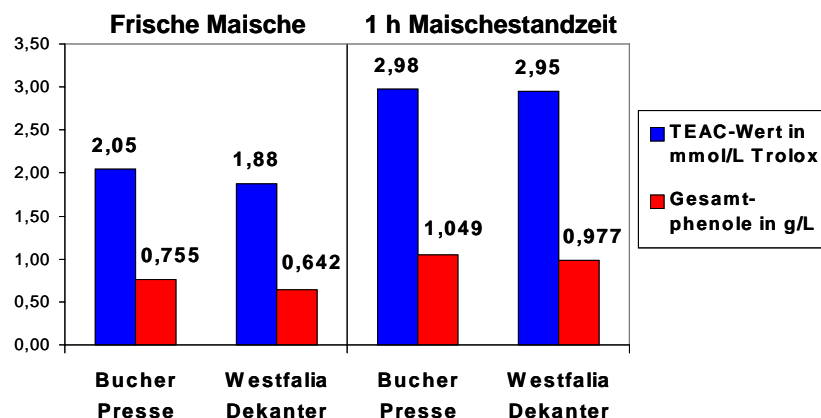


Abbildung 42: Einfluss der Maischestandzeit auf den Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und den TEAC-Wert in Apfelsaft bei zwei verschiedenen Entsaftungssystemen (Bucher HP 10000 und Westfalia Dekanter CA 505)

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.

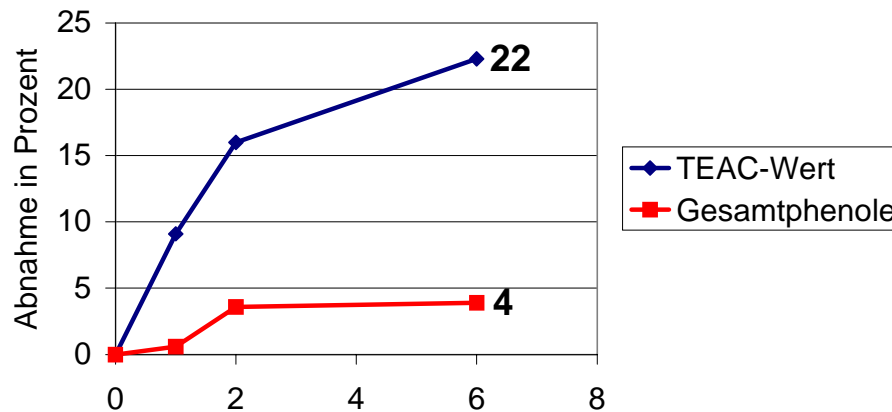


Abbildung 43: Abnahme des TEAC-Wertes und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu von Apfelsaft während einer Standzeit von 6 Stunden

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.

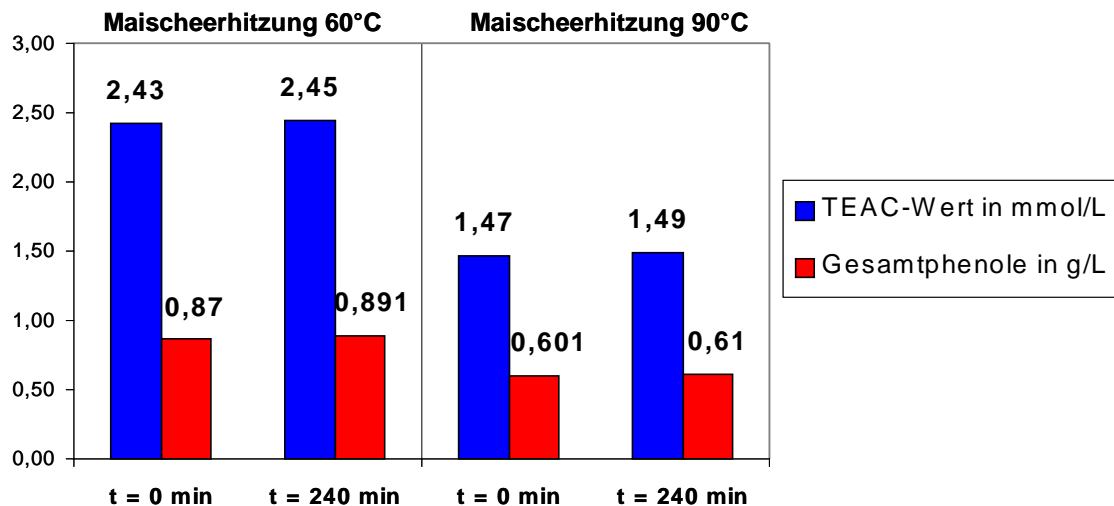


Abbildung 44: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt von Apfelpresssaft bei zwei Varianten der Maischeerhitzung nach einer Standzeit von 4 Stunden

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 Polyphenoxidasen 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.

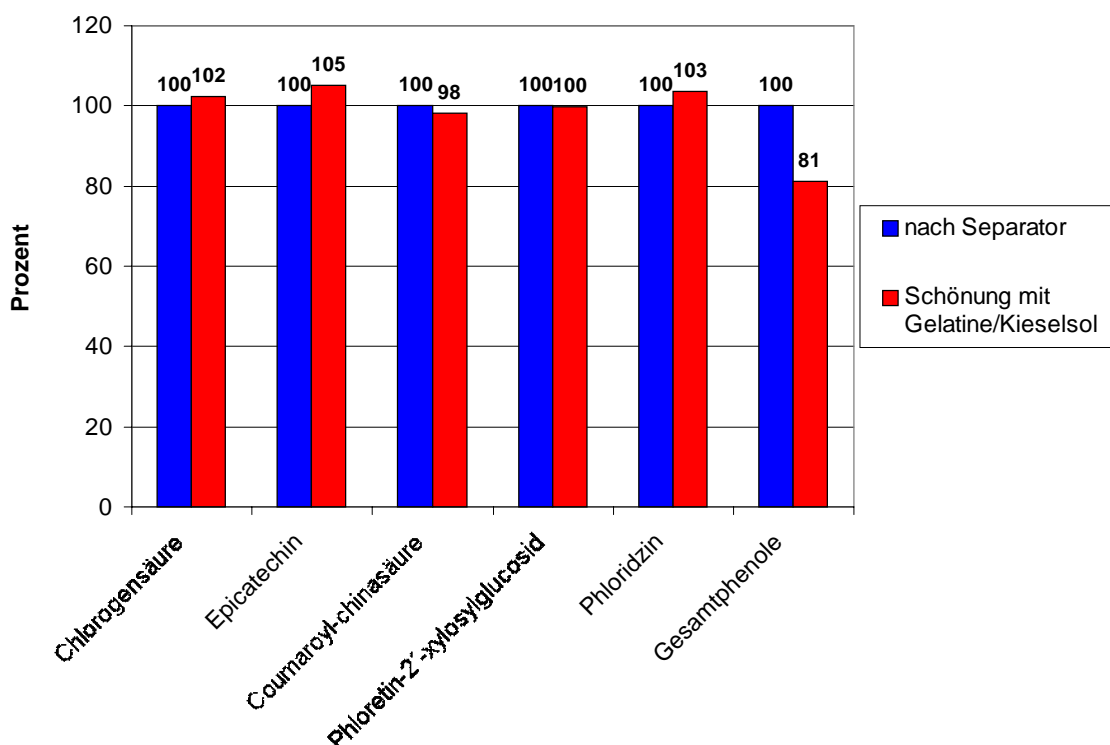


Abbildung 45: Veränderung der Gehalte einzelner Polyphenole und des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu bei der Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels einer Schönung mit 14 g/hL Gelatine + 140 mL/hL Kieselsoil (15%)

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).

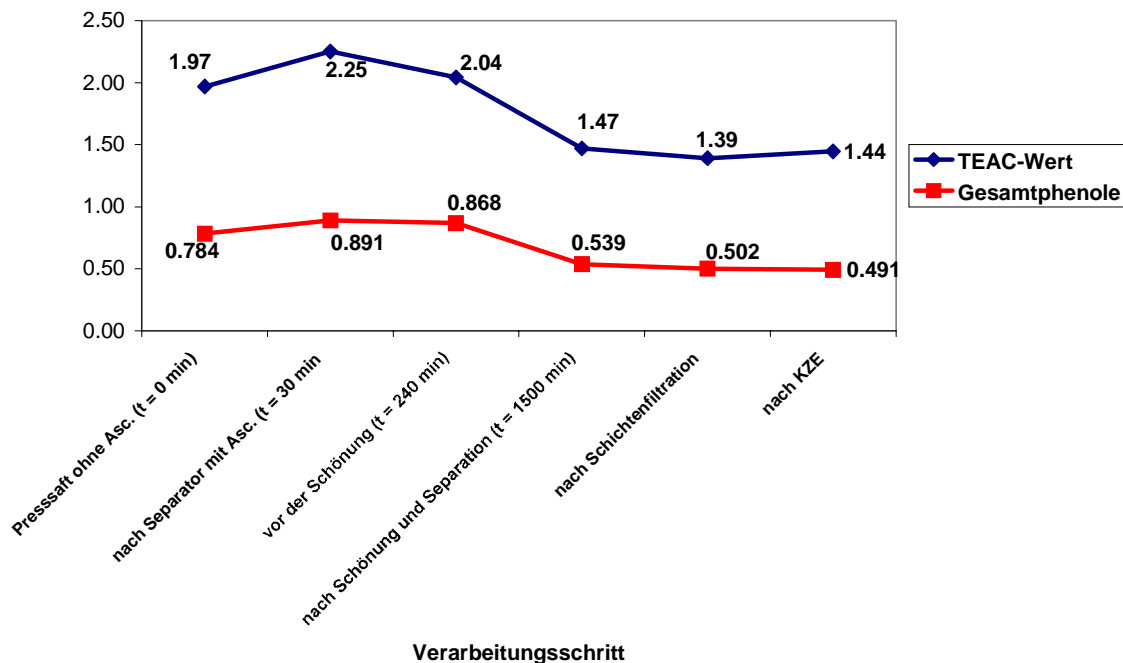


Abbildung 46: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu während der Herstellung eines klaren Apfelsaftes mittels Gelatine/Kieselol-Schönung

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.

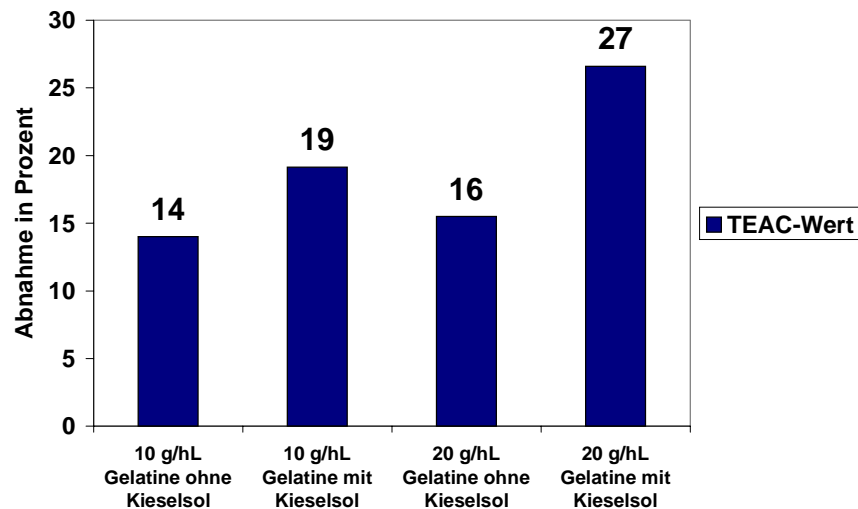


Abbildung 47: Einfluss der Kieselzolzugabe bei der Gelatineschönung auf den TEAC-Wert von Apfelsaft, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%)

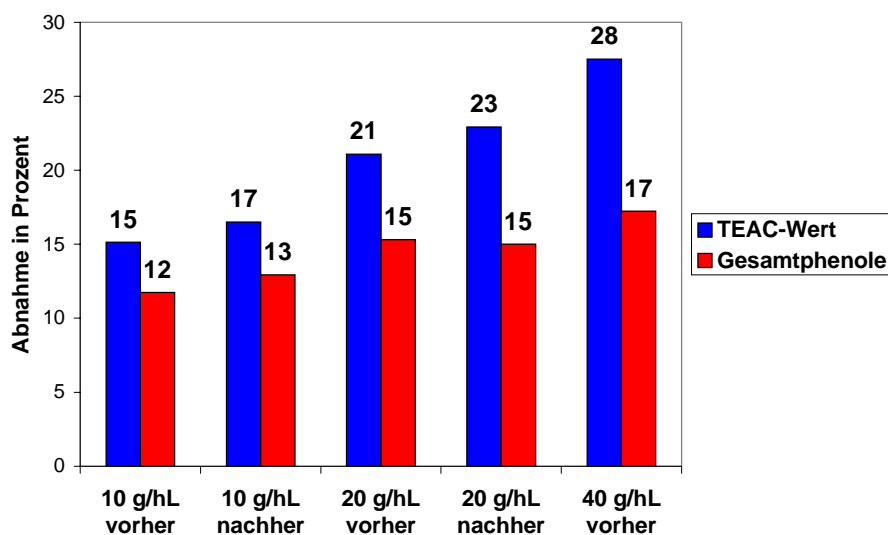


Abbildung 48: Einfluss des Zeitpunktes der Kieselzolzugabe bei der Gelatineschönung auf den TEAC-Wert und den Gesamtphenolgehalt von Apfelsaft, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%)

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).

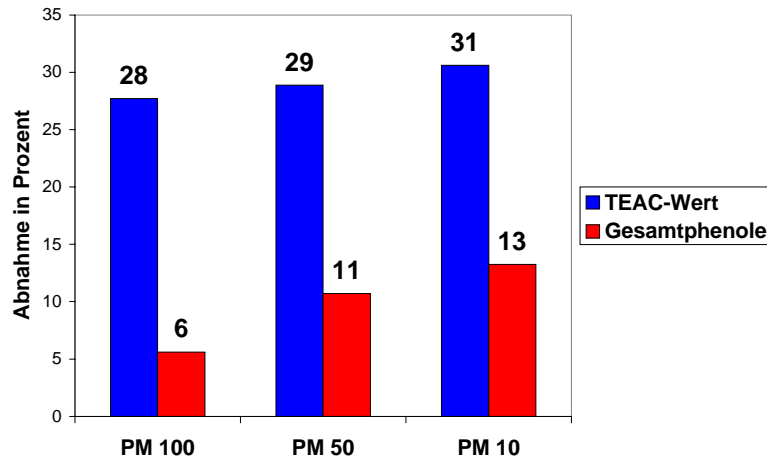


Abbildung 49: Abnahme von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu nach einer Ultrafiltration von naturtrübem enzymiertem Apfelsaft mit verschiedenen Trenngrößen, bezogen auf den unfiltrierten Saft (100%)

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 Apfelsafttrub, der nur einen Gewichtsanteil am trübem Saft von etwa 3 - 5% hat (Gewicht des Schleudertrubs), ca. 30% der antioxidativen Kapazität des trübem 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 Trub lokalisierten antioxidativ wirksamen Substanzen, vermutlich hochmolekulare Antioxidantien, gar nicht oder kaum, so dass ihr Verlust durch die Entfernung des Trubes 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).

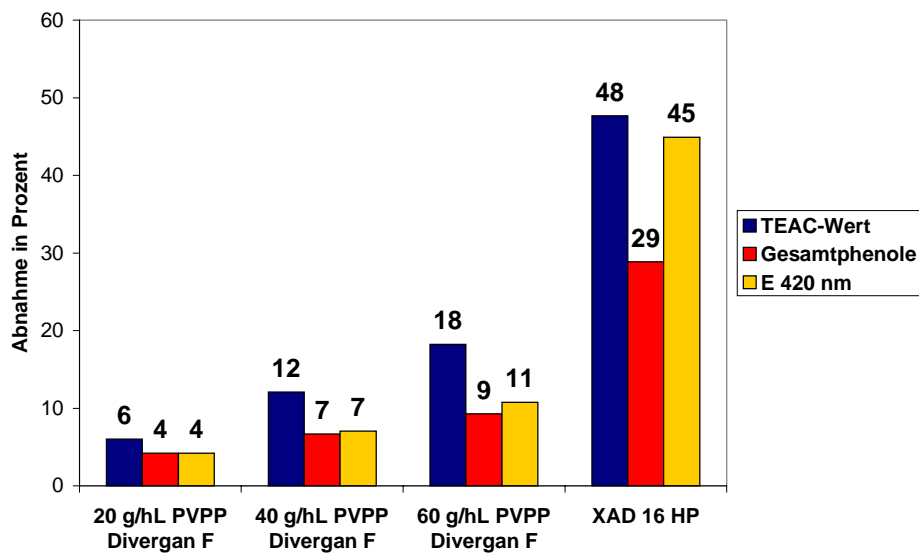


Abbildung 50: Abnahme des TEAC-Wertes, des Gesamtphenolgehaltes und des Farbwertes E 420 nm von mikrofiltriertem Apfelsaft bei der Behandlung mit PVPP Divergan F und Adsorberharz XAD 16 HP (65 BV bei 25 BV/h), bezogen auf den mikrofiltrierten Apfelsaft (100%)

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).

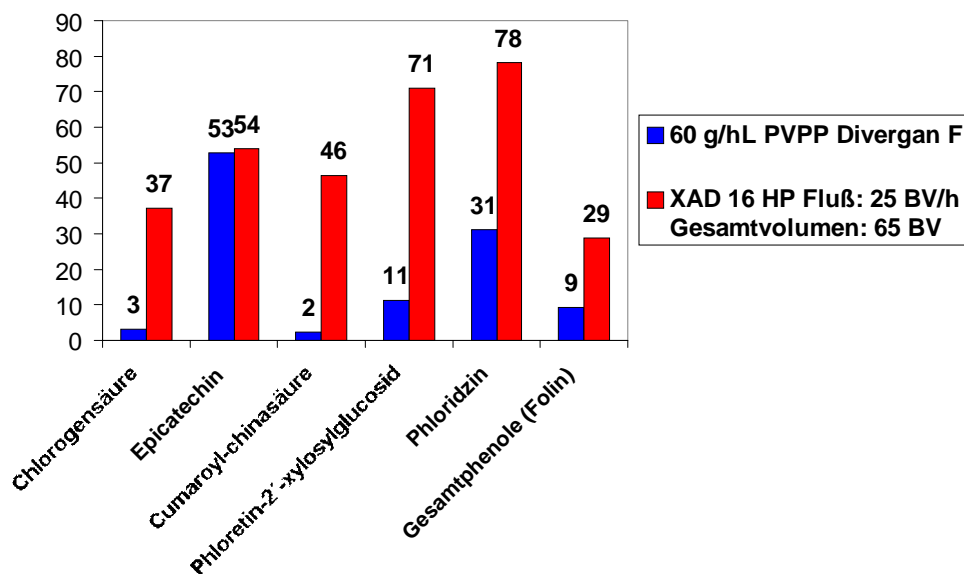


Abbildung 51: Abnahme einzelner Polyphenole nach der Stabilisierung von mikrofiltriertem Apfelsaft mittels PVPP und Adsorberharzsäule, bezogen auf den mikrofiltrierten Saft (100%)

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).

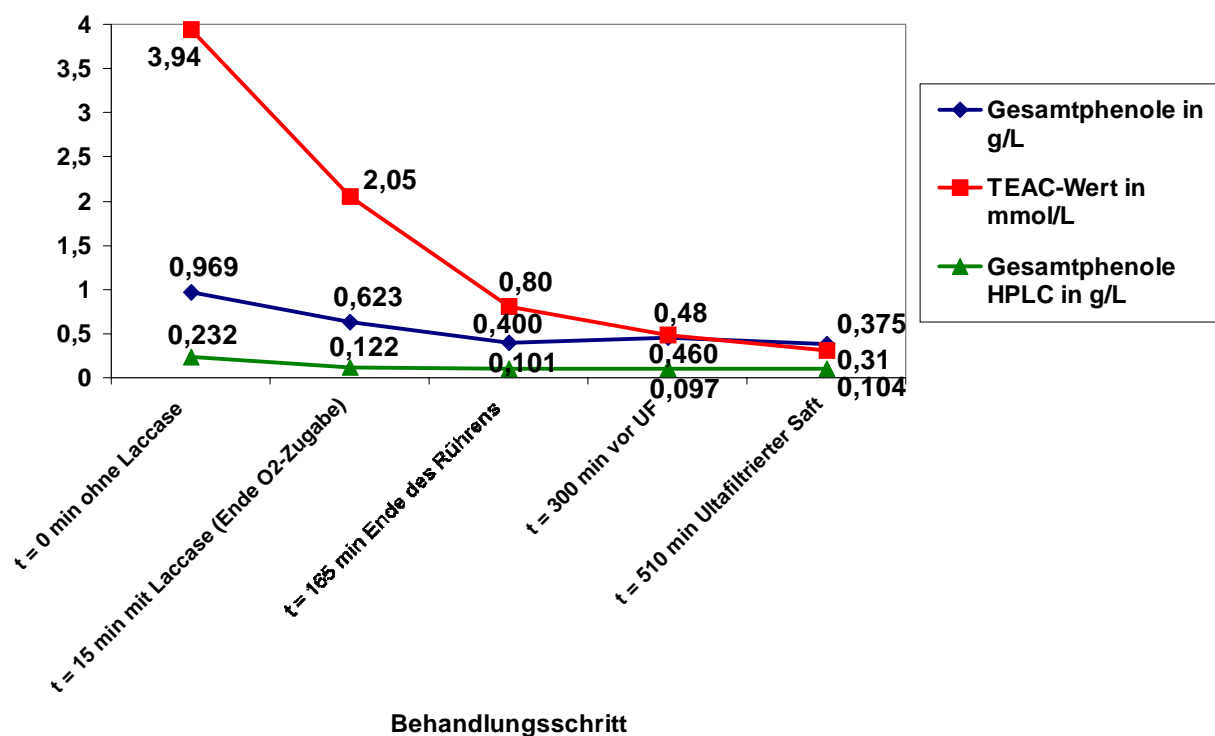


Abbildung 52: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu sowie mittels HPLC während des Laccase-Versuchs

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).

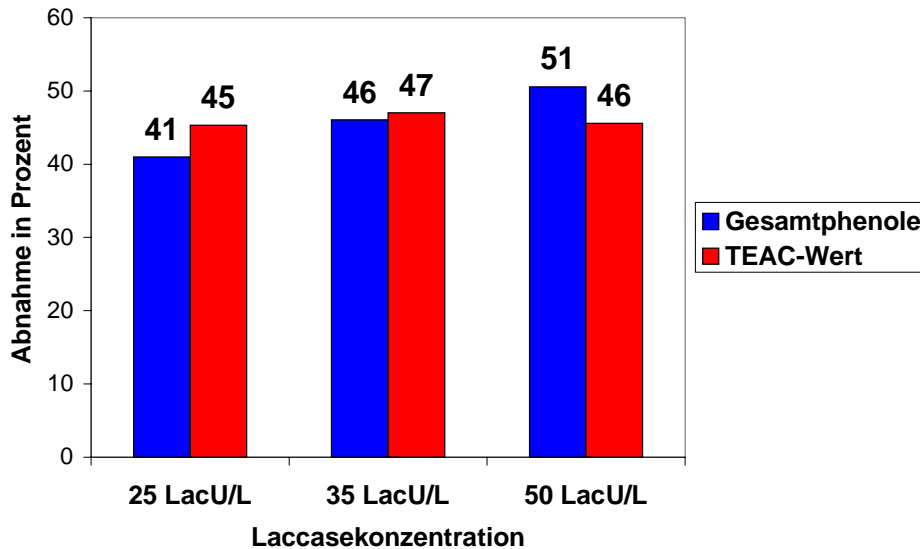


Abbildung 53: Abnahme von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu eines mit verschiedenen Laccasekonzentrationen behandelten, ultrafiltrierten Apfelsaftes, bezogen auf den ultrafiltrierten, unbehandelten Saft (100%)

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/Kieselol-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.

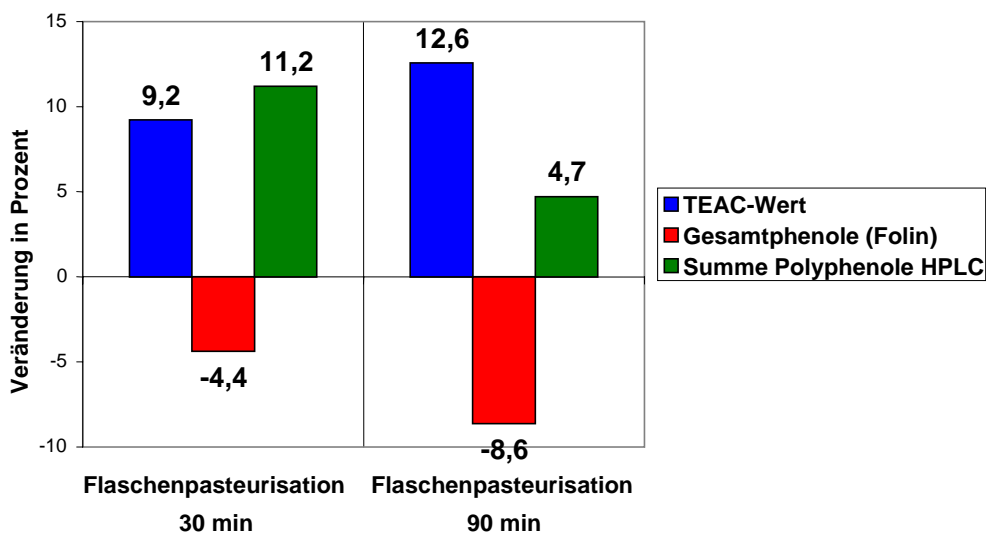


Abbildung 54: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Summe der einzelnen Polyphenole mittels HPLC während der Flaschenpasteurisation, bezogen auf den Saft vor der Pasteurisation (100%)

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).

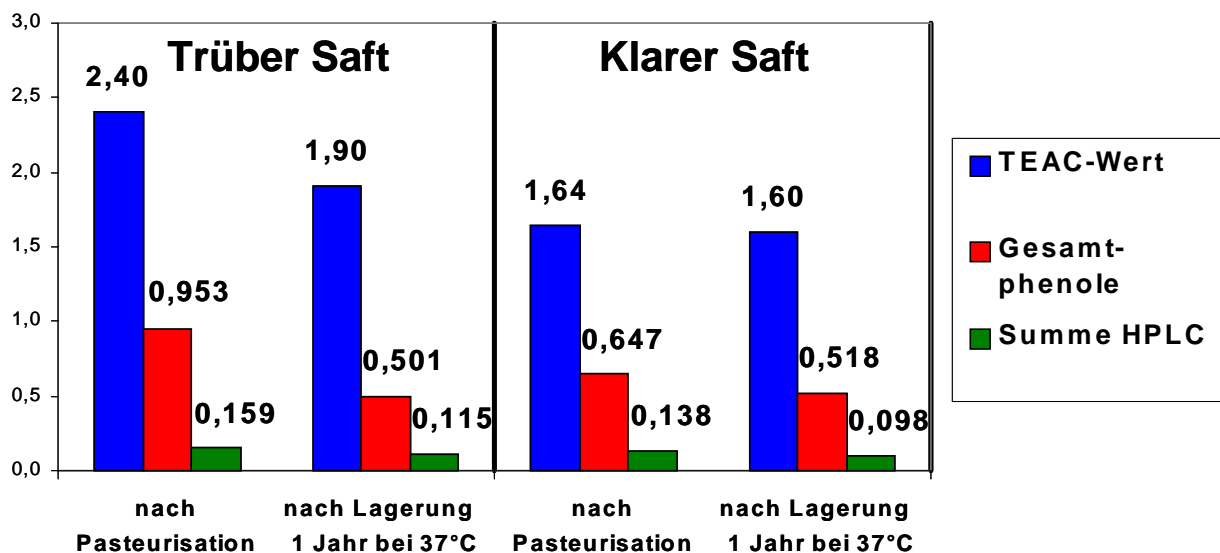


Abbildung 55: TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu von klarem und trübem Apfelsaft der Sorte Boskoop vor und nach einer einjährigen Lagerung bei 37°C

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.

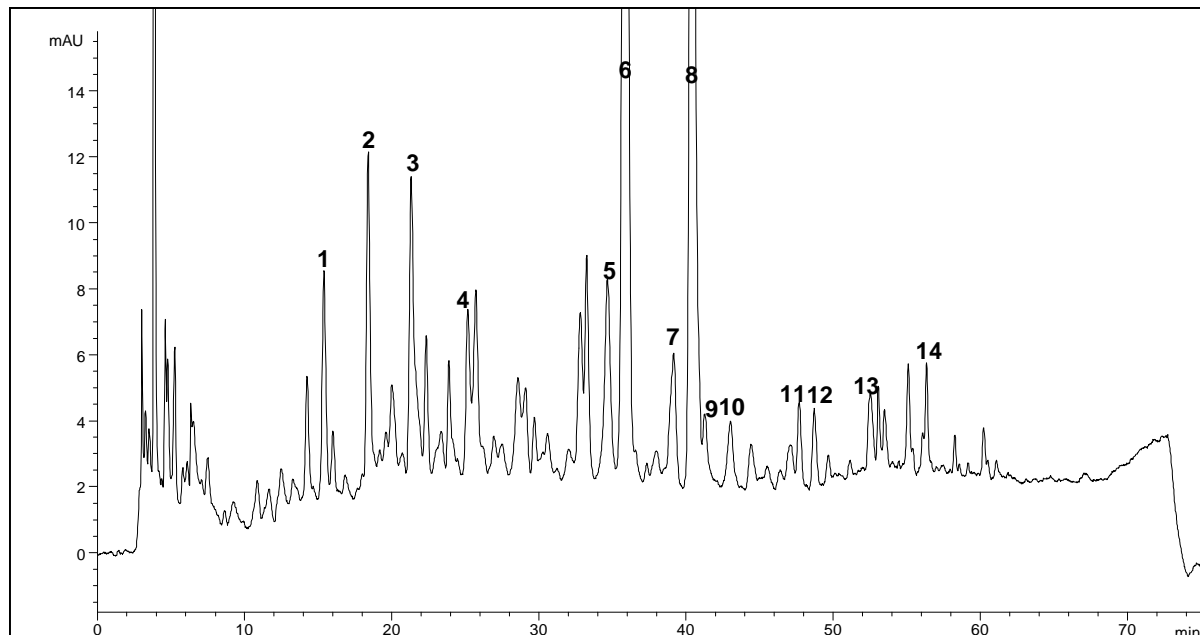


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm eines schwarzen Johannisbeersaftes (frischer Presssaft) an einer Fluofix-Säule bei 280 nm
 Caffeoylglucose (1)*, Neochlorogensäure (2), Coumaroylglucose (3)*, 3-p-Coumaroylchinasäure (4)*, Delphinidin-3-glucosid (5), Delphinidin-3-rutinosid (6), Cyanidin-3-glucosid (7), 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).

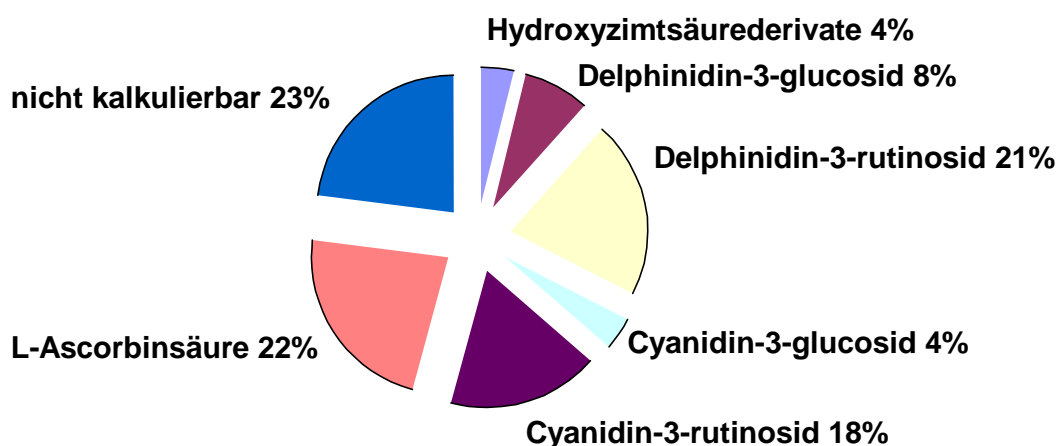


Abbildung 57: Anteil einzelner Polyphenole und der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert eines frischen schwarzen Johannisbeersaftes

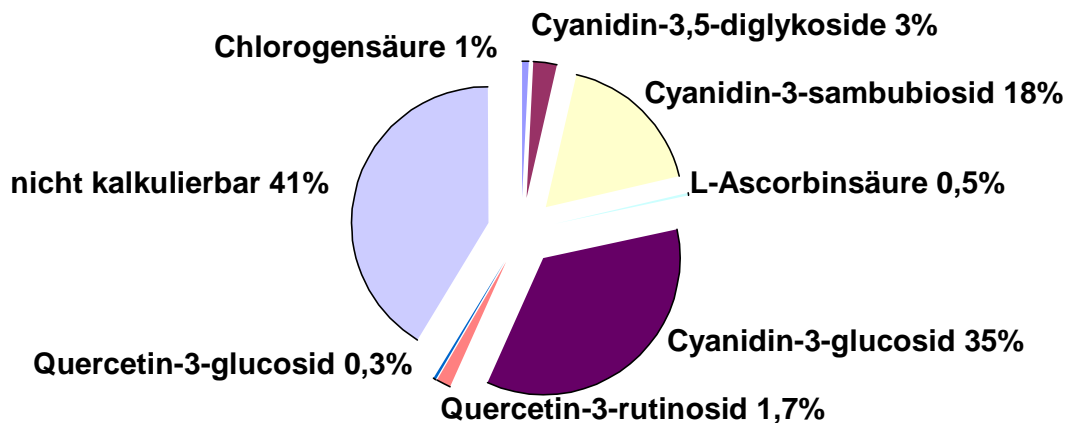


Abbildung 58: Anteil einzelner Polyphenole und der L-Ascorbinsäure am TEAC-Wert eines frischen Holunderpresssaftes

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.

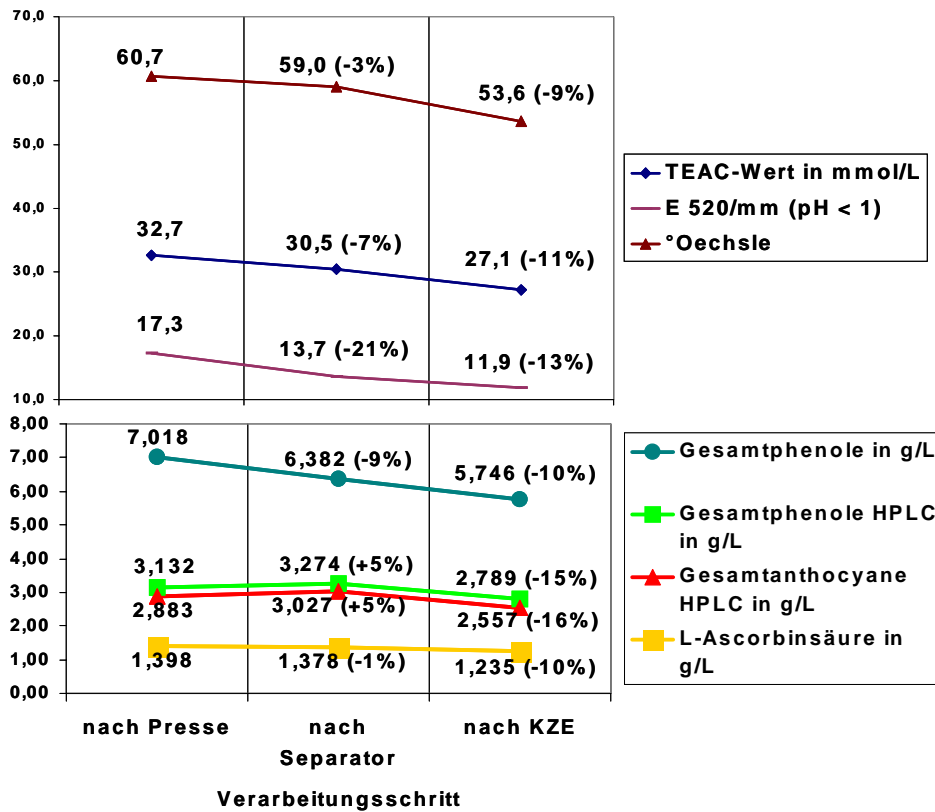


Abbildung 59: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtphenolgehalt und –anthocyanengehalt mittels HPLC, E 520/mm (pH < 1), L-Ascorbinsäuregehalt und Extraktgehalt während der Herstellung von schwarzem Johannisbeersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen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

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

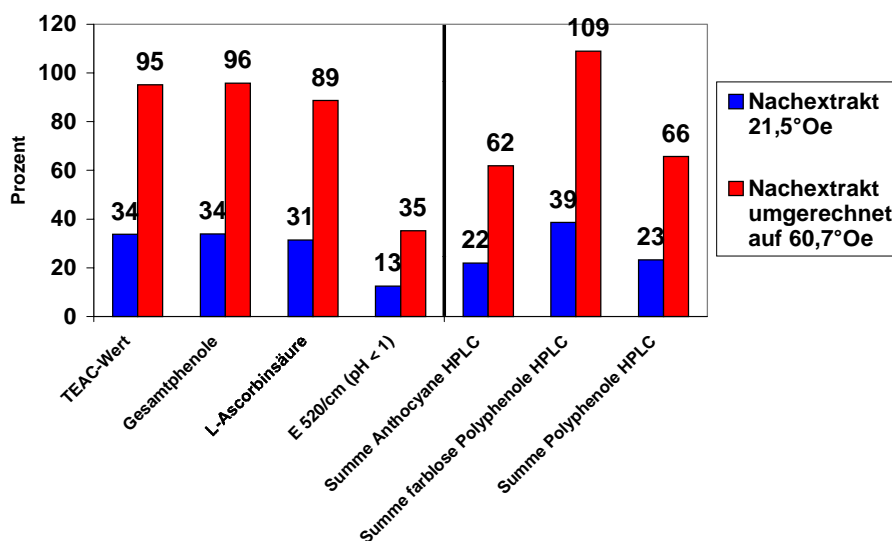


Abbildung 60: TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, L-Ascorbinsäuregehalte, Farbwert E 520/cm (pH < 1) sowie die Summen der Gehalte an Anthocyanen, farblosen Polyphenole und aller Polyphenole mittels HPLC von Nachextrakt und umgerechneten Nachextrakt einmal entsafteter schwarzen Johannisbeeren,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

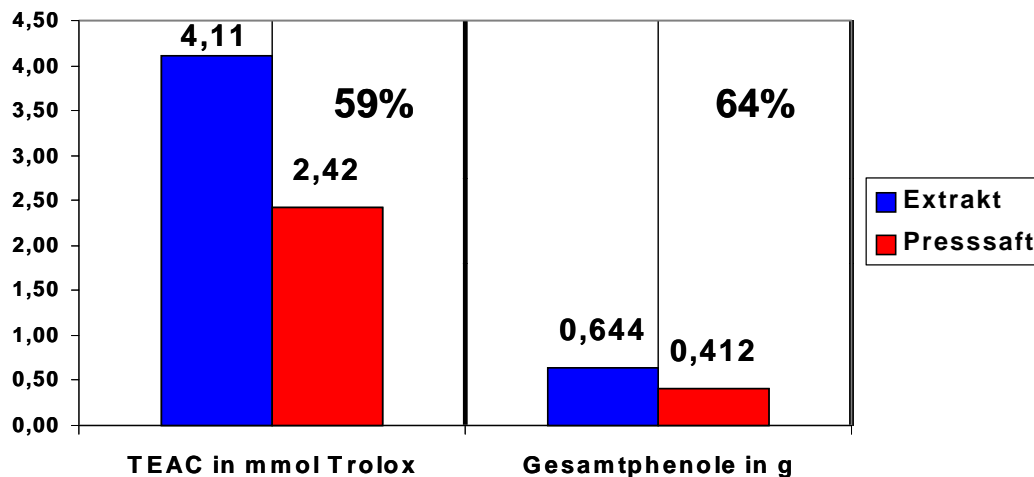


Abbildung 61: Absoluter TEAC-Werte und absoluter Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu von Presssaft und Maischeextrakt aus 100 g schwarzer Johannisbeermasche sowie die Ausbeuten in Prozent für den Presssaft

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 monomere Anthocyanen von ca. 50% durch den Konzentrierungsprozess im Vergleich zum direkt hergestellten Saft als negativ zu beurteilen.

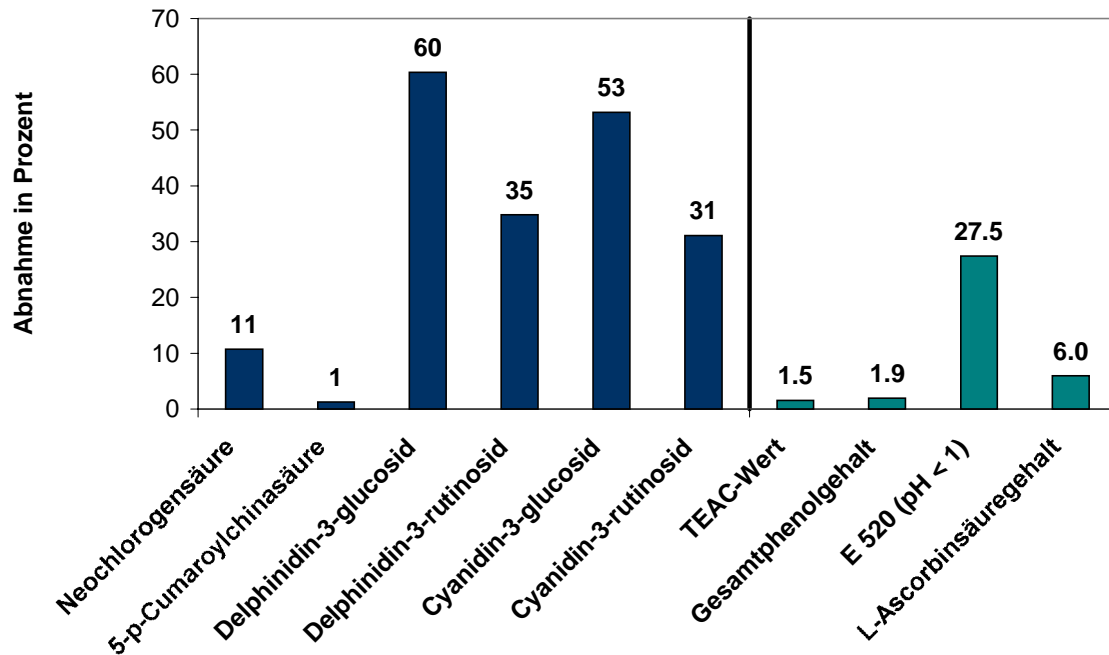


Abbildung 62: Abnahme einzelner Polyphenole und Anthocyane sowie des TEAC-Wertes, des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu, der Extinktion bei 520 nm (pH < 1) und des L-Ascorbinsäuregehaltes von schwarzem Johannisbeersaft nach dem Konzentratherstellungsprozess, bezogen auf den Muttersaft vor dem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

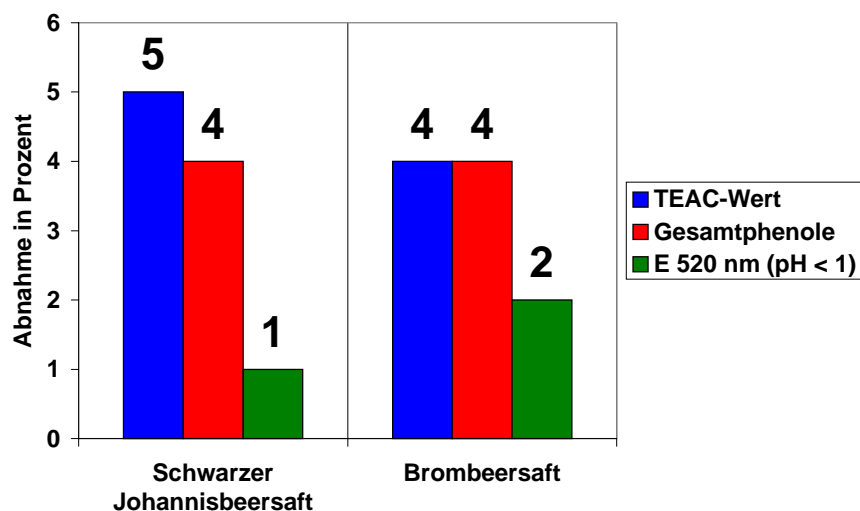


Abbildung 63: Abnahme von TEAC-Wert, Farbwert E 520 nm und Gesamtphenolgehalt nach einer Schönung von schwarzem Johannisbeersaft und Brombeersaft mit 15 g/hL Gelatine, bezogen auf den ungeschönten Saft (100%)

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.

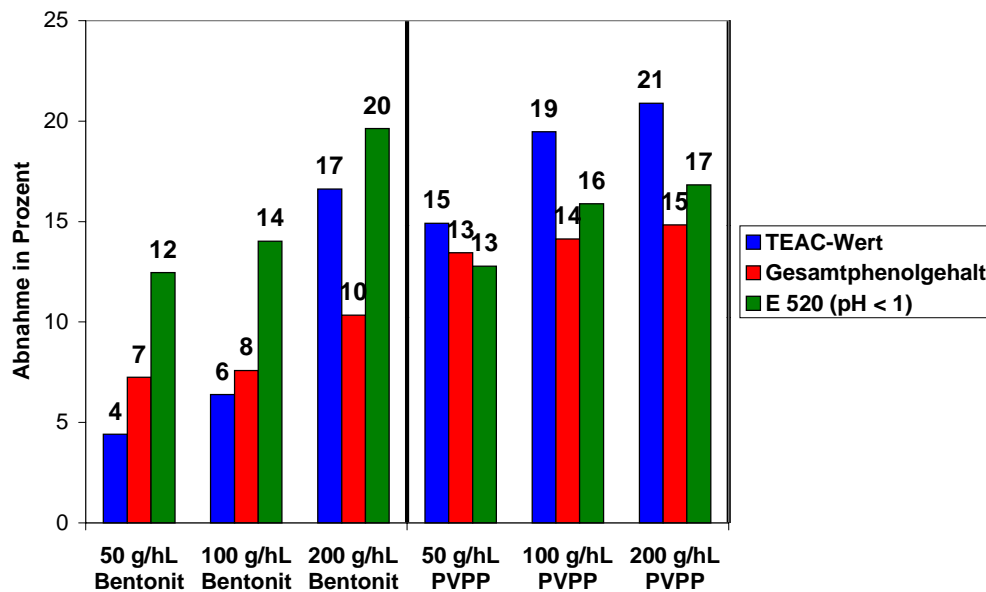


Abbildung 64: Abnahme von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und der Extinktion bei 520 nm/cm (pH < 1) nach der Behandlung von schwarzem Johannisbeersaft mit verschiedenen Mengen an PVPP und Bentonit.

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).

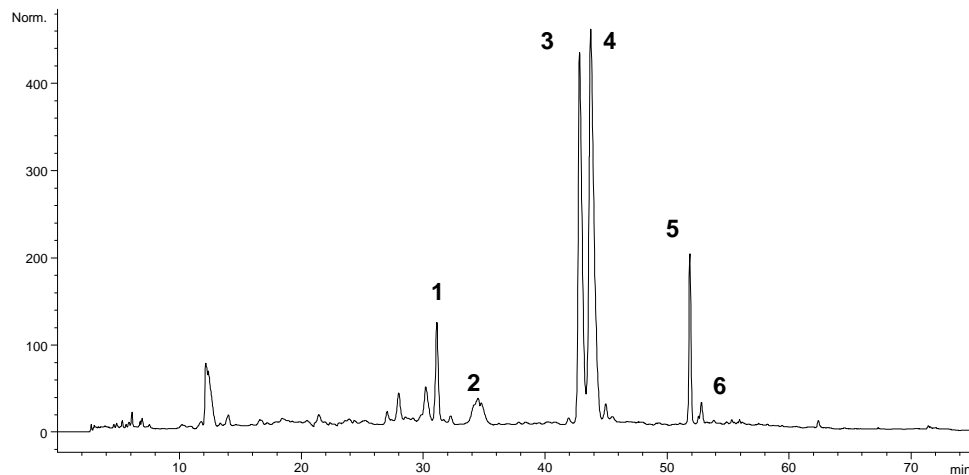


Abbildung 65: HPLC-Chromatogramm eines frischen Holunderpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm
Chlorogensäure (1), Cyanidin-3,5-diglucosid + Cyanidin-3-sambubiosyl-5-glucosid (2), Cyanidin-3-sambubiosid (3), Cyanidin-3-glucosid (4), Quercetin-3-rutinosid (5), Quercetin-3-glucosid (6)

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).

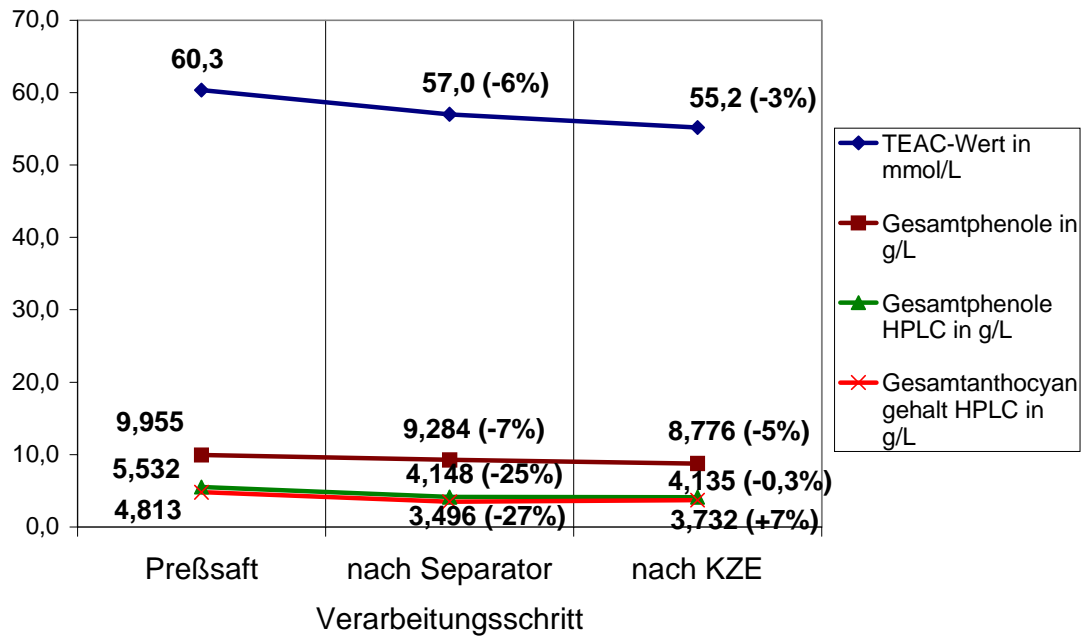


Abbildung 66: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Gesamtphenol- und Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC während der Herstellung von Holundersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.

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.

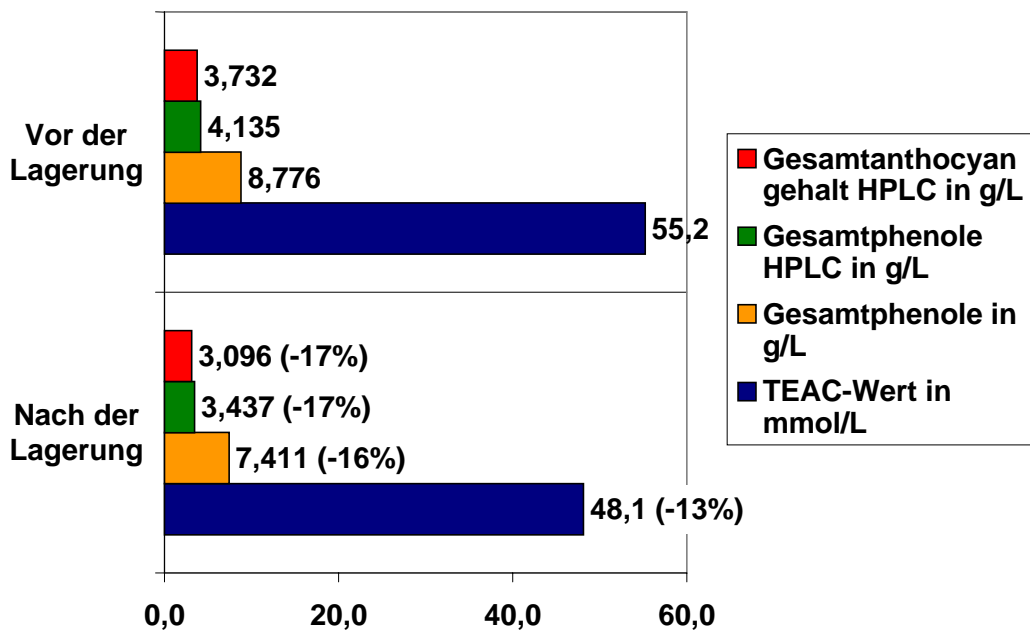


Abbildung 67: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu sowie Gesamtphenol- und Gesamtanthocyangehalt mittels HPLC von steril eingelagertem Holundersaft nach 6 Monaten Tanklagerung

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.

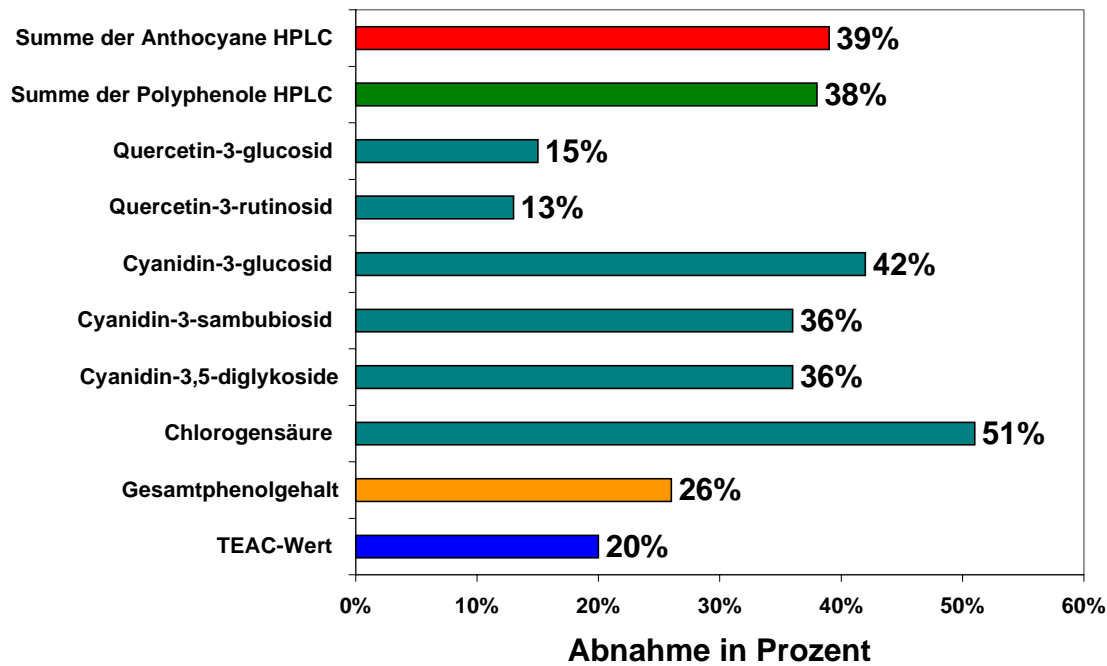


Abbildung 68: Prozentuale Abnahme von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtphenol- und Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC sowie der einzelnen Polyphenole mittels HPLC über den gesamten Herstellungs- und Lagerungsprozess von Holundersaft, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)

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).

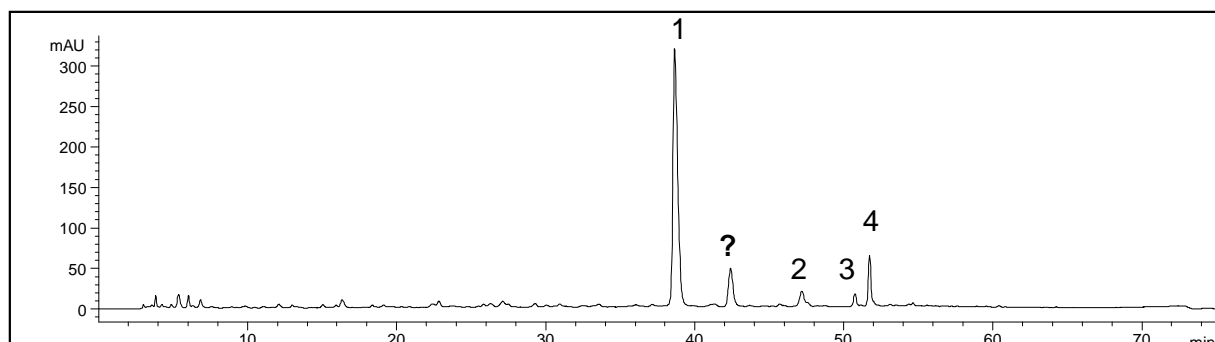


Abbildung 69: HPLC-Chromatogramm eines Brombeerpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280 nm

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.

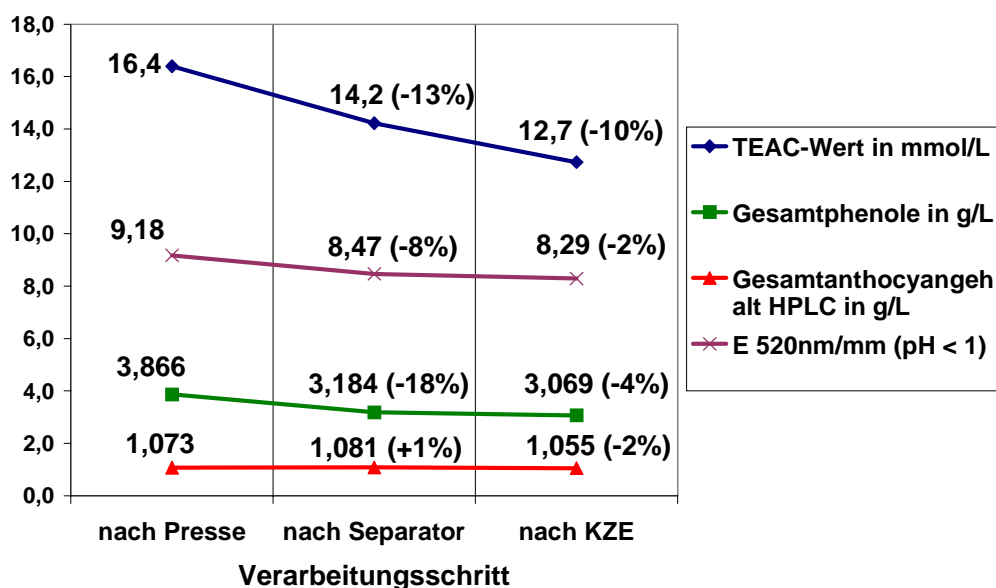


Abbildung 70: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu, Gesamtanthocyanengehalt mittels HPLC und Farbwert E 520 nm/cm ($\text{pH} < 1$) während der Herstellung von Brombeersaft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.

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).

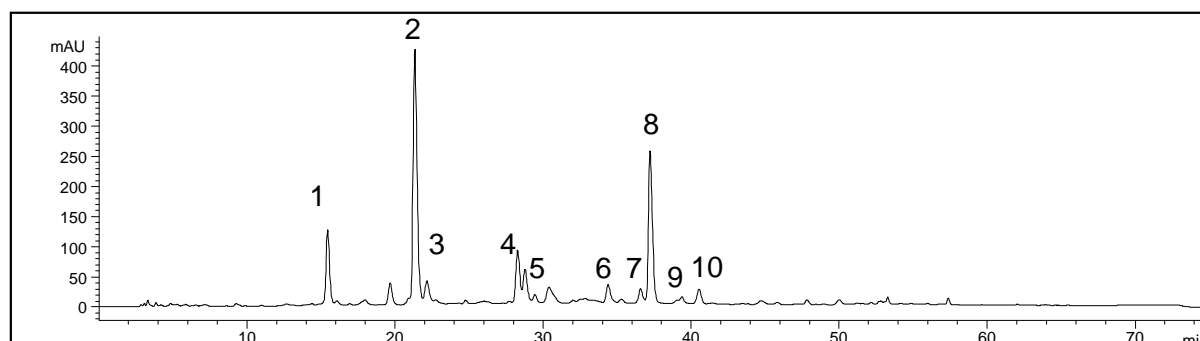


Abbildung 71: HPLC-Chromatogramm eines Sauerkirschpresssaftes an einer Fluofix-Säule bei 280nm

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%.

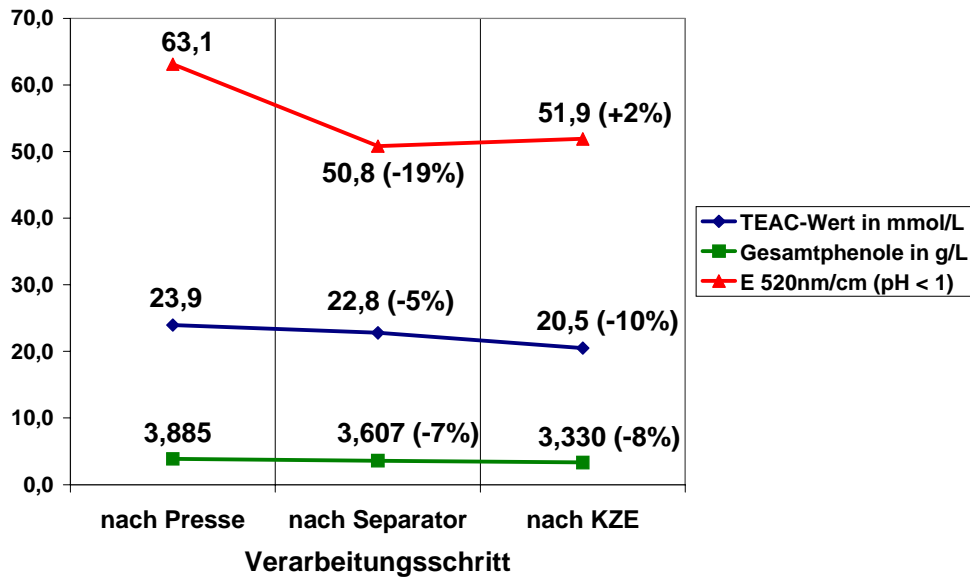


Abbildung 72: Veränderung von TEAC-Wert, Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu und Farbwert E 520 nm/cm (pH < 1) während der Herstellung von Sauerkirschsafft. Prozentuale Veränderung bezogen auf den vorangegangenen Verarbeitungsschritt.

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.

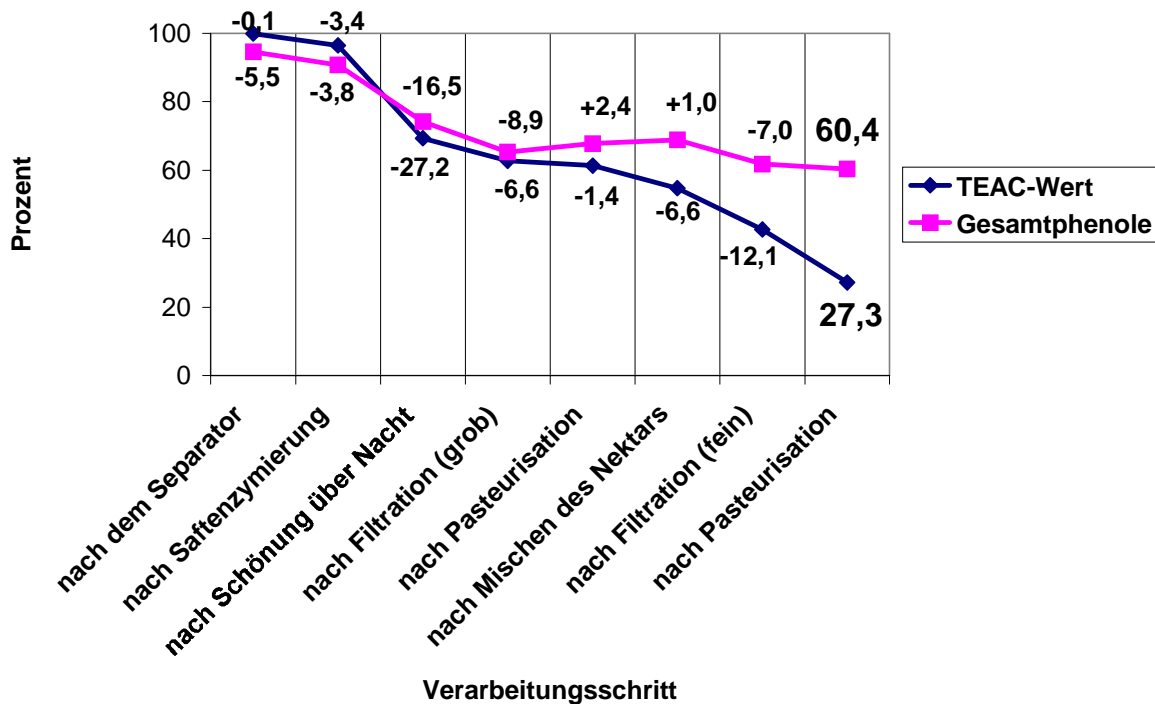


Abbildung 73: Veränderung von TEAC-Wert und Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu während der Herstellung von Stachelbeernektar, bezogen auf den frischen Presssaft (100%)

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]	Gesamtantho cyane [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).

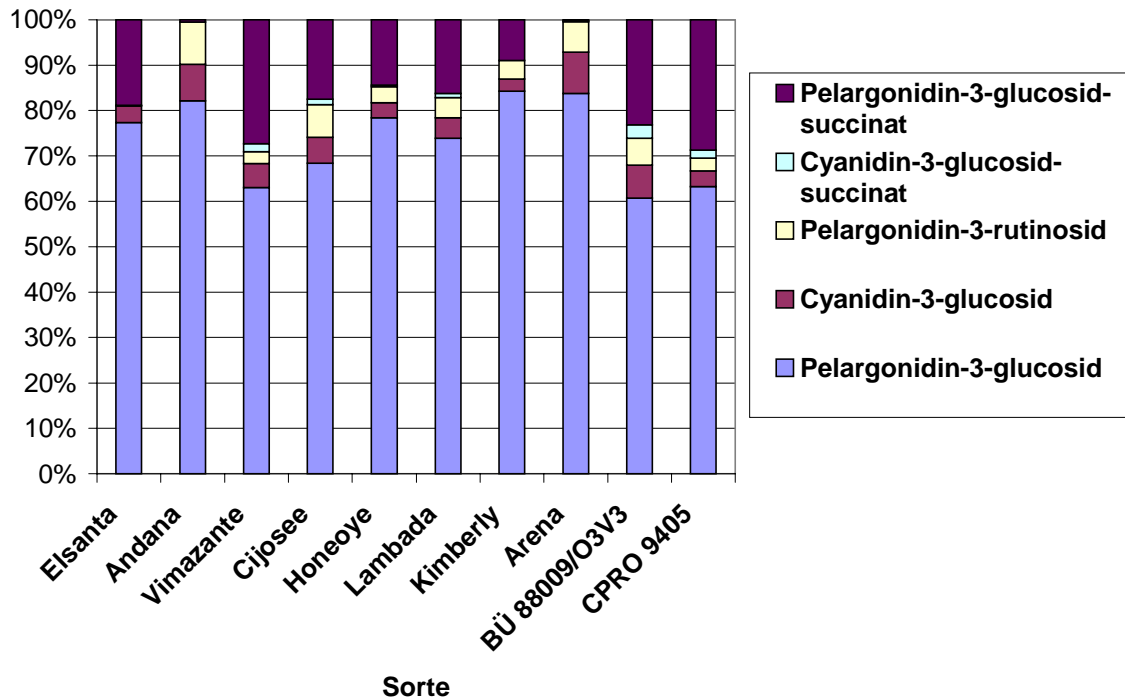


Abbildung 74: Anthocyanfingerprints verschiedener Erdbeersorten

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

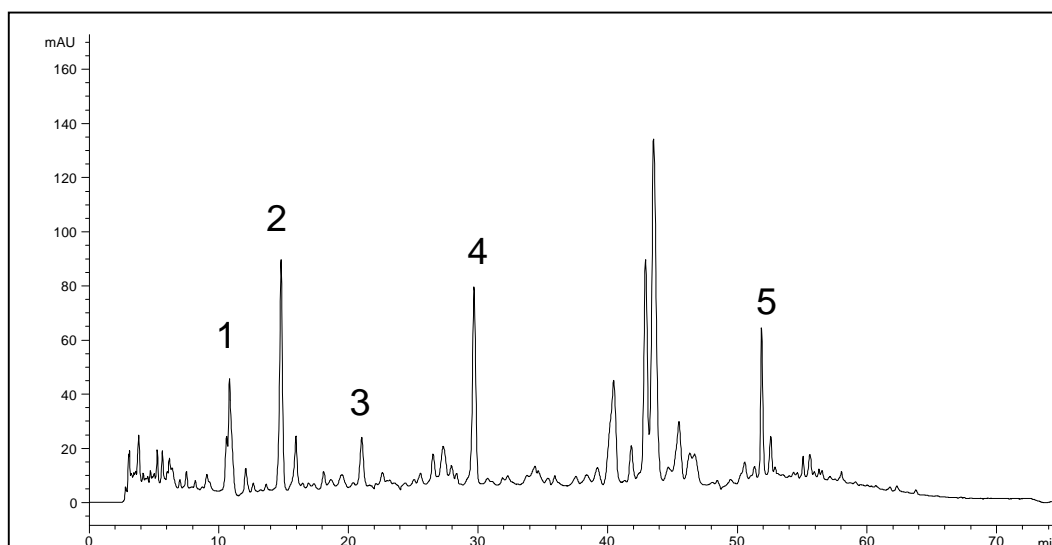
Parameter	Wert
Extrakt	45,6°Oechsle
Gesamtsäure (als Citronensäure)	11 g/L
Gesamtphenolgehalt (als Catechin)	2573 mg/L
TEAC-Wert	18,2 mmol/L Trolox

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)

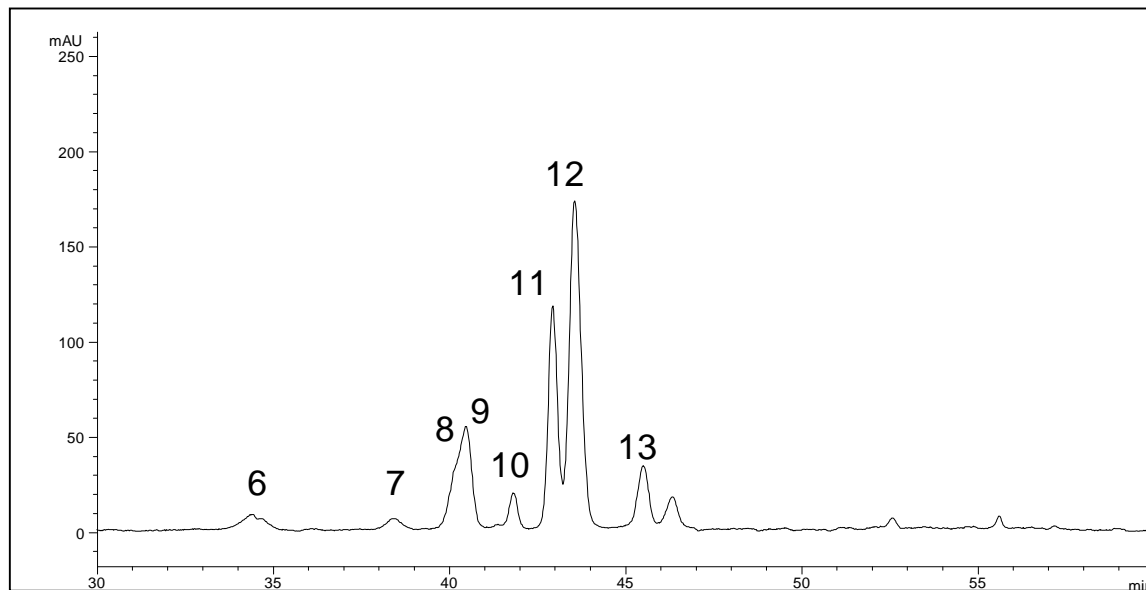


Abbildung 76: HPLC-Chromatogramm des Antioxidansgetränkes an einer Fluofix-Säule bei 525 nm, Ausschnitt 30 – 60 min

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

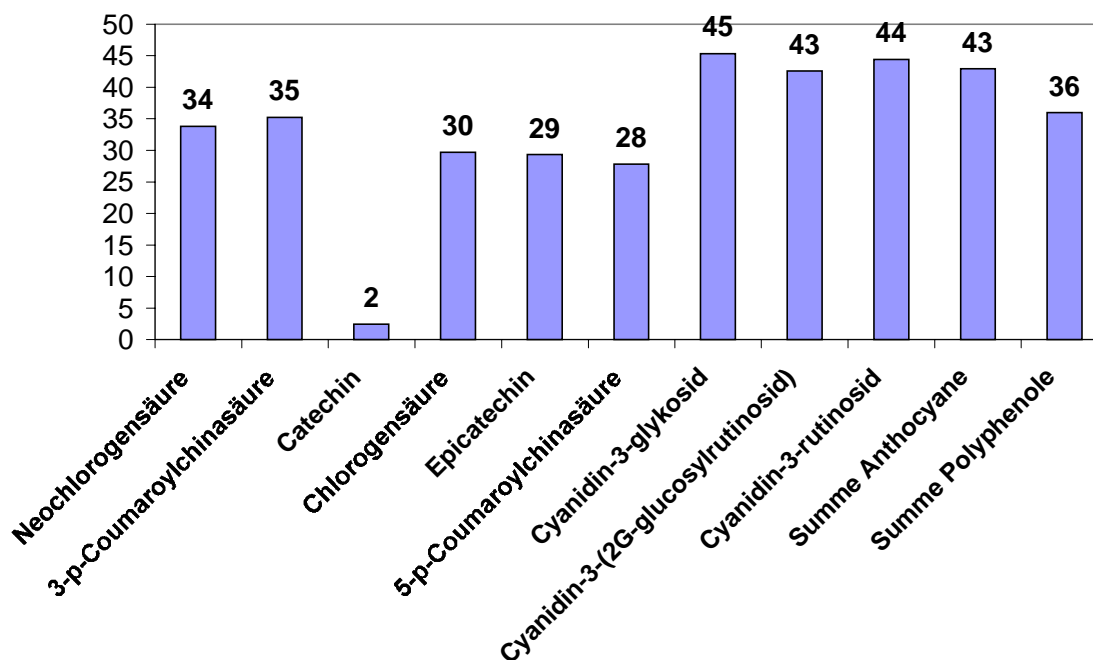
Der Einfluss der alkoholischen Gärung auf die antioxidative Kapazität und die Polyphenole von Beerensäften bei der Herstellung von Fruchtweinen wurde untersucht. Die Veränderungen der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehaltes bei der Vergärung von Fruchtsäften zu Fruchtweinen sind gering 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 Sauerkirschsaff 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).

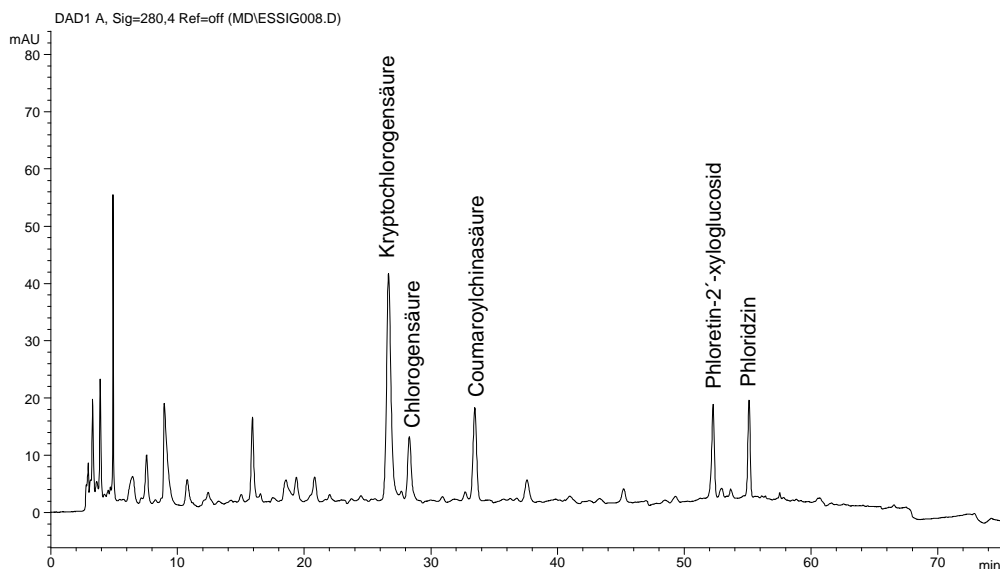


Abbildung 78: HPLC-Chromatogramm eines Apfelessig an einer Fluofix-Säule bei 280 nm