

## Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeeren in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität Kaiserslautern Fachbereich Chemie Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie Prof. Dr. Elke Richling
<b>Forschungsstelle II:</b>	Universität Wien Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie Prof. Dr. Doris Marko
<b>Industriegruppen:</b>	Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V. (VdF), Bonn Fachverband Pektin e. V., Neuenbürg
	Projektkoordinator: Prof. Dr. Hans-Ulrich Endreß Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg
<b>Laufzeit:</b>	2011 - 2013
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 271.000,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

In der Bevölkerung steigt mit zunehmendem Alter die Inzidenz chronischer Erkrankungen. Eine häufig diskutierte Ursache chronischer Erkrankungen ist oxidativer Stress. Dieser entsteht im Körper, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung und Inaktivierung von sog. reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) kommt. Diesem Ungleichgewicht können endogene Faktoren (z.B. körpereigenes Glutathion (GSH)) und exogene Antioxidantien (z.B. Flavonoide) entgegenwirken. Epidemiologische Daten zeigen, dass eine Ernährung mit einem hohen Anteil an Flavonoiden präventive Eigenschaften hat und mit einem inversen Effekt bezüglich des Risikos chronischer Krankheiten korreliert. Beerenfrüchte (vor allem Wildheidelbeeren) stellen eine wichtige Quelle an diesen Flavonoiden dar. Für die Wildheidelbeere werden neben anderen Polyphenolen hauptsächlich die Anthocyane für deren Wirkung verantwortlich gemacht. Vor allem antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften von Anthocyanen werden derzeit diskutiert. Der Nachteil von Anthocyanen im Vergleich zu anderen Polyphenolen resultiert aller-

dings aus deren geringen Bioverfügbarkeit. In vielen Studien liegt die Bioverfügbarkeit von verzehrten „intakten“ Anthocyanen im Urin meist unter 0,1 %. Ein Grund für die geringe Aufnahme von Anthocyanen ist deren limitierende Stabilität. Im Darm, welcher als Hauptresorptionsort für Anthocyane gilt, liegt ein Milieu von pH 6-8 vor. Unter diesen pH-Bedingungen sind die Strukturen der Anthocyane nur begrenzt stabil. Daraus begründete sich in der Vergangenheit unter anderem das Forschungsziel, Anthocyane aus Heidelbeerextrakt (HBE) mit Hilfe verschiedener Verkapselungstechniken während der Darmpassage zu stabilisieren und gezielt am Wirkort freizusetzen (DFG/AiF-Cluster 1, 2008-2011). Die effektivsten Verkapselungstechniken basierten dabei auf Molkenprotein- und Pektinbasis. *In vitro* konnten durch die Verkapselung im Vergleich zum unverkapselten Extrakt höhere Anthocyankonzentrationen im (simulierten) Dünndarmmilieu erreicht werden. Außerdem zeigte sich *in vitro* keine Reduktion auf der Ebene der biologischen Aktivität (ROS, DNA-Strangbrüche, GSH) durch die Verkapselung.

Ziel des Forschungsvorhabens war es nun, die bisherigen In-vitro-Ergebnisse zur biologischen Aktivität des HBE (unverkapselt und verkapselt) und der Bioverfügbarkeit der Anthocyane aus dem HBE bzw. Kapselmaterial auf die In-vivo-Situation zu übertragen und zu verifizieren. Die zentrale Frage war, in welchem Ausmaß Anthocyane aus HBE die Bioaktivität beeinflussen können, unverändert in den Dickdarm gelangen, welche Rolle Prozesse der Dickdarmmikrobiota spielen und inwieweit dies durch Stabilisierungs-(Verkapselungs-)Techniken moduliert werden kann. Der Lösungsweg für diese Fragestellungen wurde durch eine humane Pilotstudie an Probanden realisiert. Welchen Einfluss der Dickdarm bezüglich der Bioaktivität und Bioverfügbarkeit von HBE besitzt, kann anhand von Probanden mit intaktem Gastrointestinaltrakt nur begrenzt erfasst werden. Aus diesem Grund wurde die Studie zum einen mit Probanden, die ein Stoma am terminalen Ileum besitzen (Pilotstudie A, ohne Kolon) und zum anderen analog mit Kontrollprobanden (Pilotstudie B) mit intaktem Kolon durchgeführt.

#### Forschungsergebnis:

Die Pilotstudie wurde 2011 erfolgreich am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt und unterteilte sich in drei Abschnitte. Dabei erfolgte während der Studienphase 1 die Verabreichung von Heidelbeerextrakt (HBE), während Studienphase 2 die Verabreichung von HBE-beladenen Molkeproteinkapseln (hergestellt durch die Arbeitsgruppe Prof. Kulozik, TU München) und während Studienphase 3 die Verabreichung von HBE-beladenen Citruspektinkapseln (hergestellt durch die Arbeitsgruppe Prof. Schwarz, Universität Kiel), jeweils mit äquimolaren Anthocyankonzentrationen. Durchgeführt wurde die Pilotstudie mit Probanden mit intaktem Gastrointestinaltrakt (mit Kolon - Studie B) und Probanden, die einen künstlichen Dünndarmanusgang (Stoma) besitzen (ohne Kolon - Studie A). Während der Studie wurden von allen Probanden Blut- und Urinproben und von den Ileostomieprobanden zusätzlich Ileostomabeutel gesammelt. Durch den Vergleich der beiden Probandengruppen konnte somit erfasst werden, welchen Einfluss der Dickdarm auf die Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität besitzt und inwieweit im Dickdarm gebildete Metaboliten für biologische Wirkungen verantwortlich sind.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Verkapselung von Anthocyanen deren Biover-

fübarkeit im Vergleich zu nichtverkapselten Anthocyanen modulieren kann, wobei die Bioverfügbarkeit der Anthocyane im Allgemeinen während dieser Studie sehr gering war. Durch Molkeproteinverkapselung konnte die Bioverfügbarkeit der Anthocyane am stärksten erhöht werden und durch Citruspektinverkapselung konnten vermehrt Anthocyane in das Kolon gelangen. Als zentraler Befund auf der biologischen Ebene war zu beobachten, dass in den gesunden Probanden (mit funktionellem Kolon) bereits 2 h nach HBE-Verzehr eine tendenzielle Abnahme der direkten und oxidativen DNA-Strangbrüche (Comet-Assay mit Formamidopyrimidinglycosylasebehandlung) auftrat. Es zeigte sich in diesen gesunden Probanden beim Konsum von unverkapseltem HBE bereits nach 1 h eine signifikante Veränderung der Transkription (Anstieg der Transkripte für NQO1, Verminderung für HO-1). Dieser Effekt verstärkte sich 2 h nach HBE-Aufnahme, wobei zusätzlich ein signifikanter Abfall der Transkripte für Nrf2 zu beobachten war. Diese rasche antioxidative ‚response‘ wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben und konnte kürzlich publiziert werden.

Die beobachtete biologische Wirkung (Modulation von DNA-Strangbrüchen und Nrf2-regulierter Gene) nach HBE-Verzehr (verkapselt und unverkapselt) konnte allerdings nicht alleine auf die „intakten Anthocyane“ zurückgeführt werden. Literaturdaten und eigene Messungen zeigen, dass die resultierenden Anthocyan-Abbauprodukte, die im Darm gebildet werden, um ein Vielfaches gegenüber intakten Anthocyanen im Urin zu finden sind und vermutlich die eigentlichen strukturellen Wirkkomponenten der Anthocyane (im Menschen) darstellen könnten. Insbesondere der intestinale Anthocyanmetabolit Phloroglucinolaldehyd erwies sich in ergänzenden In-vitro-Untersuchungen als biologisch aktiv. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen also, dass es nicht ausschließlich wichtig ist, die intakten Anthocyane im Körper zu stabilisieren, sondern auch den Einfluss der Verkapselung auf die Bildung potentiell bioaktiver Abbauprodukte der Anthocyane zu berücksichtigen.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Lebensmittelindustrie ist stark mittelständisch geprägt. 55 % der Betriebe haben weniger als 50 und 98 % der Betriebe weniger als 500 Mitarbeiter. Dabei nimmt der Anteil an kleinen und mittelständischen Unternehmen (KMU) bei

Herstellern von Massenprodukten aufgrund der kleinen Deckungsbeiträge stetig ab, da diese nur unzureichend vom "Economies of Scale" profitieren können. Gerade KMU sind daher verstärkt auf Nischenmärkte angewiesen. Der Bereich der funktionellen Lebensmittel mit höheren Deckungsbeiträgen und innovativen Technologien bietet für KMU eine besondere Chance.

Die „Health-Claims“-Verordnung zwingt die Hersteller zur Erfassung sehr aufwändiger Wirkungsnachweise mittels Humanstudien, deren Erforschung ein KMU alleine nicht tragen kann. Gerade der Comet-Assay als Methode zur Bestimmung von DNA-Schäden wird von der EFSA generell als validierter Parameter akzeptiert. Die in jüngster Zeit erfolgten Ablehnungen von Claims erfolgten aufgrund von unspezifischen Messungen und der Ex-vivo-Bestimmung unspezifischer oxidativer DNA-Schäden nach Lymphozytenextraktion, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung oder Oxidation mit Fe<sup>2+</sup>. Im vorliegenden Projekt erfolgte die Bestimmung oxidativer DNA-Schäden (Behandlung der DNA mit Formamidopyrimidinglycosylase) direkt aus Vollblut ohne Artefakt erzeugende Isolierungsschritte. Die Ergebnisse dieser Studie eröffnen den Unternehmen die Chance, Wirkungsstudien zielführender und damit ökonomisch effizienter anzulegen. Die unerwartete rasche antioxidative ‚response‘ nach Verzehr von Heidelbeerextrakt lässt sich möglicherweise auch auf andere anthocyanreiche Lebensmittel (z.B. Säfte) übertragen. Die gewonnenen Erkenntnisse bieten eine gute Grundlage für weitere Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten bezüglich der Herstellung von Fruchtsäften, Smoothies, Shots, Fruchtextrakten und Fruchtzubereitungen mit „gesundheitlichen Wirkungen“ und können somit wesentlich zur Optimierung der Funktionalität dieser Produkte beitragen.

Modulation of Nrf2-dependent gene transcription by bilberry anthocyanins in vivo? *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 545-550 (2013).

3. Mueller, D., Schantz, M. und Richling E.: Antioxidative Wirksamkeit von unverkapselten bzw. verkapselten Anthocyanen aus Wildheidelbeerextrakt (*Vaccinium myrtillus L.*). *Lebensmittelchem.* 67 (2), 28 (2013).
4. Mueller, D., Jung, K., Winter, M., Rogoll, D., Melcher, R. und Richling, E.: Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *J. Agric. Food Chem.* (eingereicht).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität Kaiserslautern  
 FB Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie  
 Erwin-Schrödinger-Str. 52  
 67663 Kaiserslautern  
 Tel.: +49 631 205-4061  
 Fax: +49 631 205-3035  
 E-Mail: richling@chemie.uni-kl.de

Universität Wien  
 Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie  
 Währinger Straße 38, 1090 Wien  
 Tel.: +43 1 4277-70800  
 Fax: +43 1 4277-70899  
 E-Mail: doris.marko@univie.ac.at

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
 Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
 Tel.: +49 228 3079699-0  
 Fax: +49 228 3079699-9  
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.
2. Kropat, C., Mueller, D., Boettler, U., Zimmermann, K., Heiss, E., Dirsch, V., Rogoll, D., Melcher, R., Richling, E. und Marko, D.:

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.