

Reduktion des zahnschädigenden Potenzials von zuckerhaltigen Fruchtgetränken durch Reformulierung mit antikariogenen Polyphenolen

Karin Schwarz und Ralf Schweiggert

Forschungsstellen:

Institut für Humanernährung
und Lebensmittelkunde
Universität Kiel (FS I)

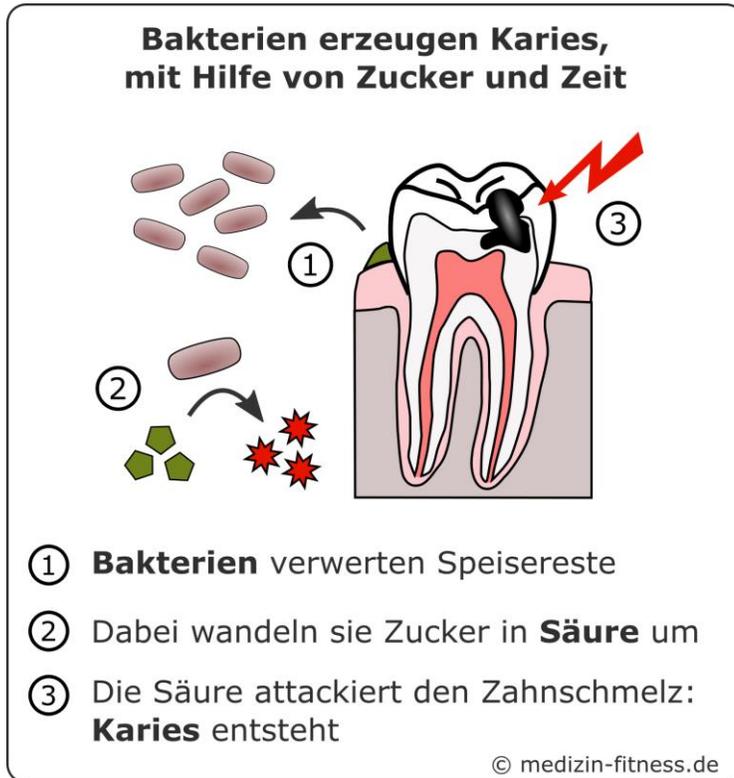
Institut für Getränkeforschung
Hochschule Geisenheim (FS II)

in Kooperation mit
Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie,
UKSH Campus Kiel



AiF 20741 N
Antikariogene Polyphenole

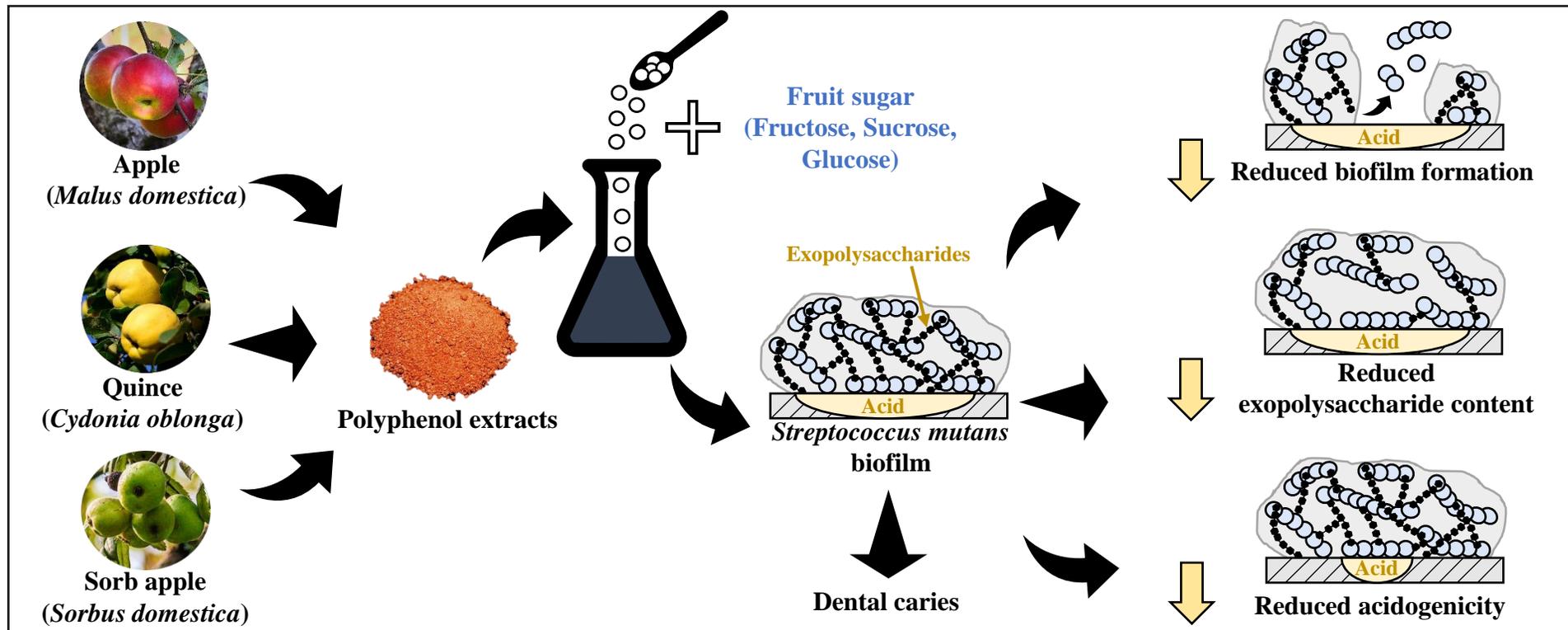
Karies ist eine weitverbreitete ernährungsbedingte Erkrankung



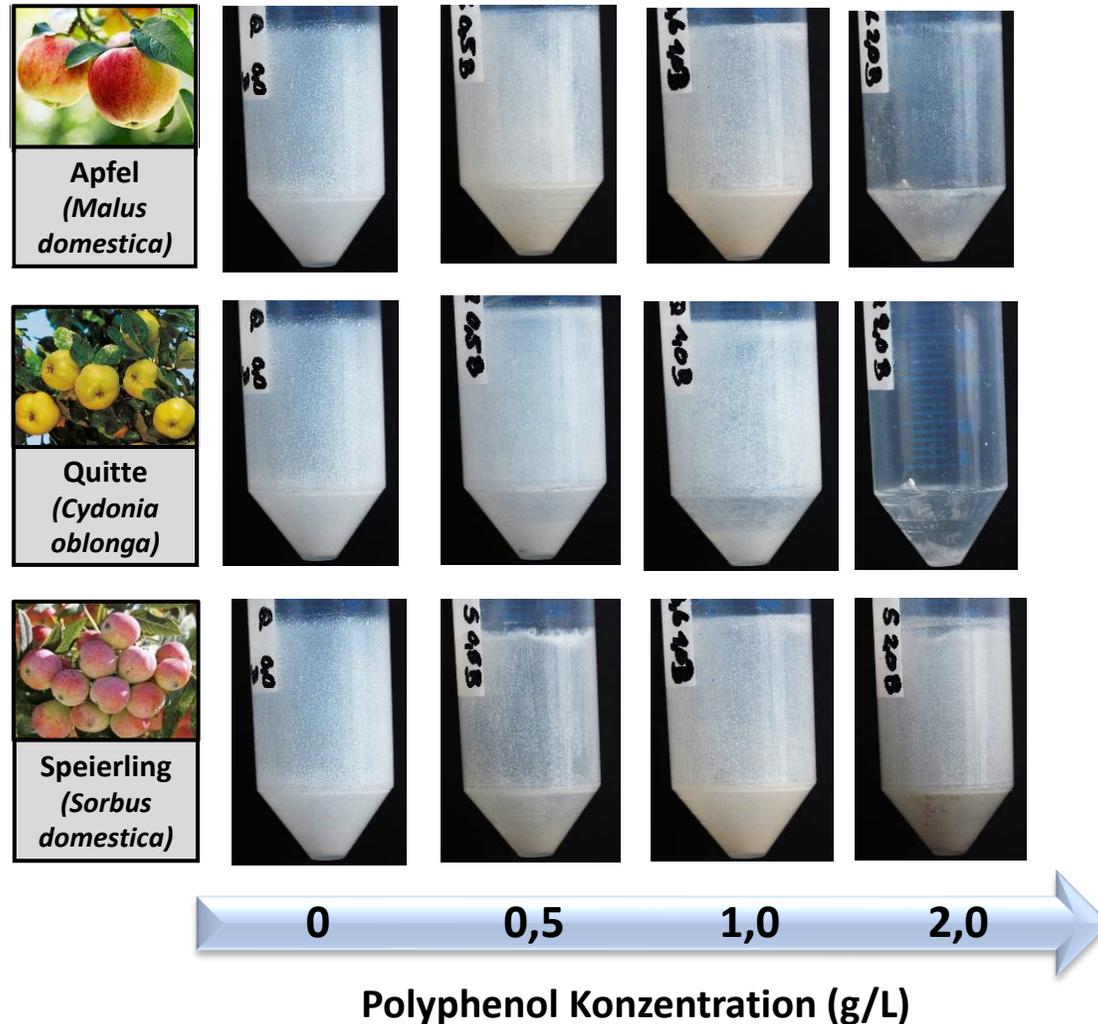
Karies	
3-Jährige	10–17 %
6-7-Jährige	40–60 % (seit 1994 um 40% gesunken)
12-Jährige	20% (seit 1994 um 80% gesunken)
Erwachsene	95% von Karies oder Parodontitis betroffen

Zahnerosion	
12-Jährige	18 %
Erwachsene	45 %
Senioren	60 %

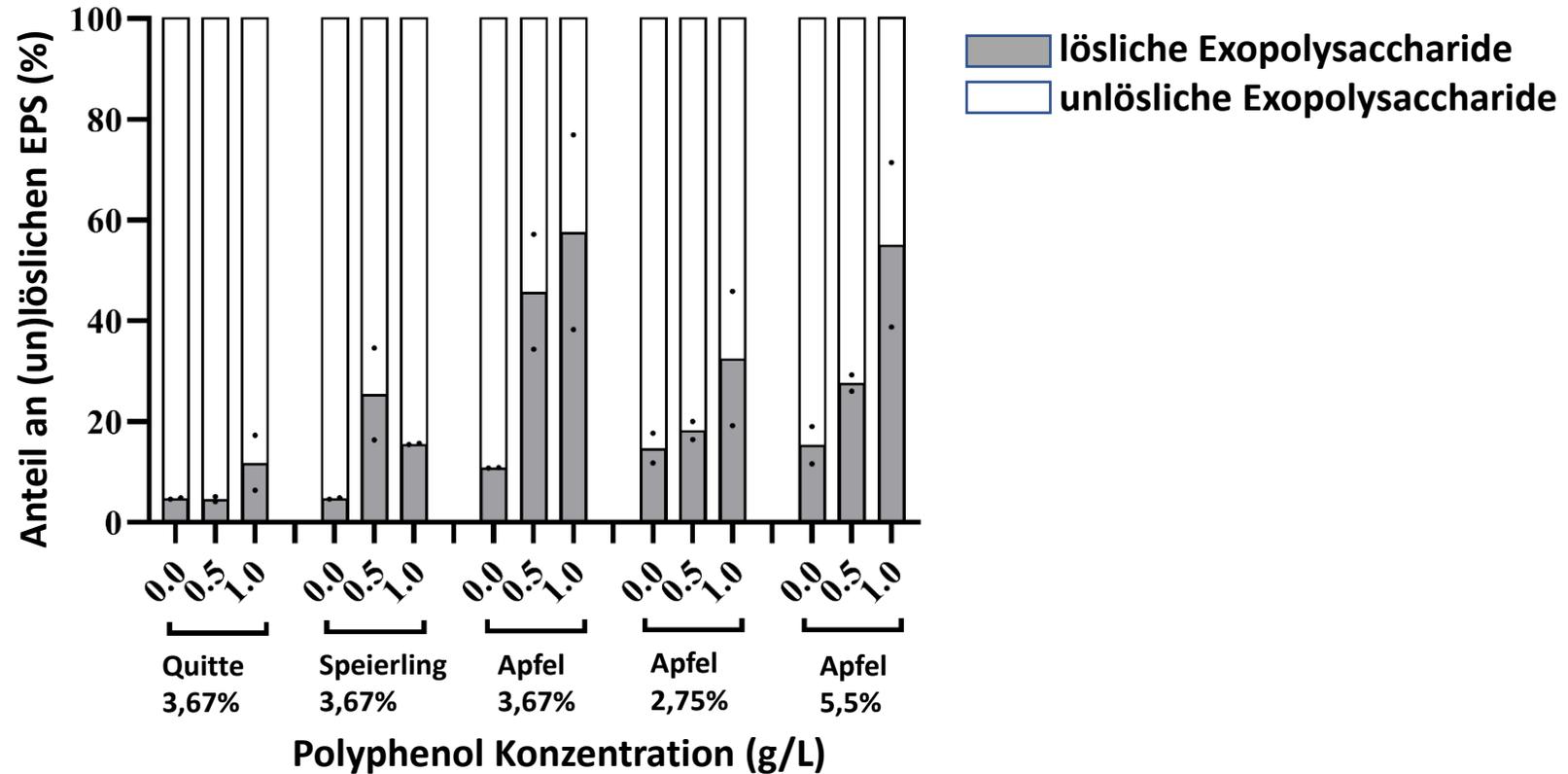
Kann durch eine Erhöhung des Gehaltes an Polyphenolen die kariogene Wirkung in einem Fruchtgetränk mit ca. 5 % Zucker reduziert werden?



Einfluss von Polyphenolen aus Apfel, Quitte und Speierling auf die Biofilmbildung von *Streptococcus mutans* in Gegenwart von 3,7% Zucker



Einfluss von Polyphenolen aus Apfel, Quitte und Speierling auf die Bildung von löslichen und unlöslichen Exopolysacchariden in *Streptococcus mutans* Biofilm



Reduktion des zahnschädigenden Potenzials von zuckerhaltigen Fruchtgetränken durch Reformulierung mit antikariogenen Polyphenolen

Zielsetzungen

- Herstellung von Saftmischungen mit hohem Polyphenolgehalt und unterschiedlichen Polyphenolprofilen
- Optimierung der sensorischen Eigenschaften
- Nachweis von karieshemmenden Wirkungen (in vitro / in situ)



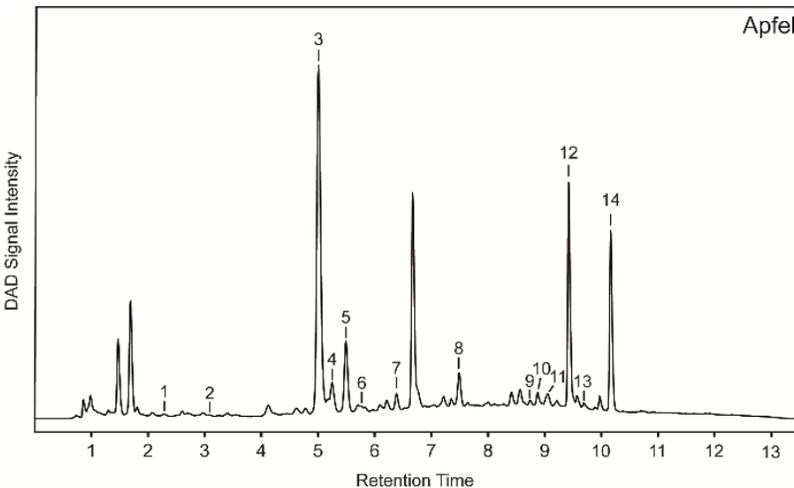
Auswahl der Rohware

Herstellung von Fruchtsäften aus polyphenolreichen Äpfeln, Quitten und Früchten des Speierlings

- Analyse der Polyphenolprofile via RP-UHPLC-DAD

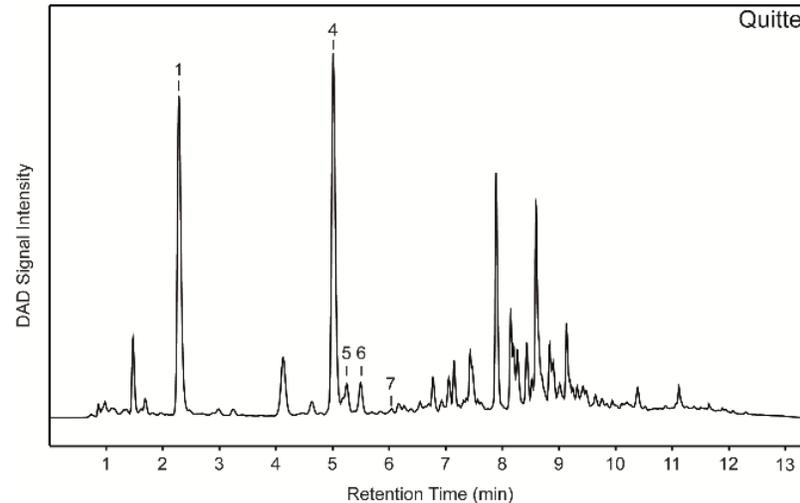
Apfel

Hohe Gehalte an Chlorogensäure, Flavan-3-ole und Phloretinglykoside



Quitte

Hohe Gehalte an Chlorogensäure und Neochlorogensäure



Speierling

Hohe Gehalte an Neochlorogensäure und polymeren Flavan-3-olen

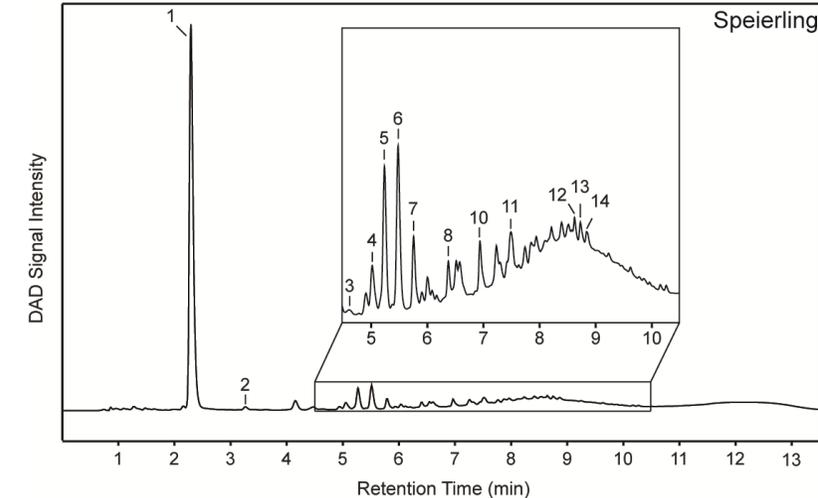


Abb. 1 RP-UHPLC Chromatogramm von Fruchtsäften aus Apfel (Links), Quitte (Mitte) und Speierling (Rechts) bei 280 nm.

Herstellung der Studiengetränke

Arbeitsschritte

Herstellung von Apfelsaft und -halbkonzentrat

- Basis für die Studiengetränke und für die Gewinnung der Polyphenolextrakte

Polyphenolextraktion

- Gewinnung von 800 g Polyphenolextrakt und 171 L polyphenolfreiem Apfelsaft

Ausmischen der Studiengetränke

- Zielgrößen: ca. 50 g/L Gesamtzucker- und 1,5 bzw. 0,0 g/L Gesamtphenolgehalte

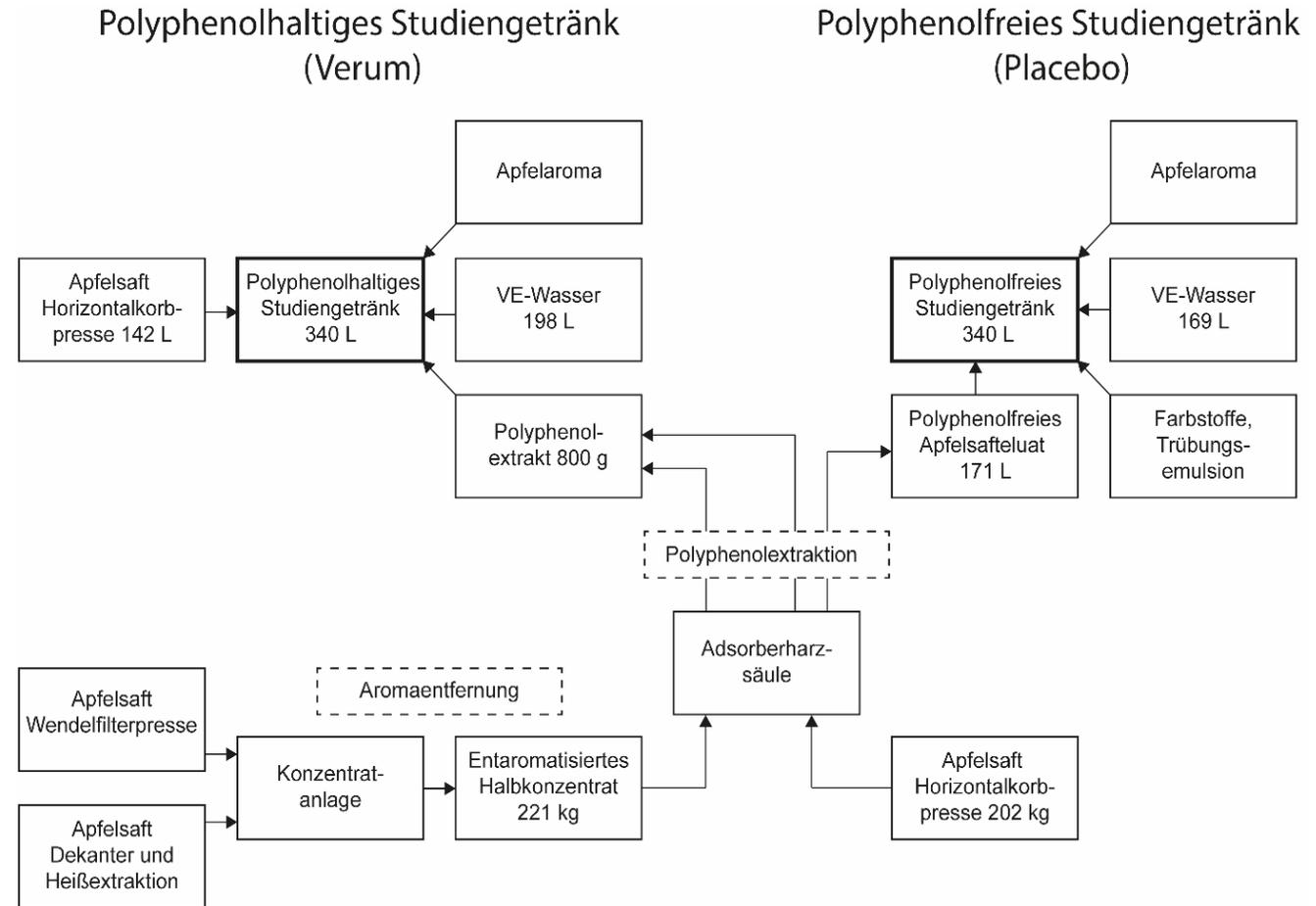


Abb. 1 Herstellungsschema der polyphenolhaltigen und -freien Studiengetränke

Zusammensetzung der Studiengetränke

Tab. 1 Zucker-, Säure- und Gesamtphenolgehalte der polyphenolhaltigen und -freien Studiengetränke

	Polyphenolhaltiges Studiengetränk (Verum)	Polyphenolfreies Studiengetränk (Placebo)
Σ Zucker [g/L]	53,10	54,40
Glucose [g/L]	15,00	15,00
Fructose [g/L]	35,20	35,70
Saccharose [g/L]	2,90	3,70
Lösliche Trockensubstanz [°Brix]	6,36	6,25
pH-Wert [-]	3,20	3,25
Gesamtsäure [g/L]	3,79	3,58
Gesamtphenole [g/L]	1,40	0,04



Polyphenolanalytik

RP-UHPLC-DAD-HR-MS/MS

Identifizierung und Quantifizierung

- Mono- und dimere Flavan-3-ole
- Dihydrochalcone
- Hydroxyzimtsäuren
- Flavonole

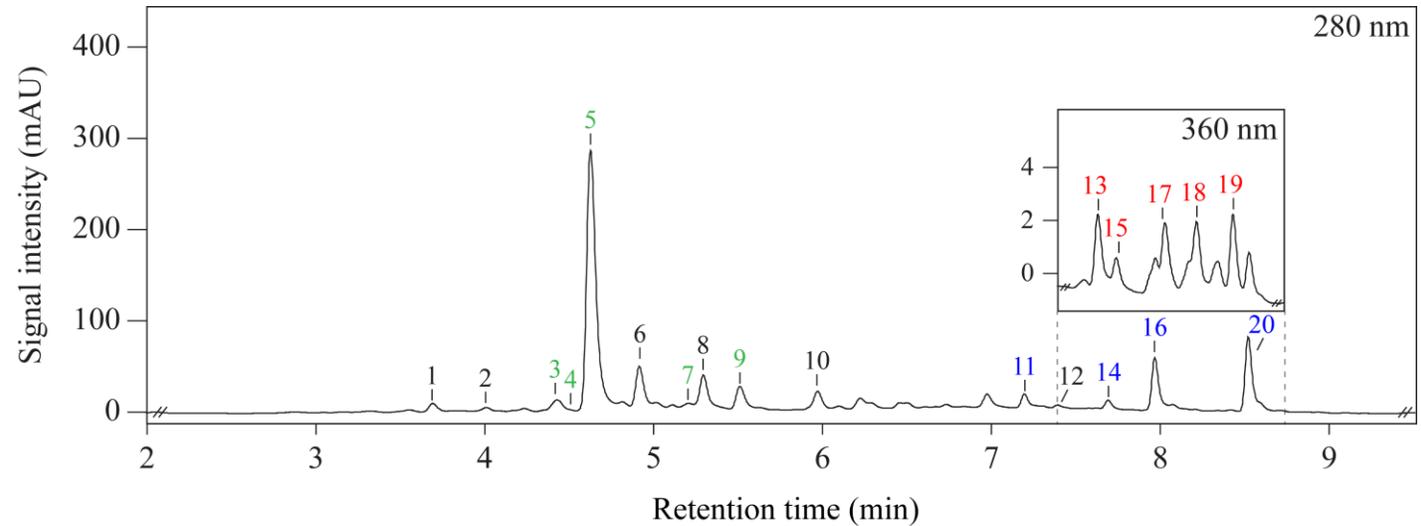


Abb. 2 RP-UHPLC-DAD Chromatogramm von Polyphenolen in Apfelsaft bei 280 nm.

HILIC-FLD-DAD-HR-MS/MS

Identifizierung und Quantifizierung

- Oligomere Flavan-3-ole
Polymerisierungsgrad (DP) 3-8

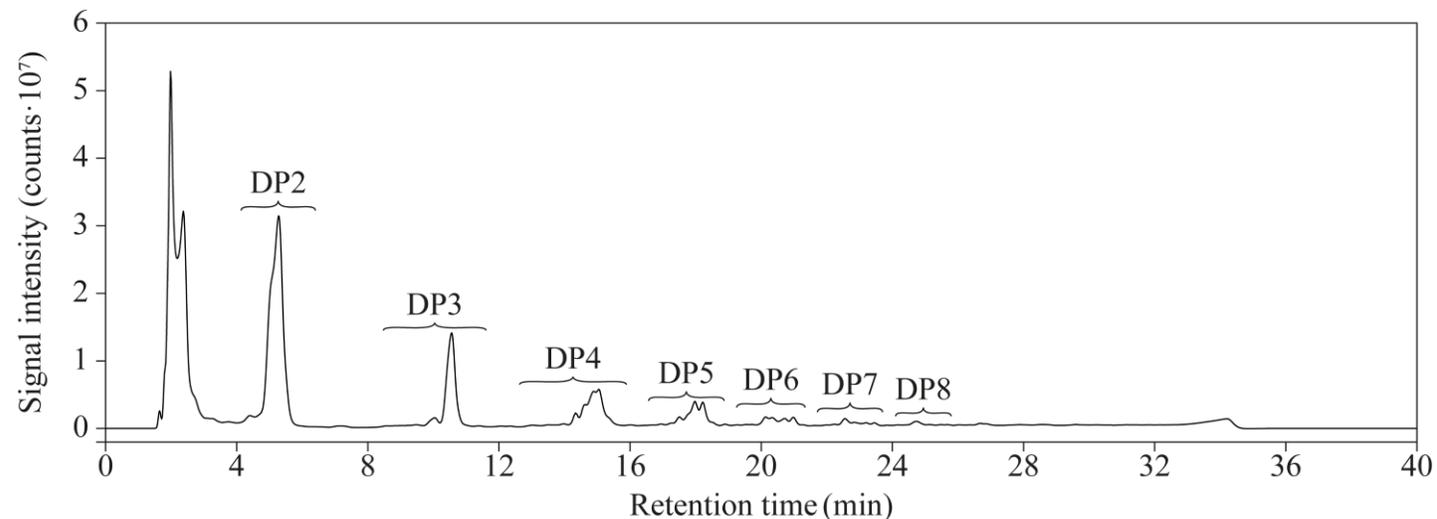


Abb. 3 HILIC-FLD Chromatogramm von Flavan-3-olen in Apfelsaft bei 230/321 nm.

Polyphenolprofil und -stabilität

- Identifikation und Quantifikation von 25 unterschiedlichen Polyphenolen

Flavan-3-ole (20 %): (Epi)catechin und Procyanidine (DP 2-7)

Dihydrochalcone (23%): Phlorizin, Phloretin-2'-O-xyloglucosid

Hydroxyzimtsäuren (55 %): Chlorogensäure

Flavonole (2 %): Quercetin-3-O-glycoside

- Polyphenolverlust nach 6 Monaten bei 20 °C betrug unter 10 %

Tab. 2 Gehalte an phenolischen Verbindungen im Studiengetränk über eine Lagerzeit von 6 Monaten bei Raumtemperatur (20 °C)

Polyphenole	Konzentration [mg/L]			
	0 Monate	2 Monate	4 Monate	6 Monate
ΣFlavan-3-ole	138,5 ± 0,7	122,3 ± 0,0	121,4 ± 0,5	119,4 ± 0,4
ΣDihydrochalcone	162,9 ± 0,3	157,8 ± 0,2	156,1 ± 0,1	149,5 ± 0,4
ΣHydroxyzimtsäuren	389,7 ± 0,6	380,1 ± 0,3	376,5 ± 0,3	360,0 ± 0,4
ΣFlavonole	15,9 ± 0,1	14,9 ± 0,1	14,8 ± 0,0	14,1 ± 0,0
ΣPolyphenole UHPLC	707,0 ± 0,3	675,1 ± 0,3	668,7 ± 0,0	643,0 ± 0,5
ΣGesamtphenole Folin-Ciocalteu-Assay	1414,0 ± 0,5	1289,0 ± 0,5	1293,0 ± 0,0	1281,0 ± 0,5

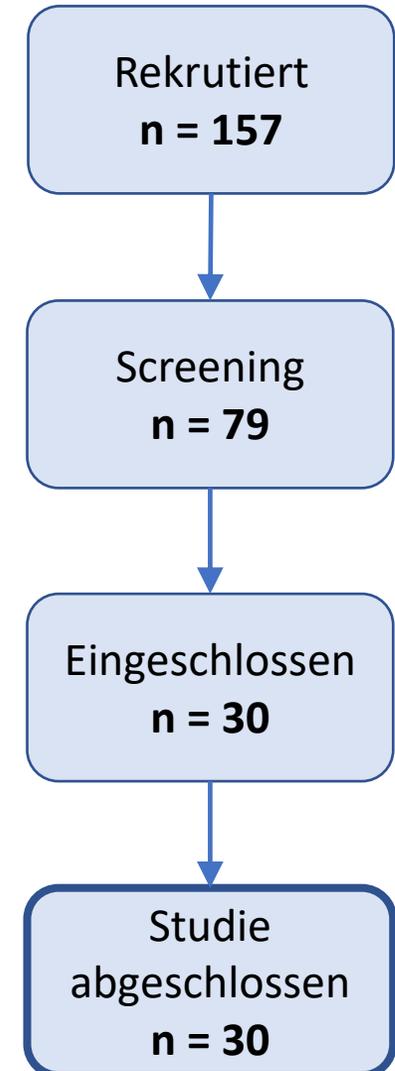
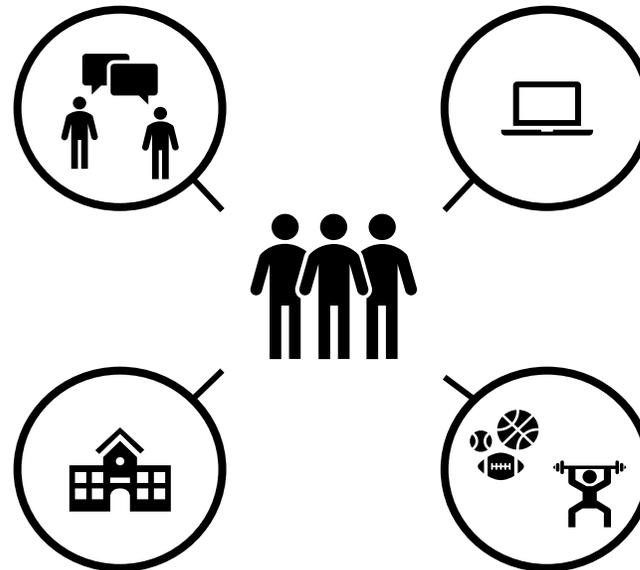
Design der humanen Interventionsstudie

Studienzeitraum: ca. 8 Monate

- Randomisierte Interventionsstudie im Cross-over Design
- 30 gesunde männliche Probanden, 21-55 Jahre, BMI 18.5-29.5

Ausschlusskriterien:

- Stoffwechsel- oder endokrine Erkrankungen
- Malabsorptionssyndrom
- Allergien
- Rauchen, Alkohol- und Drogenmissbrauch
- Nahrungsergänzungsmittel
- Medikamente (z.B. Antidepressiva, Antibiotika)
- Fruktoseintoleranz
- ...



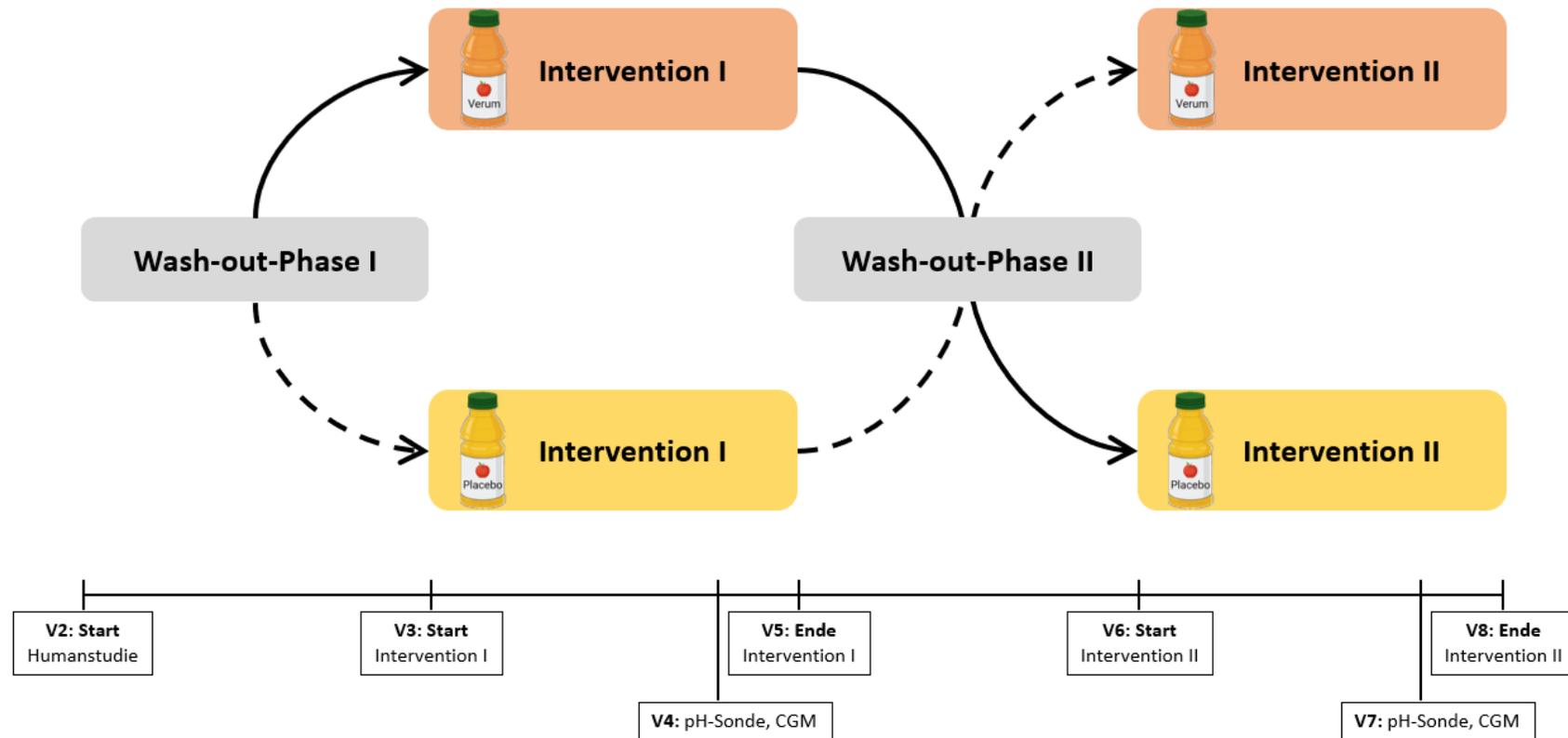
Design der humanen Interventionsstudie

Studienzeitraum: ca. 8 Monate

- Randomisierte Interventionsstudie im Cross-over Design
- 30 gesunde männliche Probanden, 21-55 Jahre, BMI 18.5-29.5

Ausschlusskriterien:

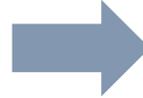
- Stoffwechsel- oder endokrine Erkrankungen
- Malabsorptionssyndrom
- Allergien
- Rauchen, Alkohol- und Drogenmissbrauch
- Nahrungsergänzungsmittel
- Medikamente (z.B. Antidepressiva, Antibiotika)
- Fruktoseintoleranz
- ...



Analysen

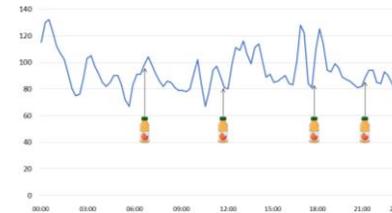
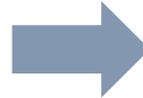
1. Einfluss auf die Zahngesundheit

- Läsionstiefe
- pH-Wert (Biofilm)



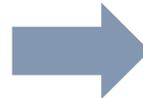
2. Einfluss auf das Blutglucoselevel

- Continuous Glucose Monitoring

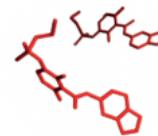


3. Einfluss auf das Metabolom

- Abbauprodukte des Saftes
- Systemische Effekte
- Blutplasma, Urin, Speichel

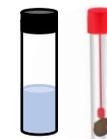


metabolomics



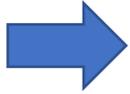
4. Einfluss auf die orale- und Darmmikrobiota

- Sequenzierung
- Koloniebildende Einheiten

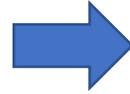


Polyphenol-Abbauprodukte im Metabolom des Urins

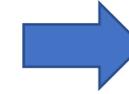
Probanden



Probenmatrix



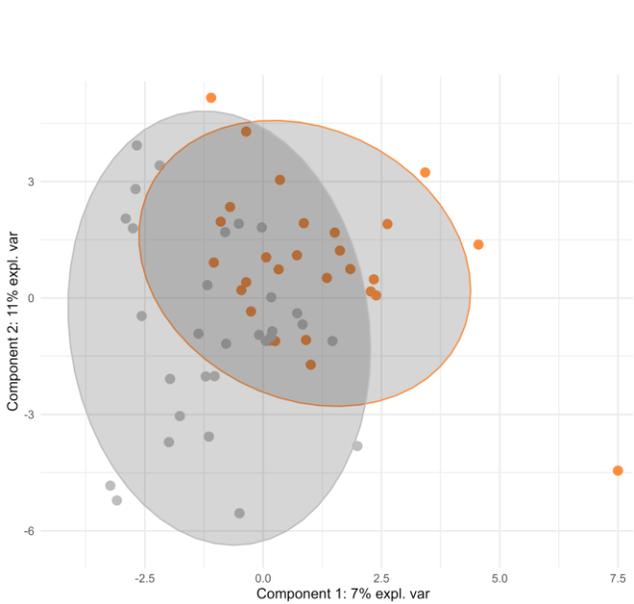
FT-ICR-MS



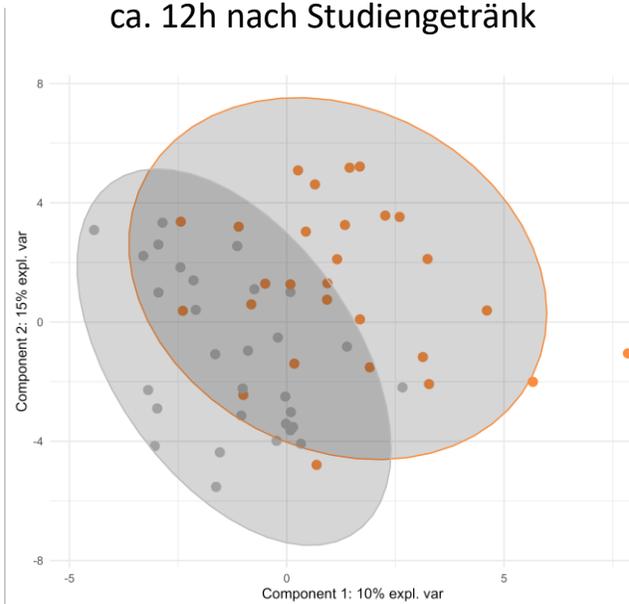
Datenanalyse



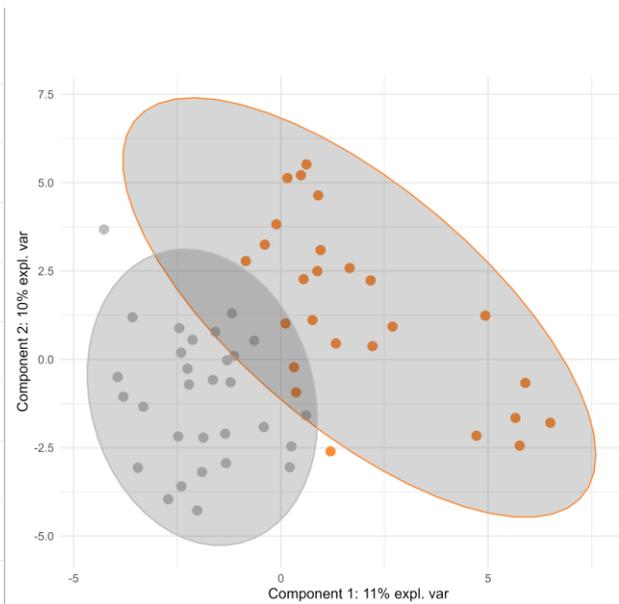
Start der Studie



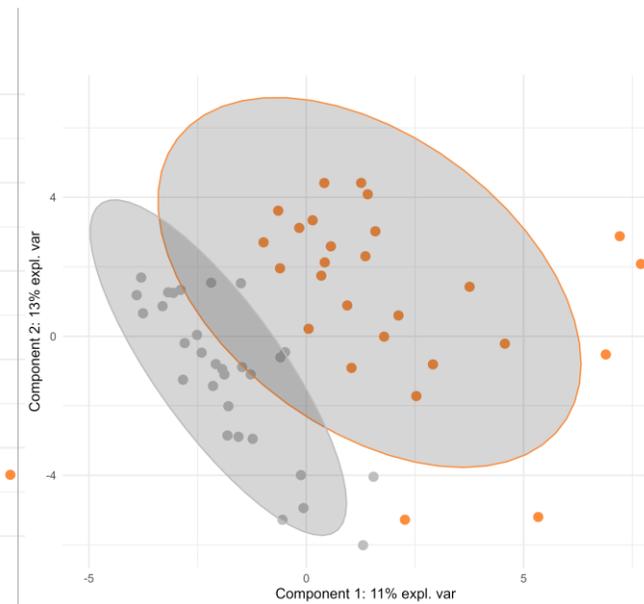
Ende der Studie
ca. 12h nach Studiengetränk



1h nach Studiengetränk



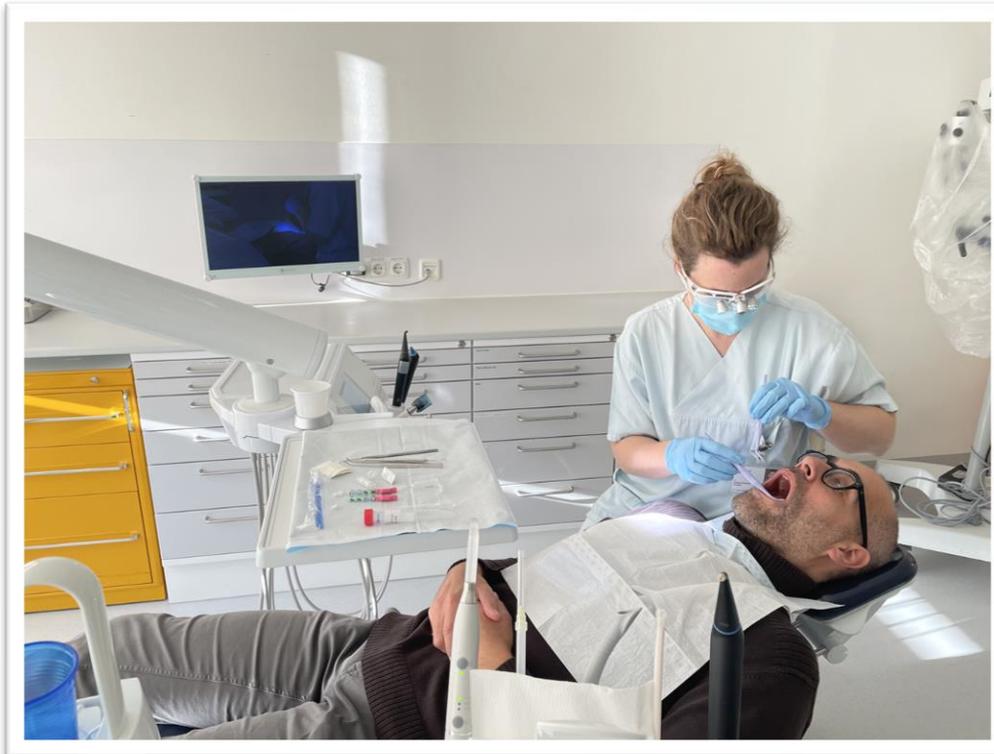
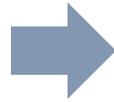
2h nach Studiengetränk



- mit Polyphenolen
- Placebo

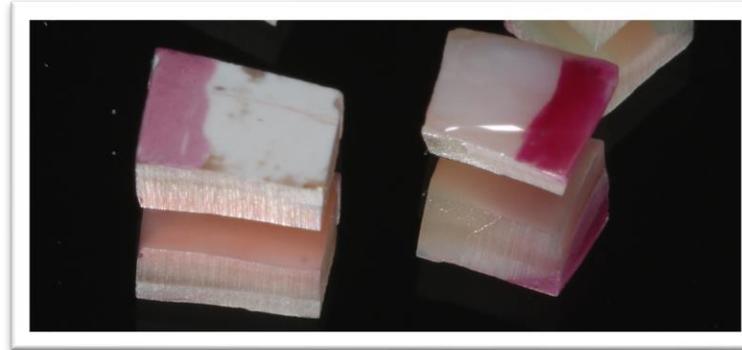
Zahnmedizinische Untersuchungen

Läsionstiefe
pH-Wert (Biofilm)



Speichelflussrate
Speichel pH-Wert
Speichelpufferkapazität
Plaque Index: Maß für Biofilmbildung
Gingivitis Index: Maß für Zahnfleischentzündungen
DMFT: Index für fehlende, gefüllte Zähne

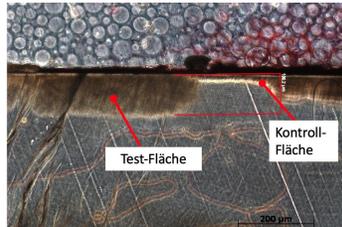
Zahnschmelzapparatur



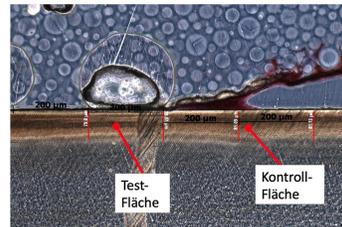
Untersuchung des kariogenen Effektes

- Individuell angepasst
- Behandelte Rinderzahnschmelzproben
- Tragedauer = 2 Wochen
 - Ausnahmen: Mundhygiene und Nahrungsaufnahme
- Test- und Kontrollfläche

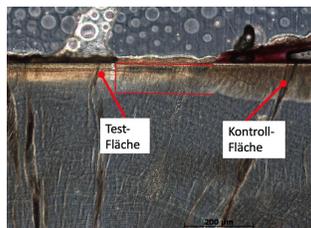
Lichtmikroskopische Untersuchungen



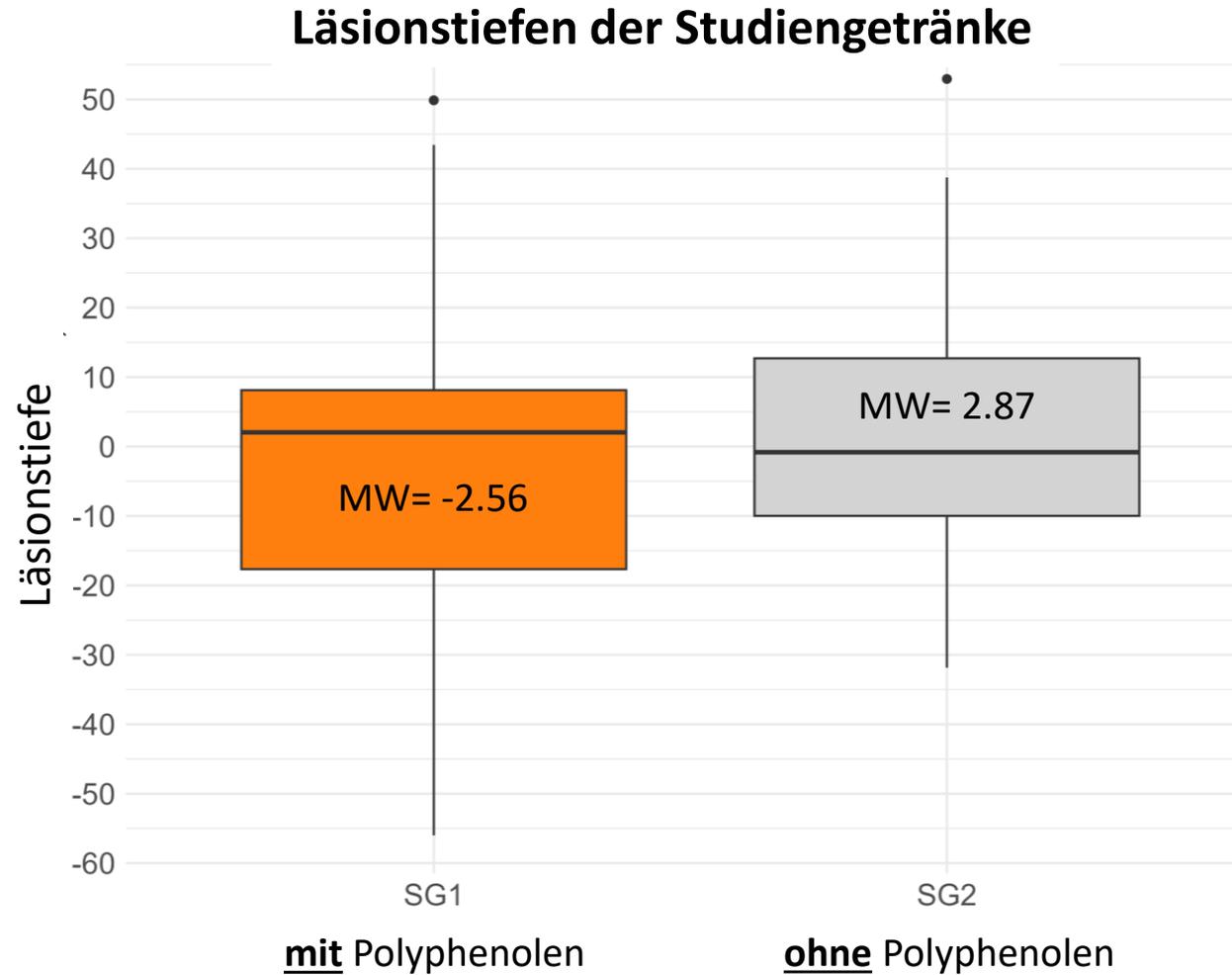
1. Läsion vergrößert



2. Läsion gleich

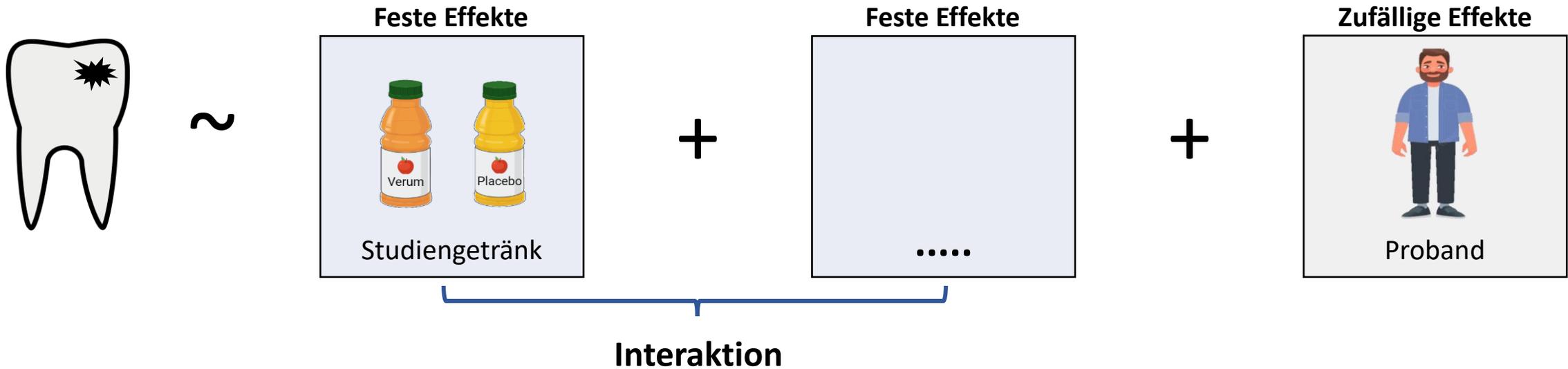


3. Läsion vermindert



Höherer Wert -> höhere Schädigung des Zahnschmelzes

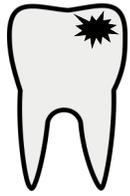
Lineares gemischtes Modell



Im Modell	Feste Effekte
treatment	Studiengetränk: Polyphenolreich oder Placebo
sp_fliess	Speichelflussrate
sp_pur	Speichel pH-Wert
sp_puffer	Speichelpufferkapazität
pi_mean	Plaque Index: Maß für Biofilmbildung
gi_mean	Gingivitis Index: Maß für Zahnfleischentzündungen
dmft	DMFT: Index für fehlende, gefüllte Zähne

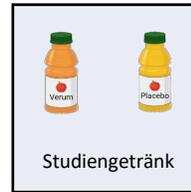
Zufällige Effekte
Proband: Individuelle Einflüsse durch Probanden
Phase: Phase des Cross-over Designs

Ergebnisse des Modells



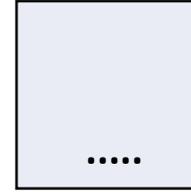
~

Feste Effekte



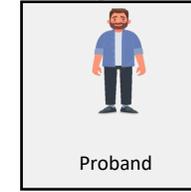
+

Feste Effekte

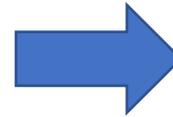


+

Zufällige Effekte



ANOVA des Modells Kariesrisiko	P-Wert	
Studiengetränk	<0.001	***
Speichelfliessrate	0.016	*
Speichelpufferkapazität	<0.001	**
Speichel pH-Wert	0.002	**
DMFT	0.017	*
Plaque-Index	<0.001	***
Gingivitis-Index	<0.001	***
Studiengetränk:Speichel pH-Wert	<0.001	***
Studiengetränk:Plaque-Index	0.021	*
Studiengetränk:Gingivitis-Index	<0.001	***
Studiengetränk:DMFT	0.016	*
Studiengetränk:Speichelfl.:Gingivitis-Index	0.002	**
Studiengetränk:Speichelpuf.:Plaque-Index	0.025	*



Post hoc Test

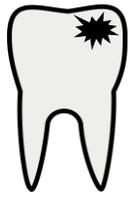
Ist ein Unterschied in den Läsionstiefen nach 2 Wochen polyphenolreichem Studiengetränk vs. Placebo feststellbar?

Contrast Comparison	Estimate [µm]	Standard Error [µm]	p-Value
mit PP – ohne PP	-55.7	15.2	0.019 *

Bei mittleren kariologischen Parametern bewirkt das polyphenolreiche Studiengetränk eine geringere Schädigung des Zahnschmelzes als das Placebogetränk

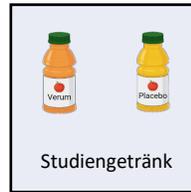
Negative Werte = Remineralisierung des Zahnschmelzes

Ergebnisse des Modells



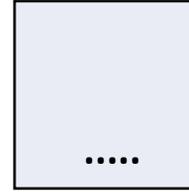
~

Feste Effekte



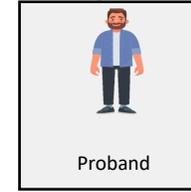
+

Feste Effekte



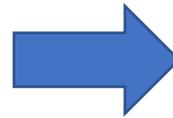
+

Zufällige Effekte



Modell 2

- Berücksichtigung der individuellen Zahngesundheit bei der Analyse
- Probanden wurden in Gruppen sortiert
 - Gruppe 1: DMFT < 5
 - Gruppe 2: DMFT ≥ 5



Post hoc Test

Gibt es einen Unterschied in den Läsionstiefen zwischen den beiden Studiengetränken?

Kontrastvergleiche	DMFT	Estimate	SE	P-Wert	
mit PP – ohne PP	< 5	-55.4	17.34	0.032	*
mit PP – ohne PP	≥ 5	-35.5	22.08	0.21	n.s.

Probanden mit besserer Zahngesundheit zeigten im Durchschnitt eine geringere Läsionstiefe, was auf das Potenzial des polyphenolreichen Studiengetränks zur Vorbeugung von Zahnkaries hindeutet.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Anreicherung eines Fruchtgetränkes mit **antikariogenen Apfel-Polyphenolen** ist möglich

Die Anreicherung von Polyphenolen im Studiengetränk führte zu signifikant niedrigeren Läsionstiefen im Zahnschmelz bei **Berücksichtigung verschiedener zahnmedizinischer Faktoren**

Einflussfaktoren auf **remineralisierende Effekte** scheinen eine wichtige Rolle zu spielen und sind individuell sehr unterschiedlich

Probanden mit **besserer Zahngesundheit** profitieren stärker vom polyphenolreichen Studiengetränk

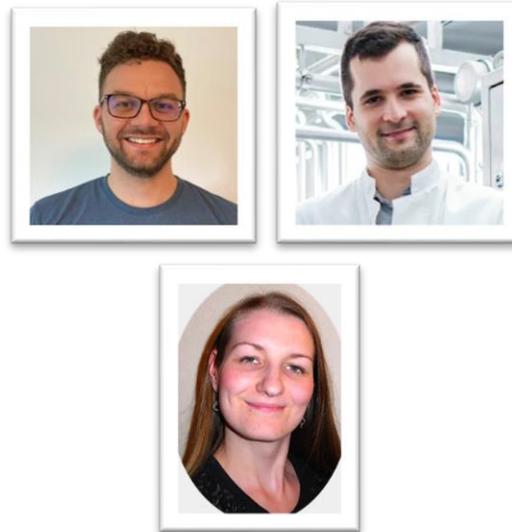
Das entwickelte Modell muss von Probanden **bestätigt werden**, die nicht an der Studie teilgenommen haben

Die Förderung von Zahngesundheit ist sehr relevant – sie korreliert mit anderen zunehmenden **chronischen Erkrankungen**



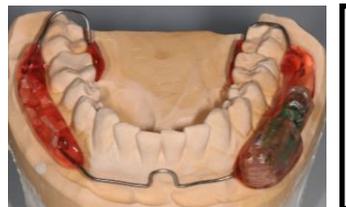
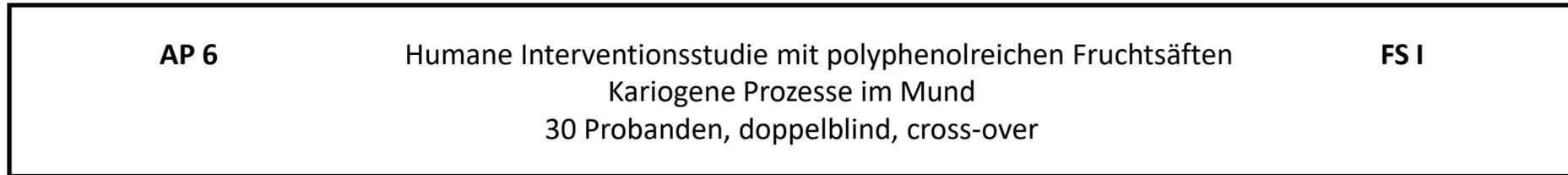
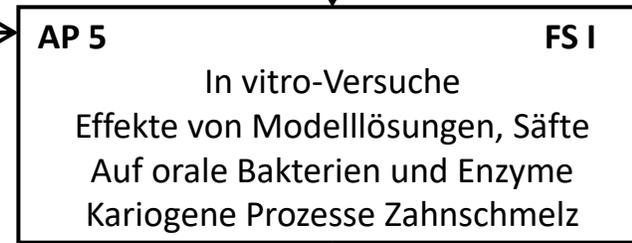
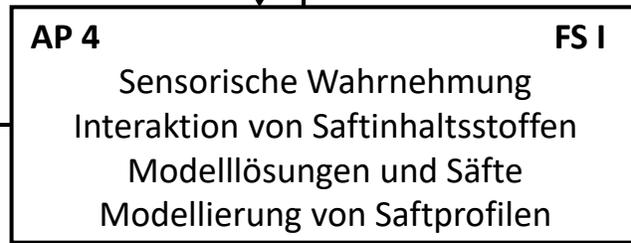
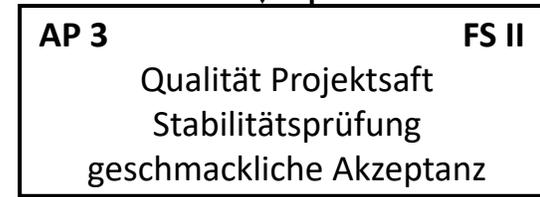
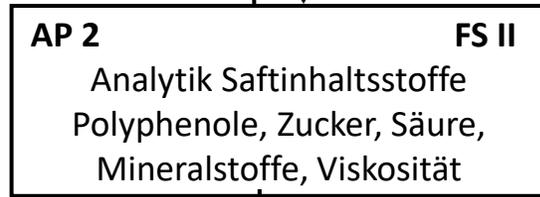
Danke

Prof. Dr. Christof Dörfer
Dr. Antje Geiken
Dr. Louise Holtman
Vivian Schaarschmidt
Louisa Pannenbeckers
Prof. Dr. Dominik Schulte
PD Dr. Tim Hollstein
Dr. Tobias Demetrowitsch
Niklas Röder
Alina Pisarevskaja
Sarah Elsner
Annika Thiel
Neskea Kriett



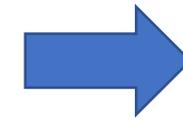
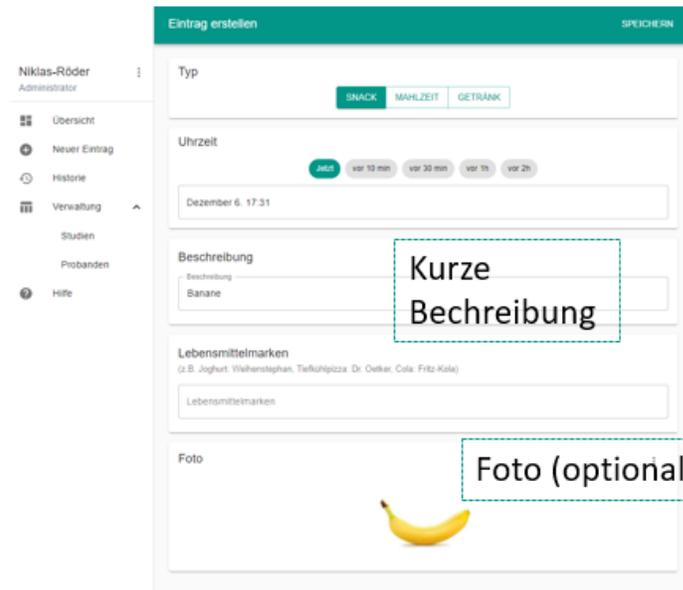
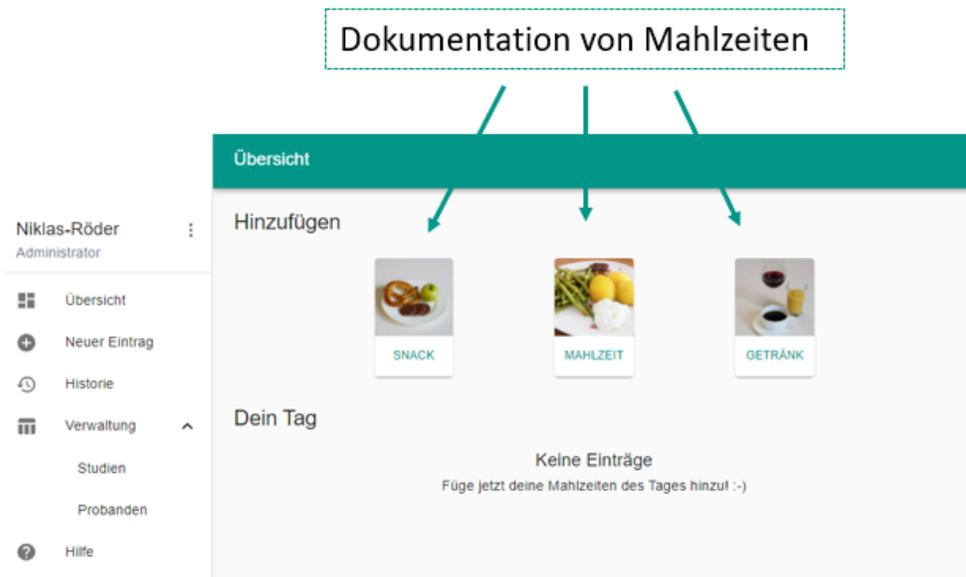
Prof. Dr. Frank Will
Stefan Dußling
Anja Rheinberger
Anja Giehl
Marius Michels
Lea Sikora

Vorsitzender des
Projektbegleitender
Ausschuss
Dr. Volker Herdegen

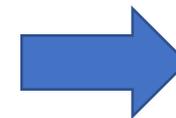


Ergebnisse - Ernährungsprotokoll

- Anweisung für polyphenolarme Diät
- Erfassung der Nahrungsaufnahme mit Ernährungs-App (AG Bosy-Wetsphal)



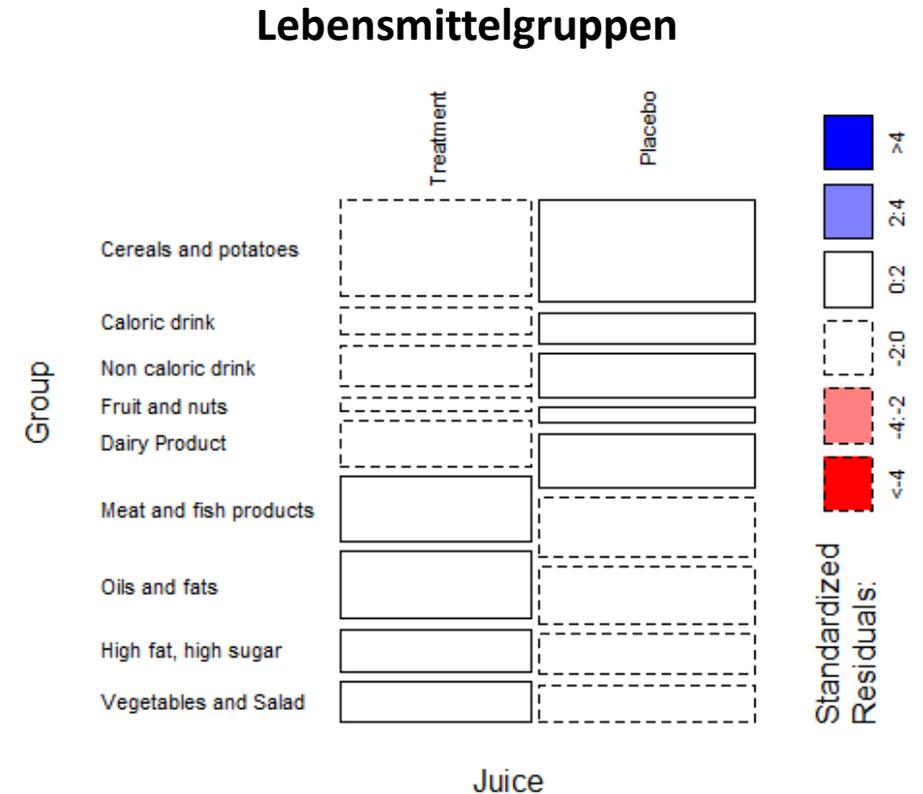
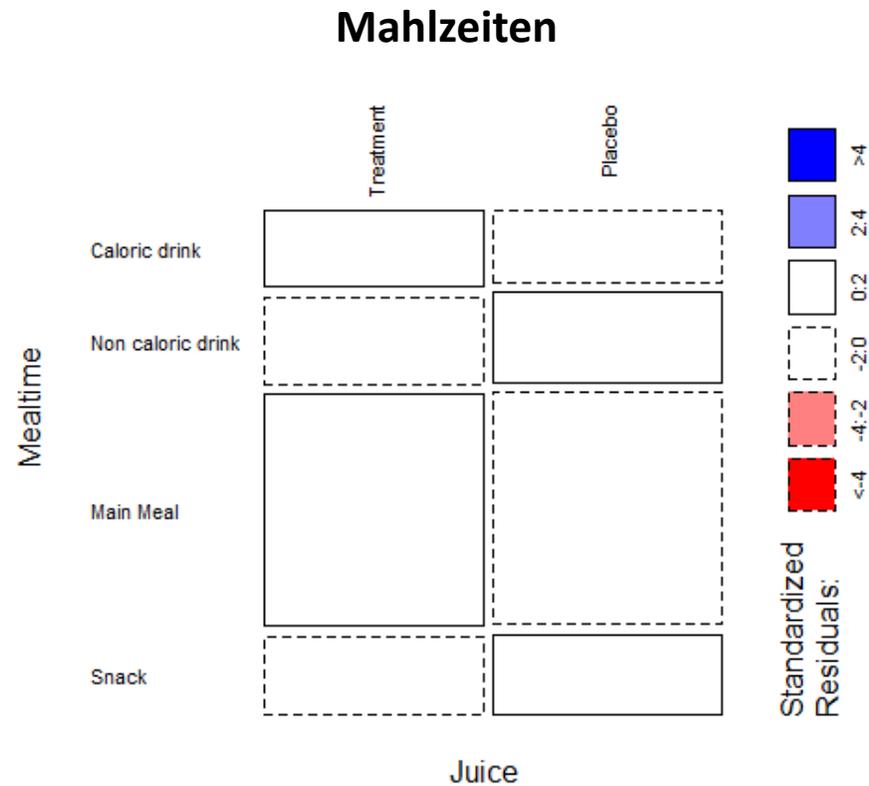
Mahlzeit, Snack, Getränk



- Dokumentation während der Intervention
- Analyse der letzten 4 Tage jeder Intervention

Ergebnisse - Ernährungsprotokoll

Verteilung von Mahlzeiten und Lebensmittelgruppen zwischen den beiden Studiengetränken

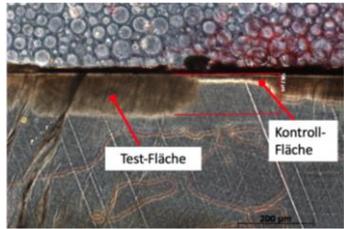


Chi² Test p-wert: 0.989

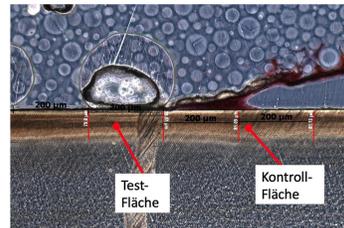


Chi² Test wert: 0.882

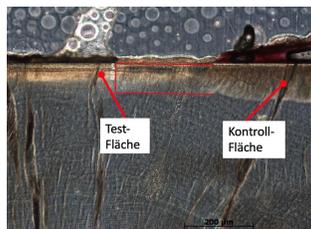
Lichtmikroskopische Untersuchungen



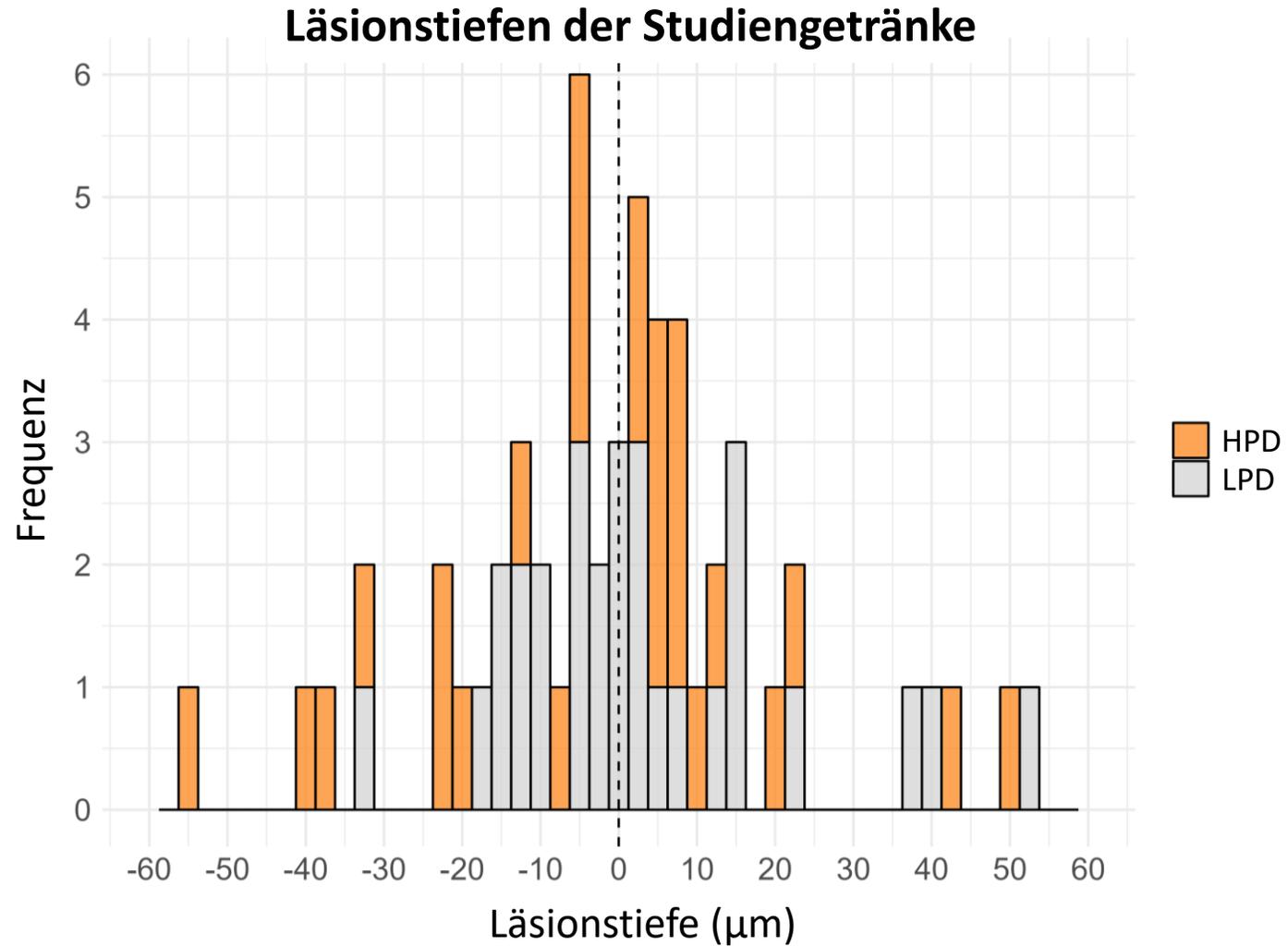
1. Läsion vergrößert



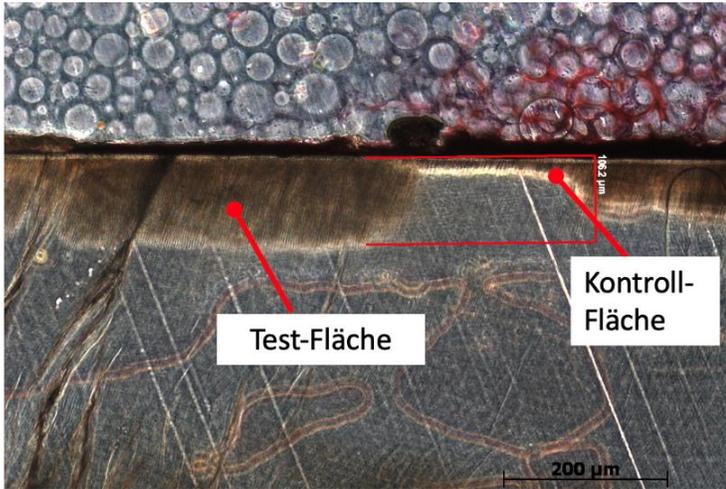
2. Läsion gleich



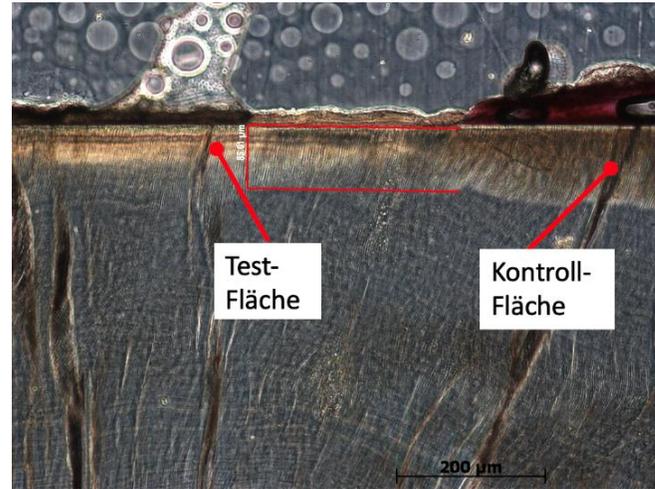
3. Läsion vermindert



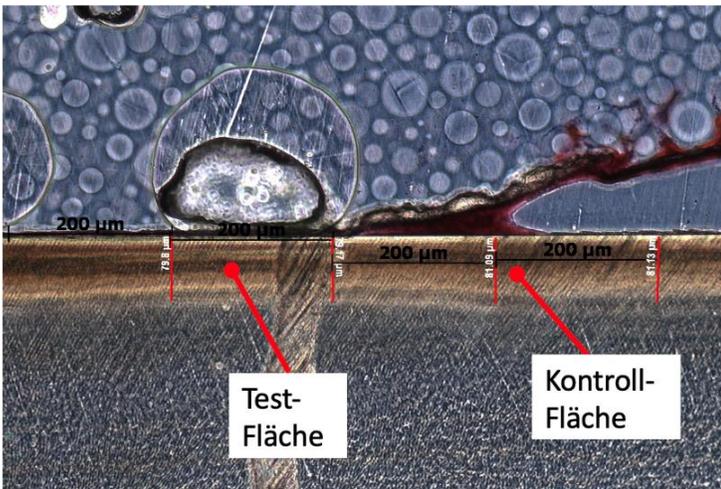
Lichtmikroskopische Untersuchungen



1. Läsion vergrößert



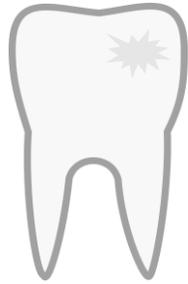
3. Läsion vermindert



2. Läsion gleich

Einfacher Vergleich der Studiengetränke:
→ Kein signifikanter Unterschied in den Läsionstiefen

Lineares gemischtes Modell



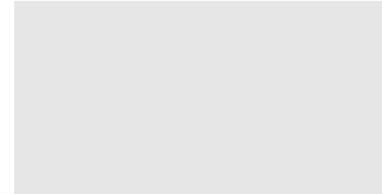
~

Feste Effekte



+

Feste Effekte



+

Zufällige Effekte



difference ~ **treatment + sp_fliess + sp_puffer + sp_pur + dmft + pi_mean + gi_mean + treatment:sp_fliess + treatment:sp_puffer + treatment:sp_pur +**
treatment:sp_fliess:sp_puffer + treatment:sp_fliess:sp_pur + treatment:sp_fliess:dmft + ...

Im Modell

Phase + Proband

treatment

sp_fliess

Speichelflussrate

sp_pur

Speichel pH-Wert

sp_puffer

Speichelpufferkapazität

pi_mean

Plaque Index: Maß für Biofilmbildung

gi_mean

Gingivitis Index: Maß für Zahnfleischentzündungen

dmft

DMFT: Index für fehlende, gefüllte Zähne

Phase: Phase des Cross-over Designs