

Lebensmittelchemie 2003

Bestimmten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen schreibt man eine gesundheitsfördernde Wirkung zu. In diesem Zusammenhang haben Carotinoide und Polyphenole besonderes Interesse auf sich gezogen. Gentechnische Veränderungen und mikrobielle Kontaminationen lassen sich am einfachsten auf DNA-Ebene mit speziellen Hybridisierungs-Techniken und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisen.

Funktionalität sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe

◆ Eine vorwiegend pflanzliche Ernährung senkt das Risiko für bestimmte Krankheiten, z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs, wie epidemiologische Studien zeigen. Die schützenden Effekte pflanzlicher Lebensmittel werden vor allem Ballaststoffen und sekundären Pflanzenstoffen zugeschrieben. Von diesen haben Carotinoide und Polyphenole besonderes Interesse auf sich gezogen.

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind im Gegensatz zu primären Stoffwechselprodukten wie Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen in den meisten Lebensmitteln Minorkomponenten. Da diesen Stoffen physiologische Wirkungen zugeordnet werden, gewinnen sie bei der Erzeugung

von funktionellen Lebensmitteln an Bedeutung, die in vielen Fällen gerade durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe ihren Zusatznutzen erhalten.

Carotinoide

◆ Von den sauerstofffreien Carotinoiden (Carotine) finden sich Lycopin in hoher Konzentration in Tomaten und Wassermelonen (Abbildung 1). Nach neuesten Untersuchungen halbiert der Verzehr von mehr als zehn tomatenhaltigen Mahlzeiten pro Woche die Wahrscheinlichkeit, an Prostatakrebs zu erkranken. Die Oberfläche der Lycopinkristalle in formulierten Produkten beeinflusst ihre Bioverfügbarkeit entscheidend.¹⁾

β-Carotin, das wichtigste Provitamin in der menschlichen Ernährung, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen zur Modulation von Zellwachstum und -differenzierung, auf die hier nicht eingegangen werden

kann. Tägliche Einnahme von β-Carotin kann den UV-Schutz der Haut gegenüber Erythembildung verbessern. Dieser „orale“ Sonnenschutz ersetzt zwar keine Sonnencreme, kann aber den Grundschutz für sonnenempfindliche Menschen erhöhen.

Die sauerstoffhaltigen Carotinoide (Xanthophylle) Lutein und Zeaxanthin (Abbildung 1) reichern sich selektiv in der menschlichen Retina an. Ein niedriger Spiegel beider Xanthophylle im Blutplasma gilt als Risikofaktor für das Auftreten von Krankheiten wie der Adulten Maculadegeneration (AMD). Ein erhöhter Verzehr xanthophyllreicher Nahrung führt zwar zu einer höheren Carotinoidkonzentration in der Macula, ob sich dies auf die Ausbildung von AMD auswirkt, ist jedoch umstritten. Hauptquellen für Lutein und Zeaxanthin sind grüne Blattgemüse.

β-Cryptoxanthin hat möglicherweise eine chemopräventive Wirkung gegenüber Dickdarmtumoren. Exzellente β-Cryptoxanthinquellen sind Früchte wie Orangen und Papaya.

In letzter Zeit kommen vermehrt Nahrungsergänzungsmittel mit Xanthophyllen auf den Markt, vor allem Luteinpräparate (0,25–20 mg / Tagesdosis). Basierend auf der vermuteten anticarcinogenen Wirkung von β-Cryptoxanthin wurde kürzlich in Japan die Erzeugung von „Functional Eggs“ patentiert.

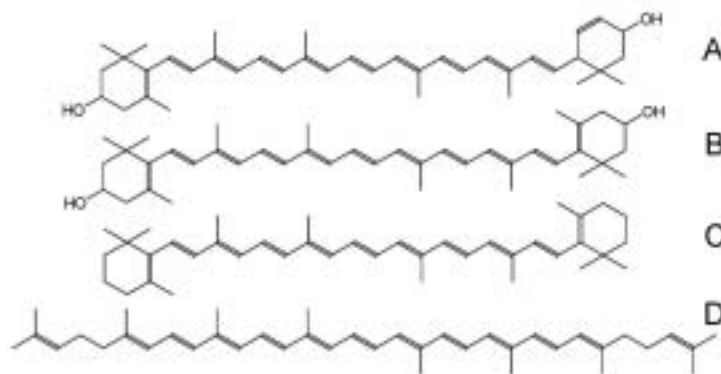


Abb. 1.
Strukturbeispiele für Xanthophylle (A: Lutein, B: Zeaxanthin) und Carotine (C: β-Carotin, D: Lycopin).

Carotinoide als Vorstufen

◆ Carotinoide sind in vielen Früchten und Blüten wichtige Vorstufen für Aromastoffe. Enzyme, welche die Polymerkette selektiv oxidativ spalten und dabei C13-Norisoprenoiden freisetzen, wurden kürzlich in der Quitte und der Sternfrucht gefunden.²⁾ Außerdem gelang es, zwei Gene aus Safran zu isolieren, die für Zeaxanthin-spaltende Enzyme codieren. Interessante Perspektiven für die biotechnische Darstellung norisoprenoider Aromen eröffnet die Entdeckung, dass verschiedene Speisepilze Carotinoid-spaltende Enzyme enthalten.³⁾

Analytik von Xanthophyllen

◆ Xanthophylle kommen nativ sowohl frei als auch mit Fettsäuren verestert vor. Die traditionelle Probenbehandlung sieht einen Verseifungsschritt vor, der zwar zur Bildung einer geringen Anzahl freier Stammxanthophylle führt, aber auch mit dem Verlust der natürlichen Bindungsinformation einhergeht. Aus dieser Technik resultiert ein erschreckend geringes Wissen über das Vorkommen und die Bioverfügbarkeit nativer Xanthophyllester. Eine zweifelsfreie Identifizierung der Xanthophyllester erfolgt idealerweise durch HPLC-MS-Kopplung.⁴⁾ Informationen über die E/Z-Stereoisomerenverteilung liefert die HPLC-NMR-Kopplung. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung von Lutein- und Zeaxanthin isomeren in Spinat eingesetzt.⁵⁾

Bioverfügbarkeit von Xanthophylleestern

◆ Nicht alle Xanthophyllester sind für den Menschen gleichermaßen bioverfügbar. Nach Verzehr eines Paprikaoleoresins waren im Blut von Probanden Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin nachweisbar, während Capsanthin nicht präsent war: Dessen Ester sind somit nicht bioverfügbar.⁶⁾ Es ist unklar, ob die freie oder die veresterte Form eine höhere Bioverfügbarkeit besitzt. Nach Resultaten von Bowen et al. sind Luteindiester besser

verfügbar als die freie Form.⁷⁾ Im Falle von β -Cryptoxanthin hat eine Humanstudie für die acylierte und die freie Form eine vergleichbare Bioverfügbarkeit ergeben.⁸⁾ Kommerzielle Luteinpräparate enthalten meist freie Xanthophylle und nur in Einzelfällen Luteinester-haltige Pflanzenextrakte.

Phenolische Verbindungen

◆ Phenolische Verbindungen, häufig auch als Polyphenole oder Pflanzenphenole bezeichnet, sind im Pflanzenreich weit verbreitet und eine außerordentlich heterogene Stoffklasse. Zumeist werden sie in Phenolcarbonsäuren (Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäurederivate mit C₆-C₁- bzw. C₆-C₃-Grundgerüst) und in Flavonoiden klassifiziert (mit C₆-C₃-C₆-Struktur). Ebenfalls von Bedeutung sind Lignane (C₆-C₃-Dimere) und Stilbene (C₆-C₂-C₆-Struktur). Bei letzteren wurde insbesondere Resveratrol mit dem „French Paradox“ in Verbindung gebracht. Darunter versteht man die Tatsache, dass in Frankreich trotz vergleichsweise fettreicher Ernährung die Sterblichkeitsrate durch Herz-Kreislauf-Krankheiten niedriger ist als in anderen westlichen Industrieländern einschließlich den USA.

In Pflanzen dienen phenolische Verbindungen unter anderem als Pigmente, Attraktantien, Phytoalexine und zum Schutz vor UV-Strahlung. Abhängig von ihrer Struktur sind sie starke Antioxidantien und können freie Radikale abfangen, redoxaktive Metallionen chelatisieren und damit die Lipidperoxidation inhibieren.

Noch Mitte der 80er Jahre wurden Polyphenole als „Mutagene in unserer täglichen Nahrung“ angesehen, mittlerweile sind Polyphenol-angereicherte Lebensmittel in großer Vielfalt im Handel, wobei nicht selten gesundheitsfördernde Effekte sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe angepriesen werden. Dieser Trend hat zur Entstehung einer Grauzone zwischen Lebensmitteln und Arzneimitteln geführt. Es ist für die amtliche Lebensmittelüberwachung eine anspruchsvolle Aufgabe, diese Produkte zu bewerten, zumal es an standardisierten Bestimmungsmethoden mangelt.

Analytik phenolischer Verbindungen

◆ Es ist teilweise problematisch, selektive Bestimmungsmethoden für phenolische Verbindungen zu etablieren. Dies liegt zum einen an deren struktureller Vielfalt, zum anderen stehen zu wenig zuverlässig charakterisierte Referenzsubstanzen zur Verfügung. Unspezifische Konventionenmethoden wie die photometrische Quantifizierung der Gesamtpolyphenole nach Folin-Ciocalteu haben nur begrenzte Aussagekraft oder tendieren sogar zur Überbestimmung.⁹⁾ Verlässliche Aussagen sind daher nur durch Kopplungstechniken, vorzugsweise durch LC-MS und gegebenenfalls LC-NMR zu treffen. Mit LC-MSⁿ gelang es kürzlich erstmals, Isorhamnetinglycoside in Äpfeln und Phloridzin in Erdbeeren nachzuweisen.^{10,11)} Diese Befunde sind nicht nur in phytochemischer Hinsicht von Interesse – sie haben auch Konsequenzen für die Authentizitätskontrolle pflanzlicher Lebensmittel und



Dietmar E. Breithaupt,

Jahrgang 1966, studierte Lebensmittelchemie in Frankfurt am Main und Karlsruhe und promovierte 1998 in Stuttgart-Hohenheim. Seither ist er wissenschaftlicher Assistent am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim. Seine aktuellen Hauptarbeitsgebiete sind die Charakterisierung, Analytik und Bioverfügbarkeit von Carotinoiden, wobei er sich hauptsächlich mit Xanthophylleestern befasst.



Andreas Schieber,

Jahrgang 1966, studierte Lebensmittelchemie in Stuttgart und promovierte 1996 an der Universität Hohenheim. Seit 1997 arbeitet er dort am Institut für Lebensmitteltechnologie an der Charakterisierung sekundärer Pflanzenstoffe und an der Gewinnung von Wertstoffen aus Nebenprodukten. Als DAAD- bzw. Schormüller-Stipendiat verbrachte er 2002 und 2003 Forschungsaufenthalte im Arbeitskreis von Ronald E. Wrolstad an der Oregon State University, Corvallis/USA.

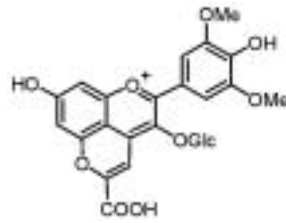
Abb. 2.
Struktur des aus
Malvidin-3-glucosid
und Brenztrauben-
säure gebildeten
Vitisin A.¹⁴⁾

belegen, dass bislang fast dogmatisch vertretene Ansichten zum Vorkommen bestimmter phenolischer Verbindungen revidiert werden müssen.

Eine vielversprechende Methode zur Analytik phenolischer Verbindungen aus festen Proben ist die Online-Kopplung von beschleunigter Lösungsmittelextraktion, automatisierter Festphasenextraktion und Hochleistungsflüssigchromatographie (ASE-ASPEC-HPLC). Wie bei der Bestimmung von Proanthocyanidinen in Malz gezeigt, lassen sich mit dieser Kombination 20 Proben pro Tag analysieren. Zudem vermindert sie das Risiko, dass sich Analyte abbauen und Artefakte bilden.¹²⁾

Isolierung phenolischer Verbindungen mit CCC

◆ Die Gegenstromverteilungschromatographie (Counter Current Chromatography, CCC) ist eine leistungsstarke Technik, um Referenzsubstanzen zu gewinnen. Bereits in den vergangenen Jahren wurden hiermit Erfolge bei der präparativen Isolierung von Anthocyanen, Isoflavonen, Li-



gnanen und Flavonolglycosiden erzielt. Jüngst wurden reine Anthocyane, darunter mono- und hochglycosylierte sowie acylierte Derivate in Mengen von mehreren hundert Milligramm pro Trennung isoliert.¹³⁾

Phenolische Verbindungen und die Farbe im Rotwein

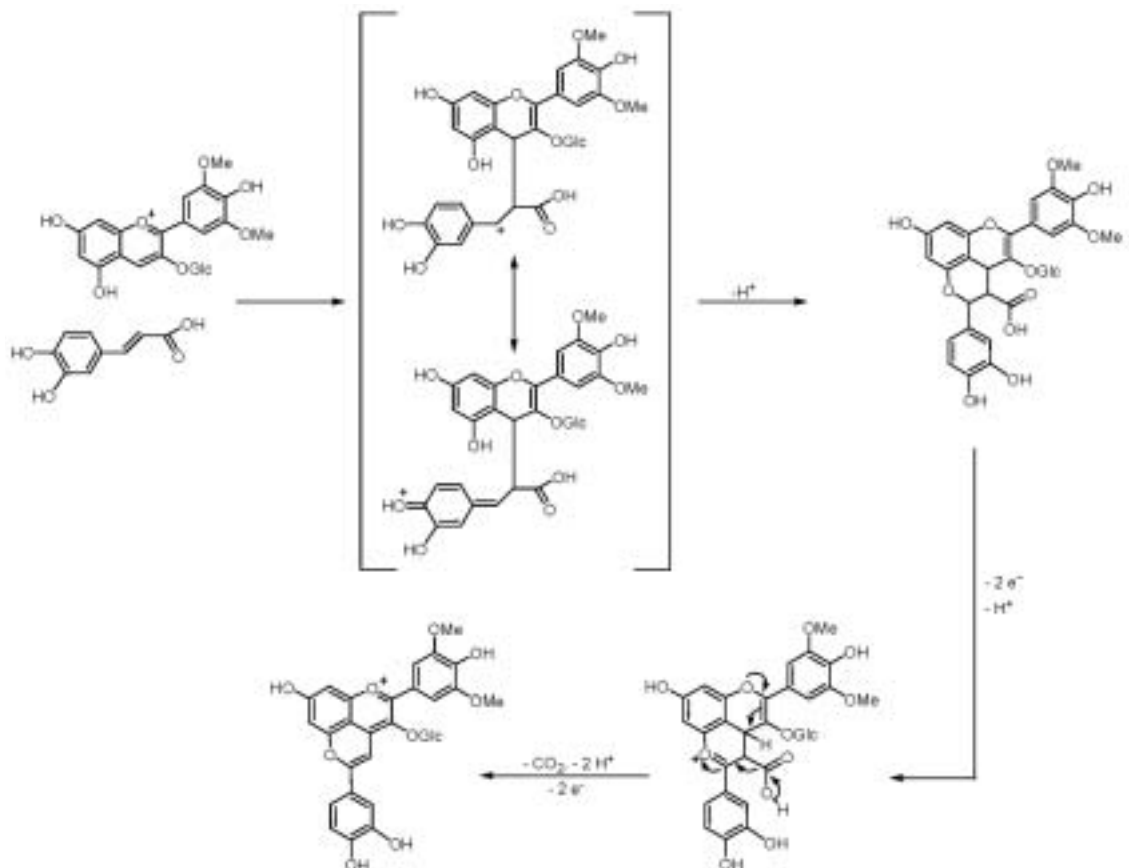
◆ Polymerisationsreaktionen phenolischer Verbindungen bei der Alterung von Rotwein führen zur Bildung bislang nur unzureichend charakterisierter Verbindungen. Diesen wird eine wesentliche Bedeutung für die Farbe des Weins zugeschrieben. Vitisin A (Abbildung 2), das durch Reaktion von Malvidin-3-glucosid mit Brenztraubensäure entsteht, scheint dabei nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die polymere

Fraktion trägt hingegen zu 70 bis 90% zur Farbe bei.¹⁴⁾ Die aus Malvidin-3-glucosid und Vinylphenolen gebildeten Pyranoanthocyane wurden erstmals Mitte der 90er Jahre entdeckt. Bislang nahm man an, dass nur die durch enzymatische Decarboxylierung entstandenen Vinylphenole mit dem Anthocyan reagieren. Wie neueste Arbeiten jedoch belegen, reagieren Anthocyane mit *p*-hydroxysubstituierten Zimtsäuren in wässriger Lösung direkt, ohne Enzyme (Abbildung 3).¹⁵⁾

Ausblick

◆ Nahrungsmittel, die sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in hoher Konzentration enthalten, wecken beim Verbraucher hohe Erwartungen. Derartige Stoffe lassen sich jedoch nur dann bewerten, wenn entsprechende analytische Verfahren (HPLC-MS) etabliert sind und Bioverfügbarkeits- und Metabolismusstudien vorliegen. Nur so ist es möglich, Werbeaussagen fundiert zu prüfen und die Qualität funktioneller Lebensmittel im Rahmen der amtlichen Lebensmittel-

Abb. 3.
Postulierter Mechanismus der Bildung von Pinotin A aus Kaffeesäure und Malvidin-3-glucosid.¹⁵⁾



überwachung langfristig zu kontrollieren. Zweifellos wird die CCC die Isolierung größerer Mengen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe ermöglichen, die somit als Referenzsubstanzen für die Analytik und für in vitro und in vivo-Studien zur Verfügung stehen. Weiterführende Erkenntnisse sind durch eine enge Vernetzung von Lebensmittelchemie, Lebensmitteltechnologie, Ernährungswissenschaft und Toxikologie zu erwarten. Insbesondere gilt es, Stabilität und Bioverfügbarkeit sekundärer Pflanzenstoffe zu steigern und ihren vermuteten Zusatznutzen zu belegen.

Dietmar E. Breithaupt

*Institut für Lebensmittelchemie
Universität Hohenheim, Stuttgart
breithau@uni-hohenheim.de*

Andreas Schieber

*Institut für Lebensmitteltechnologie
Fachgebiet Lebensmittel pflanzlicher
Herkunft
Universität Hohenheim, Stuttgart
schieber@uni-hohenheim.de*

- 1) V. Böhm, J. Food Sci. 2002, 67, 1910–1913.
- 2) P. Fleischmann, K. Studer, P. Winterhalter, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 1677–1680.
- 3) H. Zorn, S. Langhoff, M. Scheibner, M. Nimtz, R. G. Berger, Biol. Chem. 2003, 384, 1049–1056.
- 4) D. E. Breithaupt, U. Wirt, A. Bamedi, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 66–70.
- 5) T. Glaser, A. Lienau, D. Zeeb, M. Krucker, M. Dachtler, K. Albert, Chromatographia 2003, 57 (Suppl.), 195–255.
- 6) Perez-Galvez, H. D. Martin, H. Sies, W. Stahl, Br. J. Nutr. 2003, 89, 787–793.
- 7) P. E. Bowen, S. M. Herbst-Espinosa, E. A. Hussain, M. Stacewicz-Sapuntzakis, J. Nutr. 2002, 132, 3668–3673.
- 8) D. E. Breithaupt, P. Weller, M. Wolters, A. Hahn, Br. J. Nutr. 2003, 90, 795–801.
- 9) K. Robards, J. Chromatogr. A. 2003, 1000, 657–691.
- 10) A. Schieber, P. Keller, P. Streker, I. Klaiber, R. Carle, Phytochem. Anal. 2002, 13, 87–94.
- 11) P. Hilt, A. Schieber, C. Yildirim, G. Arnold, J. Conrad, I. Klaiber, U. Beifuß, R. Carle, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 2896–2899.
- 12) M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maio, R. Galensa, J. Chromatogr. A 2002, 958, 9–16.
- 13) M. Schwarz, S. Hillebrand, S. Habben, A. Degenhardt, P. Winterhalter, Biochem. Eng. J. 2003, 14, 179–189.
- 14) M. Schwarz, P. Quast, D. von Baer, P. Winterhalter, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 6261–6267.
- 15) M. Schwarz, T. C. Wabnitz, P. Winterhalter, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 3682–3687.

Molekularbiologische Methoden der Lebensmittelanalytik

◆ Seit den letzten zwei Jahrzehnten versucht man, mit Hilfe der Gentechnik Selektionsvorgänge in der Pflanzenzüchtung zu beschleunigen. Die Einführung von Eigenschaften und deren Kombination mit bereits vorhandenen ist inzwischen in weiten Bereichen der menschlichen und tierischen Ernährung verbreitet. Als erste gentechnisch veränderte Pflanze erhielt in den USA im Jahr 1994 die FlavrSavr-Tomate eine Zulassung zum Anbau und zur Vermarktung als Lebensmittel.¹⁾

Zwischen 1996 und 2001 stieg die Anbaufläche für gentechnisch modifizierte Nutzpflanzen um das 30-fache. Der weltweite Anbau gentechnisch veränderter Kulturpflanzen umfasste im Jahr 1996 1,7 Mio. Hektar, im Jahr 2000 45 Mio. Hektar und 2002 bereits 58,7 Mio. Hektar. Die hauptsächlich verwendeten gentechnisch veränderten Nutzpflanzen sind Soja (63 % der weltweiten Fläche), Mais (19 %), Baumwolle (13 %) und Raps (5 %).²⁾

Die Europäische Union hat gezielt Vorschriften zum Schutz von Gesundheit und Umwelt erlassen mit dem Ziel, den Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) einheitlich zu regeln. Einen guten Überblick zur rechtlichen Situation sowie nützliche Internet-Links bietet die Internetseite von Transgen.³⁾

Zur Spezifizierung der Produkte und zur Überprüfung der gesetzlich vorgeschriebenen Kennzeichnung sind entsprechende Nachweisverfahren erforderlich. Gentechnische Veränderungen von Organismen lassen sich – beim Erzeuger aber auch bei Überwachungsbehörden – am effizientesten mit DNA-basierten Techniken nachweisen.

Ein weiteres Einsatzgebiet molekularbiologischer Methoden in der Lebensmittelanalytik ist die Identifizierung und Quantifizierung von

pflanzen-, tier- und humanpathogenen Mikroorganismen. Mikrobielle Infektionen, die durch Lebensmittel übertragen werden, sind ein weltweit ernst zu nehmendes Problem. So kann beispielsweise verschmutztes Wasser Obst und Gemüse bakteriell kontaminieren. Eine schnelle und sichere Identifizierung pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln ist sowohl für Qualität als auch für die Sicherheit unumgänglich. Damit hygienische Standards bei Herstellung, Behandlung und Inverkehrbringen von Lebensmitteln eingehalten werden, hat der Gesetzgeber Vorschriften erlassen, die auch den Einsatz molekularbiologischer Techniken vorsehen. Die Methoden zur DNA-basierten Analytik von Lebensmitteln, die bereits in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) aufgenommen sind, stehen in der Tabelle (S. 311).

Für die molekularbiologische Identifizierung von gentechnischen Veränderungen oder Fremd-DNA im Allgemeinen stehen prinzipiell zwei Verfahren zur Verfügung: DNA lässt sich mit Gen-Sonden durch eine einfache Hybridisierungsreaktion nachweisen. Eine weitere Methode ist die PCR. Auch bei diesem Verfahren werden zunächst Hybridmoleküle zwischen jeweils einem Strang der Proben-DNA und dem zu diesem Strang passenden Oligonukleotid ausgebildet. Anders als bei Hybridisierungsverfahren wird bei der PCR die Proben-DNA vermehrt. Besondere Versuchsanordnungen erlauben bei dieser Methode auch eine Quantifizierung des Probenmaterials. Beide Verfahren lassen sich, je nach Fragestellung, miteinander und mit anderen molekularbiologischen Techniken kombinieren.

Der DNA-Nachweis mit Gen-Sonden

◆ Bei Hybridisierungsverfahren, sowohl beim Einzelnachweis als auch bei der simultanen Analyse von vielen Nukleinsäureproben mit DNA-Chips, werden Nukleinsäure-Ziel-