



G. Tomaschewski, L. Ebner und J. Illiger

Flavonoide - Gewinnung aus den Trestern gekelterter roter Weintrauben

Vorbemerkung

Der Weinanbau, die Weingewinnung gehören zum ältesten menschlichen Kulturgut. Schon aus der Antike ist Rotwein als wichtiges Getränk bekannt. Zur damaligen Zeit stellte Wein nicht das Genussmittel von heute dar, sondern war vielmehr ein Getränk, dem man stärkende und heilende Wirkung zusprach.

So war beispielsweise römischen Legionären der Weinkonsum ausdrücklich vorgeschrieben, und von Hippokrates (460 - 377 v.Chr.) wurde der Wein therapeutisch als Beruhigungs- und Schlafmittel, bei Herz-Kreislauf-Störungen und selbst bei Augenerkrankungen eingesetzt.

Die Nützlichkeit des Weines wird auch im Neuen Testament überliefert. Im **1. Brief an Thimotheus** schreibt der **Apostel Paulus** (Kap. 5 Vers 23):

„Trinke nicht mehr Wasser, sondern brauche ein wenig Wein
um deines Magens willen, und weil du oft krank bist.“

Plutarch (46-120 n.Chr.), der griechische Dichter und Philosoph, beschrieb den Wein auf diese Weise:

„Der Wein ist unter den Getränken das nützlichste,
unter den Arzneien die schmackhafteste und
unter den Nahrungsmitteln das angenehmste.“

Und **William Shakespeare** schrieb:

„Wein macht das Gehirn sinnig, schnell und erfinderisch,
voll von lebenden, feurigen und ergötzlichen Gedanken“.

Um die ersten widersprüchlichen Studien über die Wirkung von Rotwein auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen vergleichbar zu machen, hat in den 80er Jahren die WHO in vielen Ländern der Erde ein wissenschaftliches Untersuchungsprogramm durchgeführt. Im MONICA-Projekt (World Health Organisation Multinational Monitoring of Trends and Determinants of Cardiovascular Disease) wurden die Ernährungsgewohnheiten und die HK-Mortalität (Herz-Kreislauf Mortalität) in verschiedenen Ländern der Welt verglichen. Die HK-Mortalität nimmt in Europa von Nord nach Süd ab. Als Maß für die Ernährungsgewohnheiten der Bevölkerung wurde der tägliche Verbrauch an Milchfett in Kalorien verglichen und der HK-Mortalität gegenübergestellt. Zu den Ergebnissen wurden von französischen Forschern differenzierte Aussagen getroffen [1]. Aus diesen epidemiologischen Untersuchungen ergibt sich, dass die Häufigkeit der Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Europa und selbst innerhalb Frankreichs von Norden nach Süden abnimmt. Auf Grund des täglichen Verzehrs von Milchfett in Frankreich, vergleichbar mit dem in Deutschland, müssten die Franzosen auch die gleiche Häufigkeit an Herz-Kreislauf-Erkrankungen haben. Das ist aber nicht der Fall, die Sterblichkeitsrate ist in Deutschland etwa doppelt so hoch. Allgemein wird das Phänomen von Medizinern und Ernährungsphysiologen als „French Paradoxon“ bezeichnet. Der Nord-Süd Abfall bei den Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird auf den höheren Verzehr von Obst/Gemüse, Fisch, Olivenöl, und auf den Genuss von Wein, insgesamt die „mediterrane Ernährung“, in den südlichen Ländern Europas zurückgeführt.

In der Abbildung 1 wird der direkte Zusammenhang zwischen Milchfett-Verzehr und der Sterblichkeit an Herz-Kreislauf-Erkrankungen dargestellt:

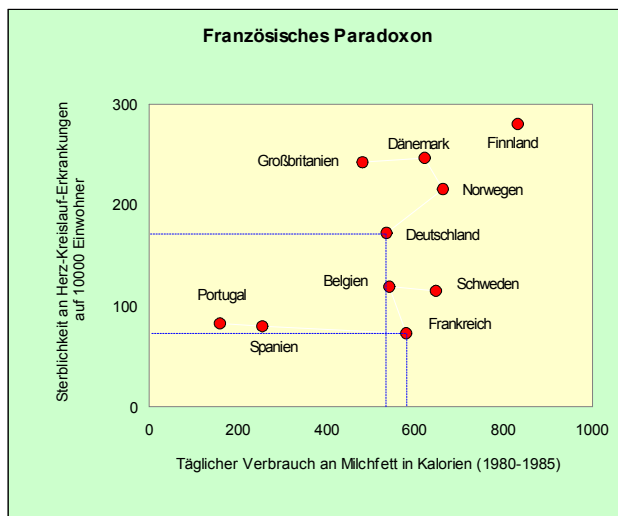


Abb. 1: Epidemiologische Studie über den Zusammenhang von Herz-Kreislauf-Mortalität und Verzehr von Milchfett in Europa

Hinweise auf die besondere Wirkung des Rotweins hinsichtlich einer Prophylaxe bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen lieferte ein ungewöhnliches Tierexperiment, das vor fast dreißig Jahren von amerikanischen Forschern durchgeführt wurde. Sie fütterten 48 männliche Kaninchen mit typisch amerikanischer Kost, teilten die Tiere in 6 Gruppen und gaben an die Tiere außerdem Wasser, Bier, Whisky, Ethanol, Weiß- und Rotwein zur Ernährung hinzu.

Nach 3 Monaten wurden die Kaninchen geschlachtet und die Arterien genauer untersucht. Im Vergleich zu Wasser (= 100 %) und den anderen alkoholischen Getränken erwies sich, dass die Wein trinkenden Kaninchen die geringsten Schädigungen/Ablagerungen (40-67 %) an den Gefäßwänden hatten [2].

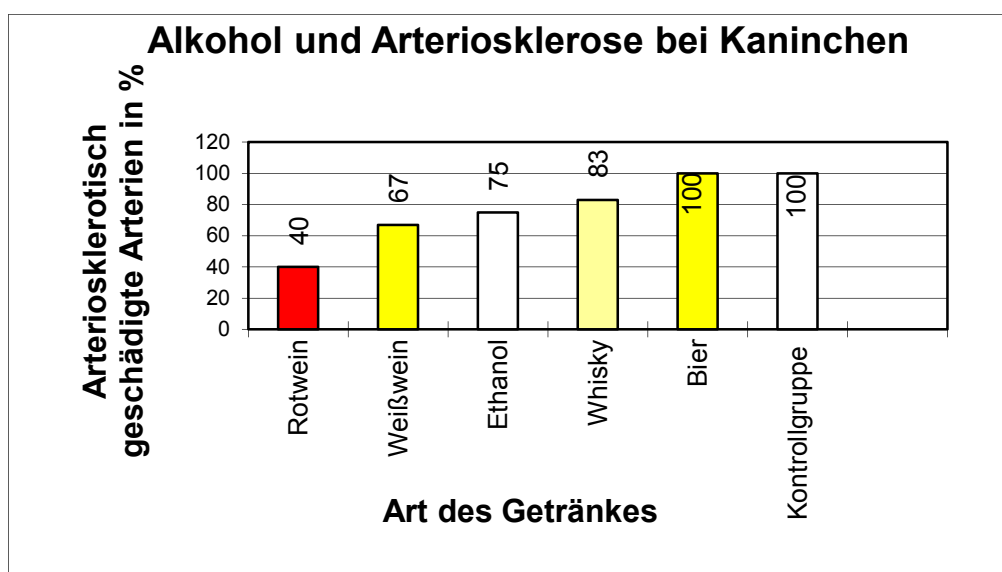


Abb. 2: Schädigung der Arterien bei Kaninchen durch alkoholische Getränke

In den letzten Jahrzehnten haben sich Chemiker, Biochemiker, Pharmakologen und Mediziner der besonderen Wirkung des Weines zugewandt und mit modernen Methoden der jeweiligen Wissenschaft viele neue Erkenntnisse zusammengetragen.

Im Ergebnis dieser umfangreichen Forschungsarbeiten zeigte sich aus in vitro Untersuchungen, dass die Inhaltsstoffe der roten Weintraube ein antioxidatives Potential aufweisen. Die Inhaltsstoffe aus roten Weinbeeren wirken weiterhin:

- kardioprotektiv durch ACE-Hemmung [4-6],
- antimikrobiell (antibakteriell, fungizid, antiviral),
- immunomodulierend und antiinflammatorisch,
- anticancerogen [7-11]
- antiallergene Wirkung, anti-Histamin-Wirkung,
- antidiabetisch.

Wesentliche Hauptinhaltsstoffe des Extraktes aus gekelterten roten Weinbeeren sind vorrangig Phenole und polyphenolische Verbindungen. Diese aktiven Verbindungen lassen sich verschiedenen Substanzklassen zuordnen, wie den Phenolen und Phenolsäuren, Zimtsäurederivaten, den Flavonoiden / Flavononen / Flavonolen (insbesondere Flavonole), den Anthocyanen den Catechinen, und essentiellen Ölen. Diese bioaktiven Substanzen zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, die als Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen mikrobiellen Befall, Insekten und Pflanzenfresser gebildet werden. Die Verteidigungsstoffe der Pflanze häufen sich deshalb besonders in Zellen der äußeren Schichten oder Geweben an [3].

Entwicklung eines Extraktionsverfahrens

Die wertvollen sekundären Pflanzenstoffe sind aus den Schalen der roten Trauben zu gewinnen. Die Schalen von Obst- und Gemüsepflanzen bestehen hauptsächlich aus Strukturen mit Zellulosecharakter. In der Regel sind die Inhaltsstoffe in den Zellulosepflanzenzellen eingeschlossen und müssen sozusagen aus den Zellwänden freigelegt werden.

Um einen Extrakt aus roten Weintrauben mit einem hohen Gehalt an Polyphenolen/Bioflavonoiden zu gewinnen, sind mehrere Aspekte von besonderer Bedeutung. Einmal ist die Rebsorte auszuwählen, die einen hohen Gehalt an Bioflavonoiden hat. Zweitens hängen die Gehalte an Bioflavonoiden von den Standorten der Rebsorte ab.

Um die geeignete rote Rebsorte aus deutschen Anbaugebieten zu ermitteln, haben wir eine größere Anzahl deutscher Weine verschiedener Rebsorten von unterschiedlichen Standorten auf ihren Polyphenolgehalt untersucht.

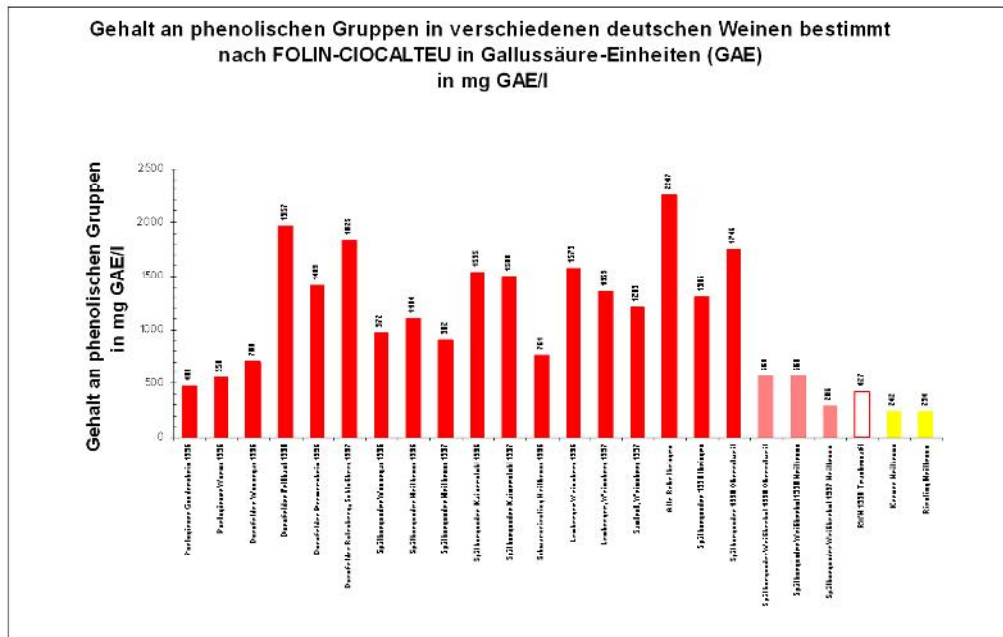


Abb. 3: Gehalt an phenolischen Gruppen in verschiedenen deutschen Weinen bestimmt nach FOLIN-CIOCALTEU in Gallussäure-Einheiten (GAE) in mg GAE/l

Auf Grund dieser Ergebnisse haben wir uns auf die Extraktion von gekelterten Trauben des Spätburgunders und dem Standort Heilbronn in Baden-Württemberg konzentriert.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, welche Trester roter Weintrauben wir zur Extraktion einsetzen. Unter Berücksichtigung der Technologie der Rotweinherstellung, ist klar, dass man die Trester aus der Rotweingewinnung nicht benutzen darf. Durch die Maischegärung wird der überwiegende Teil der Inhaltsstoffe den Trestern entzogen. Wir haben deshalb nur Trester der roten Weintrauben für unsere Extraktgewinnung eingesetzt, die aus der Weißherbstherstellung stammen.

Mit diesen gekelterten roten Weintrauben haben wir umfangreiche Extraktionsversuche durchgeführt, um ein Maximum an Bioflavonoiden zu gewinnen. Die Extraktion sollte schonend erfolgen, um die Inhaltsstoffe nicht durch die thermische Belastung zu zerstören und auch die natürliche Glycosidstruktur der Inhaltsstoffe sollte erhalten bleiben.

Wir führten vielfältige Versuche zur Extraktion durch, bei der die Temperatur, das Lösungsmittel, die Extraktionsdauer variiert wurden. Schließlich wurde ein Percolationsverfahren mit Isopropanol als Lösungsmittel favorisiert. Wir haben so ein schonendes Verfahren zur Gewinnung eines naturbelassenen Extraktes aus roten Weintrauben entwickelt.

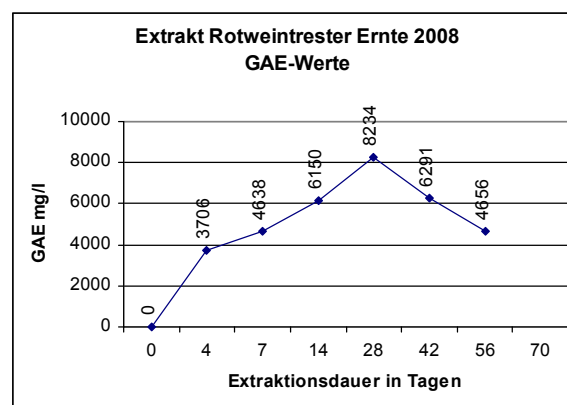


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Extraktion von Rotweintrestern mit Isopropanol bei Raumtemperatur, Bestimmung des Polyphenolgehaltes nach FOLIN-CIOCALTEU

Die Abbildung 4 zeigt, dass die Extraktionsdauer sehr lang ist. Eine optimale Ausbeute erhalten wir nach ca. 20 Tagen der Percolation. Natürlich ist für die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens auch von Bedeutung welche Menge an Extrakt zu gewinnen ist.

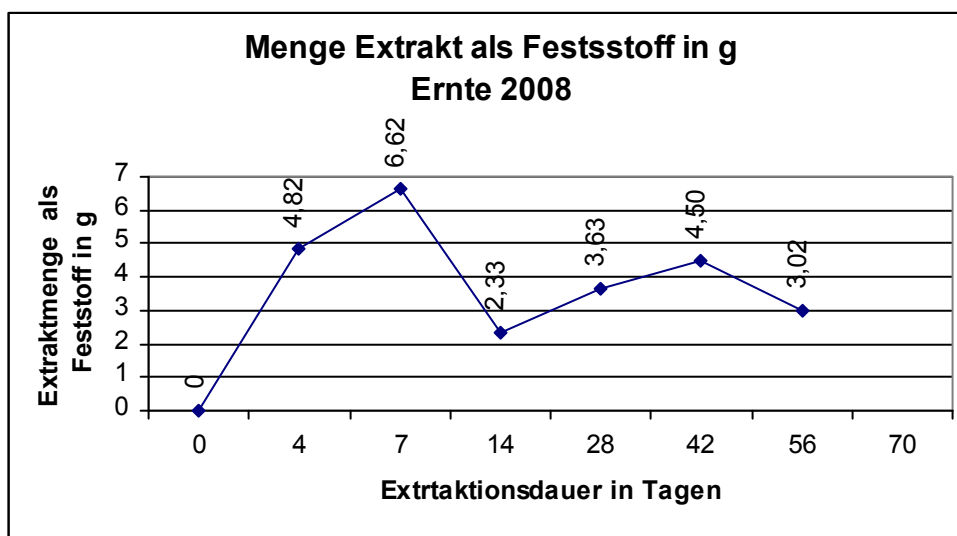


Abb.5 Extraktmenge aus gekelterten Treestern von Spätburgundertrauben. Ernte 2008

In der Abbildung 5 ist die Menge an isoliertem Extrakt in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer dargestellt. Es zeigt sich, dass nach ca. 20 Tagen die übliche Extraktmenge von ca. 4 % gewonnen wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es der Firma PROTEKUM nach mehrjähriger Forschungs- und Entwicklungsarbeit gelungen ist, ein schonendes Verfahren zur Gewinnung eines naturbelassenen Extraktes aus roten Weintrauben zu entwickeln.

Unser Extrakt enthält [12]:

- Die Anthocyane Cyanidin, Delphinidin, Pelargonidin
- die Flavonoide Myricetin, Quercetin, Kämpferol und Catechin
- die Phenolcarbonsäuren Gallussäure, Protocatechusäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure, Syringasäure, Ferulasäure,
- als Minorkomponente das Resveratrol.

Die Inhaltsstoffe liegen, wie in der Weinrebe, weitgehend als Glycoside vor.

Für alle diese Stoffe ist charakteristisch, dass sie phenolische Gruppen enthalten. Den Gehalt an Polyphenolen in unserem Extrakt bestimmen wir nach FOLIN-CIOCALTEU. Diese Gallussäureeinheiten (GAE) geben auch das antioxidative Potential des Extraktes wieder.

Durch das von uns entwickelte spezielle Extraktionsverfahren enthält unser Extrakt darüber hinaus noch

- 7,5 % Weinkernöl mit hohem Anteil (40 %) von cis18:2
- 216,2 mg/100 g α -Tocopherol
- 2,7 mg/100 g β -Tocopherol
- 351,4 mg/100 g α -Tocopherol-acetat.

Vorteile des Verfahrens

Dieses Extraktionsverfahren zeichnet sich aus durch Gewinnung eines qualitativ hochwertigen naturbelassenen Extraktes:

- mit den Glycosiden der Bioflavonoide,
- mit einem hohen Gehalt an oben charakterisierten Polyphenolen,
- mit einem Anteil an Traubenkernöl und Vertretern des Vitamin E.

Nachteile des Verfahrens

Aus nachstehenden Gründen ist der Preis des Extraktes aus gekelterten roten Weintrauben relativ hoch und bringt daher Wettbewerbsnachteile:

- Verwendung des brennbaren Lösungsmittels Isopropanol und damit verbunden notwendige Schutzmaßnahmen (Explosionsschutz) bei der Extraktion und beim Eindampfen des Extraktes,
- extrem lange Extraktionsdauer,
- hoher energetischer und technischer Aufwand zur Rückgewinnung des Lösungsmittels.

Aufgrund dieser Tatsachen soll ein neues Verfahren zur Isolierung der Inhaltsstoffe der roten Weintraube entwickelt werden, welches auf den Einsatz eines organischen, brennbaren Lösungsmittels verzichtet.

Entwicklung eines neuen, biotechnischen Verfahrens zur Gewinnung eines Extraktes aus gekelterten roten Weintrauben

Das zu entwickelnde Verfahren soll auf biotechnischer Basis arbeiten und folgende Kriterien erfüllen:

- Enzymatischer Aufschluss der Zellwände der roten gekelterten Weintrauben (Trester)
- Extraktion mit Hilfe von Wasser unter Variation der Temperatur
- Feststofftrennung in wässrigem Milieu.

Der Hauptbestandteil der Traubenschalen ist wie bereits erwähnt die Cellulose. Dabei handelt es sich um ein unverzweigtes Polymer aus Glucoseeinheiten, die durch β -1,4-Bindungen miteinander verknüpft sind. Die enzymatische Spaltung durch Cellulasen ist ein komplexer Vorgang, der in drei Schritten abläuft:

1. Endo- β -1,4-glucanasen greifen die β -1,4-Bindungen innerhalb des Makromoleküls gleichzeitig an und erzeugen große Kettenabschnitte
2. Exo- β -1,4-glucanasen spalten vom Ende der Kette her das Disaccharid Cellobiose ab
3. β -Glucosidasen hydrolysieren Cellobiose unter Bildung von Glucose.

Durch diese „Auflösung“ des Cellulose-Gerüsts können die darin gebundenen Polyphenole schließlich in die wässrige Umgebung austreten.

Zum Einsatz kommen dabei drei verschiedene Cellulasen, die sich hinsichtlich Aktivität und Komplex unterscheiden:

C1:	Trichoderma viridae lyop.	(fest)
C2:	Trichoderma viridae	(flüssig)
C3:	Cellulase penicillium	(fest)

Die hier eingesetzten Cellulase-Systeme wurden jedoch alle methodisch gleich unter definierten Standardbedingungen untersucht, um die Einwaagen der verschiedenen Versuchskolben hinsichtlich der Enzymaktivität konstant zu halten.

Die ermittelten Aktivitäten sind folgende:

C1:	3060 U/g,
C2:	750 U/g,
C3:	12993 U/g.

Ausschlaggebend für den biotechnischen Aufschluss sind allerdings die Komplexe/Systeme der Cellulasen. Das Cellulase-System besteht aus wenigstens drei Enzymen: Endoglucanasen, Exoglucanasen und β -Glucosidasen. Daneben sind häufig Hemicellulasen oder auch andere Enzyme wie Pectinasen, Xylanasen, Amylasen usw. enthalten. Letztendlich sind bei konstanten

„Aktivitätseinwaagen“ und Umgebungsbedingungen ausschließlich die verschiedenen Enzymkombinationen für unterschiedliches Aufschlussverhalten verantwortlich.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die zu wählenden Konzentrationen sind die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der drei Cellulasen. Infolgedessen müssen die Einwaagen für vergleichbare Aktivität wie folgt gewählt werden:

C1: *Trichoderma viridae* (fest), 3060 U/g wird als „Vergleichscellulase“ mit Faktor 1 angesetzt; somit ergibt sich für

C2: *Trichoderma viridae* (flüssig), 750 U/g mit 3060/750 der Faktor 4,08 und für

C3: *Cellulase penicillium* (fest), 12993 U/g mit 3060/12993 der Faktor 0,24.

Um die Einwaagen schließlich in vertretbarem Rahmen zu halten wird von Cellulase C1 eine Menge von 1g eingesetzt, von C2 somit 4,08g und von C3 0,24g.

In das Untersuchungsprogramm wurden Cellulasen einbezogen.

Bei den Cellulasen kommt es darauf an, die breite Palette der kommerziellen Enzyme in einer Art Screening zu erproben. Bei diesem Screening gilt es, ein unkompliziertes System zu entwickeln, um die Konzentration der Inhaltsstoffe der roten Weintrauben während des Aufschlusses zu bestimmen und in kurzer Zeit einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen. Dafür bieten sich photometrisch analytische Verfahren an.

Die Laboruntersuchungen hatten zum Ziel, das Maximum der Freisetzung der Inhaltsstoffe der roten Weintraubenschalen zu finden.

Für die Untersuchungen wurden 100 g Trester von roten Weintrauben eingesetzt und mit 200 ml destilliertem Wasser vermischt.

Der pH-Wert ist zu kontrollieren und, wenn nötig, in den sauren Bereich zwischen pH 3 und 5 einzustellen.

Die jeweilig festgelegte Cellulosemenge wird in den Kolben gebracht. Anschließend wird der mit einem Gärröhrchen verschlossene Kolben in den Schüttelinkubator gebracht. Unter Einhaltung des Temperaturoptimums und zur Vergleichbarkeit mit den Heferversuchen wird dieser auch hier auf 50 rpm und 35°C programmiert.

Die Dauer der Versuche ist auf 6 Stunden festgelegt. Die enzymatische Reaktion wird durch Erhitzen der Proben, des Laborversuchsmaterials auf 100 °C beendet.

Im Laufe der Versuchsdauer sind 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Versuchsstart Proben gezogen. Diese werden abzentrifugiert und 1ml vom klaren Überstand in Eppendorfcups pipettiert. Zur Verdünnung und Stabilisierung wird jeweils 1ml einer 50%-igen Isopropanollösung zugegeben.

Als Screening werden die Extinktionen der Gärproben im UV/VIS-Spektralphotometer ausgemessen. Somit können Verlauf und Erfolg des Aufschlusses kontrolliert und verglichen werden.

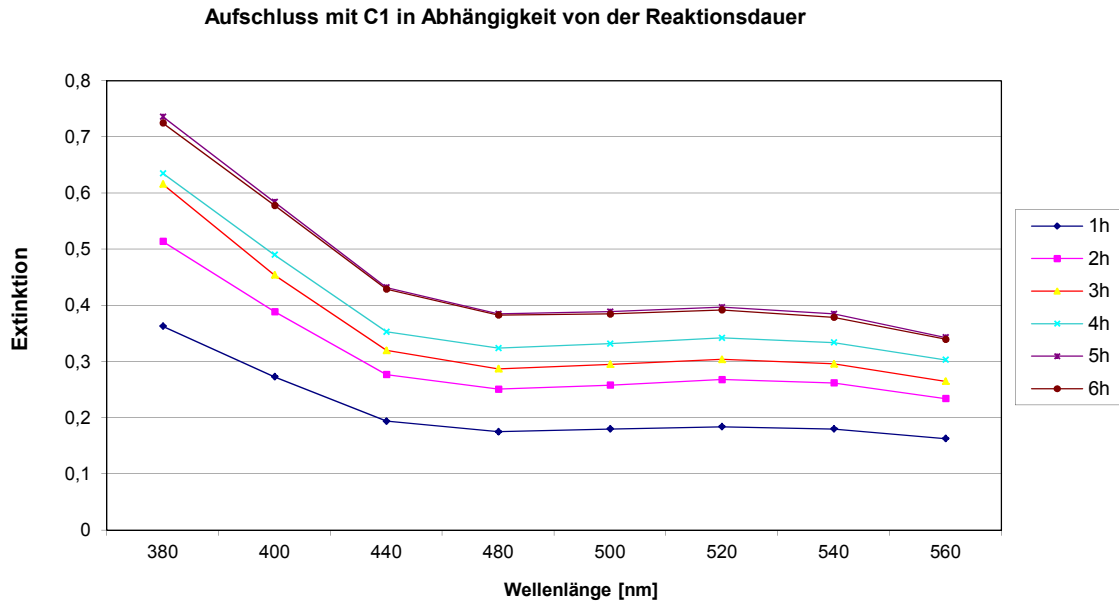


Abb. 6: UV/VIS Absorption während des Aufschlusses mit Cellulase C1

Diese Abbildung zeigt, dass nach einer Aufschlusszeit von fünf Stunden mit Cellulase C1 kein weiterer Anstieg der Extinktionen mehr erfolgte und somit die Zeit des Abbruchs nach sechs Stunden für alle weiteren Aufschlüsse mit Cellulasen beizubehalten war.

Die Proben der sich anschließenden Versuche mit Cellulase C2, *Trichoderma viridae* (flüssig), und C3, *Penicillium*, lagen hinsichtlich ihrer Extinktionen im selben Bereich.

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach FOLIN-CIOCALTEU lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse:

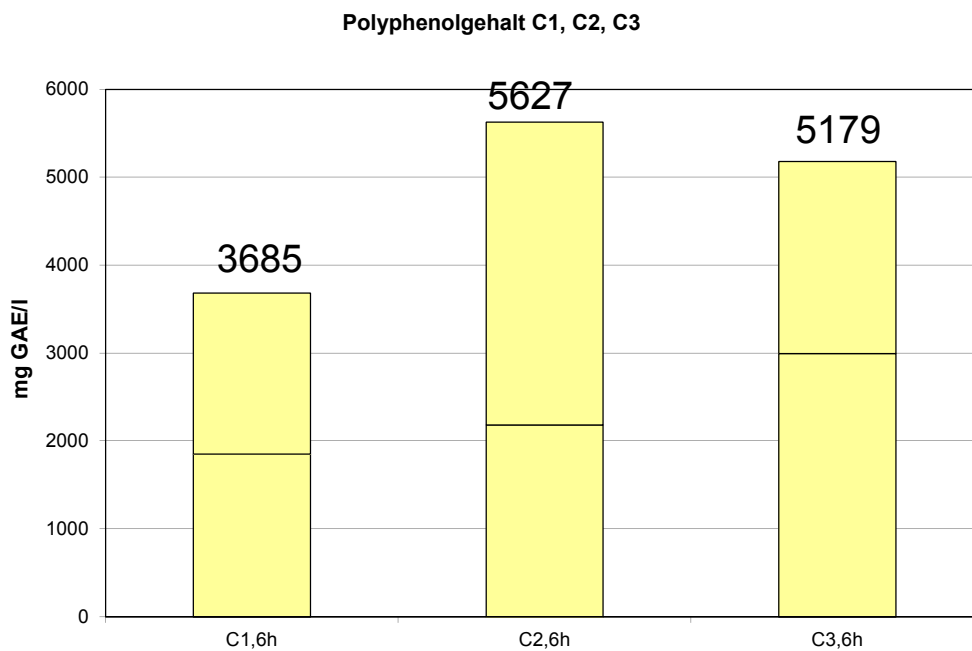


Abb. 7: Polyphenolgehalt der Versuchsreihen mit Cellulasen C1, C2 und C3

Es ist zu erkennen, dass alle Aufschlüsse mit Cellulasen in ihrem Gehalt an Polyphenolen nicht wesentlich höher als bei der Extraktion mit Isopropanol sind. Hinzu kommt, dass Cellulasen im Allgemeinen sensibler auf Umgebungsbedingungen reagieren (z.B. pH-Wert) und auch in ihrem Anschaffungspreis sehr teurer sind. Außerdem ist zu bedenken, dass die Reste der Cellulasen nach Beendigung der Reaktion als Proteinbruchstücke in dem Extrakt verbleiben.

Aufgrund dieser genannten Nachteile wurden keine weiteren Versuchsreihen mit Cellulasen durchgeführt.

Zusammenfassung

Nach den verschiedenen Untersuchungen zur Gewinnung eines Extraktes aus gekelterten roten Weintrauben ist festzustellen, dass das Verfahren unter Verwendung von Isopropanol als Lösungsmittel, zwar wegen der explosionsgeschützten Technologie großen Aufwand erfordert, jedoch ein sehr sauberes, naturbelassenes Produkt liefert. Dieser Extrakt ist sicherlich relativ problemlos als Nahrungsergänzungsmittel einsetzbar.

Der biotechnische Aufschluss der Rotweintrester mit Hilfe von Cellulasen liefert hinsichtlich der Ausbeute keinen besonderen Vorteil. Der Nachteil ist der Verbleib von Proteinrückständen im Extrakt. Die zwar inaktiven Cellulasebruchstücke, lassen den Einsatz des Extraktes als Nahrungsergänzungsmittel deshalb als fragwürdig erscheinen.

Literatur

- [1] S. Renaud, M. De Lorgeril: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease; *Lancet*, 339 [1992], 1523-1525
- [2] D.M. Klurfeld, D. Kritschewsky: Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits; *Exp.Mol.Pathol.* 34 (1981) 62-71
- [3] B.F de Simon; T. Hernandez, I. Estrella: Relationship between chemical structure and biosynthesis and accumulation of certain phenolic compounds in grape wine during ripening; *Z.Lebensm.-Unters.Forsch.* 195 (1992) 124-8
- [4] J.A. Vinson, K. Teufel, N. Wu : Red wine, dealcoholized red wine, an especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model; *Artherosclerosis* 156 (2001), 67-72
- [5] R. Corder, J.A. Douthwaite, D.M. Lees, N.Q. Khan, A.C.V. dos Santos, E.G. Wood, M.J. Carrier: Endothelin-1 synthesis reduced by red wine; *Nature* 414 (2001) 863-864
- [6] M. Flesch, A. Schwarz, M. Böhm: Effects of red and white Wine on endothelial-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries; *Am. J. Physiol.* 183 (1998), 183-190
- [7] H. Kamai, T. Koide, T. Kojimam, M. Hasegawa, K. Terabe, T. Umeda und Y. Hashimoto; *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 11 (1996), 193-196
- [8] Kamei H. Hashimoto Y. Koide T. Kojima T. Hasegawa M.: Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines; *Cancer Biother. Radiopharm.* 13(6):447-452, 1998 Dec.
- [9] A.J. Clifford, S.E. Ebeler, J.D. Ebeler, N.D. Bills, S.H. Hinrichs, P-L. Teissedre, A.L. Waterhouse: Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids; *Am.J. Clin.Nutr.* 64(1996), 748-756
- [10] H. Makita, T. Tanaka, H. Fujitsuka, N. Tatematsu, K. Satoh, A. Hara und H. Mori; *Cancer Res.* 56 (1996), 4904-4909

- [11] M. Jang, L. Cai, G.O. Udeani, K.L.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, J.M. Pezzuto: Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes; *Science*, 275 (1998), 218-220
- [12] J. Werner: Diplomarbeit, Analytische Charakterisierung der Inhaltsstoffe des naturbelassenen Extraktes aus gekelterten roten Weintrauben, Fachhochschule Neubrandenburg, 2005

Wir danken Frau Martina Genthner für ihre Mitarbeit an dieser Aufgabenstellung.

Adresse der Verfasser: PROTEKUM Umweltinstitut GmbH.
 16515 Oranienburg, Lehnitzstr. 73



[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)