

Aktivitätsgeleitete Fraktionierung von Fruchtsaftextrakten zur Identifizierung von Wirkstoffen zur Beeinflussung der Glucoseresorption im Menschen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität Kaiserslautern Fachbereich Chemie Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie Prof. Dr. Elke Richling
Forschungsstelle II:	Technische Universität Braunschweig Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. P. Winterhalter/Dr. Gerold Jerz
Industriegruppe(n):	Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (VdF), Bonn Projektkoordinator: Dipl.-Ing. Hans Mario Dechent Eckes-Granini Group GmbH, Nieder-Olm
Laufzeit:	2016 – 2018
Zuwendungssumme:	€ 457.190,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

In den letzten Jahren stieg aufgrund eines erhöhten Ernährungsbewusstseins die Nachfrage nach Lebensmittelinhaltsstoffen mit chemoprotektivem Potential. Früchte enthalten neben Vitaminen auch einen signifikanten Anteil weiterer bioaktiver Inhaltsstoffe. Ein hoher Frucht- und Gemüsekonsum ist invers korreliert mit zahlreichen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs.

Aus der Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sind insbesondere die Polyphenole in den vergangenen Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt und in Hinblick auf ihre gesundheitsförderlichen Eigenschaften vorwiegend mittels In-vitro-Studien untersucht worden. Bei Diabetes mellitus Typ 2 geht man neben einer gestörten Insulinsensitivität auch von einer erhöhten Glucosefreisetzung aus der Leber via dem Schlüsselenzym der Glykogenolyse, der Glykogenphosphorylase (GP), aus. Glucose wird täglich über die Nahrung in Form von Stärke, Saccharose oder Glu-

cose dem Körper zugeführt. Die Kohlenhydrate werden im Gastrointestinaltrakt durch Enzyme gespalten und anschließend über Transporter in den Blutkreislauf aufgenommen. Auch Enzyme der Leber und Muskulatur tragen zur Reduzierung des Blutglucosespiegels bei. Seit Jahren beschäftigt sich die pharmazeutische Industrie mit der Suche nach Substanzen, die den Blutglucosespiegel positiv beeinflussen können („glycaemic control“). Ein Ansatz ist hierbei die Hemmung der α -Amylase und α -Glucosidase im Darm sowie die Hemmung von Glucosetransportern vor allem in den Nieren, um die Rückresorption der Glucose ins Blut zu verhindern. Ein weiterer Ansatz ist die Identifizierung von GP-Inhibitoren, die verhindern, dass aus dem Speicherkohlenhydrat der Leber (Glykogen) Glucose freigesetzt und ins Blut abgegeben wird.

Zahlreiche Polyphenole werden im Zusammenhang mit einer Reduzierung des Blutglucosespiegels und damit einer langfristigen Reduktion des Diabetesrisikos diskutiert. Fruchtsäfte stellen prinzipiell eine gute Quelle für präventiv wirkende sekun-

däre Pflanzenstoffe, vor allem Polyphenolen, dar, wobei der Pro-Kopf-Verbrauch von Fruchtsäften in Deutschland seit Jahren rückgängig ist und derzeit bei ca. 33 L pro Jahr liegt.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Identifizierung von Inhaltsstoffen in Fruchtsäften, die maßgeblich den Glucosestoffwechsel beeinflussen und somit zur Reduzierung der Blutglucose beitragen können. Im Zuge von Maßnahmen zur Beeinflussung des Blutglucosespiegels durch Fruchtinhaltsstoffe sollte ein Fruchtsaftextrakt getestet werden, der aufgrund seiner spezifischen Zusammensetzung in der Lage ist, den Blutglucosespiegel günstig zu beeinflussen. Zentrale Hypothese war hierbei, dass sekundäre Pflanzenstoffe von Fruchtsäften (insbesondere von Buntsäften) in der Lage sind, regulierend in den Kohlenhydratstoffwechsel einzugreifen. Diese Inhaltsstoffe sollten über eine Aktivitäts-geleitete Fraktionierung der Saftextrakte identifiziert und strukturell charakterisiert werden. Mit diesem Wissen kann die Fruchtsaftindustrie neue gesundheitsförderliche Saftprodukte entwickeln sowie ihre Prozesse in Hinblick auf den weitestgehenden Erhalt dieser wertgebenden Inhaltsstoffe optimieren. Angestrebt wurde eine Beeinflussung des Blutglucosespiegels von gesunden Personen. Ein moderater Anstieg der Blutglucosekonzentration und damit eine geringere Insulinausschüttung war das Ziel.

Forschungsergebnis:

Zu Beginn der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung wurde ein Screening mit 37 Muttersäften, 16 Saftkonzentraten und 5 Pürees aus 16 verschiedenen Obstsorten durchgeführt. Nach einer Extraktion und einer säulenchromatographischen Anreicherung phenolischer Verbindungen wurden die Extrakte in vitro auf ihr Inhibitions Potenzial gegenüber α -Amylase und α -Glucosidase getestet. Als Positivkontrolle diente das Medikament Glucobay, ein Glucosidase- und Amylasehemmer mit dem Wirkstoff Acarbose. Da es beim roten Traubensaft eine Rolle spielen könnte, welche Traubensorte verarbeitet wurde, wurden aus 12 sortenreinen roten Traubensäften Extrakte hergestellt. Charakterisiert wurden die Extrakte mittels HPLC-ESI-MSⁿ, dem Gesamtpolyphenolgehalt und

der antioxidativen Aktivität. Im Screening der verschiedenen roten Fruchtsäfte zeigte sich, dass alle Saftextrakte potente Inhibitoren der beiden Verdauungsenzyme α -Amylase und α -Glucosidase enthalten. Extrakte aus Holunderbeere, Sauerkirsche und Heidelbeere wiesen tendenziell eine schwächere inhibitorische Aktivität auf, während Extrakte aus Aronia, Preiselbeere, roter Traube und Granatapfel potenter waren. In beiden Testsystemen wiesen die untersuchten roten Traubensorten eine ähnliche inhibitorische Aktivität auf. Die Varietät scheint also keinen Einfluss auf das inhibitorische Potential der Traubenprobe zu haben. Über eine Nutzwertanalyse konnten die drei aktivsten Fraktionen ermittelt werden. Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung erfolgte mit einem Aroniasaft (*Aronia melanocarpa*), einem Granatapfelsaft (*Punica granatum*) und einem roten Traubenkonzentrat (*Vitis vinifera*) aus Italien. Zu Beginn der Fraktionierung wurde mittels einer membran chromatographischen Trennung der XAD-7-Extrakte verschiedener Buntsäfte jeweils die Anthocyan- und Copigmentfraktion erhalten. Zur Gewinnung der Polymerfraktion aus den XAD-7-Extrakten wurde die bedingte Löslichkeit der höhermolekularen Verbindungen in unpolaren Lösungsmitteln ausgenutzt und die Polymere wurden mittels Hexan ausgefällt. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihr Inhibierungspotenzial getestet. Eine anschließende Subfraktionierung der erhaltenen Anthocyan- und Copigmentfraktionen mittels Gegenstromverteilungschromatographie (engl. countercurrent chromatography, CCC) und darauffolgende Inhibitionstestungen der einzelnen (Sub-)Fraktionen lieferte weitere Erkenntnisse zur Identifizierung der Schlüsselkomponenten und ließ darüber hinaus auch Schlussfolgerungen über synergistische Effekte zu. Bei den In-vitro-Untersuchungen an Forschungsstelle 1 zeigte sich, dass alle Fraktionen und Subfraktionen potente Inhibitoren der beiden Enzyme enthalten. Über massenspektrometrische Analysen konnten Vertreter verschiedener phenolischer Verbindungsklassen identifiziert werden, darunter zahlreiche Anthocyane. Eine Testung der Reinsubstanzen belegte die inhibitorische Wirkung im α -Amylase- und α -Glucosidase-Assay und ergab Hinweise darauf, dass eine große Anzahl an Hydroxylgruppen und die damit verbundene

höhere Polarität zu einem erhöhten inhibitorischen Potential führt. Aber auch die Größe des Moleküls bzw. die des gebundenen Zuckerrestes bei Anthocyanen nimmt einen Einfluss. Je kleiner der Inhibitor desto größer war das Hemmpotential. Des Weiteren hängt die inhibitorische Aktivität auch von der Interaktion verschiedener Substanzen ab, was durch Testung von Einzelsubstanzen bestätigt werden konnte. In der Humanstudie zeigte sich eine signifikante Reduktion sowohl des Blut- als auch des Gewebeglucosespiegels nach Konsum von 100 mg Aroniadirektsaft-Extrakt mit Maltodextrin im Vergleich zum Kontrollgetränk ohne Extrakt. Die Insulinkonzentration hingegen wurde nicht beeinflusst. Während nach Aufnahme von 120 mg eines Extraktes aus rotem Traubensaftkonzentrat mit Maltodextrin der Glucosespiegel weder im Blut noch im Gewebe reduziert wurde, lies sich eine signifikante Erhöhung der Insulinkonzentration beobachten. Für alle drei Parameter konnten bei Verzehr der Extrakte mit Maltodextrin bei den Probanden individuelle Unterschiede festgestellt werden, die eine Einteilung der Probanden in Responder und Nicht-Responder nahelegen. Die Testgetränke und der Direktsaft bzw. das Saftkonzentrat von Aronia und roter Traube wurden abschließend auf ihre Lagerstabilität untersucht. Vor allem im ersten Monat nahm der Polyphenolgehalt der Testgetränke signifikant ab. Die phenolischen Verbindungen im Direktsaft und Saftkonzentrat waren dabei stabiler als diejenigen der Testgetränke. Für den Erhalt der bioaktiven Schlüsselkomponenten wird deshalb eine kühle Lagerung (4 °C) unter Lichtausschluss empfohlen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Wissen um die gesundheitsfördernden Inhaltsstoffe von Früchten und Fruchtsäften sowie der Beleg ihrer Wirksamkeit (z.B. blutzuckerregulierende Wirkung) sind nicht zuletzt in Hinblick auf die oftmals negative Berichterstattung in den Medien wichtig. Letztere beziehen sich oftmals allein auf zu hohe Zuckergehalte, ohne die positiven Inhaltsstoffe eines Fruchtsaftes, wie z.B. die sekundären Pflanzenstoffe (Polyphenole, Carotinoide), zu berücksichtigen, was zu einer Verunsicherung der Verbraucher führen kann. Zuletzt betrug der Pro-Kopf-Ver-

brauch an Fruchtsäften/Fruchtnektaren in Deutschland nur noch ca. 32,2 L p.a. (in 2017) nach dem Rekordwert von ca. 42 L p.a. (in 2003). Insbesondere das gesundheitsfördernde Potential an Polyphenolen, welche vor allem in roten Früchten vorkommen, gibt Anlass, Fruchtsäfte und Fruchtsaftkonsum positiv im Bewusstsein der Konsumenten zu verankern.

Die gewonnenen Erkenntnisse können in die Entwicklung von Getränken, Smoothies, Shots, Fruchtextrakten und -zubereitungen mit gesundheitlichen Wirkungen einfließen und somit wesentlich zur Optimierung von deren Funktionalität beitragen. Fruchtextrakte finden sich aber nicht nur in Lebensmitteln, sondern auch in kosmetischen und pharmazeutischen Produkten. Daher kann dieses Vorhaben auch über die Lebensmittelbranche hinaus zur Wissensmehrung beitragen und von anderen Branchen im Bereich der ‚Life Sciences‘ mit genutzt werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2019.
2. Berger, K., Ostberg-Potthoff, J.J., Bakuradze, T., Winterhalter, P. & Richling, E.: Untersuchung der blutzuckersenkenden Wirkung ausgewählter Fruchtsaftextrakte im Rahmen einer humanen Interventionsstudie. *Lebensmittelchem.* 73 (3), 49 – 80 (2019).
3. Ostberg-Potthoff, J.J., Berger, K., Richling, E. & Winterhalter, P.: Activity-Guided Fractionation of Red Fruit Extracts for the Identification of Compounds Influencing Glucose Metabolism. *Nutr.* 11, 1166, 1-21 doi:10.3390/nu11051166. (2019).
4. Ostberg-Potthoff, J.J., Berger, K., Bakuradze, T., Richling, E. & Winterhalter, P.: Aktivitätsgeleitete Fraktionierung von Fruchtsaftextrakten zur Identifizierung von Wirkstoffen zur Beeinflussung der Glucoseresorption im Menschen. *Lebensmittelchem.* 72, 1-24, 13 (2018).
5. Berger, K., Ostberg-Potthoff, J.J., Bakuradze, T., Winterhalter, P. & Richling, E.: Einfluss von Extrakten aus roten Buntsäften auf die α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität *in vitro*. *Lebensmittelchem.* 71, 129-160, 144 (2017).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie, Fachrichtung
Lebensmittelchemie und Toxikologie
Erwin-Schrödinger-Str. 52,
67663 Kaiserslautern
Tel.: +49 631 205-4061
Fax: +49 631 205-3085
E-Mail: richling@chemie.uni-kl.de

Technische Universität Braunschweig
Institut für Lebensmittelchemie
Schleinitzstraße 20
38106 Braunschweig
Tel.: +49 531 391-7202
Fax: +49 531 391-7230
E-Mail: p.winterhalter@tu-bs.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 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.