

Gewinnung von Traubentrestereextrakten und Untersuchungen zum Nachweis ihrer funktionellen Eigenschaften

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittel pflanzlicher Herkunft Prof. Dr. R. Carle/Dr. A. Schieber
Forschungsstelle II:	Universität Jena, Institut für Ernährungswissenschaften Lehrstuhl Humanernährung Prof. Dr. R. Bitsch/Dr. M. Netzel
Industriegruppe:	Verband der Deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V., Bonn
	Projektkoordinator: C. Rentschler Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg
Laufzeit:	2004 – 2006
Zuwendungssumme:	€ 236.400,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Nebenprodukte der Obst- und Gemüseverarbeitung sowie der Weinherstellung stellen aufgrund steigender Produktion für die verarbeitende Industrie ein Entsorgungsproblem dar, welches sich infolge gesetzgeberischer Restriktionen drastisch verschärft hat. Andererseits enthalten diese anfallenden Trester Wertstoffe, die in Lebensmitteln als natürliche funktionelle Inhaltsstoffe eingesetzt werden können. Insbesondere die Gewinnung natürlicher Farbstoffe für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie hat in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, Methoden zur Gewinnung von Wertstoffen aus Nebenprodukten der Verarbeitung pflanzlicher Lebensmittel zu entwickeln. Da in den letzten Jahren für eine Reihe von Inhaltsstoffen des Traubentresters gesundheitsfördernde Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, war es ein weiteres Ziel, die Wertstoffe in Tresterextrakten auf funktionelle Eigenschaften, wie Bioverfügbarkeit und Bioaktivität, in Humanstudien zu untersuchen.

Forschungsergebnis:

Traubentrester von neun verschiedenen Kultivaren aus zwei Jahren (Jahrgang 2001 und 2002) wurden hinsichtlich ihres Polyphenolgehalts untersucht. Hierfür wurden methanolische Tresterextrakte hergestellt und diese mit Hilfe von C18-Kartuschen in drei Fraktionen, Phenolcarbonsäuren (Fraktion I), farblose Flavonoide und Stilbene (Fraktion II) sowie Anthocyane (Fraktion III), aufgetrennt. In diesen wurden die Gehalte der Einzelsubstanzen flüssigkeitschromatographisch bestimmt. Dabei konnten 37 phenolische Verbindungen identifiziert und über externe Kalibrierung quantifiziert werden. Es zeigten sich erwartungsgemäß erhebliche Schwankungen der Polyphenolgehalte je nach Sorte und Jahrgang. Bei den jahrgangsspezifischen Unterschieden konnte kein einheitlicher Trend festgestellt werden. Während Phenolcarbonsäuren sowie farblose Flavonoide und Stilbene in den Treestern des Jahrgangs 2001 meist höhere Gehalte aufwiesen als in denen des Jahres 2002, lag bei den Anthocyanen der umgekehrte Fall vor.

Für die Aufreinigung und Isolierung einzelner phenolischer Verbindungen mittels HSCCC wurde ein zweistufiges Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, Caftar-, Cutar-, und Fertarsäure aus dem sehr komplex zusammengesetzten Traubentrestereextrakten zu gewinnen. Im ersten Schritt (Lösungsmittelgemisch: Hexan/Ethylacetat/Methanol/bidest. Wasser/TFA; 3/7/3/7/0,01; v/v) erfolgte die Abtrennung der Anthocyane und weiterer unerwünschter Begleitstoffe. Der zweite Schritt (Lösungsmittelgemisch: TBME/Butanol/Acetonitril/bidest. Wasser/TFA; 2/1/2/5/0,01; v/v) dient zur Isolierung der aufgereinigten Einzelkomponenten. Die Reinheiten von Caftar- und Cutarsäure lagen bei jeweils 97 %, die der Fertarsäure bei 90 %.

Die Untersuchungen zur Gewinnung wertstoffangereicherter Extrakte zeigten, dass die enzymunterstützte Extraktion ebenso hohe Ausbeuten liefert wie sie bisher nur durch das Sulfitverfahren erreicht wurden, ohne jedoch dessen Nachteile aufzuweisen. In einer Versuchsreihe wurde ein Enzymgemisch von Novoferm 106 (3.000 ppm) und Cellubrix L (1.500 ppm) zuerst im Labor- und anschließend im Technikumsmaßstab eingesetzt. Vor allem zeigte die Kombination aus einer wässrigen Vorextraktion der Trester und einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse der Traubenhautzellwände sehr gute Ergebnisse. Mit diesem zweistufigen Verfahren konnten 94 % der phenolischen Säuren, 70 % der Anthocyane sowie 92 % der farblosen Flavonoide und Stilbenen aus dem Trester extrahiert werden.

Zudem wurde der Flavanolgehalt des Presskuchens aus der Traubenkernölgewinnung im Sinne einer möglichst vollständigen Verwertung der anfallenden Reststoffe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ölgewinnung keinen großen Einfluss auf das Polyphenolspektrum hat. Neben der beim Polyphenolscreening verwendeten methanolischen Extraktion wurden weitere Lösungsmittel eingesetzt. Insbesondere mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch (75/25; v/v) bzw. mit Wasser bei erhöhter Temperatur (75 °C) wurden hohe Extraktionsausbeuten erzielt. Lediglich die Verwendung von reinem Ethanol hatte geringere Ausbeuten zur Folge.

In abschließenden Untersuchungen mit den Tresterextrakten wurde der Einsatz eines Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisats (Amberlite® XAD 16 HP) geprüft. Ziel der Adsorbentechnologie war die Abtrennung von Sacchariden und weiteren Begleitstoffen aus den Rohextrakten, die beim Abtrennen des Lösungsmittels und Auf-

konzentrieren zu Viskositätserhöhungen führen. Die Ergebnisse der Laborversuche konnten auch beim Scale-up bestätigt werden. In beiden Fällen lagen die Wiederfindungsraten der jeweiligen Anthocyane bei 94-99 %. Die in den Rohextrakten enthaltenen Saccharide wurden mittels eines Waschschruttes entfernt. Allerdings wurden die einzelnen Phenolunterklassen (phenolische Säuren, farblose Flavonoide, Stilbene und Anthocyane) nicht getrennt. Da die Anwesenheit farbloser phenolischer Verbindungen in pigmenthaltigen Lösungen durch die Copigmentations-effekte farbstabilisierend wirken, ist eine Fraktionierung unter Umständen auch nachteilig.

Das entwickelte Verfahren, bestehend aus enzymatischer Extraktion gefolgt von der adsorptiven Aufreinigung und Konzentrierung der phenolischen Komponenten, erlaubt die sulfittfreie Gewinnung von Anthocyanen und farblosen bzw. schwach gelb gefärbten Polyphenolen im Technikumsmaßstab in hervorragender Ausbeute.

Für den ernährungsphysiologischen Projektteil (Humanstudien) wurde von Forschungsstelle 1 folgendes Probenmaterial bereitgestellt: Weißweintrestereextrakt (Kerner; gefriergetrocknet), Rotweintrestereextrakte (u.a. Cabernet Mitos; gefriergetrocknet) und isolierte Tresterpolyphenole (kristallin; frei von Matrixeffekten): Malvidin-3-Glukosid (quantitativ wichtigstes Farbpigment in der roten Traube) sowie Caftar- und Cutarsäure (quantitativ wichtige Hydroxymitsäurenderivate in der Traube). Im Rahmen von Vorstudien-/Pilotstudien (1-2 Probanden) wurden wichtige methodische (Vor)Arbeiten durchgeführt. Im Einzelnen waren dies: Erstmaliger Nachweis-/Identifizierung von Delphinidin-, Cyanidin-, Petunidin-, Päonidin- und Malvidin-3-Glukosid im menschlichen Urin mittels HPLC-ESI-MS/MS nach Zufuhr von rotem Traubensaftkonzentrat. Prüfung und Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung von Polyphenol-Metaboliten (indirekt mittels enzymatischer Hydrolyse/direkt mittels HPLC-ESI-MS/MS; signifikante Vorteile: HPLC-ESI-MS/MS). Nach Zufuhr von verschiedenen Tresterextrakten (rot) konnte ein "positiver" Effekt hinsichtlich der untersuchten Parameter/Substanzen TEAC, FRAP, PCL, Gesamtphenole und Malondialdehyd gemessen werden. Ein "positiver" Effekt bedeutet hier: Steigerung der antioxidativen Kapazität (Plasma und Urin) und des Gesamtphenolgehaltes (Urin) sowie eine verminderte Malondialdehydexkretion nach Tresterapplikation im Vergleich zur Kontrolle (Trinkwasserapplikation). Die Ascorbin- und Harnsäurekonzentrationen zeigten keine signifikanten

Veränderungen. Nach Tresterextrakt-rot konnten im 24h-Urin der Probanden verschiedene Metaboliten der applizierten Anthocyane identifiziert und quantifiziert werden (LC-ESI-MS/MS und HPLC-DAD). Im Einzelnen waren dies: Cyanidin-glucuronid, Malvidin-glucuronid, Päonidin-sulfat und Päonidin-glucuronid (1,22-1,35 % im Vergleich zur applizierten Dosis an intakten Anthocyanen) sowie Hippursäure als "Summenmetabolit".

In den Hauptstudien (H1: Applikation von Tresterextrakt-rot, Tresterextrakt-weiß und Trinkwasser [Kontrolle] bei n=12 Probanden im randomisierten cross-over Design und H2: Applikation von Malvidin-3-glucosid, Cafatarsäure und Cutarsäure) wurden folgende Ergebnisse erzielt: Nach Zufuhr von Tresterextrakt-weiß und Tresterextrakt-rot war die Exkretion (24h-Urin) von antioxidativ wirksamen Substanzen gemessen als TEAC, FRAP, PCL und Gesamtphenole, im Vergleich zur Kontrolltestung (Trinkwasser), signifikant erhöht (zwischen 13 und 46 %). Malondialdehyd (24h-Urin) war nach Tresterextrakt-weiß um 8 % und nach Tresterextrakt-rot um 15 % erniedrigt (Trend; im Vergleich zur Kontrolle). Nach Tresterextrakt-rot konnten sowohl im Plasma als auch im Urin verschiedene Anthocyane und Anthocyanmetaboliten identifiziert und quantifiziert werden (LC-ESI-MS/MS und HPLC-DAD). Im Plasma waren dies: Cyanidin-glucosid, Malvidin-glucuronid, Malvidin-acetylglucosid und Delphinidin-acetylglucosid (C_{max} : 223,4 $\mu\text{g/L}$). Im Urin waren dies: Malvidin-glucosid, Malvidin-glucuronid und Päonidin-glucuronid (0,35 % im Vergleich zur applizierten Dosis an intakten Anthocyanen). Alle weiteren von Forschungsstelle 1 identifizierten Polyphenole und Metaboliten (insbesondere nach Tresterextrakt-weiß) werden z. Z. noch ausgewertet. Auch konnte nach Zufuhr von beiden Tresterextrakten (rot und weiß) wieder ein relativ starker Anstieg der Hippursäureexkretion (24h-Urin) beobachtet werden (zwischen 35 und 83 % im Vergleich zur Kontrolle). Die Plasma Konzentration-Zeit-Profile (FRAP und PCL) zeigten insbesondere nach Tresterextrakt-rot einen "positiven" Verlauf im Vergleich zur Kontrolle. Positiv bedeutet - im Vergleich zum Basiswert (Nüchternkonzentration) konnte nach Extraktzufuhr eine Erhöhung der antioxidativen Plasmakapazität gemessen werden (die entsprechenden pharmakokinetischen Parameter t_{max} , C_{max} und AUC werden im Moment noch auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Extrakten geprüft) – in den Kontrolltestungen hingegen konnten keine positiven Konzentration-Zeit-Profile gemessen werden. Diese positiven "Trester-

extrakt-Effekte" waren unabhängig vom Einfluss der Harnsäure bzw. Ascorbinsäure (diese beiden wichtigen Antioxidantien in Plasma und Urin zeigten keine signifikanten Veränderungen).

Nach Applikation von Malvidin-3-glucosid (42,5 mg) konnte in den Plasma- und Urinproben sowohl intaktes Malvidin-3-glucosid als auch Malvidin-glucuronid (Metabolit) identifiziert und quantifiziert werden (LC-ESI-MS/MS und HPLC-DAD). Plasma: C_{max} : 19 $\mu\text{g/L}$ (Summe aus beiden Substanzen); 24h-Urin: Wiederfindung von 1,06 % (Summe aus beiden Substanzen) im Vergleich zur applizierten Dosis an intaktem Malvidin-3-glucosid. Malvidin-glucuronid konnte als Hauptmetabolit von Malvidin-3-glucosid identifiziert werden (s. auch Tresterextrakt-rot). Nach Applikation von Cafatarsäure (40 mg) konnte in den Plasmaproben dreifach methylierte Cafatarsäure und Kaffeesäure-glucuronid identifiziert und quantifiziert werden (LC-ESI-MS/MS und HPLC-DAD; C_{max} : 0,09 $\mu\text{g/L}$ (Summe aus beiden Substanzen). Im Urin konnte(n) weder intakte Cafatarsäure noch entsprechende Metaboliten nachgewiesen werden. Nach Applikation von Cutarsäure (15,2 mg) waren weder in den Plasma- noch Urinproben intakte Substanz oder daraus entstandene (gängige) Metaboliten nachweisbar. Entweder war die applizierte Dosis zu gering oder aber Cutarsäure wird in bisher unbekannte Substanzen metabolisiert. Die erzielten Ergebnisse stellen eine hervorragende Basis für weiterführende Untersuchungen/Studien mit „Tresterprodukten“ dar.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens entwickelte enzymatische Extraktionsmethode ermöglicht eine nahezu vollständige, sulfitfreie Extraktion der phenolischen Verbindungen. Dies kann zu einer Entschärfung der bestehenden Entsorgungsproblematik beitragen. In jedem Fall ermöglicht es die ganzheitliche Verwertung des vermeintlichen Abfallproduktes. Zusätzlich deckt sich diese Nutzung mit Verbrauchererwartungen und der Ablehnung synthetischer Lebensmittelzusätze, wie z.B. künstlicher Farbstoffe. Insbesondere im Bereich der Obst- und Gemüseprodukte, die als besonders „gesund“ oder „natürlich“ angesehen werden, wird die Verwendung dieser sulfitfrei hergestellten Inhaltsstoffe die Akzeptanz der Verbraucher weiter steigern. Dies wird sich insofern positiv auf die Beschäftigungssituation insbesondere kleiner und mittelständischer Unternehmen auswirken, als die industrielle Zielgruppe mit Ausnahme weniger

Großunternehmen zahlenmäßig von mittelständischen Betrieben dominiert wird. Zudem finden sich zahlreiche kleinere und nur regional auftretende Fruchtsaftbetriebe, die sich aber aufgrund des positiven Images ihrer Produkte am Markt behaupten können.

Es wurde eine einfache und effiziente Methode zur Aufreinigung des mit Wertstoffen angereicherten Extraktes unter Verwendung der Adsorbentechnologie erarbeitet. Das Abtrennen der Zucker und weiterer Bestandteile, die eine Entfernung des vorhandenen Lösungsmittels durch mögliche Viskositätsänderungen erschweren könnten, ermöglicht eine leichte Handhabung dieser Extrakte.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von Traubenkernöl keine signifikanten Effekte auf das Wertstoffspektrum der Presskuchen hat. Es konnten auch Aussagen über die Verwendung verschiedener Lösungsmittel zur Extraktion der Reststoffe der Traubenkernölgewinnung getroffen werden, was für die Entwicklung kostengünstiger Verfahren bedeutsam ist.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2007.
2. Carle, R., Schieber, A., Kammerer, D., Bitsch, R. und Netzel, M.: Trester – ein vermeintliches Abfallprodukt mit wertvollem Inhalt. *Getränke! Technologie & Marketing für die Getränkeindustrie* 3, 46-48 (2008).
3. Netzel, M., Netzel, G., Naier, T., Kammerer, D. R., Carle, R., Schieber, A., Bitsch, I. und Bitsch R.: Polyphenole aus Trauben – Erste Ergebnisse aus Metabolisierungsstudien mit Traubentresterextrakten und Probanden. *Flüssiges Obst* 75, 240-246 (2008).
4. Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D. R., Schieber, A. und Carle, R.: Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Eur. Food Res. Technol.* DOI 10.1007/s00217-007-0720-y (2007).
5. Maier, T., Sanzenbacher, S., Kammerer, D.R., Berardini, N., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R. und Schieber, A.: Isolation of hydroxycinnamoyltartaric acids from grape pomace by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatography A* 1128, 61-67 (2006).
6. Kammerer, D., Gajdos Kljusuric, J., Carle, R. und Schieber, A.: Recovery of anthocyanins

from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mito) using a polymeric adsorber resin. *Eur. Food Res. Technol.* 220 (3-4), 431-437 (2005).

7. Kammerer, D.R., Schieber, A. und Carle, R.: Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace – a review. *J. Appl. Botany and Food Qual.* 79 (3), 189-196 (2005).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Lebensmittel pflanzlicher Herkunft
August-von-Hartmann-Str. 3, 70599 Stuttgart
Tel.: 0711/459-22314, Fax: 0711/459-24110
E-Mail: carle@uni-hohenheim.de

Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Lehrstuhl Humanernährung
Dornburger Str. 29, 07743 Jena
Tel.: 03641/949-630, Fax: 03641/949-632
E-Mail: Roland.Bitsch@uni-jena.de

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