

Auswahl und Verarbeitung von Früchten nach ernährungs- physiologischen Kriterien zur Steigerung der Qualität von Säften, Konzentraten und Extrakten

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Forschungsanstalt Geisenheim Institut für Oenologie und Getränkeforschung FG Weinanalytik und Getränkeforschung Prof. Dr. H. Dietrich
Forschungsstelle II:	Universität Jena Institut für Ernährungswissenschaften Lehrstuhl Humanernährung Prof. Dr. R. Bitsch/Dr. M. Netzel
Industriegruppe:	Verband der Deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V., Bonn
	Projektkoordinator: Dipl.-Ing. H. M. Dechent Eckes-Granini GmbH & Co. KG, Nieder-Olm
Laufzeit:	2002 – 2005
Zuwendungssumme:	€ 251.900,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Im Rahmen eines vorangegangenen Gemeinschaftsforschungsvorhabens (AiF/FEI 11160 B) wurden neue Konzepte für die Verarbeitung von Früchten entwickelt mit dem Ziel, die Grundlagen zu schaffen für die Produktion von Fruchtsäften mit hohem antioxidativem Potential, dessen Komponenten im menschlichen Organismus verfügbar und wirksam sind. Dies gelang durch Auswahl polyphenolreicher Obstsorten (Most-äpfel und Beerenfrüchte) und Einsatz wertstoffschonender Verarbeitungstechnologien und führte zur Produktion von Apfel- und Beerenobst-säften mit hoher ernährungsphysiologischer Qualität. Diese Fruchtsäfte enthielten deutlich mehr antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe als bisher je erreicht werden konnte und erhöhten die antioxidative Kapazität im Plasma von jungen, gesunden Versuchspersonen signifikant.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, aufbauend auf diesen Ergebnissen noch bestehende Schwachpunkte in der Verfahrenstechnik zu beseitigen und die Untersuchungen auf die Erhaltung bioaktiver Antioxidantien, beim Apfel

sind dies vor allem die Catechine, Procyanidine und Dihydrochalcone zu fokussieren. Stabilität, Bioaktivität und Bioverfügbarkeit der bioaktiven Inhaltsstoffe sollten über mehrere Monate getestet werden, um Erkenntnisse bezüglich der Lagerung und Alterung zu gewinnen. Erstmals sollten auch Polyphenol-Extrakte aus Apfelsaft im Vergleich zu den Originalsäften analysiert und ernährungsphysiologisch beurteilt werden, sowie Äpfel im Vergleich zu Säften und Extrakten (Prüfung auf Matrixeffekte). Die im Vorgängerprojekt eingesetzten Beurteilungskriterien sollten um neue analytische Methoden und Testverfahren ergänzt werden. Die Aussagen zur ernährungsphysiologischen Qualität sollten erweitert werden durch Untersuchungen zur Einflussnahme auf den glykämischen Index, die Thrombozytenaggregation (Plasma) und auf Biomarker der Lipidperoxidation.

Forschungsergebnis:

Den sekundären Pflanzenstoffen, insbesondere den Polyphenolen, werden gesundheitliche Wirkungen zugeschrieben. Daher ist eine Erhöhung

des Anteils an Polyphenole im Sinne der Rohwarenauswahl und der Minimierung von Verarbeitungsverlusten anzustreben und dem in den letzten Jahren vorherrschenden Trend zur Nahrungsergänzung oder der Anreicherung von Lebensmitteln vorzuziehen. Zweckmäßig ist es, bei Lebensmitteln anzusetzen, die regelmäßig verzehrt werden, wie z.B. Apfelsaft. Hier bieten wiederum Mostapfelsorten einen guten Ansatzpunkt als Ausgangsware für die Fruchtsaftproduktion. Die über drei Jahre untersuchten sortenreinen Mostapfelsäfte zeigten z.T. sehr hohe Polyphenolgehalte. Polyphenolreiche Mostapfelsorten, die extrem sauer oder gerbig sind wie der Spitzenreiter Bittenfelder, können durch Mischung mit anderen Sorten wohl-schmeckende, antioxidantienreiche Säfte ergeben. So entstehen qualitativ hochwertige Säfte, die ernährungsphysiologisch zu empfehlen sind.

Neun Apfelsorten wurden in Schale, Parenchym und Kerngehäuse unterteilt, um die Polyphenolverteilung in den Gewebezonen zu untersuchen. Zudem wurden die Maischen mit den aus ihnen hergestellten Säften in Bezug auf die Polyphenole verglichen. Die untersuchten Apfelsorten unterschieden sich quantitativ und qualitativ deutlich in ihren Polyphenolprofilen. Die Gesamtgehalte in der Maische lagen zwischen 170 und 1.004 mg/kg. Die Verteilung lag bei 50-574 mg/kg Dihydrochalkonen, 15-415 mg/kg Phenolcarbonsäuren und 25-409 mg/kg Quercetinen. Die Flavanolgehalte waren aufgrund von Oxidationsproblemen mit 0-140 mg/kg gering. Die Aufteilung der Früchte in die Gewebezonen ergab, dass die Quercetine fast ausschließlich in der Schale vorhanden sind, die Dihydrochalkone größtenteils im Kerngehäuse, aber auch in Schale, und wenig im Parenchym. Die Phenolcarbonsäuren kommen ebenso wie die Flavanole in allen Gewebezonen vor, erstere hauptsächlich im Kerngehäuse und letztere in Schale und Kerngehäuse. Die aus den verschiedenen Apfelsorten hergestellten Säfte unterscheiden sich ebenfalls deutlich in ihren Polyphenolgehalten (89-437 mg/L). Beim Übergang in den Saft konnte bestätigt werden, dass Quercetine und Dihydrochalkone, die an den festen Bestandteilen der Frucht sitzen, am Schlechtesten in den Saft übergehen. Es wurden noch 0-14 % an Quercetinen bzw. 14-72 % an Dihydrochalkonen im Saft gefunden (Maische = 100 %).

Beerenobstsäfte können als „natürliche Antioxidantienkonzentrate“ angesehen werden und sind somit für die Steigerung der Qualität von Säften prädestiniert. Im Rahmen des Sortenscreenings über zwei Jahrgänge konnten polyphenolreiche

Beerenobstsorten gefunden werden. Untersucht wurden Erdbeeren, Brombeeren, Schwarze Johannisbeeren, Aronia, Boysenbeere, Heidelbeere und Cranberry. Aus polyphenolreichen Säften hergestellte Mehrfruchtsäfte (100 % Saft) können durchaus als „Wellnessgetränke“ angesehen werden, da sie einen hohen gesundheitlichen Nutzen haben. Daneben sind solche Säfte natürliche Produkte, was entsprechend beworben werden sollte, um den Preisunterschied zu rechtfertigen.

Bei Beerenobst lag ein Schwerpunkt der Untersuchung bei Ellagsäurederivaten. Zur Bestimmung von sowohl freier als auch glycosidisch gebundener und gesamter Ellagsäure (nach Hydrolyse) wurden erfolgreich Extraktions- und Analysemethoden entwickelt und die Erdbeer- und Himbeerfrüchte des o.g. Sortenscreenings untersucht. Es konnten 4-24 mg/kg Frischgewicht freie Ellagsäure in Erdbeeren und 210-543 mg/kg in Himbeeren gefunden werden. An Gesamtellagsäure besaßen die Erdbeeren bis zu 500 mg/kg, die Himbeeren bis zu fast 3.000 mg/kg, ein Ergebnis, das bisherige Befunde bei Himbeeren deutlich übersteigt. Auch Ellagtannine wird eine gesundheitliche Bedeutung zugeschrieben. Der antioxidative und anticarcinogene Effekt von Ellagtanninen in der Nahrung wird im Gastrointestinaltrakt vermutet. Im Rahmen dieses Projektes konnte eine Vielzahl von Beerenfrüchten identifiziert werden, die sich sehr gut zur Steigerung der Qualität eines Saftes eignen. Bei Erdbeeren und Himbeeren wird die Verwendung als Püree empfohlen, da die Ellagsäuren schlecht in den Saft übergehen.

Im Rahmen des Projekts sollten Schwachpunkte der Verarbeitung, in denen wertvolle Antioxidantien verloren gehen, näher definiert und beseitigt werden. Hierzu wurden zahlreiche Verarbeitungsstudien durchgeführt. Die Untersuchungen des Einflusses verschiedener technologischer Maßnahmen (am Beispiel Apfel) zeigte, dass die Maischestandzeit vor dem Entsaften möglichst kurz gehalten werden sollte. Eine zusätzliche KZE direkt nach dem Entsaften (Dekanter) führte im Verhältnis zum Kontrollversuch ohne diesen Schritt zu einer Verhinderung der Abnahme von Gesamtphenolgehalt (Folin) und der besonders oxidationsempfindlichen Procyanidine B1 und B2 und Chlorogensäure im Verlauf der Saftstandzeit. Die leichte Freisetzung der Quercetine wurde jedoch ebenfalls unterbunden. Gerade die schlecht wasserlöslichen Dihydrochalkone und Quercetine, die in Kerngehäuse und Schale der Äpfel vorkommen, gehen schlecht in den Saft über, wohingegen die Flavanole und Phenolcar-

bonsäuren durch Oxidation abnehmen. So führen Prozesse zur Erhöhung des Transfers der ersten beiden Gruppen wie längere Maischezeit zu einem Verlust der letzteren und Maßnahmen zum Schutz vor Oxidation, wie eine zusätzliche KZE des Saftes nach dem Pressen, verhindern die Extraktion der ersteren. Es gelingt nicht, alle Polyphenole des Apfels in den Saft zu überführen. Eine Steigerung des Polyphenolgehaltes (gerade der Dihydrochalkone und Quercetine) konnte jedoch durch eine Nachextraktion erreicht werden. Die Supratornmaschine brachte hierbei keine deutlichen Vorteile gegenüber der Nachextraktion ohne ihren Einsatz. Dieser Nachextrakt-„Saft“ von polyphenolreichen Sorten kann darüber hinaus zur Qualitätssteigerung von einfacheren (Tafel)Apfelsäften in Zugaben von 10-15 % eingesetzt werden.

Als Basis der ernährungsphysiologischen Versuche, in denen Fruchtsäfte unterschiedlichen Alters verabreicht werden sollten, wurde die Veränderung der Polyphenole bei Apfelsaft und beerenobstreichem Mehrfruchtsaft untersucht. Während der untersuchte Bohnapfelsaft sich analytisch kaum während der Lagerzeit von 1 Jahr veränderte, nahmen die Anthocyane des Mehrfruchtsaftes schon im ersten Lagermonat deutlich ab. Dagegen verschlechterte sich der Bohnapfelsaft sensorisch (Aussehen, Geruch und Geschmack) schon nach einem halben Jahr Lagerung deutlich und wurde nach 1 Jahr abgelehnt. Der Mehrfruchtsaft verlor zwar nach 6 Monaten seine Frische und die Säure im Geschmack, konnte aber Fruchtigkeit und Aroma gut über den Lagerzeitraum bewahren und wurde noch nach 1 Jahr mit 3 von 5 Punkten für die Farbe und 3,5 Punkten für Geruch und Geschmack beurteilt.

Die von Forschungsstelle 1 (Geisenheim) gelieferten Apfelsäfte der Sorten Weisser-Trierer-Weinapfel und Bittenfelder waren bezüglich ihrer Phenolgehalte (Gesamtphenole_{Folin}/Phenole_{HPLC}) und antioxidativen Kapazität (TEAC, TRAP, FRAP und PCL) durchaus mit phenolreichen Beerenobstsaften bzw. Rotweinen vergleichbar und bilden somit eine ebenbürtige Alternative. Sehr hohe Korrelationen (bei n = 18 Apfelsäften) konnten sowohl zwischen den TEAC-, FRAP- und PCL-Werten (r: 0,901-0,928), als auch zwischen diesen und den korrespondierenden Polyphenolgehalten (Gesamtphenole_{Folin} und Phenole_{HPLC}) beobachtet werden (r: 0,796-0,935). Damit sind diese drei Testverfahren für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität von phenolischen Substanzen in Apfelsäften gut geeignet. Die TRAP-Werte dagegen korrelierten

etwas schlechter mit den übrigen Parametern (r: 0,705-0,793), weshalb diese Methode zur Beurteilung von Apfelsäften (bezügl. Antioxidativer Kapazität) nur eingeschränkt empfohlen werden kann. Welche Saftkomponenten/Matrixbestandteile insbesondere im TRAP-Test (Mechanismus: Transfer von H-Atomen und Abfangen von Peroxyl-Radikalen) einen „störenden/hemmenden“ Effekt besitzen, muss in einer separaten Studie untersucht werden.

Nach Zufuhr von Weisser-Trierer-Weinapfelsaft (700 ml; „Topapfelsaft“ bzgl. der Parameter *antioxidative Kapazität* und *Polyphenolgehalt* aus den Vorstudien) konnte ein beträchtlicher Anteil an antioxidativ wirksamen Substanzen im 24 h-Urin wiedergefunden werden: 14 % als Gesamtphenole_{Folin}, sowie jeweils ca. 8 % im FRAP-Test und PCL-Test (im Vergleich zur zugeführten Dosis). Im Vergleich zur Kontrolltestung (700 ml Trinkwasser; appliziert im randomisierten cross-over-Design) waren die Unterschiede statistisch signifikant (p < 0,05): die PCL- und FRAP-Werte waren um 44 % bzw. 35 %, die Gesamtphenole um 36 % erhöht. Erwähnt werden muss, dass sowohl die FRAP- und PCL-Werte als auch die Gesamtphenolgehalte jeweils um Ascorbin- und Harnsäure „bereinigt“ wurden. Mittels HPLC-ESI-MS/MS wurden vor allem Glukuronidkonjugate des Phloretins (1,72 ± 0,71 mg) und das Phloretin (Aglykon; 0,31 ± 0,15 mg) detektiert. Weiterhin konnten sehr geringe Konzentrationen an Chlorogensäure, Vanillinsäure und Kaffeesäure in den Urinproben „nach Apfelsaft“ nachgewiesen werden. Die Wiederfindung von Phloretin im 24 h-Urin in Form von Metaboliten (Glukuronide) und als Aglykon betrug 4,4 % im Vergleich zur applizierten Dosis. Hippursäure als potentieller Kolonmetabolit der Polyphenole war nach Apfelsaft deutlich um 210 % erhöht (p < 0,05). Das Malondialdehyd als ein Biomarker für „oxidativen Stress“ blieb praktisch unverändert (-2 % im Vergleich zur Kontrolle).

In den Hauptstudien konnten die Befunde der Vorstudie in der Matrix Urin im Prinzip bestätigt werden. Nach Zufuhr von Bohnapfelsaft und Mehrfruchtsaft („frisch“ und „4 Monate gelagert“) war die Exkretion von antioxidativ wirksamen Verbindungen gemessen als TEAC, FRAP, PCL und Gesamtphenole, im Vergleich zur Kontrolltestung (Trinkwasser), erhöht (zwischen 6 und 60 %). Entsprechend dem Vorversuch wurden sämtliche Werte der antioxidativen Tests (TEAC, FRAP und PCL) sowie die Gesamtphenolgehalte, sowohl Harnsäure als auch Harnsäure und Ascorbinsäure „bereinigt“ und aus-

gewertet. Auch konnte nach Zufuhr von beiden Studiensäften wieder ein relativ starker Anstieg der Hippursäureexkretion (im 24 h-Urin) beobachtet werden (zwischen 31 und 321 %). Das Malondialdehyd (im 24 h-Urin) war nach Bohnapfelsaft „frisch“ und Mehrfruchtsaft „4 Monate gelagert“ jeweils um max. 9 % erniedrigt (im Vergleich zur Kontrolle). Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Sowohl nach Bohnapfelsaft als auch nach Mehrfruchtsaft wurden im Urin der Probanden hauptsächlich Metaboliten der applizierten Saftpolyphenole nachgewiesen (LC-ESI-MS/MS). Nach Bohnapfelsaft waren dies: Phloretin-Glukuronide und Hippursäure sowie sehr geringe Konzentrationen an Phloretin, Chlorogen-, Kaffee- und Vanillinsäure. Nach Mehrfruchtsaft waren dies: Anthocyan-Glukuronide und -Sulfate sowie Hippursäure.

Die Plasma Konzentrations-Zeit-Profile (TEAC, FRAP, PCL und Gesamtphenole) nach beiden Studiensäften („frisch“ und „4 Monate gelagert“) zeigten alle einen „positiven“ Verlauf im Vergleich zur Kontrolle. Positiv bedeutet: Im Vergleich zum Basiswert (Nüchternkonzentration) konnte nach Saftzufuhr eine Erhöhung der antioxidativen Plasmakapazität gemessen werden (die entsprechenden pharmakokinetischen Parameter t_{max} , C_{max} und AUC werden im Moment noch auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Säften geprüft). In den Kontrolltestungen hingegen konnten keine positiven Konzentrations-Zeit-Profile gemessen werden. Diese positiven „Saft-Effekte“ waren unabhängig vom Einfluss der Harnsäure bzw. Ascorbinsäure! Die Unterschiede bzw. Verlaufsschwankungen beim Plasma-Malondialdehyd waren statistisch nicht signifikant.

Das Versuchsdesign (jeweils 3 *in vivo* Testungen im Block/randomisierten cross-over-Design gegen Kontrolle/n = 12 Probanden), die Studiendauer (4 Testblöcke über 11 Monate), die Auswahl der „Testsubstanzen“ (sortenreiner Apfelsaft und Mehrfruchtsaft - frisch und gelagert/Äpfel, Saft und Extrakt aus der gleichen Rohware), die Untersuchungsparameter/Analytik (antioxidative Kapazität/Biomarker für oxidativen Stress/Blutglukose (\rightarrow Glykämischer Index)/Einsatz von HPLC-DAD und LC-ESI-MS/MS) sowie die Ermittlung der Pharmakokinetik der absorbierten Substanzen, können durchaus als wegweisende Vorgehensweise in Hinblick auf die Zielparame^{ter} *Bioverfügbarkeit* und *Bioaktivität* von bioaktiven Lebensmittel(Saft)inhaltsstoffen betrachtet werden. [Eine Vielzahl von Daten wird z.Z. noch ausgewertet]

Wirtschaftliche Bedeutung:

Mit etwa 13 L pro Kopf und Jahr sind Apfelsäfte die am meisten konsumierten Fruchtsäfte Deutschlands und beinhalten somit ein erhebliches wirtschaftliches Potential. Im Jahre 2004 wurden in Deutschland 576 Mio L Apfelsaft gekeltert (+17,3 % gegenüber 2003). Mostäpfel haben in Deutschland traditionell einen hohen Stellenwert; sie enthalten Inhaltsstoffe, die in Tafeläpfeln nur in geringen Mengen vorhanden sind. Die verfügbare Menge liegt bei etwa 500.000 Tonnen, die aber immer weniger genutzt werden. Alte klassische Mostapfelsorten stellen wegen ihres Sekundärstoffreichtums einen bedeutenden Genpool dar, den es zu erhalten gilt. Die EU-Verordnung Nr. 1590/2004 über ein Gemeinschaftsprogramm zur Erhaltung, Charakterisierung, Sammlung und Nutzung genetischer Ressourcen in der Landwirtschaft fordert die Erhaltung der pflanzengenetischen Vielfalt (Genpool) als gesellschaftliche Aufgabe, Verbesserung der Qualität von Lebensmitteln, Erhaltung der Vielfalt für kommende Generationen sowie die Sammlung und Nutzung vorhandener Bestände. Hierzu zählen auch alte Obstsorten. Das AiF-Projekt kommt daher nicht nur der Fruchtsaftindustrie, sondern auch der Obstwirtschaft zugute.

Neben dem Apfel als Basis der deutschen Fruchtsaftindustrie ist auch eine Art „Renaissance“ von anthocyanhaltigen Buntsäften festzustellen. Das nun abgeschlossene Projekt legt wichtige Grundlagen für die künftige Getränkeentwicklung.

Angesichts der Globalisierung und des enormen Konkurrenzdrucks ausländischer Konzentratanbieter (der größte ist China) ist das Selbstkeltern in Deutschland nur noch möglich und wirtschaftlich sinnvoll, wenn mit der eigenen Verarbeitung ein Zusatznutzen verbunden ist. Man geht davon aus, dass künftig der Gesundheitsaspekt von Fruchtsäften und hochfruchtsafthaltigen Getränken an Bedeutung gewinnen wird. Die Möglichkeit der Angabe von Health Claims wird z.Zt. in der EU diskutiert und ist mittelfristig zu erwarten. Da sich einzelne Betriebe eigene klinische oder ähnliche Studien nicht leisten können, ist der einzige sinnvolle Weg eine konzertierte Aktion, wie sie in diesem AiF-Gemeinschaftsforschungsprojekt beschr^{itten} wurde.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2005.
2. Dietrich, H. und Bitsch, R.: FEI-Gemeinschaftsforschung für den Mittelstand: Fruchtsaft – Functional Food aus der Natur. Getränke! Technologie und Marketing für die Getränkeindustrie 4, 46-48 (2008)
3. Thielen, C., Ludwig, M., Patz, C.-D., Will, F., Dietrich, H., Netzel, G., Netzel, M., Bitsch, R. und Bitsch, I.: Charakterisierung sortenreiner Apfelsäfte. Dt. Lebensmittelrund. 102, 426-435 (2006).
4. Dietrich, H., Thielen, C., Würth, K., Bonerz, D. und Will, F.: Neue Erkenntnisse über bioaktive Stoffe in Fruchtsäften. Flüss. Obst 72 (9), 472-478 (2005).
5. Thielen, C., Will, F., Zacharias, J., Dietrich, H. und Jacob, H.: Polyphenole in Äpfeln. Verteilung von Polyphenolen im Apfelgewebe und Vergleich der Frucht mit Apfelsaft. Dt. Lebensmittelrund. 100, 389-398 (2004).
6. Thielen, C., Ludwig, M. und Dietrich, H.: Polyphenole und antioxidative Kapazität sortenreiner Apfelsäfte. Lebensmittelchem. 58, 6 (2004).
7. Netzel, M., Rossberg, A., Straß, G., Thielen, C., Dietrich, H., Bitsch, I. und Bitsch, R.: Interaktionen zwischen antioxidativer Kapazität und phenolischen Substanzen im Apfelsaft. (Posterabstract) Tagungsband 62. Diskussionstagung des Forschungskreises der Ernährungsindustrie, 119 (2004).

Weiteres Informationsmaterial:

Forschungsanstalt Geisenheim
Institut für Oenologie und Getränkeforschung
FG Weinanalytik und Getränkeforschung
Rüdesheimer Str. 28, 65366 Geisenheim
Tel.: 06722/502311, Fax: 06722/502310
E-Mail: h.dietrich@fa-gm.de

Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Lehrstuhl Humanernährung
Dornburger Str. 29, 07743 Jena
Tel.: 0641/9939033, Fax: 0641/9939049
E-Mail: Roland.Bitsch@uni-jena.de;
Michael.Netzel@uni-jena.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de