



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Biotechnologische Reduktion des Zuckers in Apfelsaft
mittels der Enzyme Fructosyltransferase und Glucose-
Oxidase.“

verfasst von / submitted by

Anna Elisabeth Hellmayr, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Dipl.-Ing. Dr. -Ing. Henry Jäger

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Ing. Henry Jäger, der mir erst die Möglichkeit gab, dieses Thema für meine Masterarbeit zu wählen.

Besonderen Dank an Dipl. Ing. Thomas Fauster, der mich wunderbar betreut hat während meiner Zeit an der Universität für Bodenkultur Wien am Institut für Lebensmittelwissenschaften und Lebensmitteltechnologie, mir stets geholfen hat und mir jede noch so blöde Frage beantwortet hat.

Danke an alle am Institut, die mir geholfen haben mich zurechtzufinden und wohl zu fühlen.

An meinen Freund und Freundeskreis, danke für eure moralische Unterstützung. Ihr seid mein Fels in der Brandung.

Der aller größte Dank gebührt jedoch meinen Eltern. Vielen Dank für die immerwährende Unterstützung und für eure unendliche Geduld. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke für alles!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abstract	VI
Zusammenfassung	VIII
I. Abbildungsverzeichnis	XI
II. Tabellenverzeichnis	XIII
III. Formelverzeichnis	XV
IV. Abkürzungsverzeichnis	XV
1. Einleitung	1
2. Wissenschaftlicher Hintergrund	2
2.1. Zucker	2
2.1.1. Definition von Mono,- Di-, Oligo- und Polysaccharide	2
2.1.2. Metabolismus von Saccharose, Glucose und Fructose	5
2.1.3. Zufuhrempfehlung, Zuckerkonsum und Zusammenhänge mit Krankheiten	7
2.2. Einsatz von Fructooligosacchariden in der Lebensmittelindustrie und deren Wirkung auf die Gesundheit	9
2.2.1. Einsatz in der Lebensmittelindustrie	10
2.2.2. Symptomlinderung bei Verstopfung	11
2.2.3. Modulation des Fettmetabolismus und Blutzuckers	12
2.2.4. Einfluss einer FOS-Supplementation auf Dickdarmkrebs	15
2.3. Fructooligosaccharide als Präbiotika	16
2.4. Apfelsaft	18
2.4.1. Herstellung	18

2.4.2.	Inhaltsstoffe.....	18
2.4.3.	Zusammenhang zwischen dem Konsum von Fruchtsäften und metabolischen Erkrankungen.....	19
2.5.	Zuckerreduzierende Enzyme.....	21
2.5.1.	Fructosyltransferase.....	21
2.5.2.	Glucose-Oxidase.....	24
2.6.	Enzymsysteme zur Zuckerreduktion.....	27
2.6.1.	Invertase und Glucose-Oxidase.....	27
2.6.2.	Fructosyltransferase und Glucose-Oxidase.....	28
3.	Materialien und Methoden.....	29
3.1.	Geräte.....	29
3.2.	Chemikalien.....	30
3.3.	Versuche.....	32
3.3.1.	Versuchsaufbau.....	32
3.3.2.	Verwendete Parameter.....	32
3.3.3.	Versuchsablauf.....	34
3.4.	Extraktion.....	34
3.5.	Gesamtpolyphenolgehalt.....	35
3.6.	Bestimmung der antioxidativen Kapazität und der Scavenging Activity.....	36
3.7.	Enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts.....	39
3.8.	Farbmessung.....	40
3.9.	Statistik.....	41
4.	Ergebnisse und Interpretation.....	42
4.1.	Originalsaft.....	42
4.2.	Ergebnisse der Versuche mit dem Enzym Fructosyltransferase.....	43

Inhaltsverzeichnis

4.2.1. Enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts	43
4.2.2. Gesamtpolyphenolgehalt	51
4.2.3. Antioxidative Kapazität und Scavenging Activity	51
4.3. Ergebnisse der Versuche mit dem Enzym Glucose-Oxidase	53
4.3.1. Enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts	53
4.3.2. Gesamtpolyphenolgehalt	55
4.3.3. Antioxidative Kapazität und Scavenging Activity	56
4.4. Farbmessung	57
5. Conclusio	59
Literaturverzeichnis.....	61

Abstract

The aim of this work was to produce a sugar reduced and prebiotic apple juice with two different enzymes. The first enzyme was the fructosyltransferase, which splits sucrose into monosaccharide. Further it builds fructooligosaccharides out of fructose. The second enzyme was the glucose-oxidase, which turns glucose into gluconic acid. The initial plan was to use these enzymes simultaneously in order to create a method to produce a glucose-, fructose- and sucrose-reduced apple juice.

Fructosyltransferase was used with 7,5, 10 and 15 U/ml at 30 °C and 50 °C. One experiment was conducted with 422 U/ml and 30 °C, which achieved the highest reduction of sucrose (26 %). The sucrose content of the experiment with 15 U/ml resulted in a reduction of 15 %. The fructose content didn't rise in any of those experiments, which means that there should have occurred a fructooligosaccharide formation. At 50 °C the experiments with 10 U/ml and 15 U/ml achieved a sucrose reduction of 12,5 and 12 % and the fructose content didn't rise, so it is likely that fructooligosaccharides have been formed.

Glucose-oxidase was used with 0,6 U/ml and 1,2 U/ml at 30 °C. The lower enzyme concentration didn't reduce the glucose content, 1,2 U/ml achieved a reduction of about 9%.

Both enzymes didn't work as well as previous studies suggested, so there were no experiments conducted with both enzymes mixed. One limitation of this study is the low pH value of the used apple juice (3,5), because both enzymes have a pH optimum above 5. There is also the possibility that the used enzyme concentrations were too low.

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Masterarbeit war es ein Verfahren zu entwickeln, um einen zuckerreduzierten und präbiotischen Apfelsaft herzustellen. Hierfür wurden zwei Enzyme verwendet, zum einen die Fructosyltransferase, welche die vorhandene Saccharose aufspaltet und aus Fructose Fructooligosaccharide bildet. Zum anderen wurde Glucose-Oxidase verwendet, welche Glucose zu Gluconsäure umbaut.

Die Fructosyltransferase wurde bei 30 °C und 50 °C mit je drei verschiedenen Enzymkonzentrationen (7,5, 10 und 15 U/ml) verwendet. Ein Versuch wurde mit 422 U/ml durchgeführt. Die höchste Saccharosereduktion konnte bei 422 U/ml erreicht werden und lag bei 26 %. Der Versuch bei 30 °C und 15 U/ml erzielte eine Reduktion von 15 %. Bei dieser Temperatur stieg bei keinem Versuch der Fructosegehalt an, daraus kann geschlossen werden, dass eine Fructooligosaccharidbildung stattgefunden hat. Bei 50 °C konnte bei 10 und 15 U/ml eine Saccharosereduktion von 12,5 und 12 % erreicht werden ohne einen Anstieg der Fructose. Auch dies deutet daraufhin, dass Fructooligosaccharide entstanden sind.

Die Versuche mit dem Enzym Glucose-Oxidase wurden mit zwei Enzymkonzentrationen (0,6 und 1,2 U/ml) durchgeführt. Nur die Versuche mit 1,2 U/ml zeigten eine Glucosereduktion von ca. 9 %.

Da beide Enzyme keine große Zuckerreduktion erzielen konnten, wurden keine Experimente mit einer Mischung aus ihnen durchgeführt. Eine Limitation dieser Arbeit stellt der niedrige pH-Wert des verwendeten Apfelsafts dar (3,5). Beide Enzyme haben ein pH-Optimum über 5, dies kann einer der Gründe sein, warum keine größere Zuckerreduktion stattgefunden hat. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Enzymkonzentrationen zu niedrig gewählt wurden.

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Kohlenhydrate (Matissek, Fischer und Steiner, 2018).....	2
Abbildung 2: D-Glucose und D-Fructose (Latscha, Kazmaier und Klein, 2008)..	3
Abbildung 3: Reduzierende und nicht-reduzierende Disaccharide (Matissek und Baltes, 2016).....	4
Abbildung 4: Chemische Struktur von 1-Kestose, 1-Nystose und 1-Fructofuranosylnystose (Campbell et al., 1997).....	5
Abbildung 5: Grundzüge des Glucosestoffwechsels (Löffler, 2008).....	6
Abbildung 6: Reaktion von Saccharose mit dem Enzym Fructosyltransferase (Plou et al., 2008).....	22
Abbildung 7: Reaktion mit dem Enzym Glucose-Oxidase (Witt et al., 2000).....	25
Abbildung 8: Versuchsaufbau der Hauptversuche	32
Abbildung 9: Saccharosereduktion nach 24 Stunden durch das Enzym FTase	44
Abbildung 10: Vergleich der Saccharosegehalte bei 30 °C nach 24 Stunden...	45
Abbildung 11: Vergleich der Fructosegehalte bei 30 °C nach 24 Stunden.....	46
Abbildung 12: Vergleich der Saccharosegehalte bei 50 °C nach 24 Stunden...	47
Abbildung 13: Vergleich der Fructosegehalte bei 50°C nach 24 Stunden.....	48
Abbildung 14: Vergleich der Saccharosegehalte bei 30 °C und 50 °C.....	49
Abbildung 15: Vergleich der Fructosegehalte bei 30 °C und 50 °C nach 24 Stunden	50
Abbildung 16: Gesamtpolyphenolgehalt nach 24 Stunden durch das Enzym FTase.....	51

Abbildung 17: Vergleich der Scavenging Activity bei 30 °C und 50 °C nach 24 Stunden 53

Abbildung 18: Vergleich der Glucosegehalte der verwendeten Enzymkonzentrationen nach 24 Stunden 54

Abbildung 19: Vergleich der antioxidativen Kapazität der Enzymkonzentrationen nach 24 Stunden..... 56

Abbildung 20: Vergleich der Scavenging Activity [%] der verwendeten Enzymkonzentrationen 57

II. Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1: Süßkraft verschiedener Zucker (Matissek und Baltes, 2016)	10
Tabelle 2: Zusammensetzung des Zuckers von Apfelsaft (Souci, Fachmann und Kraut, 2015)	19
Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der optimalen Bedingungen für die Synthese von FOS	23
Tabelle 4: Verwendete Geräte	29
Tabelle 5: Verwendete Enzyme	30
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien	30
Tabelle 7: Verwendete Parameter für die Versuche mit dem Enzym Fructosyltransferase	33
Tabelle 8: Verwendete Parameter der Versuche mit dem Enzym Glucose-Oxidase.....	34
Tabelle 9: Verdünnung von Ferulasäure für die Kalibrationskurve von TPC.....	36
Tabelle 10: Verdünnung der Eisensulfat-Lösung zur Erstellung der Kalibrationsgerade.....	37
Tabelle 11: Verdünnungsschritte des Trolox-Standards zur Erstellung einer Kalibrationsgerade.....	38
Tabelle 12: Pipettierschema zur enzymatischen Bestimmung des Zuckergehalts (Sucrose, D-Fructose and D-Glucose assay procedure K-Surfg 04/18, 2018)	40
Tabelle 13: Zuckerzusammensetzung des Originalsafts.....	42
Tabelle 14: TPC-, FRAP- und DPPH-Werte des Originalsafts.....	42
Tabelle 15: Ermittelte Zuckergehalte aller Versuche mit dem Enzym FTase nach 24 Stunden.....	43

Tabelle 16: Antioxidative Kapazität der Versuche mit dem Enzym FTase	52
Tabelle 17: Glucosegehalte der Versuche mit reiner Glucose-Oxidase nach 24 Stunden	53
Tabelle 18: Gesamtpolyphenolgehalt der verwendeten Enzymkonzentrationennach 24 Stunden	56
Tabelle 19: Δ -E-Werte der Versuche mit dem Enzym FTase nach 24 Stunden.....	58
Tabelle 20: Δ -E-Werte der Versuche mit dem Enzym GOD nach 24 Stunden.....	58

III. Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Scavenging Activity (AA%) 38
 Formel 2: Berechnung des Farbabstandes 41

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	
ACF	Abberant crypt foci
BMI	Body Mass Index
FOS	Fructooligosaccharide
FTase	Fructosyltransferase
FS	Ferulasäure
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GOD	Glucose-Oxidase
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
scFOS	Kurzkettige Fructooligosaccharide
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren
TPC	Gesamtpolyphenolgehalt

1. Einleitung

Weltweit liegt die tägliche Zuckierzufuhr über dem empfohlenen Wert von 10 % der Gesamtenergieaufnahme. Säfte spielen hierbei eine bedeutende Rolle, da sie zwar den Anschein erwecken gesund zu sein, jedoch sehr viel Zucker enthalten. Neben Orangensaft zählt Apfelsaft zu den beliebtesten Getränken Österreichs und trägt einen erheblichen Teil zur täglichen Energie- und auch Zuckierzufuhr bei. Eine hohe Zuckeraufnahme geht mit verschiedenen Krankheiten einher, bereits zwei Gläser Apfelsaft pro Tag überschreiten die Empfehlung. Aufgrund des enthaltenen Zuckers sind Fruchtsäfte nicht geeignet den Wasserbedarf zu decken und sollte nicht in großen Mengen aufgenommen werden (WHO, 2015).

Ziel dieser Arbeit war es ein Verfahren zu entwickeln, um den Zuckergehalt in Apfelsaft zu reduzieren. Zwei Enzyme wurden zum Zuckerabbau verwendet, zum einen die Fructosyltransferase, welche Saccharose und Fructose in Fructooligosaccharide umwandelt, zum anderen die Glucose-Oxidase, die Glucose zu Gluconsäure abbaut. Durch Kombination dieser Enzyme sollte ein zuckerreduzierter und gleichzeitig probiotischer Saft entstehen, der durch den Gehalt an Fructooligosaccharide gesundheitsfördernde Eigenschaften aufweist.

Um die Auswirkungen auf den Saft durch die Behandlung mit den Enzymen zu erfassen, wurden zusätzlich verschiedene Parameter, wie der Gesamtpolyphenolgehalt, die Farbe und die antioxidative Kapazität untersucht.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1. Zucker

Zucker gehören der Gruppe der Kohlenhydrate, auch Saccharide genannt, an und werden, wie in Abbildung 1, weiter in Monosaccharide, Disaccharide, Oligosaccharide und Polysaccharide eingeteilt. Die Summenformel dieser Stoffe lautet $C_nH_{2n}O_n$, demnach zeichnen sie sich durch eine hohe Anzahl an Hydroxylgruppen aus. Sie zeigen eine starke Affinität zu Wasser und je nachdem, ob sie nieder- oder hochmolekular sind, weisen sie eine gute Wasserlöslichkeit auf (Matissek und Baltes, 2016).

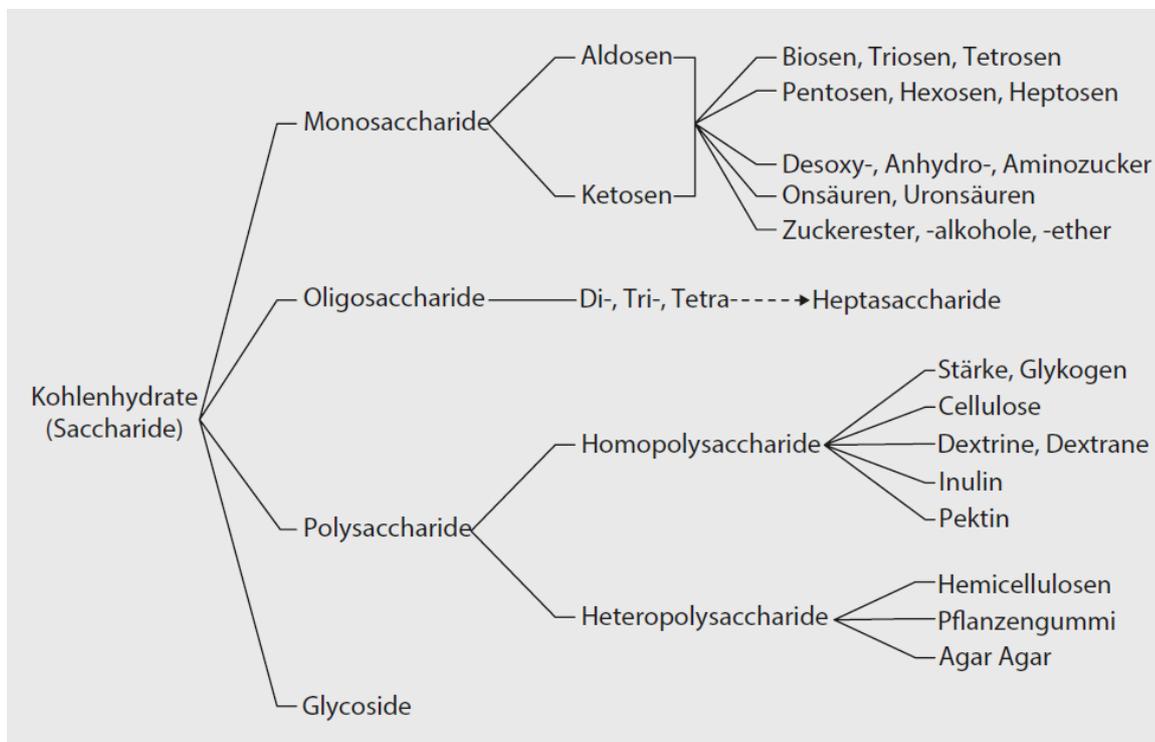


Abbildung 1: Einteilung der Kohlenhydrate (Matissek, Fischer und Steiner, 2018)

2.1.1. Definition von Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide

Monosaccharide sind niedermolekulare Zucker, die sich von D-Glycerinaldehyd (Ausgangssubstanz für Aldosen) oder 1,3-Dihydroxyaceton (Ausgangssubstanz für Ketosen) ableiten. Je nachdem ob die primäre oder sekundäre Hydroxylgruppe von Glycerin dehydriert wird, wird zwischen Aldosen und Ketosen unterschieden. Werden CHO-Gruppen eingefügt, entstehen unterschiedlichste

Monosaccharide, welche zusätzlich je nach Anzahl der Kohlenstoffatome in Triosen, Tetraosen, Pentosen, Hexosen und Heptosen eingeteilt werden (Matissek und Baltes, 2016).

In Abbildung 2 sind zwei der wichtigsten Monosaccharide abgebildet. Zum einen D-Glucose, welche den bedeutendsten Zucker darstellt und die am häufigsten vorkommende organisch-chemische Substanz auf der Welt ist. Zum anderen Fructose, welche in großen Mengen in Obst und Honig zu finden ist und oft als Süßungsmittel oder Zuckeraustauschstoff verwendet wird, da sie im Vergleich zu Glucose eine wesentlich höhere Süßkraft besitzt. Durch Verknüpfung untereinander, bilden Monosaccharide die Bausteine für höhermolekulare Kohlenhydrate, wie Disaccharide, Oligosaccharide und Polysaccharide (Ebermann und Elmadfa, 2011).

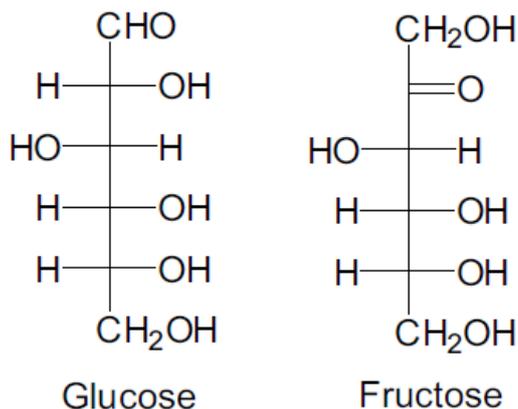


Abbildung 2: D-Glucose und D-Fructose (Latscha, Kazmaier und Klein, 2008)

Disaccharide sind aus zwei Monosacchariden aufgebaut und je nachdem welche verknüpft sind, ergeben sich unterschiedliche Zucker. Eine weitere Einteilung, siehe Abbildung 3, erfolgt aufgrund der Bindungen zwischen den Bausteinen. Liegt die Verknüpfung zwischen den glycosidischen Hydroxylgruppen der Monosaccharide, so wird dieser Zucker als nicht-reduzierend bezeichnet. Entsteht eine Bindung an der Hydroxylgruppe des C-4-Atoms eines anderen Monosaccharids, werden reduzierende Disaccharide gebildet (Matissek und Baltes, 2016). In der menschlichen Ernährung gelten Saccharose, Lactose und Maltose als die wichtigsten Disaccharide. Saccharose (α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranosid), der herkömmliche Haushaltszucker, ist das wich-

tigste Süßungsmittel weltweit. Es besteht chemisch gesehen aus einem Mol Glucose, welches mit einem Mol Fructose über ihre glycosidischen Kohlenstoffatome verknüpft ist und somit zu den nicht-reduzierenden Disacchariden zählt (Ebermann und Elmadfa, 2011).

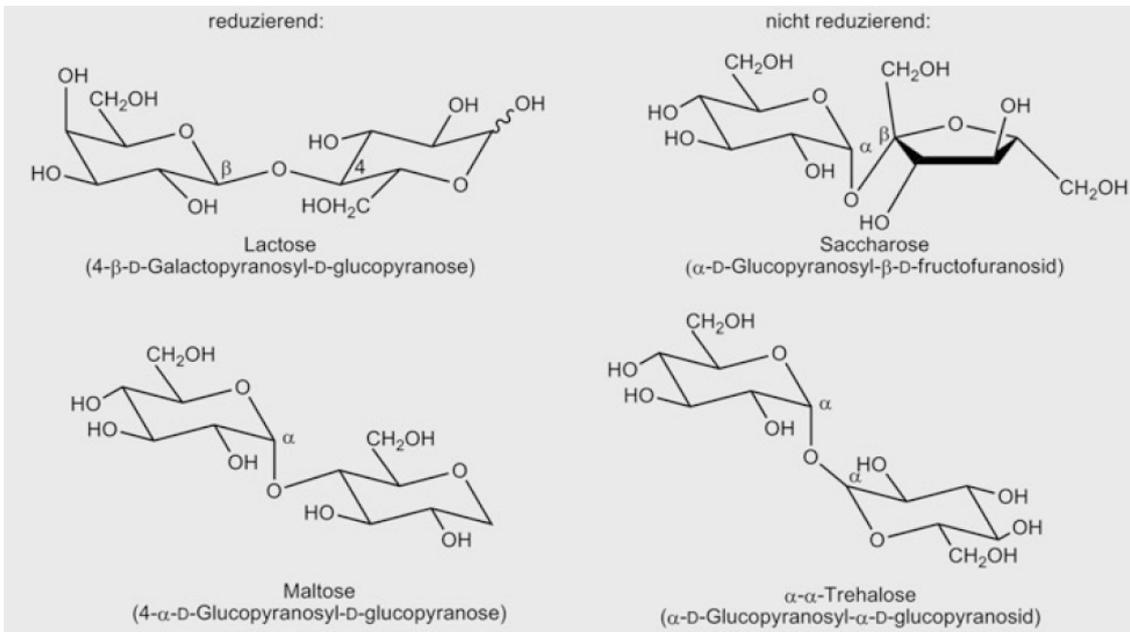


Abbildung 3: Reduzierende und nicht-reduzierende Disaccharide (Matissek und Baltes, 2016)

Oligosaccharide bestehen aus drei bis fünf Monosacchariden, die durch zwei bis vier glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Relevant für diese Arbeit sind die kurzkettigen Fructooligosaccharide (short chain fructooligosaccharides, kurz scFOS), welche in Abbildung 4 dargestellt sind. Kestose und Isokestose sind Vertreter der nicht-reduzierenden Trisaccharide und sind aus Saccharose und einem zusätzlichen Fructosemolekül, welches glykosidisch am Fructose-Ende gebunden ist, aufgebaut. Je nachdem, ob die zweite Fructose-Einheit β-(6-2) oder β-(1-2) verknüpft ist, wird zwischen Kestose und Isokestose unterschieden (Ebermann und Elmadfa, 2011). Nystose, ein Tetrasaccharid, hat ebenfalls Saccharose als Ausgangssubstanz und bildet sich über Kestose indem noch ein weiteres Fructosemolekül angeknüpft wird (Stick, 2007).

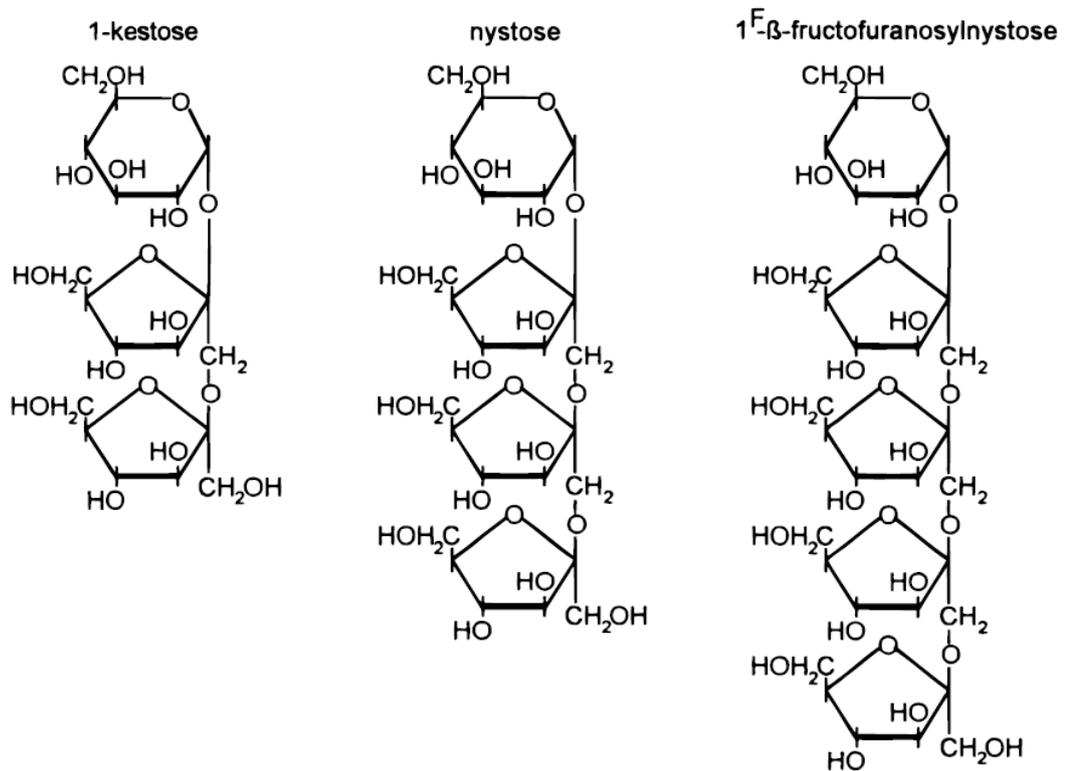


Abbildung 4: Chemische Struktur von 1-Kestose, 1-Nystose und 1-Fructofuranosylnystose (Campbell et al., 1997)

Polysaccharide sind Polymere von Monosacchariden, welche verschiedene Kettenlängen aufweisen und ebenfalls durch glykosidische Bindungen verknüpft sind. Eine weitere Einteilung erfolgt in Homopolysaccharide und Heteropolysaccharide. Erstere bestehen aus verbundenen Monosaccharid-Bausteinen derselben Art. In der Tier- und Pflanzenwelt bilden sie wichtige Speicher- und Gerüstsubstanzen, wie beispielsweise Glykogen, Stärke und Cellulose. Im Gegensatz dazu sind Heteropolysaccharide, zum Beispiel Hemicellulose, aus verschiedenen Bausteinen aufgebaut und werden in der Lebensmittelindustrie unter anderem als Gelier- und Verdickungsmittel eingesetzt (Ebermann und Elmadfa, 2011).

2.1.2. Metabolismus von Saccharose, Glucose und Fructose

Saccharose wird im Duodenum durch das Enzym Invertase, auch Saccharase genannt, in die Monosaccharide Glucose und Fructose aufgespalten. Abbildung 5 gibt einen Überblick über den weiteren Stoffwechselweg von Glucose im

menschlichen Organismus. Der Blutzuckerspiegel wird durch die Hormone Insulin und Glucagon reguliert (Löffler, 2008).

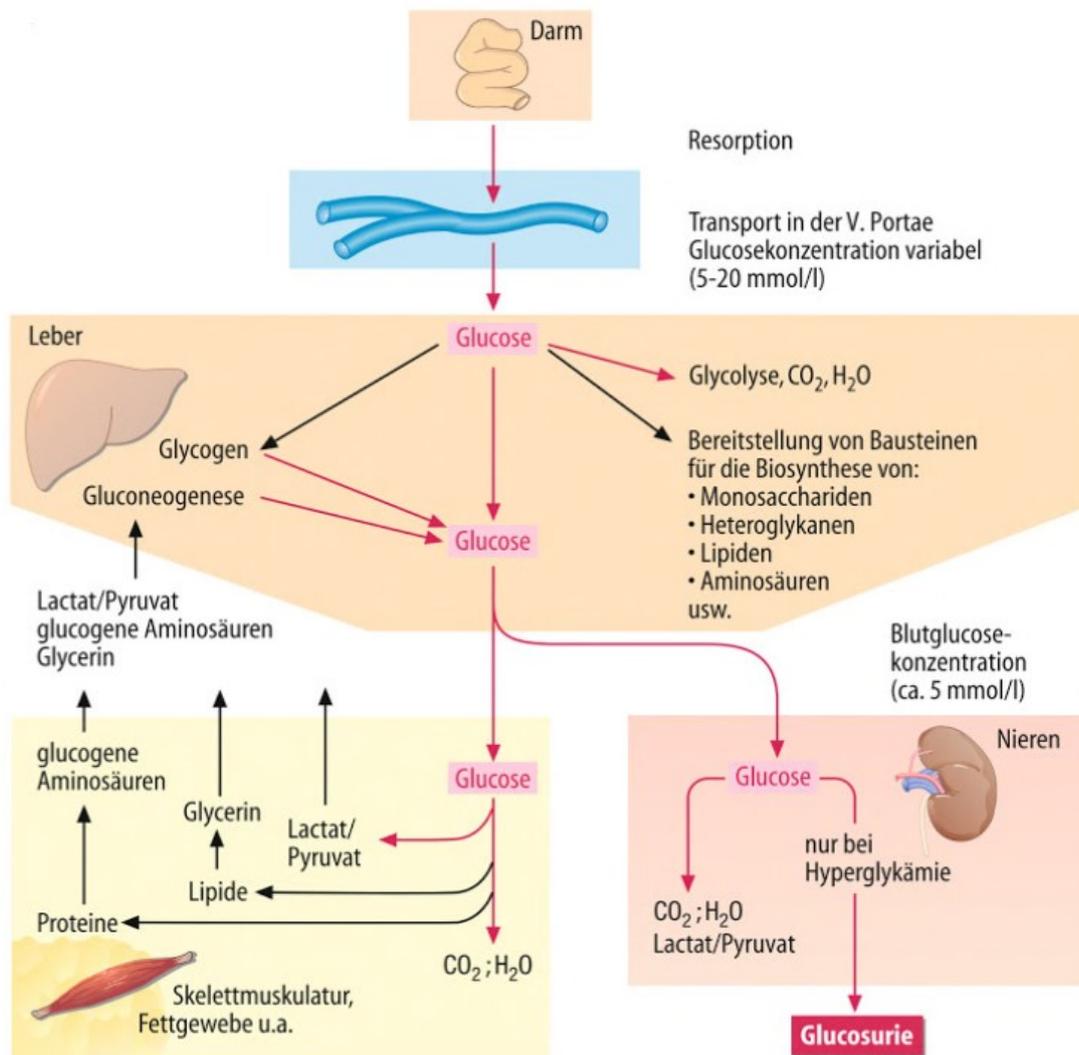


Abbildung 5: Grundzüge des Glucosestoffwechsels (Löffler, 2008)

Fructose wird, ähnlich wie Glucose, ebenfalls im Duodenum, resorbiert und zur Leber transportiert. Dort wird es gespalten und die entstandenen Produkte werden wiederum in die Glykolyse oder Gluconeogenese eingeschleust. Im Gegensatz zur Glucose läuft der Stoffwechselweg der Fructose insulinunabhängig ab (Löffler, 2008).

2.1.3. Zufuhrempfehlung, Zuckerkonsum und Zusammenhänge mit Krankheiten

Die World Health Organization (WHO) definiert "freie Zucker" als Mono- und Disaccharide, die entweder in einem Lebensmittel natürlich vorkommen oder aufgrund von technologischen Gründen hinzugefügt wurden. Die Verzehrsempfehlung von diesen Zuckern gilt sowohl für Erwachsenen als auch für Kinder und wurde auf maximal 10 % der täglich aufgenommenen Energie beschränkt. Bei einer durchschnittlichen Kalorienaufnahme von 2000 kcal pro Tag entspricht dies einer Menge von 50 g Zucker, die höchstens aufgenommen werden soll. Zusätzlich schlägt die WHO vor, den Zuckerkonsum sogar auf unter 5 % der täglichen Energieaufnahme zu reduzieren. Besonders im Hinblick auf Zahnkaries ist eine derartig niedrige Zuckeraufnahme von Vorteil (World Health Organization, 2015).

Laut dem österreichischem Ernährungsbericht 2017 macht der durchschnittliche Konsum von freien Zuckern bei Frauen 17,6 % und bei Männern 16 % der Gesamtenergiezufuhr pro Tag aus, somit liegen 88,8% der Frauen und 81,4% der Männer über der bereits erwähnten empfohlenen Menge der WHO (Bundesministerium für Frauen und Gesundheit, 2017). Die noch strengere angestrebte Grenze von maximal 5 % wird von ca. 98 % der ÖsterreicherInnen nicht erreicht. Grund für diese niedrige Empfehlung ist die Tatsache, dass ein hoher Zuckerkonsum mit verschiedenen Krankheiten einhergeht, welche im Folgenden näher beleuchtet werden (World Health Organization, 2015).

Eine der häufigsten nicht-übertragbaren Krankheiten weltweit ist Zahnkaries, etwa 80 % der Weltbevölkerung ist betroffen, egal ob Kinder oder Erwachsene. Freie Zucker, die mit der Nahrung aufgenommen werden, gelten als wichtigster Risikofaktor, auch die Menge und die Frequenz der Zuckeraufnahme spielen eine Rolle bei der Entstehung dieser Krankheit. Die Einhaltung der WHO-Empfehlung maximal 10 % der Gesamtenergie in Form von Zucker zu konsumieren bewirkt zwar eine Reduktion des Kariesrisikos, jedoch erfolgt dadurch keine Eliminierung der Erkrankung (Moynihan, 2016). Bezogen auf Karies ist es von Vorteil lediglich unter 2-3 % der täglichen Energieaufnahme aus Zucker zu beziehen (Sheiham und James, 2014).

Ein weiteres globales Problem, welches mit einer übermäßigen Zuckeraufnahme zusammenhängt, stellen Übergewicht und Adipositas dar. Der Body Mass Index (BMI) liegt bei übergewichtigen Menschen zwischen 25 und 30 kg/m², ab einem BMI von über 30 kg/m² wird von Adipositas gesprochen. Diese Krankheit stellt einen wichtigen, jedoch beeinflussbaren, Risikofaktor für chronische Krankheiten, wie Diabetes Mellitus Typ 2, oder kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Es besteht ein positiver Zusammenhang zwischen einer hohen Zuckeraufnahme und hohem Körpergewicht, denn eine zuckerreiche Ernährung führt zum Anstieg des Fettanteils des menschlichen Körpers aufgrund eines Überschusses an aufgenommener Energie, der durch den Zucker verursacht wird (Engin, 2017).

Ein Zusammenhang zwischen einer Senkung des Risikos an Adipositas zu erkranken und einer reduzierten Zuckeraufnahme konnte zwar festgestellt werden, jedoch war die Studiendauer meist zu gering, um gesicherte Ergebnisse zu liefern. Zusätzlich zur Einschränkung des Zuckerkonsums ist eine Ernährungs- und Lebensstilumstellung zur Senkung des Adipositasrisikos von großer Bedeutung (Morenga, Mallard und Mann, 2013). Ein erhöhter Zuckerkonsum geht mit einer schnelleren und stärkeren Zunahme des Körpergewichts einher, somit stellt die Zuckerreduktion eine geeignete präventive Strategie gegen Adipositas dar. Da Übergewicht ein Risikofaktor sowohl für Diabetes Mellitus Typ 2 als auch Hypertonie ist, spielt demnach Zucker auch eine indirekte Rolle bei der Entstehung dieser Krankheiten. (He und MacGregor, 2015; Campbell et al., 2017)

Neben Saccharose zählt in der Lebensmittelindustrie auch der fructosehaltige Maissirup (high fructose corn syrup) zu den am meisten verwendeten Süßungsmitteln. Dieser häufige Einsatz von Maissirup führte zu einem weltweiten Anstieg des Fructosekonsums. Mit diesem Anstieg ging eine Zunahme an nicht alkohol-bedingten Fettleber-Erkrankungen (non alcoholic fatty liver disease, kurz NAFLD) einher. Mittlerweile gehen Wissenschaftler davon aus, dass ein übermäßiger Fructosekonsum eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Krankheit spielt. Fructose stimuliert nicht nur die de-novo-Lipogenese, wodurch

Fette synthetisiert werden, sondern blockiert auch die β -Oxidation der Fettsäuren und hemmt so den Abbau. Beide Wirkungen führen dazu, dass sich Fett in der Leber anreichert. NAFLD hat zwar viele verschiedene Ursachen, doch ein hoher Fructosekonsum stellt einen wichtigen Risikofaktor für diese Erkrankung dar (Jensen et al., 2018).

2.2. Einsatz von Fructooligosacchariden in der Lebensmittelindustrie und deren Wirkung auf die Gesundheit

Fructooligosaccharide (kurz FOS) gehören der Gruppe der Fructane an, welche aus mehreren Fructoseeinheiten aufgebaute Oligo- und Polysaccharide sind. Da es sich um Oligosaccharide handelt, schließen manche Autoren jene Stoffe aus, welche eine Kettenlänge von über 20 Einheiten aufweisen (Yun, 1996). Im Gegensatz dazu wird oft auch eine sehr weitläufige Definition verwendet, wie zum Beispiel bei Sabater-Molina et al. (2009), die FOS in folgende 3 Kategorien einteilen. Die erste Gruppe besteht aus Inulin, welches einen Polymerisationsgrad von 2-60 Fructoseeinheiten aufweist. Die zweite definieren sie als Oligofructose, welche durch eine enzymatische Hydrolyse aus Inulin erzeugt wird und einen Polymerisationsgrad von 2-20 Einheiten besitzt. Die letzte Gruppe sind die kurzkettigen FOS. Diese sind aus maximal 5 Fructoseeinheiten aufgebaut, welche durch β -(2-1) glycosidische Bindungen verknüpft sind und eine endständige Glucose enthalten. Durch Fermentation mit dem Enzym Fructosyltransferase (abgekürzt FTase) entstehen die kurzkettigen Oligosaccharide Kestose, Nystose und Fructofuranosyl-Nystose, welche in Abbildung 4 dargestellt sind.

FOS werden als Süßungsmittel eingesetzt. Je kürzer die Kettenlänge der Fructoseeinheiten ist, umso süßer schmecken diese (Roberfroid und Slavin, 2000). Kestose, das kürzeste Oligosaccharid dieser Gruppe, hat eine Süßkraft von 30 % im Vergleich zu Saccharose. Tabelle 1 stellt den Vergleich der Süßkraft verschiedener Zucker dar. Die Süße von FOS weist ein ähnliches Geschmacksprofil wie herkömmlicher Zucker auf. Da sie unverdaulich sind, besitzen sie lediglich 1,5 – 2 kcal/g FOS auf und sind verglichen mit Saccharose kalorienarm (Bornet, 1994). Jedoch aus dem gleichen Grund weisen sie, wie alle unverdau-

lichen Kohlenhydrate, osmotische Effekte auf. Eine zu hohe Aufnahme kann zu unangenehmen Nebenwirkungen, wie Durchfall oder Blähungen, führen. Ein täglicher Konsum von 10 – 20 g gilt aber als unbedenklich und verursacht keine unerwünschten Effekte. Bei höheren Dosen ist es empfehlenswert diese Menge auf den Tag verteilt aufzunehmen, da so die Verträglichkeit gesteigert wird (Roberfroid und Slavin, 2000).

Tabelle 1: Süßkraft verschiedener Zucker (Matissek und Baltés, 2016)

Zucker	Saccharose	Glucose	Fructose	FOS
Süßkraft	1	0,6	1,2	0,3

2.2.1. Einsatz in der Lebensmittelindustrie

FOS werden in der Lebensmittelindustrie vorrangig aus zwei Gründen eingesetzt, einerseits aufgrund ihrer technologischen Eigenschaften und andererseits aus ernährungsphysiologischen bzw. gesundheitlichen Gründen.

Bei Milchprodukten kommen FOS als Fett- oder Zuckerersatz zum Einsatz, zusätzlich lässt sich das Mundgefühl und die Schaumstabilität des Lebensmittels positiv beeinflussen (Singla und Chakkaravarthi, 2016). Auch Käse kann von einer Anreicherung profitieren. Durch Zugabe von FOS zu einem bereits probiotischen Käse (Petit-Suisse) konnte ein Produkt mit symbiotischen Eigenschaften erzeugt werden und gesundheitsfördernd wirken. Symbiotika zeichnen sich durch eine Kombination von präbiotischen Stoffen und probiotischen Bakterien aus (Cardarelli et al., 2008). Durch Anreicherung eines Molkegetränks aus Ziegenmilch wurde ebenfalls ein symbiotisches Lebensmittel geschaffen. Durch diese Eigenschaften der bereits vorhandenen probiotischen Bakterien und der zugesetzten präbiotischen FOS kann dieses Produkt potenziell als funktionelles Lebensmittel eingestuft werden. Die sensorischen Untersuchungen zeigten sowohl bei dem Käse als auch bei dem Molkegetränk eine gute Akzeptanz, ebenfalls konnten technologische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Viskosität, verbessert werden (Cardarelli et al., 2008; da Silveira et al., 2015).

In Backwaren werden FOS ebenfalls erfolgreich als Zuckerersatz eingesetzt. Nicht nur präbiotische Effekte, sondern auch die Feuchtigkeit und die Haltbarkeit konnten positiv beeinflusst werden. Bei gefrorenem und über einen längeren Zeitraum gelagertem Teig konnte gezeigt werden, dass sich FOS bis zu einer Konzentration von 6 % positiv auf die Backqualität auswirken. Der Teig ging nicht nur besser auf, auch das Volumen des gebackenen Brotlaibs stieg an. Dies wird auf eine verzögerte Stärkeverkleisterung zurückgeführt, welche durch eine Zugabe von FOS verursacht wird. Durch den Zusatz war die Brotkrume feuchter und weicher, nur die dunklere Farbe der Kruste wurde bemängelt (Park, Jang und Lim, 2016). Auch Versuche mit angereichertem Kuchen wurden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls eine stärkere Braunfärbung, dieser Effekt wurde jedoch in dieser Studie nicht als negativer Aspekt angeführt. Die sensorische Analyse zeigte eine Veränderung der Konsistenz, der Kuchen war härter und klebriger. Die Testpersonen bewerteten den „funktionalen“ Kuchen beinahe gleich positiv wie den herkömmlichen. (Volpini-Rapina, Sokei und Conti-Silva, 2012)

Bei Fleischprodukten kommen FOS als Fettersatz zum Einsatz. Eine Anreicherung wirkt sich auf die Textur und die Stabilität aus. So ist es möglich eine Fettreduktion von 40 – 50 % zu erreichen und eine Textur von herkömmlichen Würsten zu erhalten, wenn eine gleichzeitige Anreicherung mit FOS erfolgt. Es wäre demnach mögliche Würste auf den Markt zu bringen, welche 30 % weniger Kalorien enthalten als herkömmliche Produkte, da diese auch bei sensorischen Analysen gut abschnitten. (Mendoza et al., 2001; Cáceres et al., 2004).

2.2.2. Symptomlinderung bei Verstopfung

FOS wird zugeschrieben eine symptomlindernde Wirkung bei Verstopfungen zu besitzen.

Eine Studie von Kleessen et al. (1997) hat Versuche an älteren Personen, die an Verstopfungen litten, durchgeführt. Die Dauer des Experiments betrug acht Tage und die verwendete Dosis begann bei 20 g Inulin pro Tag und wurde stetig auf 40 g täglich erhöht. Bei 9 von 10 TeilnehmerInnen erhöhte sich durch die

Intervention die Stuhlfrequenz erheblich und es traten als Nebenwirkung lediglich milde bis moderate Blähungen auf. Eine Aufnahme von unverdaulichen Kohlenhydraten kann laut diesem Ergebnis einen Beitrag leisten, die Symptome von Verstopfungen zu lindern. Eine weitere Studie hat an sechs gesunden Menschen, die nur einen oder zwei Stuhlgänge in zwei oder drei Tagen aufwiesen, ebenfalls die Auswirkung von Inulin auf die Stuhlfrequenz untersucht. Die TeilnehmerInnen bekamen drei Mal täglich 5 g Inulin und auch hier zeigte sich durch eine Supplementation mit Inulin eine Erhöhung der Stuhlfrequenz um das 1,6-fache (Den Hond, Geypens und Ghoos, 2000).

In einer Studie von de Souza Lima Sant'Anna et al. (2015) erhielten 48 Freiwillige, die an Verstopfungen litten, 52 g eines Yacón-basierenden Produkts gemischt mit 448 ml Orangensaft, welches eine Menge von insgesamt 10 g FOS enthielt. Dieses Getränk sollten sie auf zwei Portionen aufteilen und eine in der Früh und eine am Abend zu sich nehmen. Nach Abschluss der 30-tägigen Studie, zeigte sich eine deutliche Linderung der Symptomatik der TeilnehmerInnen, die Anzahl der Bifidobakterien war höher und die Anzahl der Clostridium- und Enterobakterien sank signifikant ab. Nur zwei Teilnehmer berichteten von Bauchschmerzen und 13 von Blähungen, alle Nebenwirkungen wurden jedoch als tolerierbar eingestuft und traten nur in der ersten Woche der Intervention auf. Dieses Produkt, welches als inulin- und FOS-reich gilt, kann demnach wirksam gegen Verstopfungen eingesetzt werden.

2.2.3. Modulation des Fettmetabolismus und Blutzuckers

Ballaststoffe sind ein wichtiger Teil einer gesunden Ernährung und bringen viele positive Effekte mit sich. Sie zeigen beispielsweise die Fähigkeit den Blutzucker zu modulieren, indem hohe postprandiale Glucosespitzen verhindert werden. Mechanismen, die für diese Wirkung und eine Beeinflussung der Absorption von Makronährstoffen (vor allem Kohlenhydrate) verantwortlich sind, sind eine verzögerte Magenentleerung, aufgrund dessen eine längere Verweildauer des Speisebreis im Magen und zusätzlich eine verkürzte Transitzeit im Dünndarm (Kaur und Gupta, 2002).

FOS können auch einen positiven Effekt auf den Serumlipidspiegel aufweisen, die Triglycerid- und Cholesterinkonzentration im Serum senken und infolgedessen das Risiko an Diabetes Mellitus und Adipositas zu erkranken verringern. Mehrere mögliche Mechanismen werden bei Sabater-Molina et al. (2009) genannt.

FOS sind in der Lage postprandialen Glucosespitzen im Blut zu senken und reduzieren in Folge Enzyme des Fettstoffwechsels, welche durch Glucose und Insulin angeregt werden. Durch die Umsetzung der FOS durch die Darmflora entstehen die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acids) Propionat, Acetat und Butyrat. Propionat hemmt die Biosynthese von Cholesterin und die Lipogenese, während Acetat diese Stoffwechselwege stimuliert. Ein bestimmtes Mengenverhältnis dieser Fettsäuren, welche in die Leber gelangen, ist ausschlaggebend für die lipidreduzierenden Fähigkeiten von FOS. Zusätzlich fördern FOS die Sekretion von Gallensäure im Darm, wodurch mehr Cholesterin ausgeschieden wird und in weiterer Folge der Cholesterinspiegel im Serum gesenkt wird (Sabater-Molina et al., 2009).

In einem Tierversuch wurde an Ratten für einen Zeitraum von drei Wochen untersucht ob Oligofructose in der Lage ist eine postprandiale Lipidämie bei einer fettreichen Ernährung zu senken. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt, eine Kontrollgruppe, eine, die eine fettreiche Nahrung bekam und die Versuchsgruppe, die Oligofructose zusätzlich zu fettreichem Futter erhielt. Die Supplementation reduzierte erfolgreich die postprandiale Triglyceridämie um mehr als 50 % im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Dies lässt sich auf eine Verbesserung des Stoffwechsels der Lipoproteine zurückführen. Zusätzlich zeigte sich bei der Versuchsgruppe geringere Mengen an nicht verestertem Cholesterin im Serum. Laut diesen Ergebnissen hat eine Supplementation mit Oligofructose einen Schutzeffekt gegen einen Anstieg dieser Werte, wenn gleichzeitig eine fettreiche Ernährung erfolgt (Kok, Taper und Delzenne, 1998).

Der Effekt von 10 g Inulin pro Tag auf die hepatische Lipogenese, Triglycerid- und Cholesterinkonzentration im Plasma wurde an acht gesunden Personen im

Rahmen einer doppelblinden, randomisierten und Placebo-kontrollierten Crossover-Studie untersucht. Drei Wochen lang folgten die Teilnehmer und Teilnehmerinnen einer kohlenhydratreichen und fettarmen Ernährung und konsumierten täglich, auf zwei Mal aufgeteilt, insgesamt 10 g Inulin. Bei einer Supplementation konnte ein signifikant geringerer Triglyceridspiegel im Plasma festgestellt werden und auch die hepatische Lipogenese war deutlich reduziert, verglichen mit der Placebogruppe. Es zeigte sich jedoch weder ein Einfluss auf das Gesamt-, HDL- oder LDL-Cholesterin, noch auf die Glucose-, Insulin- oder Glucagonkonzentration (Letexier und Beylot, 2003).

In einer randomisierten, doppelblinden Crossover-Studie wurde der Effekt von einer moderaten Aufnahme von scFOS auf den Fettmetabolismus und den Glucosestoffwechsel an 30 Menschen mit leichter Hypercholesterinämie untersucht. Die tägliche Dosis betrug 10,6 g pro Tag, welche auf zwei Mal aufgeteilt, als Süßungsmitteln in Tee oder Kaffee verwendet werden sollte. In dieser Studie konnte kein positiver Effekt von kurzkettigen FOS auf den Fett- oder Glucosestoffwechsel beobachtet werden. Es zeigten sich weder eine senkende Wirkung auf den Cholesterin- und Triglyceridspiegel, noch eine Senkung der postprandialen Glucosespitzen. Als mögliche Erklärung dieser Ergebnisse nennen die Autoren die geringe Menge an verwendeten scFOS (Brouns et al., 2003).

Eine doppelblinde, randomisierte und Placebo-kontrollierte Studie untersuchte die Auswirkungen von FOS auf den Glucosespiegel an 74 Teilnehmer und Teilnehmerinnen mit einem Mindestalter von 60 Jahren über einen Zeitraum von neun Wochen. Die ProbandInnen sollten täglich 18 g eines gefriergetrockneten Yacòn-Pulvers, in dem 7,4 g FOS enthalten waren, mit Milch oder Saft im Laufe des Frühstücks konsumieren. Es konnte eine signifikante Reduktion der Glucosekonzentration im Serum im nüchternen Zustand festgestellt werden, ohne dem Auftreten von jeglichen Nebenwirkungen. Dieses Pulver scheint demnach eine gute Quelle für FOS zu sein, jedoch erwähnen die Autoren nicht, welche Oligosaccharide tatsächlich in der dieser Wurzelknolle enthalten sind (Scheid et al., 2014).

FOS mit einem hohen Polymerisationsgrad, wie Inulin oder Oligofruktose, wirken sich positiv auf den Fettmetabolismus aus, wie sowohl Tier- als auch Humanstudien zeigten. Bei kurzkettigen FOS konnte jedoch kein Effekt nachgewiesen werden.

2.2.4. Einfluss einer FOS-Supplementation auf Dickdarmkrebs

Sowohl bei Frauen als auch bei Männern stellt Darmkrebs weltweit eine der häufigsten Krebsdiagnosen dar. Neben einer genetischen Prädisposition, Adipositas und Rauchen, ist ebenfalls die Ernährung, bzw. der gesamte Lebensstil, ein Risikofaktor, gleichzeitig aber auch ein wichtiger Ansatzpunkt für präventive Maßnahmen gegen diese Krankheit. Rotes Fleisch und Alkohol erhöhen das Risiko für Dickdarmkrebs, Milch und Vollkornprodukte hingegen besitzen protektive Eigenschaften (Vieira et al., 2017). Auch FOS als unverdauliche Lebensmittelbestandteile werden mit präventiven Wirkungen gegen Darmkrebs in Verbindung gebracht. Die präbiotischen Effekte und die dadurch verursachten Veränderungen der Mikrobiota im Darm bewirken, dass Kanzerogene schneller ausgeschieden werden (Sabater-Molina et al., 2009). Bifidobakterien, die in ihrem Wachstum durch FOS verstärkt werden, produzieren zusätzlich Milchsäure, die den pH-Wert im Darm senkt und einen schützenden Effekt gegen pathogene Keime, wie E. Coli oder Clostridium perfringens, bewirken (Reddy, 1999). Die kurzkettige Fettsäure Butyrat fördert die Proliferation von gesunden Zellen, hemmt diesen Vorgang bei bereits veränderten und ist in der Lage bei geschädigten Zellen die Apoptose auszulösen. (Delzenne, 2003).

Um den Effekt einer FOS-Supplementation auf Dickdarmkrebs zu untersuchen, wurde bei 40 Ratten künstlich anormale Kryptenherde (abberant crypt foci, kurz ACF) mittels dem Kanzerogen 1,2-Dimethylhydrazin erzeugt. Über eine Zeitspanne von 35 Tagen wurde das Futter der Tiere der Versuchsgruppe mit 60 g FOS pro Kilogramm Futter angereichert, die Kontrollgruppe erhielt herkömmliche Nahrung. Die Ergebnisse zeigten, dass die supplementierten Ratten wesentlich weniger ACF im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufwiesen. Eine Supplementation mit FOS führt zu einer Hemmung der Entwicklung von präkanzero-

genen Läsionen im Dickdarm und kann so zur gastrointestinalen Gesundheit beitragen (Chung et al., 2004).

Eine Humanstudie setzte sich zum Ziel den Effekt von Präbiotika auf das Risiko von Dickdarmkrebs zu bestätigen. Die Gabe erfolgte über eine Dauer von 12 Wochen mittels eines symbiotischen Präparats, welches aus einerseits Inulin mit Oligofructose angereicht und andererseits aus Lacto- und Bifidobakterien bestand. Die Versuchspersonen litten entweder an Dickdarmkrebs oder ihnen wurden bereits Wucherungen im Darm entfernt. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Intervention eine Reduktion der Proliferation im Dickdarm bewirkte und zu einer Verbesserung der epithelialen Barrierefunktion führte. Des Weiteren ließ sich eine geringere Exposition von Genotoxinen feststellen. Diese Studie liefert Hinweise, dass sich Inulin und Oligofructose positiv auf den Dickdarm auswirken könnten (Rafter et al., 2007).

2.3. Fructooligosaccharide als Präbiotika

Die erste Definition von Präbiotika, welche sich hauptsächlich auf Kohlenhydrate bezog, erfolgte von Gibson und Roberfroid (1995). Sie definierten Präbiotika als unverdauliche Lebensmittelbestandteile, die sich positiv auf die Gesundheit des Menschen auswirken, indem diese Stoffe selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität bestimmter Bakterien im Dickdarm stimulieren. Gemeint waren hauptsächlich Bakterien der Gattung *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*. Es wurden Kriterien festgelegt, die erfüllt werden mussten, damit ein Stoff als präbiotisch gilt. Der Lebensmittelbestandteil darf nicht hydrolysiert oder von den oberen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts absorbiert werden. Es muss ein Substrat für nützliche Bakterien im Dickdarm darstellen, die dadurch zum Wachstum angeregt werden oder ihre metabolische Aktivität erhöht. Außerdem muss es in der Lage sein die Zusammensetzung der Mikrobiota des Dickdarmes positiv zu beeinflussen und gesundheitsfördernde Effekte bewirken.

Über die Jahre hinweg gab es einige Überarbeitungen, welche immer wieder geringfügige Änderungen mit sich brachten und neu erlangte Erkenntnisse integrierten. Gibson et al. (2017) veröffentlichte eine überarbeitete Definition. Ein

Präbiotikum ist demnach ein Substrat, das von den Mikroorganismen des Darms selektiv verwertet wird und erwiesenermaßen positive Effekte auf die Gesundheit mit sich bringt. Durch diese Änderungen werden auch Substanzen, die nicht der Gruppe der Kohlenhydrate angehören, miteingeschlossen und die Anwendung nicht mehr speziell auf den Darm begrenzt, sondern auf den gesamten Körper ausgeweitet.

Wie bereits erwähnt können FOS aufgrund ihrer β -(1-2) glykosidischen Verbindungen der Fructose-Einheiten von den körpereigenen Enzymen im Dünndarm nicht hydrolysiert werden und gelangen unverändert in den Dickdarm. Da sich diese Stoffe nach einer Aufnahme nicht im Fäzes befinden, weist das daraufhin, dass sie im Dickdarm von den Bakterien fermentiert werden. Durch diesen Prozess entstehen die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat, denen viele positive Effekte auf den menschlichen Körper zugesprochen werden. Alle SCFA bewirken einen Abfall des pH-Werts im Dickdarm und fördern einerseits so das Wachstum von Bifido- und Lactobakterien und hemmen andererseits das Wachstum von schädlichen Bakterien. Acetat und Propionat besitzen die Fähigkeit den Kohlenhydrat- und Fettmetabolismus zu beeinflussen. Propionat ist außerdem in der Lage die Gluconeogenese in der Leber zu reduzieren und hemmt die Synthese von Harnstoff. Da Acetat eine starke Säure ist, senkt es den pH-Wert im Darm und kann so verhindern, dass pathogene Keime Metaboliten produzieren, die potenziell kanzerogen wirken können. Weiters stellt Butyrat eine wichtige Energiequelle dar und hat die Fähigkeit das Zellwachstum und die Differenzierung von Zellen im Darm zu regulieren. (Sabater-Molina et al., 2009)

Präbiotika sind in der Lage die Zusammensetzung der Mikrobiota des Darms zu verändern. Bereits geringfügige Modifikationen der Ernährungsgewohnheiten haben einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmbakterien. Eine Substitution von nur 15 g Saccharose pro Tag durch die gleiche Menge Oligofructose oder Inulin bewirkt einen signifikanten Unterschied in der Zusammensetzung der Mikrobiota, welcher sich durch einen Anstieg des Anteils der Bifidobakterien äußert. (Gibson et al., 1995). In einer weiteren Studie wurden zwischen 22 und

34 g Inulin pro Tag verabreicht und die Ergebnisse bestätigten, dass Inulin einen präbiotischen Effekt aufweist und die Anzahl der Bifidobakterien erhöht (Kruse, Kleessen und Blaut, 1999). Untersuchung zu kurzkettigen FOS zeigten den selbigen Effekt ab einer Dosis von 5 g pro Tag. Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der aufgenommenen Menge der kurzkettigen FOS und der Erhöhung dieser Bakterien festgestellt werden (Bouhnik et al., 1999).

2.4. Apfelsaft

Apfelsaft ist neben Orangensaft laut der European Fruit Juice Association der beliebteste Saft in Österreich. In diesem Kapitel wird unter anderem die Herstellung, die Inhaltsstoffe und der Zusammenhang von Fruchtsäften mit metabolischen Krankheiten behandelt (European Fruit Juice Association, 2018).

2.4.1. Herstellung

Apfelsaft wird entweder aus kürzlich geernteten Früchten oder aus rekonstituiertem Konzentrat hergestellt. Die Produktion des Safts beginnt mit der Ernte, welche per Hand oder mechanisch durchgeführt wird. In Boxen oder Körben werden die Früchte zur jeweiligen Herstellungsstätte transportiert, wo sie zuerst gewaschen und begutachtet werden. Beschädigte oder verdorbene Früchte werden entweder aussortiert oder betroffene Stellen entfernt. Die ausgewählten Äpfel werden zerkleinert, um die Effizienz des Pressvorgangs zu maximieren. Schließlich erfolgt das Pressen, hier entsteht der eigentliche Saft und es erfolgt meist eine Zugabe von Vitamin C, um eine enzymatische Bräunung zu verhindern. Eine Klärung des Saftes wird einerseits durch den Einsatz von Enzymen, welche unter anderem Pektine, Proteine und phenolische Substanzen abbauen und andererseits durch Filtration oder Zentrifugieren (Separator) erreicht. Der klare Saft kann nun entweder zu Konzentrat verarbeitet oder direkt pasteurisiert und abgefüllt werden (Sant'Ana, Rosenthal und de Massaguer, 2008).

2.4.2. Inhaltsstoffe

Die durchschnittliche Zuckerzusammensetzung von Apfelsaft laut Souci, Fachmann und Kraut (2015) ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Zuckers von Apfelsaft (Souci, Fachmann und Kraut, 2015)

Kohlenhydrate	Saccharose	Glucose	Fructose
11,1 g/100 g	1,7 g/100 g	2,4 g/100 g	6,4 g/100 g

Je nachdem welche Apfelsorte bzw. welche Mischungen aus verschiedenen Sorten für die Saffherstellung verwendet wurde, schwankt der Polyphenolgehalt zwischen 43 und 675 mg/l. Die wichtigsten Polyphenole im Apfelsaft sind unter anderem Chlorogensäure, Epicatechin und Phloridzin (Rechner, 2000).

2.4.3. Zusammenhang zwischen dem Konsum von Fruchtsäften und metabolischen Erkrankungen

Es ist unumstritten, dass gesüßte Getränke, wie beispielsweise Softdrinks, beträchtlich zur Energieaufnahme beitragen und das Risiko für Übergewicht, Diabetes Mellitus Typ 2 und anderen metabolischen Erkrankungen erhöht. Da Fruchtsäfte ebenfalls eine beachtliche Menge an Saccharose, Glucose und Fructose enthalten, wird diskutiert, ob sich diese Getränke ebenfalls negativ auf die Gesundheit auswirken und ein Zusammenhang zu manchen Krankheiten besteht.

Eine Meta-Analyse untersuchte den Zusammenhang zwischen Fruchtsaftkonsum und Veränderungen des BMI bei Kindern und konnte nur bei Kindern unter 6 Jahren eine geringe Gewichtszunahme mit Fruchtsäften in Verbindung bringen. Hier liegt es in der Verantwortung der Eltern, dass ihre Kinder nicht übermäßig viel Fruchtsaft konsumieren, auch wenn die Ergebnisse nicht signifikant waren, ergibt sich durch einen häufigen und vor allem hohen Fruchtsaftkonsum eine höhere Zuckeraufnahme, die nicht vernachlässigt werden darf (Auerbach et al., 2017).

Eine Studie von Pereira und Fulgoni (2010) untersuchte, ob ein häufiger Saftkonsum mit einem höheren Risiko an Adipositas zu erkranken einhergeht. Ein moderater Konsum von Fruchtsaft steht mit einem niedrigeren Körpergewicht, BMI und Hüftumfang in Verbindung. Die TeilnehmerInnen, die regelmäßig

Fruchtsaft konsumierten, zeigten ein geringeres Risiko an Adipositas zu erkranken als jene, die keinen Saft tranken. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass ein moderater Fruchtsaftkonsum mit einem gesünderen Lebensstil einhergeht und so das Risiko beeinflusst wird. Es ist nicht geklärt, ob dieser Zusammenhang kausal mit dem Saftkonsum zusammenhängt oder andere Faktoren dafür verantwortlich sind.

Eine Studie von Schulze et al. (2004) untersuchte den Zusammenhang zwischen Getränken, die mit Zuckern gesüßt wurden, und Gewichtsveränderungen sowie das Risiko von Frauen an Diabetes Typ 2 zu erkranken. Hier zeigte sich, dass ein häufiger Saftkonsum mit einer höheren Gewichtszunahme, verglichen mit denen die wenig Saft tranken, einhergeht. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fruchtsaftaufnahme und einem höheren Risiko an Diabetes zu erkranken konnte jedoch nicht festgestellt werden. Jedoch bestand eine signifikante Relation zwischen anderen Getränken, die mit Zucker gesüßt sind, und dem Diabetes-Risiko. Als mögliche Erklärung für diese Ergebnisse nennen sie die Tatsache, dass es sich bei Saft um natürlichen, und nicht zugefügten, Zucker handelt. Das Vorhandensein von anderen Nährstoffen, wie verschiedene Vitamine, Mineralstoffe, Ballaststoffe und andere Phytochemikalien, darf nicht außer Acht gelassen werden, denn diese Stoffe können sich ebenfalls positiv auf den menschlichen Körper auswirken und so den potenziell negativen Effekt von Zucker entgegenwirken.

Im Vergleich dazu kam eine Meta-Analyse zu einem gegenteiligen Ergebnis. Es wurde ein Anstieg des Diabetesrisikos um 5-7 % bei einem Konsum von einer Portion (250 ml) mehr pro Tag gefunden. Die Autoren schreiben jedoch, dass die Ergebnisse instabil und empfindlich gegenüber dem jeweiligen Studiendesign waren und die Meta-Analyse selbst einige Limitationen aufweist (Imamura et al., 2016). Zusätzlich gibt es Unterschiede zwischen verschiedenen Fruchtgetränken. Der Konsum von Fruchtsaft mit zugesetzten Zuckern zeigte ein signifikant höheres Risiko für Diabetes Mellitus Typ 2. jedoch reiner Fruchtsaft wies keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Konsum und dieser Krankheit auf (Xi et al., 2014).

2.5. Zuckerreduzierende Enzyme

Da Fruchtsäfte sehr zuckerhaltig sind, stellen sie keine geeignete Alternative für Wasser oder ungesüßte Tees dar, welche zur Deckung der Wasserbilanz des menschlichen Körpers empfohlen werden (Bundesministerium für Frauen und Gesundheit, 2017). Im Folgenden werden zwei Enzyme und Enzymsysteme beschrieben, die das Potential aufweisen den Zucker in Fruchtsäften zu reduzieren und gleichzeitig ein präbiotisches Getränk zu erzeugen.

2.5.1. Fructosyltransferase

FTase (EC 2.4.1.9) ist ein Enzym, welches in der Lage ist, einerseits Saccharose aufzuspalten und andererseits aus der freigesetzten Fructose FOS zu bilden (BRENDA - Information on EC 2.4.1.9 - inulosucrase, 2019). Es gehört der Gruppe der Glycosyltransferasen an und kommt in vielen Pflanzen, wie zum Beispiel Spargel, Zuckerrüben, Zwiebeln oder Topinambur, vor. Das Enzym kann auch von Pilzen und Bakterien, unter anderem von *Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp., gebildet werden und wird in der Lebensmittelindustrie hauptsächlich für die Synthese von FOS eingesetzt. (Yun, 1996).

FTase katalysiert eine Übertragung einer Fructosylgruppe eines Donors, meistens Saccharose, auf ein Akzeptormolekül, welches ebenfalls Saccharose oder ein FOS sein kann, das Produkt ist aus diesem Grund immer eine Fructosyl-Einheit länger als das Akzeptormolekül. Durch diese Reaktion, welche in Abbildung 6 dargestellt ist, werden verschiedene FOS gebildet. Je nachdem wie viele Fructosyl-Bausteine an das Akzeptormolekül angehängt werden bzw. welche chemische Verbindung als Akzeptor dient, entsteht Kestose, Nystose oder 1-Fructofuranosyl-Nystose. Dient Wasser als Akzeptormolekül werden keine FOS gebildet und lediglich Saccharose in Glucose und Fructose aufgespalten (Antošová und Polakovič, 2001).

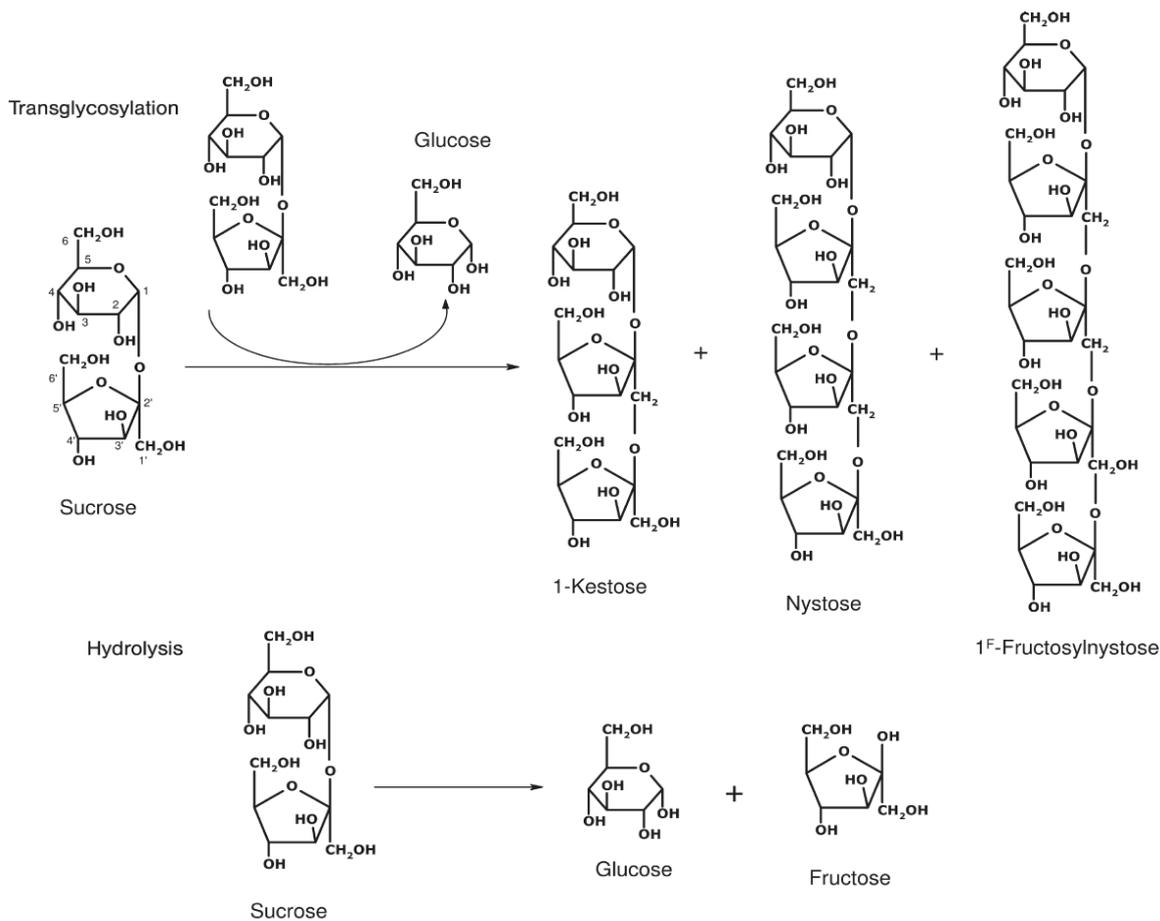


Abbildung 6: Reaktion von Saccharose mit dem Enzym Fructosyltransferase (Plou et al., 2008)

Hang und Woodams (1995) untersuchten 22 kommerziell erwerbliche Enzympräparate, welche in der Fruchtsaftverarbeitung eingesetzt werden, hinsichtlich ihrer FTase-Aktivität. Die Versuche wurden bei 40 °C über einen Zeitraum von 15 Stunden durchgeführt und das Reaktionsgemisch bestand aus der Enzymlösung, 0,6 M Saccharose und 0,01 M Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,6). Das Präparat Pectinex Ultra SO-L zeigte die höchste Aktivität und in weiterführenden Versuchen wurden die optimalen Bedingungen untersucht. Es zeigte sich, dass die Menge an gebildeten FOS besonders in den ersten sechs Stunden des Versuchs sehr rasch anstieg und ihren Höhepunkt nach 14 Stunden erreichte. Umso höher die Ausgangskonzentration von Saccharose als auch die Enzymkonzentration war, umso mehr FOS wurden gebildet. Die höchste FOS-Ausbeute wurde bei einer Temperatur von 65 °C und einem pH-Wert zwischen 5 und 6 beobachtet (Hang und Woodams, 1996).

Weitere Versuche untersuchten den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Saccharose (300-500 g/l), Enzymaktivitäten (4-32 U/ml), Temperaturen (45-60 °C) und pH-Werten (4-7). Eine höhere Ausgangskonzentration der Saccharose zeigte auch hier eine höhere Ausbeute an FOS, jedoch ab 450 g/l konnte keine weitere Steigerung nachgewiesen werden. Untersuchungen bezüglich der verschiedenen Enzymkonzentration und der Enzymaktivität stellten fest, dass ab einer Konzentration von 16 U/ml kein weiterer Anstieg der Ausbeute erfolgte. Die optimale Temperatur lag zwischen 50 und 55 °C, da die Menge an gebildeten FOS am höchsten war (Kashyap, Palai und Bhattacharya, 2015).

In Tabelle 3 sind die optimalen Temperaturen und pH-Werte von verschiedenen Studien zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass jeder Versuch unterschiedliche Ergebnisse ergab. Dies lässt sich auf den Ursprung der Enzyme zurückführen, denn je nachdem von welchem Bakterium oder Pilz die verwendete FTase stammt, variieren die optimalen Bedingungen, die zur FOS- Synthese beitragen (Hang und Woodams, 1996).

Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der optimalen Bedingungen für die Synthese von FOS

Temperatur	pH-Wert	Ursprung	Quelle
55 °C	5,5	Aureobasidium pullans	Jung et al.,1989
65 °C	5-6	Aspergillus niger	Hang und Woodams, 1996
50-55 °C	4-5	Aspergillus aculeatus	Kashyap und Bhattacharya, 2015

Ein wichtiger Inhibitionsfaktor der FTase stellt Glucose dar, die durch die Aufspaltung der Saccharose bei der FOS-Synthese anfällt. Um das Ausmaß der hemmenden Wirkung festzustellen, wurden diesbezüglich Untersuchungen durchgeführt. Es wurden verschiedene Glucosekonzentrationen zwischen 0 – 100 g/l verwendet. Bereits bei 25 g Glucose/l zeigte sich eine leichte Reduktion

der FOS-Bildung und umso höher die Glucosekonzentration war, umso geringer fiel die Ausbeute aus (Kashyap, Palai und Bhattacharya, 2015). Ab einer Konzentration von 30 g/l liegt ein Aktivitätsverlust von 50 % vor (Jung et al., 1989).

2.5.2. Glucose-Oxidase

Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4., kurz GOD) ist eine Oxidoreduktase und katalysiert eine sauerstoffabhängige Oxidation von β -D-Glucose (BRENDA - Information on EC 1.1.3.4 - glucose oxidase, 2019). Die Reaktion, welche in Abbildung 7 dargestellt ist, kann in zwei Schritte, die simultan ablaufen, unterteilt werden. Im reduktiven Teil wird die Glucose zu D-Glucono- δ -lacton oxidiert und in weiterer Folge durch eine nicht-enzymatische Hydrolyse spontan zu Gluconsäure umgesetzt. Währenddessen wird der Flavinring des Enzyms zu FADH₂ reduziert. Im oxidativen Schritt erfolgt eine Übertragung von jeweils zwei Elektronen und Protonen des Flavinrings auf molekularen Sauerstoff, wodurch das Enzym wieder oxidiert und regeneriert wird. Hierbei bildet sich aus dem Sauerstoff Wasserstoffperoxid (Witt et al., 2000).

Das entstehende Wasserstoffperoxid hemmt GOD, vor allem, wenn der Flavinring des Enzyms im reduzierten Zustand vorliegt und in Folge dessen nicht mehr regeneriert werden kann (Kleppe, 1966). Durch Zugabe von dem Enzym Katalase kann dieser hemmende Effekt verhindert werden. Denn es besitzt die Fähigkeit Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umzuwandeln (Mirón et al., 2004). Durch die Bildung von Gluconsäure, sinkt der pH-Wert des Reaktionsgemisches immer weiter ab. Dieser Abfall stellt ebenfalls einen hemmenden Faktor beim Abbau der Glucose dar, denn ein pH-Wert zwischen 5,5 und 6 hat sich als optimal erwiesen. Durch regelmäßige Messungen des pH-Wertes und Anpassung an das Optimum lässt sich dieser Limitationsfaktor eingrenzen. Die optimale Temperatur für den Glucoseabbau liegt bei 30 °C und auch ein Einbringen von molekularem Sauerstoff in das Reaktionsgemisch hat sich als nützlich erwiesen (Pickering, Heatherbell und Barnes, 1998).

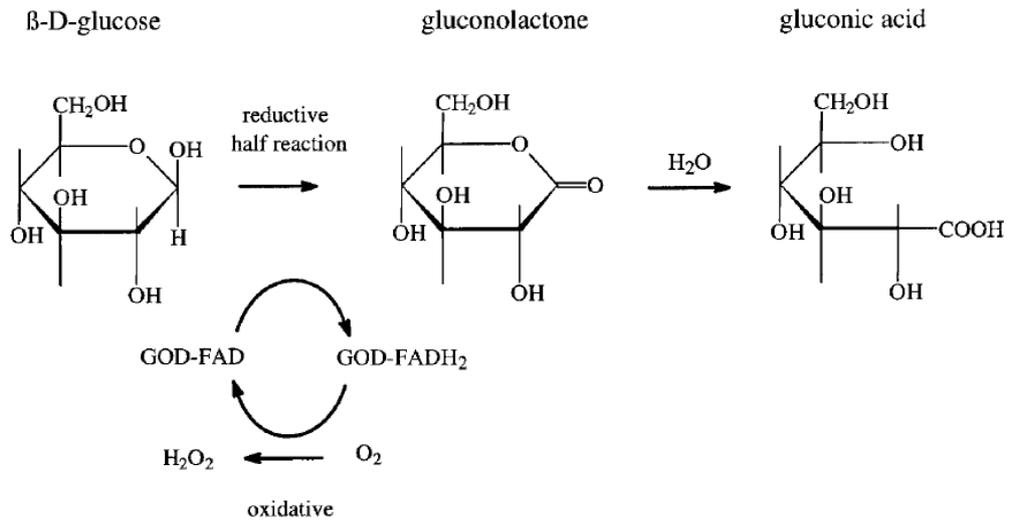


Abbildung 7: Reaktion mit dem Enzym Glucose-Oxidase (Witt et al., 2000)

In der Lebensmittelproduktion hat GOD ein breites Anwendungsgebiet. Es wird beispielsweise als Konservierungsmittel und Oxidationsmittel eingesetzt.

Da Wasserstoffperoxid eine antibakterielle Wirkung besitzt, kommt GOD als Konservierungsmittel in der Milchindustrie zum Einsatz. Milch besitzt einen natürlichen antibakteriellen Mechanismus namens Lactoperoxidase-System (LPS), welches zur Konservierung von Rohmilch, falls keine Kühlung möglich ist, verwendet werden kann. Lactoperoxidase katalysiert eine Reaktion zwischen Thiocyanat und Wasserstoffperoxid, wodurch antibakterielle Substanzen entstehen. Diese Wirkung entfaltet sich jedoch nur, wenn alle beteiligten Substanzen zu genüge vorhanden sind. Deswegen wird GOD zugesetzt, denn das Enzym dient als Lieferant von Wasserstoffperoxid (Seifu, Buys und Donkin, 2005). Durch eine Anreicherung mit GOD zum LPS ist es möglich, eine wirksame Hemmung des Wachstums und sogar, unter optimalen Bedingungen, eine Abtötung der Bakterien in Milch zu erzielen. (Sandholm et al., 1988)

Aufgrund des entstehenden Wasserstoffperoxids, wird GOD beim Brotbacken als Oxidationsmittel eingesetzt. Durch die Zugabe von GOD konnte ein elastischerer und viskoserer Teig hergestellt werden. Außerdem bewirkt eine Anreicherung eine bessere Stabilität beim Aufgehen der Teige und kann durch die

Bildung von Wasserstoffperoxid das Volumen des fertigen Brotes erhöhen (Vemulapalli und Hoseneey, 1998; Decamps et al., 2012).

GOD kommt als Konservierungsmittel bei Eiprodukten zum Einsatz, da eine Anreicherung die Haltbarkeit des Lebensmittels durch das entstehende Wasserstoffperoxid und dessen Fähigkeit das Bakterienwachstum zu verlangsamen verlängert (Dobbenie, Uyttendaele und Debevere, 1995). Da Eiweiß reich an Proteinen ist, weist es eine hohe Anfälligkeit gegenüber nicht-enzymatischen Bräunungsreaktionen (Maillard-Reaktion) auf. Durch eine Reaktion einer Aminogruppe eines Proteins oder Aminosäure mit einem reduzierenden Zucker entstehen unerwünschte Verfärbungen und Geschmacksstoffe, die gesundheitsbedenklich sein können. Um dies zu verhindern, wird GOD zugesetzt damit der Zucker in den Eiern reduziert bzw. entfernt wird (Sisak et al., 2006).

Auch bei der Weinproduktion wird GOD eingesetzt, um den Alkoholgehalt zu reduzieren. Setzt man das Enzym bereits vor der Gärung dem Traubensaft zu, so wird die für die Alkoholbildung essenzielle Glucose vor der eigentlichen Fermentation bereits abgebaut.

Petkova et al. (2016) verglichen das Ausmaß der Glucosereduktion von zwei verschiedenen GOD. Die Versuche wurden mit einer Glucoselösung mit Konzentrationen von 10 g und 20 g Glucose/l und mit einer Modellösung, die den Charakteristika eines Traubensaftes entsprach, durchgeführt. Zum einen wurde ein kommerziell erwerbliches Enzym namens Alphamalt Gloxy 5080 (Mühlenchemie) verwendet, welches ursprünglich in der Backindustrie eingesetzt wird und in Mehl immobilisiert vorliegt. Eine Besonderheit dieses Enzyms ist es, dass es zusätzlich zur Fähigkeit Glucose abzubauen eine geringe Katalaseaktivität aufweist. Zum anderen wurde eine reine GOD von *Aspergillus niger* verwendet. Bei den Versuchen mit dem reinen Enzym wurde teilweise Katalase zum Substrat hinzugefügt, um den Einfluss eines Wasserstoffperoxidabbauenden Enzyms auf die Aktivität von GOD zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass Alphamalt Gloxy eine Reduktion der Glucose von 60-73 % bewirkte und auch im sauren Milieu der Modellösung eine hohe Aktivität aufwies, da das Enzym durch die Immobilisierung widerstandsfähiger gegenüber dem

niedrigen pH-Wert war. Die reine GOD zeigte hingegen bei den Versuchen mit der Glucoselösung nur eine sehr geringe Reduktion der Glucose von lediglich 1,32 %, jedoch sank der Glucosegehalt um ungefähr 50 %, wenn es in Verbindung mit einer Katalase verwendet wurde. Wurden die Versuche mit der reinen GOD in der Modelllösung durchgeführt, konnte eine nur sehr geringe Aktivität beobachtet werden. Die Autoren gingen davon aus, dass der niedrige pH-Wert dafür verantwortlich ist. Eine Immobilisierung des Enzyms kann von Vorteil sein, denn es ist widerstandsfähiger gegenüber suboptimalen Versuchsbedingungen. Außerdem ist eine Zugabe von Katalase bei Verwendung von reiner GOD nützlich, solange der pH-Wert nahe am Optimum liegt.

Um die Schlüsselfaktoren, welche die Aktivität der GOD beeinflussen, zu bestimmen und die Reduktion der Glucose zu optimieren, wurden von Pickering et al. (1998) Versuche durchgeführt. Das Ziel der Studie war es ebenfalls den Zuckergehalt von Traubensaft zu reduzieren, um einen alkoholreduzierten Wein herzustellen. Der Einfluss von variierenden Parametern, unter anderem vom pH-Wert, auf die Aktivität der GOD wurden untersucht. Die Ergebnisse stimmen mit denen der Studie von Petkova et al. (2016) überein, ein niedriger pH-Wert hat einen starken hemmenden Effekt auf die Aktivität des Enzyms. Eine Optimierung des pH-Wertes, angelehnt an das Optimum, ist folglich wichtig für die Bildung von Gluconsäure ist.

2.6. Enzymsysteme zur Zuckerreduktion

2.6.1. Invertase und Glucose-Oxidase

Um aus Saccharose Gluconsäure zu produzieren, verwendeten Mafra et al. (2015) Invertase, um diesen Zucker aufzuspalten, GOD für die Produktion von Gluconsäure und schließlich Katalase, um das anfallende Wasserstoffperoxid, welches dieses Enzym hemmt, abzubauen. Bei diesem Enzymsystem entsteht als Nebenprodukt Fructose, da nur Glucose von GOD abgebaut wird. Bei einem pH-Wert von 6 und 40 °C konnte eine komplette Aufspaltung der Saccharose (Anfangskonzentration: 50 g/l) und eine Gluconsäurebildung von 28,6 g/l er-

reicht werden. Alle Enzyme zeigten bei diesen Versuchen eine hohe Wirksamkeit.

2.6.2. Fructosyltransferase und Glucose-Oxidase

Da die FOS-Produktion aus Saccharose durch die freiwerdende Glucose begrenzt ist, hat Jung et al. (1993) GOD verwendet, um diesen hemmenden Faktor zu eliminieren. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 40 °C und einem pH-Wert von 6 durchgeführt. Die verwendeten Enzymmengen waren 10 U FTase/g Saccharose und 5 U GOD/g Saccharose. Durch die Zugabe dieser Enzyme konnte ein FOS-Gehalt von 88,8 % erreicht werden, verglichen mit der konventionellen Methode, die lediglich einen Wert von 57,4 % erzielen konnte.

3. Materialien und Methoden

3.1. Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Marke	Seriennummer
Multi-Rotator	Grant Instruments PTR-60	01011816120145
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik	
Photometer UV-18000	Shimadzu	A116355
Zentrifuge 5810	Eppendorf	543-15/04/002/00
Magnetrührer RCT basic	IKA	
Waage	Sartorius	
Feinwaage	Sartorius	
Laborflaschen 250 ml	VWR	
Kolbenhubpipette	Eppendorf	
Makro-Küvetten	Greiner bio-one	
Semi-Mikro-Küvetten	Greiner bio-one	

3.2. Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Marke	Herkunftsland
Pectinase	Sigma	Schweiz
Glucose-Oxidase	Sigma	Schweiz
Alphamalt Gloxy 5080	Mühlenchemie	Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Marke	Herkunftsland
Methanol	Merck	
Salzsäure 37 %	Roth	Deutschland
Folin-Ciocalteu Reagenz	VWR Chemicals	Frankreich
Natriumcarbonat	Roth	Deutschland
Eisen-III-Chlorid Heptahydrat	Sigma	Schweiz
TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyrridyl)-s-triazine	Fluka	Schweiz
Natrium-Acetat-Trihydrat	VWR Chemicals	
Essigsäure 100 %	Roth	Deutschland
Puffer pH 7,6	Megazyme	

NADP ⁺ + ATP	Megazyme	
Hexokinase – Glucose-6-Phosphatase-Dehydrogenase	Megazyme	
Phosphoglucose-Isomerase	Megazyme	
D-Glucose + D-Fructose-Standard	Megazyme	
β-Fruktosidase	Megazyme	
Natriumhydroxid	Roth	Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat-II-Trihydrat	Merck	
Zinksulfat-7-hydrat	Merck	
Ferulasäure	Sigma	Schweiz
Eisen-II-Sulfat	Merck	
D(+)-Saccharose	Roth	Deutschland
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxyl-Säure)	Sigma	Schweiz
DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	Sigma	Schweiz

3.3. Versuche

3.3.1. Versuchsaufbau

Verschiedene Reaktorsysteme wurden getestet, um einen optimalen Ablauf der Versuche zu ermöglichen. Die Vorversuche mit Modell-Zuckerlösungen wurden in einem Bioreaktor mit einem Volumen von 1 Liter durchgeführt. Da das Gefäß undicht wurde und immer nur ein Versuch durchgeführt werden konnte, wurde ein neues Reaktorsystem erstellt. Es wurden jeweils drei 250 ml-Laborflaschen als Versuchsgefäße verwendet, somit konnten 3 Versuche simultan durchgeführt werden. Die Flaschen wurden in einen Behälter gestellt, welcher mit einem Wasserbad verbunden war, um eine konstante Temperatur während des Versuchs zu ermöglichen. Eine Durchmischung des Saftes und der Enzyme erfolgte mittels einer Magnetrührplatte. Dieser Aufbau wurde für die Hauptversuche verwendet und ist in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Versuchsaufbau der Hauptversuche

3.3.2. Verwendete Parameter

Als Substrat wurde Apfelsaft gewählt, da es einer der beliebtesten und am häufigsten konsumierten Säfte in Österreich ist. Acht Liter der Marke „pure fruits“, welche alle idente Losnummer aufwiesen, wurden in einem Supermarkt erwor-

ben und bis zur Verwendung im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Der pH-Wert des Saftes wurde nicht verändert und lag bei 3,5. Das ausgewählte Substratvolumen der Versuche lag bei 150 ml, nur bei einem (FTase, 422 U/ml) wurde ein Volumen von 15 ml gewählt. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Parameter für die Versuche mit dem Enzym Fructosyltransferase

Substratvolumen [ml]	Temperatur	Enzymkonzentration [U/ml]
150	4 °C	15
150	30 °C	7,5
150	30 °C	10
150	30 °C	15
150	50 °C	7,5
150	50 °C	10
150	50 °C	15
15	30 °C	422

In Tabelle 7 sind die verwendeten Parameter für die Versuche mit dem Enzym FTase angegeben. Jeweils drei verschiedene Enzymkonzentrationen (7,5; 10 und 15 U/ml) wurden bei 30 °C und 50 °C verwendet. Die Temperatur 50 °C wurde ausgewählt, da diese nahe am Optimum des Enzyms liegt und 30 °C im Hinblick auf das Optimum der GOD. Ein Versuch wurde bei 4 °C durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Enzym auch bei einer niedrigen Temperatur Aktivität aufweist. Ein weiterer Versuch wurde mit einer sehr hohen Enzymkonzentration von 422 U/ml durchgeführt.

In Tabelle 8 sind die Parameter der Versuche mit dem Enzym GOD zusammengefasst. Es wurden zwei unterschiedliche Enzymkonzentrationen des rei-

nen Enzyms bei 30 °C verwendet und ein Versuch mit der immobilisierten Form namens Alphamalt Gloxy bei 40 °C durchgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Parameter der Versuche mit dem Enzym Glucose-Oxidase

Enzym	Substratvolumen [ml]	Enzymkonzentration [U/ml]
GOD	150	0,6
GOD	150	1,2
Alphamalt Gloxy	150	10

3.3.3. Versuchsablauf

Das Wasserbad wurde auf die entsprechende Temperatur eingestellt und eingeschaltet. Nachdem das Substrat abgewogen, in die Flaschen gefüllt und ein Magnetrührstab hinzugefügt wurde, wurden diese im Wasserbad platziert. Hatte das Substrat die gewünschte Temperatur erreicht, erfolgte die Zugabe des Enzyms, was den Beginn des Versuchs darstellte. In Abhängigkeit des Enzyms, wurden die Flaschen entweder verschlossen (FTase) oder mit einem Parafilm abgedeckt (GOD). Jeweils nach 4, 8 und 24 Stunden wurden bei allen Versuchen Proben entnommen. Die gezogenen Proben wurden für 5 Minuten in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 90 °C gegeben, um das Enzym zu inaktivieren, und wurden danach für weitere Untersuchungen eingefroren.

3.4. Extraktion

Um den Gehalt aller phenolischer Bestandteile und der antioxidativen Kapazität mittels FRAP (ferric reducing antioxidant power) zu messen, wurden Extrakte aus den Saftproben hergestellt. Das verwendete Extraktionsmittel war ein Gemisch aus Methanol und 1M HCl mit einem Mischverhältnis von 85 zu 15. Es wurden 2,5 g (\pm 0,1 g) der jeweiligen Probe eingewogen und in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml des Extraktionsmittels versetzt. Die Gefäße wurden mit Alufolie abgedeckt, 20 Minuten in einem Rotator gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überschuss wurde in

einen 25 ml Messkolben überführt und mit dem Extraktionsmittel bis zur Markierung aufgefüllt. Die Kolben wurden bis zur Messung kühl und dunkel gelagert.

Zur Bestimmung der Scavenging Activity (DPPH) wurde wie folgt eine Extraktion durchgeführt. Jeweils 2 g der Proben wurden eingewogen und mit 3 ml reinem Methanol für 20 Minuten mit einem Rotator vermischt. Dann wurde für 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand in einen lichtgeschützten 10 ml Messkolben überführt. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Extrakte wurden auf 10 ml mit Methanol aufgefüllt.

3.5. Gesamtpolyphenolgehalt

Die Messung des Gesamtpolyphenolgehalts (abgekürzt TPC, Total Polyphenol Content) wurde nach der Methode von Singleton (1974) durchgeführt. Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt. Vor der Messung wurde das Folin-Ciocalteu Reagenz 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Es wurden jeweils 0,12 ml der Extrakte mit 0,6 ml Folin-Ciocalteu Reagenz versetzt und mit einem Vortex gemischt. Nach 2 Minuten wurden jeweils 0,960 ml einer Natriumcarbonatlösung ($c = 60 \text{ g/l}$) hinzugefügt, wieder gut vermischt und für 5 Minuten in einem Wasserbad bei einer Temperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nachdem die Proben wieder Raumtemperatur erreicht hatten, wurden sie erneut gemischt und in Semi-Microküvetten überführt. Die Messungen am Photometer erfolgten bei einer Wellenlänge von 760 nm und als Blindwert diente destilliertes Wasser. Je nach Polyphenolgehalt zeigte sich eine Blaufärbung.

Um die gemessenen Daten auswerten zu können, wurde eine Kalibrationsgerade erstellt. Ferulasäure (FS) mit einer Ausgangskonzentration von 0,20 mg/ml wurde laut Tabelle 9 verdünnt und anschließend im Photometer wie oben angegeben im Doppelansatz gemessen. Die Ergebnisse wurden in mg FS-Äquivalente/100 g Probe angegeben.

Tabelle 9: Verdünnung von Ferulasäure für die Kalibrationskurve von TPC

Bezeichnung	Verdünnungsfaktor	Konzentration [mg/ml]
S0		0,20
S1	1:20	0,01
S2	1:10	0,02
S3	1:5	0,04
S4	1:4	0,05
S5	1:2,5	0,08
S6	1:2	0,1

3.6. Bestimmung der antioxidativen Kapazität und der Scavenging Activity

Die Messung der antioxidativen Kapazität, kurz FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power), wurde mittels Photometer nach der Methode von Benzie und Strain (1996) bestimmt. Das benötigte FRAP-Reagenz bestand aus einem 0,3 M Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 3,6, 20 mM Eisen-III-Chlorid-Lösung und einer 10 mM TPTZ-Lösung, welche in einem Verhältnis von 10:1:1 zueinanderstanden.

Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt und 1:2 mit dem Extraktionsmittel verdünnt. 0,200 ml des verdünnten Extraktes wurde mit 1,3 ml des FRAP-Reagenz versetzt und für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Je nach Ausprägung der antioxidativen Kapazität zeigte sich auch bei dieser Methode eine Blaufärbung. Die Messung erfolgte in Semi-Mikroküvetten bei einer Wellenlänge von 595 nm, als Blindwert wurde das Extraktionsmittel verwendet (Benzie und Strain, 1996).

Für die Kalibrationsgerade wurde eine Eisensulfat-Lösung mit einer Konzentration von 1000 µM hergestellt und laut Tabelle 10 verdünnt. Diese unterschiedli-

chen Lösungen wurden wie gewöhnliche Proben gemessen und die Ergebnisse wurden in mg Fe²⁺-Äquivalente/l angegeben.

Tabelle 10: Verdünnung der Eisensulfat-Lösung zur Erstellung der Kalibrationsgerade

Bezeichnung	Verdünnungsfaktor	Konzentration [µM]
S0		1000
S1	3:4	750
S2	1:2	500
S3	1:4	250
S4	1:10	100
S5	1:20	20
S6	1:40	25

Die Bestimmung der Radikalfängereigenschaft (scavenging activity) wurde nach der Methode von Liu F. et al. (2014) mittels des Stoffes DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil) durchgeführt.

Es wurden 5,52 mg DPPH in einem vor Licht geschützten Messkolben, welcher 100 ml fasste, eingewogen und dann bis zur Markierung mit Methanol (>98%) aufgefüllt, um eine 0,14 mM DPPH-Lösung zu erhalten. Es wurden 0,2 ml der Extrakte mit 2 ml der hergestellten DPPH-Lösung versetzt (A_s). Für jede Probe wurde ein Blindwert (A₀) gemessen, welcher aus 2 ml Extrakt und 2 ml Methanol bestand. Als Kontrolle (A_c) wurden 0,2 ml Methanol und 2 ml DPPH gemessen (Liu et al., 2014).

Nach kurzem Durchmischen mit dem Vortex, wurden die Proben für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und schließlich bei einer Wellenlänge

von 517 nm mit dem Photometer gemessen. Die Radikalfängereigenschaft wurde mittels Formel 1 berechnet (Liu et al., 2014).

$$AA\% = 100 - \left(\frac{(A_s - A_0)}{A_c} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

A_s = Probe

A_0 = Blindwert

A_c = Kontrolle

Für die Kalibrationsgerade wurde eine Standardlösung mit einer Konzentration von 100 mg Trolox pro Liter hergestellt und mit Methanol, wie in Tabelle 11 beschrieben, verdünnt. Die weitere Durchführung erfolgte wie oben beschrieben. Die Ergebnisse wurden in mg Trolox Äquivalente/l angegeben.

Tabelle 11: Verdünnungsschritte des Trolox-Standards zur Erstellung einer Kalibrationsgerade

Trolox-Standard [ml]	Methanol 99,9% [ml]	Trolox-Konzentration [mg/l]
0,75	0,25	75
0,5	0,5	50
0,25	0,75	25
0,1	0,90	10

3.7. Enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts

Die Bestimmung des Saccharose-, Glucose- und Fructosegehalts wurde mittels des Megazyme-Kit „Sucrose, D-Fructose and D-Glucose Assay“ photometrisch durchgeführt.

Vor der Messung erfolgte eine Carrez-Klärung (Carrez clarification) laut dem Handbuch des Herstellers, um etwaige Trübstoffe, welche die Messwerte verfälschen könnten, zu entfernen. Hierfür wurde 1 g Probe in einen 25 ml Messkolben mit 15 ml destilliertem Wasser versetzt, dann wurden je 1,25 ml Carrez-Lösung I und II hinzugefügt und 0,25 ml 1 M NaOH-Lösung überführt. Die Proben wurden zwischen den einzelnen Schritten gut gemischt, auf 25 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und filtriert (Sucrose, D-Fructose and D-Glucose assay procedure K-Surfg 04/18, 2018).

Um die empfohlene Zuckerkonzentration der Proben zwischen 0,04 und 0,08 g/l für die Messung zu erhalten, wurden sie nach der Carrez-Klärung (Verdünnungsfaktor 1:25) nochmals 1:8 verdünnt (Verdünnungsfaktor 1:200) (Sucrose, D-Fructose and D-Glucose assay procedure K-Surfg 04/18, 2018).

Die enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts erfolgte nach dem Pipettierschema in Tabelle 12. Die Werte wurden im Doppelansatz bestimmt und bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen (Sucrose, D-Fructose and D-Glucose assay procedure K-Surfg 04/18, 2018).

Tabelle 12: Pipettierschema zur enzymatischen Bestimmung des Zuckergehalts (Sucrose, D-Fructose and D-Glucose assay procedure K-Surfg 04/18, 2018)

	Blindwert- Saccharo- se	Saccharose	Blindwert- Glucose und Fructose	Glucose und Fructose
Flasche 6	100µl	100 µl	-	-
Probe	-	100 µl	-	50 µl
Mischen, 5 Minuten inkubieren				
Destilliertes Wasser	1000 µl	900 µl	1100 µl	1050 µl
Flasche 1	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Flasche 2	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Mischen, 3 Minuten inkubieren und im Photometer messen (A1)				
Flasche 3	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Mischen, 5 Minuten inkubieren und im Photometer messen (A2)				
Flasche 4	-	-	10 µl	10 µl
Mischen, 10 Minuten inkubieren und im Photometer messen (A3)				

3.8. Farbmessung

Zu Bestimmung der Farbe der Proben wurde mittels Photometer die L*a*b*-Werte im dreifachen Ansatz bestimmt. Der Farbabstand wurde mittels Formel 2 berechnet und zeigt, ob sich die verschiedenen Proben wahrnehmbar in der Farbe unterscheiden. Liegt der berechnete ΔE -Wert über 2, ist ein Farbunterschied zu erkennen. Ist dieser Wert größer als 5, gilt dieser Farbton bereits als andere Farbe. (Mokrzycki Cardinal Stefan and Tatol, 2011).

$$\Delta E = \sqrt{(L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2} \quad (2)$$

3.9. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 25. Zu Beginn wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test untersucht, ob die gemessenen Werte einer Normalverteilung unterliegen. Von einer Homogenität der Varianzen wurde ausgegangen.

Wenn eine Normalverteilung vorlag, wurde eine ANOVA (Varianzanalyse) und ein Bonferroni-Post-hoc Test durchgeführt. Zeigte sich jedoch keine Normalverteilung der Daten, wurde ein Kruskal-Wallis- und Bonferroni-Post-hoc Test angewandt.

4. Ergebnisse und Interpretation

4.1. Originalsaft

Die Zusammensetzung des Zuckers des Originalsafts ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Zuckerzusammensetzung des Originalsafts

Glucose [g/l]	Fructose [g/l]	Saccharose [g/l]
20,38 ± 0,5	62,35 ± 0,4	37,11 ± 1,4

Der Gesamtpolyphenolgehalt und die antioxidative Kapazität, ermittelt durch FRAP und DPPH, des Originalsafts sind in Tabelle 14 ersichtlich.

Tabelle 14: TPC-, FRAP- und DPPH-Werte des Originalsafts

TPC [mg FS-Äquivalente/100 g Probe]	FRAP [mg Fe²⁺-Äquivalente/l]	Scavenging Activity [%]
1704,41 ± 26,0	48,18 ± 0,3	35.64± 0,5

4.2. Ergebnisse der Versuche mit dem Enzym Fructosyltransferase

4.2.1. Enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts

In Tabelle 15 sind die Mittelwerte der gemessenen Zuckergehalte zusammengefasst.

Tabelle 15: Ermittelte Zuckergehalte aller Versuche mit dem Enzym FTase nach 24 Stunden

Versuch	Saccharose [g/l]	Glucose [g/l]	Fructose [g/l]
4 °C 15 U/ml	36,03 ± 1,2	24,26 ± 0,6	65,22 ± 1,5
30 °C 7,5 U/ml	32,3 ± 0,8	27,35 ± 0,8	62,57 ± 2
30 °C 10 U/ml	32,35 ± 0,9	26,61 ± 0,7	59,31 ± 1,6
30 °C 15 U/ml	31,20 ± 1,3	29,59 ± 1,1	62,82 ± 2,4
50 °C 7,5 U/ml	34,93 ± 0,6	24,02 ± 0,5	64,75 ± 0,7
50 °C 10 U/ml	32,50 ± 1,2	21,89 ± 1,1	60,03 ± 2,7
50 °C 15 U/ml	33,05 ± 2,1	21,28 ± 1,2	60,24 ± 2,4
30 °C 422 U/ml	27,37 ± 1,6	29,47 ± 1,8	60,26 ± 3,7

Abbildung 9 gibt einen Überblick über die Saccharosereduktion der einzelnen Versuche nach 24 Stunden. Der Versuch bei 4 °C wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Enzym auch bei niedrigen Temperaturen Aktivität aufweist, obwohl das Optimum bei 55-60 °C liegt, um einer möglichen Keimbelastung entgegenzuwirken (Kashyap, Palai und Bhattacharya, 2015). Da jeder Versuch über einen Zeitraum von 24 Stunden bei entweder 30 °C oder 50 °C durchgeführt wurde, besteht so eine Gefahr der mikrobiologischen Belastung des Saftes. Dieser Versuch zeigte eine sehr geringe Zuckerreduktion von 1 g/l, eine Temperatur von 4 °C ist unter diesen Bedingungen ungeeignet, um einen zuckerreduzierten Saft herzustellen.

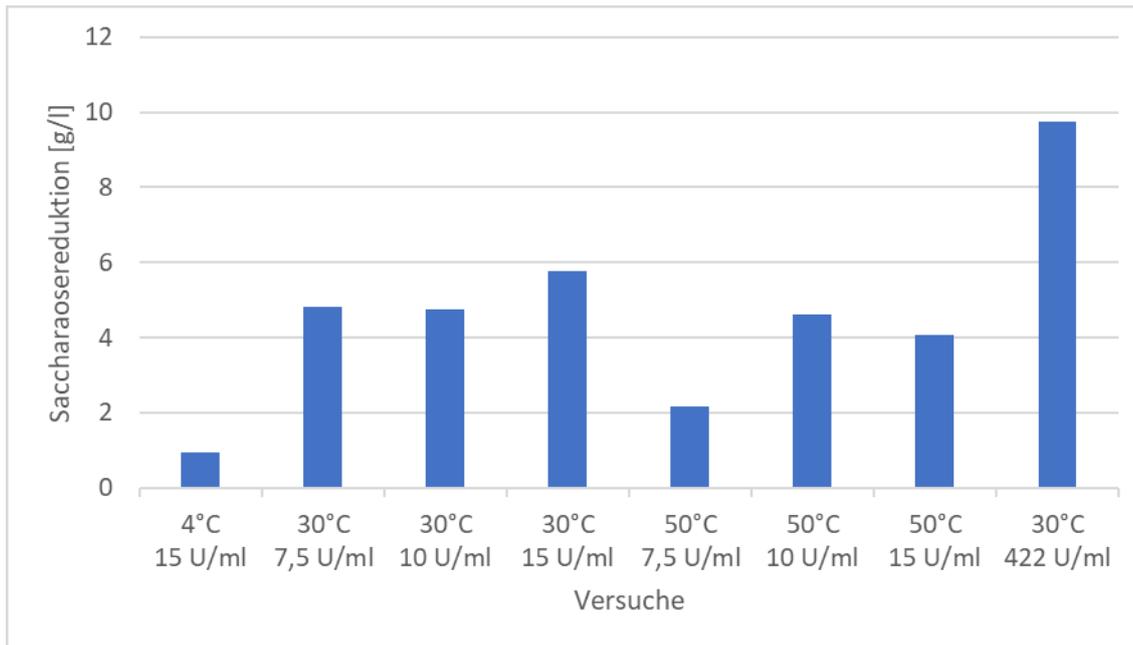


Abbildung 9: Saccharosereduktion nach 24 Stunden durch das Enzym FTase

Die effektivsten Versuche waren jene mit 422 und 15 U/ml bei 30 °C. Eine Enzymkonzentration von 422 U/ml erreichte einen Abbau der Saccharose von fast 10 g/l, 15 U/ml von 6 g/l.

In Abbildung 10 sind die Saccharosegehalte der verschiedenen Enzymkonzentrationen bei 30 °C nach 24 Stunden Fermentation dargestellt. Bei allen verwendeten Enzymkonzentrationen ergab sich eine signifikante Reduktion der Saccharose verglichen mit dem Originalsaft ($37,11 \pm 1,4$ g/l). Den niedrigsten Gehalt an Saccharose zeigte der Versuch bei 422 U/ml, welcher einen Mittelwert von $27,37 \pm 1,6$ g/l hatte. Die Saccharose wurde um 26 % reduziert und war signifikant geringer im Vergleich zu den anderen verwendeten Enzymkonzentrationen. Bei 15 U/ml konnte zwar eine Reduktion von 15 % erzielt werden, was einer Menge von 6 g/l Saccharose entspricht, jedoch konnte kein weiterer Unterschied zwischen den Konzentrationen 7,5; 10 und 15 U/ml festgestellt werden.

Hang und Woodams (1996) zeigten mit ihren Versuchen, dass die FOS-Synthese und somit auch der Abbau der Saccharose umso höher sind, je mehr Enzym verwendet wird. Diese Ergebnisse konnte durch den Versuch mit

422 U/ml bestätigt werden, da bei dieser Enzymkonzentration am meisten Saccharose abgebaut wurde.

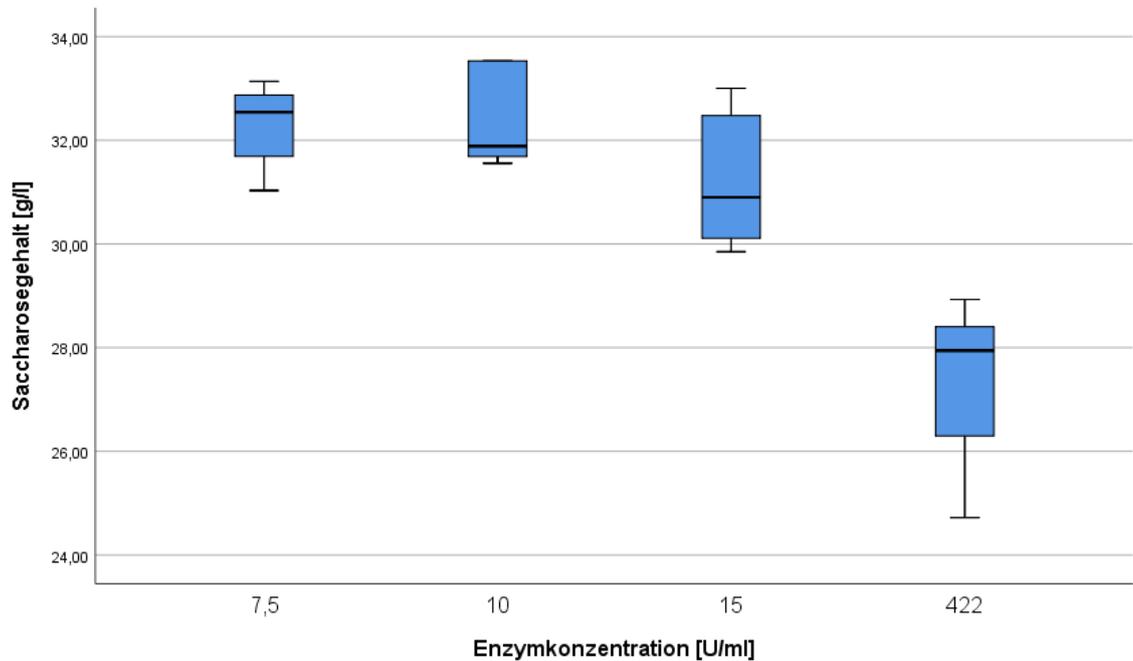


Abbildung 10: Vergleich der Saccharosegehalte bei 30 °C nach 24 Stunden

Die Fructosegehalte sind in Abbildung 11 dargestellt und erwiesen sich bei allen Enzymkonzentration als ähnlich, sie erstreckten sich von $59,31 \pm 1,6$ bis $62,57 \pm 2,1$ g/l. Bei 10 U/ml lag der gemessene Wert signifikant niedriger als bei 7,5 und 15 U/ml. Dies weist auf eine vermehrte FOS-Bildung hin, da die Fructosegehalte bei 10 U/ml im Vergleich zum Originalsaft ebenfalls signifikant geringer waren. Bei diesem Versuch mit einer Temperatur von 30 °C und einer Enzymkonzentration von 10 U/ml wurde nicht nur Fructose, welche bei dem Abbau von Saccharose frei geworden ist, in FOS umgewandelt, sondern auch bereits im Saft bestehende Fructose reduziert. Da auch bei 7,5 U/ml und 10 U/ml bei 30 °C die Fructosekonzentration trotz abgebauter Saccharose nicht anstieg, kann von einer FOS-Bildung ausgegangen werden.

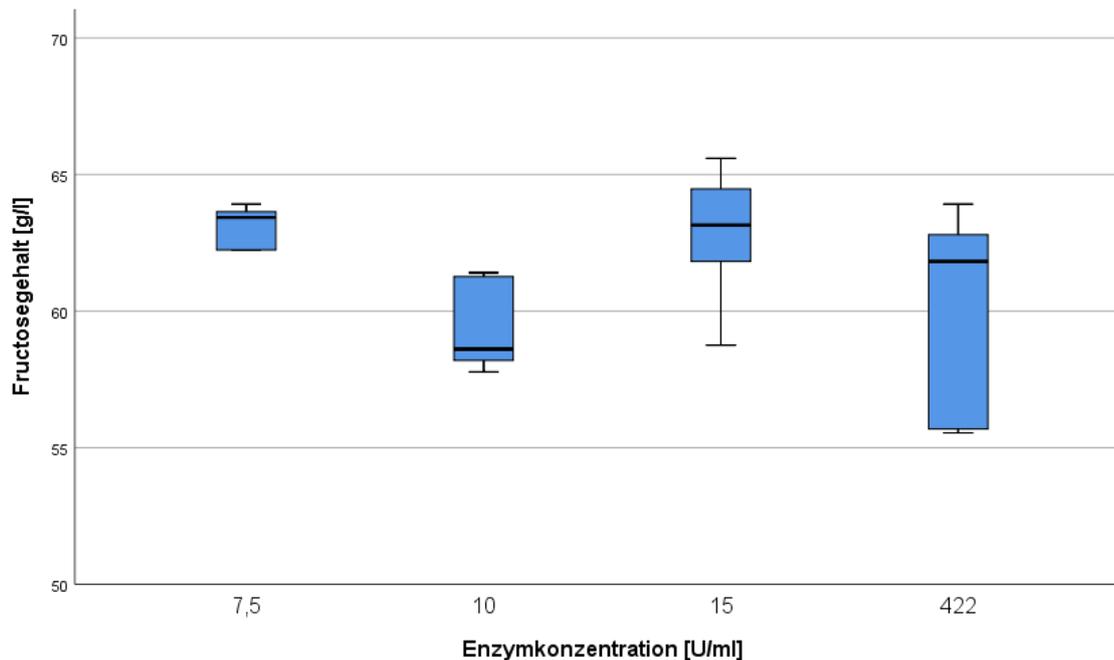


Abbildung 11: Vergleich der Fructosegehalte bei 30 °C nach 24 Stunden

Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kashyap et al. (2015), die bei einem Versuch mit 32 U/ml und 55 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden die Gehalte von Saccharose, Fructose und FOS beobachteten. Die Saccharosekonzentration zu Beginn des Versuchs von 500 g/l konnte auf 50 g/l reduziert werden und die FOS-Konzentration lag am Ende des Versuches bei 300 g/l. Während der Fermentation stieg der Fructosegehalt aufgrund der FOS-Synthese nicht signifikant an.

Die Saccharosegehalte bei 50 °C sind in Abbildung 12 dargestellt. Bei allen Enzymkonzentrationen konnte eine signifikante Reduktion der Saccharose im Vergleich zum Originalsaft festgestellt werden. Das Enzym zeigte bei 7,5 U/ml am wenigsten Aktivität, hier lag der gemessene Wert bei $34,93 \pm 0,6$ g/l und war signifikant höher als jener bei 10 U/ml. Eine Reduktion der Saccharose von 4,6 g/l (dies entspricht einer Reduktion von 12,5 %) konnte durch eine Enzymkonzentration von 10 U/ml bei 50 °C erreicht werden. Bei 15 U/ml wurde die Saccharose um 4 g/l gesenkt, was einer Reduktion von 12 % entspricht.

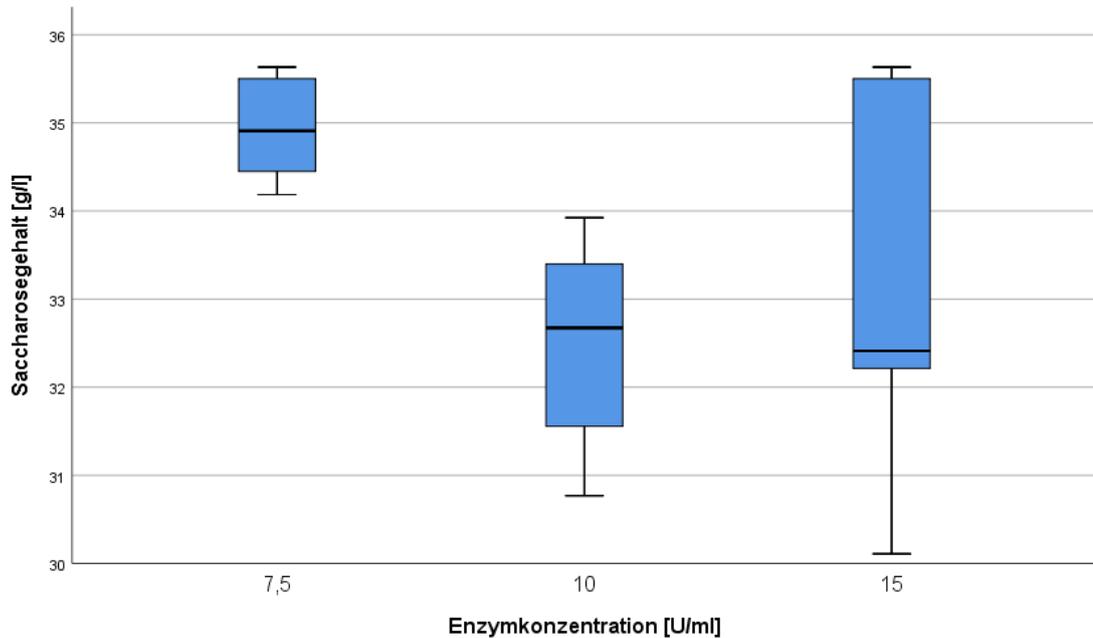


Abbildung 12: Vergleich der Saccharosegehalte bei 50 °C nach 24 Stunden

In Abbildung 13 sind die Fructosegehalte der Versuche mit 50 °C dargestellt. Die gemessenen Werte bei 10 und 15 U/ml zeigten keinen signifikanten Unterschied. Bei beiden konnte ein signifikant geringerer Wert im Vergleich zum Originalsaft festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Bildung von FOS stattgefunden hat.

Da die Versuche bei 50 °C mit 7,5 U/ml eine signifikant höhere Fructosekonzentration im Vergleich zu den anderen Enzymkonzentrationen aufwies und der Fructosegehalt signifikant höher lag als jener im Originalsaft, lässt sich aus diesen Werten schließen, dass in diesem Fall keine FOS-Bildung stattfand. Warum bei diesem Versuch weder Saccharose- noch eine Fructosereduktion erzielt werden konnte ist unklar. Da bei 30 °C und der gleichen Enzymkonzentrationen eine bessere Aktivität festgestellt werden konnte, kann es demnach nicht an der eingesetzten Enzymmenge liegen.

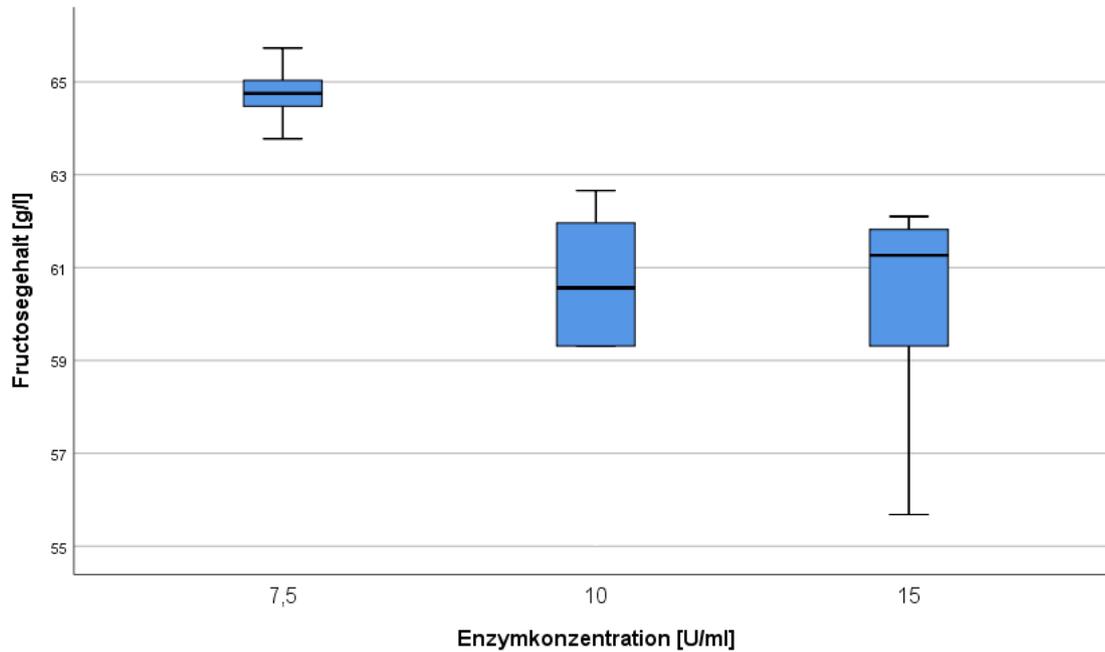


Abbildung 13: Vergleich der Fructosegehalte bei 50 °C nach 24 Stunden

Bei allen Versuchen mit dem Enzym FTase stieg der Glucosegehalt signifikant an. Dies kann einen Limitationsfaktor darstellen, da durch einen steigenden Gehalt an Glucose eine Hemmung des Enzyms erfolgt (Antasová und Polakovic, 2001).

In Abbildung 14 ist der Vergleich Saccharosegehalte der Enzymkonzentrationen bei den verwendeten Temperaturen graphisch dargestellt. Da der Saccharosegehalt bei einer Enzymkonzentration von 7,5 U/ml bei 30 °C signifikant niedriger lag als bei 15 U/ml, war die niedrigere Temperatur zumindest bei dieser Enzymmenge wirksamer.

Bei 10 U/ml zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Temperaturen, beide konnte eine Saccharosereduktion von ungefähr 12 % bewirken. Zwischen den Werten bei 15 U/ml gab es laut statistischer Analyse ebenfalls keine Unterschiede. Hier streuten jedoch die Daten der Versuche bei 50 °C und könnten so zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben. Diese Daten widersprechen dem Ergebnis von Kashyap et al. (2015), wonach das Enzym bei 50 °C wirksamer sein sollte als bei 30 °C.

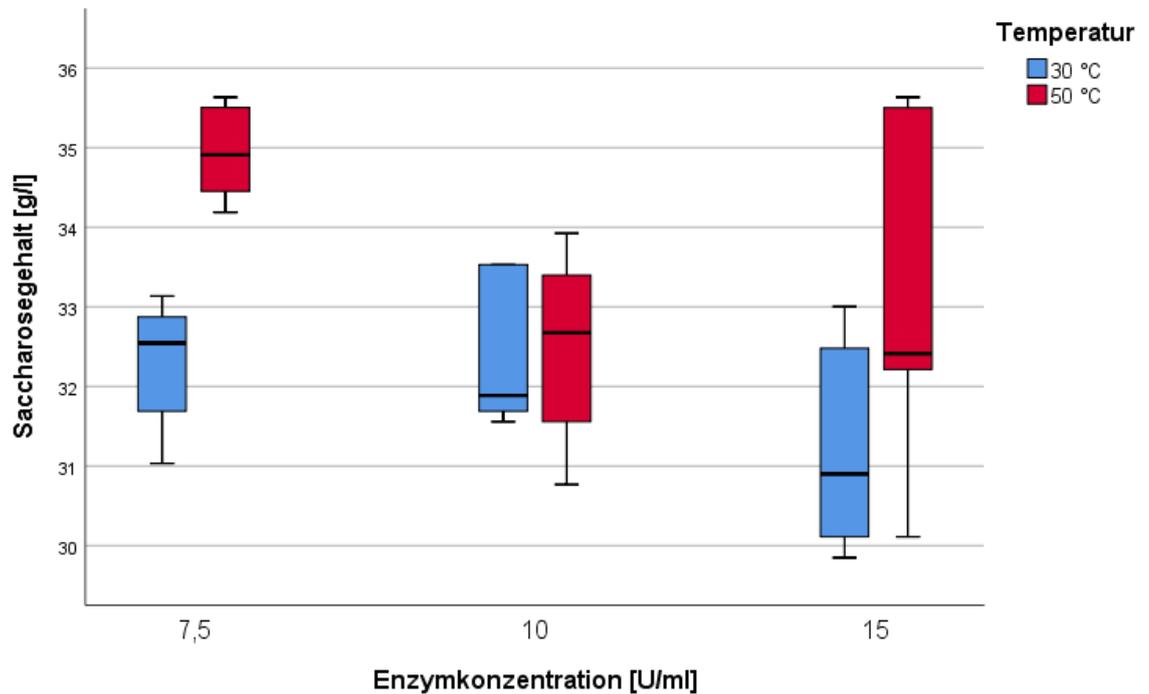


Abbildung 14: Vergleich der Saccharosegehalte bei 30 °C und 50 °C

In Abbildung 15 werden die gemessenen Fructosegehalte der verwendeten Enzymkonzentrationen hinsichtlich der unterschiedlichen Temperaturen verglichen. Bei 7,5 U/ml zeigte sich bei 30 °C ein signifikant geringerer Fructosegehalt als bei 50 °C. Demnach zeigte sich auch hier eine bessere FTase-Aktivität bei 30 °C. Weder die Werte mit 10 U/ml, noch jene bei 15 U/ml wiesen signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Temperaturen auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Temperatur zumindest bei diesen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat.

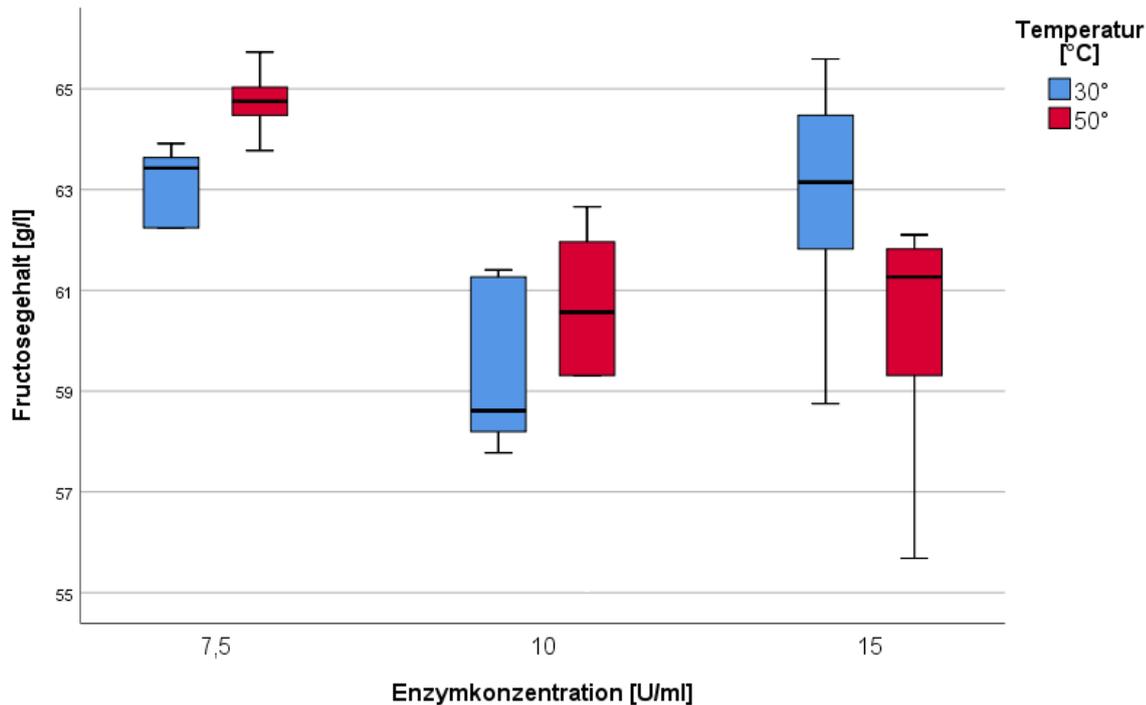


Abbildung 15: Vergleich der Fructosegehalte bei 30 °C und 50 °C nach 24 Stunden

Die FTase zeigte bei keinem der durchgeführten Versuche eine gute Wirksamkeit. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen erreichten Kashyap et al. (2015) eine Saccharosereduktion von 90 %. Ein möglicher Grund für die geringe Aktivität kann der geringe pH-Wert des Apfelsafts, welcher bei 3,5 lag, sein. Der optimale pH-Wert für die FTase liegt zwischen 5 und 6. (Hang und Woodams, 1996). Es erfolgte bei keinen Versuchen eine Optimierung des pH-Werts, was ein Problem für die FTase-Aktivität darstellen kann. Jung et al. (1989) untersuchte die Auswirkungen des pH-Werts auf die gebildete Menge von Kestose durch das Enzym FTase. Die Versuche wurden mit pH-Werten von 3-8 durchgeführt. Ein pH-Wert von 3 zeigte die geringste Aktivität des Enzyms, das Maximum wurde bei 5,5 erreicht. Eine pH-Wert-Anpassung scheint für die Produktion eines zuckerreduzierten Safts von großer Bedeutung zu sein.

Auch die verwendete Enzymmenge kann ein Problem darstellen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Versuche mit 422 U/ml, aufgrund der deutlich höheren Enzymkonzentration, die stärkste Saccharosereduktion erzielten. Demnach besteht die Möglichkeit, dass zusätzlich zu ungünstigen Parametern (pH-Wert), auch die Enzymkonzentration zu niedrig gewählt wurde.

4.2.2. Gesamtpolyphenolgehalt

Die Gesamtpolyphenolgehalte von den Versuchen bei 30 °C sind in Abbildung 16 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass der Gesamtpolyphenolgehalt bei 15 U/ml einen signifikant geringeren Wert von $1681,38 \pm 45,4$ mg FS-Äquivalente/100 g Probe aufweist im Vergleich zu den anderen Enzymkonzentrationen. Zwischen den Gesamtpolyphenolgehalten von 7,5 und 10 U/ml zeigten sich bei dieser Temperatur keine Unterschiede, die Messwerte lagen bei $1788,02 \pm 15,7$ und $1809,38 \pm 59,3$ mg FS-Äquivalente/100 g Probe.

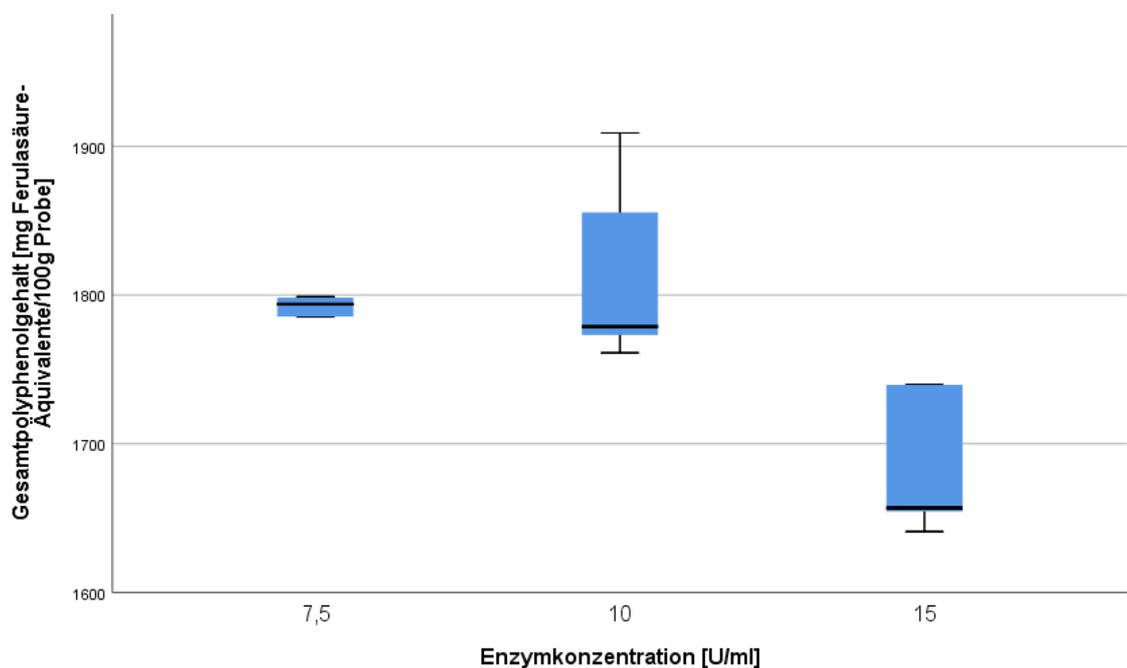


Abbildung 16: Gesamtpolyphenolgehalt nach 24 Stunden durch das Enzym FTase

Im Gegensatz dazu wies der Gesamtpolyphenolgehalt bei 50 °C keine signifikanten Unterschiede zwischen den Enzymkonzentrationen auf.

Da die signifikanten Unterschiede bei 30 °C nicht sehr groß sind und bei 50 °C kein wesentlicher Unterschied vorlag, hat die FTase, basierend auf diesen Ergebnissen, nur einen sehr geringen Einfluss auf den Gesamtpolyphenolgehalt.

4.2.3. Antioxidative Kapazität und Scavenging Activity

Die Messwerte der antioxidativen Kapazität und der Scavenging Activity sind in Tabelle 16 ersichtlich. Es zeigte sich zwischen den Enzymkonzentrationen bei

30 °C keine Unterschiede. Im Vergleich zum Originalsaft wiesen alle geringere Werte auf, die Differenz betrug jedoch nur 2-5 mg Fe²⁺-Äquivalente/l. Auch bei 50 °C gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Enzymmengen. Obwohl die antioxidative Kapazität bei 50 °C um nur ungefähr 2 mg Fe²⁺-Äquivalente/l niedriger war als der Originalsaft (48,18 ± 0,3 mg Fe²⁺-Äquivalente/l), erwies sich dieser Unterschied als signifikant. Auch der Versuch bei 4 °C zeigte keine signifikante Reduktion der antioxidative Kapazität. Dies deutet daraufhin, dass das verwendete Enzym keinen großen Einfluss auf das antioxidative Kapazität des Apfelsaftes hatte.

Tabelle 16: Antioxidative Kapazität der Versuche mit dem Enzym FTase

Enzymmenge [U/ml]	Temperatur [°C]	FRAP [mg Fe²⁺-Äquivalente/l]	Scavenging Activity [%]
15	4	43,25 ± 0,7	35,83 ± 0,5
7,5	30	46,60 ± 1,1	36,31 ± 1,1
10	30	43,11 ± 3	35,30 ± 0,6
15	30	46,46 ± 0,6	35,74 ± 0,6
7,5	50	46,54 ± 0,7	33,45 ± 2,4
10	50	46,57 ± 1,3	35,88 ± 0,9
15	50	46,46 ± 0,6	35,92 ± 1,5

Die gemessene Scavenging Activity war bei allen Versuchen sehr ähnlich. Weder bei 30 °C noch bei 50 °C zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Enzymkonzentrationen und auch keiner im Vergleich zum Originalsaft, welcher einen Wert von 35.64 ± 0.5 % aufwies.

In Abbildung 17 ist der Vergleich der Scavenging Activity der verwendeten Temperaturen der jeweiligen Enzymkonzentrationen dargestellt. Bei 10 U/ml und 15 U/ml zeigte sich kein Unterschied zwischen den Ergebnissen, nur bei

7,5 U/ml war die Scavenging Activity bei 50 °C signifikant geringer als bei 30 °C. Das Enzym hat bei diesen Parametern scheinbar keinen Einfluss auf die Scavenging Activity des Safts.

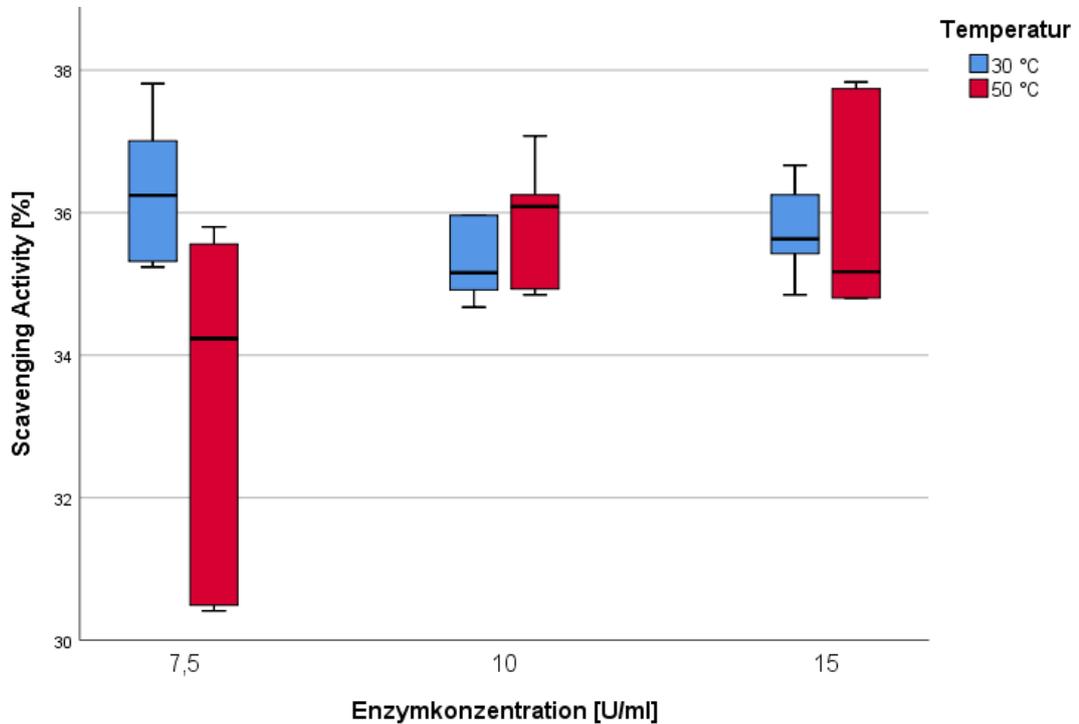


Abbildung 17: Vergleich der Scavenging Activity bei 30 °C und 50 °C nach 24 Stunden

4.3. Ergebnisse der Versuche mit dem Enzym Glucose-Oxidase

4.3.1. Enzymatische Bestimmung des Zuckergehalts

Die Glucosegehalte sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die Glucosereduktion bei 1,2 U/ml belief sich auf ungefähr 9 %, bei 0,6 U/ml zeigte das Enzym eine sehr geringe Wirkung.

Tabelle 17: Glucosegehalte der Versuche mit reiner Glucose-Oxidase nach 24 Stunden

Enzymkonzentration [U/ml]	Glucose [g/l]
0,6	20,86 ± 0,5
1,2	18,42 ± 0,6

Wurden die verwendeten Enzymkonzentrationen miteinander verglichen, wie in Abbildung 18 dargestellt ist, ergab sich bei 0,6 U/ml ein signifikant höherer Glucosegehalt als bei 1,2 U/ml. Das Enzym zeigte demnach bei 1,2 U/ml eine bessere Wirksamkeit als bei 0,6 U/ml. Die Reduktion der Glucose belief sich jedoch lediglich auf maximal 2 g/l.

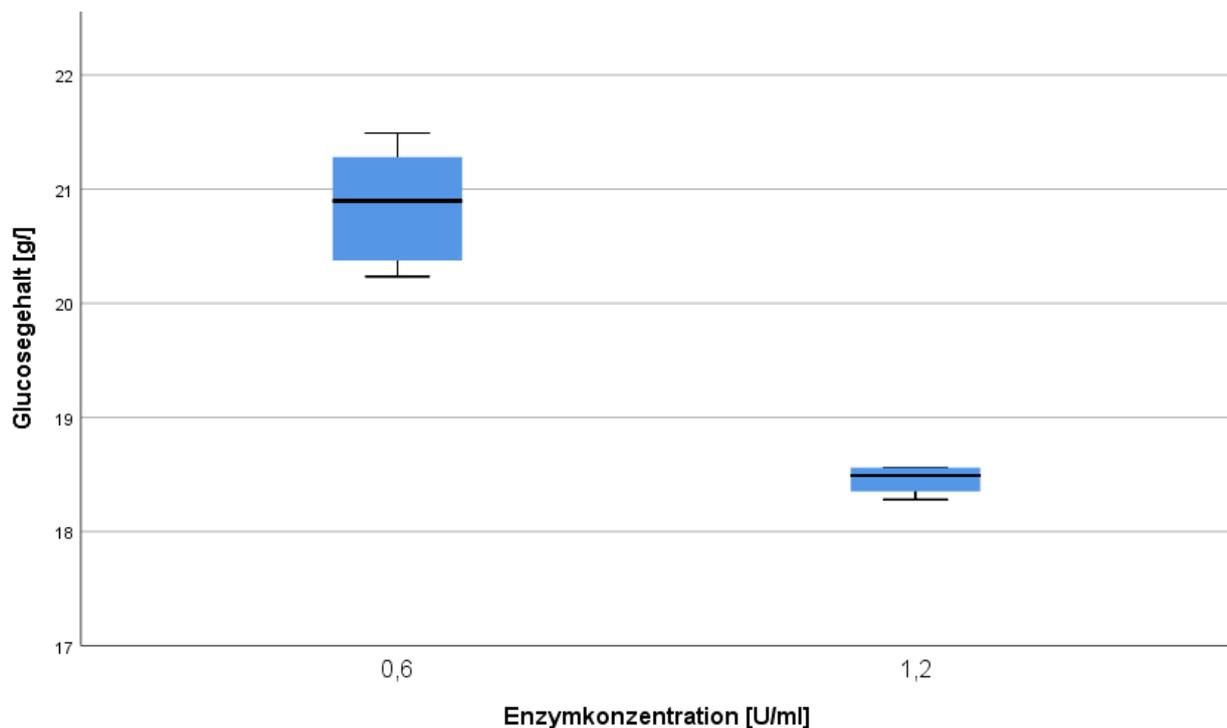


Abbildung 18: Vergleich der Glucosegehalte der verwendeten Enzymkonzentrationen nach 24 Stunden

Der Glucoseabbau kann laut Petkova et al. (2016) verbessert werden, in dem zusätzlich noch das Enzym Katalase zum Substrat hinzugefügt wird. Wurde bei ihren Versuchen GOD als einziges Enzym verwendet, erzielten sie eine Glucosereduktion von 1,32 %. Eine Kombination von GOD mit Katalase resultierte in einem Abbau der Glucose von 49,25 %. Diese Steigerung der Aktivität des Enzyms ist auf den Abbau des anfallenden Wasserstoffperoxids durch die Katalase zurückzuführen, wodurch eine Hemmung der GOD entgegengewirkt wird.

Der pH-Wert des Apfelsaftes von 3,5 stellt auch bei diesem Enzym einen limitierenden Faktor bei den durchgeführten Versuchen dar. Das pH-Optimum liegt

zwischen 5,5 und 6, eine Anpassung kann für eine Aktivitätssteigerung der GOD von Vorteil sein (Pickering, Heatherbell und Barnes, 1998).

Petkova et al. (2016) verwendeten in ihren Versuchen eine Enzymkonzentration von 200 U/ml und konnten, in Verbindung mit Katalase, eine Glucosereduktion von beinahe 50 % erreichen. Auch Jung et al. (1993) verwendeten eine Konzentration von 5 U/g Saccharose, dies würde bei einem Apfelsaft einer Konzentration von 175 U/l (angenommen der Saft enthält 35 g Saccharose/l) entsprechen. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass die verwendeten Enzymkonzentrationen von 0,6 und 1,2 U/ml zu gering gewählt wurden und deshalb nur eine geringe Glucosereduktion stattfand.

Ein Versuch wurde mit dem Enzym Alphamalt Gloxy 5080 der Firma Mühlenchemie durchgeführt. Da die Ergebnisse keine Reduktion des Glucosegehalt zeigten, wurden keine weiteren Versuche mit dieser Art von GOD durchgeführt. Die verwendete Menge an Enzym beeinflusste die Farbe (der Saft wurde sehr trüb) und die Konsistenz, da es sich um ein in Mehl immobilisiertes Enzym handelte, welches für das Backen von Brot bestimmt ist.

Petkova et al. (2016) verwendeten für ihre Versuche ebenfalls Alphamalt Gloxy 5080 der Firma Mühlenchemie mit einer Enzymaktivität von 10500 U/g und konnten mit einer Enzymkonzentration von 2 g/l eine Abbaurrate der Glucose bis zu 77,6 % erreichen. Im Vergleich dazu wies das im Rahmen dieser Masterarbeit verwendete Enzym eine geringere Enzymaktivität auf, weswegen eine größere Menge des Enzyms für die gewollte Konzentration von 10 U/ml verwendet werden musste und so eine Beeinflussung der Farbe und Konsistenz zur Folge hatte.

4.3.2. Gesamtpolyphenolgehalt

Der Gesamtpolyphenolgehalt zeigte keinen Unterschied zwischen den verwendeten Enzymkonzentrationen und auch im Vergleich zum Originalsaft gab es keine Veränderung, wie in Tabelle 18 ersichtlich ist. Das Enzym hatte bei den durchgeführten Versuchen keinen Einfluss auf den Gesamtpolyphenolgehalt.

Tabelle 18: Gesamtpolyphenolgehalt der verwendeten Enzymkonzentrationen nach 24 Stunden

Enzymkonzentration [U/ml]	TPC [mg FS-Äquivalente/100 g Probe]
0,6	1699,85 ± 38,9
1,2	1694,16 ± 27,9

4.3.3. Antioxidative Kapazität und Scavenging Activity

Die antioxidative Kapazität, dargestellt in Abbildung 19, zeigte bei 1,2 U/ml einen signifikant höheren Wert, obwohl sich die gemessenen Daten nur um 1 mg Fe²⁺-Äquivalente/l unterschieden. Beide Enzymkonzentrationen wiesen eine geringere antioxidative Kapazität als der Originalsaft (48.18 ± 0.3 Fe²⁺-Äquivalente/l) auf. Es hatte entweder die Fermentation mit dem Enzym einen Einfluss auf die antioxidative Kapazität oder die Umstände des Versuchs, wie zum Beispiel die Dauer von 24 Stunden oder die Zufuhr von Sauerstoff bewirkten eine Reduktion der antioxidativen Kapazität.

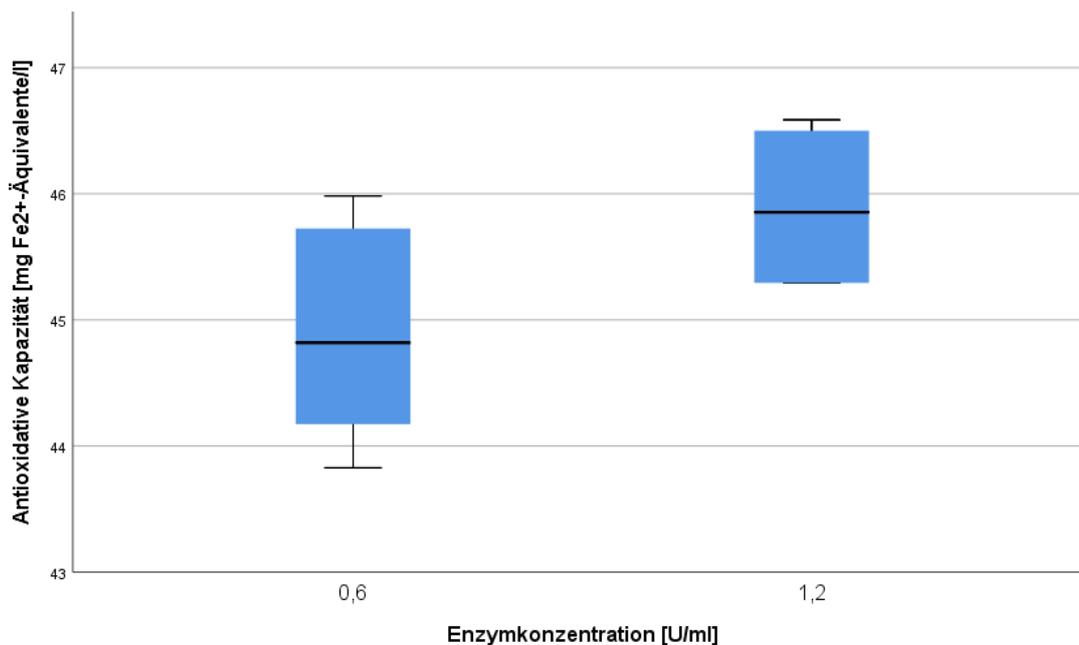


Abbildung 19: Vergleich der antioxidativen Kapazität der Enzymkonzentrationen nach 24 Stunden

Die Scavenging Activity war bei der höheren Enzymkonzentration signifikant geringer, wie in Abbildung 20 ersichtlich ist. Bei 1,2 U/ml zeigte sich eine Aktivität von $34,26 \pm 0,7 \%$ und bei 0,6 U/ml von $31,5 \pm 0,5 \%$. Auch im Vergleich zum Ausgangssaft ergaben sich signifikant geringere Werte. Daraus lässt sich schließen, dass die GOD einen Einfluss auf die Scavenging Activity besitzt.

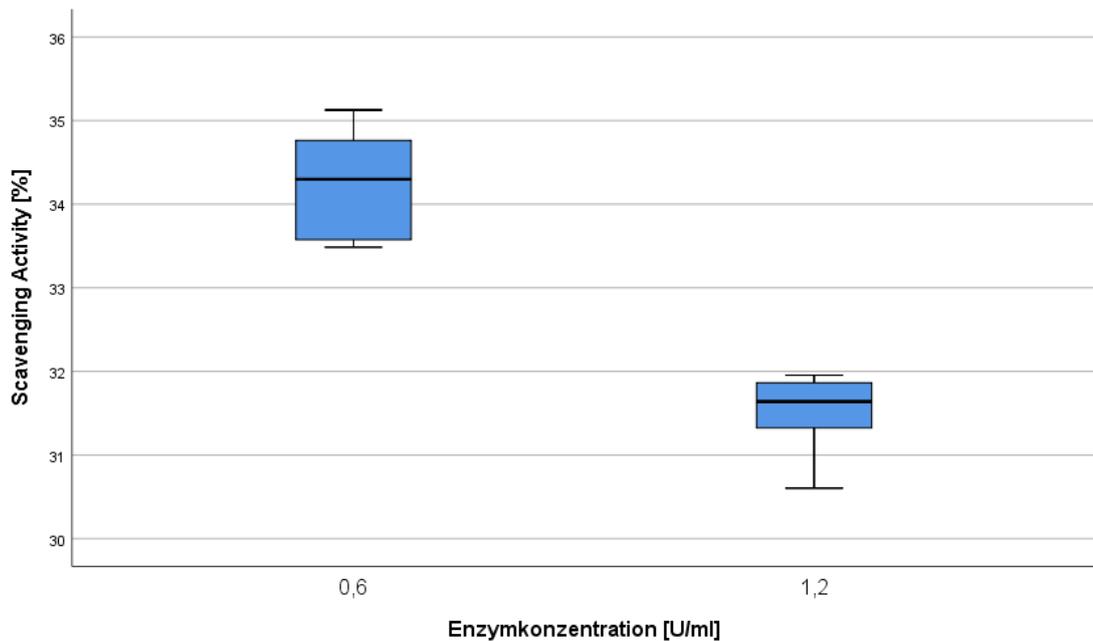


Abbildung 20: Vergleich der Scavenging Activity [%] der verwendeten Enzymkonzentrationen

4.4. Farbmessung

Die Grenze von einem Δ -E-Wert über 5 als deutlicher Farbunterschied wurde von allen Proben überschritten. Demnach haben die behandelten Säfte alle einen anderen, wenn auch ähnlichen, Farbton als der Originalsaft.

Die Δ -E-Wert der Versuche mit der FTase sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Alle Säfte wiesen nach dem Versuch einen Farbabstand von über 10 auf. Der größte Farbunterschied wurde bei den Proben des Versuchs bei 30 °C und 15 U/ml gemessen. Die Messwerte zeigen, dass sich die Farbe bei 30 °C stärker verändert hat als bei 50 °C.

Tabelle 19: Δ -E-Werte der Versuche mit dem Enzym FTase nach 24 Stunden

Versuch	Δ -E
4° - 15 U/ml	17,45 ± 0,2
30° - 7,5 U/ml	14,93 ± 1,9
30° - 10 U/ml	18,91 ± 0,6
30° - 15 U/ml	19,73 ± 1,6
50° - 7,5 U/ml	13,4 ± 0,4
50° - 10 U/ml	13,09 ± 0,2
50° - 15 U/ml	14,49 ± 0,7

In Tabelle 20 sind die Δ -E-Werte der Versuche mit dem Enzym GOD ersichtlich. GOD zeigte eine viel geringere Beeinflussung der Farbe als FTase. Der Δ -E-Wert von 0,6 U/ml lag bei $5,36 \pm 0,3$ und war der kleinste gemessene Farbabstand.

Tabelle 20: Δ -E-Werte der Versuche mit dem Enzym GOD nach 24 Stunden

Versuch	Δ -E
0,6 U/ml	5,36 ± 0,3
1,2 U/ml	7,37 ± 0,4

5. Conclusio

Der ursprüngliche Plan ein Enzymsystem mit FTase und GOD zu entwickeln wurde verworfen, da beide einzeln nicht genügend Zucker abbauten. Der Versuch mit dem Enzym FTase und 422 U/ml zeigte den größten Saccharoseabbau mit einer Reduktion von 26 %. Dies weist daraufhin, dass die Enzymkonzentrationen 7,5; 10 und 15 U/ml zu niedrig gewählt wurden. Eine Enzymkonzentration von 1,2 U/ml der GOD erreichte eine Glucosereduktion von 9 %, im Gegensatz dazu konnte kein Glucoseabbau bei 0,6 U/ml erzielt werden.

Bei beiden Enzymen weisen die Ergebnisse daraufhin, dass zu geringe Enzymkonzentrationen verwendet wurden. Im industriellen Maßstab ergeben sich jedoch durch eine höhere Enzymmenge auch mehr Kosten für ein Unternehmen, welches zuckerreduzierte Säfte produzieren möchte. Die Konzentration der Enzyme wurde absichtlich gering gewählt, um möglichst geringe Kosten für eine potenzielle Massenproduktion zu erhalten.

Da der Apfelsaft nicht behandelt wurde, lag der pH-Wert weit unter dem Optimum beider Enzyme. Eine Optimierung bzw. eine Erhöhung des pH-Werts des Safts scheint von großer Bedeutung zu sein, um die Aktivität von der FTase und GOD zu verbessern.

Die Temperaturen 30 °C und 50 °C schienen keinen großen Einfluss auf das Enzym FTase zu haben. Einzig der Versuch mit der FTase bei 4 °C resultierte in keiner Reduktion der Saccharose, demnach schränkt eine derartig niedrige Temperatur die Aktivität des Enzyms ein.

Das Enzym FTase hatte weder auf den Gesamtpolyphenolgehalt, noch auf die antioxidative Kapazität bzw. auf die Scavenging Activity einen signifikanten Einfluss. GOD scheint die antioxidative Kapazität und die Scavenging Activity bei höheren Enzymkonzentrationen zu negativ zu beeinflussen, der Gesamtpolyphenolgehalt hingegen blieb unverändert.

Bevor beide Enzyme simultan verwendet werden können, müssen GOD und FTase einzeln genug Aktivität aufweisen, um den Zucker zu reduzieren. Eine

Conclusio

Optimierung des pH-Werts und eine Anpassung der Enzymmenge scheint unausweichlich, um ein Enzymsystem zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

- Antasová, M. and Polakovic, M. (2001) 'Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing Production', *Chem*, 55(May), pp. 350–358.
- Auerbach, B. J. *et al.* (2017) 'Fruit Juice and Change in BMI: A Meta-analysis', *Pediatrics*, 139(4), p. e20162454. doi: 10.1542/peds.2016-2454.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) 'The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay', *Analytical Biochemistry*, 239(1), pp. 70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Bornet, F. R. (1994) 'Undigestible sugars in food products', *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, pp. 763S–9S.
- Bouhnik, Y. *et al.* (1999) 'Short-Chain Fructo-Oligosaccharide Administration Dose-Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans', *The Journal of Nutrition*, (February 1998), pp. 113–116.
- BRENDA - Information on EC 1.1.3.4 - glucose oxidase* (no date). Available at: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.3.4> (Accessed: 12 March 2019).
- BRENDA - Information on EC 2.4.1.9 - inulosucrase* (no date). Available at: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.9> (Accessed: 8 March 2019).
- Brouns, F. *et al.* (2003) 'Effects of short-chain fructo-oligosaccharides on glucose and lipid metabolism in mild hypercholesterolaemic individuals', *Clinical Nutrition*, 23(3), pp. 331–340. doi: 10.1016/j.clnu.2003.07.010.
- Bundesministerium für Frauen und Gesundheit (2017) *Österreichischer Ernährungsbericht*.
- Cáceres, E. *et al.* (2004) 'The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages', *Meat Science*, 68(1), pp. 87–96. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.02.008.
- Campbell, J. M. *et al.* (1997) 'Selected Fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1^F-β-Fructofuranosylnystose) Composition of Foods and Feeds', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), pp. 3076–3082. doi: 10.1021/jf970087g.
- Campbell, R. *et al.* (2017) 'Association between urinary biomarkers of total sugars and sucrose intake and BMI in a cross-sectional study', *PLOS One*, pp. 1–13. Available at: <http://biorxiv.org/content/early/2017/01/11/099556>.
- Cardarelli, H. R. *et al.* (2008) 'Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese',

- LWT - Food Science and Technology*, 41(6), pp. 1037–1046. doi: 10.1016/j.lwt.2007.07.001.
- Chung, Y.-C. *et al.* (2004) 'Xylooligosaccharides and Fructooligosaccharides Affect the Intestinal Microbiota and Precancerous Colonic Lesion Development in Rats', *The Journal of Nutrition*, 134(6), pp. 1523–1528. doi: 10.1093/jn/134.6.1523.
- Decamps, K. *et al.* (2012) 'Glucose and pyranose oxidase improve bread dough stability', *Journal of Cereal Science*. Elsevier Ltd, 55(3), pp. 380–384. doi: 10.1016/j.jcs.2012.01.007.
- Delzenne, N. M. (2003) 'Oligosaccharides: state of the art', *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(01), pp. 177–182. doi: 10.1079/pns2002225.
- Dobbenie, D., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (1995) 'Antibacterial Activity of the Glucose Oxidase/Glucose System in Liquid Whole Egg', *Journal of Food Protection*, 58(3), pp. 273–279. doi: 10.4315/0362-028x-58.3.273.
- Ebermann, R. and Elmadfa, I. (2011) 'Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung', in *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*. 2. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, pp. 21–54.
- Engin, A. (2017) 'The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome', in *Obesity and Lipotoxicity*. Springer International Publishing AG, pp. 1–17. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5.
- European Fruit Juice Association (2018) *Crucial learnings from the latest research on fruit, fruit juice and sugars*.
- Gibson, G. R. *et al.* (1995) 'Selective Stimulation of Bifidobacteria in the Human Colon by Oligofructose and Inulin', *Gastroenterology*, 108, pp. 975–982.
- Gibson, G. R. *et al.* (2017) 'Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, 14(8), pp. 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (1995) 'Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics', *The Journal of Nutrition*, 125(6), pp. 1401–1412. doi: 10.1093/jn/125.6.1401.
- Hang, Y. D. and Woodams, E. E. (1995) 'Fructosyltransferase activity of commercial enzyme preparations used in fruit juice processing', *Biotechnology Letters*, 17(7), pp. 741–744. doi: 10.1007/BF00130361.
- Hang, Y. D. and Woodams, E. E. (1996) 'Optimization of enzymatic production of

- fructo-oligosaccharides from sucrose', *LWT - Food Science and Technology*, 29(5–6), pp. 578–580. doi: 10.1006/food.1996.0089.
- He, F. J. and MacGregor, G. A. (2015) 'Salt and sugar: their effects on blood pressure', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 467(3), pp. 577–586. doi: 10.1007/s00424-014-1677-x.
- Den Hond, E., Geypens, B. and Ghoois, Y. (2000) 'Effect of high performance chicory inulin on constipation', *Nutrition Research*, 20(5), pp. 731–736. doi: 10.1016/S0271-5317(00)00162-7.
- Imamura, F. *et al.* (2016) 'Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: Systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction', *British Journal of Sports Medicine*, 50(8), pp. 496–504. doi: 10.1136/bjsports-2016-h3576rep.
- Jensen, T. *et al.* (2018) 'Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Journal of Hepatology*, 68(5), pp. 1063–1075. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.019.Fructose.
- Jung, K. H. *et al.* (1989) 'Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose', *Enzyme and Microbial Technology*, 11(8), pp. 491–494. doi: 10.1016/0141-0229(89)90029-X.
- Jung, K. H. *et al.* (1993) 'Production of high fructo-oligosaccharide syrup with two enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase', *Biotechnology Letters*, 15(1), pp. 65–70.
- Kashyap, R., Palai, T. and Bhattacharya, P. K. (2015) 'Kinetics and model development for enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using fructosyltransferase', *Bioprocess and biosystems engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 38(12), pp. 2417–2426. doi: 10.1007/s00449-015-1478-4.
- Kaur, N. and Gupta, A. K. (2002) 'Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition', *Journal of Biosciences*, 27(7), pp. 703–714.
- Kleessen, B. *et al.* (1997) 'Effects of insulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons', *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(5), pp. 1397–1402.
- Kleppe, K. (1966) 'The Effect of Hydrogen Peroxide on Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*', *Biochemistry*, 5(1), pp. 139–143. doi: 10.1021/bi00865a018.
- Kok, N. N., Taper, H. S. and Delzenne, N. M. (1998) 'Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by a fat-rich diet in rats', *Journal of Applied*

- Toxicology*, 18(1), pp. 47–53. doi: 10.1002/(SICI)1099-1263(199801/02)18:1<47::AID-JAT474>3.0.CO;2-S.
- Kruse, H.-P., Kleessen, B. and Blaut, M. (1999) 'Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects', *British Journal of Nutrition*, 82(5), pp. 375–382. doi: 10.1017/s0007114599001622.
- Latscha, H. P., Kazmaier, U. and Klein, H. A. (2008) 'Kohlenhydrate', in *Organische Chemie*. 6th edn. Springer Spektrum, p. 400. doi: 10.1002/cber.18920250390.
- Letexier, D. and Beylot, M. (2003) 'Addition of inulin to a moderately high-carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol concentrations in', *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), pp. 59–64. doi: 10.1186/s12933-017-0531-9.
- Liu, F. *et al.* (2014) 'Effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on antioxidant activity, antioxidant compounds and color of mango nectars', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Elsevier Ltd, 21, pp. 35–43. doi: 10.1016/j.ifset.2013.09.015.
- Löffler, G. (2008) 'Kohlenhydrate', in *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 8. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, pp. 55, 71, 80–82.
- Matissek, R. and Baltes, W. (2016) 'Lebensmittelchemie', in *Lebensmittelchemie*. 8. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, pp. 131–175.
- Matissek, R., Fischer, M. and Steiner, G. (2018) *Lebensmittelanalytik*. doi: 10.1007/978-3-662-55722-8.
- Mendoza, E. *et al.* (2001) 'Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages', *Meat Science*, 57(4), pp. 387–393. doi: 10.1016/S0309-1740(00)00116-9.
- Mirón, J. *et al.* (2004) 'A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions', *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5), pp. 513–522. doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.003.
- Mokrzycki Cardinal Stefan, W. and Tatol, M. (2011) 'Color difference Delta E-A survey', *Machine Graphics and Vision*, 20(April 2011). Available at: <https://www.researchgate.net/publication/236023905>.
- Morenga, L. Te, Mallard, S. and Mann, J. (2013) 'Dietary sugars and body weight: Systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies', *The British Medical Journal*, 345(7891), pp. 1–25. doi: 10.1136/bmj.e7492.
- Moynihan, P. (2016) 'Sugars and Dental Caries : Evidence for Setting a Recommended Threshold for Intake 1 – 3', *Advances in Nutrition*, (7), pp. 149–156. doi:

10.3945/an.115.009365.average.

- Park, E. Y., Jang, S. B. and Lim, S. T. (2016) 'Effect of fructo-oligosaccharide and isomalto-oligosaccharide addition on baking quality of frozen dough', *Food Chemistry*, 213, pp. 157–162. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.067.
- Petkova, V., Mladenoska, I. and Gjuladin-Hellon, T. (2016) 'Utilization of Different Types of Glucose Oxidase for Reduction of Glucose Concentration in Synthetic Grape Juice', *Agro-Knowledge Journal*, 17(1), p. 47. doi: 10.7251/agren1601047p.
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A. and Barnes, M. F. (1998) 'Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase', *Food Research International*, 31(10), pp. 685–692. doi: 10.1016/S0963-9969(99)00046-0.
- Plou, F. J. *et al.* (2008) 'Efficient Fructooligosaccharide Synthesis with a Fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*', in *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, p. 154.
- Rafter, J. *et al.* (2007) 'Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and', *International Journal*, (3), pp. 488–496.
- Rechner, A. (2000) *Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften*. Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Reddy, B. S. (1999) 'Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Possible Mechanisms by Which Pro- and Prebiotics Influence Colon Carcinogenesis and Tumor Growth', *The Journal of Nutrition*, pp. 1478–1482.
- Roberfroid, M. and Slavin, J. (2000) 'Nondigestible Oligosaccharides', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(6), pp. 461–480. doi: 10.1080/10408690091189239.
- Sabater-Molina, M. *et al.* (2009) 'Dietary fructooligosaccharides and potential', *Journal Physiology Biochemistry*, 65(3), pp. 315–328.
- Sandholm, M. *et al.* (1988) 'Glucose Oxidase (GOD) as a Source of Hydrogen Peroxide for the Lactoperoxidase (LPO) System in Milk: Antibacterial Effect of the GOD-LPO System against Mastitis Pathogens', *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 35(1–10), pp. 346–352. doi: 10.1111/j.1439-0450.1988.tb00506.x.
- Sant'Ana, A. de S., Rosenthal, A. and de Massaguer, P. R. (2008) 'The fate of patulin in apple juice processing: A review', *Food Research International*, 41(5), pp. 441–453. doi: 10.1016/j.foodres.2008.03.001.

- Scheid, M. M. A. *et al.* (2014) 'Freeze-dried powdered yacon: effects of FOS on serum glucose, lipids and intestinal transit in the elderly', *European Journal of Nutrition*, 53(7), pp. 1457–1464. doi: 10.1007/s00394-013-0648-x.
- Schulze, M. B. *et al.* (2004) 'Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women', *Journal of the American Medical Association*, 292(8), pp. 927–934. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=39097202>.
- Seifu, E., Buys, E. M. and Donkin, E. F. (2005) 'Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review', *Trends in Food Science and Technology*, 16(4), pp. 137–154. doi: 10.1016/j.tifs.2004.11.002.
- Sheiham, A. and James, W. P. T. (2014) 'A new understanding of the relationship between sugars, dental caries and fluoride use: Implications for limits on sugars consumption', *Public Health Nutrition*, 17(10), pp. 2176–2184. doi: 10.1017/S136898001400113X.
- da Silveira, E. O. D. *et al.* (2015) 'The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage', *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), pp. 445–451. doi: 10.1016/j.lwt.2014.09.056.
- Singla, V. and Chakkaravarthi, S. (2016) 'Applications of prebiotics in food industry : A review', *Food Science and Technology International*, 23(8). doi: 10.1177/1082013217721769.
- Singleton, V. L. (1974) 'Analytical Fractionation of the Phenolic Substances of Grapes and Wine and Some Practical Uses of Such Analyses', pp. 184–211. doi: 10.1021/ba-1974-0137.ch009.
- Sisak, C. *et al.* (2006) 'Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase', *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), pp. 1002–1007. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.02.010.
- Souci, S. W., Fachmann, W. and Kraut, H. (2015) *Food composition and Nutrition Tables*. 8th edn. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- de Souza Lima Sant'Anna, M. *et al.* (2015) 'Yacon-Based Product in the Modulation of Intestinal Constipation', *Journal of Medicinal Food*, 18(9), pp. 980–986. doi: 10.1089/jmf.2014.0115.
- Stick, R. V. (2007) 'Disaccharides, Oligosaccharides and Polysaccharides', in

- Carbohydrates*, pp. 213–222. doi: 10.1016/b978-012670960-5/50011-x.
- Sucrose, D-Fructose and D-Glucose assay procedure K-Surfg 04/18* (2018). Available at: www.megazyme.com (Accessed: 8 March 2019).
- Vemulapalli, V. and Hosney, R. C. (1998) 'Glucose Oxidase Effects on Gluten and Water Solubles', *Cereal Chemistry Journal*, 75(6), pp. 859–862. doi: 10.1094/cchem.1998.75.6.859.
- Vieira, A. R. *et al.* (2017) 'Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project', *Annals of Oncology*, 28(8), pp. 1788–1802. doi: 10.1093/annonc/mdx171.
- Volpini-Rapina, L. F., Sokei, F. R. and Conti-Silva, A. C. (2012) 'Sensory profile and preference mapping of orange cakes with addition of prebiotics inulin and oligofructose', *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier, 48(1), pp. 37–42. doi: 10.1016/j.lwt.2012.03.008.
- WHO (2015) 'Guideline: Sugars intake for adults and children', *Who*, (March), pp. 1–48. doi: 978 92 4 154902 8.
- Witt, S. *et al.* (2000) 'Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose.', *The Biochemical Journal*, 347(Pt 2), pp. 553–9.
- World Health Organization (2015) *Guideline: Sugars intake for adults and children*, *World Health Organisation -WHO*. doi: 978 92 4 154902 8.
- Xi, B. *et al.* (2014) 'Intake of Fruit Juice and Incidence of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis', *PLOS One*, 9(3), p. e93471. doi: 10.1371/journal.pone.0093471.
- Yun, J. W. (1996) 'Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application', *Enzyme and Microbial Technology*, 0229(95), pp. 107–117. doi: 10.1016/0141-0229(95)00188-3.