



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Schützen Haselnüsse, Erdnüsse und Pekannüsse vor
oxidativer Schädigung im *Salmonella typhimurium* TA102?

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin/Verfasser:	Christa Eiserloh
Matrikel-Nummer:	9805041
Studienrichtung (lt. Studien- blatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuerin/Betreuer:	o.Univ.-Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien

Wien, am

Danksagung

Diese Diplomarbeit entstand am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien.

Ich möchte mich besonders bei o.Univ.-Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Bettina Isnardy für Ihre große Unterstützung und die kompetente Beratung, welche wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank auch an meine Kollegin, Sabine Mollay für die gute Zusammenarbeit im Labor, sowie an meine Studienkolleginnen Nicole Gerhardter und Uta Carstanjen für ihre tatkräftige Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich noch bei meinen Eltern sowie meinem Mann und meiner Tochter bedanken, die mich immer unterstützt haben und viel Verständnis für die Abende im Labor hatten.

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
1 Einleitung und Fragestellung.....	11
2 Literaturübersicht.....	12
2.1 Nüsse.....	12
2.2 Zusammensetzung.....	13
2.2.1 Erdnüsse	14
2.2.2 Haselnüsse	14
2.2.3 Pekannüsse	15
2.3 Fettsäurezusammensetzung und ihre Wirkung.....	16
2.4 Tocopherole.....	20
2.5 Proteine.....	22
2.6 Kohlenhydrate.....	23
2.6.1 Ballaststoffe	23
2.7 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	24
2.8 Phytochemikalien.....	25
2.8.1 Polyphenole	25
2.8.2 Tannine	25
2.8.3 Flavonoide	26
2.9 Allergene Inhaltsstoffe.....	28

3	Material und Methoden.....	31
3.1	Herkunft der Nüsse.....	31
3.1.1	Erdnuss	31
3.1.2	Haselnuss	32
3.1.3	Pekannuss	33
3.2	Herstellen der Nussextrakte.....	34
3.3	AMES Test.....	36
3.3.1	Chemikalien, Medien und Platten	36
3.3.1.1	Herstellen der Lösungen	38
3.3.1.2	Herstellen der Platten	39
3.3.1.3	Frozen Permanents	42
3.3.1.4	Herstellen der Overnight Culture	43
3.3.1.5	Herstellen des Top Agars	44
3.4	Durchführung des AMES Test.....	44
3.4.1	Kontrollen	45
3.4.1.1	Negativkontrolle	45
3.4.1.2	Positivkontrolle	45
3.4.1.3	Kontrollprobe	46
3.4.1.4	Herstellung weiterer benötigter Lösungen und Mutagene	46
3.4.2	Testablauf	48
3.4.2.1	Testdesign des Standard-Platten-Inkorporationstest	49
3.4.2.2	Testdesign des Präinkubationstest	50
3.5	Statistische Auswertung.....	51
4	Ergebnisse und Diskussion.....	52
4.1	Nussextrakte.....	52

4.2	Der antioxidative Test.....	53
4.2.1	Standard-Platten-Inkorporationstest mit H ₂ O ₂ als Mutagen	54
4.2.2	Präinkubationstest ohne metabolische Aktivierung mit H ₂ O ₂ als Mutagen	56
4.2.3	Präinkubationstest mit H ₂ O ₂ mit metabolischer Aktivierung	58
4.2.4	Standard-Platten-Inkorporationstest mit tBOOH als Mutagen	60
4.2.5	Präinkubationstest ohne metabolische Aktivierung mit tBOOH als Mutagen	62
4.2.6	Präinkubationstest mit tBOOH mit metabolischer Aktivierung	64
4.2.7	Signifikanzen innerhalb des t-Tests	66
5	Diskussion.....	67
5.1	Diskussion der Ergebnisse.....	67
5.1.1	Erdnüsse und ihr antioxidative Potential	68
5.1.2	Haselnüsse und ihr antioxidatives Potential	69
5.1.3	Pekannüsse und ihr antioxidatives Potential	70
6	Schlussbetrachtung.....	72
7	Zusammenfassung.....	76
8	Summary.....	77
9	Literaturverzeichnis.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Tocopherol.....	20
Abb. 2: Hydrolyse von Ellagtanninen.....	26
Abb. 3: Erdnuss mit und ohne Schale (Quelle: www.heilfasten.de).....	31
Abb. 4: Haselnuss (Quelle: www.wikipedia.at).....	32
Abb. 5: Pekannuss (Quelle: www.exquisine.de).....	33
Abb. 6: fertig abgefüllte Proben.....	35
Abb. 7: bereitgestellte Platten zum Gießen.....	41
Abb. 8: Gießen von Glucose-Minimal-Agar-Platten.....	41
Abb. 9: Inkubation der Overnight Culture für 12 Stunden auf dem Rüttler im Brutschrank.....	44
Abb. 10: Laminar Flow für den Test hergerichtet.....	48
Abb. 11: Cupständer mit Cups für den Test vorbereitet.....	48
Abb. 12: für den Test bereitgestellte Epruvetten.....	48
Abb. 13: Standard-Platten-Inkorporationstest – Überblick über die Durchführung [Mortelsmann, Zeiger, 2000].....	49
Abb. 14: Inkubierte Platte mit teilweise markierten Revertanten auf der Rückseite.....	50
Abb. 15: Präinkubationstest – Überblick der Durchführung [modifiziert nach Göggelmann, 1993].....	50
Abb. 16: Standard-Platten-Inkorporationstest mit H ₂ O ₂ und ungekochten Extrakten.....	54
Abb. 17: Standard-Platten-Inkorporationstest mit H ₂ O ₂ und gekochten Extrakten.....	54

Abb. 18: Präinkubationstest mit H ₂ O ₂ und ungekochten Extrakten.....	56
Abb. 19: Präinkubationstest mit H ₂ O ₂ und gekochten Extrakten.....	57
Abb. 20: S9-Test mit H ₂ O ₂ mit metabolischer Aktivierung und ungekochten Extrakten.....	58
Abb. 21: S9-Test mit H ₂ O ₂ mit metabolischer Aktivierung und gekochten Extrakten.....	59
Abb. 22: Standard-Platten-Inkorporationstest mit tBOOH und ungekochten Extrakten.....	60
Abb. 23: Standard-Platten-Inkorporationstest mit tBOOH und gekochten Extrakten.....	60
Abb. 24: Präinkubationstest mit tBOOH und ungekochten Proben.....	62
Abb. 25: Präinkubationstest mit tBOOH und gekochten Proben.....	62
Abb. 26: S9-Test mit tBOOH mit metabolischer Aktivierung und ungekochten Extrakten.....	64
Abb. 27: S9-Test mit tBOOH mit metabolischer Aktivierung und gekochten Extrakten.....	64

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe von Erdnüssen.....	14
Tab. 2: Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe von Haselnüssen.....	15
Tab. 3: Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe von Pekannüssen.....	16
Tab. 4: Herstellerdaten und Beurteilung der Erdnuss.....	31
Tab. 5: Herstellerdaten und Beurteilung der Haselnuss.....	32
Tab. 6: Herstellerdaten und Beurteilung der Pekannuss.....	33
Tab. 7: Herkunft und Verwendung der Chemikalien und Medien.....	36
Tab. 8: benötigte Platten für die genetische Analyse.....	39
Tab. 9: Menge der benötigten Lösungen für die Herstellung von Masterplates.....	42
Tab. 10: Zusammensetzung der Negativkontrolle.....	45
Tab. 11: Zusammensetzung der Positivkontrolle.....	46
Tab. 12: Zusammensetzung der Kontrollprobe.....	46
Tab. 13: Übersicht über die benötigten Reagenzien zur Herstellung des S9- Mixes.....	47
Tab. 14: Signifikanzen innerhalb des t-Tests im Vergleich zur Positivkontrolle, ungekochte Proben.....	66
Tab. 15: Signifikanzen innerhalb des t-Tests im Vergleich zur Positivkontrolle, gekochte Proben.....	66

1 Einleitung und Fragestellung

Nüsse gehören zum Hartschalenobst und sind ein Teil der menschlichen Ernährung. Wegen ihres hohen Fettgehaltes werden Nüsse oft fälschlicherweise als schlecht bezeichnet. Es gibt jedoch sehr viele Studien, die belegen, dass Nüsse durch ihre besondere Zusammensetzung der Fettsäuren, sowie auch durch andere Inhaltsstoffe durchwegs positive Einflüsse auf die Gesundheit des Menschen haben können. Epidemiologische Studien zeigen unter anderem einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Nüssen und der Senkung des Risikos von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Allerdings ist bis heute unklar, welche Inhaltsstoffe dafür verantwortlich sind. Der hohe Anteil an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren und der geringe Anteil an gesättigten Fettsäuren dürften jedenfalls einen wichtigen Beitrag leisten. Zu erwähnen ist auch, dass Nüsse ebenfalls eine gute Quelle für Ballaststoffe, Antioxidantien, pflanzliche Proteine, Vitamine, Mineralstoffe und verschiedene bioaktive Substanzen sind, welche ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der Gesundheit liefern.

Der AMES Test ist eine einfache und rasche Methode, um mutagene aber auch antimutagene Wirkung von Substanzen zu ermitteln.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Nüssen sowohl in roher als auch in gekochter Form im AMES Test zu testen und zu vergleichen. Es wurden Erdnüsse, Haselnüsse und Pekannüsse in ihrer lipophilen und hydrophilen Phase im Test verwendet. Außerdem wurden die beiden Phasen in einem Phasengemisch in drei verschiedenen Konzentrationen getestet. Die Nüsse wurden extrahiert und die daraus entstehenden Extrakte wurden im AMES Test eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden Mutagene verwendet, die über oxidative Mechanismen genotoxisch wirken. Zum Einsatz kam der *Salmonella typhimurium* Stamm TA102, da dieser besonders empfindlich auf oxidative DNA-Schädigung reagiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Nüsse

Bei Nüssen handelt es sich im botanischen Sinne um Schließfrüchte mit harter, holzartig entwickelter Fruchtknotenwand. Im allgemeinen Sprachgebrauch und nach handelsüblicher Auffassung spricht man aber von Samen, die von einer festen Schale umgeben sind, die botanisch nicht unbedingt Nüsse darstellen müssen. Botanisch gesehen ist z.B. die Erdnuss eine Hülsenfrucht, während es sich bei Kokos-, Walnuss und Mandel um Steinfrüchte handelt.

Nach dem Lebensmittelrecht dürfen nur Hasel- und Walnuss als „Nuss“ bezeichnet werden. Alle anderen Nüsse müssen mit ihrem vollständigen Namen bezeichnet werden.

Die Saison für ungeschälte Nüsse ist das letzte Jahresviertel, geschälte Nüsse sind jedoch das ganze Jahr im Handel erhältlich.

Nüsse sind sehr anfällig für Schimmelbefall und durch ihren hohen Fettgehalt kommt es leicht zur Fettoxidation. Im Handel sind Nüsse zum großen Teil roh, geröstet, gesalzen oder auch als Zutat für die Herstellung von Müsli, Back- und Süßwaren erhältlich. Außerdem dienen Nüsse zur Herstellung von Speisefetten und Speiseölen, sowie als Rohstoffe zur Kosmetikherstellung [LEXIKON DER ERNÄHRUNG, 2002].

Nüsse sind ein Teil einer pflanzlich betonten Ernährungsweise und können ernährungsbedingten Erkrankungen positiv entgegen wirken [BUB und STRACKE, 2005].

Epidemiologische Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass bei regelmäßigem Nussverzehr das Risiko einer Herz-Kreislaufkrankung abnimmt. Klinische Studien führen diesen positiven Effekt teilweise oder vollständig auf die Senkung des Gesamtcholesterin- und des LDL-Cholesterinspiegels zurück. Allerdings konnte nicht genau geklärt werden, welche Inhaltsstoffe dafür verantwortlich sind. Die günstige Fettsäurezusammensetzung dürfte jedenfalls eine wichtige Rolle dabei spielen [DIEHL, 2001].

Nüsse gelten traditionell als Lebensmittel mit hoher Nährstoffdichte. Sie weisen einen hohen Fettgehalt auf und sind eine der wichtigsten Quellen für Ballaststoffe, außerdem sind sie ein guter Lieferant von pflanzlichen Proteinen, Antioxidantien, Vitaminen, Mineralstoffen und verschiedenen bioaktiven Substanzen, wie Flavonoiden und Phytosterolen, welche ebenfalls gesundheitsfördernde Wirkungen besitzen. Ein täglicher Konsum von geringen Mengen an Nüssen hat bereits eine Schutzwirkung gegenüber Herzinfarkt [GARCIA-LORDA et al., 2003].

Studien zeigten, dass Nüsse einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Baumnüsse und Erdnüsse einen Einfluss auf Plasmalipide und Lipoproteine haben. Sie reduzieren unter anderem das Gesamtcholesterin, das LDL-Cholesterin, sowie den Triglyzeridwert, ohne jedoch den Gehalt an HDL zu reduzieren [GRIEL et al., 2004].

Durch die Iowa Women's Health Study konnte der positive Effekt von Nüssen ebenfalls belegt werden. Der Nussverzehr von 34.000 Frauen wurde über sieben Jahre hinweg beobachtet. 242 Frauen starben infolge eines Herzinfarkts. Beim Vergleich der Gruppe, die weniger als 1x pro Woche Nüsse verzehrten, mit jener deren Nusskonsum bei mehr als 4x pro Woche lag, war das Herzinfarkt-Risiko bei der Gruppe mit dem höheren Nussverzehr um 40% vermindert [DIEHL, 2001].

2.2 Zusammensetzung

Gemeinsam ist den Nüssen ein hoher Fettgehalt zwischen 35% und bis zu über 70%. Die Zusammensetzung der Fettsäuren ist bei verschiedenen Nusssorten unterschiedlich. So sind z.B. Haselnüsse und Pekannüsse durch ein günstiges Verhältnis von einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu den gesättigten Fettsäuren charakterisiert. Besonders hoch ist auch der Gehalt an der gesundheitsfördernden α -Linolensäure. Weiters stellen Nüsse eine gute Quelle für Vitamin E, Folat, Niacin, Eisen, Calcium, Magnesium, Kalium, Ballaststoffe und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dar [DGE AKTUELL, 2002].

2.2.1 Erdnüsse

Erdnüsse gehören botanisch gesehen zur Familie der Leguminosae und morphologisch gesehen zu den Nussfrüchten.

Einen genauen Überblick über die wichtigsten Nährstoffkomponenten von Erdnüssen gibt Tabelle 1 [SCHERZ und SENER, 1994].

Erdnuss (je 100 g verzehrbare Anteil)			
Energie		2349,88 kJoule	
Hauptnährstoffe		Mineralstoffe	
Wasser	5,21 g	Natrium	10,96 mg
Protein	25,25 g	Kalium	661 mg
Fett	48,10 g	Calcium	40,43 mg
Kohlenhydrate (verwertbar)	8,29 g	Magnesium	160 ,g
Ballaststoffe	10,93 g	Eisen	1,82 mg
		Phosphor	341 mg
Vitamine		Fettsäuren	
Vitamin A	333,33 ng	Palmitinsäure	5,10 g
Vitamin E	10,96 mg	Stearinsäure	1,3 g
Vitamin B1	900µg	Arachidonsäure	560 mg
Vitamin B2	155 µg	Ölsäure	22,10 g
Niacin	15,31 mg	Linolsäure	13,90 g
Pantothensäure	2,7 mg	Linolensäure	530 mg
Vitamin B6	440 µg		
Biotin	34 µg		
Folsäure	169 µg		

Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe von Erdnüssen

2.2.2 Haselnüsse

Haselnüsse sind aus morphologischer Sicht, genauso wie Erdnüsse, Nussfrüchte und botanisch gesehen, gehören sie zur Familie der Betulaceae. Die Haselnuss ist weltweit eine der wichtigsten Nusssorten und ist die bei der Nussproduktion am zweithäufigsten verwendete Nuss. Die Region um das

Schwarze Meer ist das wichtigste Haselnuss-Produktionsgebiet.

Typischerweise wird die Haselnuss als ganze Nuss konsumiert entweder in roher Form oder geröstet. Außerdem wird sie gerne beim Backen und bei der Süßwarenproduktion verwendet [SHAHIDI et al., 2007].

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der Haselnuss [SCHERZ und SENER, 1994].

Haselnuss (je 100 g verzehrbare Anteil)			
Energie		2261,70 kJoule	
Hauptnährstoffe		Mineralstoffe	
Wasser	5,24 g	Natrium	2 mg
Protein	11,96 g	Kalium	636 mg
Fett	61,60 g	Calcium	226 mg
Kohlenhydrate (verwertbar)	10,54 g	Magnesium	156 mg
Ballaststoffe	8,22 g	Eisen	3,80 mg
		Phosphor	333 mg
Vitamine		Fettsäuren	
Vitamin E	26,29 mg	Myristicinsäure	150 mg
Vitamin B1	390 µg	Palmitinsäure	3 g
Vitamin B2	210 µg	Stearinsäure	1,10 g
Niacin	1,35 mg	Arachidonsäure	110 mg
Pantothensäure	1,15 mg	Palmitoleinsäure	160 mg
Vitamin B6	313 µg	Ölsäure	47,40 g
Vitamin K	9 µg	Linolensäure	6,30 g
Folsäure	71 µg	Linolensäure	150 mg
Vitamin C	3 mg		

Tabelle 2: Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe von Haselnüssen

2.2.3 Pekannüsse

Pekannüsse gehören zu den Steinfrüchten und botanisch gesehen zur Familie der Juglandaceae.

Die Zusammensetzung von Pekannüssen kann Tabelle 3 entnommen werden. [SCHERZ und SENER, 1994]

Pekannuss (je 100 g verzehrbarer Anteil)			
Energie		2897,58 kJoule	
Hauptnährstoffe		Mineralstoffe	
Wasser	3,20 g	Natrium	3 mg
Protein	9,30 g	Kalium	604 mg
Fett	72 g	Calcium	73 mg
Kohlenhydrate (verwertbar)	4,44 g	Magnesium	142 mg
Ballaststoffe	9,46 g	Eisen	2,40 mg
		Phosphor	290 mg
Vitamine		Fettsäuren	
Vitamin A	13,33 µg		
Vitamin E	3,06 mg	Palmitinsäure	4,20 g
Vitamin K	10 µg	Stearinsäure	1,90 g
Vitamin B1	860 µg	Palmitoleinsäure	210 mg
Vitamin B2	130 µg	Ölsäure	42,60g
Niacin	2 mg	Linolsäure	16,90 g
Vitamin C	2 mg	Linolensäure	850 mg

Tabelle 3: Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe von Pekannüssen

2.3 Fettsäurezusammensetzung und ihre Wirkung

Studien zeigen, dass gesättigte Fettsäuren den Gesamt-Lipoprotein-Gehalt und den LDL-Wert erhöhen, während n-6 Fettsäuren den Cholesteringehalt senken können. Langkettige n-3 Fettsäuren senken den Triglyceridgehalt und Transfettsäuren erhöhen den Cholesteringehalt. Epidemiologische Studien zeigen, dass gesättigte Fettsäuren in Zusammenhang mit einem erhöhten Herzinfarkttrisiko stehen. Die größte Risikoreduktion konnte durch die Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren beobachtet werden. Aber auch einfach ungesättigte Fettsäuren können einen geringen Beitrag leisten, das Risiko eines Infarktes zu senken. Sowohl n-6 (Linolsäure) und n-3 (α-Linolensäure) Fettsäuren haben einen präventiven Effekt [AHA Scientific Statement, 2001].

Aufgrund ihres hohen Fettanteils galten Nüsse lange Zeit als reine Energielieferanten. Sie wurden aus ernährungsphysiologischer Sicht deshalb auch sehr schlecht bewertet. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Studien, die diese negative Bewertung widerlegen. Heute sind Nüsse ein integraler Bestandteil einer gesunden Ernährung. Sowohl die DGE, als auch z.B. die Amerikanische Herzgesellschaft haben Nüsse in ihre Ernährungsempfehlungen aufgenommen. Wie zahlreiche Studien belegen, können Nüsse aufgrund ihrer Inhaltsstoffe zahlreichen Erkrankungen entgegen wirken [BUB und STRACKE, 2005].

Nüsse weisen eine für den Menschen günstige Fettsäurezusammensetzung auf. Der Fettgehalt beträgt etwa zwischen 45 und 75%. Sie enthalten einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren und nur eine geringe Menge an gesättigten Fettsäuren. So besteht der Fettanteil von Haselnüssen zu etwa 14% aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (n-6), 78% einfach ungesättigten Fettsäuren und ca. 8% gesättigten Fettsäuren. Pekannüsse weisen einen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von ca. 39% auf, der sich wiederum aus ca. 37% n-6 und 2% n-3 Fettsäuren zusammensetzt. Der Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren liegt bei etwa 52% und der Anteil an gesättigten Fettsäuren bei 9%. Der Fettanteil von Erdnüssen setzt sich aus etwa 35% mehrfach ungesättigten Fettsäuren (n-6), 50% einfach ungesättigten und 8% gesättigten Fettsäuren zusammen [MUKUDDER-PETTERSEN et al., 2005].

Studien konnten nachweisen, dass diese günstige Fettsäurezusammensetzung viele verschiedene positive Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben kann. So wurde in einer Studie getestet, welche Auswirkungen der Verzehr von Nüssen auf die Entstehung von Gallensteinen hat. Hohe Plasma-Triacylglycerin-Werte und niedrige HDL-Werte stehen in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Gallensteinen. Da Nüsse reich an Inhaltsstoffen sind, welche positive Wirkung auf die Blut-Cholesterin- und Lipoprotein-Werte haben, und außerdem auch noch reich an Ballaststoffen sind, können sie in weiterer Folge präventive Wirkung gegenüber Gallensteinen haben. Häufiger Verzehr von Nüssen war verbunden mit einer geringeren

Kohlenhydrat-Aufnahme und einer höheren Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Ballaststoffen [TSAI et al., 2004].

Außerdem wurde in Studien untersucht, wie sich dieser hohe Fettanteil von Nüssen auf das Körpergewicht auswirkt. Epidemiologische Studien und Interventionsstudien zeigen, dass ein regelmäßiger Nusskonsum nicht zu einer Erhöhung des BMI führt. Das konnte z.B. durch die Adventist Health Study oder auch durch die Nurses Health Study gezeigt werden [BUB, Stracke 2005].

Garcia-Lorda et al. [2003] gibt in ihrem Bericht eine zusammenfassende Darstellung zu Interventionsstudien mit Nüssen in Bezug auf den BMI. Lediglich eine dieser zahlreichen Studien zeigte eine negative Auswirkung bezüglich des Körpergewichtes. In dieser Studie nahmen normalgewichtige Probanden täglich 100 g Nüsse über vier Wochen lang zu sich. Dadurch kam es zu einer signifikanten Erhöhung des Körpergewichtes gegenüber der Kontrollgruppe. Alle anderen Studien kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass ein regelmäßiger und täglicher Nussverzehr zu keiner Erhöhung des Körpergewichtes beiträgt. Teilweise wurde bei Personen, die regelmäßig Nüsse essen, sogar ein niedrigerer BMI bemerkt. Allerdings wurde in diesen Studien nicht speziell das Körpergewicht beobachtet, was es schwierig macht, diese Studien allgemein zu bewerten. Lediglich in einer Studie wurde speziell die Wirkung von Nüssen auf das Körpergewicht untersucht. Aber auch hier konnte keine signifikante Änderung des Körpergewichtes erkannt werden. Lediglich in der Gruppe der Personen mit einem BMI an der Grenze zum Untergewicht konnte ein leichter Gewichtsanstieg festgestellt werden. Bei der Gruppe der übergewichtigen Probanden konnte dafür wieder eine leichte Abnahme des Gewichtes festgestellt werden.

Bis jetzt ist noch nicht genau geklärt, wieso es zu keiner Erhöhung des Körpergewichtes kommt. Es wird jedoch angenommen, dass die Absorption der Energie aus Nüssen unvollständig ist. So konnte bei einer Gruppe von gesunden Probanden festgestellt werden, dass sie bei einer täglichen

Aufnahme von 76 g Erdnüssen, davon wieder 18% der Ballaststoffe mit dem Harn ausscheiden und auch der Stuhl enthielt kleine Nussstücke, welche nicht verdaut wurden. Dieses Phänomen konnte sowohl bei ballaststoffreichen sowie ballaststoffarmen Diäten beobachtet werden [GARCIA-LORDA, et. al., 2003].

Studien zeigten, dass die Art der Ernährung eine sehr wichtige präventive Maßnahme für Typ 2 Diabetes darstellt. Nüsse, mit ihrem hohen Anteil an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, haben einen positiven Effekt auf das Glucose- und Insulin-Gleichgewicht. So ist eine hohe Aufnahme an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren förderlich für die Insulinsensitivität. Durch diese höhere Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ergibt sich ein niedrigeres Risiko für Typ 2 Diabetes, während eine hohe Aufnahme von gesättigten- und Trans-Fettsäuren das Risiko, an Typ 2 Diabetes zu erkranken, deutlich erhöht. Andere Inhaltsstoffe von Nüssen, wie z.B. Vitamine, Antioxidantien, Mineralstoffen und pflanzliche Proteine tragen ebenfalls zur Senkung des Risikos, an Typ 2 Diabetes zu erkranken, bei. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in einer Studie an Frauen von der Nurses's Health Study der Zusammenhang des Nussverzehres und des Erkrankungsrisikos untersucht. Dafür wurden die Frauen in vier Gruppen bezüglich ihres Nusskonsums eingeteilt: nie/sehr selten, weniger als 1x in der Woche (1-3x/Monat), 1-4x pro Woche und 5x pro Woche. Jene Gruppe, deren Nusskonsum bei 5x pro Woche lag, hatten ein geringeres Risiko für Typ 2 Diabetes als jene, die nur sehr selten Nüsse aßen. Auch der häufige Verzehr von Erdnussbutter war assoziiert mit einem niedrigerem Krankheitsrisiko. Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass häufiger Verzehr von Nüssen oder Erdnussbutter das Krankheitsrisiko für Typ 2 Diabetes senkt, unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren, wie Alter, Übergewicht, familiäre Vorbelastung oder Rauchen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass jene Frauen, die mehrmals pro Woche Nüsse zu sich nahmen, auch mehr Früchte und Gemüse aßen und generell weniger Fleisch und raffinierte Getreideprodukte zu sich nahmen [JIANG et. al., 2002].

MIRALIAKBARI und SHAHAIDI [2008] untersuchten in ihrer Studie Nussöle hinsichtlich ihres Lipid-, Tocopherol- und Sterolgehaltes. Dazu wurden frische rohe Nüsse mit Chloroform/Methanol extrahiert. In allen Proben war Ölsäure die dominante Fettsäure mit Ausnahme von Pinienkern- und Walnussöl, wo Linolsäure die vorherrschende Fettsäure war. Haselnüsse hatten mit etwa 83,3% den höchsten Gehalt an Ölsäure. Es wurde in den Proben außerdem Triacylglycerole, Sterole und Sterolester gefunden. Kohlenwasserstoffe oder freie Fettsäuren konnten nicht nachgewiesen werden. Bei Pistazien und Pekannüssen wurde der geringste Gehalt an Triacylglycerol gemessen. Sterolester wurden generell nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen.

Studien haben gezeigt, dass regelmäßiger Nussverzehr den Gesamtcholesterin-Wert, sowie den LDL- und Triacylglycerid-Wert senkt, ohne jedoch den LDL-Wert zu reduzieren [GRIEL et. al., 2004].

2.4 Tocopherol

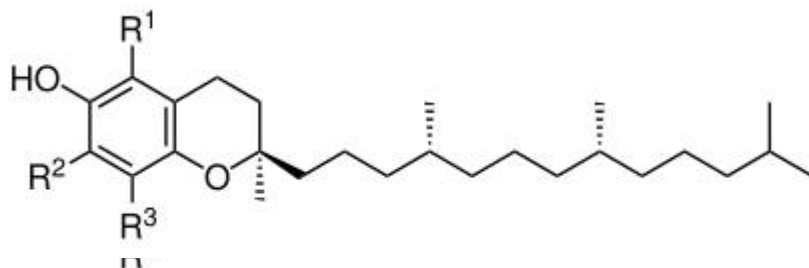


Abbildung 1: Strukturformel von Tocopherol

Zu den wichtigsten Gruppen der natürlichen Antioxidantien gehören Tocopherole, Flavonoide und Phenolsäuren. Tocopherole gehören zu den am häufigsten verwendeten Antioxidantien. Sie können klassifiziert werden als Tocopherole (Toc) und als Tocotriene (Toc-3). Innerhalb dieser zwei Klassen gibt es wiederum vier Isomere (α -, β -, γ - und δ -). Diese insgesamt acht Isomere

sind in vielen Lebensmitteln enthalten. Das wichtigste Antioxidant dieser Gruppe ist das α -Tocopherol [PORKORNY et al., 2001].

Die biologische Wirksamkeit der Tocopherole ist abhängig von der Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Ringsystem. Mit abnehmender Zahl der CH_3 -Gruppen am Benzolring nimmt die Wirksamkeit als Vitamin ab (α -, β -, γ - und δ -). In umgekehrter Reihenfolge verhalten sich die Tocopherole hinsichtlich ihrer Wirkung als Antioxidantien [ELMADFA und LEITZMANN, 1998].

Nüsse zeichnen sich durch einen hohen Tocopherolgehalt aus. Der Gehalt an α -Tocopherol ist besonders hoch in Haselnüssen (31,4 mg/100 g extrahiertes Öl), während der Gehalt an β - und γ -Tocopherol in Erdnüssen und Pekannüssen sehr hoch ist. Spuren von δ -Tocopherol (<4 mg/100 g extrahiertes Öl) wurden in Haselnüssen, Erdnüssen und Pekannüssen gefunden. Nüsse sind daher eine gute Quelle für α -, β - und γ -Tocopherol. Sie können wesentlich zu einer ausreichenden Zufuhr an Vitamin E beitragen [KORNSTEINER et al., 2006].

GAO et al. [2005] untersuchten in einer Studie, wie hoch die aufgenommene Menge an α -Tocopherol in verschiedenen Diäten ist. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine vermehrte Zufuhr von Nüssen auch mit einer höheren Aufnahme von α -Tocopherol in Verbindung stand, während es hingegen bei einem geringen Verzehr von Nüssen zu einer unzureichenden Aufnahme von α -Tocopherol kam. Wobei aber wieder berücksichtigt werden muss, dass die einzelnen Nusssorten einen sehr unterschiedlichen Tocopherolgehalt aufweisen. So haben z.B. Haselnüsse einen relativ hohen Gehalt an Vitamin E, während im Vergleich dazu der Gehalt an Vitamin E in Erdnüssen eher niedrig ist. In dieser Studie konnte auch festgestellt werden, dass eine hohe α -Tocopherol Aufnahme in Verbindung mit einem niedrigeren Risiko an Diabetes Typ 2, Bluthochdruck, Krebs, Alzheimer oder an einem Herzleiden zu erkranken, steht.

Bei einer Untersuchung von Nussölen wurde festgestellt, dass Öle, die mit Chloroform/Methanol extrahiert wurden, einen höheren Gehalt an Tocopherol

aufweisen als bei einer Extraktion mit Hexan . Haselnussöl hatte den höchsten Tocopherol-Gehalt (462-508 mg/kg Öl) gefolgt von Pekanöl (454-490 mg/kg). α -Tocopherol war dominierend in Haselnussöl (382-472 mg/kg), während in Pekanöl γ -Tocopherol (176 mg/kg) den höchsten Gehalt aufwies. Diese Werte decken sich mit jenen, die in der Literatur gefunden wurden. Außerdem ist in den Nussölen die jeweils gleiche Tocopherol-Art dominant wie in rohen Nüssen, was bereits erwähnt wurde [MIRALIAKBARI und SHAHIDI, 2008].

2.5 Proteine

Nüsse haben einen relativ hohen Proteingehalt, was sie zu einer guten Quelle für die Aufnahme von pflanzlichem Protein macht. Den höchsten Gehalt an Proteinen haben Erdnüsse, Walnüsse, Mandeln, Pistazien und Cashewnüsse, gefolgt von Paranüssen, Haselnüssen und Pinienkernen. Pekannüsse und Macadamianüsse haben verglichen mit den vorher erwähnten, einen eher geringeren Proteingehalt. Nüsse haben außerdem ein niedriges Lysin:Arginin Verhältnis, welches das Risiko der Entstehung von Hypercholesterolemie und Atherosklerose senkt. Haselnüsse, Pinienkerne und Walnüsse haben das niedrigste Lysin zu Arginin Verhältnis. Das Verhältnis ist bei pflanzlichem Protein generell niedriger als bei tierischem [BRUFAU et al. 2006].

In der von VENKATACHALAM und SATHE [2006] durchgeführten Studie, war der Proteingehalt von Pekannüssen im Vergleich mit den anderen Nüssen mit 7,5% am niedrigsten. Der Proteingehalt von Haselnüssen war mit 14,08% etwa doppelt so hoch. Am höchsten war der Gehalt bei Erdnüssen mit 21,56%.

Verglichen mit den Empfehlungen der FAO/WHO bezüglich der Aufnahme von essentiellen Aminosäuren, hatten nur Mandeln und Erdnüsse einen mangelhaften Gehalt an Schwefel-Aminosäuren (Met + Cys). Alle anderen Nüsse hatten einen adäquaten Gehalt an allen essentiellen Aminosäuren. Alle untersuchten Nussproben erwiesen sich als eine gute Quelle für Arginin. Dieser hohe Arginingehalt gekoppelt mit den einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren verstärkt die positive Wirkung von Nüssen auf die Gesundheit. Allerdings steht die gesundheitsfördernde Wirkung der in Nüssen enthaltenen

Aminosäuren wieder in engem Zusammenhang mit den restlichen Inhaltsstoffen wie Ballaststoffe, Mineralstoffe, Vitamine und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.

Der Threoningehalt in Nüssen liegt etwa zwischen 24 und 40 mg/g Protein. Nüsse haben aber nur einen niedrigen Gehalt an Isoleucin (32-40 mg/g Protein). Der Leucin-Gehalt liegt bei etwa 86mg/g Protein. Pistazien und Pekannüsse haben mit etwa 65mg/g Protein den niedrigsten Gehalt an Leucin. Die dibasische Aminosäure Lysin kommt in den meisten Nüssen nur in sehr geringen Mengen vor. Außerdem kommen die schwefelhaltigen Aminosäuren auch nur in sehr geringen Mengen vor. Andere Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tyrosin kommen in beachtlichen Mengen vor. Nüsse sind auch eine gute Quelle für Valin. Allgemein kann man sagen, dass der Histidinegehalt in allen Nüssen sehr hoch ist. Wenn man das gesamte Aminosäure-Profil von Nüssen betrachtet, sieht man, dass Nüsse eine ideale Quelle sind, da alle essentiellen Aminosäuren in mehr oder weniger großen Mengen enthalten sind. Nüsse sind daher die ideale Ergänzung zu anderen proteinhaltigen Lebensmitteln. Außerdem wirkt sich die Aufnahme von pflanzlichen Proteinen positiv auf das Herz-Kreislauf-System aus verglichen mit der Aufnahme von tierischen Proteinen [BRUFAU et al., 2006].

2.6 Kohlenhydrate

Der angegebene Kohlenhydratgehalt in Nüssen variiert in den verschiedensten Studien, je nachdem, ob er bestimmt oder ausgerechnet wurde. Zu jenen Nüssen mit dem höchsten Gehalt an Kohlenhydraten gehören Cashewnüsse und Pistazien. Erdnüsse (16,1 g/100 g Probe), Pekannüsse (13,9 g/100g) und Haselnüsse (17 g/100 g) liegen mit ihrem Kohlenhydratgehalt verglichen mit den restlichen Nüssen im Mittelfeld [BRUFAU et al., 2003].

2.6.1 Ballaststoffe

Eine regelmäßige Aufnahme von Ballaststoffen wirkt sich positiv auf die Gesundheit aus. In den letzten Jahren wurden Studien durchgeführt, die zeigen,

dass Ballaststoffe das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen senken können. LAIRON et. al. wollte nun in ihrer Studie herausfinden, in welchem Bezug das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen mit den verschiedenen Arten von Ballaststoffen steht (gesamter Ballaststoffgehalt, lösliche und unlösliche Ballaststoffe). Außerdem soll in dieser Querschnittstudie gezeigt werden, welche Quellen von Ballaststoffen (Getreideprodukte, Hülsenfrüchte, Gemüse, frisches Obst, Trockenobst, Nüsse und Samen) eine besonders gesundheitsfördernde Wirkung haben. Dabei wurde festgestellt, dass sich eine erhöhte Ballaststoffaufnahme von Nüssen, Samen und Trockenfrüchten positiv auf den BMI und den „waist-to-hip ratio“ auswirkt. Ballaststoffe von Nüssen stehen außerdem in Verbindung mit einem verminderten Risiko einer erhöhten Apolipoprotein B- und Glucose-Konzentration. Weiters wurde noch festgestellt, dass unverdauliche Ballaststoffe wirkungsvoller sind [LAIRON, et al. 2005].

2.7 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Bei der Prävention von Krankheiten durch Lebensmittel spielen vor allem Komponenten aus dem Pflanzenreich eine wichtige Rolle. In erster Linie handelt es sich dabei um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Der Pflanze dienen sekundäre Pflanzenstoffe als Farb-, Abwehr- und Schutzstoffe sowie zur Wachstumsregulation. Bei sekundären Pflanzenstoffen handelt es sich um höchst heterogene Substanzen, welche in den Pflanzen nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Ihre Einteilung erfolgt im Wesentlichen aufgrund ihrer chemischen Struktur, aber auch nach ihren funktionellen Eigenschaften. Sekundären Pflanzenstoffen wird auch eine gesundheitsfördernde Wirkung nachgesagt. So können sie unter anderem das Krebsgeschehen beeinflussen. Phytosterine, eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen, kommen vorwiegend in fettreichen Pflanzenteilen vor wie in Samen oder Nüssen. Sie besitzen eine antikanzerogene und cholesterinsenkende Wirkung. Typische Vertreter der Phytosterine sind Campesterin, β -Sitosterin und Sigmasterin. Jedoch ist der Mechanismus des cholesterinsenkenden Effektes bis heute nicht vollständig geklärt. Vermutet wird, dass der Effekt auf einer Hemmung der Cholesterolabsorption beruht [Kunz und Schulz, 2004; Hahn et al., 2005].

2.8 Phytochemikalien

In Nüssen kommen Phytochemikalien im gebundenen und im ungebundenen Zustand vor. Die gebundene Form erreicht den Dickdarm unverdaut. Ungebundene Phytochemikalien können dazu beitragen, Komponenten zu erhalten, welche anschließend absorbiert werden können. Dazu werden sie von der Mikroflora modifiziert. Unabsorbierte Phytochemikalien können den Gastrointestinaltrakt schützen und helfen, der Krebsentstehung entgegenzusteuern. In Nüssen kommen vor allem Tannine und Flavonoide vor [Pellegrini et al., 2006].

2.8.1 Polyphenole

In den letzten Jahren wurde dem gesundheitsfördernden Effekt der Polyphenole immer mehr Beachtung geschenkt. Als Antioxidantien besitzen Polyphenole einen präventiven Effekt bezüglich oxidativer Schädigung. Außerdem bieten sie eine Schutzwirkung gegenüber der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Osteoporose, Diabetes mellitus und neurodegenerativen Erkrankungen. Polyphenole weisen eine sehr komplexe chemische Struktur auf [D'ARCHIVIO et al., 2007].

2.8.2. Tannine

Tannine kommen in zahlreichen pflanzlichen Lebensmitteln vor und können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die hydrolysierbaren und die kondensierten. Ellagtannine, welche unter anderem auch in Nüssen vorkommen, zählen zu der hydrolysierbaren Gruppe. In vivo und in vitro Studien haben gezeigt, dass Ellagtannine eine große biologische Aktivität besitzen und so antioxidativ, antiviral, antimutagen, antimikrobial und antitumor fördernd wirken können. Ellagtannine spielen daher in der menschlichen Ernährung eine wichtige Rolle. Allerdings ist die Bioaktivität von reinen Tanninen, nachdem sie mit der Nahrung aufgenommen wurden, nicht vollständig geklärt. Ellagsäure, dessen Stoffwechsel in früheren Studien bereits untersucht wurde, entsteht aus

Ellagtanninen durch Hydrolyse. Ellagsäure ist vor allem in Wal- und Pekannüssen reichlich vorhanden [ITO et al. 2008 und DEVIPRIYA et al., 2007].

Ellagtannine sind wasserlösliche phenolische Verbindungen mit einem hohen Molekulargewicht. Sie können Proteine und Alkaloide ausfällen. Bei Ellagtanninen handelt es sich um Ester der hexahydroxy-Diphenic-Säure. Die monomere Form kann in Pflanzen zu Dimeren, Trimeren und Tetrameren mit einem Molekulargewicht von bis zu 4000 oxidiert werden. Ellagtannine konnten in vielen Nüssen nachgewiesen werden. So wurden in Haselnussbäumen verschiedene Monomere, Di- und Trimere gefunden. Allerdings ist nicht bekannt, ob diese Verbindungen auch in der Nuss selbst enthalten sind.

Es gibt keine definierten Studien über die Absorption von Ellagtanninen und auch in Tierversuchen gibt es keine eindeutigen Untersuchungen bezüglich der Absorption der natürlichen Form. Allerdings gibt es klare Ergebnisse aus in vitro und in vivo Studien mit Tieren, dass die hexahydroxy-Diphenyl-Gruppen in den Ellagtanninen hydrolysiert werden können, wobei jedoch unklar ist, ob dafür der pH-Wert des Darms, oder die vorhandene Mikroflora verantwortlich ist [CLIFFORD and SCALBERT, 2000].

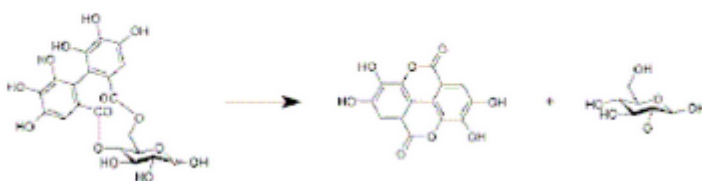


Abbildung 2: Hydrolyse von Ellagtanninen

2.8.3 Flavonoide

Flavonoide ist ein Sammelbegriff für über 5000 Verbindungen, welche bereits in den verschiedensten Pflanzen identifiziert werden konnten. Bei Flavonoiden handelt es sich um die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole. Es handelt sich um wasserlösliche Pflanzenfarbstoffe, welche im

Stoffwechsel der Pflanze eine wichtige Rolle spielen. Sie bestehen aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen und einem O-heterozyklischen Ring. Durch ihre strukturellen Unterschiede am C-Ring können Flavonoide in sechs Unterklassen eingeteilt werden:

- Flavonole: sie sind charakterisiert durch eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 und einer Hydroxylgruppe am C3. Flavonole sind die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Flavonoide. Beispiele für Flavonole sind Quercetin, Rutin, Kaempferol, Myricetin, Isorhamnetin
- Flavone: haben eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 und sind die am seltensten vorkommenden Flavonoide.
- Flavanone: z.B. Hesperetin, Naringenin, Eriodicytol
- Isoflavone: sie weisen eine Strukturähnlichkeit mit den Estrogenen auf und besitzen eine Hydroxylgruppe am C4 und C7. Isoflavone kommen vor allem in Leguminosen vor. Beispiele für diese Untergruppe sind Genistein und Daidzein.
- Anthocyanidine: hierbei handelt es sich um wasserlösliche Pigmente, welche für die rote, blaue und violette Farbe der meisten Pflanzen, Früchte und Blumen verantwortlich sind. Zu den Anthocyanidinen gehören z.B. Cyanidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin.
- Flavanole: z.B. Catechin, Gallocatechin, Epicatechin, Epigallocatechingallat, Theaflavin, Thearubigin [WATZL et. al., 2001 und HOLLMAN and ARTS, 2000].

Wirkung von Flavonoiden:

- die metabolische Aktivierung von Karzinogenen wird gehemmt
- Entgiftungsprozesse werden aktiviert
- antioxidative Eigenschaften
- das Zellwachstum wird verlangsamt
- Induktion von Apoptose
- Induktion der zellulären End-Differenzierung [GERHÄUSER, 2001]

Als in den 80er Jahren in einer Studie der Zusammenhang zw. einer hohen Aufnahme von Obst und Gemüse und einem verminderten Risiko für chronische Krankheiten gezeigt wurde, stieg auch das Interesse am Flavonoid-Gehalt verschiedener Lebensmittel deutlich an. So wurde eine Studie durchgeführt, in welcher der quantitative Gehalt an Flavonoiden in mehr als 60 Proben an frischem Obst, Gemüse und Nüssen gemessen wurde. Von jeder Sorte gab es jeweils fünf verschiedenen Proben. Das Ergebnis dieser Studie wurde mit zwei speziellen Datenbanken verglichen, welche von der „Nutrient Data Laboratory“ herausgegeben wurde: „the flavonoid database“ (FDB) und „proanthocyanidin database“ (PDB). Unterschiedliche Flavonoid-Gehalte können durch nicht-repräsentative Proben, unterschiedliche Sorten, unterschiedliche Anbauggebiete oder Messmethoden zustande kommen. Signifikante Unterschiede könnten meist auf unterschiedliche Anbauggebiete zurückzuführen sein. Umwelteinflüsse können ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf den Flavonoidgehalt haben. Es konnte belegt werden, dass der Flavonoidgehalt vom UV-Licht und CO₂-Gehalt abhängig ist. So ist es nicht überraschend, dass es bei gleichen Lebensmitteln aus verschiedenen Ländern große Unterschiede gibt [HARNLY et. al., 2006].

2.9 Allergene Inhaltsstoffe

Nüsse führen aufgrund ihrer Strukturverwandtschaft mit Pollen häufig zu allergischen Reaktionen. Meist treten enorale Symptome auf, es kann aber auch zu schweren anaphylaktischen Reaktionen kommen. Klinische Symptome die auftreten können, sind z.B. das orale Allergiesyndrom, akute Urtikaria, Bronchospasmen, sowie Nausea oder Erbrechen. Beim oralen Allergiesymptom kommt es zu Juckreiz mit Schwellungen der Lippen, der oralen Mukosa und des weichen Gaumens bei direktem Kontakt mit dem auslösenden Nahrungsmittel. Die Haselnussallergie ist eine der häufigsten Nahrungsmittelallergien. Die Allergene der Haselnuss weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit den Allergenen

frühblühender Baumpollen wie z.B. Birke, Hasel oder Erle auf [SENTI et al., 2000].

Obwohl Nüsse als ein äußerst gesundheitsförderndes Lebensmittel gelten, sind sie aber andererseits eines jener Nahrungsmittel, welche am häufigsten zu einer allergischen IgE-Antikörper-Reaktion führen. IgE-Antikörper-Antworten sind die am besten untersuchten Reaktionen auf Nahrungsmittel. Für ein geringeres Allergierisiko wird unter anderem auch empfohlen, im letzten Trimester einer Schwangerschaft sowie während der Stillzeit auf allergieauslösende Nahrungsmittel wie Nüsse zu verzichten.

Allerdings konnte bisher nur eine geringe Anzahl an Allergenen in den verschiedenen Nussarten identifiziert werden. Durch die Studie der rekombinierten Proteine der komplementären DNA-Stränge von Cashew-, Hasel-, Erd- und Walnüssen konnten wichtige Informationen bezüglich der Allergene gewonnen werden. So konnte festgestellt werden, dass die meisten Nussallergene Samenspeicherproteine sind wie z.B. Vicilin, Legumin und 2S Albumin.

Andere Allergene in Nüssen, wie Profilin oder „pathogenesis –related proteins“, werden wegen ihres Beitrags zu allergischen Reaktionen als Pan-Allergene bezeichnet. Sie kommen unter anderem in Pollen, Nüssen, Früchten und auch Gemüse vor. Profilin wurde erstmals als Allergen in Birkenpollen identifiziert. Heute sind sie als Kreuz-Allergene zwischen Pollen und Nahrungsmitteln bekannt. Haselnuss-Profilin ist in Haselnusspollen und auch in Haselnüssen enthalten und kann so allergene Reaktionen auslösen. Genauso kann auch Erdnuss-Profilin zu Kreuzreaktionen führen [CRESPO et al. 2006].

Bislang wurden verschiedene Haselnussallergene identifiziert. Cor a1.04 ist das Hauptallergen der Haselnuss. Es ist ebenso wie das Cor a2 (Profilin) ein pollen-assoziiertes Haselnussallergen. Es gibt aber auch Haselnussallergene, die keine Verwandtschaft mit Pollenallergenen aufweisen wie z.B. das Cor a 8 (Lipid-Transfer-Protein) und Cor a 9 (Legumin). Eine IgE-Antikörper-Antwort

kann aber auch durch Glykoproteine ausgelöst werden und zwar durch ihre N-Glykane [LAUER et al., 2004].

3 Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden Erdnuss-, Haselnuss- und Pekannussextrakte im AMES Test mit Hilfe des Stammes TA 102 auf ihre antioxidative Wirkung gegenüber oxidativ wirkenden Mutagenen überprüft.

Da es sich bei dieser Diplomarbeit um eine weiterführende Arbeit der Diplomarbeit „Antimutagene Eigenschaften von Haselnuss-, Pekannuss- und Erdnussextrakten im Salmonella typhimurium assay.“ von Uta Carstanjen handelt, wurde sowohl die Beschreibung der Nussherkunft sowie das Verfahren zur Herstellung der Nussextrakte von dieser Arbeit übernommen. Das Verfahren der Herstellung wird in dieser Arbeit nur grob beschrieben, die genaue Anleitung kann aus der Arbeit meiner Kollegin entnommen werden.

3.1 Herkunft der Nüsse

3.1.1 Erdnuss



Abbildung 3: Erdnuss mit und ohne Schale (Quelle: www.heilfasten.de)

Bearbeitung:	ungeröstet, mit Haut, ganze Kerne
Verpackung:	vakuumverpackt

Füllgewicht:	100 g
Größe:	im Schnitt 2 cm groß
Geruch:	Plastikgeruch (Verpackung) geringer Eigengeruch kein Verderbgeruch
Aussehen:	braun-rötliche Haut, tw. braune Flecken glatte Oberfläche kein Verderb oder Schädlingsbefall
Geschmack:	nicht typisch „nussig“, eher Erbsengeschmack kein Verderbsgeschmack
Herkunft:	keine Angaben
Lieferant:	Veggies Delight; Frank Heidel Naturkost
Sonstige Lieferantenangaben:	keine Angaben

Tabelle 4: Herstellerdaten und Beurteilung der Erdnuss

3.1.2 Haselnuss

Abbildung 4: Haselnuss (Quelle: www.wikipedia.at)

Bearbeitung:	ungeröstet, mit Haut, ganze Kerne
Verpackung:	lose im Plastiksäckchen
Füllgewicht:	200g
Geruch:	typischer Geruch nach Haselnuss

	kein Fremdgeruch, kein Verderbsgeruch
Aussehen:	hell- und dunkelbraune Haut, glatte dunkle Oberfläche keine Spur von Verderb oder Schädlingsbefall
Größe:	durchschnittlich 1 cm Durchmesser
Geschmack:	nussiger Geschmack kein Verderbsgeschmack
Herkunft:	Italien
Lieferant:	Backidee (Diamant Nahrungsmittel GmbH & Co KG)
Sonstige Lieferantenangaben:	Charge L1

Tabelle 5: Herstellerdaten und Beurteilung der Haselnuss

3.1.3 Pekannuss



Abbildung 5: Pekannuss (Quelle: www.exquisine.de)

Bearbeitung:	ungeröstet, mit Haut, ganze Kerne
Verpackung:	abgepackt als Nussmix lose im Plastiksäckchen
Füllgewicht:	375-g
Geruch:	geringer Geruch kein Fremdgeruch kein Verderbsgeruch

Aussehen:	dunkelbraune Haut, keine Spur von Verderb oder Schädlingsbefall
Größe:	durchschnittlich 3 cm groß
Geschmack:	intensiver Nussgeschmack kein Fremdgeschmack kein Verderbsgeschmack
Herkunft:	keine Angaben
Lieferant:	Bioquelle Klaus Loesch GmbH
Sonstige Lieferantenangaben:	Charge L40325

Tabelle 6: Herstellerdaten und Beurteilung der Pekannuss

3.2 Herstellen der Nussextrakte

Als Probenmenge wurden jeweils 20 g Nüsse, welche ungeröstet und ohne Haut waren, verwendet. Ermittelt wurde diese Menge aus verschiedenen Verzehrsempfehlungen, Studien und Verzehrserhebungen.

Da die Pekannüsse gemeinsam mit anderen Nüssen verpackt waren, wurden sie vor der Verarbeitung mittels Gebläse von anderen Nussrückständen getrennt.

Zur Herstellung der Nussextrakte, welche im AMES Test eingesetzt wurden, wurde eine Zweiphasenextraktion mit Chloroform und Methanol nach der Methode von Folch durchgeführt.

Dafür wurden je 1 g der Probe mit 30 mL des Extraktionsmittels, welches in diesem Fall Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 ist, versetzt, 30 min. geschüttelt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Die Lipidphase (Chloroformphase) wurde mit Hilfe 0,05 molarer Calciumchloridlösung von der

methanol-wässrigen Phase getrennt. Nach der Filtration erfolgte eine Begasung mit Stickstoff.

Sowohl die wasserlösliche als auch die fettlösliche Probe wurden in DMSO gelöst.

Von jeder Nussart wurden Proben sowohl im gekochten, als auch im ungekochten Zustand hergestellt und anschließend wurde eine Verdünnungsreihe gemacht:

Probe 1: Phasenmischung (wasserlöslich/fettlöslich) – Konzentration: 0,4 g/mL

Probe 2: Phasenmischung (wasserlöslich/fettlöslich) – Konzentration: 0,3 g/mL

Probe 3: Phasenmischung (wasserlöslich/fettlöslich) – Konzentration: 0,2 g/mL

Probe 4: wasserlösliche Phase – Konzentration: 0,4 g/mL

Probe 5: fettlösliche Phase – Konzentration: 0,4 g/mL

Die Proben der wasserlöslichen und der wasserunlöslichen Phase wurden jeweils in braune Fläschchen gefüllt und bei -30°C tiefgekühlt. Aus diesen zwei Phasen wurden Probe 1-3 hergestellt.



Abbildung 6: fertig abgefüllte Proben

Probe 1: Zur Herstellung der Phasenmischung mit der Konzentration von 0,4 g/mL wurden die wasserlösliche mit der fettlöslichen Phase im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese Lösung wird auch als Stammlösung bezeichnet, da aus ihr alle weiteren Verdünnungen hergestellt werden.

Probe 2: Hier werden 7,5 mL der Stammlösung mit 2,5 mL sterilem DMSO gemischt.

Probe3: Die Stammlösung wird mit DMSO im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die einzelnen Probengemische wurden zur einfacheren Handhabung in Röhrchen abgefüllt und bei –30° C gelagert.

3.3 AMES Test

Für den Test auf antioxidative Wirkung wurde ausschließlich der *Salmonella typhimurium*-Stamm TA 102 verwendet.

Um steriles Arbeiten zu gewährleisten, wurde ausschließlich unter einer sterilen Arbeitsbank (Laminar Flow) gearbeitet. Außerdem wurden alle verwendeten Utensilien und Lösungen entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Es wurde nur destilliertes (deionisiertes) Wasser verwendet.

Die Arbeitsanleitung für den AMES Test stammt aus „Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test“ [Maron und Ames, 1984] und „The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay“ [MORTELSMANN und ZEIGER, 2000].

3.3.1 Chemikalien, Medien und Platten

Einen Überblick über Herkunft und Verwendung der eingesetzten Chemikalien und Medien gibt nachfolgende Tabelle:

Chemikalien/ Medien	Abkürzungen	Herkunft	Bestell- nummer	Verwendung
Agar Nr. 1		Oxoid/ Bertoni	LP011P	Platten, Top Agar
2-Aminofluoren	2-AF	Sigma	A9031	Testsubstanz Mutagen – S9 Test

Ampicillin Trihydrat		Sigma	A6140	
Crystal Violet-Lösung		Sigma	C3886-25G	
D-Biotin		Sigma	B4639	
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma	D5879	Lösungsmittel
Glucose		Sigma	G8270	Glucose Minimum Agar Plates, Master Plates
Glucose-6-Phosphat	Glu-6-p	Sigma	G7250	S9 Mix
Kaliumchlorid	KCL	Sigma	P5405	S9 Mix
Kaliumphosphat, dibasisch	K ₂ HPO ₄	Sigma	P3786	Vogel-Bonner-Lösung
L-Histidin HCL		Sigma	H8125	Top-Agar, Master Plates, Genetische Analyse
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma	M9272	S9 Mix
Magnesiumchlorid	MgSO ₄ ·H ₂ O	Sigma	M9397	Vogel-Bonner-Lösung
Nähr Boullion Nr. 2 CM 67		Oxoid/Bertoni	CM067B	Nutrien Broth
Natriumammonium-phosphat	Na ₂ NH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O	Sigma	S9506	Vogel-Bonner-Lösung
Natriumchlorid	NaCl	Sigma	S5886	Top Agar
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma	O6203	Ampicillin-Lösung
Nicotinamidadenin-dinucleotidphosphat	NADP	Sigma	N0505	S9 Mix
Phosphatpuffer	PBS	PAA Labor.	H15002	Präinkubationstest, S9 Mix
Rattenleberhomogenisat	S9	MP Biomedicals	0850411	S9 Mix
tert-Butyl hydroperoxide	t-BOOH	Sigma	B2633	Mutagen
Tetrazyklin Hydrochlorid		Sigma	T3383	Genetische Analyse, OC und Master Plates
2,4,7-Trinitrofluorenon	TNO-one			Standardmutagen beim AMES Test

Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂			Mutagen
Zitronensäuremonohydrat		Sigma	C1909	Vogel-Bonner-Lösung

Tabelle 7: Herkunft und Verwendung der Chemikalien und Medien

3.3.1.1 Herstellen der Lösungen

- Ampicillin-Lösung 0,8%:
0,2 g Ampicillin werden eingewogen und in 25 mL 0,2 N NaOH gelöst. Anschließend wird die Lösung sterilfiltriert und im Kühlschrank gelagert.
- Biotin-Lösung 0,01%:
10 mg Biotin einwiegen, in 100 mL destilliertem Wasser lösen, sterilfiltrieren und im Kühlschrank lagern.
- Crystal Violet-Lösung 0,1%:
100 mg Crystal Violet werden in 100 mL destilliertem Wasser gelöst. Die fertige Lösung wird bei 4° C in einer braunen Flasche aufbewahrt und vor Licht geschützt!
- Glucose-Lösung 40%:
400 g Glucose werden in einem Liter heißen Wasser (für bessere Löslichkeit) auf einem Magnetrührer gelöst. Die Lösung wird bei 121° C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend kühl gelagert.
- Glucose-6-Phosphatlösung (304 mg/ml):
1 g Glucose-6-Phosphat wird in 3,289 mL sterilem Wasser gelöst und sterilfiltriert. Je 1 mL wird in ein Kryoröhrchen gefüllt und bei –20° C gelagert.
- Histidin-Biotin-Lösung 0,5mM:

124 mg D-Biotin und 96 mg L-Histidin HCL werden in 1000 mL Wasser gelöst, autoklaviert und kühl gelagert.

- MgCl₂-KCL-Lösung:

61,5 g KCL und 40,7 g MgCl₂ werden in 500 mL sterilem Wasser gelöst, anschließend autoklaviert und kühl gelagert

- NADP-Lösung (0,135 g NADP/2 mL):

1 g NADP wird in 14,814 mL sterilem Wasser gelöst, sterilfiltriert und anschließend wird je 1 mL in Kryoröhrchen gefüllt. Die Lagerung erfolgt bei -20° C.

- Tetrazyklin-Lösung 0,8%:

0,2 g Tetrazyklin werden in 25 mL 0,2 N HCl gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank.

- Vogel-Bonner-Lösung:

Auf einem Magnetrührer werden 10 g Magnesiumsulfat, 100 g Zitronensäuremonohydrat, 500 g dibasisches Kaliumphosphat und 175 g Natriumammoniumphosphat der Reihe nach in 670 mL warmen Wasser gelöst. Das zugegebene Salz muss vollständig gelöst sein, bevor das nächste zugegeben wird. Die Lösung wird bei 121° C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend kühl gelagert. Vor jedem Gebrauch wird die Lösung erneut autoklaviert.

3.3.1.2 Herstellen der Platten

Platten	Anwendungsbereich	Herstellung
Biotin Plates	Genetische Analyse (Histidinabhängigkeit)	GM-Plates + 1,74 mL 0,01% Biotin-Lösung
Histidine Plates	Genetische Analyse (Biotinabhängigkeit)	GM-Plates + 1,74 mL 0,5% Histidin-Lösung
Biotin/Histidine Plates	Genetische Analyse (Histidin- und Biotinabhängigkeit, rfa-Marker)	GM-Plates + 1,74 mL 0,01% Biotin-Lösung + 1,74 mL 0,5% Histidin-Lösung
Biotin/Histidine/Ampicillin Plates	Genetische Analyse (Ampicillinresistenz)	GM-Plates + 1,74 mL 0,01% Biotin-Lösung + 1,74 mL

		0,5%Histidin-Lösung + 666 µL Ampicillin-Lösung
Biotin/Histidine/ Tetracycline Plates	Genetische Analyse (Tetrazyklinresistenz)	GM-Plates + 1,74 mL 0,01% Biotin-Lösung + 1,74 mL 0,5% Histidin-Lösung + 54µL Tetrazyklin-Lösung
Biotin/Histidine/Ampicillin/Tetracycline Plates	Genetische Analyse (Ampicillin und Tetrazyklin-Resistenz)	GM-Plates + 1,74 mL 0,01% Biotin-Lösung + 1,74 mL 0,5% Histidin-Lösung + 666µL Ampicillin-Lösung + 54 µL Tetrazyklin-Lösung

Tabelle 8: benötigte Platten für die genetische Analyse

Minimal Glucose Plates:

Diese Platten werden für den AMES-Test benötigt.

Herstellung:

- In einen 1000 mL Erlenmeyerkolben werden 11,25 g Agar eingewogen und mit 700 mL destilliertem Wasser aufgefüllt.
- Der Erlenmeyerkolben wird mit Watte und Alufolie verschlossen und mit einem Autoklavierband versehen und anschließen wird bei 121° C autoklaviert. Das Autoklavierband dient lediglich zum Erkennen, ob der Autoklav die tatsächlich angezeigte und benötigte Temperatur erreicht hat.
- Die bereits fertige Vogel-Bonner-Lösung wird mitautoklaviert und die Glucose (welche bereits bei der Herstellung autoklaviert wurde) wird zum Erwärmen ins 37° C warme Wasserbad gestellt.
- Nach dem Autoklavieren pipettiert man unter dem Laminar Flow 15mL Vogel-Bonner-Lösung in den Erlenmeyerkolben, welcher die Agarlösung enthält. Der Kolben muss nun gut geschüttelt werden, damit sich die Vogel-Bonner-Lösung gut verteilt.
- Wenn sich die Vogel-Bonner-Lösung gut verteilt hat und keine „Flanker!“ mehr sichtbar sind, pipettiert man nun 37,5 mL 40% Glucoselösung in den Erlenmeyerkolben. Anschließend wieder gut schütteln.
- Der Agar wird nun noch möglichst heiß in die Petri-Schalen gegossen. Wenn man zu lange wartet, wird der Agar kalt und er lässt sich nicht mehr gießen.

- Nun lässt man die Platten auskühlen. Anschließend werden sie in Plastiksackerl verpackt, mit Datum beschriftet und kühl gelagert.
- Die Haltbarkeit beträgt ca. vier bis sechs Wochen.

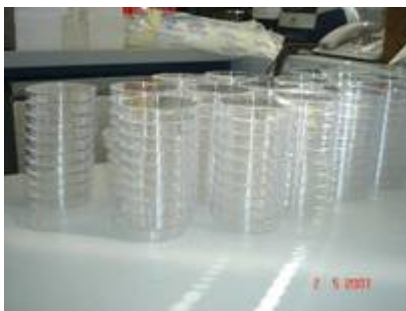


Abbildung 7: bereitgestellte Platten zum Gießen



Abbildung 8: Gießen von Glucose-Minimal-Agar-Platten

Master Plates:

Zusätzlich zu den Frozen Permanents ist es hilfreich, Master Plates herzustellen, welche bei 4° C gelagert werden können. Hierbei handelt es sich um Minimal Glucose Agar Plates, welche zusätzlich Biotin, Histidin, Ampicillin und im Falle des Stammes TA102 auch Tetracyclin enthalten. Master Plates von TA102 sind zwei Wochen haltbar.

Herstellung:

- Für den Stamm TA102 wurden jeweils zwei Platten hergerichtet und mit Datum und Stammnamen beschriftet.
- 3,2 g Agar werden in einen 250 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 200 mL destilliertem Wasser aufgefüllt und bei 121° C autoklaviert.
- Unter dem Laminar Flow werden 4,3 mL der Vogel-Bonner-Lösung, welche ebenfalls mit autoklaviert wurde und 10,8 mL Glucose (welche bereits bei der Herstellung autoklaviert wurde und jetzt nur im 37° C warmen

Wasserbad aufgewärmt wurde) pipettiert. Wie schon bei der Herstellung der minimal Glucose Agar-Platten wird auch hier zuerst die Vogel-Bonner-Lösung hinzugefügt und die Glucose-Lösung erst dann, wenn sich die Vogel-Bonner-Lösung gut gelöst hat.

- Nachdem die Lösung etwas ausgekühlt ist, gibt man Antibiotika, Histidin und Biotin dazu.

Lösung	Menge für 4 Masterplates
Histidin	2,17 mL
Biotin	1,3 mL
Ampicillin	682 µL
Tetrazyclin	54,3 µL

Tabelle 9: Menge der benötigten Lösungen für die Herstellung von Masterplates

- Der noch möglichst warme Agar wird dick in die Petri-Schalen gegossen.
- Wenn der Agar vollständig abgekühlt ist, werden die Bakterienkolonien mittels Ausstrichverfahren auf die Platten aufgetragen und für 48 Stunden bei 37° C inkubiert.
- Danach mit Isolierband umwickeln und im Kühlschrank lagern.

3.3.1.3 Frozen Permanents

Frozen Permanents dienen zur langfristigen Lagerung der Stämme. Sie werden für die Herstellung der Master Plates benötigt. Ihre Lagerung erfolgt bei –80° C. Nach einmaligem Auftauen, werden die Frozen Permanents verworfen, da ihre Qualität beim mehrmaligen Auftauen nicht sichergestellt werden kann und somit in weiterer Folge der AMES Test ein falsches Ergebnis liefern würde. Bei richtiger Lagerung, und wenn die Kühlkette nicht unterbrochen wird, sind sie mehrere Jahre haltbar.

Herstellung:

- 9,1 mL der bereits ausgekühlten Overnight Culture und 900 µL steriles DMSO, welches als Gefrierschutz dient, werden in eine Epprovette pipettiert.
- Alle Vorgänge erfolgen auf „crashed Ice“, welches man zuvor in einem Becherglas bereitgestellt hat.
- Nun werden je 1,8 mL in ein Kryoröhrchen geben, welches mit Datum und Stammmart beschriftet wird und anschließend sofort bei -80°C gelagert wird.

3.3.1.4 Herstellen der Overnight Culture

- 5 g Nutrient Broth werden in eine 250 mL Pyrexflasche eingewogen und in 200 mL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend autoklaviert man die Lösung und lässt sie auskühlen.
- 0,625 mL Ampicillin und 0,156 mL Tetrazyclin werden direkt in die Nutrient Broth pipettiert.
- Von diesem Gemisch pipettiert man 12 mL davon in einen 100 mL Erlenmeyerkolben (reicht für 100 Platten). Da wir bei unserem Test aber über 100 Platten hatten, haben wir jeweils zweimal 100mL in zwei Erlenmeyerkolben pipettiert.
- Mit der Impföse entnimmt man die Kolonien von jener Stelle auf den Master Plates, wo das meiste Wachstum statt gefunden hat und gibt diese in den Erlenmeyerkolben. Die Impföse wird ordentlich hin und her bewegt, damit sich die Bakterien auch tatsächlich von der Öse ablösen und in der Nutrient Broth Lösung verteilen.
- Jetzt wird der Kolben mit Alufolie verschlossen und bei 37°C und gleichzeitigem Rütteln zwölf Stunden inkubiert.
- Am nächsten Tag erkennt man das Wachstum der Bakterien daran, dass die Lösung trüb geworden ist.
- Unmittelbar vor Testbeginn wird diese Lösung aus dem Inkubator genommen und gleich unter den Laminar Flow gestellt.



Abbildung 9: Inkubation der Overnight Culture für zwölf Stunden auf dem Rüttler im Brutschrank

3.3.1.5 Herstellen des Top-Agars

- 1,2 g Agar und 1 g Natriumchlorid werden in eine Pyrexflasche eingewogen, mit 200 mL sterilem Wasser aufgefüllt und anschließend bei 121° C autoklaviert.
- Die Herstellung erfolgt unmittelbar vor dem Test.
- In den leicht abgekühlten Agar pipettiert man 20 mL Histidin-Biotin-Lösung und schüttelt die Flasche leicht, damit sich die Histidin-Biotin-Lösung gut verteilt.
- Anschließend stellt man den Agar ins 55° C warme Wasserbad und entnimmt ihn dann direkt aus der Pyrexflasche. Diese Menge des Agars reicht für 100 Platten.

3.4 Durchführung des AMES Test

Die Nussproben wurden mittels Standard-Platten-Inkorporations-Test und Präinkubationstest mit und ohne metabolische Aktivierung auf eine mögliche antioxidative Wirkung getestet. Es wurde immer der *Salmonella typhimurium* Stamm TA102 verwendet.

Bei allen Tests gab es sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen. Gearbeitet wurde im Dreifachansatz (mit Ausnahme der Negativkontrolle, welche sechsfach angesetzt wurde).

Die Standard-Platten-Inkorporations-Tests und der Präinkubationstest mit metabolischer Aktivierung wurden jeweils einmal durchgeführt, der Präinkubationstest ohne metabolischer Aktivierung wurde jeweils zweimal gemacht, was zu präziseren Ergebnissen führte.

3.4.1 Kontrollen

Um sicherzustellen, dass die Bakterien wie erwartet reagieren, braucht man sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen. Laut Literatur ist eine gewisse Anzahl an Revertanten zu erwarten.

3.4.1.1 Negativkontrolle

Mit Hilfe der Negativkontrolle wird die Anzahl der Spontanrevertanten ermittelt. Als Negativkontrolle diente jenes Lösungsmittel, in dem auch die Proben vorlagen. In unserem Fall war das DMSO.

Die Negativkontrolle wird im sechsfach Ansatz mitgetestet. Folgende Tabelle gibt einen Überblick, wie sich die Negativkontrolle zusammensetzt:

Standard-Platten-Inkorporations-Test	100 µL Bakterien + 100 µL DMSO steril
Präinkubationstest ohne S9	500 µL Puffer + 100 µL Bakterien + 100 µL DMSO steril
Präinkubationstest mit S9	500 µL S9-Mix + 1200 µL Bakterien + 100 µL DMSO steril

Tabelle 10: Zusammensetzung der Negativkontrolle

3.4.1.2 Positivkontrolle

Bei jedem Test wird eine Positivkontrolle im dreifach Ansatz mitgetestet, um sicherzustellen, dass die Revertanten bei Einsatz eines Mutagens tatsächlich revertieren.

Wie sich die Positivkontrolle zusammensetzt, zeigt nachfolgende Tabelle:

Standard-Platten-Inkorporations-Test	100 µL Bakterien + 100 µL Mutagen (2,4,7-TNFone)
Präinkubationstest ohne S9	500 µL Puffer + 100 µL Bakterien + 100 µL Mutagen (2,4,7-TNFone)
Präinkubationstest mit S9	500 µL S9-Mix + 100 µL Bakterien + 100 µL Mutagen (2-AF)

Tabelle 11: Zusammensetzung der Positivkontrolle

3.4.1.3 Kontrollprobe

Bei allen Tests wird zusätzlich eine Kontrollprobe ebenfalls im dreifach Ansatz mitgetestet. Da dieselbe Mutagenkonzentration wie bei den Proben gegeben sein muss, wird das Mutagen statt mit dem Nussextrakt mit dem Lösungsmittel DMSO gemischt. Dadurch wird ein direkter Vergleich mit den Proben möglich.

Standard-Platten-Inkorporations-Test	100 µL Bakterien + 100 µl Gemisch aus H ₂ O ₂ bzw. tBOOH
Präinkubationstest ohne S9	500 µL Puffer + 100 µl Gemisch aus H ₂ O ₂ bzw. tBOOH
Präinkubationstest mit S9	500 µL S9 Mix + 100 µl Gemisch aus H ₂ O ₂ bzw. tBOOH

Tabelle 12: Zusammensetzung der Kontrollprobe

3.4.1.4 Herstellung weiterer benötigter Lösungen und Mutagene

- 2,4,7 Trinitrofluorenon 0,1 mg/mL:
5 mg TNF-One einwiegen und mit DMSO auf 50 mL auffüllen. Anschließend sterilfiltrieren und bei –20° C lagern.
- H₂O₂ 60 mMol:
310 µL H₂O₂ werden in einen 50 mL Messkolben pipettiert und anschließend mit sterilem H₂O auf 50mL aufgefüllt. Die Lösung wird sterilfiltriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

- tBOOH 1mMol:

6,92 μL tBOOH werden in einen 50 mL Messkolben pipettiert, mit sterilem H_2O aufgefüllt, sterilfiltriert und kühl gelagert.

- Herstellung des S9-Mix:

Bakterien besitzen das Cytochrom P450 nicht. Deshalb wird den Proben zur oxidativen metabolischen Aktivierung von Substanzen ein Rattenleberenzymextrakt (S9) zugesetzt. Als Coenzym dient NADP. Die Herstellung erfolgt in einem sterilen 50 mL Zentrifugenröhrchen. Während der Herstellung wird dieses Röhrchen auf crashed ice gelagert. Es muss schnell gearbeitet werden, da nach Zugabe des S9, die Lösung nur eine Stunde haltbar ist. Die Reagenzien werden der Reihe nach in das Röhrchen pipettiert. Das benötigte S9 ist bereits in der richtigen Menge in Röhrchen abgefüllt und wird per Hand angewärmt bis sich der Klumpen löst und dann zugegeben. Anschließend wird die Lösung solange geschüttelt bis sich der Klumpen aufgelöst hat. 50 mL dieses Mixes reichen für 100 Platten. Eine Übersicht über die benötigten Reagenzien und deren Herstellung gibt nachfolgende Tabelle:

Reagenzien	Herstellung
19,75 mL H_2O	autoklavieren
25 mL PBS	fertige Lösung
1 mL $\text{MgCl}_2\text{-KCl}$	61,5 g Kcl und 40,7 g H_2O MgCl_2 mit H_2O auf 500 mL auffüllen und autoklavieren
2 mL NADP-Lösung	0,135 g NADP pro 2 mL, sterilfiltrieren und je 1 mL in Kryoröhrchen füllen; Lagerung bei -20°C
250 μL Glu-6-P Lösung	0,304 g Glu-6-P pro 1 mL H_2O , sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C
1 Fläschchen S9	fertig; tiefgekühlt bei -80°C

Tabelle 13: Übersicht über die benötigten Reagenzien zur Herstellung des S9-Mixes

3.4.2 Testablauf

- Am Vormittag des Vortages wird die Nutrient Broth Lösung hergestellt. Außerdem werden die benötigten Eprouvetten bereitgestellt.
- Zwölf Stunden vor Testbeginn:
 - Die Overnight Culture wird hergestellt und auf den Rüttler zum inkubieren bei 37° C gestellt.
 - Die benötigten Platten werden aus dem Kühlraum geholt, damit sie bei Testbeginn nicht kalt sind.
- Am Testtag:
 - Eine Stunde vor Testbeginn: Der bereits eingewogene Top-Agar, die Biotin-Histidin Lösung und je nach Test weitere Reagenzien (wie z.B. steriles Wasser) werden autoklaviert.
 - die bereits am Vortag hergerichteten Platten werden beschriftet, der Laminar Flow wird gereinigt und die benötigten Geräte und Lösungen werden bereitgestellt
 - ebenfalls beschriftet werden die Eprouvetten und Cups
 - wenn der Autoklav fertig ist, kann mit dem eigentlichen Test begonnen werden



Abbildung 10: Laminar Flow für den Test hergerichtet



Abbildung 11: Cupständer mit Cups für den Test vorbereitet



Abbildung 12: für den Test bereitgestellte Eprouvetten

3.4.2.1 Testdesign des Standard-Platten-Inkorporationstest

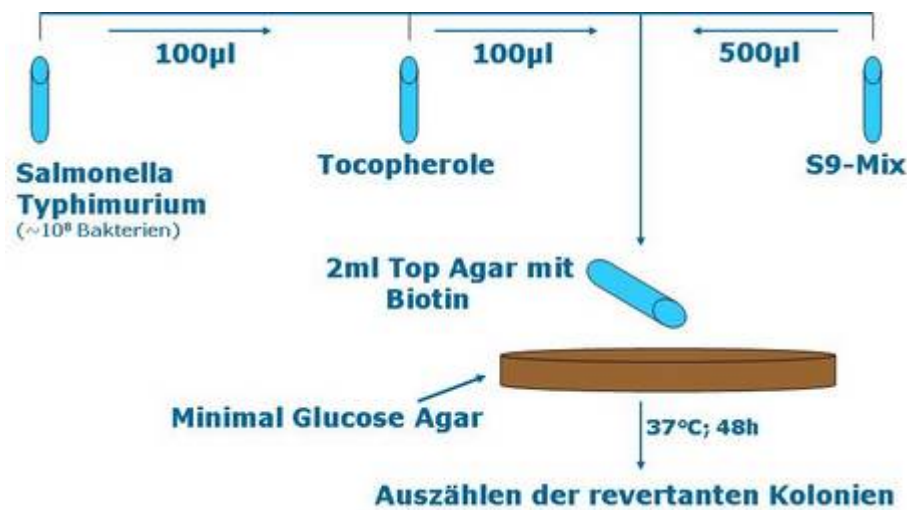


Abbildung 13: Standard-Platten-Inkorporationstest – Überblick über die Durchführung [Mortelsmann, Zeiger, 2000]

Nachdem alle benötigten Materialien unter dem Laminar Flow bereitgestellt wurden, kann mit dem eigentlichen Test begonnen werden. Begonnen wurde damit, dass man in jedes der drei Röhrchen, die pro Probe bereitstanden, 100 µL der Overnight Culture pipettiert hat. Die Probe wurde in der Zwischenzeit je nach Test entweder mit H₂O₂ oder mit tBOOH gemischt. Dafür hat man je 100 µL Probe und 100 µL H₂O₂ bzw. tBOOH in ein Cup zusammengemischt und auf dem Vortex gut geschüttelt. Aus diesem Cup wurden anschließend wieder jeweils 100 µL in jede Epruvette pipettiert, in der sich bereits die Overnight Culture befand. Nun wurden noch 2 mL des Top Agars dazugegeben, das ganze wurde auf dem Vortex gemischt und danach gleich auf die jeweils richtig beschrifteten Platten gegossen. Die Platten wurden leicht hin und her bewegt, damit sich das Gemisch gut verteilt. Dann hat man die Platten solange stehen gelassen bis der Top Agar gut getrocknet war. Wenn man mit allen Proben fertig war, wurden die Platten mit der Agar Seite nach oben in den Inkubator gegeben und dort bei 37° C für 48 Stunden inkubiert.

Nach genau 48 Stunden konnte mit dem Auszählen begonnen werden. Dafür wurden zuerst alle Platten aus dem Inkubator genommen und auf eine Lampe gelegt, damit man die Bakterien besser sehen konnte. Das Auszählen erfolgte

manuell mit Hilfe eines Zählers. Damit man keine Bakterien doppelt zählt, wurden die bereits gezählten mit einem Stift markiert. Die Anzahl der Bakterien pro Platte wurde notiert und dann weiter für die statistische Berechnungen verwendet.

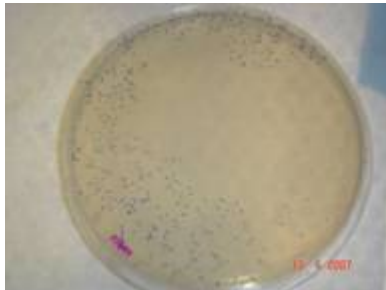
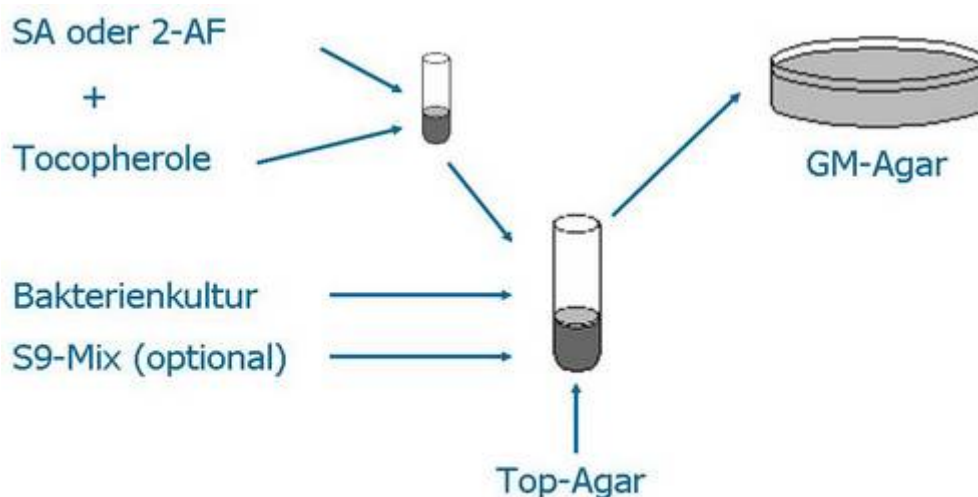


Abbildung 14: Inkubierte Platte mit teilweise markierten Revertanten auf der Rückseite

3.4.2.2 Testdesign des Präinkubationstest



(modifiz. nach Göggelmann, 1993)

Abbildung 15: Präinkubationstest – Überblick der Durchführung [modifiziert nach Göggelmann, 1993]

Bei diesem Test wird damit begonnen, dass in alle Epprovetten 500 mL PBS pipettiert wird. Anschließend gibt man 100 mL Overnight Culture und 100 mL einer Mischung aus Mutagen (je nach Test H₂O₂ oder tBOOH) und 100 mL Nussprobe hinzu. Das Gemisch wird auf dem Vortex gut gemischt und 30 Minuten lang bei 37° C und gleichzeitigem Rütteln inkubiert. Nach dem Inkubieren gibt man 2 mL Top-Agar in jedes Röhrchen und gießt die Mischung,

nachdem man sie nochmals geschüttelt hat, auf die Glucose-Minimal-Agar Platten. Wenn der Agar fest ist, werden die Platten mit dem Agar nach oben 48 Stunden lang bei 37° C inkubiert. Das Auszählen erfolgt auf die gleiche Weise wie beim Standard-Platten-Inkorporationstest.

Beim Präinkubationstest mit metabolischer Aktivierung wird statt des Puffers der S9-Mix verwendet. Der restliche Testablauf bleibt gleich. Allerdings müssen alle Platten innerhalb von 50 Minuten verarbeitet werden, damit die Wirkung der Enzyme der metabolischen Aktivierung sichergestellt ist.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Software „SPSS für Windows“ verwendet. Es wurden zuerst alle Einzeldaten eingegeben und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die Werte wurden auf Normalverteilung geprüft. Weiters wurden die Werte mit Hilfe des t-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen der Probe und der jeweiligen Positivkontrolle getestet. Ob es zwischen den einzelnen Proben signifikante Unterschiede gab, wurde durch die einfaktorielle ANOVA mit verschiedenen Post-Hoc-Tests festgestellt (Tukey-HSD, Schefflé, LSD, Bonferroni, Duncan und Tukey-B).

Als Signifikanzgrenze musste p unter 0,05 sein.

4 Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das antioxidative Potential jeweils roher und gekochter Extrakte von Erdnüssen, Haselnüssen und Pekannüssen im AMES-Test untersucht. Getestet wurden die lipophile und die hydrophile Phase sowie Mischungen dieser beiden Phasen in je drei verschiedenen Konzentrationen. In der Literatur gibt es bis dato nur wenige Angaben zu Nüssen im AMES-Test. Vorhandene Studien beschäftigen sich mit antioxidativen Wirkungen von Nüssen. Der *Salmonella typhimurium* Stamm TA 102, welcher vor allem auf oxidative Mutagene sehr sensibel reagiert, wurde in verschiedenen Testdesigns mit unterschiedlichen Mutagenen eingesetzt. Getestet wurde mittels Standard-Platten-Inkorporationstest sowie mittels Präinkubationstest mit und ohne metabolischer Aktivierung jeweils mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und tertiär-Butylhydroperoxid (tBOOH). Die verwendeten Mutagene entsprachen der in der Literatur empfohlenen Standardmutagene. Je nach Testart wurde entweder 2,4,7-Trinitro-9-fluorenol oder 2-Aminofluoren eingesetzt.

4.1 Nussextrakte

Zur Gewinnung der Extrakte wurden jeweils 20 g der verschiedenen Nüsse eingewogen. Die Extraktion wurde nach der Methode von Folch durchgeführt. Die gewonnenen Proben wurden in 50 mL des Lösungsmittels DMSO gelöst, womit sich eine Ausgangskonzentration von 0,4 g/mL ergab. Von dieser Ausgangskonzentration wurde weiters auf eine Konzentration von 0,3 g/mL und 0,2 g/mL verdünnt. Im AMES-Test kamen die lipophile und die hydrophile Phase, und die drei Konzentrationen von 0,4 g/mL, 0,3 g/mL und 0,2 g/mL zum Einsatz.

4.2 Der antioxidative Test

Eine Substanz gilt dann als antioxidativ, wenn sie in der Lage ist, die Anzahl der Revertanten, verglichen mit der Positivkontrolle, um die Hälfte zu senken oder wenn ihre Wirkung signifikant konzentrationsabhängig ist [KAREKAR et al., 2000].

Zeigt eine Substanz eine oxidative Wirkung, so wird der Test unter denselben Bedingungen ein zweites Mal durchgeführt, um diese Wirkung zu bestätigen [MORTELSMANS und ZEIGER, 2000].

Deshalb wurde in dieser Arbeit der Präinkubationstest jeweils zweimal durchgeführt. Der Präinkubationstest mit metabolischer Wirkung konnte aus Kostengründen nur einmal durchgeführt werden.

Die Mittelwerte wurden aus den Rervertantenzahlen beider Tests berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in den folgenden Graphiken die Mittelwerte in % angegeben, wobei immer die Revertanten von H_2O_2 bzw. tBOOH als 100% angenommen wurden.

4.2.1 Standard-Platten-Inkorporationstest mit H₂O₂ als Mutagen

Beim Standard-Platten-Inkorporationstest mit H₂O₂ als Mutagen konnte bei keiner Nussart eine antioxidative Wirkung festgestellt werden. Die Revertantenzahlen lagen bei allen Proben deutlich über der Kontrolle. Bei den ungekochten Nüssen lagen sogar alle Werte, mit Ausnahme der lipophilen Phase von Erdnuss, signifikant höher als die Kontrollprobe. Bei den gekochten Nussproben lagen ebenfalls alle Werte über den Werten der Kontrolle. Die hydrophile Phase von Erdnuss, die hydrophile Phase von Pekan sowie das Phasengemisch mit den Konzentrationen von 0,2 g/mL und 0,3 g/mL von Pekan lagen signifikant über den Werten der Kontrolle. Bei Haselnuss lagen alle Werte, außer der lipophilen Phase, signifikant über der Kontrolle.

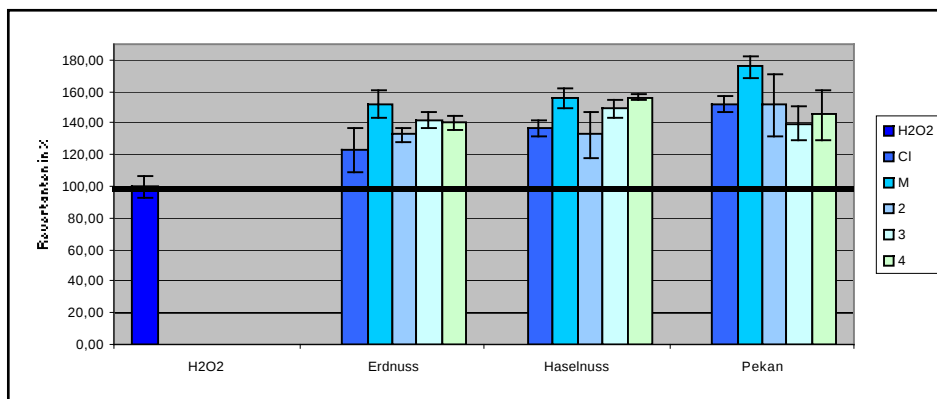


Abbildung 16: Standard-Platten-Inkorporationstest mit H₂O₂ und ungekochten Extrakten

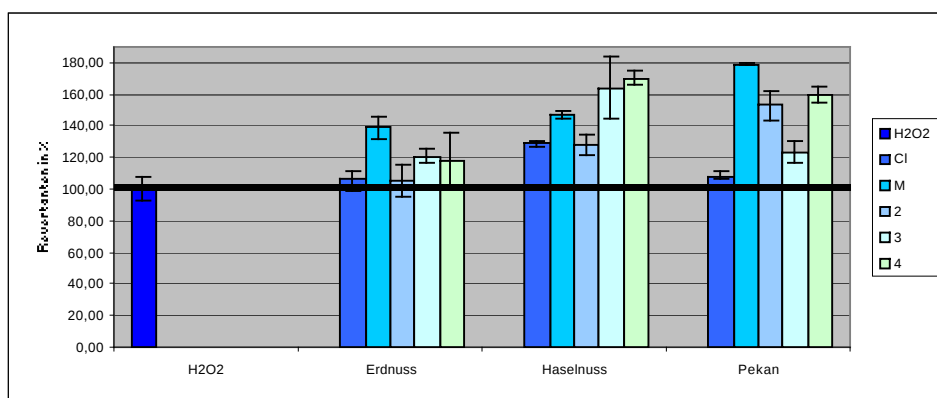


Abbildung 17: Standard-Platten-Inkorporationstest mit H₂O₂ und gekochten Extraktion

Im Rahmen der einfaktoriellen ANOVA konnte gezeigt werden, dass speziell die gekochten Haselnuss-Proben in der Gemischphase 3 und 4 sowie die gekochte

hydrophobe Phase von Pekan tendenziell signifikant über den anderen Werten lagen.

Bei den ungekochten Nussproben war nur die hydrophile Phase von Pekan signifikant höher als alle anderen Nussproben.

Vergleicht man nun die Werte der gekochten und der ungekochten Proben, so wird ersichtlich, dass mit Ausnahme der hydrophilen Phase und der Gemischphase 0,4 g/mL von Pekan die Werte der gekochten Extrakte etwas niedriger waren als die der ungekochten Proben.

4.2.2 Präinkubationstest ohne metabolische Aktivierung mit H₂O₂ als Mutagen

Der Präinkubationstest ist die genauere Methode im Vergleich zum Standard-Platten-Inkorporationstest.

Es wurden zwei Tests unter denselben Bedingungen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde 2,4,7-Trinitrofluorenon verwendet.

Wie schon beim Standard-Platten-Inkorporationstest konnte auch beim Präinkubationstest keine antioxidative Wirkung festgestellt werden.

Bei den ungekochten Extrakten lag die hydrophile Phase von Erdnuss sowie die hydrophile Phase und die Gemischphase in der Konzentration von 0,3 g/mL signifikant über der Kontrollprobe. Lediglich die Gemischphase in der Konzentration von 0,2 g/mL von Pekan lag gerinfügig unter dem Wert der Kontrolle.

Bei dem Test mit den gekochten Extrakten lagen alle Werte, außer der lipophilen Phase und den Gemischphasen mit der Konzentration von 0,2 g/mL und 0,4 g/mL von Erdnuss, sowie die Gemischphase mit der Konzentration von 0,2 g/mL von Pekan, signifikant über der Kontrolle.

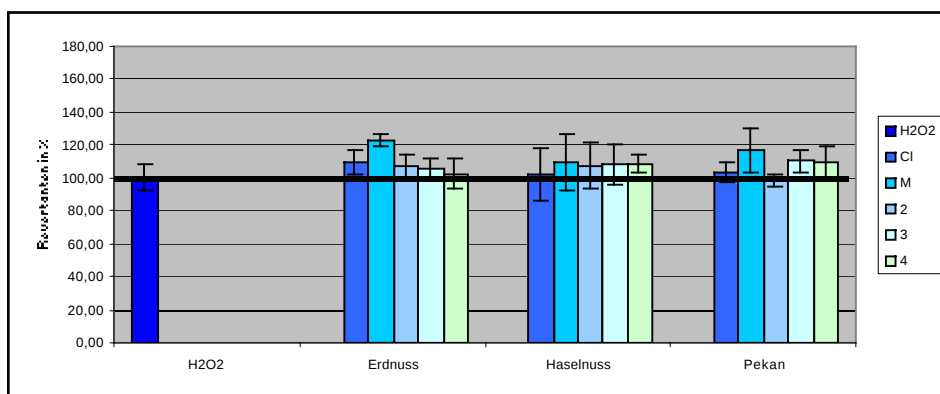


Abbildung 18: Präinkubationstest mit H₂O₂ und ungekochten Extrakten

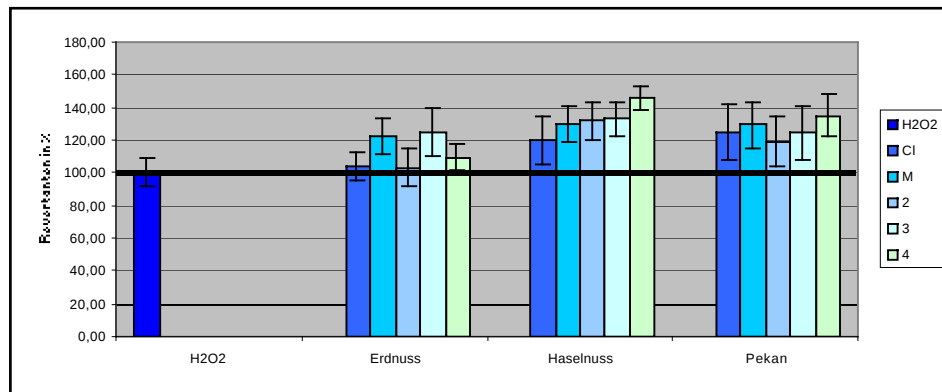


Abbildung 19: Präinkubationstest mit H₂O₂ und gekochten Extrakten

Bei diesem Test konnte durch die ANOVA gezeigt werden, dass bei den gekochten Haselnussproben der Phase 3 und 4 eine signifikante Erhöhung gegenüber Erdnuss vorlag. Außerdem lag noch die Gemischphase von 0,4 g/mL der gekochten Pekanproben signifikant über der lipophilen Phase von Erdnuss. Bei den ungekochten Proben war lediglich eine Phase der Pekannussproben signifikant niedriger als die hydrophobe Phase von Erdnuss.

Bei Vergleich der gekochten mit den ungekochten Proben lagen bei diesem Test die Revertantenzahlen der gekochten Proben über den Werten der ungekochten Extrakte. Eine Ausnahme bilden die Gemischphasen 0,3g/mL und 0,4g/mL von Erdnuss. Hier waren die ungekochten Werte höher als die der gekochten Proben.

4.2.3 Präinkubationstest mit H₂O₂ mit metabolischer Aktivierung

Um eine bessere Aussagekraft zu erzielen, wurde der Präinkubationstest mit metabolischer Aktivierung durchgeführt. Dadurch werden inaktive Substanzen in ihre aktive Form übergeführt. Bei der Durchführung wurde der S9-Mix verwendet. Als Positivkontrolle diente hier 2-Aminofluorenol.

Bei dem Test mit den ungekochten Extrakten lagen alle Revertantenzahlen, mit Ausnahme der lipophilen Phase von Pekan, welche genauso hoch wie die Kontrolle war, unter dem Wert der Kontrollprobe. Die hydrophile Phase und die gemischten Phasen in der Konzentration von 0,3g/mL und 0,4g/mL von Haselnuss konnten die Revertantenzahl im Vergleich zur Kontrolle sogar signifikant senken.

Innerhalb der Gruppe der gekochten Extrakte wurde die Revertantenzahl nur durch die Gemischphase in der Konzentration von 0,4 g/mL von Erdnuss signifikant gesenkt. Die Werte der Revertantenzahlen der lipophilen Phase und der Gemischphase in der Konzentration von 0,3 g/mL und 0,4 g/mL von Pekan lagen über der Revertantenzahl der Kontrolle. Alle anderen Phasen konnten die Zahl der Revertanten im Vergleich zur Kontrollprobe senken.

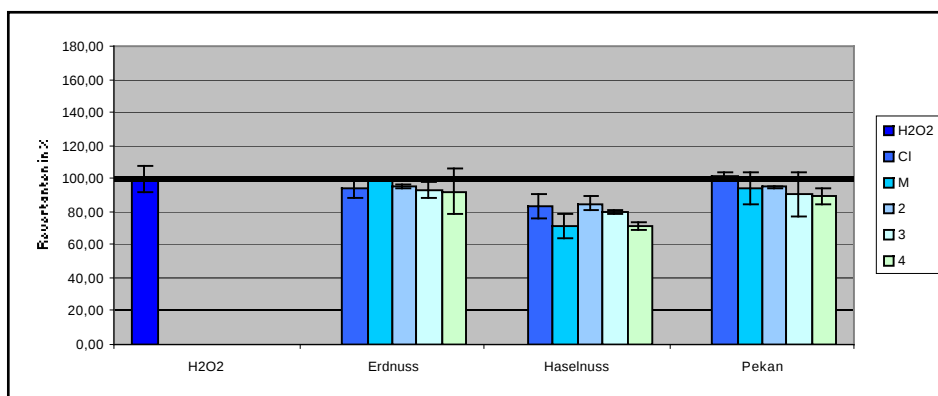


Abbildung 20: S9-Test mit H₂O₂ mit metabolischer Aktivierung und ungekochten Extrakten

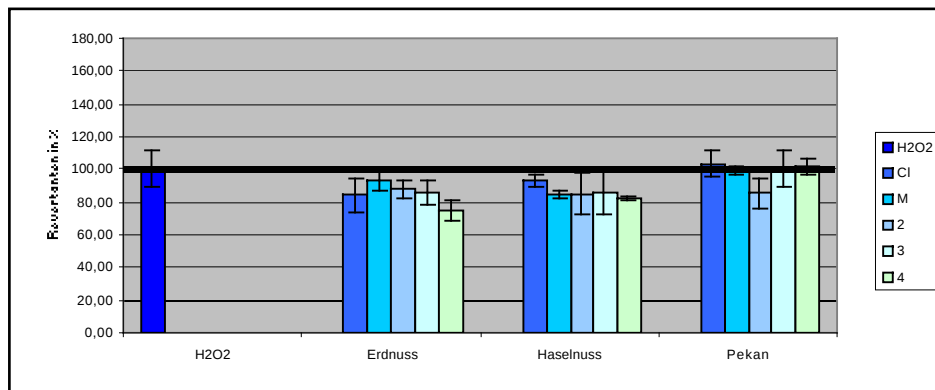


Abbildung 21: S9-Test mit H₂O₂ mit metabolischer Aktivierung und gekochten Extrakten

Beim Vergleich der ungekochten mit den gekochten Extrakten lagen die Werte der lipophilen, der hydrophilen Phase und der Gemischphase mit der Konzentration von 0,2 g/mL von Erdnuss über den Werten der gekochten Extrakte. Bei allen anderen Phasen waren die Revertantenzahlen der ungekochten Nussproben niedriger als die der gekochten.

Eine Gemischphase von Haselnuss (0,4 g/mL) und die hydrophile Phase von Pekan waren sogar signifikant niedriger als die der gekochten Proben.

Im Rahmen der ANOVA konnte bei den gekochten Proben festgestellt werden, dass nur die lipophile Phase sowie die Gemischphase von 0,4 g/mL von Pekan signifikant höher war als die Gemischphase von 0,4 g/mL von Erdnuss. Bei den ungekochten Proben lagen die Werte der hydrophoben- und der Gemischphase von 0,4 g/mL von Haselnuss signifikant unter den Werten der hydrophoben Phase von Erdnuss sowie der lipophilen Phase von Pekan.

Der Vergleich ungekocht mit gekochten Proben zeigt, dass die Revertantenzahlen bei den gekochten Erdnussproben höher waren als die der ungekochten Proben. Bei den Haselnussproben war es umgekehrt. Hier waren die Werte der gekochten Extrakte höher. Bei den Pekanproben waren die lipophile und die hydrophile Phase der gekochten Proben höher, die 3 Gemischphasen niedriger als die Werte der ungekochten Extrakte.

4.2.4 Standard-Platten-Inkorporationstest mit tBOOH als Mutagen

Beim Standard-Platten-Inkorporationstest konnte kein antioxidativer Effekt festgestellt werden. Bei den ungekochten Nussproben lagen nur die Revertantenzahlen von der hydrophilen Phase von Erdnuss, der lipophilen Phase von Haselnuss und der Gemischphase mit der Konzentration von 0,2 g/mL von Pekan geringfügig unter der Revertantenzahl der Kontrolle. Alle anderen Phasen lagen über dem Kontrollwert, die Gemischphase von Pekan (0,3 g/mL) war sogar signifikant höher.

Bei den gekochten Proben war die Revertantenzahl nur bei der lipophilen Phase von Erdnuss niedriger als die der Kontrollprobe.

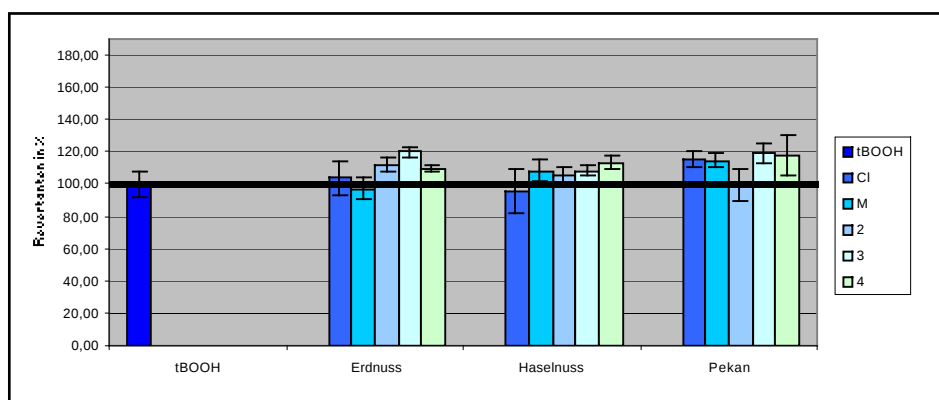


Abbildung 22: Standard-Platten-Inkorporationstest mit tBOOH und ungekochten Extrakten

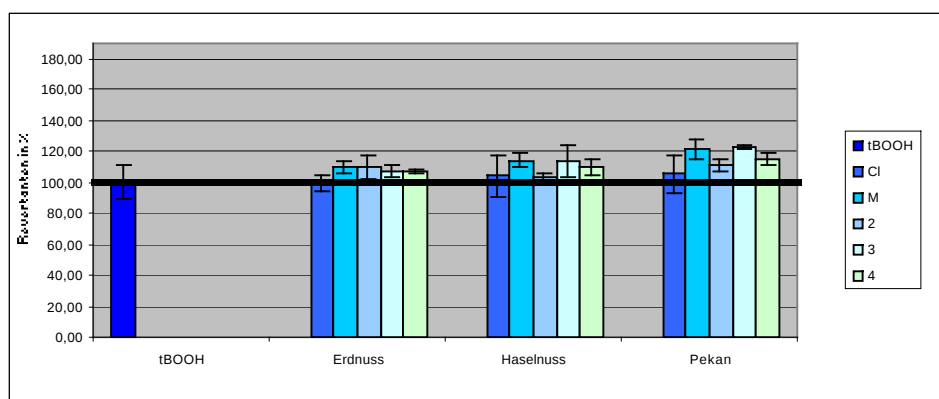


Abbildung 23: Standard-Platten-Inkorporationstest mit tBOOH und gekochten Extrakten

Durch die ANOVA konnten zwischen den einzelnen Nussproben keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Die Revertantenzahlen lagen

sowohl bei den gekochten als auch bei den ungekochten Proben nahe zusammen.

Beim Standard-Platten-Inkorporationstest mit tBOOH konnte man keine Tendenz erkennen, ob die ungekochten oder die gekochten Revertanzahlen höher waren. Die Werte der verschiedenen Nussproben lagen je nach Phase einmal höher und einmal niedriger.

4.2.5 Präinkubationstest ohne metabolische Aktivierung mit tBOOH als Mutagen

Auch beim Präinkubationstest mit tBOOH als Mutagen konnte wie schon beim Präinkubationstest mit H_2O_2 als Mutagen keine antioxidative Wirkung festgestellt werden. Lediglich die Gemischphase in der Konzentration von 0,2 g/mL von Pekan lag bei den gekochten Nussproben signifikant unter dem Wert der Kontrollprobe. Die Gemischphase von Haselnuss in der Konzentration von 0,4 g/mL lag signifikant über der Kontrollprobe. Alle anderen Werte waren entweder geringfügig über bzw. unter der Kontrollprobe.

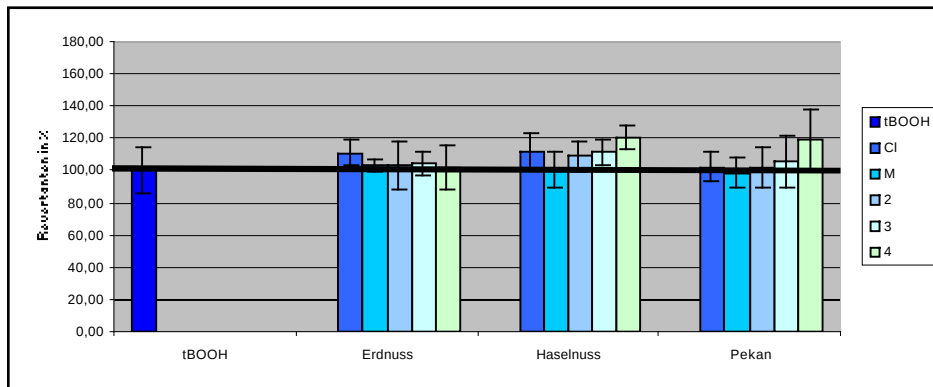


Abbildung 24: Präinkubationstest mit tBOOH und ungekochten Proben

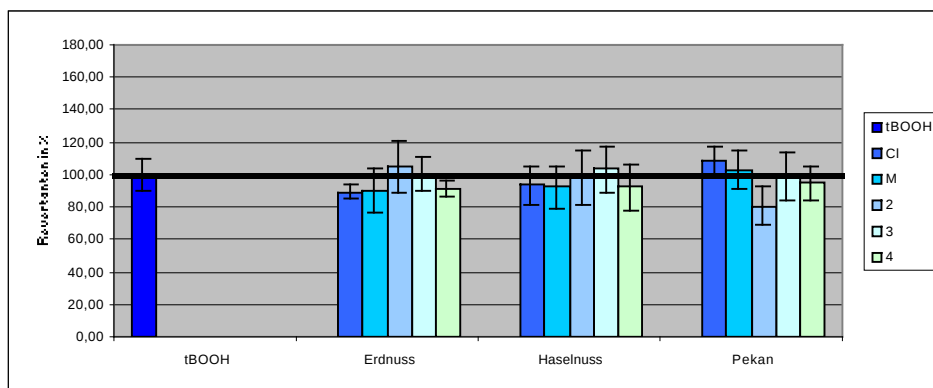


Abbildung 25: Präinkubationstest mit tBOOH und gekochten Proben

Im Rahmen der ANOVA konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Nussproben gezeigt werden. Alle Werte lagen eng zusammen.

Beim Vergleich der ungekochten mit den gekochten Proben kann man sehen, dass die gekochten Proben niedrigere Werte aufweisen. Einzige Ausnahme bildet hier die lipophile Phase von Pekan. Da liegt der Wert der gekochten Proben über dem Wert der ungekochten.

4.2.6 Präinkubationstest mit tBOOH mit metabolischer Aktivierung

Wie schon bei den vorherigen Tests konnte auch beim Präinkubationstest mit tBOOH und metabolischer Aktivierung keine antioxidative Wirkung festgestellt werden.

Alle Werte lagen entweder gering über bzw. unter dem Wert der Kontrollprobe. Es gab keine signifikanten Erhöhungen oder Senkungen.

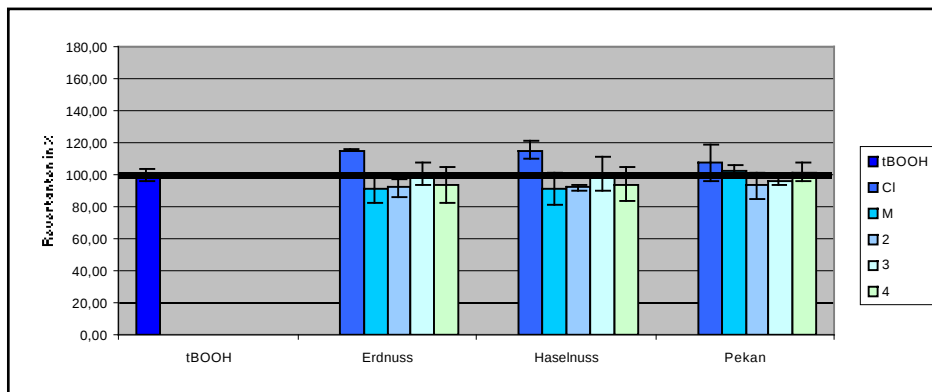


Abbildung 26: S9-Test mit tBOOH mit metabolischer Aktivierung und ungekochten Extrakten

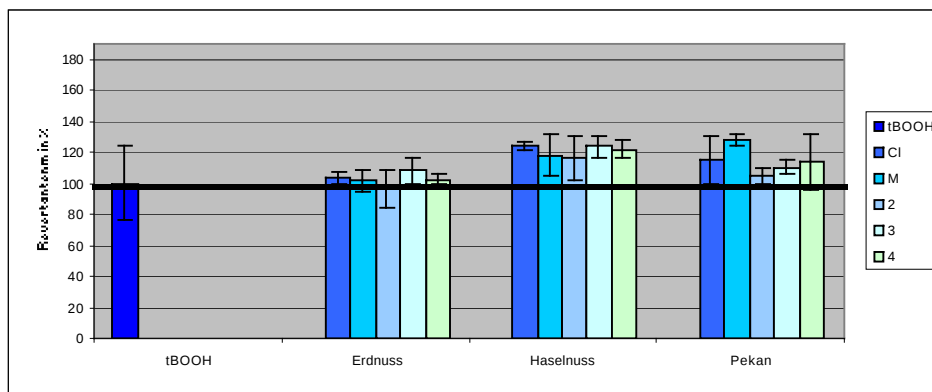


Abbildung 27: S9-Test mit tBOOH mit metabolischer Aktivierung und gekochten Extrakten

Durch die ANOVA konnte festgestellt werden, dass der Wert der hydrophilen Phase von Pekan signifikant über dem Wert von der Gemischphase 0,2 g/mL von Erdnuss lag. Alle anderen Werte haben sich nicht signifikant unterschieden.

Durch den Präinkubationstest mit metabolischer Wirkung konnte gezeigt werden, dass die ungekochten Proben die Revertantenzahlen deutlich besser

senken konnten als die gekochten Extrakte. Lediglich die lipophile Phase der ungekochten Erdnussprobe war deutlich höher als die der gekochten Probe.

4.2.7 Signifikanzen innerhalb des t-Tests

ungekocht	Std. H ₂ O ₂	Std. tBOOH	Prä. H ₂ O ₂	Prä. tBOOH	S9 H ₂ O ₂	S9 tBOOH
<u>Erdnuss</u>						
Fettph.	0,471	0,937	0,434	0,043	0,147	0,710
Wasserph.	0,020	0,239	0,004	0,193	0,438	0,875
0,2 g/mL	0,589	0,282	0,623	0,600	0,187	0,736
0,3 g/mL	0,091	0,355	0,007	0,949	0,146	0,452
0,4 g/mL	0,367	0,370	0,073	0,106	0,039	0,766
<u>Haselnuss</u>						
Fettph.	0,102	0,697	0,035	0,180	0,390	0,172
Wasserph.	0,045	0,135	0,001	0,246	0,125	0,193
0,2 g/mL	0,044	0,673	0,004	0,821	0,314	0,243
0,3 g/mL	0,020	0,188	0,000	0,725	0,345	0,121
0,4 g/mL	0,013	0,270	0,000	0,334	0,107	0,145
<u>Pekan</u>						
Fettph.	0,368	0,597	0,013	0,160	0,716	0,273
Wasserph.	0,040	0,055	0,002	0,669	0,963	0,128
0,2 g/mL	0,029	0,198	0,078	0,039	0,159	0,614
0,3 g/mL	0,061	0,172	0,013	0,827	0,966	0,373
0,4 g/mL	0,019	0,117	0,001	0,400	0,810	0,342

Tabelle 14: Signifikanzen innerhalb des t-Tests im Vergleich zur Positivkontrolle, ungekochte Proben

gekocht	Std. H ₂ O ₂	Std. tBOOH	Prä. H ₂ O ₂	Prä. tBOOH	S9 H ₂ O ₂	S9 tBOOH
<u>Erdnuss</u>						
Fettph.	0,082	0,641	0,067	0,139	0,391	0,012
Wasserph.	0,002	0,698	0,000	0,653	0,931	0,221
0,2 g/mL	0,004	0,103	0,122	0,735	0,420	0,129
0,3 g/mL	0,002	0,105	0,233	0,473	0,269	0,955
0,4 g/mL	0,002	0,174	0,648	0,837	0,442	0,584
<u>Haselnuss</u>						
Fettph.	0,002	0,65	0,774	0,144	0,057	0,755
Wasserph.	0,001	0,24	0,314	0,919	0,011	0,305
0,2 g/mL	0,042	0,375	0,341	0,226	0,072	0,391
0,3 g/mL	0,001	0,203	0,217	0,123	0,045	0,354
0,4 g/mL	0,003	0,101	0,055	0,015	0,018	0,672
<u>Pekan</u>						
Fettph.	0,001	0,061	0,414	0,740	0,993	0,360
Wasserph.	0,000	0,073	0,028	0,808	0,489	0,390
0,2 g/mL	0,034	0,928	0,671	0,866	0,384	0,303
0,3 g/mL	0,009	0,032	0,038	0,547	0,368	0,280
0,4 g/mL	0,027	0,107	0,115	0,091	0,132	0,688

Tabelle 15: Signifikanzen innerhalb des t-Tests im Vergleich zur Positivkontrolle, gekochte Proben

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse kann bei der Erdnuss und bei der Haselnuss ein teilweise antioxidatives Potential festgestellt werden. Die besten Ergebnisse konnten beim Platteninkubationstest mit H_2O_2 mit metabolischer Aktivierung erzielt werden. Tendenziell gab es nur geringfügige Unterschiede zwischen den rohen und den gekochten Proben. Man kann also davon ausgehen, dass es durch die thermische Behandlung zu keiner Beeinträchtigung der vorhandenen Inhaltsstoffe gekommen ist.

Epidemiologische Studien belegen, dass der Konsum von Nüssen positive Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem hat, was auf den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, Phytosterolen und Tocopherolen zurückzuführen ist. Neueste Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von Nussölen sogar eine noch bessere gesundheitsfördernde Wirkung besitzt als der Verzehr von rohen Nüssen. Das dürfte darauf zurückzuführen sein, dass Ballaststoffe durch ungesättigte Fettsäuren und/oder durch andere Komponenten, welche im Öl enthalten sind, ersetzt werden. Deshalb haben Miraliakbari und Shahidi [2008] in ihrer Studie den Lipidgehalt von Nussölen analysiert. Weiters wurde der Gehalt an Fettsäuren, Tocopherolen und Sterolen gemessen. Anhand dieser Studie lässt sich daher vermuten, dass der positive Effekt durch die lipophile Phase der Nuss ausgelöst wird.

Der Zusammenhang zwischen der gesamten antioxidativen Aktivität und einer Erkrankung infolge des oxidativen Stresses wird in vielen Studien untersucht. Besonders interessant sind dabei ballaststoffreiche Nahrungsmittel, in welchen phenolische Inhaltsstoffe sowohl in ihrer gebundenen als auch in ihrer freien Form vorkommen, wie es z.B. bei Nüssen der Fall ist. Pellegrini et. al. [2006] untersuchten in ihrer Studie, welchen Beitrag die gebundenen antioxidativ wirkenden Komponenten zur totalen antioxidativen Aktivität liefern. Der dabei

gemessene Gehalt an gebundenen Antioxidantien war relativ hoch und variierte, je nach angewandeter Methode, von 54% bei Haselnüssen bis zu 86% bei Erdnüssen. Außerdem wurden bei den drei verschiedenen Messmethoden jeweils andere Werte gemessen. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine der Methoden nur zur Messung der fettlöslichen Antioxidantien geeignet ist, welche in freier Form vorliegen, wie es bei Tocopherole der Fall ist. Während die andere Methode besser geeignet ist, wasserlösliche Antioxidanten, welche in freier Form vorkommen, zu bestimmen.

Ein Grossteil der antioxidativ wirkenden Komponenten ist in der Pellikula enthalten. Nüsse ohne Haut enthalten bis zu 50% weniger antioxidative Inhaltsstoffe als jene mit Haut. So lag auch der in Erdnussbutter gemessene Gehalt an Antioxidantien deutlich unter jenem Wert, welcher bei Erdnüssen gemessen wurde. Der antioxidative Gehalt von Nüssen ist wesentlich höher als jener von Nahrungsmitteln tierischer Herkunft wie etwa Fleisch, Käse oder Milch. Pflanzliche Lebensmittel sind daher eine bessere Quelle für natürliche Antioxidantien als tierische [BLOMHOFF et al., 2006].

Erwähnt werden sollte jedoch auch, dass es sich bei dem AMES-Test um eine in vitro Studie handelt. Die Ergebnisse sind nicht zu 100% auf den Menschen übertragbar.

5.1.1 Erdnüsse und ihr antioxidatives Potential

Obwohl Erdnüsse eine gute Quelle für natürliche Antioxidantien darstellen, konnte jedoch nur teilweise ein antioxidatives Potential nachgewiesen werden. Es gab keine nennenswerten Unterschiede zwischen den gekochten und den ungekochten Proben. Und auch die einzelnen Ergebnisse der beiden verwendeten Stressoren, H_2O_2 und tBOOH zeigten keine wesentlichen Unterschiede. Was jedoch beobachtet werden konnte, ist, dass die hydrophile Phase bei Verwendung von H_2O_2 als Stressor die Revertantenzahl besser senken konnte als die lipophile Phase. Beim Einsatz von tBOOH waren die Werte annähernd gleich.

Da in vielen Studien der Zusammenhang zwischen einem hohen Verzehr an antioxidantienreichen Lebensmitteln und einer niedrigeren Sterberate nachgewiesen werden konnte, kommt der Ermittlung von natürlichen Quellen, die reich an Antioxidantien sind, große Bedeutung zu. Die Literatur belegt, dass sowohl Erdnusskerne als auch –hüllen antioxidativ wirkende Bestandteile enthalten. Polyphenole stehen im Zusammenhang mit der antioxidativen Aktivität und spielen eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Lipidoxidation. Allerdings gibt es auch noch andere Inhaltsstoffe, welche antioxidative Aktivität besitzen. So untersuchten Huang et. al. [2003] eine Erdnussfraktion und vier daraus resultierende Subfraktionen hinsichtlich ihres antioxidativen Potentials. Die antioxidative Aktivität war in der ursprünglichen Fraktion höher als in den einzelnen Subfraktionen. Man kann daher davon ausgehen, dass alle Fraktionen der Nuss einen wesentlichen Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit liefern. Das Ergebniss zeigt jedoch eindeutig, dass die gebundenen Phytochemikalien in Nüssen einen wichtigen Beitrag zur gesamten antioxidativen Kapazität liefern. Phytochemikalien erreichen den Darm unverdaut und können so in ihrer nicht absorbierten Form von der Mikroflora zu verschiedenen Komponenten modifiziert werden, welche anschließend absorbiert werden. Phytochemikalien schützen so extrazellulär den Gastrointestinaltrakt und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Prävention von Darmkrebs.

5.1.2 Haselnüsse und ihr antioxidatives Potential

Es gibt Studien, über die antioxidative Aktivität von Nüssen und den daraus entstehenden Produkten. So gelten diese als eine gute Quelle für natürliche Antioxidantien und phenolische Inhaltsstoffe, welche wesentlich zur Erhaltung der Gesundheit beitragen können [SHAHIDI et al., 2007].

Bei dem von uns durchgeführten AMES-Test konnte jedoch nur ein geringes antioxidatives Potential nachgewiesen werden. Bei dem Test mit metabolischer Aktivierung mit H_2O_2 als Stressor konnten die Haselnussproben die

Revertantenzahlen im Vergleich mit der Kontrollprobe am besten senken. Bei diesem Test schnitt die Haselnuss deutlich besser ab als die anderen zwei Nusssorten.

Die ungekochten Haselnussproben schnitten geringfügig besser ab als die gekochten Proben. Man kann also davon ausgehen, dass bei der Haselnuss das antioxidative Potential durch das Kochen gesenkt wird.

Auch die Art der Extraktion hat einen wesentlichen Einfluss auf die antioxidativ wirkenden Inhaltsstoffe. In unterschiedlichen Studien wurden jeweils auch unterschiedliche antioxidative Aktivitäten gemessen. Die Werte in der von OLIVEIRA et al. (2008) durchgeführten Studie lagen deutlich unter denen, die in anderen Studien gemessen wurden. Zurückgeführt werden kann das auf die in dieser Studie verwendete Extraktionsmethode. Es wurde jene Methode angewendet, welche bereits im Vorfeld als jene Möglichkeit bestimmt wurde, welche für Proben mit einem hohen Fettgehalt geeignet ist. Wasser wurde als polares Lösungsmittel verwendet, um nicht polare Komponenten wie Fett zu entfernen. Wasser ist außerdem ein ungefährliches Lösungsmittel und somit gut geeignet, um antioxidative und antimikrobiellen Aktivitäten zu messen. Allerdings haben diese wasserhältigen Proben einen niedrigeren Gehalt an Antioxidantien als in der Fettfraktion, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären kann.

5.1.3 Pekannüsse und ihr antioxidatives Potential

Die Pekannüsse schnitten bei unseren Test verglichen mit den andern Nüssen am schlechtesten ab. Hier konnte kein antioxidatives Potential festgestellt werden. Es gab auch keine signifikanten Unterschiede bei den einzelnen Phasen.

Außerdem konnten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den gekochten und den ungekochten Proben festgestellt werden. Wie schon bei der Erdnuss geschrieben, kann man auch hier davon ausgehen, dass alle Fraktionen einen wesentlichen Beitrag zur totalen antioxidativen Aktivität liefern.

Miraliakbari und Shahidi [2008] untersuchten in ihrer Studie die oxidative Stabilität von Nussölen. Auch hier hat die verwendete Extraktionsmethode wesentlichen Einfluss auf den Gehalt an Antioxidantien. So ist bei der Extraktion mit Chloroform/Methanol der Gehalt an Tocopherolen höher als bei Verwendung von Hexan. Außerdem wurde der Gehalt an Tocopherolen bei ungeschälten und geschälten Nüssen bestimmt. Ein Schälen der Nüsse führte zu einer Senkung des Gesamtgehaltes an Tocopherolen. Was wiederum belegt, dass alle Teile der Nuss einen wichtigen Beitrag zur antioxidativen Aktivität liefern. In unseren Tests wurden ausschließlich ungeschälte Nüsse verwendet.

6 Schlussbetrachtung

Nüsse haben auch in der heutigen Zeit noch sehr oft das Image als „Dickmacher“. Aufgrund ihres hohen Fettgehaltes galten sie lange Zeit als reine Energielieferanten. Dieses negative Image muss jedoch als überholt betrachtet werden. Zahlreiche Studien haben in den vergangenen Jahren verschiedene Beweise geliefert, dass Nüsse durchwegs gesunde Lebensmittel sind. So können sie unter anderem das Risiko für eine Herz-Kreislauf-Erkrankung oder für Diabetes mellitus senken. Bis heute ist allerdings unklar, welche Inhaltsstoffe zu diesen positiven Effekten führen. Eine wichtige Rolle dürfte dabei die günstige Fettsäurezusammensetzung spielen, also der hohe Gehalt an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren und der geringe Gehalt an gesättigten Fettsäuren. Diese günstige Fettsäurezusammensetzung kann auch positiv zur Gewichtsreduktion beitragen.

Aber auch andere Inhaltsstoffe wie Vitamine, Ballaststoffe, Proteine, Mineralstoffe und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffen dürften einen wichtigen präventativen Beitrag leisten.

Nüsse gelten mittlerweile als ein wichtiger Bestandteil einer pflanzlichen Ernährungsweise. So haben die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), die „5 am Tag“ Kampagne und auch die Amerikanische Herzgesellschaft Nüsse in ihre Ernährungsempfehlungen aufgenommen. Die DGE empfiehlt eine Zufuhr von 25 g pro Tag.

In dieser Arbeit wurde der antioxidative Effekt der ganzen Nuss untersucht. Bis heute gibt es kaum Untersuchungen dazu. In den meisten Studien wurden lediglich die verschiedenen Nussinhaltsstoffe untersucht.

Für unsere Studie wurde der AMES-Test ausgewählt, da er eine einfache und rasche Methode darstellt um die antioxidative Wirkung zu detektieren.

Es wurden Extrakte von rohen und gekochten Haselnüssen, Erdnüssen und Pekannüssen hinsichtlich ihrer antioxidativen Eigenschaft mit Hilfe des AMES-Testes untersucht. Die Extraktion wurde nach der Methode von Folch (Folch et al., 1975) durchgeführt. In Folge kamen die hydrophilen und die lipophilen Phasen der einzelnen Nüsse zum Einsatz, sowie Gemische daraus in verschiedenen Konzentrationen (0,4 g/ml, 0,3 g/ml und 0,2 g/ml).

Als Stressoren wurden H_2O_2 und t-BOOH eingesetzt. Der Salmonella typhimurium Stamm TA102 wurde eingesetzt, um die antioxidative Wirkung zu messen.

Nur bei den Erdnüssen und den Haselnüssen konnte ein teilweise antioxidatives Potential nachgewiesen werden. Bei den Pekannüssen gab es kaum Senkungen der Revertantenzahlen und somit auch keine antioxidative Aktivität. Auch gab es keinen wesentlichen Unterschied zwischen den gekochten und den ungekochten Proben. Man kann daher davon ausgehen, dass durch die thermische Behandlung keine antioxidativ wirkenden Inhaltsstoffe zerstört wurden.

Ebenso keinen signifikanten Unterschied gab es bei den lipophilen und den hydrophilen Phasen. Dies lässt vermuten, dass beide Fraktionen einen wesentlichen Beitrag zu antioxidativen Aktivität liefern.

Haselnuss und Erdnuss schnitten bei unserem Test in etwa gleich ab. Bei beiden konnte jedoch nur ein geringes antioxidatives Potential festgestellt werden. Beim Präinkubationstest mit metabolischer Aktivierung und H_2O_2 als Stressor schnitten die ungekochten Haselnüsse am besten ab. Bei den gekochten Proben konnten die Haselnüsse und die Erdnüsse die Revertantenzahlen im Vergleich zu Kontrollprobe in etwa gleichem Ausmaß senken.

Die Pekannüsse wiesen bei dem von uns durchgeführten Test die schlechtesten Ergebnisse auf. Bei den ungekochten Proben lag die Revertantenzahl nur geringfügig unter der Kontrollprobe. Bei den gekochten Proben gab es eine Senkung der Revertantenzahl nur bei der Gemischphase von 0,2 mg/l. Alle anderen Werte waren annähernd gleich hoch, wie die der Kontrollprobe. Es konnte also keine antioxidative Wirkung festgestellt werden.

Bei Verwendung von t-BOOH als Stressor konnten die Revertantenzahlen beim Präinkubationstest ohne metabolische Aktivierung bei den gekochten Proben bei allen drei Nussarten deutlich besser gesenkt werden. Dafür war das Ergebnis der beiden Präinkubationstests mit metabolischer Wirkung sowohl bei den gekochten als auch bei den ungekochten Proben deutlich schlechter. Hier konnten die Revertantenzahlen nur bei den ungekochten Erdnuss- und Haselnussproben minimal gesenkt werden. Bei den gekochten Proben waren die Revertantenzahlen im Vergleich zur Kontrollprobe entweder genauso hoch oder lagen sogar darüber. Bei Verwendung von t-BOOH kam es also vermehrt zu prooxidativen Effekten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Erdnüsse und Haselnüsse teilweise antioxidatives Potential gezeigt haben. Pekannüsse schnitten bei unseren Test vergleichsweise am schlechtesten ab. Es lässt sich kein eindeutiges Muster erkennen, woraus man schließen könnte, welche Phase die höchste antioxidative Aktivität besitzt. Man kann also davon ausgehen, dass sowohl die lipophile als auch die hydrophile Phase wichtige Bestandteile enthalten, welche zum antioxidativen Potential beitragen. Obwohl keine der drei Nussarten in allen Tests antioxidativ wirkte, kann man trotzdem davon ausgehen, dass Nüsse einen wertvollen Beitrag zur Erhaltung der Gesundheit beitragen können.

Auf jedenfall sind weitere Untersuchung auf diesem Gebiet sinnvoll, vor allem solche, welche nicht nur einzelne Inhaltsstoffe untersuchen, sondern die Wirkung der Nuss als ganzes erforschen. Da jedoch bis heute nicht genau bekannt ist, welche Nussinhaltsstoffe für die positiven Effekte verantwortlich

sind, sind auch Studien der einzelnen Inhaltsstoffe sehr wichtig, um viele offene Fragen zu klären. Außerdem ist zu erwähnen, dass es sich bei den Ergebnissen um in vitro Studien handelt, welche nicht 1:1 auf den Menschen übertragen werden können.

7 Zusammenfassung

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Nüsse einen positiven Einfluss auf die Erhaltung der Gesundheit haben. Viele Studien haben sich mit der Fettsäurezusammensetzung befasst. Nüsse weisen eine günstige Fettsäurezusammensetzung mit einem hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und einem geringen Gehalt an gesättigten Fettsäuren auf. Diese dürfte eine wesentliche Rolle in der Prävention von Krankheiten spielen. Allerdings ist nicht genau bekannt, ob diese positiven Effekte tatsächlich auf die günstige Fettsäurezusammensetzung zurückzuführen sind. Einen wichtigen Betrag liefern auch weitere Inhaltsstoffe wie Proteine, Ballaststoffe, Vitamine und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Vor allem aufgrund des Gehaltes an Polyphenolen und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wird ein antioxidatives Potential vermutet.

In dieser Arbeit wurde die antioxidative Wirkung von Haselnüssen, Erdnüssen und Pekannüssen untersucht. Dabei kamen verschiedene Phasen zum Einsatz. Einerseits die lipophile Phase, andererseits die hydrophile Phase sowie Gemische daraus in verschiedenen Konzentrationen (0,4 mg/l, 0,3 mg/l, 0,2 mg/l). Als Stressoren kamen H_2O_2 und t-BOOH zum Einsatz. Zur Messung der antioxidativen Wirkung von Nüssen kam der *Salmonella typhimurium* Stamm TA102 zum Einsatz. Es gab drei verschiedene Testansätze, nämlich den Standard-Platten-Inkorporationstest, den Präinkubationstest ohne metabolische Aktivierung und den Präinkubationstest mit metabolischer Aktivierung.

Bei Hasel- und Erdnüssen konnte ein teilweise antioxidatives Potential festgestellt werden. Bei Pekannüssen kam es zu keiner Senkung der Revertantenzahlen und somit konnte auch kein antioxidatives Potential erkannt werden. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen sowie bei den gekochten und ungekochten Proben. Man kann daher davon ausgehen, dass alle Fraktionen der Nuss einen wichtigen Beitrag zum antioxidativen Potential liefern und, dass das antioxidative Potential durch thermische Behandlungen nicht gesenkt wird.

8 Summary

Dietary nut intake has been associated with a reduced risk of diseases, such as coronary heart disease. Nuts have a good fatty acid composition, most of them are highly rich in polyunsaturated fatty acids and the amount of saturated fatty acids is low. Due to their fatty acid pattern, nuts play a major role in human nutrition and health. However, it is not proven, whether these positive effects are only related to the favourable consistency of fatty acids. Contents of nuts like proteins, dietary fibers, vitamins and secondary plant ingredients make also a major contribution to the prevention of diseases. Due to the high amount of polyphenoles and secondary plant ingredients it is assumed that nuts have a considerable antioxidant potential.

In this study the antioxidant potential of hazelnuts, peanuts and pecans was analysed. The procedure contains different phases of exploration: first the lipophilic phase and secondly the hydrophilic phase as well as mixtures of various levels of concentration (0,4 mg/l, 0,3 mg/l and 0,2 mg/l). Hydrogen peroxide or tertiärbutyl hydroperoxide was used as oxidant stressor. The *Salmonella thyphimurium* tester strain TA 102 has been used to measure the antioxidant effect of nuts. The investigation procedure contained three different test approaches: first the standard plate incorporation assay, secondly the preincubation assay without metabolic activation and finally the preincubation assay with metabolic activation.

The results of the investigation procedures showed that both, hazelnuts as well as peanuts have partly antioxidant potential. However pecans didn't show this antioxidant potential as no decrease in the amount of revertants was detected. Furthermore no significant differences between the individual investigation phases of both, the cooked and the uncooked samples were noticed. In conclusion, all fractions of nuts did show a considerable positive antioxidant effect.

9 Literaturverzeichnis

AHA Scientific Statement: Summary of the Scientific Conference on Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Health. Journal of Nutrition. 2001; 131:1322-1326

BLOMHOFF R, CARLSEN MH, ANDERSEN LF, JACOBS JR DR. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. In: British Journal of Nutrition, 2006; 96 (2):S52-S60

BRUFAU B., BOATELLA J., RAFAECAS M. Nuts: source of energy and macronutrients. British Journal of Nutrition, 2006; 96 (2): S24-S28

BUB A, STRACKE BA. Nüsse in der Ernährung des Menschen. NUCIS e.V. Deutschland. Quelle: http://www.nucis.de/PDF/Nuesse_in_der_Ernaehrung_des_Menschen_2005.pdf (Zugriff: 10.5.2008)

CARSTANJEN U. Antimutagene Eigenschaften von Haselnuss-, Pekannuss-, und Erdnussextrakten im Salmonella typhimurium assay. Diplomarbeit (2007)

CLIFFORD MN, SCALBERT A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80: (1118-1125)

CRESPO JF., JAMES JM., FERNANDEZ-RODRIGUEZ C., RODRIGUEZ J. Food Allergy: nuts and tree nuts. British Journal of Nutrition, 2006; 96, Suppl. 2: S95-S102

DEVIPRIYA N, SRINIVASAN M, SUDHEER AR, MENON VP. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. Singapore Med j, 2007, 48 (4): 311

ELMADFA I, LEITZMANN C. Vitamin E. In: Ernährung des Menschen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1998; 309-318

GAOX, WILDE P, LICHTENSTEIN A, BERMUDEZ O, TUCKER K. The Maximal Amount of Dietary α -Tocopherol Intake. Journal of Nutrition, 2006;136 (4): 1021-6

GARCIA-LORDA P, RANGIL IM, SALAS-SALVADO J. Nut Consumption, body weight and insulin resistance. European Journal of Clinical Nutrition, 2003; 57 (1): S8-S11

GERHÄUSER C. Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe.
http://www.dgem.de/termine/ern2001/dia_gerh.pdf (Zugriff am 5.10.2008)

GRIEL E, EISSENSTAT B, JUTURU V, HSIEH G, KRIS-ETHERTON P. Improved Diet Quality with Peanut Consumption. Journal of the American College of Nutrition 2004; 33; 6: 660-668

HAHN A, STRÖHLE A, WOLTERS M. Sekundäre Pflanzenstoffe – die neuen „Vitamine“? Deutsche Apotheker Zeitung, 2005; 145: 73-81

HARNLY JM, DOHERTY RF, BEECHER GR, HOLDEN JM, HAYTOWITZ DB, BHAGWAT S, GEBHARDT S. Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables and Nuts. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 2006; 54: 9966-9977

HOLLMAN P-CH, ARTS I-CW. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. Journal of Science of Food and Agriculture, 2000; 80: 1081-1093

HUANG SC, YEN GC, CHANG LW, YEN WJ, DUH PD. Identification of an Antioxidant, Ethyl Protocatechuate, in Peanut Seed Testa. Journal of Agriculture and Food Chemistry; 2003; 51: 2380-2383

ITO H, IGUCHI A, HATANO T. Identification of Urinary and Intestinal Bacterial Metabolites of Ellagitannin Geraniin in Rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56: 393-400

JIANG R, MANSON JE, STAMPFER MJ, LIU S, WILLET WC, HU FB. Nut and Peanut Butter Consumption and Risk of Type 2 Diabetes in Women. *The Journal of American Medical Association*, 2002; 288(20): 2554-2560

Knack die Nuss – Nüsse sind besser als ihr Ruf. DGE aktuell 10/2002; <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=168> (Zugriff am 10.10.2008)

LAUER I, FOETISCH K, KOLARICH D, BALLMER-WEBER BK, CONTI A, ALTMANN F, VIETHS S, SCHEURER S. Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochemical Journal*, 2004; 383: 327-334

KUNZ C, SCHULZ S. Funktionelle Lebensmittel. *Chem Unserer Zeit*, 2004, 38: 120-127

KORNSTEINER M, WAGNER KH, ELMADFA I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 2006; 98 (2): 381-387

LAIRON D, ARNAULT N, BERTRAIS S, PLANELLS R, CLERO E, HERCBERG S, BOUTRON-ROUAULT MC. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, Vol. 82 (6): 1185-1194

MAID-KOHNERT U. Lexikon der Ernährung. Spektrum Akademischer Verlag, 2002

MARON DM, AMES BN. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Handbook of Mutagenicity Test Procedures (Kilbey BJL, M.; Ramel, C.; Hrsg). Elsevier Science Publisher BV, 1984: 93-140.

MIRALIAKBARI H, SHAHIDI F. Lipid Class Compositions, Tocopherols, and Sterols of Tree Nut Oils Extracted with Different Solvents. Journal of Food Lipids, 2008 (15): 81-96

MIRALIAKBARI H, SHAHIDI F. Oxidative Stability of Tree Nut Oils. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2008 (56): 4751-4759

MORTELSMANN K, ZEIGER E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat Res 2000; 455: 29-60

MUKUDDER-PETERSEN J, OOSTHUIZEN J, JERLING J. A Systematic Review of the Effects of Nuts on Blood Lipid Profiles in Humans. Journal of Nutrition, 2005; 135: 2082-2089

OLIVEIRA I, SOUSA A, MORAIS JS, FERREIRA I C.F.R, BENTO A, ESTEVINHO L, PEREIRA JA. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. In: Food and Chemical Toxicology, 2008, 46 (1801-1807)

PELLEGRINI N, SERAFINI M, SALVATORE S, DEL RIO D, BIANCHI M; BRIGHENTI F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. Mol Nutr Food Res, 2006, 50 (1030-1038)

POKORNY J, YANISHLIEVA N, GORDON M. Sources of natural antioxidants. In: Antioxidants in food. Verlag Woodhead Publishing, 2001: 171-172

SENTI G, BALLMER-WEBER BK, WÜTHERICH B. Nüsse, Samen und Kerne aus allergologischer Sicht. Schweiz. Med. Wochenschr. 2000; 130: 1795-1804

SHAHIDI F, ALASALVAR C, LIYANA-PATHIRANA C. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. J. Agric. Food Che. 2007; 55 (4): 1212-1220

SCHERZ S.; SENSER F. (1994): Food Composition and Nutrition Tables

TSAI CJ, LEITZMANN M, HU F, WILLET W, GIOVANNUCCI E. Frequent nut consumption and decreased risk of cholecystectomy in women. American Journal of Clinical Nutrition. 2004; 80 (1): 76-81

VENKATACHALAM M., SATHE SK. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. In: Journal of Agriculture Food Chemistry. 2006; 54 (13): 4705-4714

WATZL B, RECHKEMMER G. Flavonoide. In: Ernährungsumschau. 2001; 12: 49

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Geburtsdatum	22. August 1978
Geburtsort	Wien

Ausbildung

1984 bis 1988	Volksschule in Wien
1988 bis 1992	AHS in Wien
1992 bis 1997	Handelsakademie-Floridsdorf; Vienna Business School
seit Oktober 1998	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

Berufserfahrung im Rahmen des Studiums

Februar 2007	Praktikum bei der AKE im Rahmen des Projektes „Nutrition Day in European Hospitals“
Jän. 2005 – Apr. 2005	Praktikum bei der Verkehrsbüro Kulinarik (CMS, Vitana, Gustana)