



Universität für Bodenkultur Wien

Department für Lebensmittelwissenschaften
und -technologie

GEWINNUNG SEKUNDÄRER
PFLANZENWIRKSTOFFE MITTELS
MEMBRANVERFAHREN UND CHROMATOGRAPHIE
RECOVERY OF SECONDARY PLANT COMPOUNDS
UTILIZING MEMBRANE PROCESSES AND
CHROMATOGRAPHY

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der Universität für Bodenkultur Wien

Eingereicht von
Dipl.-Umweltwiss. Dipl.-Ing.(FH) Ulf Jens Schubert

Betreuer:
A.o.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Senad Novalin

Wien, Februar 2008

„Eure Nahrungsmittel sollen eure Heilmittel
und eure Heilmittel eure Nahrungsmittel sein“
(Hippokrates, 460 - 377 v.Chr.)

Diese Arbeit ist meinem Zwillingsbruder Sven gewidmet.

„follow your dreams“

Danksagung

Mein Dank gilt allen Freunden, Kollegen und Kooperationspartnern, die durch ihre Unterstützung die Erarbeitung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn A.o.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Senad Novalin, der durch sein Engagement das Projekt erst ermöglichte und fortlaufend mit Rat und Tat zur Seite stand. Unsere anregenden Gespräche, auch über den Tellerrand der Durchführung des Projektes hinaus, haben die Arbeit gefördert und eine ganzheitliche Betrachtung der Thematik ermöglicht.

Dem ehemaligen Departmentleiter, Herrn A.o.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Emmerich Berghofer danke ich für seinen geschätzten Rat und die Möglichkeit, die Dissertation an diesem Department durchführen zu dürfen. Ebenso möchte ich seinem Nachfolger, Herrn Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Wilhelm Windisch danken. Weiter möchte ich mich bei dem ehemaligen Abteilungsleiter der Lebensmittelbiotechnologie, Herrn O.Univ.Prof. i.R. Dipl.-Chem. Dr.rer.nat. Klaus Dieter Kulbe und seinem Nachfolger, Herrn Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Dietmar Haltrich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr.nat.techn. Hong Thang Vu, Frau Dipl.-Ing.ⁱⁿ Michaela Binder, Frau Dipl.-Ing.(FH) Helen Rickhoff, Frau Dipl.-Ing.(FH) Eva Nowak, Frau Dipl.-Ing.ⁱⁿ Vanja Vasiljevic sowie Philipp Wurbs, Sara Doppler, Karl Schneider, Herbert Linhard, Stefan Scheiblbrandner, Nikolaus Pfaffenbichler und Inge van der Zijden für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre in unserem Arbeitskreis und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr.rer.nat. Wolfgang Fichtner für die Kooperation mit der Hochschule Darmstadt.

Auch möchte ich mich explizit für die finanzielle Unterstützung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft und die Firma New Technology Anlagenbau GmbH bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die meine Fortbildungen stets unterstützten und mir emotional zur Seite standen.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand am Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie in der Abteilung Lebensmittelbiotechnologie der Universität für Bodenkultur Wien im Arbeitskreis von A.o.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Senad Novalin von Oktober 2004 bis Februar 2008.

Im Zeitraum vom 1. November 2005 bis 31. Oktober 2007 wurde das Projekt durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft mit dem Industriepartner NTA (New Technology Anlagenbau GmbH) aus Grünau im Almtal (Projekt-Nr. 810066/7878-SCK/SAI) gefördert.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Isolierung und Gewinnung von sekundären Pflanzenstoffen (Polyphenolen) aus Byproducts der Lebensmittelindustrie. Dabei wurde eine neue Trennstrategie, bestehend aus Vorreinigung und -fraktionierung mittels Membranverfahren in Kombination mit präparativer Chromatographie, vorgeschlagen und untersucht. Als repräsentative Rohstoffe dienten in erster Linie Wein- und Apfeltrester. Darüber hinaus wurde ermittelt, ob Rotklee, Sojakeie und Biertreber als alternative Rohstoffquellen geeignet sind. Im ersten Teil der Arbeit wurden Extraktionsversuche durchgeführt und das Extraktionsverfahren teilweise optimiert (geeignete Prozessparameter: Zweistufenextraktion, Ethanol/Wasser 20/80 (v/v), Feststoff/Flüssigkeits-Verhältnis 1:4, 50 °C, 2 h). Im zweiten Abschnitt wurden zunächst Membranversuche mit keramischen Membranen durchgeführt, wobei vor allem die Permeatleistung und das Rückhalteverhalten in Abhängigkeit von der Porengröße (NMWC 1, 3, 5, 8 und 15 kDa) und der Überströmgeschwindigkeit (3, 4,5 und 6 m/s) untersucht wurden. In weiterer Folge stand die Leistungsfähigkeit und das Rückhaltevermögen organischer Flachmembranen (NMWC 10, 4, 1, 0,3 und 0,2 kDa) im Vordergrund des Interesses. Es zeigt sich, dass erwartungsgemäß mittels Membranen eine teilweise Fraktionierung möglich ist, wobei die Membrandeckschicht die Rückhalteigenschaften maßgeblich beeinflusst. Die präparative Chromatographie wurde mit Scout-Säulen (6,5 x 300 mm), C18-Harzen (YMC, ODS-A 50 µm) und Ethanol/Wasser-Eluenten untersucht und entwickelt. Aus praktischer Sicht ist die Isolierung/Gewinnung einzelner Polyphenole mittels Chromatographie kaum möglich. Ein Hybridverfahren bestehend aus Nanofiltration/Chromatographie kann geeignet und vorteilhaft sein, um sekundäre Pflanzenstoffe im industriellen Maßstab zu gewinnen.

Schlüsselwörter: sekundäre Pflanzenstoffe, Polyphenole, Weintrester, Apfeltrester, Membranverfahren, präparative Chromatographie

Abstract

This work deals with the isolation and recovery of secondary phytochemicals (polyphenols) from by-products of the food industry. A new separation strategy consisting of a preliminary purification and fractionation using membrane technology in combination with preparative chromatography was suggested and investigated. First and foremost pomace of wines and apples were chosen as representative natural resources. Additionally, by-products such as red clover, okara and draff from brewing were determined as alternative raw materials. Initially, extraction experiments were conducted and the extraction process was partly optimized (appropriate process parameters: two-step extraction, ethanol/water 20/80 (v/v), solid/liquid-ratio 1:4, 50 °C, 2 h). The second part of the work investigates the effect of pore size (NMWC 1, 3, 5, 8 and 15 kDa) on flux performance and retention behaviour in ceramic membranes. Moreover, the performance of organic membranes (NMWC 10, 4, 1, 0,3 and 0,2 kDa) was the focus of interest. As predicted, partial fractioning is possible by utilizing membranes. However, the retention properties of the membranes are highly dependent on its filtration layer. The preparative chromatography was investigated and developed by using scout-columns (6,5 x 300 mm), C-18 resins (YMC, ODS-A 50 µm) and ethanol/water-elution. From a practical point of view the isolation/recovery of single polyphenols by chromatography is unlikely. A more appropriate solution is a hybrid process consisting of nanofiltration/chromatography showing advantages in recovering secondary phytochemicals in industrial scale.

Keywords: secondary phytochemicals, polyphenols, wine pomace, apple pomace, membrane processes, preparative chromatography

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Zielsetzung und Abgrenzung der Fragestellung	9
2.1	Zielsetzung der Fragestellung	9
2.2	Abgrenzung der Fragestellung	9
3	Grundlagen	10
3.1	Allgemeiner Überblick zu sekundären Pflanzenwirkstoffen	10
3.1.1	Definition und Gliederung der „sekundären Pflanzenwirkstoffe“	10
3.1.2	Wirkungen und Bioverfügbarkeit sekundärer Pflanzenstoffe	11
3.1.3	Klassifizierung der Polyphenole (Pflanzenphenole)	14
3.1.4	Biosynthese der Polyphenole	28
3.1.5	Wirtschaftliche Bedeutung sekundärer Pflanzenwirkstoffe und Marktpotential	32
3.1.6	Patentrechtliche Situation pflanzenphenolhaltiger Nahrungsergänzungsmittel	33
3.1.7	Rechtliche Situation von Nahrungsergänzungsmitteln und Functional Food	33
3.2	Allgemeines zu den ausgewählten Rohstoffen	34
3.2.1	Weintraubentrester	34
3.2.1.1	Aufbau der Weintraube	39
3.2.1.2	Inhaltsstoffe der Weintrauben	43
3.2.2	Apfeltrester	50
3.2.2.1	Aufbau des Apfels	52
3.2.2.2	Inhaltsstoffe des Apfels	53
3.2.3	Alternative Rohstoffquellen	54
3.3	Überblick zu der relevanten Verfahrenstechnik	55
3.3.1	Vorbehandlung des Rohstoffs	55
3.3.1.1	Zerkleinerung	55
3.3.1.2	Enzymierung	56
3.3.2	Extraktion	58
3.3.3	Pressen	60
3.3.4	Zentrifugation	61
3.3.5	Membranverfahren	64
3.3.6	Chromatographie	74
3.4	Stand der Wissenschaft und Technik zur Isolierung sekundärer Pflanzenstoffe	82
4	Material und Methoden	84
4.1	Analytik	84
4.1.1	Antioxidative Kapazität (TEAC-Methode)	84
4.1.2	Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode)	88
4.1.3	Polyphenolanalytik	92
4.1.4	Organische Säure-, Zuckeranalytik, Glycerin und Alkoholbestimmung	97

4.1.5	Ionenanalytik	101
4.1.6	Weitere Analytik	104
4.1.6.1	Glührückstand (Asche)	105
4.1.6.2	Trockenmasse (gravimetrisch)	106
4.1.6.3	Proteinbestimmung nach Bradford	107
4.2	Versuchsaufbau und Durchführung	108
4.2.1	Verfahrenstechnisches Konzept zur präparativen Isolierung	108
4.2.2	Enzymierung und Extraktion	109
4.2.3	Membranfiltration	113
4.2.4	Isolierung mittels präparativer Chromatographie	115
5	Ergebnisse und Diskussion	118
5.1	Traubentrester	118
5.1.1	Extraktions- und Enzymierungsversuche	118
5.1.2	Membranversuche	122
5.1.2.1	Permeatflüsse anorganischer Membranen	123
5.1.2.2	Permeatflüsse organischer Membranen	126
5.1.2.3	Rückhaltungen anorganischer Membranen	128
5.1.2.4	Rückhaltung organischer Membranen	131
5.1.3	Versuche zur präparativen Chromatographie	135
5.2	Apfeltrester	140
5.2.1	Extraktion und Enzymierungsversuche	140
5.2.2	Membranversuche	143
5.2.2.1	Permeatflüsse anorganischer Membranen	143
5.2.2.2	Permeatflüsse organischer Membranen	144
5.2.2.3	Rückhaltungen anorganischer Membranen	145
5.2.2.4	Rückhaltungen organischer Membranen	148
5.3	Allgemeines und Ergebnisse alternativer Byproducts	149
5.3.1	Biertreber	149
5.3.2	Rotklee und Okara	152
5.3.3	Vergleich der Rohstoffe	155
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	156
7	Literaturverzeichnis	159
8	Tabellenverzeichnis	170
9	Abbildungsverzeichnis	172
10	Anhang	178
11	Abkürzungsverzeichnis	201
12	Lebenslauf	203

1 Einleitung

Nach der Gründung der Lebensmittel- und Ernährungswissenschaft zur systematischen, analytischen, physiologischen und hygienischen Erforschung der Lebensmittel im 19ten Jahrhundert, ist das 20ste Jahrhundert geprägt durch Erkenntnisse der biochemischen, ökologischen, epidemiologischen, funktionellen und medizinischen Zusammenhänge unserer Ernährung (SPIEKERMANN 2000, TEUTEBERG 2002). So wurden neben den Hauptbestandteilen Kohlehydrate, Proteine und Fette auch essentielle Mineralstoffe, Vitamine und später bioaktive Substanzen wie Ballaststoffe, sekundäre Pflanzenstoffe sowie Substanzen und Organismen aus fermentierten Lebensmitteln identifiziert und studiert (WATZL und LEITZMANN 2005).

Sekundäre Pflanzenstoffe werden traditionell seit Jahrhunderten für präventive und therapeutische Zwecke in Form von Heilpflanzen eingesetzt, wobei die Wirksubstanzen und ihre Mechanismen noch weitgehend unbekannt waren (STEFFAN 2005). Neben traditionellen Heilpflanzen, führen epidemiologische Phänomene auf die Spur der sekundären Pflanzenwirkstoffe. Als Beispiel sei das „French Paradox“ erwähnt, bei dem statistische Untersuchungen ergeben haben, dass trotz fett- und cholesterinreicher Ernährung Franzosen seltener an Herz-Kreislaufkrankungen leiden als ihre europäischen Nachbarn. Verantwortlich werden dafür die im Rotwein enthaltenen Polyphenole und hier insbesondere das Resveratrol gemacht (RENAUD und DE LORGERIL 1992, SUN 2002, KRÖGER 2003). Resveratrol wurde erstmals bereits 1963 aus Knöterich-Pflanzen (*Polygonum cuspidatum*) isoliert und identifiziert. Knöterich-Pflanzen kommen in der japanischen und chinesischen Medizin bei der Behandlung von Pilzen, Hautentzündungen sowie Krankheiten des Herzens und der Blutgefäße zur Anwendung (NOVAMEX 2006). Dem Resveratrol werden neben dem Schutz vor Herz-Kreislaufkrankungen eine Fülle weiterer positiver Eigenschaften, wie Hemmung und Blockade von Krebs, Erhöhung des „guten“ HDL-Cholesterins, Hemmung von Blutverklumpung, Hemmung von Viren-Vermehrungen und vielem mehr zugesprochen. Solche und ähnliche Erkenntnisse haben zu einer großen Anzahl an Publikationen über sekundäre Pflanzenwirkstoffe geführt, die ein großes Potential für die Lebensmittelindustrie (z. B. Functional Food), Pharmazie und Kosmetik erahnen lassen (MANACH et al. 2005, GESCHER und STEWARD 2003).

So ist das Interesse an sekundären Pflanzenwirkstoffen in den letzten 20 bis 25 Jahren rasant gestiegen. Neben den viel versprechenden epidemiologischen Studien, ist es dabei auch der stetig verbesserten Analytik zu verdanken, dass neue Methoden und Materialien (z. B. HPLC gekoppelt mit MS, monolithische Chromatographiesäulen, u. a.) einen besseren Einblick in die Vielfältigkeit pflanzlicher Inhaltsstoffe ermöglichen und deren Strukturen, Biosynthesen und Wirkungsmechanismen aufklären helfen.

Anzumerken ist, dass bisherige Studien zu den Wirkungen und Wirkungsmechanismen an Modell-Systemen in vitro durchgeführt wurden und Versuche mit Fruchtfliegen und Rhesus-Affen bereits angelaufen sind, deren wissenschaftlich Auswertung der bisherigen Daten noch aussteht. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit am Menschen sind z. T. bereits durchgeführt, jedoch auch hier noch vielfach in der Versuchsphase. Die präventiven Wirkungen auf den Menschen an sich, sind jedoch wegen der zahlreichen weiteren Einflüsse und der langen Versuchsdauer äußerst schwer nachweisbar. Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass die Wirkmechanismen in den Modell-Systemen prinzipiell auf den Menschen übertragbar sind, wenn die betreffenden Substanzen bioverfügbar sind, also an die Stelle der Zelle gelangen, an der die Wirkung entfaltet werden soll (SCHRÖDER 2005, MANACH et al. 2005, WADE 2003).

Inzwischen ist die gesundheitsfördernde Wirkung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in vielen Fällen unumstritten, so dass bereits namhafte Institute, wie das National Cancer Institute USA und die Deutsche Gesellschaft für Ernährung („5 am Tag“ - Kampagne) Empfehlungen zum Verzehr von Obst und Gemüse mit Bezug auf Gehalte an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen geben. Weiter existieren bereits Datenbanken mit Angaben zu

Gehalten an Polyphenolen, die eine Klasse der sekundären Pflanzenstoffe repräsentieren. Das hierzu wohl umfangreichste Beispiel ist das „USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Food“, welche das US Department of Agriculture mit zahlreichen Kooperationspartnern der USA erstellt hat (US DEPARTMENT OF AGRICULTURE 2003). In Ernährungstabellen der EU sind jedoch noch keine empfohlenen Tagesdosen zu finden. Täglich werden mit einer ausgewogenen Ernährung etwa 1,5 g sekundäre Pflanzenstoffe aufgenommen (AMES et al. 1990), wobei davon etwa 1 g auf Polyphenole entfallen (SCALBERT und WILLIAMSON 2000). Betont wird, dass funktionelle Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel kein Ersatz einer gesunden Ernährung sind, sondern lediglich bei erhöhtem Bedarf an sekundären Pflanzenstoffen, wie z. B. bei Rauchern, Krankheit, chronischen Erkrankungen oder übermäßigen Belastung (Leistungssport, erhöhter Berufsstress, Sonnenbaden) als eine Ergänzung sinnvoll erscheint. Weiter ist zu berücksichtigen, dass bis vor wenigen Jahren sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe als antinutritiv bezeichnet wurden und die Ansicht bestand, dass eine maximale Verwertung der primären Nährstoffe durch die Gegenwart sekundärer Pflanzenstoffe nur eingeschränkt gewährleistet ist (z. B. binden Tannine Eiweiße, die dann nicht mehr zur Energiegewinnung zur Verfügung stehen). Darauf ist die Nahrungsmittelindustrie mit Maximierung der primären Nährstoffe und Minimierung der sekundären Pflanzenstoffe eingegangen. Die Evolution des Menschen hat jedoch mit den sekundären Pflanzenstoffen stattgefunden, die für eine gesunde Ernährung somit auch notwendig sind (HAENEL 1991, WATZL und LEITZMANN 2005), was wiederum eine Ergänzung erfordert bzw. rechtfertigt.

Was die Lebensmittelindustrie anbelangt, so haben Functional Food und Nahrungsergänzungsmittel bereits auf den Märkten in den USA und Japan mit zunehmender Beliebtheit Einzug gehalten und auch für Europa wird in den nächsten Jahren ein verstärktes Wachstum in diesem Sektor prognostiziert. Stimuliert wird diese Entwicklung durch ein gesteigertes Ernährungsbewusstsein der Konsumenten und das veränderte Nahrungsmittelangebot. Probiotische Milchprodukte, ACE-Fruchtsäfte, isotonische Getränke sind bereits einer breiten Käuferschicht als „Functional Food“ geläufig. Weiter sind zahlreiche Extrakt-Präparate verschiedenster Pflanzen als Nahrungsergänzungsmittel über das Internet verfügbar und zunehmend in Drogerie- und Supermärkten erhältlich. Einige Beispiele sind ResvertTM, Resveratrol Plus®, VidVital®, Energeticum® B-Flavon und Menoflavon®, wobei in den meisten Fällen lediglich das Präventionspotential charakterisiert werden kann, jedoch abschließend nicht bewiesen ist. Zudem handelt es sich bei diesen Präparaten zumeist um Gesamtextrakte und Rezepturen verschiedenster Inhaltsstoffe, so dass neben den sekundären Pflanzenstoffen alle weiteren extrahierten Pflanzeninhaltsstoffe (auch die unerwünschten) und weiter Vitamine, Mineralstoffe und Substanzen aus fermentierten Lebensmitteln enthalten sind.

Die Forschung richtet den Fokus ihrer Arbeiten bisher überwiegend auf die Aufklärung der Strukturen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und hier insbesondere auf die zahlreichen Polyphenole, ihrer Biosynthesen, Analytik sowie der Wirkungen und Wirkmechanismen in vitro und in vivo. Nur wenige Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Isolierung und Aufreinigung pflanzlicher Inhaltsstoffe in präparativem (industriellem) Maßstab. Der Bedarf größerer Mengen ist jedoch bereits gegeben, so dass die Verfahrenstechnik nun die Aufgabe hat, Konzepte zur großtechnischen Gewinnung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zu entwickeln. Das vorliegende Forschungsprojekt soll einen Beitrag dazu leisten und zeigt an Beispielen, wie gezielt sekundäre Pflanzenphenole isoliert und gereinigt werden können.

2 Zielsetzung und Abgrenzung der Fragestellung

2.1 Zielsetzung der Fragestellung

Ziel ist, mit Hilfe von Membranverfahren und Chromatographie Trennstrategien zur Gewinnung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu entwickeln. Neben der Konzeptionierung der gesamten Prozesskette, ausgehend von Rohmaterialien bis zu Bulk-Produkten, gilt es vor allem die Selektivität von modernen Ultra- und Nanofiltrationsmembranen zur Isolierung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe an ausgewählten Beispielen zu untersuchen und zu ermitteln sowie die entsprechenden Membranen in den Prozess vorteilhaft einzubinden. So wird beispielsweise an eine Fraktionierung mittels Ultra- und Nanofiltration gedacht, indem Moleküle mit Molmassen unterhalb und oberhalb der zu isolierenden Stoffgruppe abgetrennt werden, um ein teilweise aufgereinigtes Produkt zu erhalten. Darüber hinaus, sollen chromatographische Trennmethode, in Kombination mit Membranverfahren oder als Einzelprozesse, zur Gewinnung spezifischer Pflanzeninhaltsstoffe erforscht und untersucht werden.

Je nach Bedarf der Lebensmittelindustrie, Kosmetik und Pharmazie, sollen die Prozesse unterschiedliche Reinheitsgrade der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe ermöglichen:

- aufkonzentriertes Gesamt-Extrakt (Stand der Technik)
- mittels Membranfiltration gereinigtes und konzentriertes Pflanzenwirkstoff-Extrakt
- durch Chromatographie gereinigte und konzentrierte sekundäre Pflanzenwirkstoffe

2.2 Abgrenzung der Fragestellung

Eine besonders in ihrem Vorkommen und Wirkungen vielfältige Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, stellen die Polyphenole dar. Wichtige Vertreter dieser Stoffgruppe sind z. B. Resveratrol, Quercetin und Isoflavone. Sie kommen vornehmlich in der Schale von Früchten vor, da dort ihre Wirkungen als Antioxidantien, Fungizide, Herbizide, UV- und Kälteschutz und vielem mehr für die Pflanze zum Tragen kommen. Auch Kerne enthalten wertvolle Polyphenole, wie z. B. Tannine und Flavanole, denen genauso gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben werden, wodurch sie ebenfalls als mögliche Produkte von Interesse sind. Kostengünstige Rohstoffquellen bioaktiver Polyphenole könnten damit Trester darstellen, die bei der Fruchtsaft- und Weinherstellung als Abfallstoffe anfallen und bisher überwiegend kompostiert als Dünger oder getrocknet als Viehfutter verwertet werden. Vereinzelt dient Apfeltrester zur Pektinengewinnung und Weintraubentrester zur Alkoholgewinnung (z. B. Grappa, ein Tresterbranntwein).

Zusätzlich wird berücksichtigt, dass Österreich ein Wein- und Apfelland ist. So sind die Rohstoffquellen Weintrauben- und Apfeltrester auf einem relativ kleinen Raum in den Hauptanbaugebieten östliches Niederösterreich, Burgenland und die Steiermark für Weinreben und die steirische Apfelstrasse für Mostäpfel konzentriert, was ökologisch und ökonomisch kurze Beschaffungswege des Rohmaterials mit geringen Qualitätsverlusten gewährleistet. Weiter ist nach Byproducts der österreichischen Lebensmittelindustrie und Landwirtschaft zu suchen, die ebenfalls Potential als Rohstoffquelle für gesundheitsfördernde sekundäre Pflanzenstoffe darstellen könnten.

Die membrantechnologische, präparative Isolierung sekundärer Pflanzenwirkstoffe wird in dieser Arbeit damit auf die zwei ausgewählten Beispiele Weintraubentrester und Apfeltrester aus den beschriebenen Regionen begrenzt. Bezüglich der sekundären Pflanzenwirkstoffe, wird der Fokus auf die Hauptkomponenten der Polyphenole gerichtet, deren gesundheitsfördernde Wirkungen epidemiologisch und in zahlreichen Studien bereits untermauert werden konnten und deren Nachfrage auf dem „Functional Food“ – und Nahrungsergänzungsmittelmarkt verstärkt mit steigender Tendenz gegeben ist.

3 Grundlagen

Die Erforschung und Entwicklung der Technologie zur präparativen Isolierung und Gewinnung von Polyphenolen aus Trestern, ist interdisziplinär, so dass zunächst auf die Grundlagen der sekundären Pflanzenwirkstoffe im allgemeinen, dann der Weintrauben und der Äpfel im einzelnen eingegangen wird und anschließend die relevante Verfahrenstechnik besprochen wird.

3.1 Allgemeiner Überblick zu sekundären Pflanzenwirkstoffen

3.1.1 Definition und Gliederung der „sekundären Pflanzenwirkstoffe“

Für den Begriff „sekundäre Pflanzenwirkstoffe“ (SPS) ist eine allgemein gültige Definition wegen des großen Umfangs und seiner fließenden Übergänge zu anderen Stoffgruppen noch nicht gefunden. Jedoch lässt sich folgende Abgrenzung darstellen: Sekundäre Pflanzenwirkstoffe sind eine Gruppe von zahlreichen, chemisch sehr unterschiedlichen Stoffen, die ausschließlich in Pflanzen vorkommen. Im Gegensatz zu den Nährstoffen wie Kohlehydrate (einschließlich Ballaststoffe), Proteine und Fette, die im primären Stoffwechsel der Pflanze synthetisiert werden, werden die SPS im Sekundärstoffwechsel gebildet. Primäre Pflanzenstoffe sind somit für den Grundstoffwechsel der Pflanzenzellen notwendig und als physiologisch wirksame Pflanzenstoffe zu bezeichnen, sekundäre Pflanzenstoffe haben vielfältige ökologische Aufgaben und sind damit als ökologische Pflanzenstoffe zusammen zu fassen. Die Vielfältigkeit der ökologischen Aufgabe reicht von Lockstoffen, wie Farbe, Geschmack, Geruch, über Stabilität, Fraßgifte bis hin zum Schutz vor UV-Licht, Infektionen und Botenstoffe mit z. T. hormonellem Charakter. Sie entstehen im Allgemeinen erst nach der aktiven Wachstumsphase und in sehr viel geringeren Konzentrationen als die Primärmetabolite (FUGMANN 1997).

In der Literatur sind weitere Synonyme für die SPS zu finden, deren Bezeichnungen ihre Wirkungen oder Bedeutung konkretisieren. So soll mit der Bezeichnung Phytamine (griech. „phyton“ = Pflanze) die ernährungsphysiologische Gleichwertigkeit mit den Vitaminen zum Ausdruck gebracht werden. Vitalstoffe (lat. „vita“ = Leben) unterstreichen ihre Notwendigkeit für das Leben, Nutraceuticals, Phytopharmaka und Phytotherapeutika geben den Bezug zu Pharmaceuticals und Therapeutika und damit ihrer pharmakologischen Wirkungen. Der Begriff Sekundärmetabolite gibt den Hinweis auf ihre Herkunft. Antinutritive Inhaltsstoffe ist eine veraltete Begrifflichkeit und mit dem heutigen Wissensstand widerlegt. Phytoalexine (griech. „alekein“ = abwehren) beschreibt diejenigen SPS, die eine antibiotische Wirkung gegen ein breites Spektrum pathogener Pilze und Bakterien besitzen. Phytochemicals ist neben secondary plant substances oder compounds der häufig im Englischen verwendete Begriff der sekundären Pflanzenstoffe.

Es existieren vermutlich etwa 60.000 - 100.000 verschiedene SPS, die in neun Substanzklassen untergliedert werden (Abb. 1). Nur wenige sind vollständig identifiziert und charakterisiert. Darüber hinaus sind bisher schätzungsweise nur 5 % der auf der Erde bekannten Pflanzen diesbezüglich chemisch analysiert (SCHLEE 1992). Anzumerken ist, dass die Phytoöstrogene zumeist Isoflavone, Coumestane (beide Isoflavonoide) und Lignane sind und damit chemisch zu den Polyphenolen zählen, jedoch wegen ihrer Bedeutung häufig als neunte Substanzklasse genannt werden. Weiter sind auch einfache Pflanzenphenole zu den Polyphenolen gezählt. Ausnahmen lassen sich nicht in diese Klassierung einordnen. Zusätzlich sind in Abb. 1 bioaktive Substanzen gekennzeichnet (WATZL und LEITZMANN 2005, HELDT 2003, STRASBURGER 1998, FUGMANN 1997).

Das Vorkommen bestimmter SPS ist oft nur auf wenige Pflanzenspezies beschränkt und hat dort spezifische Funktionen. Qualität und Quantität der SPS sind als eine Art „Fingerprint“ einer Spezies anzusehen und werden z. B. auch als Indikatorsubstanzen zum Nachweis von

Verfälschungen bei Fruchtprodukten herangezogen. Diese SPS haben sich entsprechend der kontinuierlichen evolutionären Veränderung der zu lockenden oder abzuweisenden tierischen und pflanzlichen Organismen und weiterer Einflüsse, wie UV-Strahlung, Temperatur und Feuchtigkeit, vermutlich durch natürliche Selektion und Mutation herausgebildet. So ist es nicht überraschend, dass in einer Pflanze ein Cocktail von bis zu 100 verschiedener SPS und deren Metabolite enthalten sein kann (BERLITZ et al. 2001, STRASBURGER et al. 1998).

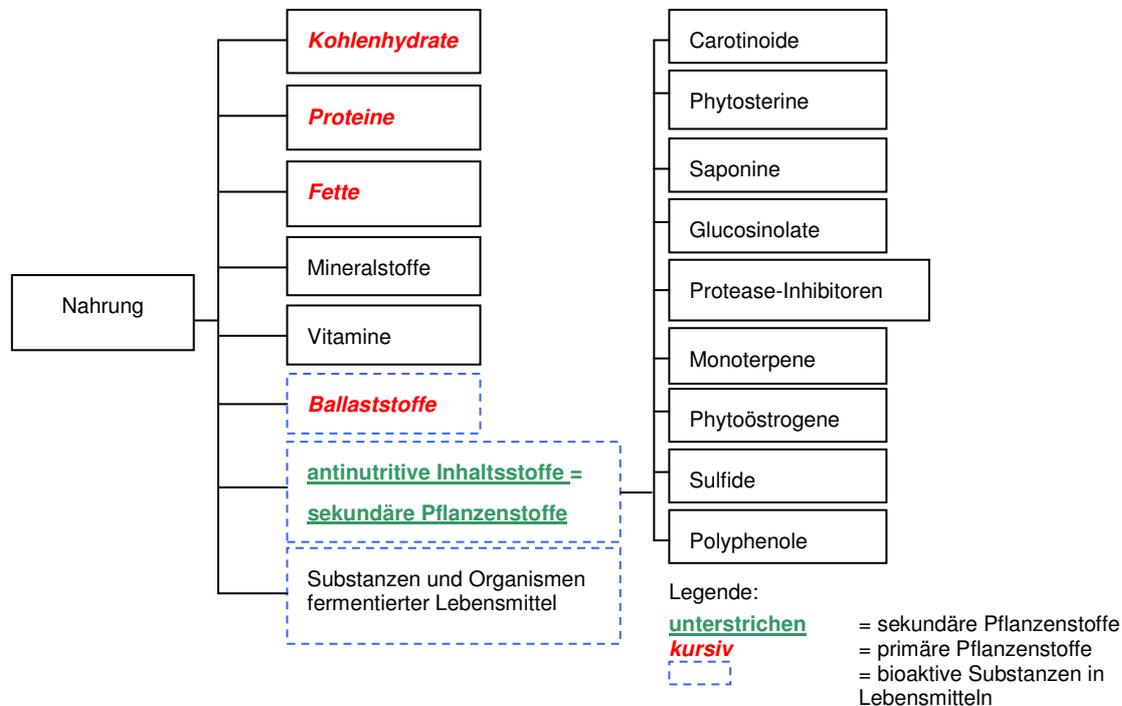


Abb. 1: Einteilung und Gliederung der sekundären Pflanzenwirkstoffe

Trockengehalte von bis zu 1-3 % SPS sind in Pflanzen üblich, wobei die hydrophilen Komponenten in den Vakuolen und die lipophilen Komponenten eher in den Kanälen, Laticifers, Oil Cells, Trichomes und Cuticle zu finden sind. Dabei muss die Synthese nicht zwingend am Speicherort stattfinden, da Transporte mittels Xylem, Phloem oder in einigen Fällen über das Apoplast möglich sind (WINK 1999).

3.1.2 Wirkungen und Bioverfügbarkeit sekundärer Pflanzenstoffe

Die gesundheitsfördernden Wirkungen auf den Menschen sind z. T. schon sehr lange bekannt und werden traditionell in Therapien und zur Prophylaxe eingesetzt. Sie stützen sich vielfach auf epidemiologische und tierexperimentelle Studien, wobei weiterhin großer Klärungsbedarf zu den Wirkungsmechanismen besteht (BENEDUM 2000).

Eine Zusammenfassung der positiven Wirkungen der SPS als Phytotherapeutika ist als Aufzählung in Abb. 2 dargestellt. Obwohl in der Literatur gerne angeführt, wird auf eine Zuordnung einzelner Wirkungen zu den SPS-Klassen verzichtet, da die Klassen in sich so vielfältig sind, dass schwer eindeutige Aussagen zu treffen sind und damit Fehlinterpretationen leicht möglich sind.

Weiter können Extrakte in Form von isolierten SPS nicht nur als Phytotherapeutika, sondern auch als Biopestizide (Herbizid, Fungizid, Insektizid, Antiviral), Stimulansien und Halluzinogene, Gifte, natürliche Farbstoffe, Düfte und Aromen Anwendung finden oder sind bereits als solche im Einsatz (Abb. 2). So können erweiternd zu den Ausführungen von WINK (1999) SPS als Nahrungsergänzungsmittel, Funktional Food und in Kosmetika eingesetzt werden.

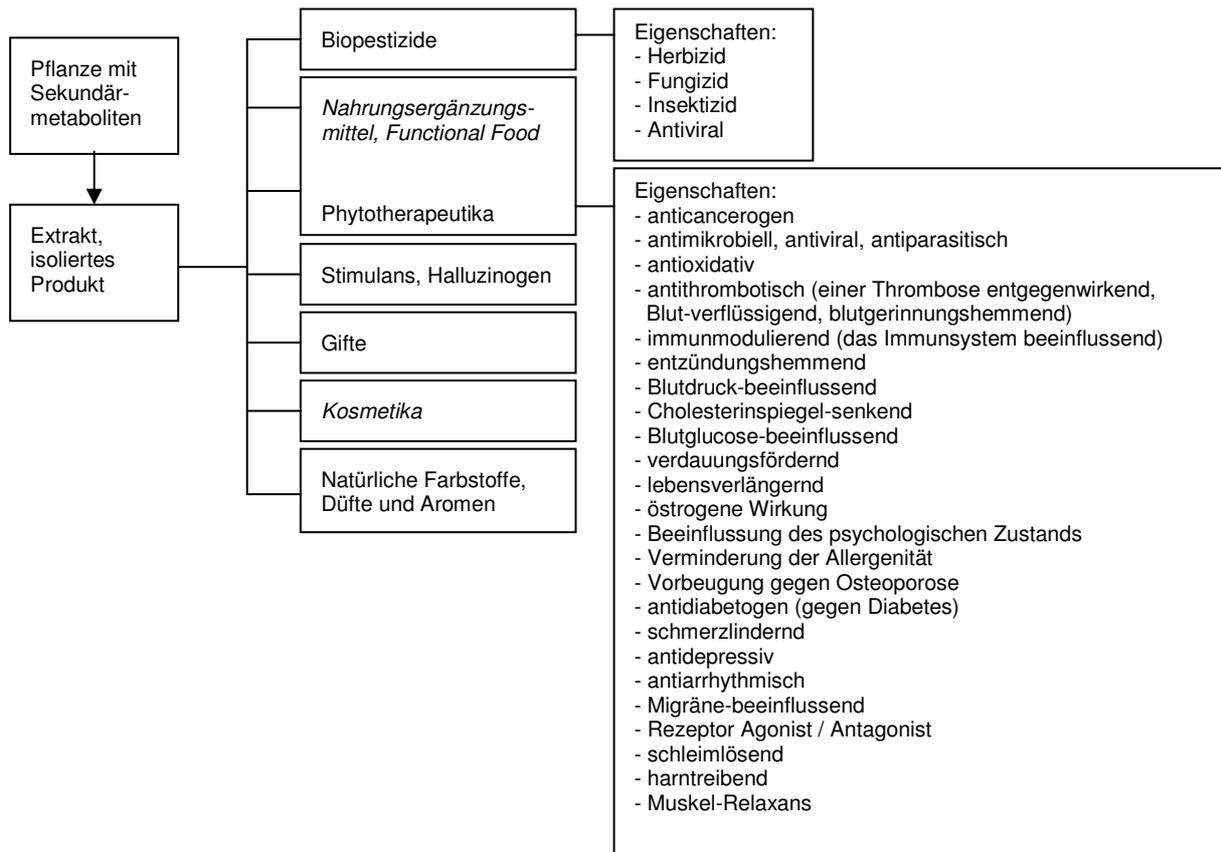


Abb. 2: Mögliche Einsatzgebiete isolierter Pflanzenextrakte (WINK 1999), ergänzt und erweitert mit WATZL und LEITZMANN (2005), GLINSMANN (1996), KOUBOVA und GUARENTE (2003), SCHROEDER (2004), AERTS et al. (1999)

Neben den gesundheitsfördernden Wirkungen der SPS sind auch toxische Effekte zu berücksichtigen. Sie dienen der Pflanze in erster Linie zum Schutz vor Tierfraß, wobei diesbezüglich weit über 1.000 Pflanzen bekannt sind. In der Regel haben Menschen und Tiere zumeist über den Geruchs- und Geschmackssinn, wie z. B. bitter, astringierende Wirkung gelernt, solche Pflanzen zu meiden und haben körpereigene Systeme zum Abbau oder Ausscheiden entwickelt, wie z. B. Entgiftungsenzyme, Bakterien oder Erbrechen. Weiter kann eine Entgiftung durch gezielte Verarbeitungsverfahren die Nutzung solcher Pflanzen erlauben, wie z. B. Erhitzung und Fermentation der betroffenen Lebensmittel (WATZL und LEITZMANN 2005).

Die Wirkungsmechanismen der SPS werden z. Z. intensiv erforscht und scheinen im Detail so vielfältig zu sein, wie deren Vorkommen und Wirkungen selber. Zumeist wird bei Polyphenolen das ausgeprägte antioxidative Potential als Basis der Wirkungsmechanismen angegeben (WÜRDIG und WOLLER 1989), welche jedoch bei weitem die komplexen Vorgänge im Körper und letztendlich der Zelle nicht erklären. So kann beispielsweise die hohe antioxidative Kapazität einiger Phenolsäuren nur mit Verstärkung durch Wechselwirkungen untereinander und Wechselwirkungen mit anderen biologisch aktiven Inhaltsstoffen erklärt werden. Die Stärke der antioxidativen Kapazität hängt dabei maßgeblich von der Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül und der Stellung möglicher Substituenten, wie z. B. Methyl-Gruppen am aromatischen Ring ab. Polyphenole dienen als Radikalfänger, indem sie offensichtlich mit ihrem niedrigen Redoxpotential als Wasserstoffdonatoren fungieren und dabei selbst oxidiert werden, so dass die zu schützenden Substanzen in der Zelle den „Radikal“-Stress unbeschadet überstehen. Das daraus gebildete Phenoxylradikal wird durch Wanderung des ungepaarten Elektrons im aromatischen Ring stabilisiert und wirkt somit weniger aggressiv, als freie Radikale ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , ROO^{\cdot}). Weiter wirken einige Polyphenole als Chelatbildner für Metalle, die als Katalysatoren schädlicher Oxidationen bzw. zur Bildung freier Radikale dienen. Weiter dienen Polyphenole

als Schutz gegen Oxidation durch Singulett-Sauerstoff und andere hochreaktive Moleküle ($^1\text{O}_2$, NO/NO_2 , H_2O_2), die ebenfalls über die Bildung freier Radikale zellschädigend wirken. Oxidantien, insbesondere die sehr reaktionsfähigen Radikale werden in unserem Körper zum Teil gezielt gebildet, um spezifische Funktionen, wie z. B. die intrazelluläre Abtötung von Mikroorganismen durch phagozytierende Zellen des Immunsystems zu bewerkstelligen, wobei diese Verbindungen selbst eine Gefahr für die körpereigenen Strukturen darstellen. Zum anderen werden schädliche Radikale oder Radikalbildner durch Umwelteinflüsse, wie Nahrungsmittel, Luftverunreinigungen, Zigarettenrauch und Arzneimittel aufgenommen und entstehen unweigerlich über die Atmungskette bei allen Sauerstoff angewiesenen Lebewesen sowie über oxidative Enzyme (z. B. Xanthinoxidase). Unser Körper verfügt über zahlreiche Schutzmechanismen gegen Oxidantien und Radikale, die in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien gegliedert werden können. Nicht-enzymatische Antioxidantien wiederum werden vom Körper selbst synthetisiert oder exogen zugeführt, also mit der Nahrung aufgenommen, wie auch die Polyphenole. Ein wichtiges Maß zur Beurteilung von Antioxidantien stellt damit die antioxidative Kapazität von Nahrungsmitteln bzw. Nahrungsergänzungsmitteln dar, welche nach RICE-EVANS et al. (1995) in Trolox-Äquivalenten angegeben werden kann (WATZL und LEITZMANN 2005). Andere Polyphenole, wie die Lignane und Isoflavonoide, wirken wiederum als Phytoöstrogene, deren Wirkungsmechanismus neben der antioxidativen Kapazität auch auf das Schlüssel-Schloss-Prinzip wie das des menschlichen Östrogens basiert (JUNGBAUER und MEDJAKOVITC 2005).

Ausschlaggebend für eine bioaktive Wirkung einer Substanz ist deren Bioverfügbarkeit. Die Bioverfügbarkeit kann definiert werden als das Ausmaß, in dem ein verzehrter Nährstoff resorbiert, vom Körpergewebe aufgenommen und für seine spezifischen Funktionen genutzt werden kann. Die gesundheitsfördernden Wirkungen von Pflanzenphenolen sind somit neben der verzehrten Menge auch abhängig von deren Bioverfügbarkeit. Die Bioverfügbarkeit wird dabei stark von der Aufnahme über den Darm beeinflusst, welche wiederum von der chemischen Struktur der Polyphenole (z. B. Aglycon, Glycosid, Veresterung, Polymerisierung) und der Lebensmittelmatrix beeinflusst wird (MANACH et al. 2004, JUNGBAUER und MEDJAKOVITC 2005). Diese sehr komplexen Zusammenhänge sind in zahlreichen Veröffentlichungen untersucht und diskutiert worden. Abb. 3 gibt einen Eindruck über die Pharmakokinetik einiger wichtiger Polyphenole (FLESCHHUT 2004).

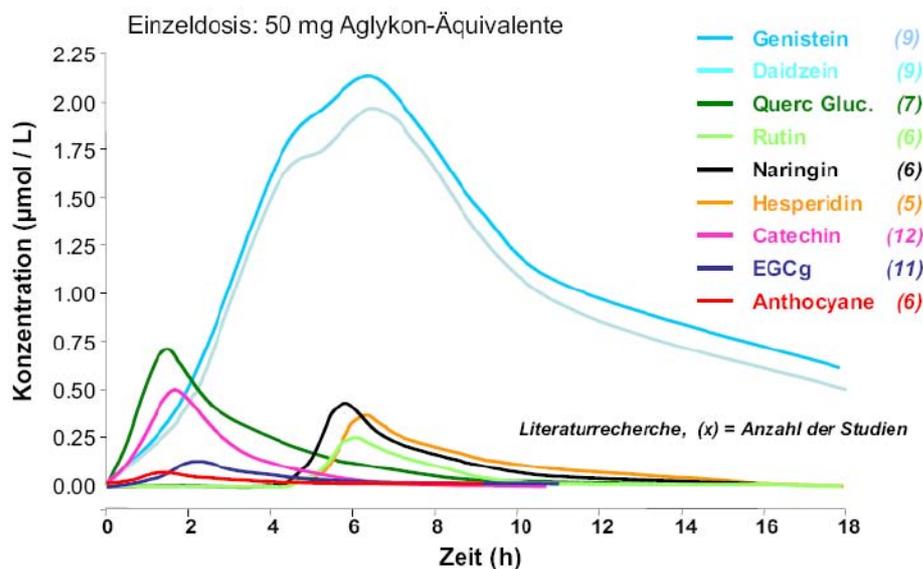


Abb. 3: Pharmakokinetik einiger wichtiger Polyphenole in Blutplasma (FLESCHHUT 2004)

Nach der oralen Aufnahme der Polyphenole steigt deren Konzentration im Blutplasma schnell an und erreicht nach einer spezifischen Aufnahmezeit ein Maximum, wobei sie zugleich oxidiert oder aus dem Körper ausgeschieden werden.

3.1.3 Klassifizierung der Polyphenole (Pflanzenphenole)

Polyphenole sind eine der umfangreichsten Gruppen der SPS deren Bedeutung in den letzten 25 Jahren stark zugenommen hat. Es sind aromatische Verbindungen mit vorwiegend mehr als einer an den aromatischen Ringen gebundenen Hydroxylgruppen oder deren funktionellen Derivate. Phenole reagieren wegen der Dissoziierbarkeit ihrer Hydroxylgruppen sauer. Es sind recht reaktive Substanzen und bilden gerne Wasserstoffbrücken aus, sofern keine sterischen Hemmnisse vorliegen. Pflanzenphenole haben auch die Eigenschaft, mit Metallen Chelatkomplexe einzugehen, sie oxidieren leicht und bilden gerne Polymere.

Neben dem Begriff Polyphenole sind in der wissenschaftlichen Literatur auch andere Bezeichnungen wie „Pflanzenphenole“ oder kurz „Phenole“ genannt, was z. T. zutreffender ist, da nicht alle bioaktiven Pflanzenphenole des Sekundärmetabolismus mehr als eine Hydroxylgruppe tragen oder gar nur mit einem Phenylring ausgestattet sind. In Tab. 1 sind wichtige phenolische Pflanzenstoffe mit ihren Grundstrukturen dargestellt und Substanzklassen zugeordnet.

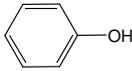
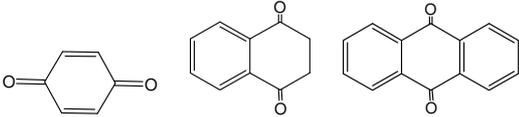
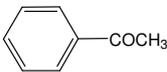
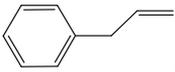
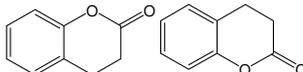
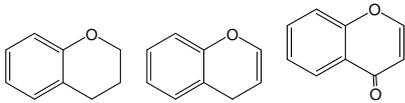
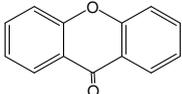
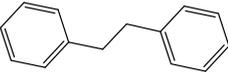
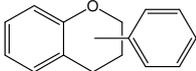
Anhand der Funktionen der phenolischen Verbindungen in den Pflanzen kann die Zuordnung zu dem Primär- und Sekundärstoffwechsel erfolgen. Viele Chinone und Lignine zählen zu dem Primärstoffwechsel, da sie für den Lebenszyklus der Pflanze essenziell sind, obwohl deren Biosynthese auf den gleichen Reaktionsprinzipien wie die des Sekundärstoffwechsels erfolgt. Teilweise sind jedoch auch Überschneidungen möglich, so sind Chinone wie z. B. Naphthochinone mit kurzer oder fehlender Seitenkette und einige Anthrachinone den SPS zugeordnet (RICHTER 1996). Weitere Überschneidungen der Polyphenole zu anderen Gruppen sind bei der Klassifizierung von Naturprodukten stets gegeben, wie es die Alkaloide und Terpene zeigen, die ebenfalls in einigen Variationen mit hydroxylierten Benzenringen vorkommen, jedoch ihre eigene Gruppe repräsentieren. Somit sind die Grenzen zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel und die Grenzen der Sekundär-Metabolite-Klassen fließend.

Extrahierbare Polyphenole sind nieder- und mittelmolekular und mit Lösungsmitteln wie Wasser, Ethanol, Methanol und Aceton aus einem Rohstoff extrahierbar. Hochmolekulare (>5.000-10.000 g/mol) und gebundene Polyphenole sind dagegen in solchen Lösungsmitteln schwer löslich. Auch vom physiologischen Gesichtspunkt gesehen, ist eine Unterscheidung sinnvoll, da gebundene und hochmolekulare Polyphenole im Darm nicht absorbiert und quantitativ wieder ausgeschieden werden (BRAVO et al. 1994). Eine weitere Einschränkung lässt sich durch die leicht flüchtigen Polyphenole durchführen, die ebenfalls bei einer Extraktion und weiteren Verarbeitung, wie Einengung und Trocknung verloren gehen. Somit lassen sich die extrahierbaren Polyphenole des Sekundärstoffwechsels wie folgt gliedern:

- Phenolcarbonsäuren (Hydroxyzimtsäuren, Hydroxybenzoesäuren)
- Chinone (Chinone, Naphthochinone, Anthrachinone)
- phenolische Ketone (Acetophenone, Phloroglucinol-Derivate)
- Phenylpropane (Cumarine, Isocumarine, Chromone, Chromane und Chromene sowie Di- und Polymere wie Lignane, Lignine und deren Vorprodukte als auch Suberin und Cutin)
- Xanthone
- Stilbene (Stilbene, Bibenzyle, Phenanthrene)
- Flavonoide (Flavane, Flavone, Anthocyane, Chalkone, Aurone, Bi-, Iso- und Neo-flavonoide, Proanthocyanidine)
- Tannine

Anhand des chemischen Aufbaus, lassen sich weitere Unterteilungen durchführen.

Tab. 1: Wichtige phenolische Substanzen in Pflanzen mit Grundstruktur des Skeletts (GOLDBERG 2005, BRAVO und SAURA-CALIXTO 1998, HARBORNE 1980, FRANZKE 1996, WATERMAN und MOLE 1994)

Anzahl der C-Atome	Grundstruktur des Skeletts	Klasse
C_6		einfache Phenole
C_6 C_6C_4 $C_6C_2C_6$	 Benzochinone, Naphthochinon, Anthrachinone	Chinone
C_6C_1 C_6C_2 C_6C_3	 z. B. Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren	Phenolcarbonsäuren
C_6C_2	 z. B. Acetophenone	phenolische Ketone
C_6C_3	 z. B. Monolignole	Phenylpropene, Phenylpropane
C_6C_3		Cumarine und Isocumarine
C_6C_3		Chromane und Chromene, Chromone
$C_6C_1C_6$		Xanthone
$C_6C_2C_6$		Stilbene
$C_6C_3C_6$		Flavonoide
$(C_6C_3)_2$	dimerisierte Monolignole	Lignane, Neolignane
$(C_6C_3)_n$	polymerisierte Monolignole, p-Cumaryl- Sinapyl- und Coniferylalkohole	Lignin
$(C_6C_3)_n$	polymerisierte Phenylpropane, langkettige Fettsäuren und Fettalkoholen (C_{18} - C_{30}) sowie Hydroxyfettsäuren und Dicarbonsäuren (C_{14} - C_{20})	Suberin, Cutin
$(C_6C_3C_6)_n$	kondensierte Phenole, speziell Flavanole	Tannine, Proanthocyanidine

Die in Pflanzen zahlreich anzutreffenden Phenolcarbonsäuren fassen die Hydroxyzimtsäuren mit C_6C_3 -Grundgerüst und Hydroxybenzoesäuren mit C_6C_1 -Grundgerüst zusammen. Sie fließen häufig als Ausgangsverbindungen in verschiedene Synthesewege ein. Die Phenolcarbonsäuren kommen meist mit anderen organischen Säuren und mit Zuckern verestert vor, wie zum Beispiel die mit Chinasäure veresterte Kaffeesäure, die als Chlorogensäure benannt ist. Eine Tasse Kaffee enthält etwa 50-150 mg Chlorogensäure. Ein weiteres Beispiel ist die Ferulasäure, die zumeist mit dem Monosaccharid Arabinose verestert ist und damit ein O-Glykosid bildet. Sie ist Bestandteil der Hemicellulosen in Vollkorn und damit der Zellwand. Ein letztes Beispiel soll die aus zwei Gallussäuremolekülen

bestehende Ellagsäure dienen, die ausschließlich in bestimmten Nüssen und Beeren vorkommt, aber auch hier zumeist als Glykosid oder Ester z. B. an Tannine gebunden vorliegt. Phenolcarbonsäuren sind vorwiegend in den Randbereichen der Pflanzen zu finden und nehmen hier Ihre Aufgabe als Antioxidants zum Schutz des darunter liegenden Gewebes wahr und gelten darüber hinaus als strukturbildende Elemente der Zellwand, wobei weitere Aufgaben der Phenolcarbonsäuren an den Zellwänden Gegenstand der Forschung sind (BUNZEL 2001). Die häufigsten in Lebensmitteln vorkommenden Phenolcarbonsäuren sind in Abb. 4 dargestellt (WATZL und RECHKEMMER 2001a, WATZL und LEITZMANN 2005).

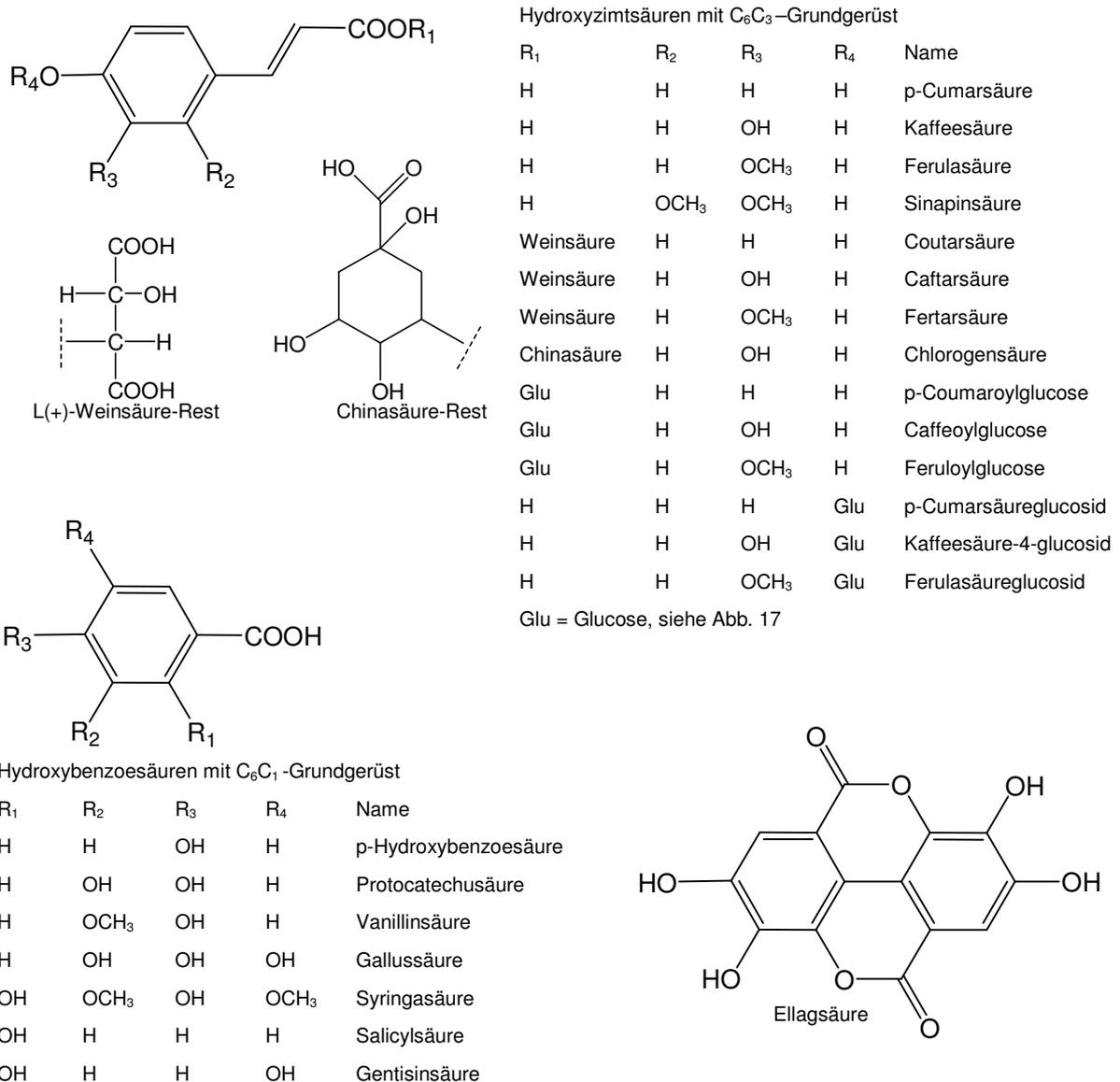


Abb. 4: Die am häufigsten in Lebensmitteln vorkommenden Phenolcarbonsäuren, zusammengestellt aus WATZL und RECHKEMMER (2001a), RECHNER (2000), BADERSCHNEIDER (2000) und RADTKE et al. (1998)

Chinone des Sekundärstoffwechsels haben eine große Farbvielfalt, die von rosa über tiefrot und violett bis hin zu braun reicht. Weiter werden ihre Funktionen mit UV- und Fraßschutz sowie Allelopathie (Hemmung von Keimung und Wachstum benachbarter Pflanzen durch Ausscheidung organischer Verbindungen) beschrieben (HARBORNE 1980). Chinone gliedern sich in drei Gruppen, die einfachen Benzochinone, die mit einem Benzenring erweiterten Naphthochinone und schließlich die mit zwei Benzenringen ausgestatteten und in ihrer Gruppe in der Natur am häufigsten anzutreffenden Anthrachinone

(z. B. in Aloe Vera Gel). Ausgesuchte Chinone werden als Arzneimittel eingesetzt (Sennoside sind Anthrachinone die abführend wirken) und weitere sind als Vitamin K bekannt (Phyllochinon = Vitamin K₁, Menachion = Vitamin K₂) (Abb. 5).

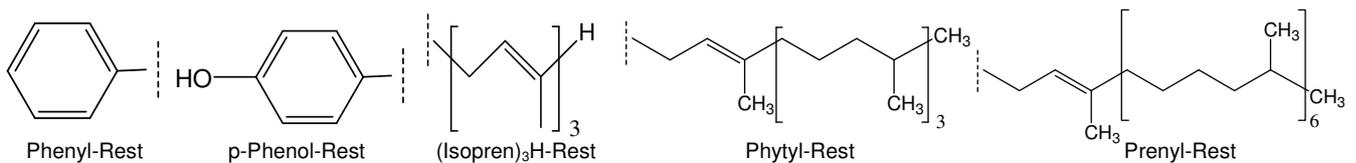
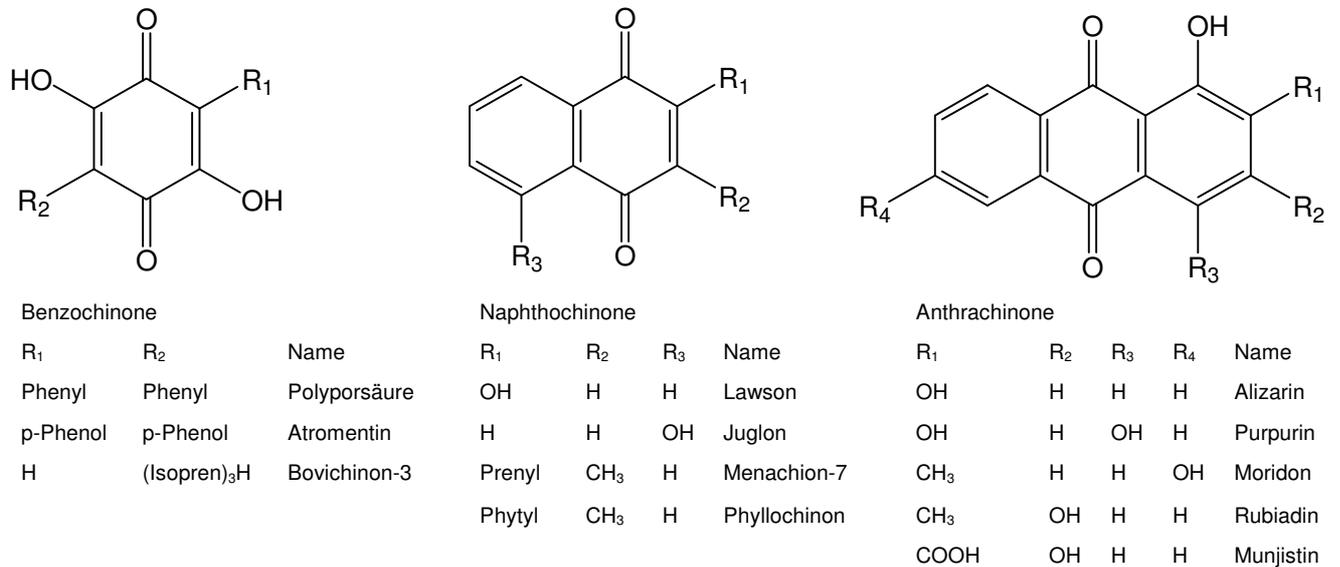


Abb. 5: Ausgesuchte Chinone (RICHTER 1996, KLÖCKL 2006)

Phenolische Ketone haben ein C₆C₂-Grundskelett und gliedern sich in zwei Gruppen. Die erste Gruppe ist die der Acetophenone, die, wie andere Phenole auch, anhand der verschiedensten Substituenten eine Vielzahl an Verbindungen hervor bringen. Ein in der Natur weit verbreitetes Glykosid des p-Hydroxyacetophenons ist das Picein. Die zweite Gruppe stellen die Phloroglucinol-Derivate dar, die im Vergleich zu den Acetophenonen eine komplexere Struktur aufweisen. Es sind zumeist Di- und Trimere der monomeren Acetophenone. Einige dieser Phenole werden in der Medizin angewendet, z. B. als Anthelminthika (zur Entwurmung). Pflanzenökologisch wirken sie zumeist als Phytoalexine, wie z. B. das Danielon und das angesprochene Picein als Fungizide (Abb. 6).

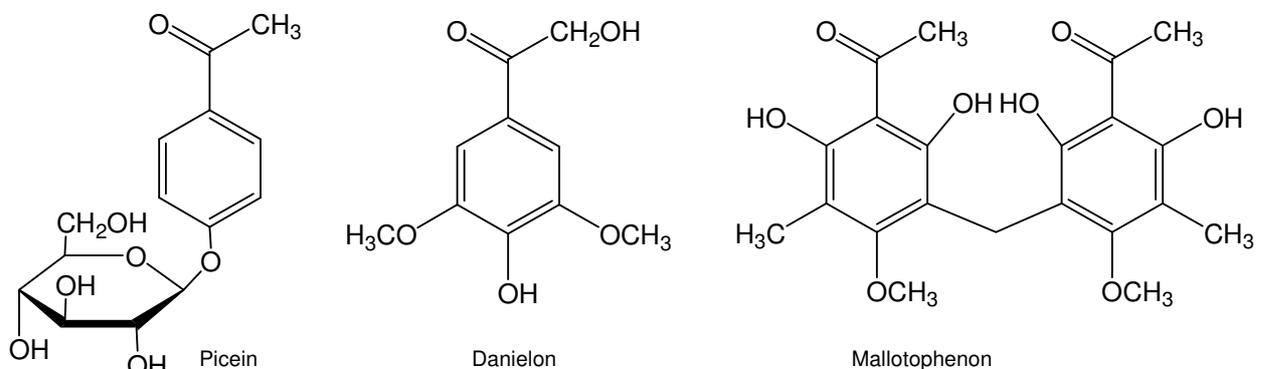


Abb. 6: Ausgesuchte phenolische Ketone Picein, Danielon und Mallotophenon (HARBORNE und BAXTER 1999)

Phenylpropane (aus dem Phenylpropanstoffwechsel, auch als Phenylpropanoide bezeichnet) weisen ein C₆C₃-Grundskelett auf und werden überwiegend aus der Zimtsäure synthetisiert, so dass Cumarine, Isocumarine, Chromone, Chromane und Chromene sowie auch die

Hydroxyzimtsäuren hinzugerechnet werden (KUTSCHERA 2002). Auch Lignane, Lignin, Suberin und Cutin zählen als Di- und Polymere zu den Phenylpropanen, gehören jedoch dem Primärstoffwechsel an. Einige Phenylpropene, wie die Monolignole, sind Zwischenprodukte und dimerisieren zu Lignanen oder polymerisieren zu Lignin, Suberin und Cutin.

Es sind mehr als 700 Cumarine bekannt und untergliedern sich in drei Klassen, die einfachen Hydroxycumarine, die Furanocumarine mit zusätzlichem Furan-Ring und die Pyranocumarine mit zusätzlichem Pyran-Ring. Sie dienen vorwiegend als Antibiotika und Fraßgifte, sind in mehr als 100 Pflanzenfamilien bereits nachgewiesen und kommen zumeist an Zuckerreste gebunden als Glykoside vor (Abb. 7) (HARBORNE und BAXTER 1999).

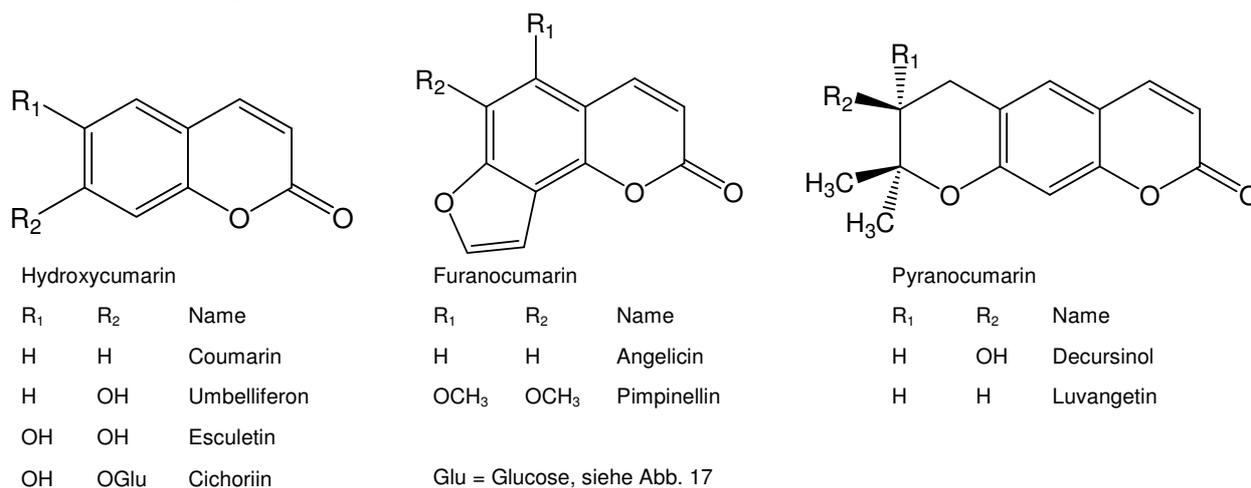


Abb. 7: Ausgesuchte Cumarine (HARBORNE und BAXTER 1999)

Chromone, Chromane und Chromene sind eine relativ kleine Gruppe an Pflanzenphenolen, die, wie die Cumarine auch weitere heterocyclische Ringe tragen können. Bekannt sind sie als Farbpigmente in Blättern und Blüten und haben zahlreiche weitere Funktionen, wie beispielsweise als Insektizide (Precocene 1 und 2 greifen als Hormon negativ in das Larvenwachstum vieler Insekten ein). Die Verbindung Khellin wird in der Therapeutik als Vasodilatator (weitet die Blutgefäße) bei der Behandlung von Angina Pectoris eingesetzt (Abb.8) (POLLY und TAYLOR 1999, HARBORNE et al. 1999).

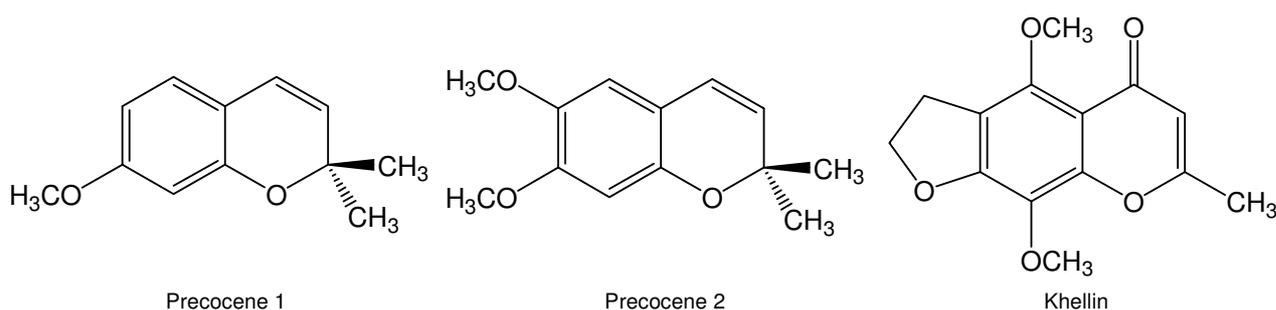
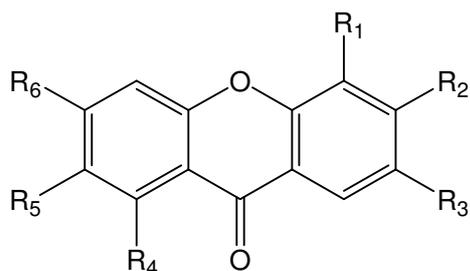


Abb. 8: Strukturformeln der Chromene Precocene 1 und 2 sowie des Chromons Khellin (POLLY und TAYLOR 1999, HARBORNE et al. 1999)

Die mehr als 210 bekannten Xanthone sind nur in wenigen Pflanzenfamilien zu finden. Ihr Strukturskelett besteht aus C₆C₁C₆, wobei auch hier wieder alle denkbaren Substitutionsmuster mit Hydroxyl-, Methyl- und Glykosyl-Gruppen bis hin zur weiteren heterozyklischen Ringbildung gegeben sind. Sie gelten als antimikrobiell und haben insektentötende und entzündungs-hemmende Eigenschaften. Das Betätigungsfeld der Xanthone ist noch recht jung, so dass viele Fragen weiter offen stehen und Gegenstand der Forschung sind (Abb. 9) (HARBORNE et al. 1999, KLÖCKL 2006, WANG et al. 2003).



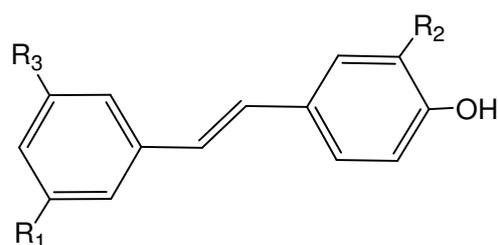
Xanthone

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Name
H	OH	OH	OH	H	OCH ₃	Athyriol
H	H	OH	OH	H	H	Euxanthone
OH	OH	H	OH	H	H	Mesuxanthone B
H	OH	OH	OH	Glu	OH	Mangiferin
OCH ₃	OH	H	OH	Glu	OH	Irisxanthone

Glu = Glucose (direkt an C gebunden, CGlu), siehe Abb. 17

Abb. 9: Ausgesuchte Xanthone (HARBORNE et al. 1999, KLÖCKL 2006, WANG et al. 2003)

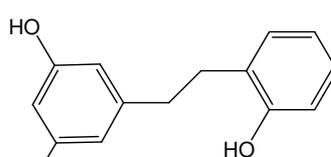
Stilbene weisen ein C₆C₂C₆-Grundskellet auf, kommen frei, wie das Resveratrol und glykolisiert, wie das Piceid vor und haben eine große Anzahl möglicher Substituenten an ihren Phenyl-Ringen, die O- und C-gebunden sein können. Häufig bilden sie Oligomere, wie das Dimer Viniferin, welches als Phytoalexin (Fungizid) in Weintrauben wirksam ist oder das Trimer Copalliferol B aus der Borke ausgesuchter Bäume, welches ebenfalls als Phytoalexin (antibakteriell) wirkt. Neben der Oligomerisation können Stilbene weiter zu Bibenzylen hydrolysieren und weitere Ringe ausbilden und dann als Phenanthrene bezeichnet werden. Sie kommen in der Natur nur sehr begrenzt vor, da eine spezielle Stilben-Synthese zu deren Bildung erforderlich ist (z. B. Kiefer, Weinrebe, Erdnuss, Knöterich) (Abb.10) (HARBORNE et al. 1999, HELDT 2003).



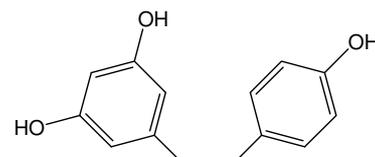
Stilbene

R ₁	R ₂	R ₃	Name
OH	H	OH	<i>trans/cis</i> -Resveratrol
OGlu	H	OH	<i>trans/cis</i> -Piceid
OGlu	OH	OH	<i>trans/cis</i> -Astringin
OCH ₃	H	OCH ₃	<i>trans/cis</i> -Pterostilben

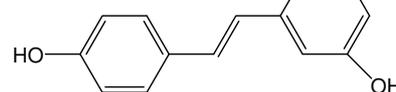
Glu = Glucose, siehe Abb. 17



Bibenzyl Demethylbatatasin IV



ε-Viniferin



Phenanthren Coelogin

Abb. 10: Ausgesuchte Stilbene, Bibenzyl Demethylbatatasin IV, Phenanthren Coelogin und Dimer ε-Viniferin (HARBORNE et al. 1999)

Die Flavonoide sind die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole (etwa die Hälfte aller Phenole). So wurde 1980 noch etwa von 2.000 Polyphenolen ausgegangen (HARBORNE 1980) und im Jahr 2005 bereits schon von 9.000 (MARTENS 2005). Neben Carotinoiden, Tetrapyrrolen, zählen die Flavonoide zu den drei wichtigsten Naturfarbstoffen. Sie geben u. a. Blüten, Früchten und selten auch Blättern und Wurzeln ihre Farbe, agieren als Copigmente und schützen vor UV-Strahlung. Dabei haben Flavonoide zumeist eine typisch gelbe Farbe (lat. „flavus“ = gelb), lediglich die Untergruppe der Anthocyanidine weist Farben von rot über blau bis dunkelviolett auf (griech. „anthos = Blüte, Blume, „kryáneos“ = dunkelblau), so dass „nichtanthocyanidine“ Flavonoide auch als Anthoxanthine zusammengefasst werden.

Wie unter Kapitel 3.1.1 bereits angedeutet, erfüllen Flavonoide weitere vielfältige Aufgaben in der Pflanze, die von pestizider Wirkung über Wachstumskontrolle bis hin zu Beteiligungen an Oxido-Reduktions-Systemen des Zellstoffwechsels reichen.

Strukturell basieren Flavonoide aufgrund gleicher biogenetischer Vorstufen auf einem C₁₅-Kohlenstoff-Skelett (C₆C₃C₆). Die Untergruppen leiten sich hauptsächlich von drei Unterscheidungsmerkmalen ab:

- Struktur des O-heterozyklischen Ringes (Chroman-Ring bzw. Pyran-Ring bei Flavanen, Flavonen, Anthocyanen, Isoflavonoiden und Neoflavonoiden, Furan-Ring bei Auronen und offenkettig als Alken bei Chalconen) (Abb. 11)
- Position des zweiten Phenyl-Ringes (B-Ring) ebenfalls an den C-Atomen 2, 3 und 4 des C-Rings (Position 2 bei Flavanen, Flavonen und Anthocyanen, Position 3 bei Isoflavonoiden und Position 3 bei Neoflavonoiden) (Abb. 12 und 13)
- unterschiedlicher Oxidationsgrad der C-Atome 2, 3 und 4 des O-heterozyklischen Ringes (C-Ring) (Abb. 14)

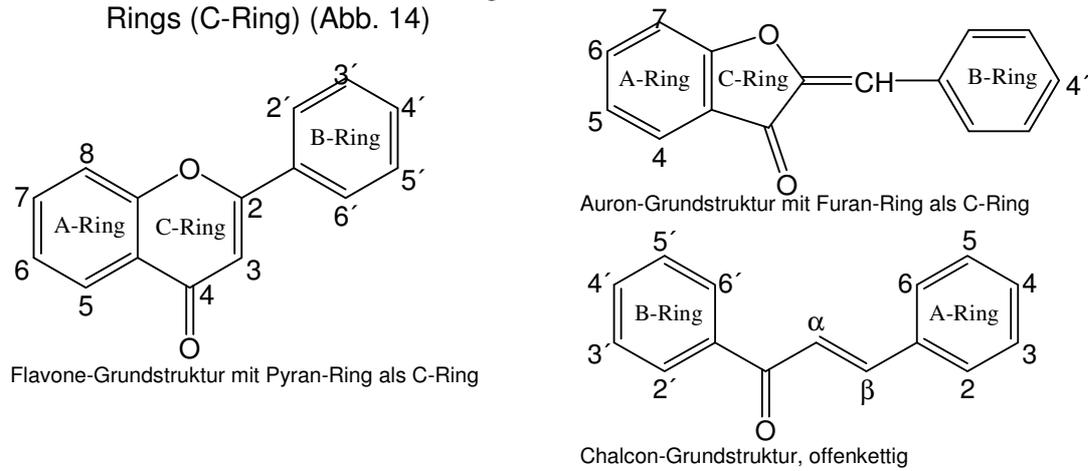


Abb. 11: Grundstrukturen des heterozyklischen Ringes bei Flavonoiden (HARBORNE 1980)

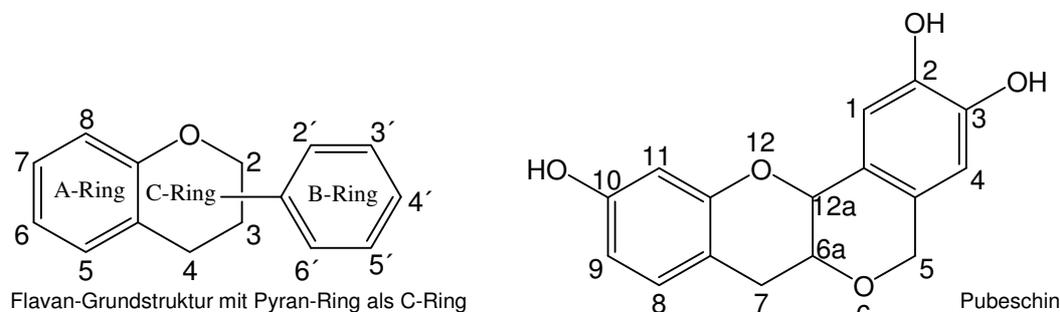


Abb. 12: Flavan-Grundstruktur und abweichende Struktur der Peltogynoid Flavane mit abweichender Nummerierung der Ringe am Beispiel des Pubescidins

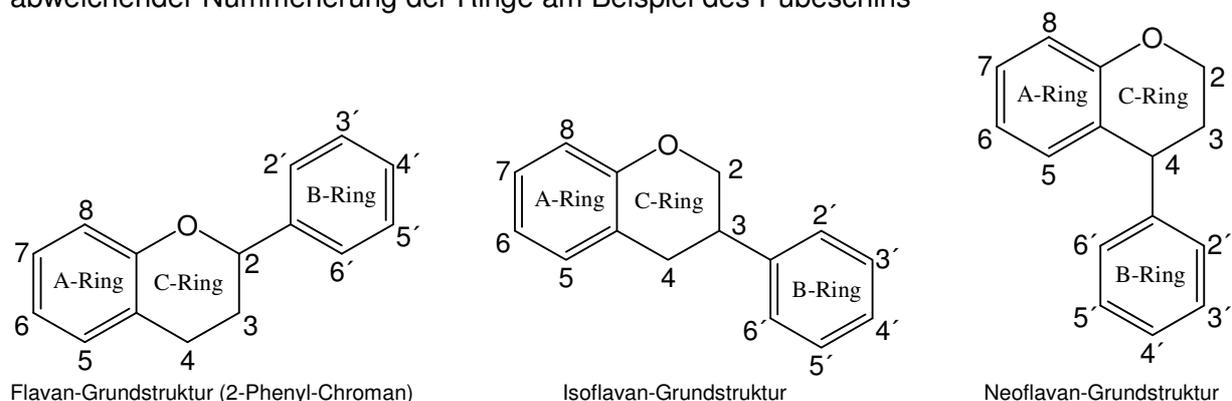


Abb. 13: Grundstruktur C₆C₃C₆ mit Pyran-Ring, Grundstrukturen der Flavane, Isoflavane und Neoflavane (HARBORNE 1980)

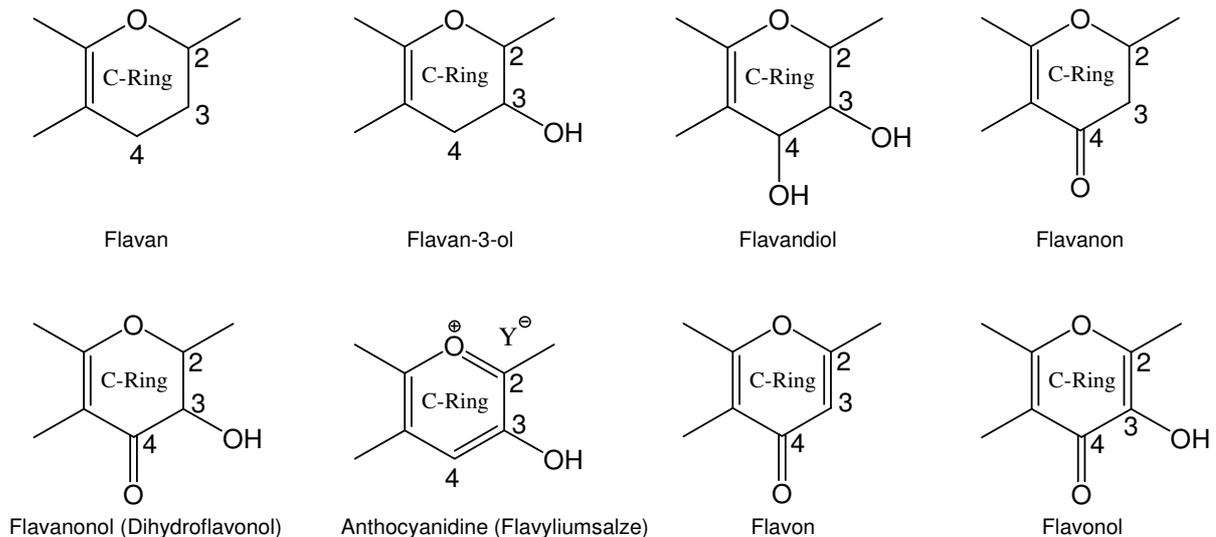


Abb. 14: Oxidationsgrade am O-heterozyklischen Ring mit Zuweisung der Untergruppen

So können die wichtigsten, in der Natur vorkommenden Flavanoide in acht Untergruppen gegliedert werden. Hinzu kommt eine neunte Untergruppe als Kondensate der Flavanole und Leucoanthocyanidine, die Proanthocyanidine oder auch so genannte kondensierte Tannine (franz. „tanin“ = Gerbstoff). Abschließend ist die zehnte Untergruppe der „diversen Flavonoide“ (miscellaneous flavonoides) zu nennen, die alle Exoten der Flavonoide zusammenfasst. In den Untergruppen selber, sorgen die unterschiedlichen Arten, die Anzahl und die Stellungen der Substituenten (z. B. =O, -OH, O- und C-Alkyle, Säuren, O-Glykoside und C-Glykoside) an den aromatischen Ringen (A- und B-Ring) für die Vielfalt der Einzelverbindungen. Wie bei den oben beschriebenen Phenolen auch, liegen die meisten Flavonoide nicht frei als so genannte Aglykone, sondern als Glykoside, an Zuckern gebunden vor (der Zuckerrest wird als Glykon bezeichnet). Flavanole bilden die Ausnahme, wobei hier Gallate (Gallussäurerest) zu ihrer Vielfalt beitragen. Mehr als 80 verschiedene Zucker sind bei Flavonoidglykosiden bereits nachgewiesen, so dass alleine beim Quercetin 179 Glykosid-Variationen beschrieben wurden.

Chalcone, Dihydrochalcone, Aurone, Flavanone und Flavanonole (Dihydroflavonole) zählen zu den „unbedeutenden Flavonoiden“ (minor flavonoids), da sie eher Übergangsgruppen zu den weiteren Flavonoiden darstellen (vgl. Kapitel 3.1.4) und qualitativ sowie quantitativ nur gering anzutreffen sind. So sind folgend in Abb. 15 bis 25 die gängigsten Vertreter der Flavanoide und im Text weitere Informationen zu den Einzelgruppen zusammengetragen. (WATZL und RECHKEMMER 2001b, PHYTO LAB 2005, HARBORNE 1980, RÖMPP-LEXIKON NATURSTOFFE 1997).

Flavane untergliedern sich in Flavane, Flavanole, Flavandiole, Flavanone und Flavanonole und haben einen gesättigten Pyran-Ring als gemeinsames Strukturmerkmal. Die Flavanole, die auch als Catechine bzw. Epicatechine bezeichnet werden, tragen ihre Hydroxid-Gruppe zumeist an der Position 3 des Pyran-Ringes und werden damit detaillierter auch als Flavan-3-ole benannt. Flavandiole tragen ihre Hydroxyde an Position 3 und 4, so dass diese im Detail mit Flavan-3,4-diole beschrieben werden und vorwiegend aus Kernholz isoliert wurden. Peltogynoid Flavane bilden einen vierten Ring mittels einfacher Kohlenstoffbrücke über C-2' oder C-6' zu der 3-oxy-Funktion des Pyran-Ringes und haben daher eine zu den Flavanen abweichende Nummerierung (Abb. 12). Von den Peltogynoid Flavanen und den Flavan-4-olen sind jeweils lediglich eine Hand voll Einzelverbindungen identifiziert und bilden mit den Flavan-3,4-olen die Gruppe der Leucoanthocyanidine („leuco“ = weiß, farblos), die relativ instabil sind und zumeist schnell weiter zu den farbigen Anthocyanen umgesetzt werden. Zu den oben genannten „kondensierten Tanninen“ kommt es, wenn Flavan-3,4-diole in Flavan-3-ole übergehen, wobei intermediär Carbokationen entstehen, welche beim Mangel an einer reduzierenden Verbindung mit NADPH und Flavan-3-olen zu Dimeren und

in weiterer Folge zu Oligomeren reagieren. Flavanone haben eine Keto-Gruppe (-on) und Flavanonole zusätzlich eine Hydroxy-Gruppe (-ole) als Oxidationsmuster am Pyran-Ring. Flavanonole werden auch als Dihydroflavonole bezeichnet, da sie die Vorstufe der Flavonole darstellen. Lediglich der C-Ring ist mittels Flavonol-Synthase zu dehydrolysieren (Dihydro-), so dass die ungesättigte C=C-Doppelbindung der C-Atome 2 und 3 der Flavonole resultiert. Flavanone und Flavanonole kommen zumeist in Früchten als O-Glykoside vor und sind ein wichtiger Geschmacksfaktor. Der bittere und astringierende Geschmack kann mittels enzymatischer Abspaltung der Zuckerreste beseitigt werden. Beide Stofffamilien der Flavane (-one und -ole) sind farblos und eher Geschmacksgeber, insbesondere bei Zitrusfrüchten (Abb. 15-19) (HARBORNE 1980).

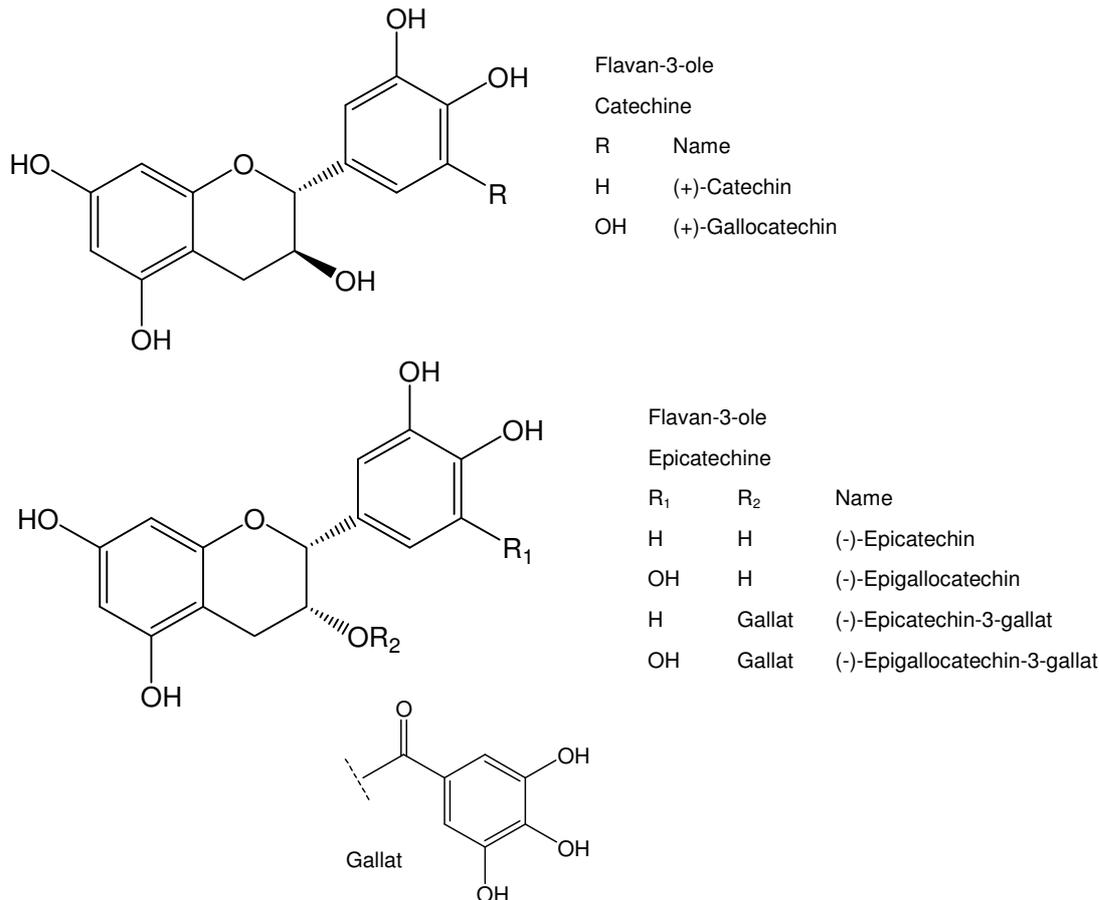


Abb. 15: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavan-3-ole

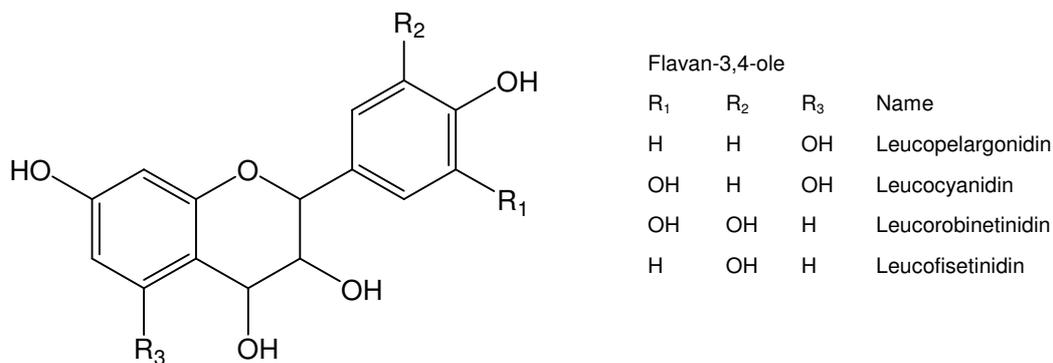
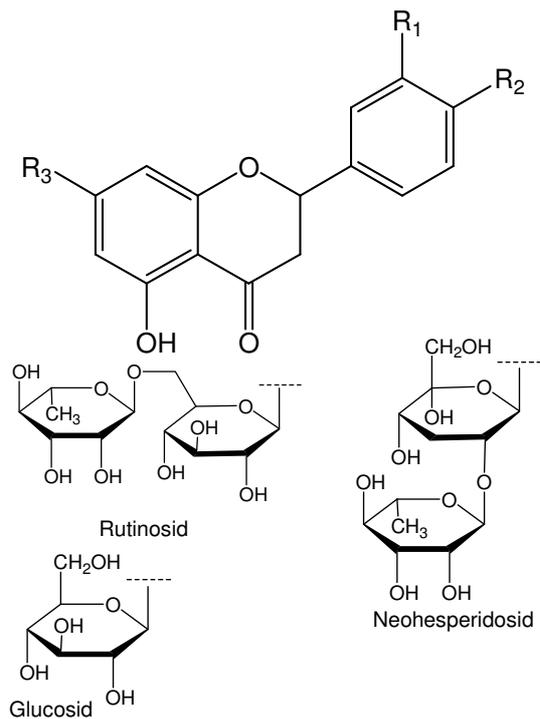


Abb. 16: Grundstruktur und wichtige Vertreter der Flavan-3,4-diole

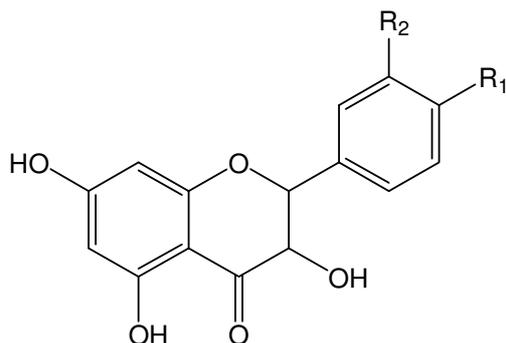


Flavanone

R ₁	R ₂	R ₃	Name
H	OCH ₃	ORut	Didymin
OH	OH	ORut	Eriocitrin
OH	OH	OH	Eriodictyol
OH	OCH ₃	OH	Hesperetin
OH	OCH ₃	ORut	Hesperidin
H	OCH ₃	OH	Isocakuranetin
H	OH	OH	Naringenin
H	OH	ONeo	Naringin
H	OH	ORut	Narinnutin
OH	OH	ONeo	Neoeriodictin
OH	OCH ₃	ONeo	Neobesperidin
H	H	OH	Pinocembrin
H	OCH ₃	ONeo	Poncirin
H	OH	OGlu	Prunin

Rut = Rutinosid, Neo = Neohesperidosid, Glu = Glucosid

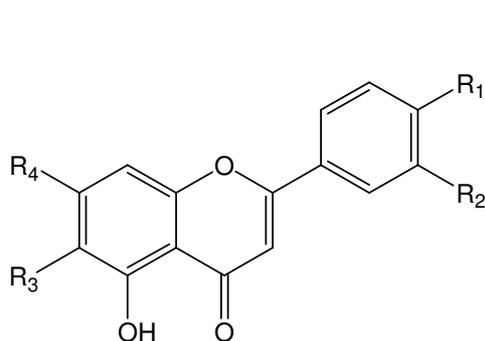
Abb. 17: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavanone



Dihydroflavonole (Flavanonole)

R ₁	R ₂	Name
H	H	Pinobanksin
OH	H	Aromadendrin (Dihydrokaempferol)
OH	OH	Taxifolin
OH	OCH ₃	Dihydroisorhamnetin

Abb. 18: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Dihydroflavonole (Flavanonole)



Flavone

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Name
OH	H	H	OH	Apigenin
H	H	OH	OH	Baicalcin
H	H	H	OH	Chrysin
OCH ₃	OH	H	ORut	Diosmin
OH	H	H	OCH ₃	Genkwanin
OH	H	H	ORut	Isorboifolin
OH	OH	H	OH	Luteonin
OH	H	H	ONeo	Rhoifolin
H	H	H	OCH ₃	Techtochrysin

Rut = Rutinosid, Neo = Neohesperidose, siehe Abb. 17

Abb. 19: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavone

Flavone und Flavonole haben einen einfach ungesättigten C-Ring und eine Keto-Gruppe an Position C4 als gemeinsames Oxidationsmuster, die Flavonole sind zusätzlich in Position C3 hydroxyliert. Sie sind gewöhnlich in Pflanzen als O-Glykoside zu finden. Gerade die oben

bereits angesprochenen Flavon-Glycoside des Quercetins sind im Pflanzenreich vorherrschend. Aber auch die Flavonol-Glycoside des Kämpferols und die der Flavone Apigenin und Luteolin sind in Gemüse nennenswert anzutreffen. In Obst hingegen, sind nahezu ausschließlich Quercetin-Glycoside neben geringsten Mengen an Myricetin- und Kämpferol-Glycosiden deutlich dominierend (Abb. 20) (HARBORNE 1980).

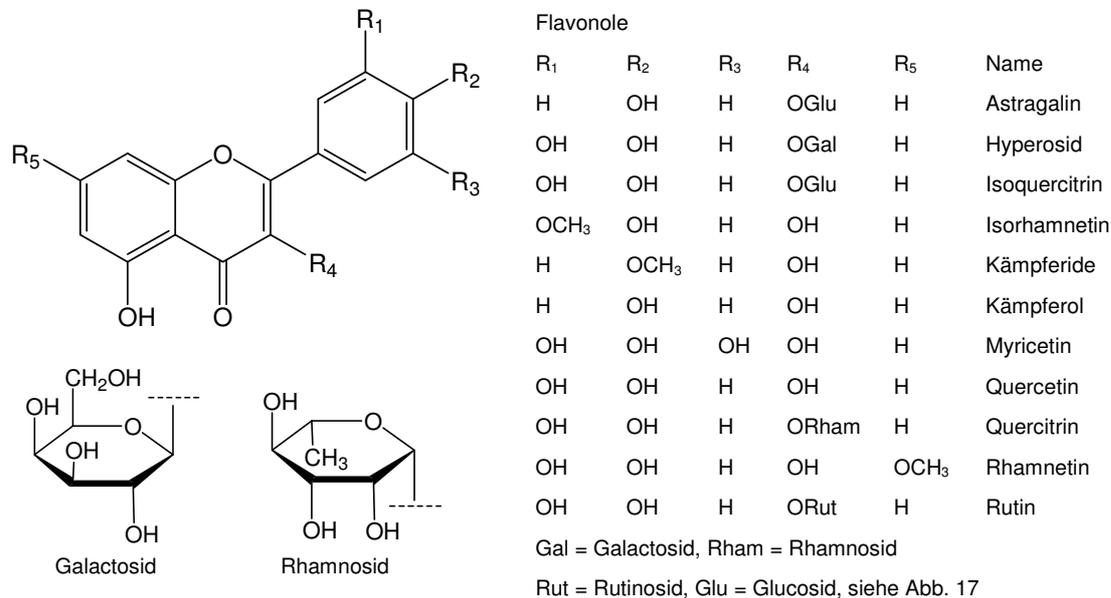


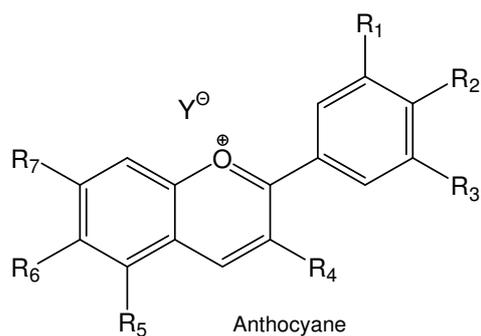
Abb. 20: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavonole

Anthocyanidine stellen die größte Gruppe der wasserlöslichen Farbpigmente dar. Die Absorptionsmaxima liegen zwischen 465-560 nm, also im sichtbaren Bereich und weisen, wie oben bereits erwähnt, ein Farbspektrum von rot über blau bis dunkelviolett auf, welches pH-Wert-abhängig ist (pH<3 rot, pH 7 violett, pH 8-9 blau, pH>8 gelb). Zumeist tragen die Anthocyanidine an der Position C3 des C-Ringes eine Hydroxyl-Gruppe, die häufig glykolisiert ist (z. B. Glucose, Galactose, Rhamnose, Rutinose und Oligosaccharide), was eine Stabilisierung des Anthocyanmoleküls bewirkt. Weiter spielen für die Stabilität und die Farbe des ionischen Moleküls (Flavyliumsalze) gebundene Spurenelemente (z. B. Fe, Al) eine wichtige Rolle. Die Glykoside der Anthocyanidine werden Anthocyane genannt und finden sich zumeist in den Randschichten der Pflanzen wie Epidermis- und Subepidermiszellen. Unter E163 sind sie als Lebensmittelfarbstoff zugelassen und werden zumeist aus Holunderbeeren, Aroniabeeren, Preiselbeeren oder roten Weintrauben gewonnen (Abb. 21) (HARBORNE 1980, WATZL und RECHKEMMER 2002).

Wie der Name Biflavonoide bereits ausdrückt, sind zwei Flavonoide über eine C-C-Bindung miteinander verknüpft. Dies können unterschiedliche Flavonoid-Variationen, wie z. B. Biflavone, Flavanon-Flavon, Biflavanone und andere sein, wobei die Verknüpfung an allen Ringen ansetzen kann und so eine große Vielfalt gewährleistet. Die Dimerisation erfolgt dabei vermutlich über eine katalytische oder photochemische Oxidation der Monomere. Bisher sind in neun Pflanzenfamilien und 33 Gattungen Biflavonoide nachgewiesen. Sie kommen vor allem in Farnen und Moosen vor, jedoch auch in Blättern, der Rinde, Kernholz, Wurzeln, Pollen, Früchten und Kernen vieler weiterer Pflanzen vor. Sie dienen als UV-Filter, Insektizide und Fungizide (Abb. 22) (HARBORNE 1980).

Isoflavonoide tragen ihren B-Ring an Position 3 des C-Ringes (Abb.13). Wie auch die in Position 2 stehenden Flavonoide, sind alle denkbaren Oxidationsgrade des C-Ringes möglich, so dass Isoflavane, Isoflavanone, Isoflavone, Isoflav-3-ene und darüber hinaus Coumestane mit der Bildung eines vierten, heterozyklischen Ringes (vgl. Peltogynoid Flavane), Isoflavonoid-Oligomere (vgl. Biflavonoide und Proanthocyane) und weitere Exoten resultieren. Obwohl in ihrer Vielfalt sehr reich, kommen die Isoflavonoide nur in sehr wenigen

Pflanzen vor und dort größtenteils als Isoflavone. Sie sind überwiegend in der Pflanzenfamilie der Hülsenfruchtartigen (*Leguminosae*), die zu den Schmetterlingsblütlern (*Fabaceae*) zählen, zu finden. In Sojabohnen sind die Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein etwa im Verhältnis 10:8:1 enthalten und in Rotklee, Klee- und Alfalfasprossen die 4'-Methylether von Daidzein und Genistein, Formononetin und Biochanin A. Auch die Isoflavonoide kommen zumeist als Glykoside vor. Isoflavone spielen neben einigen Lignan- und Coumestanen als Phytoöstrogene wegen ihrer sterischen (räumlichen) Ähnlichkeit zum menschlichen Sexualhormon 17 β -Östradiol eine an Bedeutung immer mehr gewinnende Rolle in der Therapie von Hormonstörungen (z. B. Menopause). Zwar ist ihre Wirkung im menschlichen Körper um das 100-100.000-fache geringer, andererseits können sie in wesentlich höheren Konzentrationen aufgenommen werden (Abb. 23) (JUNGBAUER und MEDJAKOVITC 2005).



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Name
H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Aurantidin
OH	OH	H	OH	OH	H	OH	Cyanidin
OH	OH	OH	OH	OH	H	OH	Delphinidin
OCH ₃	OH	OH	OH	OCH ₃	H	OH	Europinidin
OH	OH	H	H	OH	H	OH	Luteolinidin
H	OH	H	OH	OH	H	OH	Pelargonidin
OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	H	OH	Malvidin
OCH ₃	OH	H	OH	OH	H	OH	Peonidin
OH	OH	OCH ₃	OH	OH	H	OH	Petunidin
OCH ₃	OH	H	OH	OH	H	OCH ₃	Rosinidin

Abb. 21: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Anthocyane (Flavyliumsalze)

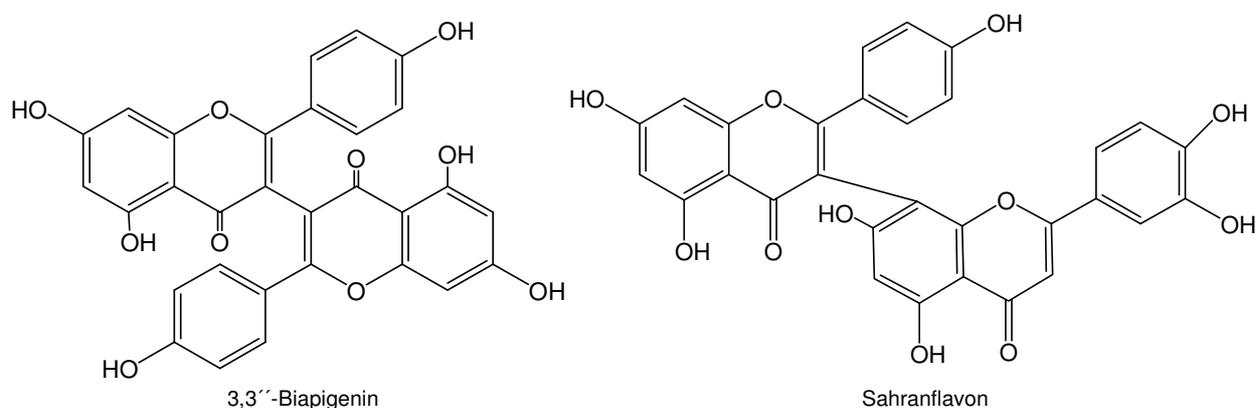


Abb. 22: Beispiele für Biflavonoide

Isoflavonoide (hier Isoflavone)				
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Name
OH	H	H	OH	Daidzein
OH	OH	H	OH	Genistein
OCH ₃	H	H	OH	Formononetin
OCH ₃	OH	H	OH	Biochanin A
OH	H	OCH ₃	OH	Glycitein
OH	H	H	OGlu	Daidzin
OH	OH	H	OGlu	Genistin
OH	H	OCH ₃	OGlu	Glycitin

Glu = Glucose, siehe Abb. 17

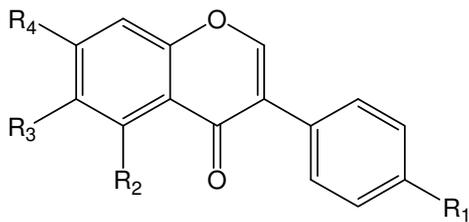


Abb. 23: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Isoflavonoide

Auch die Neoflavonoide ähneln den zuvor beschriebenen Flavonoiden in ihrem C₆C₃C₆-Grundgerüst, lediglich der B-Ring ist in Position 4 des C-Ringes angeordnet. Wie bei den Isoflavonoiden, ergeben sich unzählige Variationen des Oxidationsmusters des C-Ringes und der Substituenten am gesamten Ringsystem, wobei auch hier lediglich ausgesuchte Pflanzenfamilien und Gattungen die Fähigkeit zu ihrer Synthese haben (z. B. *Leguminosae*, *Guttiferae*, *Rubiaceae*, *Passifloraceae*). Sie liegen in den Pflanzen eher frei als Aglycone statt als Glykoside an Zuckerreste gebunden vor. Viele von ihnen sind auch als 4-Phenylcumarine, 4-Phenylchromene und 4-Phenylchromane zu beschreiben, so dass wieder die Überschneidungen der Klassen und Gruppen untereinander verdeutlicht wird (Abb. 24).

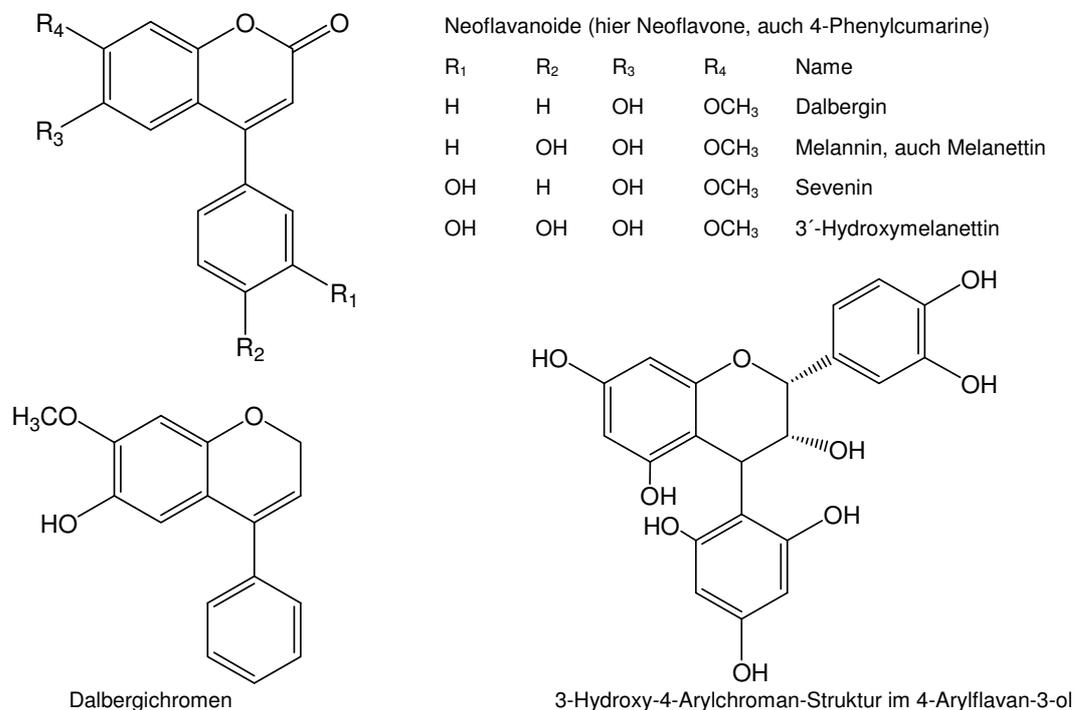
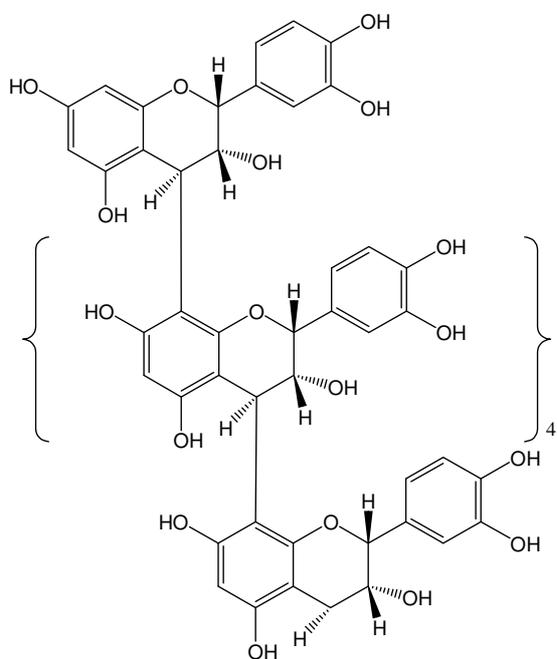


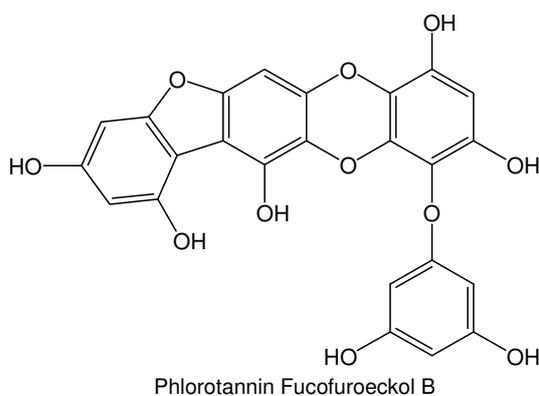
Abb. 24: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Neoflavonoide (HARBORNE et al. 1999, CHAN et al. 1997, DONNELLY et al. 2000)

Proanthocyanidine zählen zu den Tanninen und sind Di-, Tri-, Oligo- und Polymere der Flavanole. Bis zu einem Oligomerisierungsgrad von 4 überwiegt ein eher bitterer Geschmack, darüber die astringierende Wirkung (zusammenziehend). Oligomere Proanthocyanidine werden in der Literatur häufig auch mit OPC abgekürzt und bestehen aus 4-11 Monomeren. Mittels saurer oxidativer Hydrolyse entstehen die farbigen Anthocyanidine,

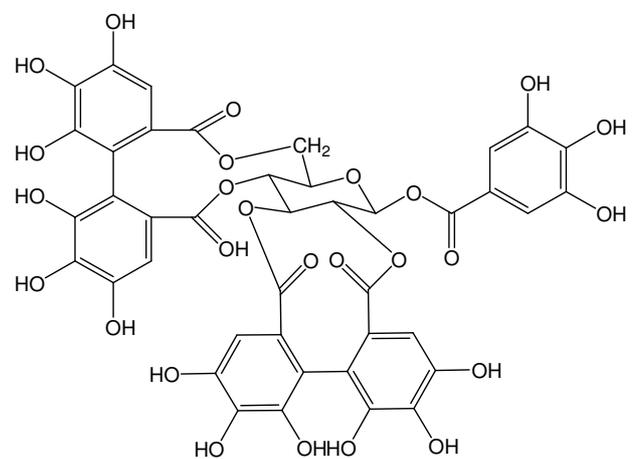
woher auch ihre Namensgebung stammt. Die kürzere Bezeichnung Procyanidine ist ebenfalls geläufig und beschreibt im speziellen die Hydrolyse zum Cyanidin, welches häufig z. B. in Rotwein vorkommt. Procyanidine stellen die größte Anzahl der auch so genannten kondensierten Tannine in der Pflanzenwelt dar. Von den kondensierten Tanninen sind hydrolysierbare Tannine zu unterscheiden, die weiter in zwei Untertypen gegliedert werden. Gallotannine haben einen Glukose-Kern, der von fünf oder mehr Galloyl-Gruppen umgeben ist, und Ellagitannine, bei denen der Glukose-Kern mit Einheiten aus Hexahydroxydiphenylsäure verestert ist und darüber hinaus auch Galloyl-Gruppen tragen kann. Sie haben eine stark gerbende Wirkung und werden daher auch als Gallusgerbsäuren bezeichnet. Die hydrolysierbaren Tannine treten jedoch im Pflanzenreich seltener auf. Eine dritte Klasse von Tanninen sind die Phlorotannine, die z. B. die Braunalgen vor Weichtierfraß schützen. Sie bestehen aus Phloroglucinol-Einheiten (Phloroglucinol = 1,3,5-Trihydroxybenzol, 1,3,5-Trihydroxybenzen, 1,3,5-Benzentriol), die über Kohlenstoff-Kohlenstoff- oder Kohlenstoff-Sauerstoff-Verbindungen miteinander verknüpft sind. Anzumerken ist, dass auch Mischformen der Tannine anzutreffen sind (Abb. 25) (CORNELL UNI 2006, TAKOS et al. 2006).



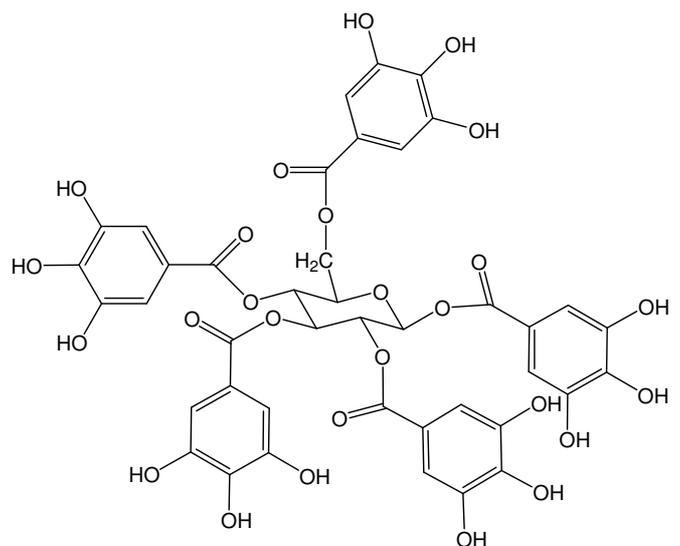
Procyanidin Cinnamtannin, [Epicatechin-(4 β →8)]₅-epicatechin



Phlorotannin Fucufuroeckol B



Ellagitannin Agrimoniin



Gallotannin Pentagalloyl- β -D-glucose

Abb. 25: Strukturen von Vertretern der Tannine (CORNELL UNI 2006)

3.1.4 Biosynthese der Polyphenole

Die Biosynthesewege des sekundären Metabolismus sind äußerst komplex und zum Teil noch nicht vollständig entschlüsselt. Die Vielfalt der Verbindungen ermöglicht nicht selten nur eine Möglichkeit ihrer Synthese, was insbesondere für einfache Phenole gilt. Hauptsyntheseweg für aromatische Verbindungen in Pflanzenzellen ist der Shikimat-Weg und daneben auch der Acetat-Mevalonat-Weg. Über den Shikimat-Weg werden Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin synthetisiert, die als Phenolderivate die Rohstoffe der oben genannten Polyphenole darstellen. Schlüsselenzym ist die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), die den Phenylpropan-Stoffwechsel mit Abspaltung der Ammoniak-Gruppe in Gang setzt. Die resultierende *trans*-Zitronensäure wird enzymatisch mittels Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) und einer Monooxygenase (P₄₅₀-Monooxygenase) weiter zur *trans-p*-Cumarsäure hydroxyliert (Einführung einer Hydroxyl-Gruppe an Position C4 des Ringes) und dient wiederum als Ausgangsstoff für einen weit verzweigten Syntheseweg.

Zum einen wird die *p*-Cumarsäure mit Hydroxylasen und O-Methyl-Transferasen zu verschiedenen Hydroxyzimtsäuren (Kaffesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure, u. a.) umgesetzt und zum anderen mit 4-Cumaroyl-CoA-Ligase (4CL) für die weitere Synthese von Flavonoiden, Stilbenen, Lignanen und mit der Ferular- und Sinapinsäure von Lignin und mit Fettsäuren, Fettalkoholen, Hydroxyfettsäuren und Dicarbonsäuren von Suberin und Cutin aktiviert.

Der unterschiedliche Hydroxylierungsgrad des aromatischen Ringes der Ausgangssubstanzen ergibt die Vielfalt der Substituenten des B-Ringes, die sich im Endprodukt widerspiegeln, wobei weitere Hydroxyl-Gruppen mit entsprechenden Hydroxylasen nachträglich eingeführt werden können. Die Hydroxyzimtsäuren wiederum dienen den Hydroxybenzoesäuren, den phenolischen Ketonen, Chinonen, Xanthonen und weiteren Phenolen als Ausgangssubstanzen. Stets sind spezifische Enzyme beteiligt, die nicht jede Pflanze besitzt, so dass insbesondere Stilbene (z. B. Kiefer, Weinrebe, Erdnuss) und Xanthone (z. B. Mango) in nur wenigen Pflanzen zu finden sind. Der Acetat-Mevalonat-Weg liefert Malonyl-CoA, von dem drei Verbindungen zu einem aromatischen Ring geformt werden, der an einem bereits bestehenden Ring aus dem Shikimat-Weg gebildet wird (Flavonoide, Stilbene, Xanthone) oder aber an einem Acetyl-CoA (als Starter) zu einem eigenständigen aromatischen Ring geformt wird (Chromone, Isocumarine, einige Hydroxybenzoesäuren) und damit den zweiten wichtigen Weg zur Phenolsynthese in Pflanzen darstellt. Einen Einblick in die Vielfältigkeit und Komplexität der Hauptsynthesewege ist exemplarisch an ausgesuchten Verbindungen in Abb. 26 gegeben. Die Flavonoid- und die Stilben-Synthese sind wegen ihrer Bedeutung gesondert in Abb. 27 und 28 detailliert dargestellt und folgend beschrieben (HELDT 2003, STRASBURGER 1998, RICHTER 1996, KINDL 1994, MORITA et al. 2001, DIXON und STEELE 1999, FORKMANN und MARTENS 2001, WINKEL-SHIRLEY 2001, GOLDBERG 2005, KOES 2005).

Wie Eingangs erwähnt, werden gerade vielen Flavonoiden und dem Resveratrol positive gesundheitliche Eigenschaften zugeschrieben, so dass entsprechende wissenschaftliche Untersuchungen in den letzten 20 Jahren intensiv vorangetrieben wurden, so auch die Erforschung ihrer Biosynthesen. Beide Synthesen gehen von dem Shikimat-Weg aus, bilden *trans*-Zitronensäure und weiter *p*-Cumarsäure, die unter Katalyse des Co-Enzyms A (CoA-ligasen → *p*-Cumaroyl-CoA) aktiviert wird. Für die Flavonoide kommt jetzt die Chalcon-Synthase (CHS) und für Stilbene die Stilben-Synthase (STS) zum Einsatz. Je *p*-Cumaroyl-CoA sind 3 Malonyl-CoA aus dem Acetat-Mevalonat-Weg zur Bildung des zweiten aromatischen Ringes erforderlich. Dabei werden für die Flavonoide drei und für die Stilbene vier CO₂ und jeweils vier Coenzym A abgespalten. An den Zwischenschritten der Ringbildung ist weiter die Beteiligung einer Polyketid-Synthase (PKS) beschrieben, die die Polyketid-Zwischenprodukte durch decarboxylierende Kondensationen der Malonyl-CoA bildet (Abb. 27) (MORITA et al. 2001).

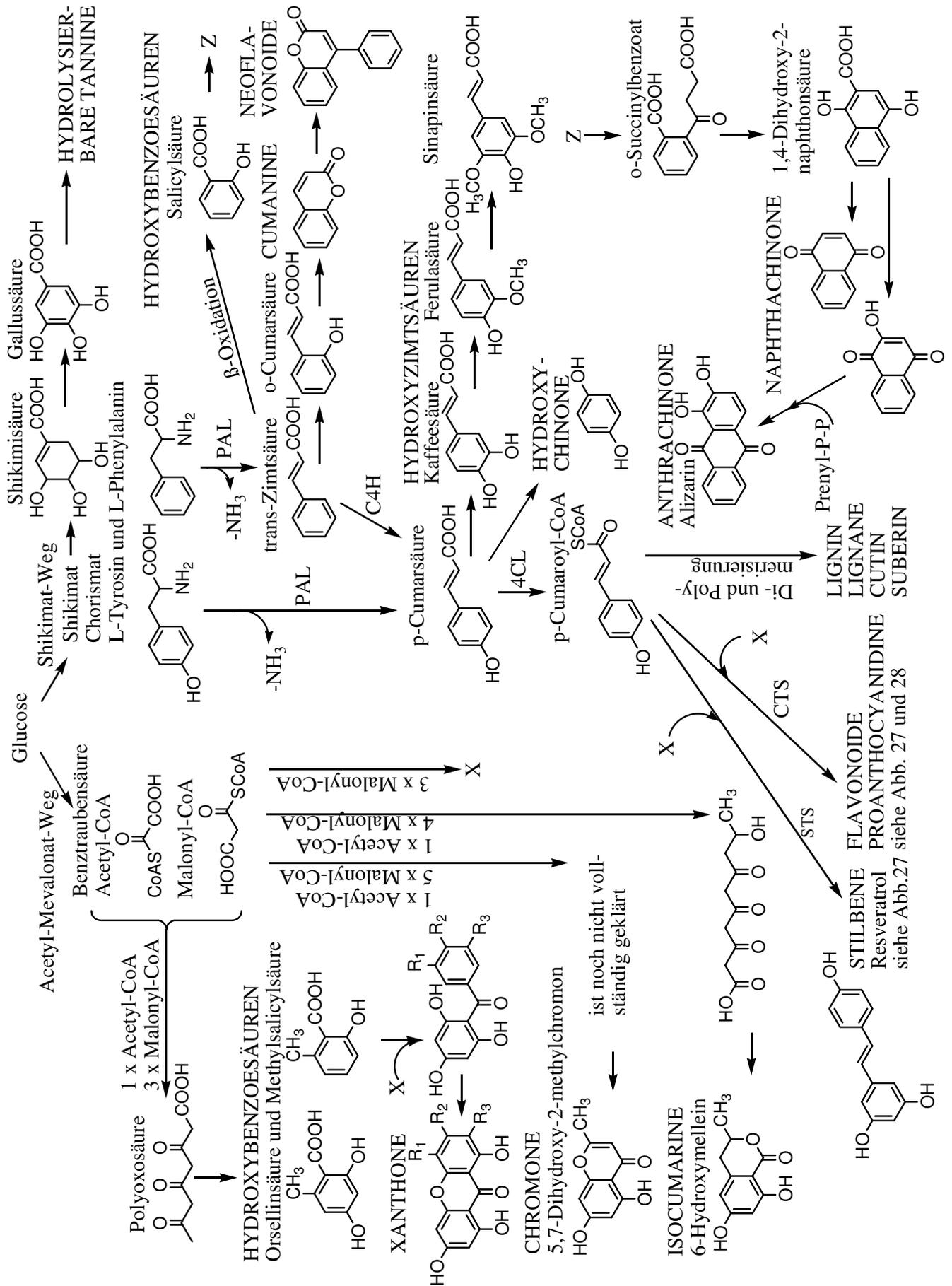


Abb. 26: Schematische Darstellung der Hauptsynthesewege ausgesuchter Pflanzenphenole

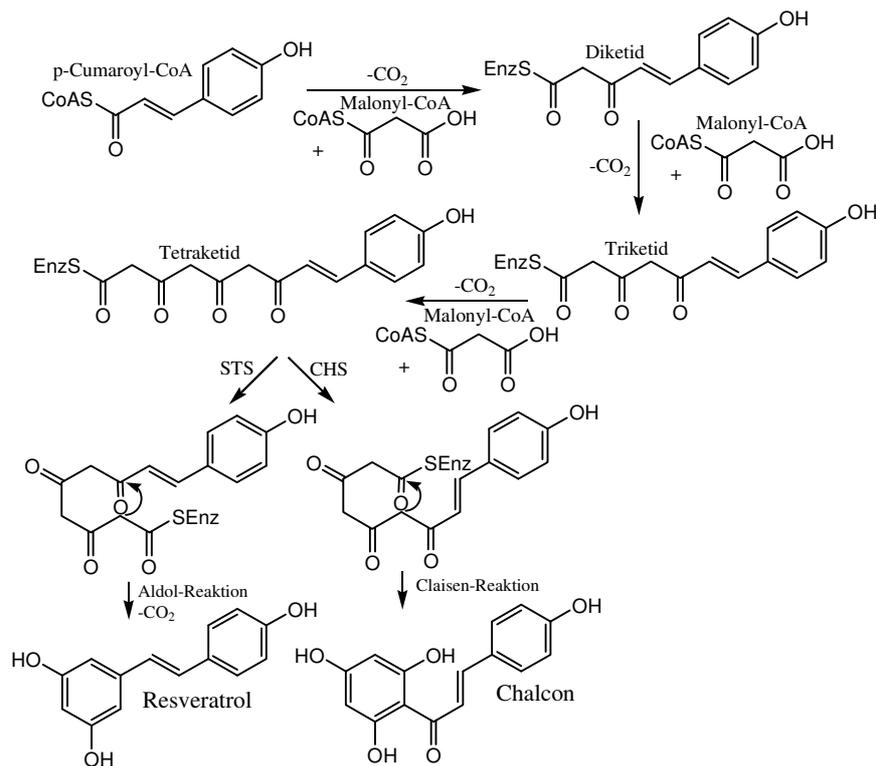


Abb. 27: Vorgeschlagener Mechanismus zur Chalcon- und Resveratrol-Biosynthese über Polyketide (MORITA et al. 2001, KODAN 2002, AUSTIN et al. 2004)

Das Chalcon ist die Ausgangssubstanz für alle Flavonoide, außer den Neoflavonoiden, die zumeist über Cumarine und Isocumarine synthetisiert werden. Durch die Chalcon Isomerase (CHI) wird das Chalcon stereospezifisch in ein Flavanon (S-Konfiguration am C-Atom 2) umgesetzt (Vertreter: Naringenin). Mit Flavonoid-3'-Hydroxylasen (F3'H) und der Flavonoid-3',5'-Hydroxylasen (F3'5'H), können am B-Ring weitere Hydroxyl-Gruppen eingeführt werden, so dass Flavanone mit unterschiedlichen Hydroxylierungsgraden resultieren (Vertreter: Pentahydroxyflavanon, Eriodictyol). Weiters wird ebenfalls vom Chalcon ausgehend mittels Auron-Synthase (AUS) der heterozyklische Furan-Ring der Aurone gebildet (Vertreter: Aureusidin). Vom Flavanon ausgehend, werden mit einer Kombination einer Isoflavon-Synthase und Hydroxyisoflavanondehydrogenase (IFS, HIDH) Isoflavonoide synthetisiert (Vertreter: Genistein), die schließlich weiter zu Pterocarpanen umgesetzt werden können, welche als antimikrobiell wirkende Substanzen (z. B. Glyceollin, Phaseollin, Pisatin) in jüngerer Zeit besondere Interesse gefunden haben (DIXON 2004). Flavanone sind weiter die Ausgangssubstanzen für Flavone, die über Wasserstoffabspaltung am Heterozyklus eine ungesättigte Doppelbindung erhalten. Dieser Prozess kann durch zwei Flavon-Synthasen (FNS I, FNS II) katalysiert werden, die unterschiedliche Wege beschreiten, jedoch zum gleichen Endprodukt führen (Vertreter: Apigenin, mit F3'H hydroxyliert Luteolin und mit F3'5'H hydroxyliert Tricetin) (MARTENS und MITHÖFER 2005). Die Flavanone erhalten mittels Flavanon-3-Hydroxylase am C-Atom 3 des Heterozyklus eine weitere Hydroxyl-Gruppe, so dass stereospezifische Dihydroflavonole (Flavanonole) synthetisiert werden, die ebenfalls weiter hydroxylieren (Vertreter: Dihydromyricetin, Dihydrokämpferol, Dihydroquercetin) und als Intermediale folgend mittels Flavonol-Synthasen (FLS) zu Flavonolen umgesetzt werden (Vertreter: Myricetin, Kämpferol, Quercetin). Die Dihydroflavonole werden durch die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) am C-Atom 4 reduziert, so dass die Leucoanthocyanidine (Flavan-3,4-diole) zumeist ebenfalls als Intermediate resultieren (Vertreter: Leukodelphinidin, Leucopelargonin, Leucocyanidin) und diese mit Katalyse von Anthocyanidin-Synthasen (ANS) die farbigen Anthocyanidine liefern (Vertreter: Delphinidin, Pelargonin, Cyanidin). Die Leucoanthocyanidine dienen nicht nur den Anthocyanidinen, sondern auch den Flavan-3-olen als Ausgangsprodukte, indem die Leucoanthocyanidinreduktase (LAR) das am C-Atom 4 gebundene Hydroxyl abspaltet

(Vertreter: Gallocatechin, Afzelechin, Catechin)(RICHTER 1996, WATERMAN und MOLE 1994). Als letzter Schritt ist eine Glykolisierung des am C-Atom 3 gebundenen Hydroxyls mittels UDP-Glucose/Flavonoid Glucosyltransferase (UFGT) gezeigt, die zu den Anthocyanen führen (Vertreter: Delphinidin-3-O-Glycosid, Pelargonin-3-O-Glycosid, Cyanidin-3-O-Glycosid) (KRASNOW und MURPHY 2004).

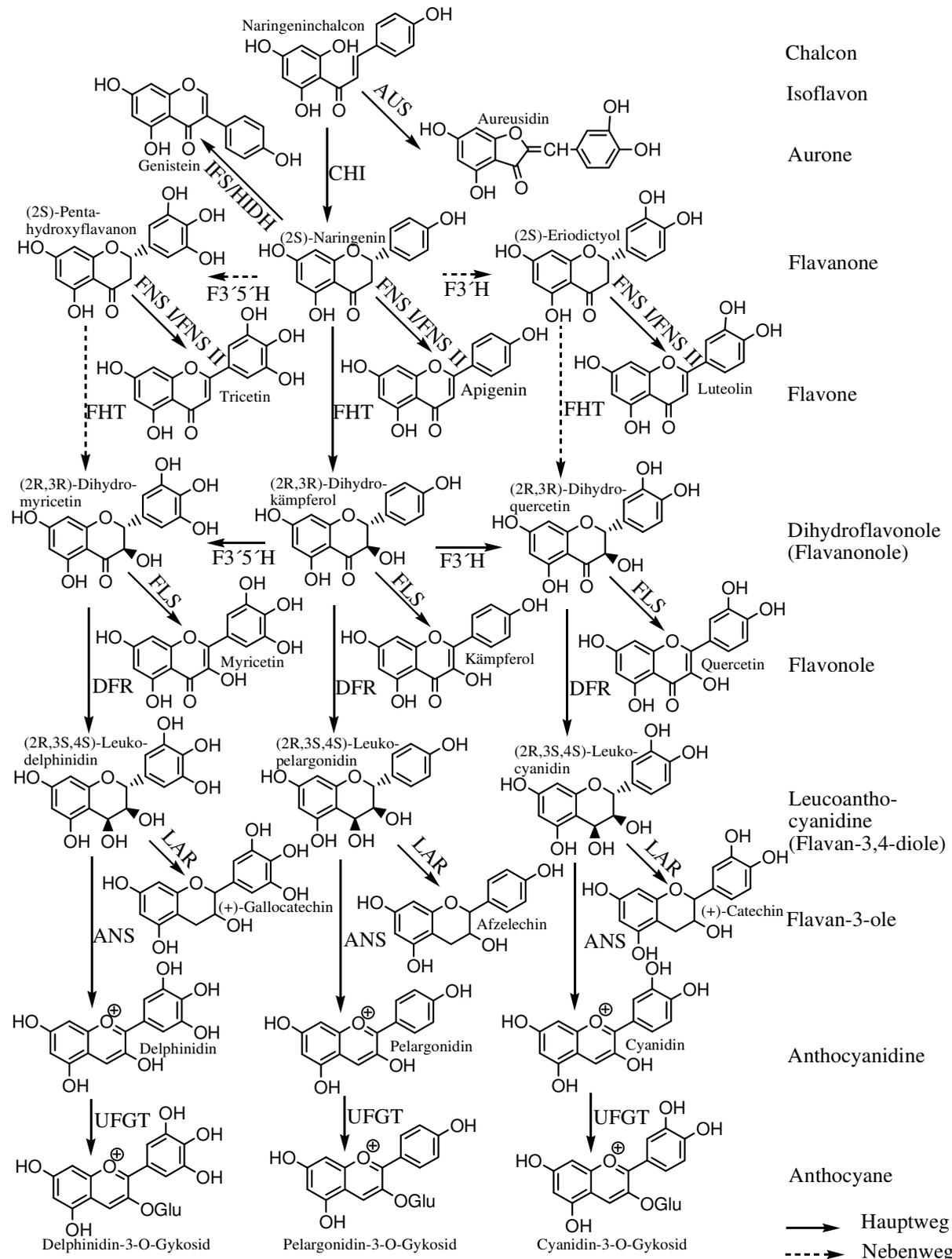


Abb. 28: Biosyntheseweg ausgesuchter Flavonoide (BARBORNE 1980, RICHTER 1996, NAKAYAMA et al. 2000)

3.1.5 Wirtschaftliche Bedeutung sekundärer Pflanzenwirkstoffe und Marktpotential

Sekundäre Pflanzenstoffe werden überwiegend in zwei Formen aufgenommen. Zum einen kann ein Lebensmittel eine oder mehrere betreffende Substanzen durch Zusatz oder Anreicherung beinhalten oder unerwünschte Bestandteile entfernt oder ersetzt (Substitution) werden, so dass dann im allgemeinen von „Functional Food“ (funktionelle Lebensmittel) gesprochen wird. Zum anderen können sie in Form von Tabletten, Kapseln, Pulvern oder Flüssigkonzentraten als so genannte Nahrungsergänzungsmittel in definiert dosierter Form eingenommen werden. Für kosmetische und pharmazeutische Zwecke sind Pflanzenwirkstoffe auch in anderen Aufnahmeformen üblich, wie z. B. mit Cremes oder Salben über die Haut (z. B. Aloe Vera Gele).

Bei dem Versuch, Aussagen über wirtschaftliche Entwicklungen dieser bioaktiven sekundären Pflanzeninhaltsstoffe als Functional Food, Nahrungsergänzungsmittel und Arzneimittel zu machen, fällt auf, dass deren Definitionen über Kontinente hinweg (z. B. USA, Japan, Europa), mehr oder weniger voneinander abweichen und daher ein direkter Vergleich schwer ist. So sind internationale Studien zu diesem Bereich mit entsprechender Toleranz zu sehen.

Generell lässt sich sagen, dass die Märkte für Funktional Food und Nahrungsergänzungsmittel, die gerne als Nutraceuticals zusammengefasst werden, zu etwa je einem Drittel auf die USA, Japan und Westeuropa entfallen. Ein Beispiel für den Markt von Functional Food gibt Abb. 29 (GEDRICH et al. 2005).

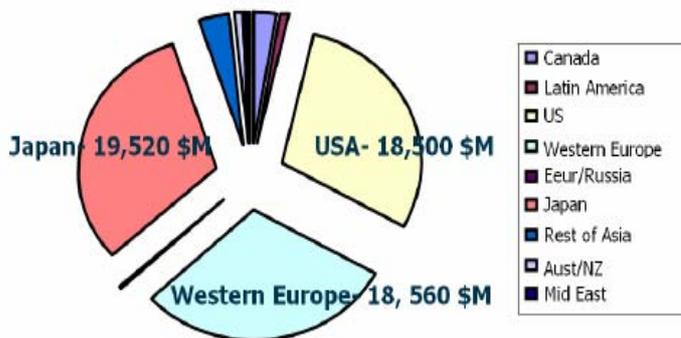


Abb. 29: Regionale Verteilung des weltweiten Umsatzes von Functional Food (GEDRICH et al. 2005)

Das Wachstum der Nutraceuticals wird im Durchschnitt mit etwa 7 bis 10 % pro Jahr angegeben und liegt dabei wesentlich höher als das Wachstum „klassischer“ Lebensmittel, welches mit 2 bis 5 % angegeben wird. Weiter ist das Wachstum von Nahrungsergänzungsmitteln zwischen den Jahren 1997 bis 2003 mit 10 % stärker ausgefallen als das Wachstum der Functional Food - Getränke mit 3,9 % und Funktional Food – Esswaren mit 8,2 %. Der Marktanteil selber liegt im unteren, einstelligen Prozent-Bereich (z. B. USA 3,3 %). Das Marktpotenzial wird in den kommenden Jahren bei 5 bis 10 % veranschlagt, sehr optimistische Prognosen gehen sogar von bis zu 20 % Marktanteil der Nutraceuticals am gesamten Lebensmittelmarkt aus (SPIEKERMANN 2001, TCI GROUP 1999, DUSTMANN 2004).

Arzneimittel aus Pflanzen werden auch als Phytopharmaka bezeichnet und finden häufig als rezeptfreie Arzneimittel zur Selbstmedikation Anwendung. Aus einer Studie von IMS-HEALTH (2005) geht hervor, dass die umsatzstärksten Indikationsbereiche der Selbstmedikation mit pflanzlichen Arzneimitteln (ohne Homöopathika) aus Apotheken ein Wachstum von 11 % im Jahr 2004 für die BRD hatten. Wachstumsstärkster Indikationsbereich war für „Herz und Kreislauf“ mit + 32 % zum Vorjahr, gefolgt von „Beruhigung und Schlaf“ sowie „Husten- und Erkältungskrankheiten“ mit + 13 bzw. + 6 %. Gerade den Polyphenolen werden gesundheitsfördernde Wirkungen von Herz und Kreislauf nachgesagt, was in verschiedenen Studien untersucht und belegt ist. So ist

marktwirtschaftlich ein besonderer Fokus auf die Entwicklung von Nahrungsergänzungsmitteln sowie Phytopharmaka mit Herz und Kreislauf – Wirkungen zu legen. Bei Funktional Food könnte eher auf Esswaren gesetzt werden, da der Getränkebereich bereits gesättigt erscheint.

3.1.6 Patentrechtliche Situation pflanzenphenolhaltiger Nahrungsergänzungsmittel

Aus YILMAZ und TOLEDO (2006) sind folgende Patente zu entnehmen:

MASQUELIER 1987: Masquelier, J. 1987, Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. US Patent 4698360

GOODMAN 2000 und 2001: Goodman D.W. 2000 und 2001, Treatment for blood cholesterol with trans-resveratrol. US Patent 6,022,901, US Patent 6211247

TOPPO 2000: Toppo F., Treatment for blood cholesterol with trans-resveratrol. US Patent 6048903

CARSON et al. 2001: Carson R.G., Patel K., Carlomusto M., Bosko C.A., Pillai S., Santhanam U., Weinkauff R.L., Iwata, K., Palanker L.R., Cosmetic compositions containing resveratrol, US Patent 6,270,780

RAY und BAGCHI 2001: Ray S.D. und Bagchi D., Prevention and treatment of acetaminophen toxicity with grape seed proanthocyanidin extract, US Patent 6245336

3.1.7 Rechtliche Situation von Nahrungsergänzungsmitteln und Functional Food

Rechtlich legt die Europäische Richtlinie 2002/46/EG in Art. 2 a) „Nahrungsergänzungsmittel“ als Lebensmittel fest, die dazu bestimmt sind, die normale Ernährung zu ergänzen und die aus Einfach- oder Mehrfachkonzentraten von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung bestehen und in dosierter Form in den Verkehr gebracht werden (Kapseln, Pastillen, Tabletten, Pillen, Pulverbeutel, Flüssigampullen). In Art. 2 b) sind Nährstoffe mit i) Vitaminen und ii) Mineralstoffen definiert, so dass SPS nicht namentlich aufgeführt sind und auch nicht unter den Begriff „sonstige Stoffe“ fallen. Somit greift die Verordnung (EG) Nr.258/97, die das Inverkehrbringen neuartiger Lebensmittel und neuartiger Lebensmittelzutaten regelt. Dabei fallen die SPS unter die im Art. 1 e) beschriebenen Lebensmittel und –zutaten, die aus Pflanzen bestehen oder aus ihnen isoliert wurden und Art. 1 f) Lebensmittel und –zutaten, bei deren Herstellung ein nicht übliches Verfahren angewendet worden ist und bei denen dieses Verfahren eine bedeutende Veränderung ihrer Zusammensetzung oder der Struktur bewirkt hat, was sich auf ihren Nährwert, ihren Stoffwechsel oder auf die Menge unerwünschter Stoffe im Lebensmittel auswirkt (also Reinigung, Aufkonzentrierung, Spaltung). Ausgenommen sind Lebensmittelzusatzstoffe, die technischen Zwecken dienen (RL 89/107/EWG), Aromastoffe (RL 88/388/EWG) und Extraktionslösemittel (RL 88/344/EWG), die den angeführten Gemeinschaftsvorschriften unterliegen. Das zuzulassende Erzeugnis ist zunächst einer Produktklassifizierung zu unterziehen, um festzulegen, ob es sich um ein Lebensmittel (VO (EG) 178/2002 Art.2 S.1) oder Arzneimittel (RL 2001/83/EG Art.1b No.2) handelt. Ist es kein Funktions- oder Präsentationsarzneimittel, ist es als Lebensmittel anzusehen. Dabei kommen in der Praxis der Rechtssprechung die Kriterien Dosierung („pharmakologische Wirkung“), Nährwerteigenschaften, Aufmachung und Auslobung, Auffassung der medizinischen Wissenschaft und Einstufung vergleichbarer Produkte in Betracht. Anschließend kann das Lebensmittel bzw. die Lebensmittelzutat gemäß der Vorschrift VO (EG) 258/97 nach positiven Bescheid der Kommission in Verkehr gebracht werden.

Funktionelle Lebensmittel sind ebenfalls Lebensmittel und bei Neuartigkeit nach der „Novel Food“-Verordnung EG 258/97 zuzulassen. Anzumerken ist, dass bioaktive Substanzen keine Lebensmittelzusatzstoffe nach Richtlinie 89/107/EWG sind.

Phytopharmaka wie Morphin, Atropin oder Digitoxin sind pflanzliche Arzneimittel aus pharmazeutisch bearbeiteten Zubereitungen von Arzneipflanzen, also keine Nahrungsergänzungsmittel, Diätetika, Lebensmittel und isolierte Einzelstoffe aus Pflanzenextrakten. Sie sind zuzulassen nach Richtlinie 2001/83/EG, AMG.

Die Abgrenzung zwischen Lebensmittel und Arzneimittel fällt gerade zwischen Nahrungsergänzungsmitteln und Arzneimitteln schwer, was sich einige Produzenten zu Nutze machen. Sie umgehen die aufwendige Zulassung von Arzneimitteln, indem sie ihr bioaktives Produkt als Nahrungsergänzungsmittel zulassen. Hier ist politischer Handlungsbedarf gegeben.

3.2 Allgemeines zu den ausgewählten Rohstoffen

Der Gesamtphenolgehalt in Weintrauben und Äpfeln wird mit 0,1% bis 1% angegeben. Er ist stark vom Reifegrad, der Sorte, dem Anbaugebiet und der Lage, dem Jahrgang und den Umwelteinflüssen (z. B. UV-Einstrahlung, Temperatur, Pilzbefall) beim Reifeprozess sowie der Obstverarbeitung und Lagerung abhängig (BERLITZ et al. 2001). Der weitaus überwiegende Teil der phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe ist in den Kernen und der Schale der Früchte enthalten, die bei der Saft bzw. Weinherstellung nur zu geringem Maße in das Lebensmittel extrahiert werden, so dass Trester als „Byproduct“ reich an Phenolen ist und daher eine gute Rohstoffquelle zur Gewinnung von SPS darstellt (LU und FOO 1999, AMICO et al. 2004, LAPORNIK et al. 2005, RUBERTO et al. 2007).

3.2.1 Weintraubentrester

Die im Ertrag befindlichen rund 43.000 ha Rebflächen werden von etwa 32.000 Winzern in 4 Weinbauregionen (Weinland Österreich, Steirerland, Wien, Bergland Österreich), die wiederum in 16 bzw. 19 Weinbaugebiete unterteilt sind, bewirtschaftet. Der größte Anteil entfällt mit über 91 % der Gesamtproduktion Österreichs auf das Weinland, welches Niederösterreich und das Burgenland umfasst (Abb. 30). Das Steirerland beinhaltet alle Anbaugebiete des Bundeslandes Steiermark, die Region Wien entsprechend alle Anbaugebiete in Wien. Das Bergland vereinigt die verbleibenden Bundesländer Niederösterreich, Salzburg, Tirol, Vorarlberg und Kärnten (Tab. 2).

Große Bedeutung haben die Weinbaugebiete der östlichen Bundesländer Niederösterreich, Burgenland, Steiermark und Wien und hier insbesondere 16 Weinbaugebiete, die mehr als 99% der Rebanbauflächen Österreichs stellen. Die sonstigen Anbaugebiete Niederösterreichs und der Steiermark sowie das Bergland Österreich ergeben die Weinbaugebiete (17) bis (19) und sind folglich mit weniger als 1 % Gesamtrebflächenanteil vertreten (Abb. 31, vgl. Tab. 2). Mit starken Schwankungen werden jährlich im Durchschnitt etwa 2,5 Mio hL Wein erzeugt, wovon ca. 65 % auf Weißweintrauben (Tendenz fallend) und 35 % auf Rotweintrauben (Tendenz steigend) entfallen (LEBENS MINISTERIUM 2005, GRÜNER BERICHT 2005). Bei den Weißweinen dominieren die Sorten Grüner Veltliner (ca. 36 %), Welschriesling (ca. 9 %), Müller Thurgau (ca. 7 %) und Weißburgunder (ca. 5 %), bei den Rotweinen die Sorten Zweigelt (ca. 9 %), Blaufränkisch (ca. 5 %) und Blauer Portugieser (ca. 5 %) (WEIN-1.NET 2006). Überschlüssig kann davon ausgegangen werden, dass 25 % (15 bis 30 %, WÜRDIG und WOLLER 1989) der Weinmenge an Trester mit etwa 25 - 35 % Trockensubstanz anfällt, so dass jährlich während der Erntezeit Ende August bis Mitte Oktober und bei Rotweinen nach der Maischegärung etwa 40.000 t Weißweintraubentrester und 22.000 t Rotweintraubentrester anfallen. Roseweine sind mit einem österreichischen Marktanteil von > 1 % im Jahr 2004 vernachlässigbar (DOCUMENTATION AUSTRIAN WINE 2004).

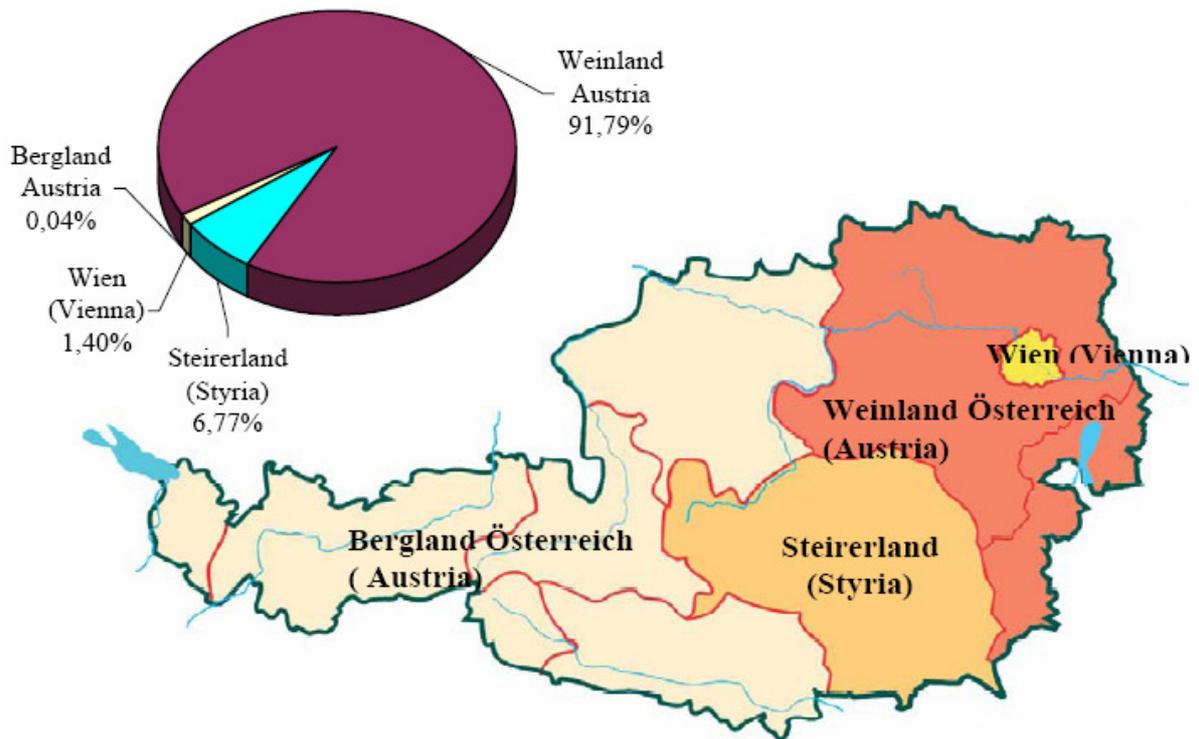


Abb. 30: Weinanbauregionen in Österreich mit Angaben der Rebflächenanteile aus dem Jahr 1999 (DOKUMENTATION ÖSTERREICHISCHER WEINE 2005)

Tab. 2: Zuordnung der Weinbaugebiete zu den Bundesländern und den Weinbauregionen

Weinbauregion	Bundesländer	Weinbaugebiete
1 Weinland Österreich	Niederösterreich (NÖ)	1 Wachau, 2 Kremstal, 3 Kamptal, 4 Traisental, 5 Donauland, 6 Weinviertel, 7 Carnuntum, 8 Thermenregion, (17) sonstige Gebiete in Niederösterreich
	Burgenland (Bgl)	9 Neusiedlersee, 10 Neusiedlersee-Hügelland, 11 Mittelburgenland, 12 Südburgenland
2 Wien	Wien (W)	13 Wien
3 Steirerland	Steiermark (Stmk)	14 Südoststeiermark, 15 Südsteiermark, 16 Weststeiermark, (18) sonstige Gebiete in der Steiermark
4 Bergland Österreich	Oberösterreich (OÖ), Salzburg (S), Kärnten (K), Tirol (T) und Vorarlberg (V)	(19) Bergland Österreich

Weißweine, Rotweine und Roseweine werden nach unterschiedlichen Verfahren hergestellt und weisen daher auch stark unterschiedliche Phenolgehalte auf. Weinherstellung ist eine Philosophie für sich, so dass gängige Verfahren in Abb. 32 dargestellt und folgend beschrieben sind. Rotlingweine, die aus einem Verschnitt an Weißweintrauben und Rotweintrauben hergestellt werden und Perlweine, die unter Kohlendruck stehen, zumeist künstlich durch ein Imprägnierungsverfahren zugesetzt (1,5 bis 2,5 bar bei 20 °C) sowie Schaumweine, die ebenfalls unter Kohlendruck stehen, jedoch aus einer zweiten Gärung (3,5 bis 6 bar bei 20 °C), sind hier wegen ihrer geringen Mengen vernachlässigbar. Nach der Annahme der Trauben steht noch am selben Tag der Lese als erster Schritt das Entrappen (Abbeeren) der Trauben von ihren Kähmen (Stielen, Rappen) und zumeist im gleichen Arbeitsschritt in einer Maschine das Mahlen der Trauben zu Weißwein- bzw. Rotweinmaische an. Hier trennen sich die Wege der Rotwein-, Rosewein- und Weißweinherstellung.

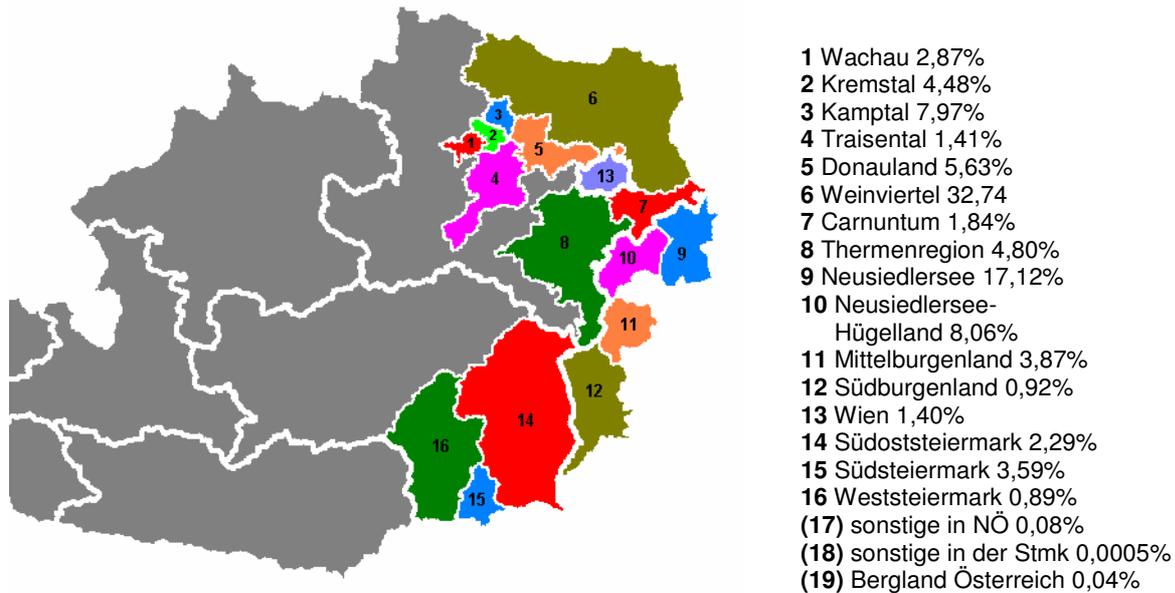


Abb. 31: Weinanbaugebiete Österreichs (WIKIPEDIA 2006) mit Angaben zu den Anteilen der gesamten österreichischen Rebanbauflächen im Jahr 1999 (DOCUMENTATION AUSTRIAN WINE 2004)

Weißweine (aus Weißweintrauben) und Roseweine (aus Rotweintrauben) werden nach dem Einmischen umgehend gekeltert, um Qualitätseinbußen durch Oxidationsprozesse und die Entwicklung schädlicher Mikroorganismen zu verhindern. Eine kurze Standzeit der Maische hat jedoch positive Auswirkungen auf die Pressfähigkeit der Trauben und das Traubenaroma, so dass gegebenenfalls 30 bis 50 mg/L SO₂ zugesetzt werden, um die unerwünschten Reaktionen zu unterbinden und die positiven Eigenschaften zu erhalten (max. 6 bis 8 h, bei 15 °C). Zum großtechnischen Kelttern haben sich Horizontalpressen durchgesetzt, so dass abhängig von der Traubensorte, dem Anbaugebiet, dem Reifegrad, dem Jahrgang und der Leistungsfähigkeit der Presse aus 100 kg Trauben 65 bis 80 L Traubensaft gewonnen werden. Der Trester weist dabei Trockensubstanzen von 25 bis 35 % auf und ist zur Phenolgewinnung umgehend weiter zu verarbeiten. Der gekelterte Presssaft wird vom Trub geklärt, bei Bedarf aufgrund mangelnder Reife und damit niedrigem Zuckergehalt mit Zucker (Saccharose) oder Traubensaftkonzentrat zur Erhöhung des späteren Alkoholgehaltes angereichert und gegebenenfalls chemisch entsäuert (z. B. CaCO₃). Bei schlechtem Traubenmaterial (faule Trauben) können mit Aktivkohle (50 bis 100 g/hL) unerwünschte Geschmacks- und Geruchsstoffe entfernt werden. Großtechnisch haben sich weitere Schritte etabliert, so dass der Most pasteurisiert und Reinzuchthefer für eine sichere Hauptgärung zugegeben wird.

Bei Rotweinen ist das Ziel Aromastoffe und die rotblauen Anthocyane aus der Schale zu extrahieren, wozu drei Verfahren zur Verfügung stehen. Zum einen wird die Maische mit den Feststoffanteilen (Schale, Kerne) in einer so genannten Maischegärung vergoren, so dass der entstehende Alkohol und das CO₂ sowie traubeneigene Enzyme und gegebenenfalls zusätzliche pektolytische Enzyme die Extraktion begünstigen. Nach der Gärung wird gekeltert, wobei Presswein und Trester anfallen. Bei der zweiten Methode wird gerade in jüngerer Zeit durch eine kurze (wenige Minuten) Maischeerwärmung auf 80 bis 85 °C die Farbstoffgewinnung verstärkt, was als so genannte Thermovinifikation bezeichnet wird. Weiter kann unter Zugabe von Pektinasen mit optimaler Enzymaktivität bei 50 °C die Extraktion in einem Verweiltank (3 bis 15 h) weiter verbessert werden. Anschließend wird gekeltert und der Presssaft der Gärung zugeführt. An diese Methode ist das automatisierbare Imeca-Stick-Verfahren angelehnt und vergleichend in Abb. 32 dargestellt. Als dritte Möglichkeit der Aroma- und Farbextraktion ist die Kohlendioxid-Mazeration („macération carbonique“ – Verfahren, Kohlensäurevermaischung) beschrieben, welches überwiegend im Midi-Gebiet (Südfrankreich) Anwendung findet und in Österreich keine

Bedeutung hat. Hierbei werden die möglichst intakten Trauben ohne sie zu entrappen oder einzumaischen mit Kohlendioxid überlagert, wodurch die Gärung und somit Ethanolbildung in Gang gesetzt wird, welches die Aromen und Farben extrahiert. Abschließend wird der Wein gekeltert.

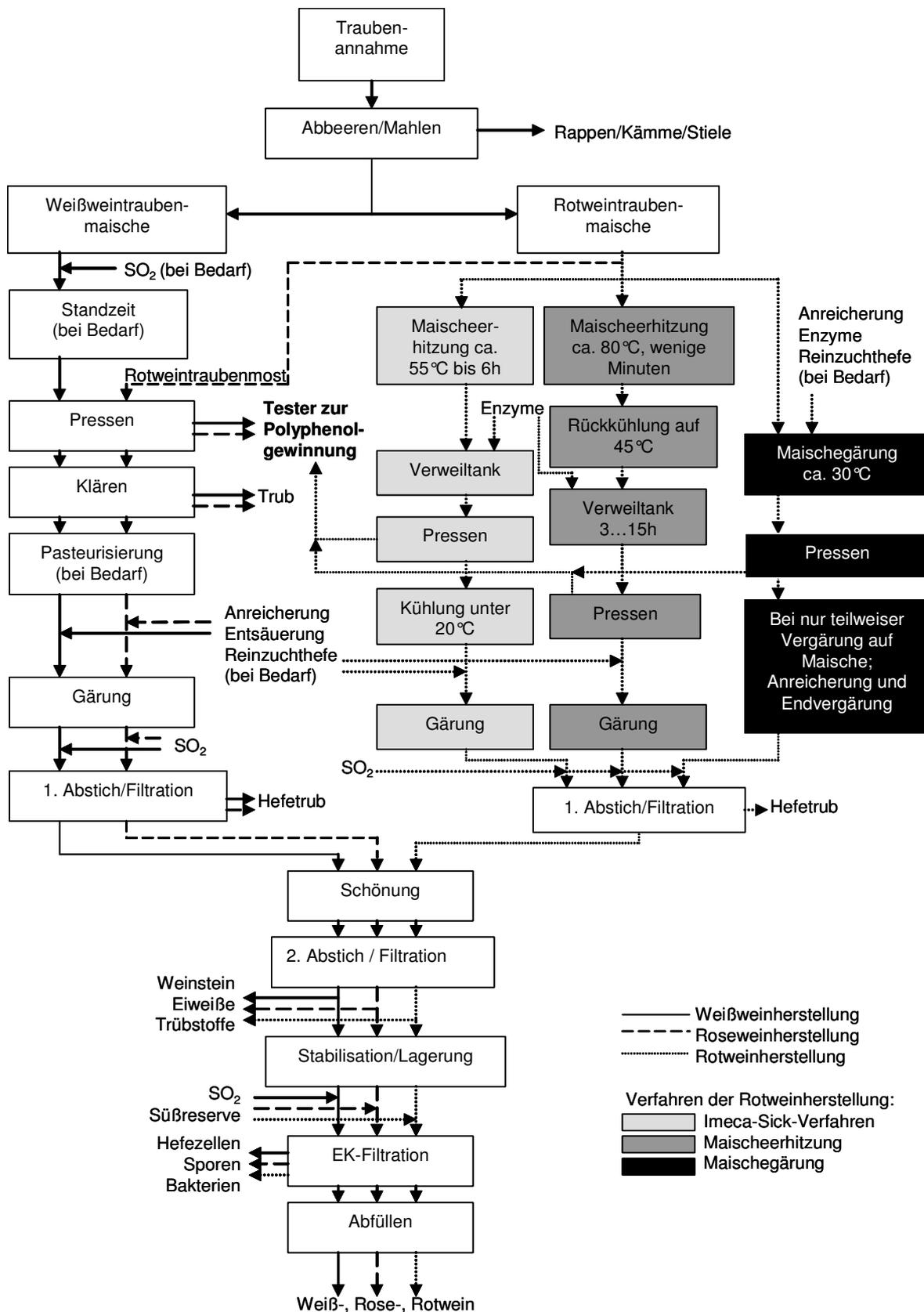


Abb. 32: Fließbild zur Weinherstellung (BELITZ et al. 2001, HEISS 2004)

Der Weinausbau, die Weinbehandlung und Stabilisierung verlaufen bei den Rot-, Rose- und Weißweinen prinzipiell wieder identisch. Nach etwa 4 bis 10 Tagen signalisiert die ausbleibende CO₂-Entwicklung das Ende der Gärung. Ist der Säuregehalt nach der Gärung zu hoch, so kann ein biologischer Säureabbau durch Milchsäurebakterien stattfinden, bei dem L-Apfelsäure (100 g) in L-Milchsäure (67 g) bei 20 °C und aufrühren des abgesetzten Hefetrubs vergärt wird (malolactische Gärung, zweite Gärung). Nach der statischen Klärung des Weins, bei dem der Hefetrub und andere Trubteilchen wie Eiweiß-, Pektin- Gerbstoffe, Tatrare und Zellfragmente (Weingeläger, Trub, Drusen) sedimentiert sind, wird der relativ klare Überstand abgetrennt, der so genannte erste Abstich. Zumeist folgt dem Abstich eine Klärung des Jungweins mittels Kieselgurfiltration oder Tellerseparator. Vor dem ersten Abstich, müssen die Weine zum Oxidationsschutz und gegebenenfalls, wenn Restsüße erwünscht ist, zum Abbruch der Gärung geschwefelt werden (30 bis 50 mg/L SO₂). Der anschließende Weinausbau beinhaltet die umfangreichen Möglichkeiten der Schönung, Kristallausscheidung und unter Umständen erforderliche Trübungs-beseitigung und endet etwa 6 bis 8 Wochen nach dem ersten Abstich mit dem zweiten Abstich und anschließender Filtration des Resttrubes. Es folgt die zumeist 3 bis 9 monatige Stabilisierung des Jungweines durch Lagerung in ausgekleideten Betonbehältern, Stahl-tanks oder Holzfässern, wobei ein spezifischer Weincharakter herausgearbeitet wird. Vor der Abfüllung in Flaschen, sind die Weine weiter mit schwefeliger Säure und gegebenenfalls L-Ascorbinsäure (selten Sorbinsäure) zu stabilisieren. Häufig wird durch mehrtägige Kühlung zusätzlich Weinstein auskristallisiert, was durch Zugabe an Kristallisationskeimen beschleunigt werden kann. Für süßere Weine wird unvergorener Most als so genannte Süßreserve zugegeben. Vor der sterilen Abfüllung in Flaschen ist der Wein nochmals zu filtrieren (EK-Filtration = Entkeimungsfiltration). In den Flaschen setzt sich die Reifung fort und erreicht durchschnittlich nach 5 bis 7 Jahren, bei edlen Weinen bis zu 12 Jahren, den Höhepunkt seiner Entwicklung (BERLITZ et al. 2001, HEISS 2004).

Durch die intensive Traubenextraktion der Rotweinherstellung finden sich in Rotweinen bis zu 10-mal höhere Phenolgehalte und damit auch sehr viel höhere antioxidative Kapazität (ORAC_{PE}), als in Rose- und Weißweinen (SANCHEZ-MORENO et al. 2003, SOLEAS et al. 1997). Dies lässt den Schluss zu, dass in dem Trester der Rose- und Weißweine die Polyphenole zum großen Teil noch enthalten sind und somit als Rohstoff zur Gewinnung sekundärer Pflanzenwirkstoffe besser geeignet sind. OKUDA und YOKOTSUKA (1996) berichten, dass nur 5 % des extrahierbaren Resveratrols aus den Traubenschalen in Weißweine (Riesling und Chardonnay) und bis zu 35,5 % in Rotweine (Cabernet Sauvignon, Muscat Bailey A) überführt werden. YILMAZ und TOLEDO (2006) bestätigen diese Tendenz mit der Untersuchung der antioxidativen Kapazität (ORAC_{PE}) verschiedener Extrakte aus Kernen und Schalen von Weißwein- (Chardonnay) und Rotweintrestern (Merlot). So ist die antioxidative Kapazität der Weißweintrester etwa doppelt so hoch, als die der Rotweintrester. Weiter ist anzumerken, dass in Kernen eine mehr als 5-mal so hohe antioxidative Kapazität festgestellt wurde als in den Schalen. Dies ist auf den hohen Gehalt an Catechinen, Epicatechinen und kondensierten Tanninen in den Kernen zurückzuführen, wobei die Schalen wiederum wesentlich höhere Quercetin-O-Glykosid-, Kämpferol-O-Glykosid- und Resveratrol-Gehalte aufweisen (KAMMERER et al. 2004). Die Korrelation zwischen Phenolgehalt und antioxidativer Kapazität stellten BORBALÁN et al. (2003) beim Vergleich von weißen und roten Trauben (kein Trester!) her. Weiters wurde festgestellt, dass in roten Trauben höhere Polyphenolgehalte (TPC mit der Folin-Ciocalteu-Methode) enthalten sind, als in weißen Trauben.

Außer dem Fehlen der Anthocyanidine in weißen Trauben, werden beiden Traubentrestern gute Aussichten als Byproducts zur Gewinnung von SPS bescheinigt (KAMMERER et al. 2004). Somit bleibt festzuhalten, dass Trauben ein Naturprodukt mit enormen Schwankungen ihrer Phenolgehalte, abhängig von unzähligen Einflussfaktoren, sind. Hinzu kommen die unterschiedlichsten Weinherstellungsverfahren, unterschiedliche Lagerung und Transport, die weiter Einfluss auf die Polyphenolgehalte haben. Als repräsentatives Beispiel der Schwankungsbreite sei KAMMERER et al. (2004) erwähnt, der den *trans*-Resveratrol-Gehalt in Cabernet Mitos des Jahrgangs 2001 mit 123,0 mg/kgTM und des

Jahrgangs 2002 nur mit 11,1 mg/kg_{TM} bestimmte. Ziel der Winzer ist ein stabiler und fehlerfreier Wein, bei dessen Herstellung wenig auf die Polyphenolgehalte in dem Byproduct Trester geachtet wird. Bei Rotweinen gar, konkurrieren die Interessen, zumindest was den Farbgehalt und die dafür ausschlaggebenden Anthocyanidine und Proanthocyanidine angeht. Es ist davon auszugehen, dass die Rotweinherstellung bezüglich der Extraktion weiter optimiert wird und damit der Polyphenolgehalt der Trester eher eine abnehmende Tendenz zeigen wird. Rote Trauben mit Herstellungsverfahren weißer Weine wären somit das Optimum für den Polyphenolgehalt der Trester, was auf Roseweine zutrifft. Diese haben mit etwa 1 % Marktanteil in Österreich jedoch nur eine untergeordnete Rolle und bieten zu geringe Trestermengen für das Betreiben einer großtechnischen Anlage. So scheint Weißweintrester mit ausreichenden Mengen von etwa 40.000 t/a Naßtrester und relativ hohen Polyphenolgehalten einen guten Rohstoff darzustellen, was allerdings analytisch im Vergleich mit Rotweintrester aus den hiesigen Regionen in dieser Arbeit noch zu belegen ist. Als Rohstoffe kommen die Trester aus der Herstellung der Weißweine Grüner Veltliner (ca. 36 % des Rebflächenanteils), Welschriesling (ca. 9 %), Müller Thurgau (ca. 7 %) und Weißburgunder (ca. 5 %) sowie der Rotweine Zweigelt (ca. 9 %), Blaufränkisch (ca. 5 %) und Blauer Portugieser (ca. 5 %) in Frage (DOCUMENTATION AUSTRIAN WINE 2004).

3.2.1.1 Aufbau der Weintraube

Weintrauben zählen gärtnerisch zum Beerenobst, botanisch ist ihre Zuordnung in Abb. 36 dargestellt. Anzumerken ist, dass die Zuordnung nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen kann und des weiteren die Kenntnisse in verschiedenen Gruppen (Taxa) noch nicht ausreichend sind, so dass ein allgemein akzeptiertes System dieser gesamten Taxonomie noch nicht gefunden ist und damit unterschiedliche Einteilungen existieren.

Die Möglichkeit von DNA-Tests erweiterte in den letzten 20 Jahren die Zuordnung nach genetisch verwandtschaftlichen Gesichtspunkten. Die hier gezeigte Taxonomie stützt sich auf die Ausführungen von STRASBURGER (1998) und BLAICH (2000). Weintrauben gehören der Ordnung der *Vitales* an und hier der Familie der Rebengewächse (*Vitaceae*). Zwei Gattungen der *Vitaceae* kommen für Weinreben in Frage, *Vitis* und *Muscadinia*. Die Gattung der *Muscadinia* umfasst 3 Arten, die vorwiegend in Amerika vorkommen und *Vitis* umfasst etwa 80 Arten. In Europa ist die Art *Vitis vinifera* und im speziellen die „kultivierte, edle Weinrebe“ *Vitis vinifera ssp. sativa* vorherrschend (Abstammung von der Wildrebe *Vitis vinifera ssp. silvestris*), von der auch die Sorten unserer Weine stammen. Etwa 10.000 Sorten sind z. Z. bekannt, wobei durch Kreuzung und Züchtung deren Zahl stetig wächst.

Nach ihrem Aufbau sind Weinreben Rispen (*Panicula*). Sie sind ein Fruchtstand und gliedern sich in die Beeren und ihr stark verzweigtes Stielgerüst (Rappen, Kämmen). Abhängig von der Rebsorte haben die Kämmen bei reifen Weintrauben einen Gewichtsanteil von 3 bis 7 %. Die Gewichtsanteile der Beeren können grob in das Fruchtfleisch mit 70 bis 85 %, in die Beerenhülsen (Schale, Haut) mit 15 bis 28 % und in die Kerne mit 2,5 bis 6 % aufgeteilt werden. Der Aufbau einer Traube ist in Abb. 34 gezeigt und lässt sich grob in drei Teile, dem Perikarp mit Beerenhaut und Fruchtfleisch, dem Samen und dem Gefäßbündel gliedern. Das lockere, saftige Beerenfleisch ist umschlossen von einer dünnen, elastischen Haut, dem Epicarp (Beerenhülse). Im Innern, in der Nähe des Stiels, befinden sich die von Zentralgefäßen versorgten 2 bis 4 Kerne (Samen, tanninreich 4 bis 5 %). Das Fruchtwesen im Bereich des Stielansatzes und der Kerne wird als „Butzen“ bezeichnet. Das Fruchtfleisch besteht aus großlumigen Zellen in deren Vakuolen der größte Teil der Flüssigkeit gespeichert ist, die beim Pressen als Most abgegeben wird. Rebsorten der Art *Vitis vinifera* haben nahezu farbloses Fruchtfleisch (leicht gelbliches), da sich die Farbstoffe in der Schale befinden. Die äußerste Zellschicht der Traube bilden die Epidermiszellen, auf denen die lipophile Kutikula der Weinbeeren aufliegt. Die Cuticula besteht aus einer Cutinmembran, die in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist und mit einem Wachs, dem Reif der Weinbeere,

überzogen ist. Unterhalb der Epidermis liegen die Hypodermiszellen, die ohne deutliche Grenzschicht in die des Fruchtfleischs übergehen (WÜRIG und WOLLER 1989).

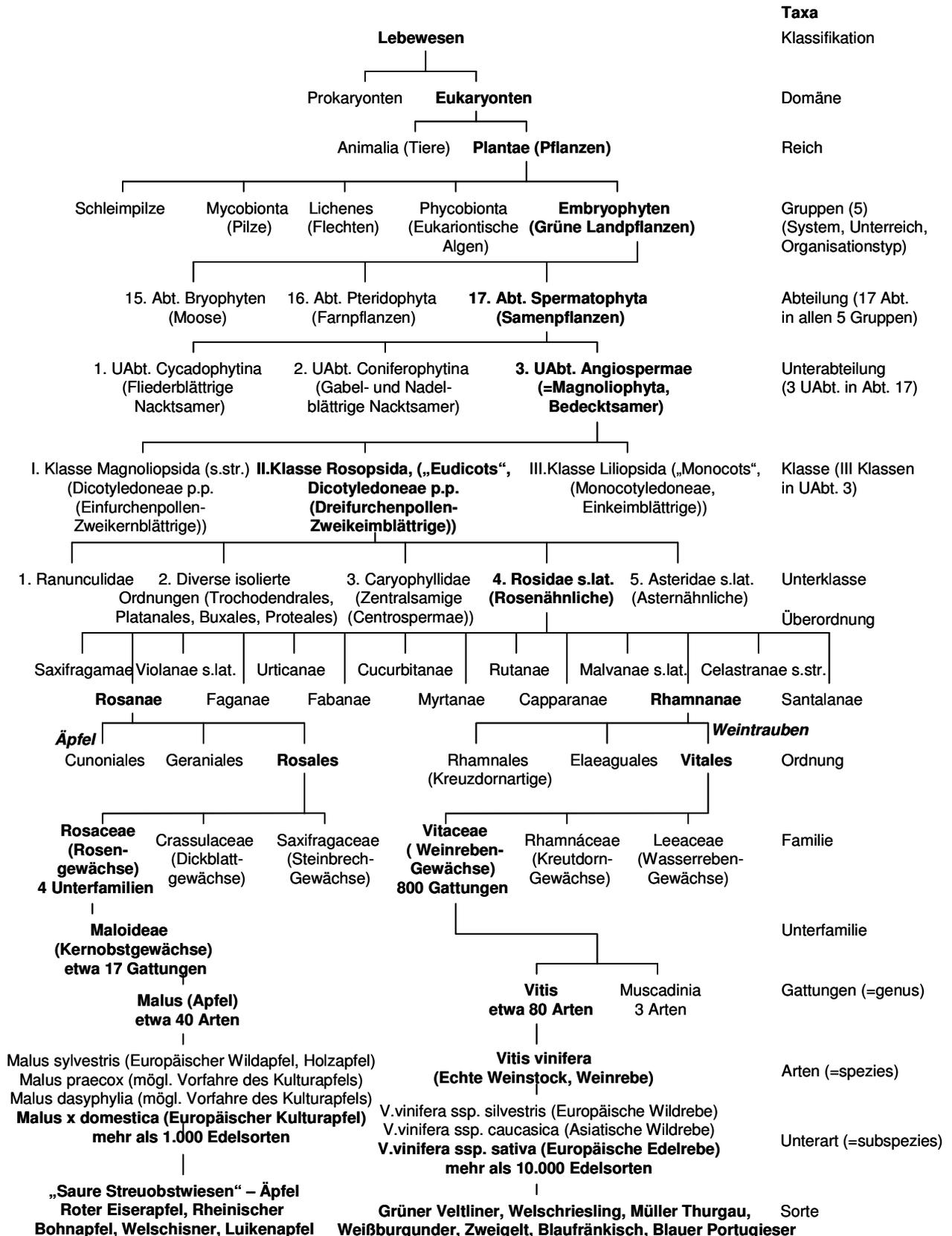


Abb. 33: Botanische Klassifizierung der Weintrauben und Äpfel (STRASBURGER 1998, BLAICH 2000)

Der Aufbau einer Traube ist in Abb. 34 dargestellt. Der Samen ist ummantelt von dem Perikarp (Fruchtwand), welches drei Schichten umfasst, das Endokarp (Kerne), das Mesokarp (Fruchtfleisch) und das Exokarp (Beerenhaut). Versorgt wird die Frucht über Gefäßbündel, ausgehend von dem Stielansatz und dem Butzen. In Abb. 35 ist ein Querschnitt einer Traubenhaut unter dem Lichtmikroskop gezeigt.

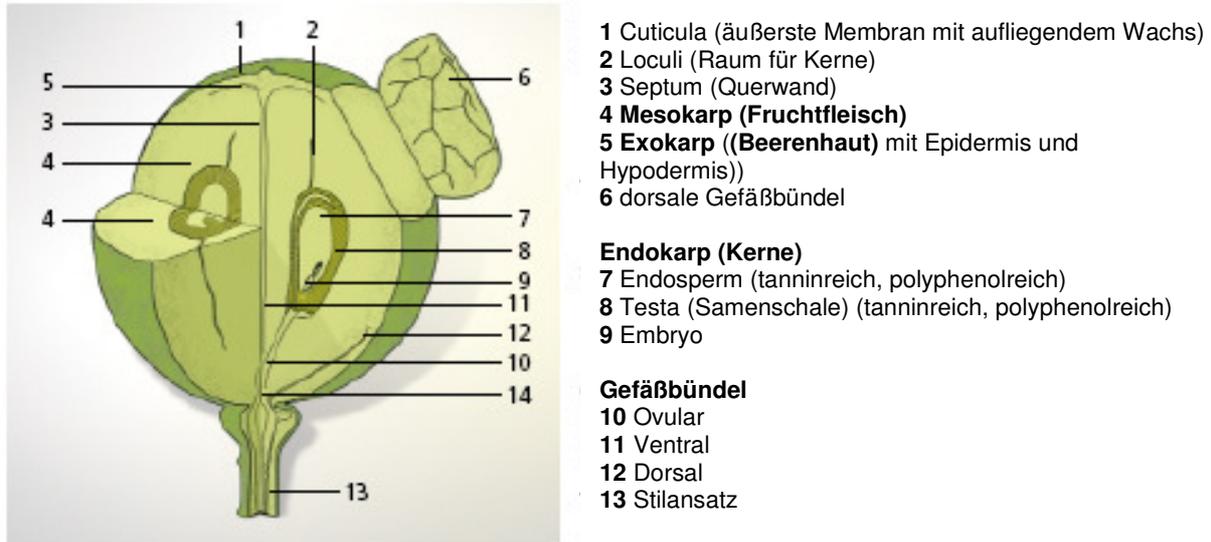


Abb. 34: Aufbau einer Weintraube mit Zuordnung wichtiger phytotomischer Bestandteile (WESTFALIA SEPARATOR 2006)

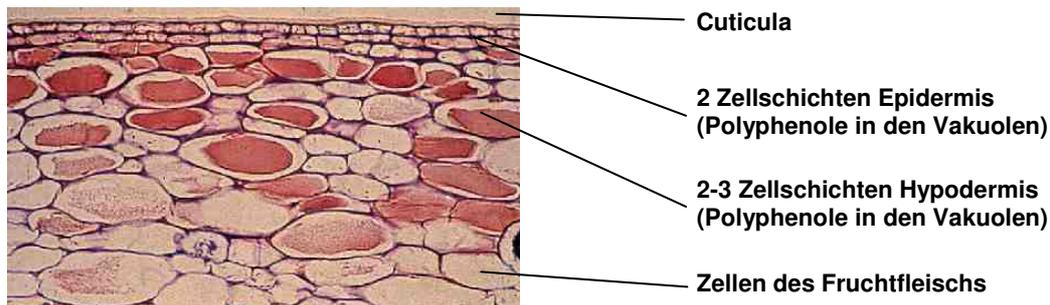
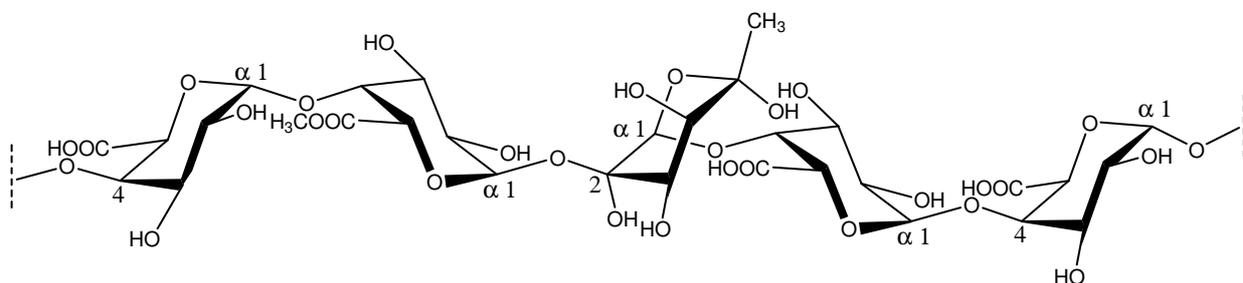


Abb. 35: Dünnschnitt einer Weintraubenbeerenhaut im Lichtmikroskop (UNI HOHENHEIM 2006)

Wie bereits angeführt, befindet sich der größte Teil der Polyphenole in der Beerenhaut und den Kernen. Flavonoide, insbesondere Anthocyane und Flavonole sind vornehmlich in den Vakuolen der Epidermis- und Hypodermiszellen der Beerenhaut anzutreffen (HESFORD und RUFFNER 2000, NEGRO et al. 2003), wohingegen Tannine und deren Ausgangsstoffe, die Flavanole Catechine und Epicatechine überwiegend in der Testa und dem fettreichen Endosperm der Kerne zu lokalisieren sind (WÜRIG und WOLLER 1989, YILMAZ und TOLEDO 2004, GUENDEZ et al. 2005).

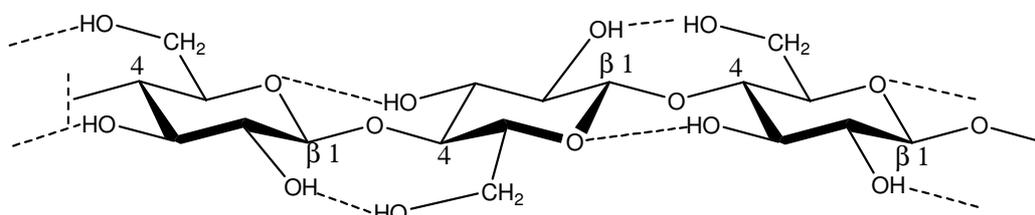
Chemisch betrachtet sind die primären Zellwände höherer Pflanzen mit extrazellulären Strukturpolysacchariden, wie Cellulose, Hemicellulosen, Pektinstoffen und darüber hinaus mit Wandproteinen aufgebaut. Ihre mechanische Festigkeit ist gering, es handelt sich bei der Zellwandmatrix um eine leicht quellbare, isotrope Gallerte von komplexer Zusammensetzung. Pektinstoffe zählen zu den Heteropolysacchariden, da neben der Galacturonsäure (genauer: Galacturonane und Rhamnogalacturonane), die zumeist unter $\alpha(1\rightarrow4)$ -Verknüpfung als so genannte Protopektine miteinander kurzketzig polymerisiert sind, auch Neutralzucker, wie Arabinane, Galactane, Arabinogalactane in Seitenketten kovalent gebunden beteiligt sein können. Ein Teil der Carboxylgruppen sind dabei mit Methylalkoholen verestert (Abb. 36). Die einzelnen Molekülketten werden durch zweiwertige

Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) verbunden. Protopektine sind leicht wasserlöslich (hydrophil), haben ein großes Quellungsvermögen, sind durch ihre dissoziierten Säuren stark negativ geladen und somit wirksame Kationenaustauscher. Hemicellulosen sind weniger hydrophil und besitzen im Allgemeinen größere Moleküle und sind aus verschiedenen Zuckern aufgebaut. Hauptvertreter sind Glucane mit $\beta(1\rightarrow3)$ - und $\beta(1\rightarrow4)$ -Verknüpfungen sowie Xyloglucane, die aus $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpften Glucose-Einheiten bestehen, von denen die meisten $\alpha(1\rightarrow6)$ -gebundene Xyloseketten tragen. Sie können zusätzlich funktionelle Gruppen tragen und Verzweigungen in ihrer Struktur aufweisen. Sie verleihen den Zellwänden Festigkeit und füllen die Räume zwischen den Cellulosefibrillen. Pektinstoffe und Hemicellulosen bilden die Mittellamellen benachbarter Pflanzenzellen, die keine Cellulosefibrillen aufweisen und daher relativ instabil sind. Das Zellwandgerüst bilden die linearen Moleküle der Cellulose mit Polymerisierungsgraden von 2.000 bis 15.000 β -Glucose-Einheiten, die sich längs zueinander über Wasserstoffbrückenbindungen zu Elementarfibrillen und – besonders in Sekundärwänden - schließlich zu dickeren Mikrofibrillen zusammenschließen (Abb. 37). Cellulose ist wasserunlöslich und von körpereigenen Enzymen des menschlichen Intestinaltraktes nicht angreifbar und bildet mit den Pektinstoffen, Hemicellulose und Lignin die so genannten inerten Polysaccharide, die jedoch als Ballaststoffe die Darmperistaltik anregen. Hauptproteine der Zellwand sind Glykoproteine mit ungewöhnlich hohem Anteil an hydroxylierten Prolin (Prolin = proteinogene Aminosäure mit sekundärer Aminogruppe), daher auch die Bezeichnung hydroxyprolinreiche Glykoproteine (HPRG). Man vermutet einen Zusammenhang mit dem Zellwachstum unter Auxineinfluss (Auxin ist ein Pflanzenwachstumshormon). Die sekundären Zellwände können zur Stabilisierung durch Faser- und Holzzellen (Lignin) dienen und isolierende Membranen darstellen. Letzteres trifft mit der lipophilen Cutinmembran mit ihrem hydrophoben epicuticularen Wachs auf die Traubenbeerenhaut zu, die direkt auf den Primärzellwänden der Epidermis sitzt. Die Zellen der Kerne hingegen verholzen, so dass eine schützende, stabile Samenschale (Testa) resultiert (STRASBURGER 1998).



Rhamnogalacturonan, mit teilmethylierter Säure mit $\alpha(1\rightarrow4)$ -Verknüpfung der Galacturonsäuren und „Knick“ (backbone) durch eingebaute Rhamnose

Abb. 36: Beispiel eines Strukturausschnitts eines Pektinstoffs (WIKIPEDIA 2006b)



Cellulosestruktur mit linearer $\beta(1\rightarrow4)$ -Glucankette (zum Teil auch für Hemicellulosen zutreffend, die jedoch kurzketziger sind und weitere Zucker und Verzweigungen aufweisen)

Abb. 37: Ausschnitt der Struktur eines Cellulosemoleküls (STRASBURGER 1998, BELITZ et al. 2001)

Um effizient an die in den Vakuolen eingeschlossenen Polyphenole der Beerenhaut und der Traubenkerne zu gelangen, ist demnach ein mechanischer, thermischer, chemischer oder enzymatischer Aufschluss der Zellwände erforderlich.

3.2.1.2 Inhaltsstoffe der Weintrauben

Die drei Hauptbestandteile der Weintraubenbeeren sind Wasser (70 – 85 %), Zucker (12 – 27 %) und Säuren (0,5 – 1,8 %). Des weiteren sind Alkohole, Stickstoffverbindungen, Mineralstoffe, Polyphenole, Strukturpolysaccharide (Pektine, Cellulose, Hemicellulose), Mineralstoffe, Stickstoffverbindungen (Ammonium und Nitrate, Aminosäuren, Eiweißstoffe, Enzyme), Öle, Fette, Wachse, Aromastoffe, Vitamine und Wuchsstoffe enthalten (Tab. 3 bis 7) (WÜRDIG und WOLLER 1989).

Tab. 3: Hauptkomponenten von Weintrauben

Hauptkomponenten	Anteil [%]
Wasser	70 - 85
Zucker (vorwiegend Glucose, Fructose, Arabinose, Rhamnose und Xylose)	12 -27
Säuren (vorwiegend Weinsäure und Apfelsäure), pH-Wert liegt bei 2,9 - 3,5	0,5 - 1,8
Mineralstoffe	0,2 - 0,5
Strukturpolysaccharide (Cellulose, Hemicellulose, Pektinstoffe)	0,06 - 0,5
Stickstoff-Verbindungen	bis 0,06
Öle (in den Kernen), Fette, Wachse	etwa 0,5
Polyphenole	0,1 - 1

Wasser ist in allen Organismen, also auch in Weintraubenbeeren maßgeblich vorhanden und für das Leben unabdingbar. Die asymmetrische Ladungsverteilung des Wassermoleküls bewirkt ein Dipolmoment, welches für die Wechselwirkungen unter den Wassermolekülen selbst und den darin gelösten Stoffen verantwortlich ist, im Besonderen mit anderen polaren und geladenen Teilchen. Der überwiegende Teil des Wassers ist in den Vakuolen der Fruchtfleischzellen enthalten und wird bei der Weinherstellung abgepresst. Der Trockensubstanzgehalt von Trestern liegt bei 30 bis 40 %, je nach Presstechnologie und Rohstoff. Die verbleibenden 60 – 70 % sind Wasser und bei Rotweinstrestern nach der Maischegärung auch Alkohole.

Der Zuckergehalt ist im Fruchtfleisch ungleichmäßig verteilt und nimmt nach außen hin zu. Glucose / Fructose - Verhältnis ca. 1:1, außer bei Pilzbefall mit *Botrytis*, der Glucose bevorzugt. Arabinose, Rhamnose und Xylose sind Bestandteile der Zellwände und werden durch hydrolytisch wirksame Enzyme aus den polymeren Substanzen freigesetzt. Saccharose wird schnell durch traubeneigene Enzyme zu Glucose und Fructose hydrolysiert, so dass nur geringe Mengen in Mosten, Weinen und Tresterextrakten anzutreffen sind.

Säuren sind neben Wasser und Zucker die dritte Hauptkomponente in Trauben. Der Säuregehalt ist im Fruchtfleisch ungleichmäßig verteilt und nimmt nach außen hin ab. Apfelsäure (Malat), Weinsäure (Tatrat) und die vom Pektinabbau stammende Galakturonsäure stellen mengenmäßig den größten Anteil. Aus dem Citratzyklus stammen kleine Mengen Citrat, Fumarat und Succinat, weiter sind die Phenolcarbonsäuren des Shikimat-Synthese-Weges sehr zahlreich und ebenfalls nur in geringen Mengen anzutreffen. Die Phenolcarbonsäuren leisten einen großen Beitrag zur antioxidativen Kapazität des Mosts, Weins und Trester-Extrakts und sind unter Kapitel 3.1.3 chemisch beschrieben. In Weinen und somit auch deren Byproducts anzutreffen, sind vor allem die Hydroxybenzoesäuren *p*-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure, Gallussäure, Syringasäure und Gentisinsäure, wobei viele verestert (Ethyl- und Methyl-) und O-glycolisiert, also nicht frei vorkommen und die Hydroxymethylsäuren *p*-Cumarinsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure, Coumarsäure, Caftarsäure, Fertarsäure und ebenfalls deren Derivate (MONAGAS et al. 2005, BADERSCHNEIDER 2000, BADERSCHNEIDER und WINTERHALTER 2001) (Tab. 4). Essigsäure und Milchsäure sind Stoffwechselprodukte von ihren gleichnamigen Bakterien (Essigsäurebakterien,

Milchsäurebakterien). Bei *Botrytis cinerea* Infektion ergibt sich ein wesentlich komplexeres Säurespektrum (Galacturonsäure, Schleimsäure). Bei Weinen wird der Gesamtsäuregehalt in (titrierbare H_3O^+ -Ionen) Weinsäure-Äquivalenten [g/L] angegeben.

Alkohole kommen bereits schon in den Trauben vor und werden zu dem durch Hefen und Pilze nachträglich in dem Most, der Maische und dem Trester gebildet. Zunächst wird Methanol mit 40 – 200 mg/L in Most angegeben. Er ist ein Produkt der Aktivität von Pektinmethylesterase, die aus dem methanolveresterten Traubenpektin durch Hydrolyse freigesetzt wird. Das Enzym wird erst nach dem Traubenmahlen aktiv, so dass Methanol kein ursprünglicher Alkohol der Trauben ist. Gleiches gilt für Ethanol, das ausschließlich von Hefen stammt, die sich schnell auf verletzten Trauben ausbreiten. Weiter kommen auch andere vom Hefestoffwechsel synthetisierten Alkohole, wie Propanol, 2-Methylpropanol, 2- bzw. 3-Methylbutanol in geringen Mengen vor. Auch werden Spuren von Glycerin in Mosten gefunden, welches ebenfalls durch Pilze und Hefen produziert wird. Der Glycingehalt kann ganz besonders bei Trockenbeeren, Beeren mit starkem *Botrytis*-Bewuchs und bei edelfaulen Mosten bis zu 21 g/L ansteigen. Inositol sind in Pflanzen weit verbreitet, sind chemisch ein Hexahydroxyhexan und mit den Zuckeralkoholen (Mannit, Sorbit) verwandt. Myo-Inositol wird zur Gruppe der B-Vitamine gezählt und ist in Pflanzen speziell als Hexaphosphorsäureester (Phytinsäure) als Phosphorspeicher wichtig. Für Hefen stellt Myo-Inositol ein essentieller Wachstumsstoff dar. Zuckeralkohole (Alditole, durch Reduktion der korrespondierenden Aldosen und Ketosen) wie Erythrit, Xylit, Arabitol, Sorbit und Mannit sind wieder Stoffwechselprodukte aus dem schwer zu vermeidenden Befall von *Botrytis* und der damit stets verbundenen Infektion mit Hefen der Gattungen *Kloeckera*, *Metschnikowia* und *Candida*, die weiter zum Alditolspektrum der Moste, Weine und letztlich auch Trester beitragen.

Wie in allen Pflanzenteilen, sind Stickstoffverbindungen auch in den Traubenbeeren enthalten, wobei sie in den verschiedenen Zellschichten nicht gleichmäßig verteilt sind. Der Stickstoffgehalt (nach Kjeldahl) bewegt sich in Mosten und Traubensäften zwischen 0,2 und 0,8 g/L. Der Ammoniumgehalt korreliert bei der Reifung und Fäulnis mit dem Säuregehalt. Nitrat ist in höheren Pflanzen zumeist der Ausgangsstoff für den gesamten Stickstoff- und Eiweißstoffwechsel, wobei Aminosäuren zwischen 60 – 90 % des in Trauben vorkommenden Stickstoffs beinhalten. Sie spielen als amphotere Moleküle (alkalische $-\text{NH}_2$ und saure $-\text{COOH}$ Gruppe, Stichwort: isoelektrischer Punkt, wenn der pH-Wert erreicht ist, bei dem das Molekül neutral erscheint) eine wichtige Rolle als Speicherstoffe und Rohstoffe für Pflanzenproteine. Eiweißstoffe (Proteine) gehören zu den lebensnotwendigen Baustoffen aller pflanzlichen und tierischen Zellen. Der Stickstoffgehalt der Proteine liegt bei etwa 15 bis 18 %. Da die Eiweißstoffe aus Aminosäuren aufgebaut sind, haben diese ebenfalls amphotere Eigenschaften und weisen einen isoelektrischen Punkt auf, bei dem das Makromolekül seine Ladung verliert und ausflockt. Mehr als 100 Aminosäurereste, die über Peptidverbindungen polymerisiert sind, werden als Proteine bezeichnet, wobei mit Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen Molekulargewichte von mehreren 10.000 g/mol (10 kDa) erreicht werden (Beispiel Hämoglobin 64 kDa). Weiter können die Eiweißstoffe außer den Aminosäuren auch andere Gruppen tragen (prothetische Gruppen), so dass sie dann als zusammengesetzte Eiweißkörper oder Proteiden bezeichnet werden. Ebenfalls Eiweißstoffe sind Enzyme, die nahezu ausnahmslos an allen Auf- und Abbaureaktionen der Pflanze katalytisch steuernd beteiligt sind. Sie lassen sich untergliedern in Enzyme mit Protein-Natur wie z. B. Amylasen, Pepsin, Trypsin und Enzyme mit Proteid-Natur, die einen Proteinteil, das so genannte Apoenzym, und eine prothetische (wirksame) Gruppe besitzen, das so genannte Coenzym. Die prothetischen Gruppen wiederum, lassen sich chemisch einteilen in Gruppen mit Metallen, wie Cu, Fe, Mg, zu denen Peroxydasen, Phosphatasen und Phenoloxidasen zählen und organische Gruppen, die vielfach Abkömmlinge von Vitaminen sind. Zu diesen Coenzymen zählen NAD (Nicotinamid-adenin-dinucleotid), FAD (Flavin-adenin-dinucleotid) und PAL (Pyridoxalphosphat). Besondere Aufmerksamkeit gilt den Untergruppen der Oxidasen und hier speziell der bereits genannten Phenoloxidasen (PO) und der Polyphenoloxidasen (PPO), die den zu gewinnenden Wertstoff abbauen und somit zu deaktivieren sind. Jede Veränderung der spezifischen Eiweißstruktur verursacht

eine Inaktivierung. Dazu zählen die Temperaturempfindlichkeit, Reaktionen auf pH-Veränderungen, Gerbstoffe und andere Verbindungen (Schwermetallsalze, Alkohol, Trichloressigsäure. Andererseits helfen gezielt eingesetzte Enzyme beim Abbau der Zellwände, so dass die Polyphenole freigesetzt werden.

Mineralstoffe werden von der Pflanze über den Boden aufgenommen. Die Menge hängt dabei u. a. von der Witterung, der Bodenart, der Düngung, der Rebsorte und dem Reifegrad ab. Einerseits sind Mineralstoffe direkt Bausteine lebenswichtiger organischer Moleküle (Eiweiß, Enzyme), andererseits wirken sie aufgrund ihrer elektrischen Ladung auf den Kolloidzustand wichtiger Plasmabestandteile. Die Mineralstoffe beinhalten vor allem Hauptelemente (Mengenelemente) (K, Ca, Mg, Na) und daneben Spurenelemente (Rb, Cs, Cr, Fe, Co, Zn, Sb, Sc, Ag, Eu, Hf, Ce, Br, Au, La, Tb, Sr, V, Mn) und kommen überwiegend als Salze oder gelöst als Ionen vor (WÜRDIG und WOLLER 1989).

Die Strukturen und Biosynthese der Polyphenole, inklusive der Phenolcarbonsäuren, wurden unter Kapitel 3.1.3 und 3.1.4 ausführlich dargestellt. Eine aktuelle Zusammenfassung der in Wein vorkommenden Polyphenole haben MONAGAS et al. (2005) erarbeitet. Hierin sind die Hauptpolyphenole Phenolcarbonsäuren, Flavonoide, inklusive ihrer kondensierten Tannine, und Stilbene berücksichtigt. Übergangsverbindungen und Nebenprodukte, wie phenolische Ketone und Phenylpropane, spielen eine untergeordnete Rolle, Ausnahme ist das Phenylpropan Tyrosol, welches in erheblichen Mengen vorkommt (2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol, $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, Molmasse 138,16 g/mol.). Xanthone und Chinone konnten bisher noch nicht identifiziert werden. In Tab. 4 bis 6 sind die relevanten Polyphenole kurz dargestellt, wobei quantitativ wegen der enormen Schwankungsbreiten keine Aussagen getroffen werden können.

Tab. 4: Phenolcarbonsäuren in Weinen (MONAGAS et al. 2005)

Bezeichnung		Summenformel	Molgewicht [g/mol]
Hydroxybenzoesäuren	<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOH}$	138,12
	Protocatechusäure	$(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COOH}$	154,12
	Vanillinsäure	$\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{COOH}$	168,15
	Gallussäure	$(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COOH}$	170,12
	Syringasäure	$\text{HOC}_6\text{H}_2(\text{OCH}_3)_2\text{COOH}$	198,17
	Gentisinsäure	$(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COOH}$	154,12
	viele weitere Derivate	-	166 – 330
Hydroxyzimtsäuren	Kaffeensäure	$(\text{OH})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}=\text{CHCOOH}$	180,16
	<i>p</i> -Cumarinsäure	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCOOH}$	164,16
	Ferulasäure	$\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCOOH}$	194,18
	Caftarinsäure	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_9$	312,24
	Coutarsäure	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_8$	296,24
	Fertarsäure	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_9$	326,27
	Sinapinsäure	$\text{HOC}_6\text{H}_2(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCOOH}$	224,21
	viele weitere Derivate	-	192 – 386

In Pflanzen konnten bisher etwa 100 Flavone identifiziert werden, wobei in Weinreben der Spezies *Vitis vinifera* lediglich zwei Flavone mit jeweils einem Glykosid in den Rebenblättern identifiziert wurden. In den Vakuolen der Epidermis hingegen, wurden vier gelbe Haupt-Flavonole lokalisiert, die mit unterschiedlichen Zuckern 3-O-glykolisiert sein können. So sind acht Monoglykoside und vier Diglykoside in den Traubenschalen und Blättern charakterisiert. Die Aglykone treten zumeist nach der Traubenverarbeitung durch Hydrolyse auf.

Tab. 5: Flavonoide in *Vitis vinifera* (MONAGAS et al. 2005)

Bezeichnung		Summenformel	Molgewicht [g/mol]
Flavone	Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	270,23
	Apigenin-7-O-glucosid	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432,38
	Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	286,23
	Luteolin-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,38
Flavonole	Kämpferol	$C_{15}H_{10}O_6$	286,23
	Kämpferol-3-O-glucosid	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,38
	Kämpferol-3-O-galactosid	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,38
	Kämpferol-3-O-glucuronid	$C_{21}H_{19}O_{12}$	463,40
	Kämpferol-3-O-glucosylarabinoid	$C_{26}H_{28}O_{15}$	580,54
	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302,24
	Quercetin-3-O-glucosid	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464,10
	Quercetin-3-O-glucuronid	$C_{21}H_{18}O_{13}$	478,09
	Quercetin-3-O-glucosylgalactosid	$C_{27}H_{30}O_{17}$	626,57
	Quercetin-3-O-glucosylxylosid	$C_{26}H_{28}O_{16}$	596,54
	Quercetin-3-O-rhamnoglucosid (Rutin)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610,52
	Myricetin	$C_{15}H_{10}O_8$	318,24
	Myricetin-3-O-glucosid	$C_{21}H_{20}O_{13}$	480,41
	Myricetin-3-O-glucuronid	$C_{21}H_{18}O_{14}$	494,08
	Isorhamnetin (3-Methylquercetin)	$C_{16}H_{12}O_7$	316,06
Isorhamnetin-3-O-glucosid	$C_{22}H_{22}O_{12}$	478,44	
Flavanonole	2,3-Dihydrokämpferol (Aromadendrin)	$C_{15}H_{12}O_6$	288,06
	2,3-Dihydrokämpferol-3-O-rhamnose	$C_{21}H_{22}O_{10}$	434,43
	2,3-Dihydrokämpferol-3-O-glucosid	$C_{21}H_{22}O_{11}$	450,43
	2,3-Dihydroquercetin (Taxifolin)	$C_{15}H_{12}O_7$	304,06
	2,3-Dihydroquercetin-3-O-rhamnose	$C_{21}H_{22}O_{11}$	450,43
	2,3-Dihydroquercetin-3-O-glucosid	$C_{21}H_{22}O_{12}$	466,43
	2,3-Dihydroquercetin-3'-O-glucosid	$C_{21}H_{22}O_{12}$	466,43
	2,3-Dihydroquercetin-3-O-xylosid	$C_{20}H_{20}O_{11}$	436,40
	2,3-Dihydromyricetin-3-O-rhamnose	$C_{21}H_{22}O_{12}$	466,43
Anthocyanidine	Cyanidin	$C_{15}H_{11}O_6$	287,26
	Cyanidin-3-O-glucosid	$C_{21}H_{21}O_{11}$	449,42
	Cyanidin-3-O-acetylmonoglucosid	$C_{23}H_{23}O_{12}$	491,46
	Cyanidin-3-O- <i>p</i> -cumaroylmonoglucosid	$C_{30}H_{27}O_{13}$	595,57
	Delphinidin	$C_{15}H_{11}O_7$	303,05
	Delphinidin-3-O-glucosid (Mirtillin)	$C_{21}H_{21}O_{12}$	465,10
	Delphinidin-3-O-acetylmonoglucosid	$C_{23}H_{23}O_{12}$	507,46
	Delphinidin-3-O- <i>p</i> -cumaroylmonoglucosid	$C_{30}H_{27}O_{14}$	611,57
Fortsetzung S. 47			

Bezeichnung		Summenformel	Molgewicht [g/mol]	
Fortsetzung Anthocyanidine	Peonidin	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301,29	
	Peonidin-3-O-glucosid	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463,12	
	Peonidin-3-O-acetylmonoglucosid	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₂	505,49	
	Peonidin-3-O- <i>p</i> -cumaroylmonoglucosid	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	609,58	
	Peonidin-3-O-caffeoylmonoglucosid	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	625,58	
	Petunidin	C ₁₆ H ₁₃ O ₇	317,06	
	Petunidin-3-O-glucosid	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479,12	
	Petunidin-3-O-acetylmonoglucosid	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃	521,49	
	Petunidin-3-O- <i>p</i> -cumaroylmonoglucosid	C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	625,60	
	Malvidin	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331,01	
	Malvidin-3-O-glucosid	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493,13	
	Malvidin-3-O-acetylmonoglucosid	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃	535,52	
	Malvidin-3-O- <i>p</i> -cumaroylmonoglucosid	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	639,63	
	Malvidin-3-O-caffeoylmonoglucosid	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₅	655,63	
	Flavan-3-ole	(+)-Catechin (kurz "Cat")	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,27
(+)-Catechin-3-O-gallat		C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,40	
(+)-Gallocatechin (kurz "Gcat")		C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,27	
(+)-Gallocatechin-3-O-gallat		C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,40	
(-)-Epicatechin (kurz "Ec")		C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,27	
(-)-Epicatechin-3-O-gallat		C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,38	
(-)-Epigallocatechin		C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,27	
Proanthocyanidine (aus- gesuchte)	Proanthocyanidine B1 (Ec-(4β→8)-Cat)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,56	
	Proanthocyanidine B2 (Ec-(4β→8)-Ec)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,56	
	Proanthocyanidine B3 (Cat-(4β→8)-Cat)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,56	
	Proanthocyanidine B4 (Cat-(4β→8)-Ec)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,56	
	Proanthocyanidine B5 (Ec-(4β→6)-Ec)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,56	
	Dimere mit Gallocatechin und Epicallocatechin	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃ oder 14	594 - 610,56	
	Proanthocyanidine C1 (Ec-(4β→8)-Ec-(4β→8)-Ec)	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,83	
	Proanthocyanidine C2 (Cat-(4β→8)-Cat-(4β→8)-Cat)	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,83	
	Proanthocyanidine T2 (Ec-(4β→8)-Ec-(4β→8)-Cat)	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,83	
	Proanthocyanidine T3 (Ec-(4β→8)-Ec-(4β→6)-Cat)	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	866,83	
	Trimere mit Gallocatechin und Epicallocatechin	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₉ bis 21	882 - 914,83	
	Ec-(4β→8)-Ec-(4β→8)-Ec-(4β→8)-Ec	C ₆₀ H ₅₄ O ₂₄	1159,14	
	Tetramere mit Gallocatechin und Epicallocatechin	C ₆₀ H ₅₄ O ₂₅ bis 28	1175 - 1223	
	Gallate	Proanthocyanidine B1 -3-O-gallat	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	730,67
		Proanthocyanidine B1 -3,3'-di-O-gallat	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₂	882,78
Proanthocyanidine C1 -3-O-gallat		C ₅₂ H ₄₂ O ₂₂	1018,94	
Proanthocyanidine C1 -3'',3'''-di-O-gallat		C ₆₂ H ₄₆ O ₂₆	1171,05	

Flavanonole kommen zumeist frei in Hölzern vor und weniger in Lebensmitteln. Dennoch sind einige, zumeist 3-O-Glykoside in Weißweinen, Rotweinen, den Stielen, der Schalen und im Fruchtfleisch der Trauben identifiziert. Die in der Schale von Rotweitrauben enthaltenen Anthocyane sind 3-O-Monoglucoside und 3-O-acylierte Monoglucoside der fünf Haupt-Anthocyanidine Cyanidin, Delphinidin, Peonidin, Petunidin und Malvidin. Die Acyle (Carbonsäurereste der Essigsäure, *p*-Cumarsäure und Kaffeesäure) sind zumeist an Position C6 der Glucose verestert. Flavan-3-ole liegen in Weintrauben frei oder mit Gallussäure an der C3-Position verestert vor. Wie bereits beschrieben, dienen Flavan-3-ole als Ausgangsprodukte für Proanthocyanidine und kondensieren zu Di-, Tri-, Oligo- und Polymeren. In Weintrauben sind explizit Procyanidine (in den Kernen) als Kondensate aus (+)-Catechinen mit (-)-Epicatechinen und Prodelphinidine (in den Kernen und der Schalen) als Kondensate aus (+)-Gallocatechinen mit (-)-Epigallocatechinen anzutreffen. Mit saurer Hydrolyse entstehen die farbigen Anthocyanidine Cyanidin und Delphinidin. Die Zahl der Proanthocyanidine wird durch weitere Polymerisierung miteinander und untereinander schnell unüberschaubar und ist gerade in den Kernen äußerst manigfaltig.

Hauptvertreter der Stilbene in *Vitis vinifera* ist das Resveratrol und seine Derivate. Einige Derivate, wie z. B. das Pallidol, kommen nur in wenigen Rebsorten vor, andere wurden ausschließlich in nicht-lignifiziertem Gewebe nachgewiesen und dann auch nur bei nicht gesundem Gewebe, wie das Pterostilben (LANDRAULT et al. 2002, LANGCAKE et al. 1979). Tab. 6 zeigt die von MONAGAS et al. (2005) aus der aktuellen Literatur zusammengetragenen Stilbene in Weinen.

Tab. 6: Stilbene in Weinen (MONAGAS et al. 2005)

Bezeichnung		Summenformel	Molgewicht [g/mol]
Einfache Stilbene	<i>trans/cis</i> -Resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,24
	<i>trans/cis</i> -Resveratrol-3-O-glucosid (<i>trans/cis</i> -Piceid)	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390,13
	Resveratrol-2-C-glucosid	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390,13
	<i>trans</i> -Astringin	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	406,13
Dimere Stilbene	Pallidol	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	454,50
	Pallidol-3-O-glucosid	C ₃₄ H ₃₂ O ₁₁	616,66
	Pallidol-3-3''-O-diglucosid	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₆	778,82
	<i>trans/cis</i> -ε-Viniferin-diglucosid	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₆	778,82
	Parthenocissin-A	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	454,50
andere Stilben-derivate	3,5,3',4'-Tetrahydroxystilben-3-O-glucosid	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	406,42
	2,4,6-Trihydroxyphenanthren-2-O-glucosid	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388,82

Wie beschrieben, sind Pektinstoffe, Cellulose und Hemicellulose Strukturpolysaccharide und haben wegen der relativ dünnen Beerenhaut bei Weintrauben nur einen sehr kleinen Massenanteil von maximal 0,5 %.

In den Kernen werden mit zunehmender Reife der Traubenbeeren Öle eingelagert, deren Trockenmassenanteil 10 bis 20 % betragen können. Traubenkernöl wird durch Extraktion abgetrennter und getrockneter Kerne oder kalt gepresst gewonnen und als angenehm schmeckendes Öl als Nahrungsmittel verwendet. Neben seinem hohen Gehalt an antioxidativen Inhaltsstoffen, wie Vitamin E und oligomere Procyanidine (OPC), zeichnet es sich durch seinen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus. So besteht das Kernöl überwiegend aus Glyceriden der Linolsäure und enthält darüber hinaus Glyceride der Öl-, Palmitin- und Stearinsäure. Fette sind als Glycolipide, Phospholipide und neutralen

Fetten in sehr geringem Ausmaß zu finden, ebenso sind Wachse als Überzug der Cuticula in nur geringsten Mengen vorhanden.

Vitamine sind essentielle organische Nahrungsfaktoren für den Menschen, für Tiere und für viele Mikroorganismen. Biochemisch sind Vitamine häufig Bestandteile von Coenzymen. Einige werden während der Gärung verbraucht (z. B. Thiamin und Biotin als Wachstumsfaktoren für Hefen), andere unterliegen nur geringen Änderungen. Vitamine können in fett- und wasserlöslich untergliedert werden und sind in Tab. 7 mit Gehalten in Traubenkernöl und Traubenmost zusammen gestellt. In Weinen sind folglich überwiegend wasserlösliche Vitamine zu finden, wobei in Rotweinen mit Maischegärung, analog zu den Polyphenolgehalten, auch z. T. sehr viel größere Mengen Vitamine extrahiert werden, als in Weißweinen (WÜRDIG und WOLLER 1989) und in Traubenkernölen ist das fettlösliche Vitamin E dominierend und enthält weiter sehr kleine Mengen an Vitamin C und Provitamin A (UMA MAHESWARI und RAO 2005, GÖKTÜRK BAYDAR und AKKURT 2001).

Aromastoffe sind Geruchs- und Geschmacksstoffe, die dem Wein ihr unverwechselbares Bukett verleihen. Einige sind bereits in den Traubenbeeren vorhanden, andere werden bei der Traubenverarbeitung, Gärung und später im Ausbau gebildet. Zu den Geruchsstoffen zählen leichtflüchtige Ester- und Carbonylverbindungen, Kohlenwasserstoffe, Alkanole und Thiole, während zu den Geschmacksstoffen die bereits angesprochenen organischen Säuren, phenolische Verbindungen und Zucker zählen. Qualitativ sehr zahlreich, machen sie quantitativ nur einen kleinen Bruchteil aus (WÜRDIG und WOLLER 1989).

Tab. 7: Vitamine mit Gehalten in Traubenkernöl und Traubenmost (WÜRDIG und WOLLER 1989, UMA MAHESWARI und RAO 2005, GÖKTÜRK BAYDAR und AKKURT 2001)

fettlösliche Vitamine			
Bezeichnung	Gehalt in Kernöl [g/kg]	Summenformel	Molgewicht [g/mol]
Vitamin A (Retinol, Axerophthol)	keine Angaben	$C_{20}H_{30}O$	286,46
Provitamin A (β -Carotin)*	vorhanden	$C_{40}H_{56}$	536,87
Vitamin E (Tocopherol)	0,3 – 1,2**	$C_{29}H_{50}O_2$	430,72
Vitamin K ₁ (Phyllochinon)	keine Angaben	$C_{31}H_{46}O_2$	450,71
Vitamin D (Calciferol)	zählt heute zu den Hormonen, kann mit Vitamin D – Vorstufen in der Haut mit Hilfe von Sonnenlicht gebildet werden, daher nicht essentiell		
wasserlösliche Vitamine			
Bezeichnung	Gehalt in Traubenmost [μ g/L]	Summenformel	Molgewicht [g/mol]
Vitamin B ₁ (Thiamin)	160 – 330	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	337,27
Vitamin B ₂ (Riboflavin, Lactoflavin)	3 – 60	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	376,37
Vitamin B ₅ (Pantothersäure)	500 – 1.380	$C_9H_{16}NO_5$	219,24
Vitamin B ₆ (Pyridoxin, Pyridoxol)	160 – 530	$C_8H_{11}NO_5$	169,18
Vitamin B ₇ (Vitamin B ₈ und H, Biotin)	2 – 4	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	244,31
Vitamin B ₉ (Folsäure, Folinsäure)	1,2	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	441,41
Vitamin B ₁₂ (Cobalamin)	0,2***	$C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$	1.355,39
Vitamin C (Ascorbinsäure)	20 – 100	$C_6H_8O_6$	173,13
Vitamin B ₃ (Niacin)	Ist keine essentielles Vitamin und kann aus Tryptophan in Gegenwart von Vitamin B6 vom Körper synthetisiert werden.		

* β -Carotin ist die Vorstufe für Vitamin A (Lebensmittelfarbstoff E160a) und wird vom Körper nach Bedarf in Vitamin A umwandelt, ** kalt gepresstes Traubenkernöl, *** in Rotweinen, in Most kein Vitamin B₁₂ nachweisbar

Es kann davon ausgegangen werden, dass in den einzusetzenden Trestern gleiche Inhaltsstoffe, wie in den Weinen, Mosten und Kernölen enthalten sind und lediglich in anderen Konzentrationen vorliegen. Gut wasserlösliche Polyphenole werden bereits durch die Weinherstellung weitgehend extrahiert worden sein, wohingegen lipophile Verbindungen vermehrt im Trester verbleiben sollten, ganz besonders im Weißweintrester, da hier im Gegensatz zur Rotweinherstellung die Ethanolextraktion der Maischegärung fehlt.

3.2.2 Apfeltrester

Die Apfelanbaufläche und somit die Apfelernte konnte in Österreich in den letzten 5 Jahren stetig auf eine Intensiv-Anbaufläche von mehr als 6.000 ha gesteigert werden, so dass 2004 insgesamt (Extensiv- und Intensiv-Obstbau) von etwa 3.000 Betrieben und unzähligen Privatgärtnern 480.000 t geerntet wurden. Dabei entfielen mit 9,8 % 47.475 t auf Sommeräpfel, der größte Anteil mit 72,9 % 352.810 t auf die Winteräpfel und mit 17,3 % 83.811 t auf Mostäpfel (GRÜNER BERICHT 2005, STATISTIK AUSTRIA 2005). Die Steiermark hat mit einer Anbaufläche von etwa 4.800 ha den Löwenanteil dazu beigetragen, was vor allem auf die Winteräpfel zutrifft. Aber auch die für die Polyphenolgewinnung interessanten Mostäpfel, sind in der Steiermark mit einem österreichischen Anteil von 41 % und damit 34.686 t stark vertreten (LANDWIRTSCHAFTSKAMMER STMK 2004). Wie bei Weintrester, ist auch hier mit einem Tresteranteil von etwa 25 % auszugehen. So fallen nach der Pressung österreichweit rund 21.000 t und lokal in der Steiermark 8.500 t Apfeltrester an. Da Apfeltrester reich an Pektinstoffen ist, wird er zum großen Teil in der Pektinindustrie eingesetzt, wofür er zuvor getrocknet wird (max. 0,29 €/kg Trockentrester). Apfelerntezeit der Mostäpfel ist September und Oktober.

Das Byproduct Apfeltrester wird bei dem Prozess der Apfelsaftherstellung relativ früh abgetrennt, wobei zwei Hauptproduktionswege zu unterscheiden sind, bei denen naturtrüber und klarer Apfelsaft hergestellt wird (Abb. 38). Die vollreifen und gesunden Äpfel werden gewaschen, verlesen und gemahlen. Hier trennt sich die Produktion naturtrüber und klarer Apfelsäfte. Für naturtrübe Produkte wird die aus der Mahlung (Rätz- oder Hammermühle) erhaltene Maische gegebenenfalls mit Ascorbinsäure als Oxidationsschutz (ca. 150 bis 300 mg/L) versetzt. Es schließt die Entsaftung mittels Pressen (Band-, Korb-, Schneckenpresse) oder Dekantern an, so dass der erhaltene Trester für die vorliegende Anwendung als Rohstoff zur Polyphenolgewinnung zur Verfügung steht und der Presssaft weiter zur Entfernung von Stärkekörnern und Grobtrub geleitet wird (Filter, Zentrifugen). Der trübe Saft ist dann zu Pasteurisieren (KZE) und in einem Tank zu lagern. Dieser so genannte Direktsaft wird häufig nach der Lagerung nochmals von aggregiertem Grobtrub durch Separation befreit und dann abgefüllt. Vor der Abfüllung kann gegebenenfalls nochmals Ascorbinsäure als Oxidationsschutz zugesetzt werden. Ein zweiter Weg, naturtrübe Apfelsäfte herzustellen, geht über Einengung der Säfte zu Apfelsafthalbkonzentraten mit vorheriger Aromaabtrennung. Nach der Kühlung werden die Konzentrate wieder rückverdünnt und mit Aromakonzentrat versetzt. Weiter kann aus naturtrüben Säften durch Enzymierung mit Pektinasen und evtl. Amylasen klare Apfelsäfte erzeugt werden, was in Kleinbetrieben häufig der Fall ist. In Großbetrieben werden jedoch andere Produktionswege für klare Apfelsäfte angewendet. Nach der Apfelmahlung wird die Maische mit pektolytischen Enzymen versetzt. Die Enzymierung wird bei 15 bis 20 °C durchgeführt, um Wärmeschäden der hitzeempfindlichen Aromastoffe zu vermeiden. Anschließend wird die Maische gepresst, so dass der trübe Saft nach zwei möglichen Wegen weiter verarbeitet werden kann und der Trester im vorliegenden Fall als Byprodukt zur Verfügung steht. Der trübe Saft wird in einem der zwei gebräuchlichen Wege zu klarem Direktsaft weiter verarbeitet. Hierbei kommt eine enzymatische Schönung und Separation, evtl. Filtration mit anschließender Pasteurisierung zum Einsatz. Der Klarsaft wird kühl gelagert und vor der Abfüllung evtl. nochmals enzymatisch geschönt und filtriert. Der zweite Weg führt zu klarem Apfelsaft aus Konzentrat, indem der trübe Saft nach der Pressung zentrifugiert wird und bei 90 °C eine Aromaabtrennung folgt. Der entaromatisierte Apfelsaft kann jetzt mit enzymatischem Pektin-

Wie auch bei den Weintrauben, sind zahlreiche Polyphenole in der Schale und den Kernen der Äpfel enthalten. Da bei der Herstellung naturtrüber Apfelsäfte vor der Pressung keine Enzyme eingesetzt werden und damit kein enzymatischer Aufschluss die in den Schalen und Kernen lokalisierten Polyphenole freisetzt, lässt dies den Schluss zu, dass aus Treestern naturtrüber Apfelsäfte höhere Ausbeuten an Pflanzenphenolen erwartet werden können.

Für die Apfelsaftherstellung wird zumeist auf die säurehaltigen, älteren Sorten aus dem Streuobstanbau zurückgegriffen. Die Apfelsorten müssen eine entsprechende Säure aufweisen, da die Säfte ansonsten zu süß schmecken. Tafeläpfel kommen jedoch auch zum Einsatz, wenn diese am Markt nicht vermarktbar sind.

3.2.2.1 Aufbau des Apfels

Apfelbäume (Gattung *Malus*) zählen zu den Rosengewächsen (Familie *Rosaceae*) und detailliert zu den Kernobstgewächsen (Unterfamilie *Maloideae*) (Abb. 33). Es existieren etwa 40 Arten, wobei *Malus x domestica* als europäischer Kulturapfel 1.000 – 1.500 Edelsorten umfasst und in der Vergangenheit um 1880 sogar mehr als 20.000 Apfelmischungen umfasst hat, von denen sich jedoch nur wenige bis heute durchgesetzt haben. Diese Vielfalt erklärt sich durch die leichte Bildung von Hybriden untereinander, aus denen auch unser Kulturapfel hervorgegangen ist. So wird vermutet, dass durch Kreuzungen des noch heute vorkommenden Holzapfels (*Malus sylvestris*) mit den Arten *Malus praecox* und/oder *Malus dasyphyllis* der Kulturapfel *Malus x domestica* hervorgegangen ist. Etwa 60 Edelsorten sind von wirtschaftlicher Bedeutung, wobei im Gartenhandel 30 bis 40 Sorten zum Kauf angeboten werden. Botanisch handelt es sich bei Äpfeln nicht um eine Frucht, sondern eine Scheinfrucht, da der Kelchgrund um das Kerngehäuse herumwuchert (STRASBURGER 1998).

Äpfel besitzen ein zähes Endokarp (verholzt). Jedes der fünf Fruchtfächer enthält zwei braune, flach eiförmige Samen. Das Fruchtfleisch (Mesokarp) enthält in den Markzellen bis kurz vor der Baumreife erhebliche Mengen feinkörniger Stärke (5 – 14 µm), wobei auch einzelne Apfelsorten noch nach der Reife Stärke besitzen. Die Oberhaut der Frucht (Exokarp) besteht aus derbwandigen, polygonalen Zellen (CZAJA 1968), die ähnlich aufgebaut ist, wie die der Weintrauben, jedoch einen hohen Pektingehalt aufweist. Polyphenole sind ebenfalls gerade in den Treestern (Schalen und Kernen) von Mostäpfeln zu finden, die bis zu 10-mal höhere Werte als in Tafeläpfeln aufweisen. Weiter bleiben schwer wasserlösliche Polyphenole, wie die Quercetin-Glykoside, Phloridzin und höhere Procyanidine, im Trester zurück und gehen nicht in den Saft über, so dass Trester aus Mostäpfeln umso mehr interessant als Byproduct zur Polyphenol-Gewinnung ist. Gut wasserlösliche Polyphenole, wie Hydroxyzimtsäuren hingegen, gehen leicht in den Presssaft über (RECHNER 2001) (Abb. 39).

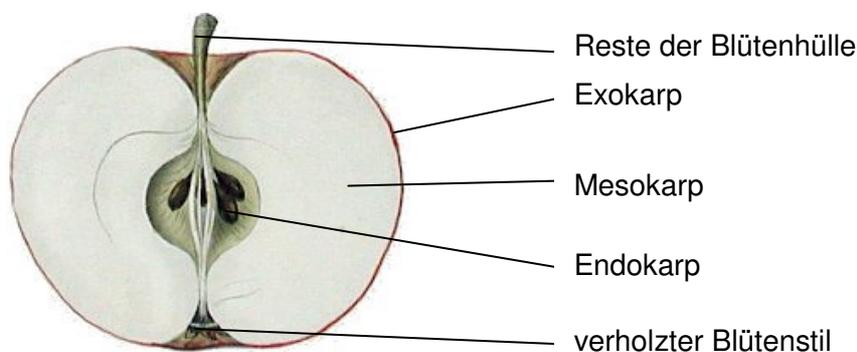


Abb. 39: Aufbau eines Apfels mit Zuordnung wichtiger phytotomischer Bestandteile (BROCKHAUS 1996)

3.2.2.2 Inhaltsstoffe des Apfels

Wie auch bei Weintrauben sind die Hauptkomponenten Wasser, Zucker, organische Säuren, Mineralstoffe, Pektinstoffe, daneben sind noch Stickstoff-Verbindungen, Öle, Fette, Wachse und Polyphenole zu nennen (Tab. 8).

Tab. 8: Hauptkomponenten von Äpfeln (FACHGRUPPE OBSTBAU 2004, DREWS 1968)

Hauptkomponenten	Anteil [%]
Wasser	78 - 93
Zucker (vorwiegend Glucose, Fructose, Saccharose, Arabinose, Rhamnose und Xylose)	3 - 15
Säuren (vorwiegend Apfelsäure, Zitronensäure, Chinasäure)	4 - 12
Mineralstoffe (vorwiegend Kalium, Phosphor, Calcium, Magnesium, Natrium)	0,1 - 0,5
Pektinstoffe, ber. als Calciumpektat	0,1 - 1,6
Stickstoff-Verbindungen	0,1 - 0,4
Öle (in den Kernen), Fette, Wachse	0,3 - 0,5
Polyphenole	0,01 – 1

Die Polyphenole aus Äpfeln sind in Tab. 9 dargestellt, wobei Quercetin-Glykoside eine dominierende Rolle spielen. Anthocyane sind in roten Äpfeln ebenfalls zu finden und hierbei vor allem Cyanidin-Glykoside. Die Gehälter an Polyphenolen haben eine sehr weite Schwankungsbreite und sind, wie bei den Weintrauben auch, von zahlreichen Faktoren wie z. B. dem Anbauggebiet, der Sorte, der Witterung und Schädlingsbefall abhängig. Weitere Inhaltsstoffe von Äpfeln sind Vitamine (Tab. 10).

Tab. 9: Wichtige Polyphenole in Äpfeln, zusammengestellt von RECHNER (2000)

Nachgewiesene Polyphenole	Gehalte in mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate	
Chlorogensäure (5-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure)	62 – 385 (Mittelwert 139)
Kryptochlorogensäure (4-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure)	0 – 12 (Mittelwert 2)
4-Coumaroyl-L-(-)-chinasäure	Spuren – 32 (Mittelwert 2)
5-Coumaroyl-L-(-)-chinasäure	Spuren – 9 (Mittelwert 2)
Caffeoylglucose	0 – 6 (Mittelwert 2)
Coumaroylglucose	1 – 19 (Mittelwert 2)
Feruloylglucose	0 – 9 (Mittelwert 2)
Flavonole	
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	5 - 39
Quercetin-3-glucosid (Isoquercitin)	3 - 16
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	1 – 10
Quercetin-3-arabinosid (Avicularin)	8 – 25
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	3 – 19
Quercetin-3-xylosid	4 – 10

Fortsetzung S. 54

Dihydrochalkone Phloridzin (Phloretin-2'-glucosid) Phloretin-2'-xylosylglucosid	10 – 158 11 – 230
Flavan-3-ole (+)-Catechin (-)-Epicatechin	Spuren – 27 (Mittelwert 9) 2 – 129 (Mittelwert 46)
Procyanidine B1 B2 B5 C1 Σ Procyanidine	0,07 – 0,42 mg/Apfel* 0,67 – 2,50 mg/Apfel* 0,06 – 0,22 mg/Apfel* 0,33 – 1,29 mg/Apfel* 140 – 3240
Anthocyanidine Cyanidin-3-galaktosid Cyanidin-3-xylosid Cyanidin-3-arabinosid Cyanidin-3-glucosid acylierte Cyanidin-3-glycoside Σ Cyanidin-3-Glycoside	0,1 – 8 mg/g Apfelschale n.b. n.b. n.b. n.b. 1 mg/g Apfelschale

n.b.= nicht bestimmt, *MAYR et al. 1996

Tab. 10: Vitamine in Äpfeln (FACHGRUPPE OBSTBAU 2004, DREWS 1986)

Vitamine	Gehalte in mg/100 g, frische Frucht
Vitamin B1	0,02 - 0,06 mg
Vitamin B2	0,01 - 0,05 mg
Vitamin B3	0,1 - 0,5 mg
Vitamin B5	0,05 - 0,13 mg
Vitamin B6	0,04 - 0,06 mg
Inositol	22 mg
Folsäure	bis 0,008 mg
Vitamin C	5 - 35 mg
Vitamin E	0,3 - 0,8 mg
Vitamin H	bis 0,0035 mg

3.2.3 Alternative Rohstoffquellen

Angelehnt an diese Arbeit, wurden Rotklee, Okara (Sojakleie) und Biertreber als alternative Rohstoffquellen zur präparativen Gewinnung sekundärer Pflanzenstoffe untersucht. Futterrotklee fällt bei der Fruchtfolge in der „Bio“-Landwirtschaft im Drei-Jahres-Rhythmus an und enthält große Mengen an Phytohormonen (Isoflavone), die bereits heute als Nahrungsergänzungsmittel zur Linderung der Beschwerden von Frauen in den Wechseljahren und darüber hinaus Anwendung finden. Okara ist der Reststoff der Sojamilchherstellung, enthält ebenfalls Isoflavone und wird bisher als proteinreiches

Futtermittel- und Lebensmittelzusatzstoff verwertet. Biertreber enthalten ebenfalls gesundheitsfördernde sekundäre Pflanzenstoffe, wie Xanthohumole und Bittersäuren, und werden beispielsweise als Futtermittelzusatzstoffe und in Biogasanlagen verwertet oder deponiert. Erntezeit von Futterklee ist Juni bis September, Okara und Treber sind das ganze Jahr über verfügbar.

3.3 Überblick zu der relevanten Verfahrenstechnik

Die zu entwickelnde Technologie kann zunächst grob in mehrere Teilschritte untergliedert werden. So ist das Rohmaterial für die Extraktion vorzubereiten (Zerkleinerung, Enzymierung), um anschließend die Extraktion durchzuführen. Es folgt die Abtrennung (grober) Feststoffe (Raffinat) vom Extrakt. Darüber hinaus kann eine weitere Abtrennung von feinen Feststoffen für die nachfolgende Trenntechnologie erforderlich sein. Anschließend werden die Inhaltsstoffe des Extrakts mittels Membranverfahren und Chromatographie fraktioniert bzw. isoliert, wobei die beiden Verfahren einzeln oder in Kombination angewendet werden. Die Produkte werden im letzten Schritt aufkonzentriert und gegebenenfalls getrocknet.

3.3.1 Vorbehandlung des Rohstoffs

3.3.1.1 Zerkleinerung

Wie in den Kapiteln 3.2.1.1 und 3.2.2.1 gezeigt, sind wertvolle Pflanzenphenole zum Teil in Pektinen eingeschlossen, so dass ein enzymatischer Aufschluss angedacht ist. Dieser enzymatische Aufschluss als auch die nachfolgende Extraktion wird mit Vergrößerung der Oberfläche durch einen mechanischen Aufschluss begünstigt, so dass der Trester zuvor zu zerkleinern ist. Weiter ist in der Fruchtsafttechnologie die Zellpermeabilisierung zur besseren Entsaftung gebräuchlich, die auch als thermischer Aufschluss bezeichnet wird (HEISS 2004). Da Pflanzenphenole z. T. hitzeempfindlich sind, kann eine Zellpermeabilisierung lediglich bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden.

Die Zerkleinerung erfolgt durch Einwirkung mechanischer Kräfte. In dem zu zerkleinernden Trester sind Schalen, Kerne und Reste an Stängeln enthalten, die eine Härte nach Mohs von < 2 aufweisen und damit zur Weichzerkleinerung zählen, - zudem wird der Trester feucht angeliefert. Die Beanspruchungsarten bei der Zerkleinerung sind Druck, Schlag, Prall, Reiben und Schneiden, wobei für das hier weiche, elastische und faserige Zerkleinerungsgut das Reiben, Reißen und Scheren gut geeignet sind (VAUCK und MÜLLER 2000, SCHWISTER et al. 2005). Maschinen, die sich für die Fruchtsaftherstellung in der Lebensmitteltechnologie durchgesetzt haben, sind zumeist Mühlen (Walzenmühlen, Schleuderfräsen, Hammermühlen, Lochscheibenmühlen, Rätzscheibenmühlen, Korundscheibenmühlen). Der hier eingesetzte Rohstoff Trester, hat demnach bereits eine Zerkleinerung erfahren und ist nun mit Schneideapparaturen oder feineren Mühlen weiter zu zerkleinern.

Ein Maß für die Beurteilung der Zerkleinerung ist der Zerkleinerungsgrad (Gl. 1), der verschieden definiert ist (HEISS 2004). Der Zerkleinerungsgrad kann dabei auf den Größtdurchmesser oder auf einen anderen Durchmesser (d_{80} , d_{50} , d. h. 80 bzw. 50 %Ma des dispersen Materials weisen einen kleineren Durchmesser aus) bezogen werden. Zum zweiten kann er auf die spezifische Oberfläche bezogen werden. Weiter wird er auch gerne als „scheinbarer“ Zerkleinerungsgrad angegeben, bei dem die Austragsspaltweite bzw. Maschen- oder Lochweite herangezogen wird (VAUCK und MÜLLER 2000, SCHWISTER et al. 2005).

$$(Gl. 1) \quad Z_d = \frac{d_A}{d_E}, \quad Z_d = \frac{d_{80,A}}{d_{80,E}}, \quad Z_d = \frac{d_{50,A}}{d_{50,E}}, \quad Z_S = \frac{S_{v,A}}{S_{v,E}} = \frac{S_{m,A}}{S_{m,E}} \text{ und } Z_a = \frac{d_A}{a}$$

Z_d = Zerkleinerungsgrad bezogen auf den Durchmesser

Z_S = Zerkleinerungsgrad bezogen auf die spezifische Oberfläche

Z_a = scheinbarer Zerkleinerungsgrad

d_A, d_E = Größtdurchmesser zu Beginn und Ende der Zerkleinerung

$d_{80bzw.50,A}, d_{80bzw.50,E}$ = Durchmesser d_{80} bzw. d_{50} zu Beginn und Ende der Zerkleinerung

$S_{v,A}, S_{v,E}$ = volumenspezifische Oberfläche zu Beginn und Ende der Zerkleinerung

$S_{m,A}, S_{m,E}$ = massenspezifische Oberfläche zu Beginn und Ende der Zerkleinerung

a = Austragsspaltweite

Trotz zahlreicher Versuche zur theoretischen Beschreibung von Zerkleinerungsprozessen, ist es noch nicht gelungen, eine gültige Beziehung zwischen Zerkleinerungsarbeit und Zerkleinerungsergebnis zu finden. Somit werden nach wie vor die halbempirischen Gesetze von *Kick*, *Bond* und *Rittinger* eingesetzt, die jedoch eher auf harte und spröde Materialien zutreffen und somit für die vorliegende Betrachtung nicht geeignet sind. Zudem besteht Trester aus unterschiedlichen Materialien mit ebenso unterschiedlichen Eigenschaften. So sind die Reste der Stängel holzig, faserig, elastisch, die Traubenkerne holzig und die Schalen weich.

Für die Zerkleinerung muss mindestens so viel Arbeit aufgebracht werden, dass die Bindungskraft zwischen den Molekülen überwunden wird. Der Leistungsbedarf einer Zerkleinerungsmaschine ist das Produkt des Feststoffmassenstroms und der massebezogenen Zerkleinerungsarbeit (Gl. 2).

$$(Gl. 2) \quad P = \dot{m} \cdot W$$

P = Leistungsbedarf

\dot{m} = Feststoffmassenstrom

W = spezifische Zerkleinerungsarbeit

Ein Großteil der eingebrachten Energie wird jedoch als Reibung in Wärmeenergie umgewandelt, so dass eine Erwärmung stattfindet. Weiter kann eine zu starke Zerkleinerung negative Auswirkungen bei anschließenden Prozessen wie Zentrifugation oder Filtration zeigen.

3.3.1.2 Enzymierung

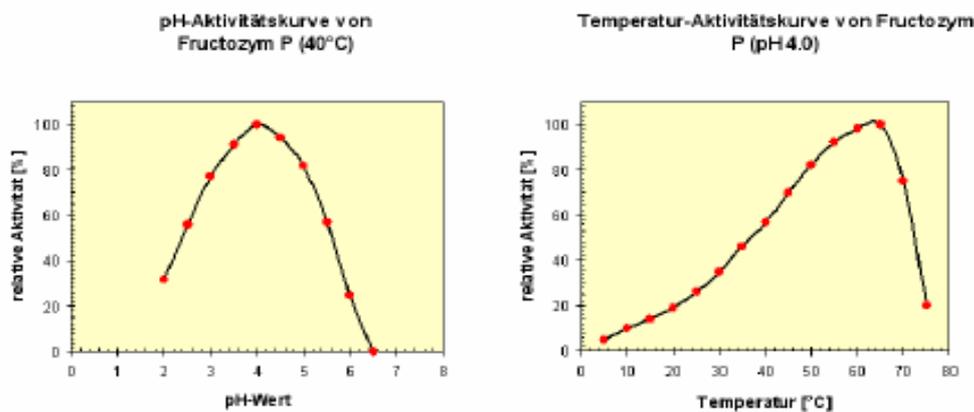
Die in der Fruchtsaftindustrie angewendeten enzymatischen Aufschlüsse bedienen sich gängiger Pektinasen und Cellulasen. Gerade in der Rotweinherstellung ist eine ähnliche Aufgabe zu bewältigen. Ziel ist dabei, die rotblauen Anthocyane und wertvolle Aromen in den Wein zu überführen. Auch zur weiteren Saftgewinnung aus Apfeltrester sind spezielle Enzyme bzw. Enzymkombinationen entwickelt worden. Zusammenfassend kann formuliert werden, dass jeder Rohstoff seine inhaltsstoffspezifischen Enzyme benötigt und auch für die in dieser Arbeit beschriebene Aufgabenstellung geeignete Enzyme bereits großtechnisch verfügbar sind.

Zur Charakterisierung von Enzympräparaten wird in der Enzymologie unter anderem die Aktivität der Enzyme in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur im entsprechenden

Substrat ermittelt und graphisch dargestellt. In der praktischen Anwendung wird das Optimum der Enzymreaktion angestrebt, um kostenintensive Enzympräparate einzusparen (Abb. 40).

Wie oben bereits angedeutet, bestehen technische Fruchtsaftenzyme nicht ausschließlich aus Pektinasehauptaktivitäten, sondern es können auch weitere cellulolytische, hemicellulolytische und proteolytische Begleitaktivitäten vorgefunden werden, die je nach Produktionsstamm und Produktionsverfahren der Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten sind. Weiter beruht die Pektinaseaktivität nicht nur auf einem Enzym, sondern vielmehr auf einer Kombination mehrerer spezifischer Enzyme. So kommen beim Abbau des gelösten Pektins (Hydropektin) vier Pektinasefraktionen zum Einsatz (Pektinesterase (PE, PME), Polygalakturonase, Pektinlyase und Pektatlyase) und beim Abbau der hochmolekularen, ungelösten Pektinstoffe (Protopektin) weitere Pektinasefraktionen (Mazerationsenzyme), deren einzelne pektinolytische Aktivitäten jedoch noch nicht vollständig entschlüsselt sind. Der heterogene Aufbau der Pektinstoffe macht demnach frucht- und reifegradspezifische Enzymkombinationen erforderlich, um einen möglichst guten Protopektinaufschluss zur Freisetzung der Pflanzenphenole zu erreichen und anschließend den Abbau der Hydropektine, die durch ihre elektrochemischen Kräfte eine Bindung zwischen Feststoff und Extrakt vermittelt und so einer guten Pressbarkeit entgegenwirken, voranzutreiben.

Aktivitätscharakteristik



Stabilitätscharakteristik

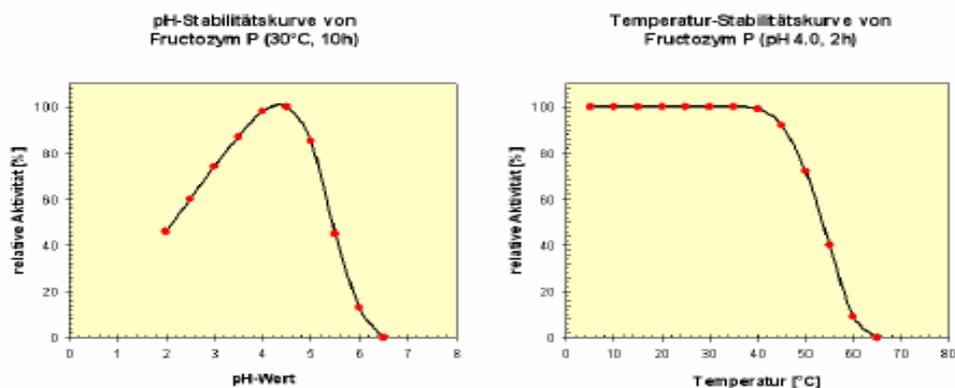


Abb. 40: Aktivitätscharakteristik und Stabilitätscharakteristik von Pektinase am Beispiel von Fructozym P der Firma ERBSLÖH Geisenheim AG (HABELBECK 2006)

Anzumerken ist, dass neben den gewünschten Enzymen bei technischen Enzymen weitere unerwünschte Enzyme, wie z. B. Polyphenoloxidasen enthalten sein können, die den zu isolierenden Wertstoff abbauen und so entsprechende am Markt befindliche Präparate mit geringen Polyphenol-abbauenden Aktivitäten zum Einsatz zu bringen sind.

3.3.2 Extraktion

Feststoffextraktionen können in zwei Grundarten untergliedert werden, die klassische Feststoffextraktion und die Destraktion. Bei der Feststoffextraktion liegen feste Extraktionsgüter mit Poren- oder Zellstruktur vor, die feste oder flüssige, durch das Extraktionsmittel herauszulösende Extraktstoffe einschließen. Die Feststoffextraktion von Pflanzeninhaltsstoffen zählt zu den ältesten Techniken der Menschheit (Tee, Kaffee, Heilstoffextraktion, Gewinnung von Ölen, Farbstoffen, u. v. m.) und kommt auch bei den hier zu gewinnenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zum Einsatz. Neben der Feststoffextraktion, wäre noch eine Destraktion (Hochdruck-Gasextraktion) denkbar und ist an zahlreichen Pflanzenstoffen, auch Weintraubenbestandteilen bereits wissenschaftlich untersucht (FRÖG 2002). Die Extraktion mit überkritischem CO₂ dient vor allem dem Abtrennen von unpolaren, schwerflüchtigen, thermisch instabilen Naturstoffen (koffeinfreier Kaffee, nicotinfreier Tabak, Gewürzextrakte, Aromastoffe). Den Vorteilen niedriger Betriebstemperatur, keine Flüssiglösemittel, niedriger spezifischer Energiebedarf, völlige Trennung Gas/Destrakt/Raffinat stehen die Nachteile hoher Betriebsdrücke, hoher Investitions- und Wartungskosten sowie komplexe Durchführungsprozesse gegenüber. Aus der Literatur geht hervor, dass die Gewinnung sekundärer Pflanzenstoffe, insbesondere der Pflanzenphenole zwar möglich ist, jedoch der Aufwand und deren Kosten mit der heute zur Verfügung stehenden Technik noch zu hoch ist. So wird hier lediglich auf die in Frage kommenden, klassischen Feststoffextraktion (Fest/Flüssig - Extraktion) eingegangen.

Grundsätzlich wird beim Extrahieren eine Komponente (Extraktstoff) aus einem Stoffgemisch (Extraktionsgut) mit Hilfe eines möglichst selektiven Extraktionsmittels (Solvent), welches auf den Extraktstoff abzustimmen ist, herausgelöst. Die Extraktion bewirkt keine vollständige Trennung der Komponenten des Extraktionsgutes (A, B), vielmehr geht ein Teil des Extraktstoffs (B) aus dem Trägermittel (A) in das Extraktionsmittel (C) über (Gl. 3), stets mit Zunahme der Entropie des Gesamtsystems. Durch einmaliges Extrahieren stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht von Stoff B im Feststoff A und dem Extraktionsmittel C ein. Mit dem *Nernst'schen Verteilungsgesetz* (Gl. 4) können für Flüssig-Flüssig-Extraktionen Verteilungskoeffizienten und somit Arbeitsgeraden entwickelt werden, was für die Fest-Flüssig-Extraktion nicht möglich ist. Die Gründe liegen im nicht zu definierenden Verteilungskoeffizienten: 1. Komponente B im Extraktgut liegt nicht mit einheitlichen Konzentrationen vor, 2. Komponente B liegt unterschiedlich weit von der Guts Oberfläche im Extraktionsgut vor (Kapillarlänge), 3. Adsorption des Extraktionsmittels an der Oberfläche des Feststoffs und somit unterschiedliche Verteilung des Extraktstoffs im Solvent. Die Extraktion selber läuft durch Diffusionsvorgänge ab, die nach dem *Fick'schen Gesetz* (Gl. 5) beschrieben werden können (VAUCK und MÜLLER 2000, SCHWISTER et al. 2005, IGNATOWITZ 1994). Dennoch kann sich ein Quasigleichgewicht einstellen, bei dem die Konzentration des Wertstoffes in den Kapillaren gleich der Konzentration in der freien Lösung ist. Mit diesem Quasigleichgewicht lässt sich die Fest/Flüssig-Extraktion ähnlich der Flüssig/Flüssig-Extraktion vereinfacht im *Gipps'sches Phasendreieck* verfolgen (Abb. 41). Je nach Betriebsweise, wie z. B. Kreuzstrom oder Gegenstrom, sind mit Hilfe experimentell gewonnener Quasigleichgewichtsdaten (Ortskurve) Voraussagen zur erforderlichen Zahl der Extraktionsstufen zum Erreichen einer definierten Auslaugung des Raffinats möglich (SATTLER 1995).



$$(Gl. 4) K = \frac{c_{B,Phase1}}{c_{B,Phase2}}$$

K = Nernst'sche Masseverteilungskoeffizient (Gleichgewichtskonstante)

$c_{B,Phase1}$ = Konzentration von Stoff B in Phase 1

$c_{B,Phase2}$ = Konzentration von Stoff B in Phase 2

$$(Gl. 5) \quad \frac{n_B}{t} = -D \cdot A \cdot \frac{dc}{ds}$$

n_B = Stoffmenge des Extraktstoffs B

t = Zeit

D = Diffusionskoeffizient

A = Fläche

dc/ds = Konzentrationsgefälle (s = Strecke (Kapillarlänge))

Die pro Zeiteinheit ausgetauschte Stoffmenge nimmt zu, je größer der Diffusionskoeffizient, die Austauscherfläche und das Konzentrationsgefälle sind. Das negative Vorzeichen in Gl. 5 beschreibt den Ablauf der Diffusion Richtung sinkender Konzentration. Der Diffusionskoeffizient selber wird zumeist empirisch bestimmt. So ist er direkt proportional zur Temperatur und indirekt proportional der dynamischen Zähigkeit und dem hydrodynamischen Radius eines kugelförmigen Teilchens (Gl. 6) (SCHWISTER et al. 2005).

$$(Gl. 6) \quad D \approx \frac{T}{\eta \cdot r}$$

T = Temperatur

η = dynamischen Zähigkeit [Pa s]

r = hydrodynamischen Radius eines kugelförmigen Teilchens

Das Extraktionsgut enthält den Extraktstoff aus der pflanzlichen Zelle, so dass eine weitgehende und schnelle Extraktion nur mit zerkleinertem (mechanischer, enzymatischer Aufschluss) und aufgelockertem Gut (unter Rühren) erreicht wird. Die Extraktionszeit τ (bis zum Quasiverteilungsgleichgewicht) kann in Abhängigkeit von der mittleren Kapillarlänge l mit der Beziehung $\tau \approx l^{(2...2,5)}$ angenähert werden.

Die Anforderungen an das Extraktionsmittel sind selektives Lösungsvermögen, enge Siedegrenzen (d. h. chemische Einheitlichkeit) sowie niedrige Siedetemperaturen und geringe Verdampfungsenthalpien zur kostengünstigen Rückgewinnung des Extraktionsmittels.

Der Extraktionsvorgang selbst ist der Extraktstofftransport aus den Feststoffporen, -zellen und -kapillaren ins Extraktionsmittel. Wie oben bereits erwähnt, steigt die Extraktionsgeschwindigkeit mit guter Zerkleinerung des Extraktionsgutes, Anwendung großer Extraktionsmittelmengen, um die treibende Kraft des Konzentrationsunterschieds groß zu halten und hohen Rührgeschwindigkeiten, die die *Prandtsche* Grenzschicht klein halten.

Fest/Flüssig-Extraktionen werden in der Praxis meist als Perkolationsextraktion im Kreuzstrom oder Gegenstrom und als Immersionsextraktion diskontinuierlich oder kontinuierlich durchgeführt. Die Perkolationsextraktion wird in der Weise betrieben, dass das zerkleinerte, aufgeschlossene Extraktionsgut durch die Apparatur bewegt und von Stufe zu Stufe mit Extraktionsmittel berieselt wird, wobei sich das Extraktionsmittel mit Wertstoff anreichert. Der zu extrahierende Feststoff muss für die Perkolationsextraktion vom Lösungsmittel gut durchströmbar sein. Ist das nicht der Fall, wird die Immersionsextraktion angewendet. Das Extraktionsgut wird in dem Extraktionsmittel suspendiert und anschließend diskontinuierlich zumeist mittels Dekanter oder kontinuierlich in speziellen Extraktionsapparaturen als Raffinat vom Extrakt wieder abgetrennt.

Wie oben erwähnt, kann im *Gibbs'schen Phasendreiecks* die Extraktion verfolgt bzw. Aussagen zur benötigten Extraktionsstufenzahl gemacht werden. Wird bei der Extraktion im Kreuzstrom das Extraktionsgut T (Träger) mit der Anfangskonzentration w_F (Zustandspunkt F) stufenweise mit frischem Lösungsmittel L versetzt, so liegt der Mischpunkt P_1 auf der Verbindungsgeraden FL und der Geraden SP_V , die das gewählte

Lösungsmittelverhältnis $v=L/T$ repräsentiert. Die Extraktphase der ersten Extraktion weist den Zustandspunkt Q_1 auf, der als Verlängerung der Verbindungsgeraden TP_1 mit der Dreiecksseite SL erhalten wird. Der Zustandspunkt Q_1 entspricht der Auftrennung des Gemisches gemäß P_1 in reinen Träger und eine Flüssigphase gemäß Q_1 , bestehend aus Wertstoff S und Lösungsmittel L . Nach der Trennung Raffinat und Extrakt verbleibt eine bestimmte Menge „gebundener“ Wertstoff im Raffinat. Der Zustandspunkt M_1 des noch feuchten Raffinats liegt dann auf der Verbindungsgeraden TQ_1 und der experimentell bestimmten Ortskurve OK für die Anteile gebundener Lösung. Die verbleibende Konzentration w_1 des Wertstoffs S im Träger T (Zustandspunkt F_1) ist der Schnittpunkt der verlängerten Verbindungsgeraden LM_1 mit der Dreiecksseite TS . Folgt eine zweite Extraktion mit frischem Lösungsmittel des gleichen Verhältnisses $v=L/T$, so resultiert der Zustandspunkt P_2 aus dem Schnittpunkt der Verbindungsgeraden LM_1 und SP_V , woraus wiederum das feuchte Restgut gemäß M_2 , eine Extraktphase gemäß Q_2 und Restkonzentration w_2 im Zustandspunkt F_2 resultieren. Letztendlich soll bei der Extraktion ein feuchtes Restgut gemäß M_ω bzw. eine Konzentration w_ω erreicht werden, so dass so viele Trennstufen (Q_n) erforderlich sind, bis die Gerade LR_ω durch die letzte Verbindungslinie LM_n unterschritten wird (Abb. 41).

Bei der Gegenstromextraktion hingegen, wird zu Beginn frisches Lösungsmittel zugegeben und weiter mit immer stärker beladenem Lösungsmittel gearbeitet. Analog zur Flüssig/Flüssig-Extraktion, ergibt sich ein Extraktionspol als Schnittpunkt der verlängerten Geraden $E_\omega F$ und $R_\omega L$, wobei die Konzentrationen der ablaufenden Extraktphase E_ω und des verbleibenden Restfestguts R_ω festzulegen sind. Weiter ist anzunehmen, dass sich in jeder Extraktionsstufe Quasigleichgewichte als Konzentrationsausgleich zwischen freier und gebundener Lösung einstellen, so dass nach dem in Abb. 41 gezeigten Verfahren zur Trennstufenzahlbestimmung gearbeitet werden kann. Wie bei der Kreuzstromextraktion, ergibt sich die Anzahl der notwendigen Trennstufen aus der Zahl der Extraktphasenzustandspunkte $E_\omega, E_1, \dots, E_n$ auf der Dreiecksseite SL . Auch hier gilt: Letztendlich soll bei der Extraktion ein feuchtes Restgut gemäß M_ω mit einer Konzentration w_ω erreicht werden, so dass so viele Trennstufen erforderlich sind, bis die Gerade LR_ω durch die letzte Verbindungslinie LM_n unterschritten wird (SATTLER 1995).

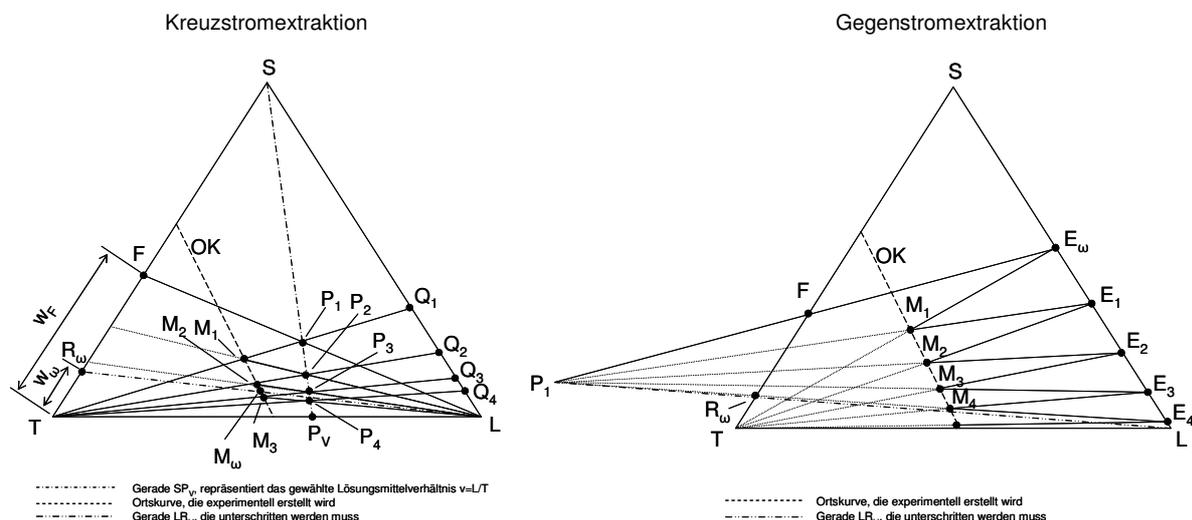


Abb. 41: Gibbs'sches Phasendiagramm zur Bestimmung der Extraktionsstufen bei Kreuzstromextraktion und Gegenstromextraktion (Fest/Flüssig-Extraktion) (SATTLER 1995)

3.3.3 Pressen

Schwammartige Pressgüter, wie Ölf Früchte, Obst und Rübenschnitzel, erfordern ein Auspressen mit Drücken von 5 bis 100 MPa. Dabei wird ein Teil des Pressdrucks zur Verformung des Presskuchenskeletts benötigt, um die freie Flüssigkeit aus den

Zwischenräumen der Partikel sowie aus den Kapillaren und Zellen mechanisch abtrennen zu können. Dieser Druckanteil nimmt mit fortschreitendem Pressvorgang zu. Zu diesem unwirksamen Druck kommt der aktive hydraulische Druck für das Entweichen der Flüssigkeit zur Überwinden des Widerstandes in den Kapillaren und Zellen des Presskuchens. Eine langsame Steigerung des Pressdrucks ermöglicht der bereits abgepressten Flüssigkeit aus dem Kuchen auszutreten (VAUCK und MÜLLER 2000).

Gängige großtechnische Pressen sind Schnecken-, Siebband- und Kammerfilterpressen sowie Vollmantelschneckenzenrifugen (Dekanter). Zumeist werden in diesen Maschinen zunächst die Suspensionen bis zu einer breiartigen Konsistenz mittels Siebung, Filtration oder Zentrifugation eingedickt und anschließend gepresst.

3.3.4 Zentrifugation

Zur großtechnischen Abtrennung und Klärung von Raffinaten und Säften in der Nahrungsmittelindustrie, insbesondere in der Fruchtsaft- und Weinherstellung, haben sich neben Band-, Kammerfilterpressen und der Membranfiltration kontinuierlich arbeitende Zentrifugen, wie Dekanter und Tellerseparatoren etabliert. Dabei dienen Dekanter einerseits zur Vorklärung der Säfte, Extrakte sowie Weine und gleichzeitig zur Entwässerung bzw. Entsaftung der Raffinate und Früchte. Tellerseparatoren „polieren“ das Zentrat, um feinste Trübstoffe zu eliminieren und ein blankes Produkt (Öle, Säfte, Bier, Wein) zu erhalten.

Funktionsprinzip eines Dekanters: Die Suspension wird kontinuierlich über ein stillstehendes Zulaufrohr in den Verteilerraum des Schneckenrundkörpers gepumpt, in dem sie auf Drehzahl beschleunigt wird und über Schlitze im Schneckenrundkörper in den eigentlichen Trennraum gelangt. Die Dekantertrommel und -schnecke drehen gleichsinnig, wobei die Schnecke zumeist voreilend ist, d. h. etwas schneller als die Trommel dreht, so dass die Schnecke den an der Trommelwandung unter der Zentrifugalkraft sedimentierten, schwereren Feststoff zum konischen Teil der Trommel transportiert (Abb. 42). Die Trommel ist nicht zur Gänze gefüllt, so dass der Feststoff den konischen Teil „hochgeschoben“ wird, aus der Flüssigkeit auftaucht und über die „Trockenzone“ zu den Feststoffaustragsbuchsen gefördert wird. Die zu klärende Flüssigkeit geht die entgegengesetzte Richtung und gelangt über die Distanz der gesamten Schneckenwendel auf der gegenüberliegenden Seite des Feststoffaustrags über eine Wehrscheibe oder einen Greifer geklärt ins Freie. Die Differenzdrehzahl zwischen Schnecke und Trommel kann fix über Riemenscheiben eingestellt oder über Regelmechanismen mittels zusätzlichem Drehstrommotor oder einem hydrostatischen Schneckenantrieb variabel eingestellt werden. Zumeist dient das Drehmoment als Eingangsgröße einer automatischen Regelung, die bei schwankenden Zulaufbedingungen unverzichtbar ist. Gelangt eine Suspension mit erhöhtem Feststoffanteil in den Dekanter, so erhöht sich das Drehmoment zwischen Schnecke und Trommel. Die Regelung initiiert eine Erhöhung der Differenzdrehzahl, so dass der Feststoff schneller ausgetragen wird und ein niedrigeres Drehmoment resultiert.

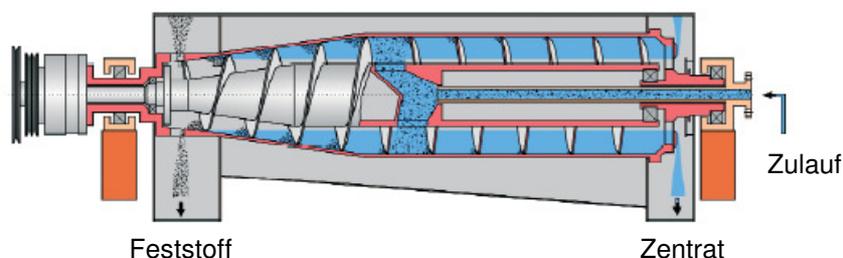


Abb. 42: Funktionsprinzip Vollmantelschneckenzenrifuge (FLOTTWEG 2007)

Funktionsprinzip eines Tellerseparators: Selbstentleerende Tellerseparatoren arbeiten hinsichtlich des Suspensionszulaufs und des Ablaufs der geklärten Phase kontinuierlich und hinsichtlich des Feststoffaustrags semi-kontinuierlich (Abb. 43). Der durch die Zentrifugalkraft

separierte Feststoff sammelt sich im Schlammraum, der über einen hydraulisch zu öffnenden Ringspalt bei voller Drehzahl entleert wird.

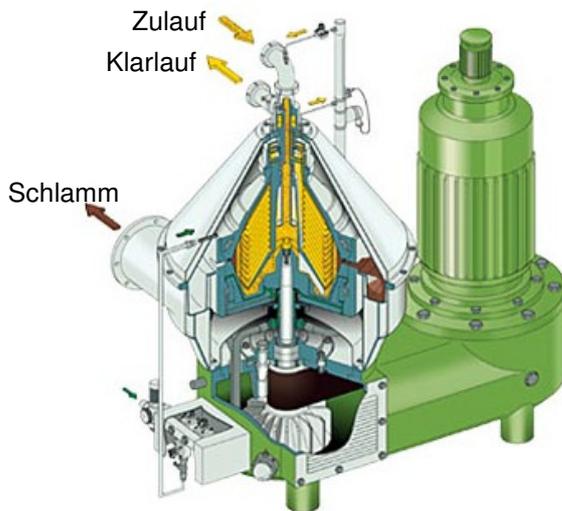


Abb. 43: Funktionsprinzip selbstentleerender Tellerseparator (WESTFALIA SEPARATOR 2007)

Die Entleerungen können entweder zeitgesteuert sein, über ein optisches System im Klarlauf ausgelöst werden, indem eine definierte Trübung überschritten wird oder aber eigengesteuert sein, wobei hier der oberste Teller in den Schlammraum ragt und so einen By - Pass – Strom über eine Sensorik schleust. Füllt sich der Schlammraum bis zum überragenden Teller, so wird der By - Pass – Strom unterbrochen und mit dem Sensoriksignal eine Entleerung ausgelöst.

Ein theoretischer Ansatz der stationären Absetzgeschwindigkeit wurde von *Stokes* (Gl. 7 und 8) formuliert und mit Formkorrekturfaktoren zur praktischen Anwendbarkeit verfeinert, die aus Tabellen zu entnehmen und stets < 1 sind. Die Absetzgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Abweichung von der idealen Kugelform der abzuscheidenden Partikel ab.

$$(Gl. 7) \text{ im Erdschwerefeld } v_s = k_{St} \frac{dr}{dt} = k_{St} \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d_v^2 \cdot g}{18 \cdot \eta}$$

$$(Gl. 8) \text{ im Zentrifugalfeld } v_z = k_{St} \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d_v^2 \cdot r \cdot \omega^2}{18 \cdot \eta}$$

v_s, v_z = Sedimentationsgeschwindigkeit des Feststoffs im Erdschwerefeld und Zentrifugalfeld

k_{St} = Korrekturfaktor für Stokes

ρ_s, ρ_l = Dichte des Feststoffs und der Flüssigkeit

d_v = äquivalenter Kugeldurchmesser

g = Erdbeschleunigung

η = dynamische Viskosität der Flüssigkeit

r = Radius, auf dem sich das sedimentierende Teilchen befindet

ω = Winkelgeschwindigkeit

Zur Vergleichbarkeit der Trennwirkung wird die Schleuderschleuderzahl z_R (Gl. 9) angegeben. Sie ist ein Maß dafür, wie viel Mal stärker die Absetzwirkung in einer Zentrifuge im Vergleich zur Schwerkraft ist.

(Gl. 9) $z_R = \frac{a_Z}{g} = \frac{r \cdot \omega^2}{g}$ und näherungsweise $z_R = \frac{n^2 \cdot d}{1800}$ und $z_R = 11,18 \cdot \left(\frac{n}{1000}\right)^2 \cdot r$

z_R = Schleuderzahl, Schleuderziffer, g-Zahl

a_Z = Zentrifugalbeschleunigung

n = Drehzahl [min^{-1}]

d = Durchmesser der Zentrifugentrommel [m]

r = Radius der Zentrifugentrommel [cm]

Zur weiteren Vergleichbarkeit wird die äquivalente Klärfläche Σ (Gl. 10) herangezogen, die die rechnerische Sedimentationsfläche eines theoretischen Beckens wiedergibt, welches mit der einfachen Erdbeschleunigung arbeitet.

(Gl. 10) $\Sigma = z_R \cdot A_R = z_R \cdot 2\pi r_R \cdot L_{\text{eff}}$

Σ = äquivalente Klärfläche (Sigma-Wert)

A_R = wirksame zylindrische Rotorfläche oder Trennfläche

r_R = Radius der Überlaufkante einer Überlaufzentrifuge (Wehrscheibe)

L_{eff} = Länge der effektiven Trennzone (Gesamtlänge minus Ein- und Auslaufzone)

Für durchströmte Zentrifugen kann die in Abb. 44 dargestellte Überlaufzentrifuge als idealisiertes Beispiel dienen. In Gl. 11 sind die Zusammenhänge der Betriebsgrößen (Drehzahl, Durchsatz), Geometrie (Durchmesser und Länge des Rotors, Durchmesser des Überlaufendes (Wehrscheibe)), Stoffeigenschaften (Zähigkeit der Flüssigkeit, Dichtedifferenz) und Abscheidequalität (Trennkorngröße) dargestellt. Wird von einem Schichtenmodell nach REUTER (1967) ausgegangen, so wird in der Einlaufzone die zugeführte Suspension zunächst auf Umdrehungsgeschwindigkeit des Rotors beschleunigt, so dass der axiale Transport dann in einer überströmten Schicht Richtung Auslaufzone fließt. Der übrige Zentrifugenraum wird als stagnierende Schicht betrachtet. Ein Partikel einer bestimmten Größe, welches über die Zulaufzone beschleunigt in die Trennzone eintritt, ist dann abgeschieden, wenn es in der gleichen Zeit radial die Strecke ($r_S - r_0$) und axial die Trennzonenlänge (effektive Länge, $L_{\text{eff}} \approx (0,8 \dots 0,9 \cdot L)$) zurückgelegt hat und somit nicht über die Wehrscheibe ausgetragen wird (STIEß 1997).

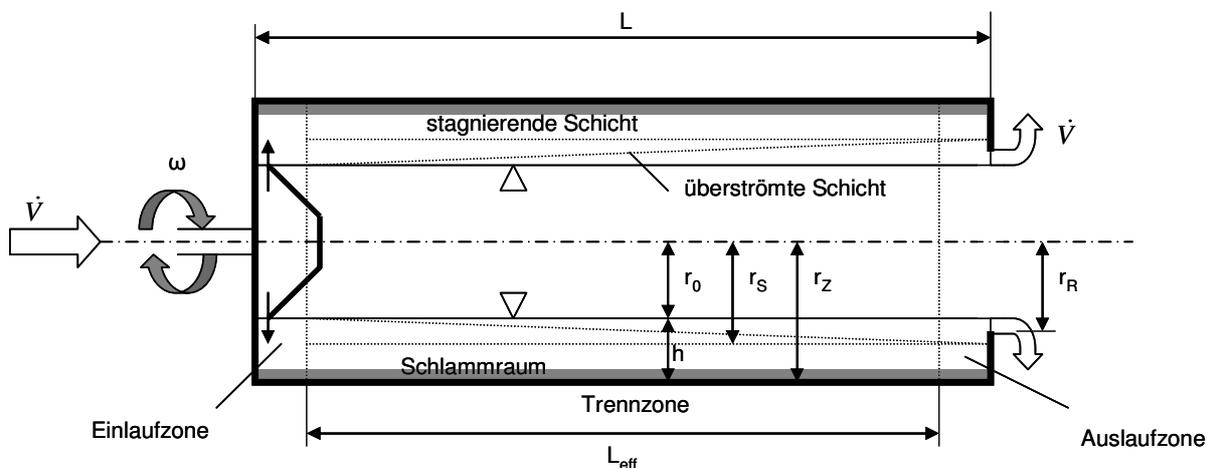


Abb. 44: Überlaufzentrifuge (STIEß 1997)

$$(Gl. 11) \dot{V} = k_{St} \cdot \underbrace{\frac{\Delta\rho \cdot g \cdot d_t^2}{18 \cdot \eta}}_{v_s} \cdot \underbrace{\frac{r_R \cdot \omega^2}{g}}_{z_R} \cdot \underbrace{2\pi r_R \cdot L_{eff}}_{A_R}$$

\dot{V} = Volumenstrom durch die Überlaufzentrifuge

d_t = Trennkorngröße

Röhrenzentrifugen und Kammerseparatoren kommen diesem idealisierten Modell der Überlaufzentrifuge schon sehr nahe, bei Vollmantelschneckenentrifugen und Tellerseparatoren sind weitere Einflüsse, wie Austragsschnecke und Tellerpaket zu berücksichtigen.

3.3.5 Membranverfahren

Die in dieser Arbeit besonders im Fokus stehenden Trenntechniken sind die (feine-)Ultra- und Nanofiltration, die zu den Membranverfahren zu zählen sind. Membranverfahren werden in seltenen Fällen als Dead-End-Filtration oder in der Regel als Crossflow-Filtration betrieben (Abb. 45), wobei erstere beispielsweise in der Biotechnologie als Sterilfilter eingesetzt werden. Die Cross-Flow-Filtration hingegen findet vorzugsweise in der Aufkonzentrierung oder Abtrennung von suspendierten Feststoffen sowie Trennung flüssiger (gelöster) Substanzen Anwendung.

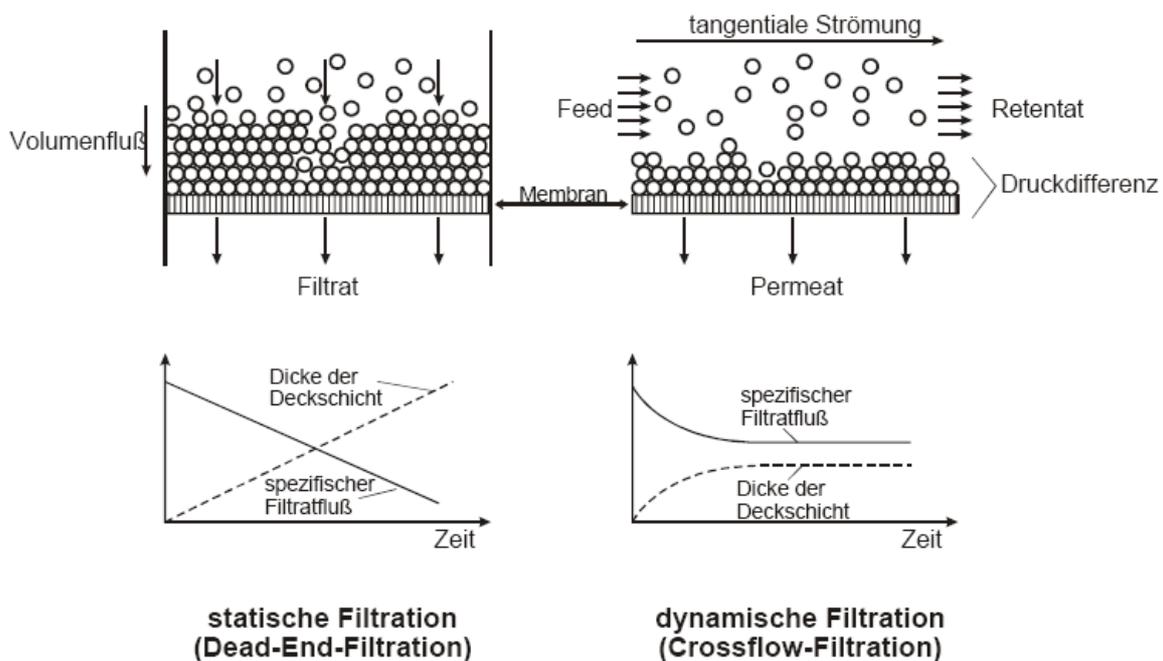


Abb. 45: Filtrationsarten Dead-End-Filtration und Crossflow-Filtration (UNI HANNOVER 2007)

Die „Membranfiltration“ ist ein Sammelbegriff für die Umkehrosmose (UO), Nano- (NF), Ultra- (UF) und Mikrofiltration (MF), die sich nach ihren Trenneigenschaften und –mechanismen unterscheiden (Abb. 46), wobei die Einteilung nicht normiert ist und durch die stetige Weiterentwicklung die Grenzen zwischen den Filtrationen fließend sind.

Bei der Mikrofiltration werden offene Membranen eingesetzt, die das Passieren der meisten gelösten Stoffe ermöglichen, während nicht gelöste Teilchen (suspendierte Partikel), Bakterien und Ölkügelchen (Ölemulsionen) zurückgehalten werden (Siebeffekt). Bei der Ultrafiltration ist die Membranstruktur schon deutlich weniger offen oder bereits dicht und

erlaubt lediglich das Passieren von Salzen, Zuckern, organischen Säuren und kleinen Peptiden, jedoch nicht von Proteinen, Fett und Polysacchariden (Siebeffekt, zum Teil Diffusionseffekt). Der Arbeitsdruck erhöht sich durch die dichtere Struktur des Materials bereits erheblich. Die Nanofiltration stellt eine relativ neue Disziplin in der Membranfiltration dar und ist durch die Fortschritte der Membranherstellung erst möglich geworden. Es werden dichte Membranen eingesetzt, die kleine Ionen, wie Natrium oder Chlorid passieren lassen, jedoch die meisten organischen Verbindungen zurückhalten. Die Umkehrosmose arbeitet wegen der Überwindung des osmotischen Druckes (Gl. 12) und der Verwendung dichter Membranen mit relativ hohen Drücken. Hier werden nahezu alle gelösten Stoffe zurückgehalten, wobei nur Wasser passiert (Tab. 11, Abb. 46) (NIELSON 2004).

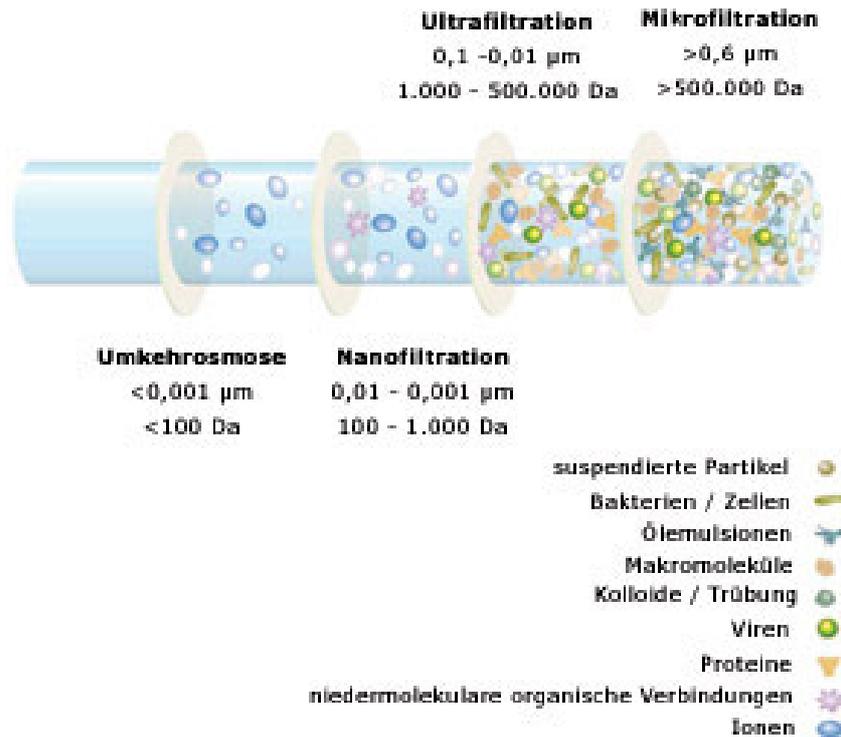


Abb. 46: Crossflow Membranfiltration als Trennmethode suspendierter oder gelöster Stoffe nach Molekülgröße und Größe (MICRODYN-NADIR 2007)

$$(Gl. 12) \pi = z_i \cdot \frac{(c_{mi} - c_{pi})}{M_i} \cdot R \cdot T$$

π = osmotischer Druck

z_i = Dissotiationsgrad der Komponente i

c_{mi} = Konzentration der Komponente i an der Membraninnenseite

c_{pi} = Konzentration der Komponente i im Permeat

M_i = Molmasse der Komponente i

R = allgemeine Gaskonstante [8,314 J/K mol]

T = Temperatur

Bei der MF und UF werden die Trenngrenzen anhand der kleinsten zurückgehaltenen Partikel- bzw. Molekülgrößen in µm angegeben, da vornehmlich der Siebeffekt als Trennprinzip wirkt (Umrechnung von Fadenmolekülen, Scheibenmolekülen und Kugelmolekülen mit den Gl. 13 – 15).

(Gl. 13) $L = 0,11 \cdot M$ für Fadenmoleküle

(Gl. 14) $D = \sqrt{M}$ für Scheibenmoleküle

(Gl. 15) $D = 1,4 \cdot \sqrt[3]{M}$ für Kugelmoleküle

L, D, M = Moleküllänge, -durchmesser, -masse

Tab. 11: Vergleich der Membranfiltrationsverfahren (IRMLER 2001, NIELSON 2004)

Verfahren (Abkürzung)	Membran Porengr. [μm]	Gewöhnliche Transmemb.- drücke [bar]	Trennprinzip	Hauptbegrenzung
Mikrofiltration (MF)	$10^{-1} - 10^1$	<1	Siebeffekt	Einstellung des Transmembrandrucks, Zusetzen der Poren
Ultrafiltration (UF)	$10^{-2} - 10^{-1}$	1 - 10	Siebeffekt	Gelbildung/Konzentrations- polarisierung/Viskosität des Retentats
Nanofiltration (NF)	$10^{-3} - 10^{-2}$	20 - 35	Lösung / Diffusion	osmotischer Druck
Umkehrosmose (UO, RO)	$10^{-4} - 10^{-3}$	30 - 80	Lösung / Diffusion	osmotischer Druck

Bei der feinen UF und NF wird die nominale Trenngrenze (NMWC, nominal molecular weight cut-off, aber auch MWCO molecular weight cut-off oder kurz cut-off; Ausschlussgrenze) der Membranen anhand der Molmassen der kleinsten zurückgehaltenen Moleküle in Dalton angegeben (Dalton entspricht dem Zahlenwert g/mol). Definitionsgemäß ist ein Molekül zurückgehalten, wenn seine Rückhaltung 90 % beträgt (PUHLFÜRSS et al. 2000). Die Rückhaltungen und damit die Trenngrenzen werden in der Praxis für die MF und UF mit Protein- und Polymerstandards (Dextrane und PEG) und zusätzlich für die NF mit kleineren Testsubstanzen, wie Vitamine und Zucker, bestimmt (Anhang II) (Abb. 47).

Je steiler die im Rückhaltungsvermögen/Ausschlussgrenze-Diagramm (Abb. 47) gezeigte Kurve ist, desto schärfer ist die Trenngrenze. Die Rückhaltung kann nach Gl. 16 ermittelt werden. Neben dem Parameter der Trenngrenze zur Auswahl einer geeigneten Membran sind weitere Faktoren, die auf die Leistung Einfluss haben, zu berücksichtigen, wie z. B. Gehalt und Form des gelösten Moleküls bzw. Makromoleküls, Wechselwirkungen des Moleküls und der Matrix mit dem Membranmaterial, Fouling und Konzentrationspolarisation (NIELSON 2004).

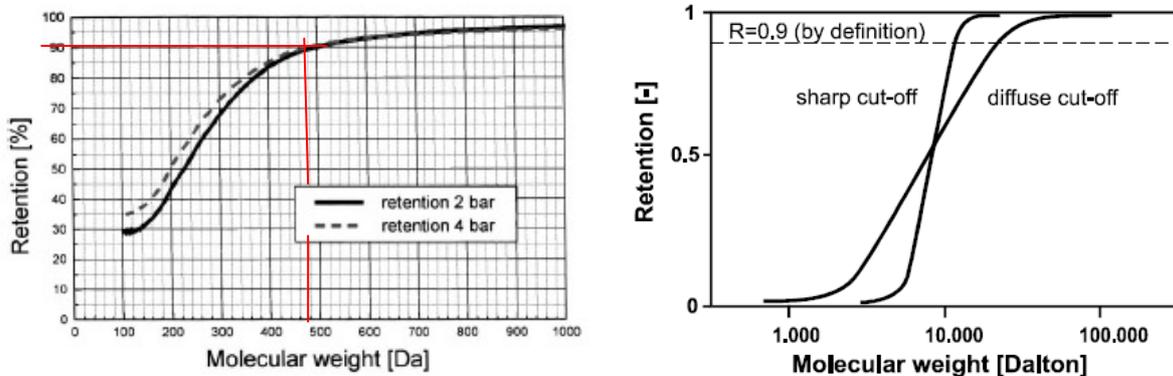


Abb. 47: Rückhaltungsvermögen/Ausschlussgrenze-Diagramm einer keramischen TiO_2 -Membran (PEG Cut-Off 480 Da, 90 % Rückhaltung) (PUHLFÜRSS et al. 2000) sowie eine allgemeine Darstellung eines Rückhaltungsvermögen/Ausschlussgrenze-Diagramms

$$(Gl. 16) R_i = \left(1 - \frac{c_{i,Permeat}}{c_{i,Feed}} \right) \cdot 100\%$$

R_i = Rückhaltung einer Komponente i

$c_{i,Permeat}$ = Konzentration der Komponente i im Permeat

$c_{i,Feed}$ = Konzentration der Komponente i im Feed (Zulauf, Rohlösung)

Membranfilter unterscheiden sich weiter durch ihr Membranmaterial (org. Polymere, anorg. Materialien (Keramiken) (Anhang III)), ihren Membranaufbau (symmetrische, asymmetrische Membranen (Abb. 48)) und Morphologie (porös, dicht) sowie ihrem Modulaufbau (Tab. 12).

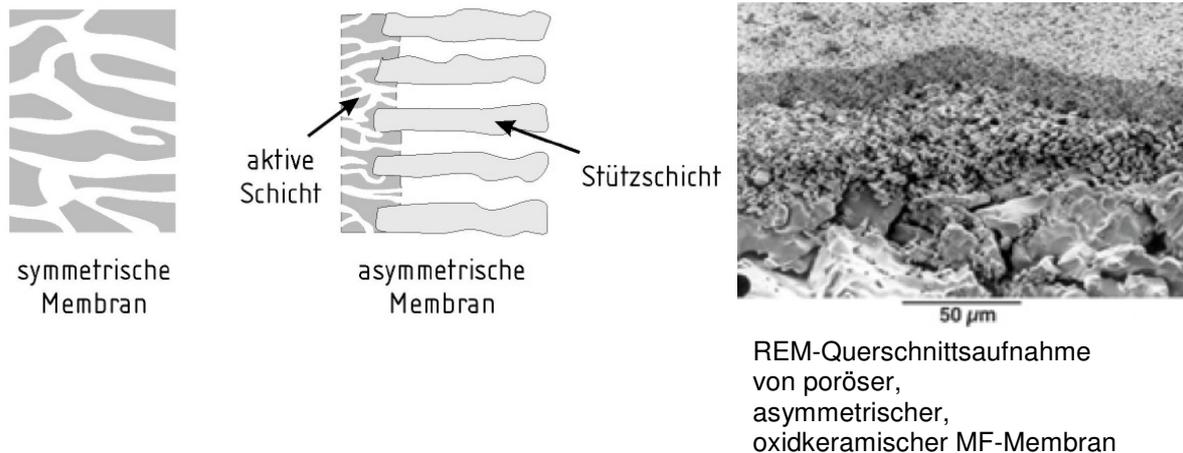


Abb. 48: Symmetrische und asymmetrische Membranen (GLASMACHER 2007)

Um ausreichende Filterleistungen auf angemessenem Raum unterbringen zu können, werden Membranen in so genannten Modulen angeordnet, in denen das Membranmaterial als Trennwand zwischen Permeat und Retentat fungiert und zugleich eine kontrollierte Überströmung des Membranmaterials zulässt. Die Bauarten der Membranmodule können nach der Bauweise und Anordnung des Membranmaterials unterteilt werden (Tab. 12).

Organische sowie keramische Ultra- und Nanofiltrationsmembranen haben eine asymmetrische Struktur. Die aktive Oberfläche der Membran, welche mit der zu trennenden Flüssigkeit in Kontakt steht, ist bei organischen Membranen eine dichte mikroporöse Schicht und bei keramischen Membranen eine offene mikroporöse Schicht, die auf eine sehr poröse Stützstruktur aufgebracht ist. Die Stützstruktur wirkt lediglich als Träger für die extrem dünne aktive Schicht und hat keinen Einfluss auf die Filtrationseigenschaften der Membran. Da die eigentliche Trennschicht extrem dünn ist, können hohe Flussraten erreicht werden. Aufgrund der hochasymmetrischen Struktur werden alle Stoffe jenseits der Ausschlussgrenze an der Membranoberfläche zurückgehalten, wodurch Verstopfung (Fouling) der Poren von innen schwer möglich ist. Während Fouling somit in den Poren bei asymmetrischen Membranen so gut wie nicht vorkommt, muss der Belag auf der Membranoberfläche mit ihrer feinporigen Struktur möglichst gering gehalten werden. Die Konzentration gelöster vor allem niedermolekularer Stoffe an der Membranoberfläche steigt jedoch aufgrund des Filtrvorgangs an, was zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks führt und sich damit negativ auf den Permeatfluss auswirkt. Man nennt diesen Effekt Konzentrationspolarisation. Durch diese Konzentrationserhöhung kommt es unter Umständen zu einer Überschreitung der Löslichkeit von Inhaltsstoffen und damit zu einer Ausbildung einer gelartigen Schicht, die wie eine zweite Membran wirkt. Die Filmtheorie (Diffusionsmodell) geht davon aus, dass durch die Konzentrationserhöhung an der Membran, aufgrund des Konzentrationsgradienten, eine Rückdiffusion der zurückgehaltenen Komponenten stattfindet. Die Trenncharakteristik wird nun neben denen der eigentlichen Membran auch von der gebildeten Gelschicht und deren Permeabilität beeinflusst. Da die Dicke der

Gelschicht von der Rückwanderung (Rückdiffusion) der Stoffe in das Retentat abhängt, kann sie vor allem durch die Wahl geeigneter Strömungs- und Diffusionsverhältnisse positiv beeinflusst werden. Der Einsatz der Cross-Flow-Filtrationstechnik führt zu einer hohen Überströmgeschwindigkeit der Membran, so dass eine möglichst kleine laminare Filtergrenzschicht zwischen Kernsuspension bzw. -lösung und der Membranoberfläche erzeugt wird und so Foulingeffekte (hauptsächlich MF und UF) und die Konzentrationspolarisation mit Gelschichtbildung (hauptsächlich feine UF und NF, UO) reduziert werden, was zu einem höheren Permeatfluss führt (Abb. 49). Der Stoffaustausch lässt sich in Analogie zum Wärmeaustausch aus Ähnlichkeitstheoretischen Überlegungen beschreiben.

Tab. 12: Bauarten von Membranmodulen

Bauart des Moduls	Bauweise der Membran	Anordnung der Membran	Darstellung
Kapillarmodul, Hohlfasermodul	rohrförmige Membrane	wie Rohrbündelwärmetauscher, Membranröhrchen mit 0,5-1,5 mm Durchmesser	
Rohrmodul		schlauchförmige Membran liegt in druckfestem Rohr (d=10-15 mm) mit Drainagevlies zur Permeat-abführung	
Plattenmodul	Fachmembrane	sandwichartiger Aufbau von Träger, Membran und Rechteckkanälen	
Wickelmodul, Spiralmodule		Flachmembranen in Form von Membrantaschen mit zwischen den Taschen liegendem Trenngeflecht, spiralförmig auf perforiertem Rohr aufgewickelt	

Neben der Strömungsgeschwindigkeit wird das Fouling- und Konzentrationspolarisationsverhalten einer asymmetrischen Membran stark von der Oberflächenbeschaffenheit, d. h. insbesondere vom Material der Membran, beeinflusst. Nichtgelöste Stoffe und größere Moleküle sind häufig hydrophob (Wasser abstoßend). Da die üblicherweise verwendeten polymeren Membranmaterialien ebenfalls hydrophob sind, lagern sich Partikel und größere Moleküle bevorzugt darauf ab. Dies gilt insbesondere, wenn es sich um lösemittelresistente und pH-stabile Membranen handelt. Umgekehrt sind hydrophile Membranen wesentlich resistenter gegen Fouling (geringere Ablagerung) (MICRODYN-NADIR 2007). Feine UF- und NF-oxidkeramische Membranen, die mittels polymerer Sol-Gel-Technik hergestellt werden (Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2 und SiO_2), besitzen hervorragende hydrophile Eigenschaften zur Wasserfiltration. Zugleich weisen sie mit diesem Benetzungsverhalten jedoch auch deutlich schlechtere Trenneigenschaften bei organischen Lösungsmitteln auf. Diesem Verhalten kann

mit der Hydrophobisierung der Membranoberfläche mit Silanen entgegengewirkt werden (OHLROGGE und EBERT 2006).

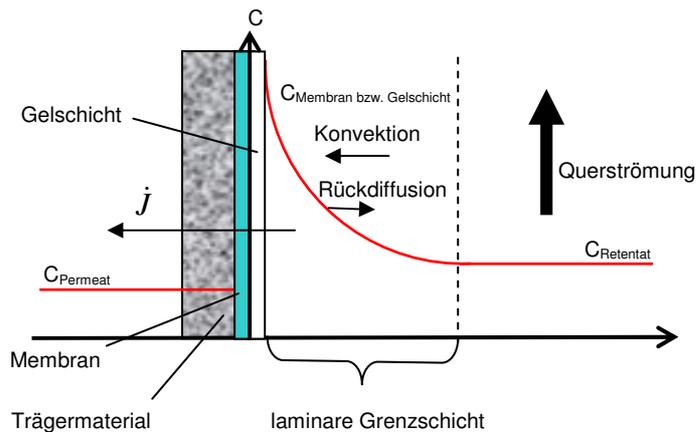


Abb. 49: Konzentrationsverlauf, Konzentrationspolarisation an der Membranoberfläche (HESS 1991)

Keramische Membranen zeichnen sich weiter durch ihre hohe Stabilität unter chemisch-korrosiven, thermischen und mechanischen Belastungen aus. Dies ermöglicht den Einsatz bei Anwendungen, bei denen organische Polymermembranen unzureichende Stabilitäten aufweisen. Darüber hinaus sind die Reinigbarkeit mit scharfen Chemikalien und die Sterilisation mittels Dampf möglich, wodurch die Lebensdauer erheblich verlängert wird (OHLROGGE und EBERT 2006). Nachteilig sind die hohen Investitionskosten keramischer Membranen, die bisher begrenzte Verfügbarkeit von Membranen mit Trenngrenzen im NF-Bereich und darunter, die geringere Filterflächendichte (m^2 Filterfläche pro m^3 Modul) sowie die eingeschränkte Verfügbarkeit spezieller Oberflächen, wo die organischen Membranen ihre Vorteile aufweisen. Eine Zunahme des Anteils an Keramikmembranen wird mit fortschreitender Entwicklung deutlich (IRMLER 2001).

Zwei gängige Betriebsweisen der Querstromfiltration sind in Abb. 50 dargestellt. An dieser Stelle soll erwähnt sein, dass die Querströmung auch auf anderem Wege realisierbar ist, indem das Filtermaterial rotiert und die Suspension bzw. Lösung ruht. Diese Möglichkeit wird z. Z. insbesondere für keramische Materialien entwickelt und findet momentan noch sehr begrenzte Anwendungen.

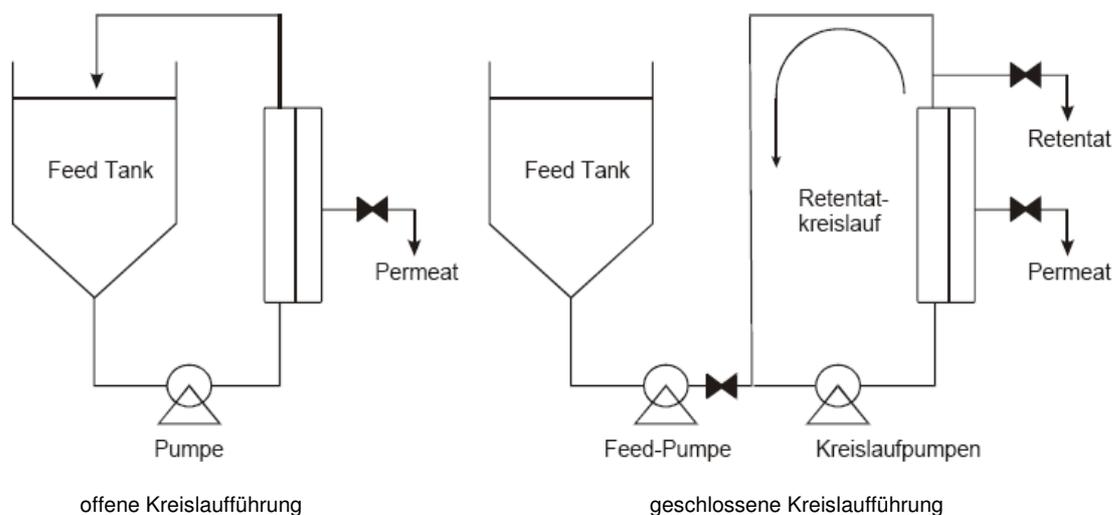


Abb. 50: Betriebsweisen von Membrananlagen (UNI HANNOVER 2007)

Die drei Haupttypen der Bildung von Ablagerungen auf der Membran sind Partikel (Trübstoffe), Biofouling (mikrobiologischer Aufwuchs) und Scaling (zumeist kristalline Ausfällungen). Weitere Einflussfaktoren des Fluxverlusts sind die erwähnte Konzentrationspolarisation sowie chemische und physikalische Veränderungen in der Membran. Die Erhöhung des transmembranen Drucks bringt nur kurzzeitig Erfolg, so dass die mit dem Filtrationsvorgang gebildete Foulingschicht entfernt werden muss, um das Filter zu regenerieren. Dies kann durch eine kurzfristig höhere Fließgeschwindigkeit, oder durch Rückspülen mit sauberem Permeat oder Luft erfolgen (Forward Flush, Backward Flush, Air Flush), oder auch durch chemische Reinigung.

Drei Faktoren bestimmen maßgeblich die Effektivität des Filtrationsprozesses:

1. Die Selektivität als Rückhaltevermögen (Gl. 15) oder Selektivität (Gl. 16)
2. Die Produktivität als spezifischer Permeatfluss [L Permeat/m² Filterfläche*h]
3. Die Ausbeute (Gl. 17) bzw. der Volumenkonzentrationsfaktor ($VCF_{(t)}$), mit dem die Aufkonzentrierung des Retentats zu jeder Zeit berechnet werden kann (Gl. 18).

$$(Gl. 16) S_{ij} = \frac{(c_{iP} / c_{jP})}{(c_{iF} / c_{jF})}$$

S_{ij} = Selektivität

c_{iP}, c_{iF} und c_{jP}, c_{jF} = Konzentration der Komponente i bzw. j im Permeat bzw. im Feed

$$(Gl. 17) Y = \frac{V_P}{V_F} = \frac{\dot{V}_P}{\dot{V}_F}$$

Y = Ausbeute

V_P, \dot{V}_P = Volumen bzw. Volumenstrom des Permeats

V_F, \dot{V}_F = Volumen bzw. Volumenstrom des Feeds

$$(Gl. 18) VCF_{(t)} = \frac{V_F}{V_{R(t)}} = \frac{V_F}{(V_F - V_{P(t)})}$$

$VCF_{(t)}$ = Volumenkonzentrationsfaktor zum Zeitpunkt t

$V_{R(t)}, V_{P(t)}$ = Retentat- bzw. Permeatvolumen zu Zeitpunkt t

Zur Auslegung von Membrananlagen sind weiter der mittlere transmembrane Druck und die dafür einzubringende Leistung der Pumpe bzw. Pumpen wichtige Kenngrößen. Der mittlere transmembrane Druck ergibt sich in der Querstromfiltration als Mittel des Druckverlustes bei der Durchströmung des Membranmoduls (Gl. 19) (Abb. 51).

$$(Gl. 19) \Delta p_{tm} = \frac{(p_E - p_A)}{2} - p_P$$

Δp_{tm} = mittlerer transmembraner Druck

p_E = Eingangsdruck ins Modul

p_A = Ausgangsdruck aus dem Modul

p_P = Ausgangsdruck des Permeats (bei freiem Ablauf ≈ 0 bar)

Die Pumpenleistung ist abhängig von der gewünschten Überströmgeschwindigkeit (turbulent) und dem damit erforderlichen Volumenstrom, dem benötigten mittleren

transmembranen Druck, der vom hydrodynamischen Druckverlust entlang der Strömungsführung im Modul abhängt (Gl. 21), dem Druckverlust in der gesamten weiteren Apparatur und letztlich vom Wirkungsgrad der Pumpe selber (Gl. 20).

$$(Gl. 20) P = \frac{\Delta p \cdot \dot{V}}{\eta} + P_{Apparatur} \quad \text{für offene Kreislaufführung (Abb. 50)} \quad P = \frac{p_E \cdot \dot{V}}{\eta} + P_{Apparatur}$$

P = Leistung der Pumpe

Δp = hydrodynamischer Druckverlust im Modul

\dot{V} = Überströmvolume (Zirkulationsvolumenstrom)

η = Wirkungsgrad der Pumpe ($\approx 0,7$)

$P_{Apparatur}$ = Druckverlust in der restlichen Apparatur

$$(Gl. 21) \Delta p = \lambda \cdot \frac{\rho}{2} \cdot w^2 \cdot \frac{1}{d_h} (= p_E - p_A)$$

λ = Widerstandsbeiwert des Moduls

ρ = Dichte

w = Überströmgeschwindigkeit

d_h = hydraulische Durchmesser

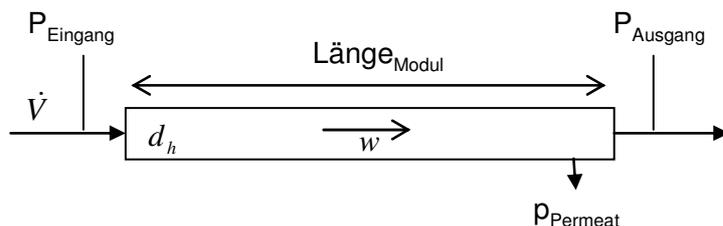


Abb. 51: Charakterisierung des Moduls

Weiter ist die Temperatur als Einflussfaktor des Permeatflusses (Flux, Transmembranfluss, Durchtrittsrate) zu berücksichtigen. Steigende Temperatur reduziert die Viskosität der meisten Flüssigkeiten. Bei Wasser um etwa 2,5 % pro Kelvin (IRMLER 2001), was in einer ähnlichen Größenordnung den Permeatfluss erhöht, so dass zur Temperaturkorrektur Gl. 22 herangezogen werden kann.

$$(Gl. 22) \dot{J}_{korr} = \dot{J} + \frac{\dot{J} \cdot (2...3[\% / K]) \cdot \Delta T}{100\%}$$

\dot{J}_{korr} = korrigierter Permeatfluss

\dot{J} = gemessener Permeatfluss

$\Delta T = T_{Bezug} - T_{gemessen}$ = Temperaturdifferenz (Bezugstemperatur = normierte Temperatur)

Bei der Betrachtung des Stofftransports durch die Membran sind zwei Modelle zum Verständnis der grundlegenden Vorgänge nötig. Zum einen das Lösungs-Diffusionsmodell, welches seine Anwendung hauptsächlich für die UO und NF (Diffusionseffekte) findet und zum anderen das Porenmodell, welches eher der UF und MF zuzuordnen ist (Siebeffekte). Im Übergangsbereich von porösen zu nichtporösen (dichten) Membranen sind beide Modelle in Betracht zu ziehen (Abb. 52).

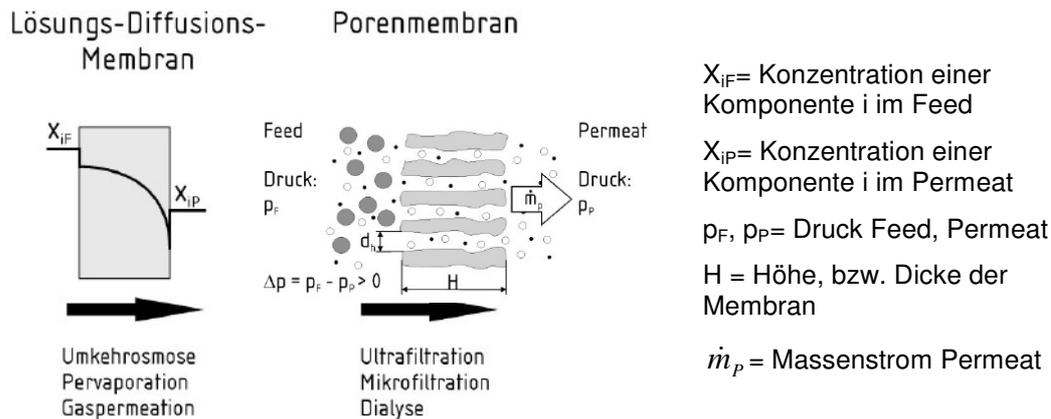


Abb. 52: Idealisierte Modelle einer Membran (GLASMACHER 2007)

Beim **Lösungs-Diffusionsmodell** wird der Stofftransport durch die Membran durch Diffusion beschrieben. Dazu werden folgende Annahmen getroffen:

- Die Membran wird als homogenes, porenfreies Medium betrachtet
- Alleiniger Transportmechanismus durch die Membran ist die Diffusion
- Gültigkeit des 1. Fick'schen Gesetzes (Gl. 5 und für Membranen vereinfacht Gl. 23), d. h. es wird ein linearer Konzentrationsgradient in der Membran vorausgesetzt
- Gleichheit der chemischen Potentiale an der Phasengrenzfläche

$$(Gl. 23) \quad J_m = -D \frac{dc}{dz}$$

J_m = Massenfluss durch die Membran

D = Diffusionskoeffizient

c = Konzentration der betreffenden Komponente

z = z-Koordinate (Dicke der Membran, Diffusionsweg)

Das Fick'sche Gesetz (Gl. 23) wird unter Einbeziehung der Konzentrations- und Druckabhängigkeit des chemischen Potentials (Gl. 24) sowie der Beziehung des osmotischen Drucks (Gl. 12 und 25) umgeformt zu den Gl. 26 und 27, die das Verhalten von Lösungsmittel und Gelöstem beim Durchgang durch die Membran beschreiben.

$$(Gl. 24) \quad \mu = \mu^0 + RT \ln|\alpha| + \tilde{V}(p - p^0)$$

$$(Gl. 25) \quad \pi = -\frac{RT}{\tilde{V}} \ln|\alpha|$$

$$(Gl. 26) \quad J_s = A(\Delta p - \Delta \pi)$$

$$(Gl. 27) \quad J_g = B(c_1 - c_2)$$

μ, μ^0 = chemisches Potential, chemisches Potential unter Standardbedingungen

α = Aktivität, \tilde{V} = Molvolumen

p, p^0 = Druck, Standarddruck

J_s, J_g = spezifischer Permeatfluss, Fluss des Gelösten

A, B = Membrankonstanten

So zeigt sich, dass der Permeatfluss des Lösungsmittels proportional dem Nettodruckgefälle über die Membran ist. Das Nettodruckgefälle ist die Differenz der Druckgradienten vom osmotischen Druck und hydraulischem Druck. Der Fluss des Gelösten ist proportional dem Konzentrationsgefälle zwischen Membranoberfläche und Kernströmung. Die Membrankonstanten A und B sind konzentrationsunabhängig und besitzen eine exponentielle Abhängigkeit von Druck und Temperatur (RAUTENBACH und RAUCH 1977).

Im **Porenmodell** wird die Membran als ein von Kanälen durchzogenes Gebilde betrachtet, so dass ein Vergleich zur Strömung in Röhren gezogen werden kann. Die Widerstandscharakteristik im laminaren Bereich ist hier durch das *Hagen-Poiseuillesche Gesetz* gegeben (Gl. 28a und b), für das die Kapillaren in der porösen Membran vereinfacht als parallele Röhren betrachtet werden.

$$(Gl. 28a) \quad \dot{j}_{Kap} = \frac{d^2 \Delta p}{32 \eta L}$$

und für die Anzahl von n Kapillaren entsprechend

$$(Gl. 28b) \quad \dot{J} = n \cdot \dot{j}_{Kap}$$

\dot{j}_{Kap}, \dot{J} = Permeatfluss einer Kapillare bzw. Gesamtpermeatfluss von n Kapillaren

d = Kapillardurchmesser

Δp = Druckdifferenz (Druckverlust in der Kapillare)

η = dynamische Viskosität

L = Länge der Kapillare

Wie in Abb. 48 gezeigt, sind reale Membranen als poröse, schwammartige Strukturen aufzufassen, so dass die verfahrenstechnischen Parameter Porosität, die volumenbezogene spezifische Oberfläche, der hydraulische Durchmesser (Gl. 29) und ein Umwegfaktor (Labyrinthfaktor) in Gl. 28 eingesetzt werden, um realen Bedingungen näher zu kommen. In Gl. 30 ist zu sehen, dass bei Zusammenfassung aller membranspezifischen Parameter zu einer Membrankonstanten der Permeatfluss ausschließlich von der treibenden Kraft der Druckdifferenz, also dem transmembranen Druck abhängt.

In der Praxis ist jedoch weiter die Foulingschicht zu berücksichtigen, die allerdings mit den prozesstechnischen Parametern beeinflusst werden kann. Gerade Pektine bilden gerne Gele als Foulingschicht auf der Membran und wirken wie eine Sekundärmembran, was bei der Obst und Gemüseverarbeitung zu Problemen bei Filtrationsprozessen führen kann.

$$(Gl. 29) \quad d_h = \frac{4\varepsilon}{(1-\varepsilon)S_v}$$

$$(Gl. 30) \quad \dot{J} = \frac{\varepsilon^3}{\underbrace{\eta(1-\varepsilon)^2 S_v^2 \mu_L H}_{A_{PorenM}}} \cdot \Delta p = A_{PorenM} \cdot \Delta p$$

d_h = hydraulischer Durchmesser, ε = Porosität

S_v = volumenbezogene spezifische Oberfläche

μ_L = Labyrinthfaktor $\mu_L = L_{Kap} / H$

L_{Kap} = tatsächliche Länge der Kapillare

H = Membranhöhe (Membrandicke), A_M = Membrankonstante

3.3.6 Chromatographie

Chromatographie ist eine physikalisch-chemische Methode zur Stofftrennung in einem System aus einer stationären und einer mobilen Phase. Sie kann nach ihren mobilen Phasen in Gas- und Flüssigkeitschromatographie unterteilt und weiter nach ihren Trennverfahren und Trennmechanismen untergliedert werden. Eine Sonderform stellt die Supercritical Fluid Chromatography dar, bei der mit überkritischen, mobilen Phasen gearbeitet wird und zwischen der Gas- und Flüssigkeitschromatographie angesiedelt ist (Abb. 53).

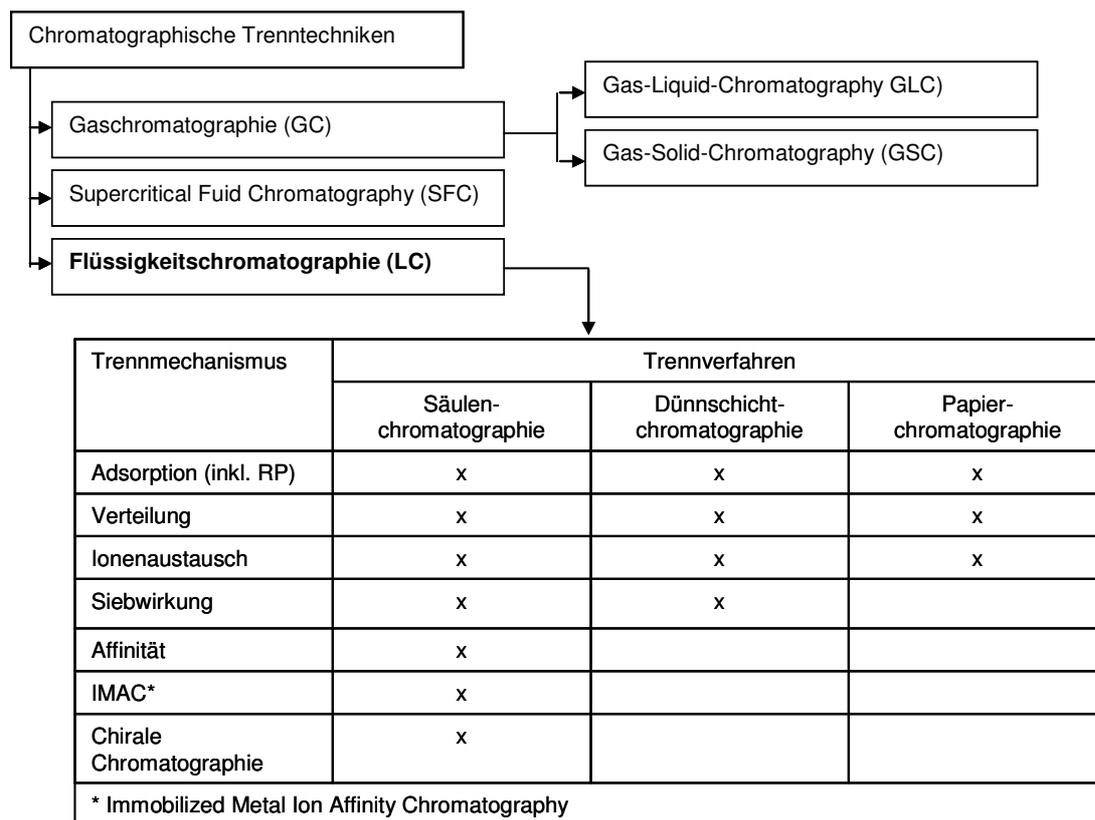


Abb. 53: Unterteilung chromatographischer Trenntechniken (HENKE 1999)

Zur präparativen Isolierung größerer Stoffmengen hat sich die Säulenchromatographie etabliert, so dass diese in der Konzeptionierung der Trennstrategie einen festen Platz einnimmt. Für die Trennung von Polyphenolen sind im analytischen Maßstab modifizierte Reversed Phase- (RP)-Kieselgele im Einsatz, die C_8 und C_{18} Ketten aufweisen und so unpolar sind. Als Laufmittel dienen polare Lösungsmittel wie Wasser mit Alkoholanteilen, Ethanol, Methanol, Acetonitril. Zur semi-präparativen Isolierung einzelner Polyphenole, die als Standardsubstanzen am Markt verfügbar sind, werden ebenfalls diese Systeme in geringfügig vergrößertem Maßstab (etwa Faktor 10) eingesetzt.

Weitere Sonderformen der Chromatographie sind die Droplet Counter-Current Chromatography (DCCC), Rotation Locular Counter-Current Chromatography (RLCC), Centrifugal Counter-Current Chromatography (CCC), Zirkular-Chromatographie und die Extraktions-Chromatographie, die ebenfalls zumeist zur semi-präparativen Isolierung von Naturstoffen eingesetzt werden (HENKE 1999).

Bei der Säulenchromatographie wird die mobile Phase mit Druck durch eine Säule, die die stationäre Phase enthält, gepumpt. Ein definiertes Volumen an Stoffgemisch wird auf die Säule aufgegeben (injiziert) und die Komponenten des Gemisches mit der mobilen Phase mehr oder weniger schnell durch die Säule transportiert und dann in einem geeigneten Detektor (UV, RI) und Chromatogramm erfasst (Abb. 54). Als Maß für die Tendenz einer Komponente, sich bevorzugt in der mobilen oder in der stationären Phase aufzuhalten, dient

der Verteilungskoeffizient (Gl. 31). Je größer der Verteilungskoeffizient einer Komponente, desto länger seine Retentionszeit.

$$(Gl. 31) K_{Xi} = \frac{c_{i,stat}}{c_{i,mob}}$$

K_{Xi} = Verteilungskoeffizient

$c_{i,stat}$ = Konzentration (eigentl. Aktivität; vgl. Gl. 4) der Komponente i in der stationären Phase

$c_{i,mob}$ = Konzentration der Komponente i in der mobilen Phase

Um eine Trennung eines Stoffgemischs mit einem chromatographischen System zu erreichen sind unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der einzelnen Komponenten erforderlich, so dass unterschiedliche Retentionszeiten resultieren. Die Retentionszeit ist bei gleichen chromatographischen Bedingungen für eine spezifische Komponente immer gleich und damit zur Identifikation einer Komponente geeignet (qualitative Aussage). Die Höhe bzw. die Fläche eines Peaks im Chromatogramm ist der Menge der aufgegebenen Probe proportional und wird zur quantitativen Auswertung des Chromatogramms eingesetzt.

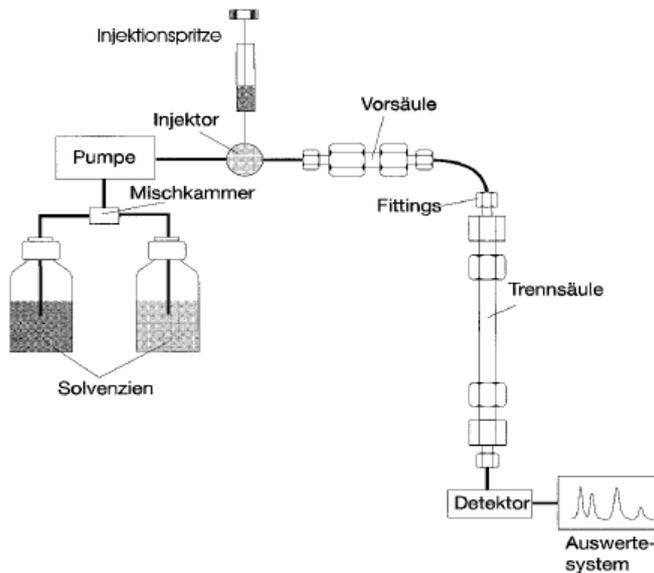
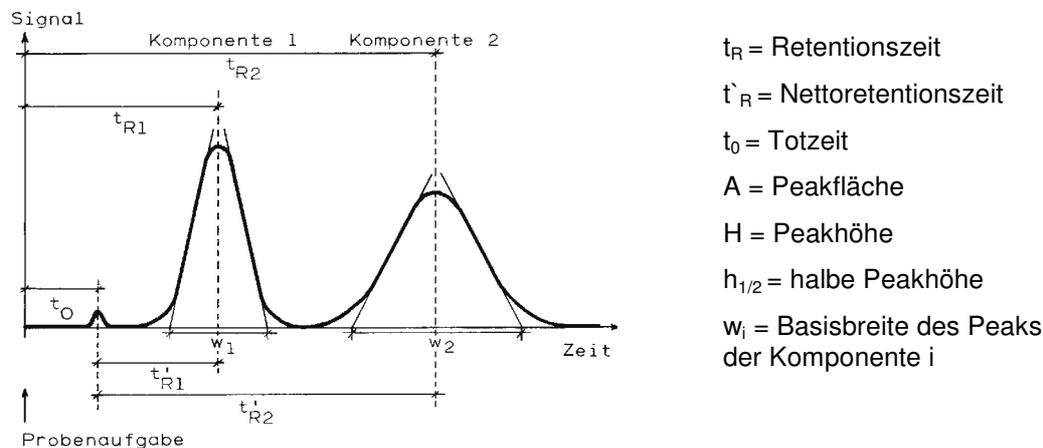


Abb. 54: Schema einer HPLC-Apparatur (PLENIO 2007)

Wichtige Kenngrößen in einem Chromatogramm sind in Abb. 55 und den Gl. 32 bis 34 dargestellt.



t_R = Retentionszeit

t'_R = Nettoretentionszeit

t_0 = Totzeit

A = Peakfläche

H = Peakhöhe

$h_{1/2}$ = halbe Peakhöhe

w_i = Basisbreite des Peaks der Komponente i

Abb. 55: Das Chromatogramm und seine Kenngrößen (MEYER 2004)

Die Retentionszeiten sind von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und der Länge der Säule abhängig, so dass zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Apparaturen, jedoch gleicher Trennsysteme (gleiche mobile und stationäre Phasen), der Retentionsfaktor günstiger geeignet ist (Gl. 32).

$$(Gl. 32) \quad k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k = Retentionsfaktor

t_0, t_R, t'_R = Totzeit, Retentionszeit und Nettoretentionszeit

Ein Maß für die relative Trennung zweier Stoffe ist der Selektivitätsfaktor α , der die Retentionsfaktoren beider Stoffe ins Verhältnis setzt (Gl. 33). Sind beide Retentionsfaktoren gleich, so resultiert eine Selektivität von 1 und damit keine Trennung. Anzustreben sind Selektivitätsfaktoren von etwa $\alpha = 1,5$, um eine ausreichende Trennung zu gewährleisten.

$$(Gl. 33) \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

α = Selektivitätsfaktor

k_1, k_2 = Retentionsfaktor des ersten Peaks bzw. zweiten Peaks ($k_2 \geq k_1$)

Der Selektivitätsfaktor berücksichtigt lediglich die relative Lage der zu trennenden Peaks, jedoch nicht deren Breite. Bei einem chromatographischen Prozess ist die Güte der Trennung zweier benachbarter Peaks besser durch die Auflösung beschrieben (R , Resolution) (Gl. 34). Eine gute Basislinientrennung zweier etwa gleich großer Peaks wird mit einer Auflösung von etwa $R = 1,5$ erreicht, ist einer von beiden Peak wesentlich kleiner, muss die Auflösung erhöht werden.

$$(Gl. 34) \quad R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2,1} - w_{1/2,2}}$$

R = Auflösung, Resolution

t_{R1}, t_{R2} = Retentionszeit Komponente 1 bzw. 2

w_1, w_2 = Basisbreits des Peaks der Komponente 1 bzw. 2

$w_{1/2,1}, w_{1/2,2}$ = Peakbreite auf halber Peakhöhe der Komponente 1 bzw. 2

Bei der Adsorptions- und der Ionenaustauschchromatographie beruht der Trenneffekt auf unterschiedlich starker, aber reversibler Adsorption an der stationären Phase. Das Phasengleichgewicht wird in der Chromatographie häufig durch Adsorptionsisotherme (Sorptionisotherme) beschrieben. In der Flüssigkeitschromatographie stellen sie die auf der Oberfläche der stationären Phase (Sorbent) gebundene Stoffmenge (Sorbit) (q_i^*) in Abhängigkeit von der Stoffmenge in der Lösung (c_i), also der mobilen Phase dar. Je höher die Konzentration einer Komponente i in der mobilen Phase ist, desto größer ist auch die adsorbierte Menge der Komponente i auf dem Chromatographieharz. Der Verlauf der Sorptionsisotherme (linear, degressiv, progressiv) hat maßgeblich Einfluss auf die Peakform im Chromatogramm, da Adsorption und Desorption aus den Isothermen bei fortlaufender Elution abgeleitet werden können. Bei nicht linearen Isothermen resultieren Peaks mit Fronting oder Tailing (Abb. 56). Sorptionsisotherme werden häufig für empirische Modelle verwendet, die keine Aussagen über zugrunde liegende Mechanismen und Einflussgrößen machen. Sie werden aus Messdaten mittels Regressionsanalysen gewonnen. Diese Isothermen können nun mathematisch beschrieben werden, wobei zum Teil physikalische Grundlagen einfließen. Die wichtigsten Modelle sind „Lineare Isotherme“, „Freundlich-Isotherme“, „Langmuir-Isotherme“ und das „BET-Modell“ (DECKERT 1998).

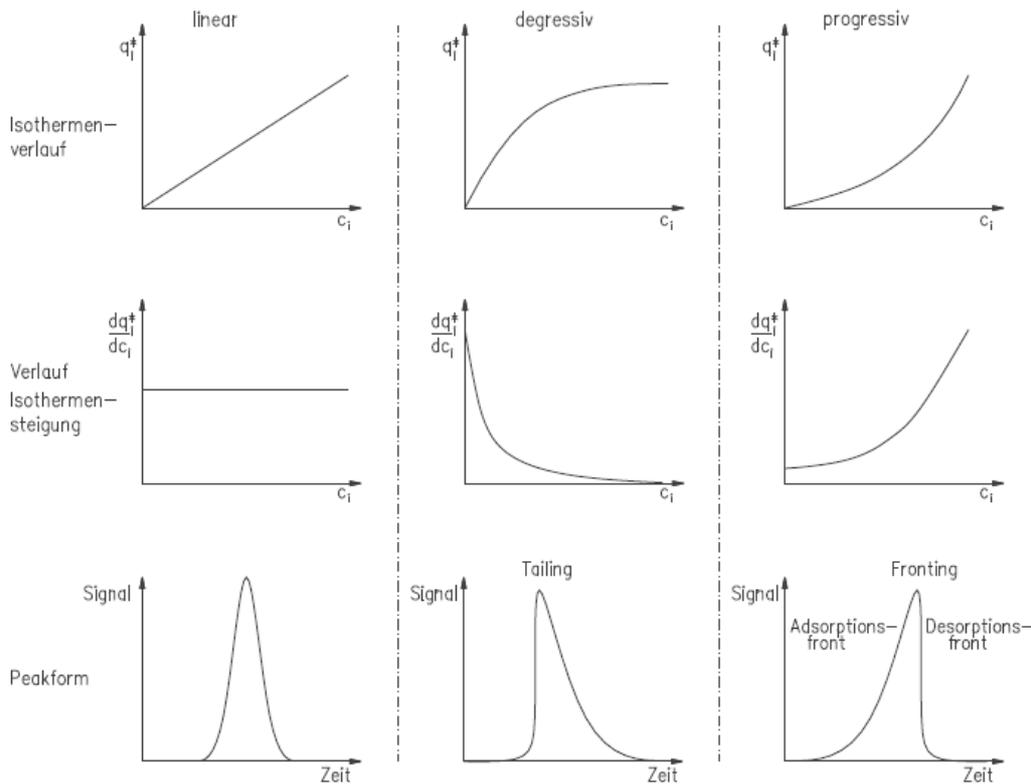


Abb. 56: Sorptionsisotherme und deren zugehörige Chromatogramme (DECKERT 1998)

Die Säuleneffizienz eines chromatographischen System wird mittels theoretischer Bodenzahl (Theoretische Trennstufen; NTU_i , Number of transfer Units) charakterisiert. Als theoretischer Boden, oder kurz nur Boden, wird ein Teil der Säule bezeichnet, in dem sich das Verteilungsgleichgewicht einer Komponente i zwischen stationärer und mobiler Phase einmal eingestellt hat. Dabei wird die Säule theoretisch in Abschnitte geteilt, die wie Trennstufen analog zur Rektifikation behandelt werden (Stufentheorie). Je mehr Böden in einer Säule vorhanden sind, desto öfter hat sich das Gleichgewicht der zu trennenden Komponenten mit unterschiedlichem Verteilungskoeffizienten eingestellt und desto weiter sind sie voneinander getrennt. Die Höhe der Böden ist somit ebenfalls ein Maß für die chromatographische Effizienz und wird als Trennstufenhöhe (HETP, Height Equivalent to a theoretical Plate) bezeichnet – je kleiner, desto effizienter. Die Anzahl an theoretischen Trennstufen (Böden) für eine Komponente i und somit auch der Trennstufenhöhe, wird über die Peakbreite und die Retentionszeit berechnet. Bei nicht gaußförmigen Peaks (Peaks mit Tailing, Fronting) sind entsprechende Korrekturen vorzunehmen (Gl. 35 bis 37, Abb. 57).

$$(Gl. 35) \quad NTU_i = 16 \left(\frac{t_{R,i}}{w_i} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_{R,i}}{w_{1/2,i}} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{h \cdot t_{R,i}}{A_i} \right) \text{ für symmetrische Peaks}$$

$$(Gl. 36) \quad NTU_i = 41,7 \frac{(t_R / w_{0,1})^2}{T + 1,25} \text{ für asymmetrische Peaks}$$

NTU_i = Zahl der theoretischen Böden einer Komponente i eines chrom. Systems

h = Höhe des Peaks der Komponente i

A = Fläche des Peaks der Komponente i

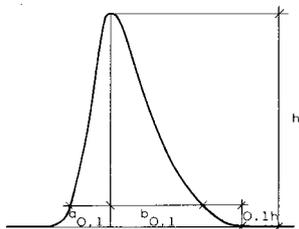
$w_{0,1}$ = Breite des Peaks auf 10% der Peakhöhe (Abb. 57)

T = Tailing $b_{0,1} / a_{0,1}$ (Abb. 57)

$$(Gl. 37) HETP_i = \frac{L_c}{NTU_i}$$

$HETP_i$ = Trennstufenhöhe einer Komponente i

L_c = Länge der chromatographischen Säule



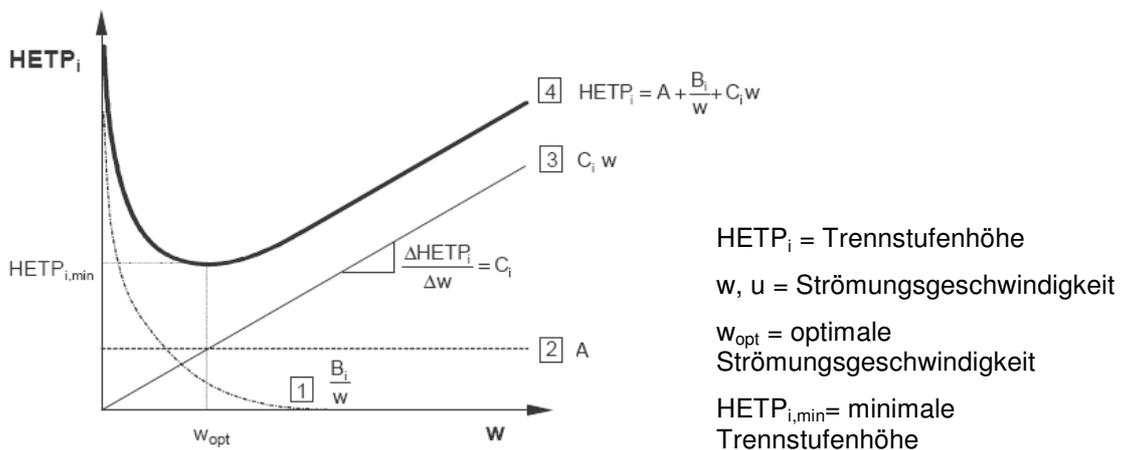
$b_{0,1} / a_{0,1}$ = Tailing, Maß für Asymmetrie des Peaks

h = Peakhöhe

$0,1 h$ = 10 % der Peakhöhe

Abb. 57: Beschreibung der Peakasymmetrie (MEYER 2004)

Die Trennstufenhöhe lässt sich in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase graphisch darstellen (HETP-Kurve, Van Deemter-Kurve bzw. -Gleichung) (Abb. 58 und 59, Gl. 38 bis 41). Aus diesem weit verbreiteten Modell der Bandenverbreiterung kann die optimale Fließgeschwindigkeit ermittelt werden, die zu einer minimalen Trennstufenhöhe und damit höchsten chromatographischen Effizienz führt.



$HETP_i$ = Trennstufenhöhe

w, u = Strömungsgeschwindigkeit

w_{opt} = optimale Strömungsgeschwindigkeit

$HETP_{i,min}$ = minimale Trennstufenhöhe

Abb. 58: Van Deemter Kurve (VAN DEEMTER et al. 1956, SCHWEDT 1994)

$$(Gl. 38) HETP_i = A + \frac{B_i}{u} + C_i u$$

$HETP_i$ = Trennstufenhöhe einer Komponente i

u = Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase

A = Streudiffusion (Eddy-Diffusion)

B_i = Longitudinal-Diffusion der Komponente i

C_i = Massentransfer stagnierender und nicht stagnierender mobiler Phase der Komponente i

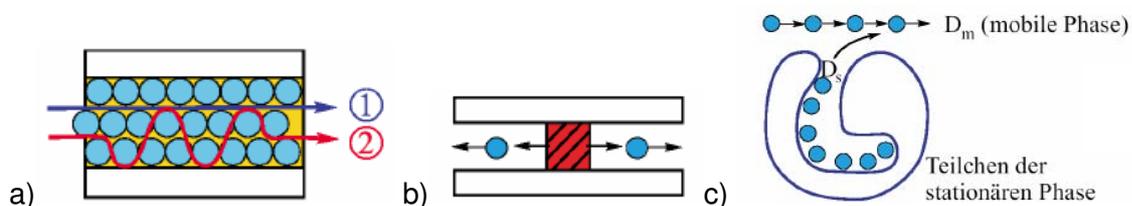


Abb. 59: Schemata a) Eddy-Diffusion, b) Longitudinal-Diffusion, c) Massentransfer

Der **Term A** berücksichtigt in der *Van Deemter Gleichung* die Streudiffusion (Eddy-Diffusion). Diese entsteht aufgrund unterschiedlich langer Wegstrecken der aufgegebenen Komponenten durch die Säulenpackung. Diese Wegstrecken sind im Wesentlichen von der Packungsgüte der stationären Phase und weniger von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase abhängig. Die Packungsgüte wird durch den mittleren Teilchendurchmesser und der statistischen Unregelmäßigkeit der Packung definiert. Aus Gl. 39 ist ersichtlich: Je größer der mittlere Durchmesser der Harzpartikel und je größer ihre Größenverteilung, desto größer wird der Term A und somit auch die Trennstufenhöhe.

$$(Gl. 39) A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$$

λ = statistische Unregelmäßigkeit der Packung

d_p = mittlerer Teilchendurchmesser

Der **Term B** berücksichtigt die Longitudinal-Diffusion in oder entgegen der Strömungsrichtung. Im Wesentlichen ist er von den Diffusionskoeffizienten und dem Obstruktionsfaktor der stationären Phase abhängig (Gl. 40). Der Obstruktionsfaktor beschreibt die gehinderte Diffusion durch die Säulenpackung/Poren. Je größer die Strömungsgeschwindigkeit ist, desto weniger Zeit verbleibt einer Komponente i in der Säule zu diffundieren und damit zur Peakverbreiterung beizutragen. So nimmt mit steigender Strömungsgeschwindigkeit der Einfluss von Term B ab.

$$(Gl. 40) B_i = 2 \cdot k_D \cdot D_{M,i}$$

k_D = Obstruktionsfaktor, Labyrinthfaktor der Poren in der stationären Phase

$D_{M,i}$ = Diffusionskoeffizient in der mobilen Phase einer Komponenten i

Der **Term C** wird als Massentransferterm bezeichnet und beschreibt Stoffaustauschphänomene der Phasen. Dieser trägt häufig stark zur Peakverbreiterung bei. Die Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase ist im Vergleich zur Diffusionsgeschwindigkeit in der stagnierenden mobilen Phase in den Poren der Partikel sehr groß. Die Gleichgewichtseinstellung in den Poren der Partikel wird dadurch verzögert, der Peak verbreitert sich. Wird der Austauschvorgang in der stationären Phase durch kurze Diffusionswege (kleine Harze) beschleunigt, so steigt auch die chromatographische Effizienz. Zur Beschreibung der Vorgänge dieser Stoffaustauschphänomene sind mehrere Modelle vorgeschlagen. So unterteilt GIDDINGS (1965) den Term in zwei Teile. Ein Teil beschreibt dabei den Stoffaustausch in der mobilen Phase, der zweite Teil beschreibt den Stoffaustausch in der stagnierenden Phase (Gl. 41).

$$(Gl. 41) C = C_m \cdot u + C_s \cdot u = \varpi \cdot d_p^2 \cdot \frac{u}{D_m} + c \cdot d_f^2 \cdot \frac{u}{D_s}$$

D_m = Diffusionskoeffizient der mobilen Phase

D_s = Diffusionskoeffizient in dem stagnierenden Eluenten in den Poren

u = Strömungsgeschwindigkeit, Fluss

ϖ = Säulenparameter

d_p = mittlerer Teilchendurchmesser

c = Konstante

d_f = Filmdicke

Bei hohen Flüssen trägt der C-Term stark zur Trennstufenhöhe bei, bei kleinen Flüssen steigt der Beitrag des B-Terms (UNI ULM 2007). Zur Optimierung der Trennstufenhöhe lässt

sich zusammenfassend sagen: Kleine Partikelgrößen, enge Größenverteilungen und sphärische (kugelige) Formen der Partikel sowie niedrige Viskositäten der Eluenten, die zumeist mit Erhöhung der Temperatur erreicht werden, erhöhen die Bodenzahlen und damit die chromatographische Effizienz.

Die analytische Säulenchromatographie unterscheidet sich zu ihrem präparativen Gegenpart insbesondere durch ihre Zielsetzung. Soll bei der Analytik eine möglichst vollständige Auftrennung eines Gemischs mit anschließender Peakidentifikation erfolgen, läuft es bei der präparativen Chromatographie vielfach auf eine wirtschaftliche Optimierungsrechnung hinaus. Die Isolierung des gewünschten Produktes ist in definierter Reinheit, in maximaler Menge und minimaler Zeit durchzuführen. Die entsprechenden Bezugsgrößen heißen Produktionsrate und Durchsatz (throughput). Um möglichst hohe Produktionsraten zu erzielen, sind die Säulen zu überladen und zu vergrößern (Scale-Up). In diesem Zusammenhang soll zunächst die Beladbarkeit (Massen-, und Volumenbeladbarkeit einer Säule) und anschließend das Up-Scaling betrachtet werden.

Die Beladbarkeit einer bestimmten Säule ist nach allgemeinem Verständnis als die maximale Probenmenge aufzufassen (mit definierter Stoffmenge und Volumen), unter der eine Säule noch optimal arbeitet. Die Literatur macht einige Vorschläge zur mathematisch/physikalischen Definition der Beladbarkeit, wobei in der Praxis die maximale Probenaufgabemenge zumeist empirisch bestimmt wird. Dabei wird so viel Feed aufgegeben, bis sich die voneinander zu trennenden Peaks gerade eben berühren bzw. die gewünschte Reinheit der zu gewinnenden Fraktionen gerade noch erreicht wird. Einflussgrößen zur Optimierung der Massen- und Volumenbeladbarkeit sind in Gl. 42 und 43 wiedergegeben.

$$(Gl. 42) \quad M = C_1 \pi r^2 I K d A_s \sqrt{C_2 \frac{d_p^2}{l}}$$

M = Maximale Probenmasse

C_1, C_2 = Konstanten

r, l, d_p = Säulenradius und Länge, mittlerer Partikeldurchmesser

d = Packungsdichte

K = Verteilungskoeffizient

A_s = Sorbensoberfläche

$$(Gl. 43) \quad V_L = V_0 \left[(\alpha - 1) k_A - \frac{2}{\sqrt{NTU}} (2 + k_A + k_B) \right]$$

V_L = maximales Dosiervolumen

V_0 = Totvolumen der Säule

α = relative Retention (k_B / k_A)

NTU = Bodenzahl

k_A, k_B = Retentionsfaktoren, früher Kapazitätsfaktoren

Im ersten Teil der Gl. 42 ist ersichtlich, dass die Massenüberladbarkeit mit Vergrößerung des Durchmessers der Säule, der Sorbensoberfläche und der Länge der Säule zunimmt. Der zweite Teil der Gleichung verhält sich jedoch umgekehrt. Die Massenbeladbarkeit sinkt mit Zunahme des Verhältnisse d_p^2/l , also mit Zunahme der Bodenzahl NTU (d_p^2/l und NTU verhalten sich proportional), so dass ein Optimum von Partikeldurchmesser und Säulenlänge gefunden werden muss, um eine maximale Beladbarkeit und damit eine gute Produktionsrate zu erreichen (Abb. 60).

Die Volumenbeladbarkeit hängt lediglich vom Totvolumen der Säule, also dem Volumen, welches zum Füllen der Zwischenräume des Harzes und der Poren erforderlich ist, und den k' -Werten der zu trennenden Komponenten A und B sowie der Trennleistung der Säule in Form der NTU ab.

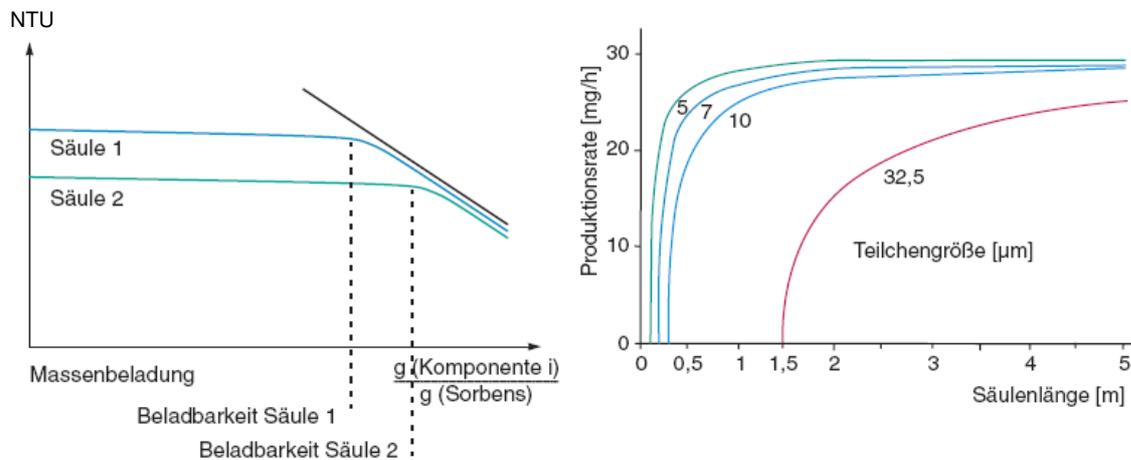


Abb. 60: Trennstufenzahl/Massenbeladungs-, Produktionsrate/Säulenlängen-Diagramm der präparativen Chromatographie (MACHEREY-NAGEL 2007)

Um möglichst viel reinen Stoff pro Zeiteinheit zu gewinnen, wird in der Praxis zumeist im überladenen Zustand gearbeitet. Drei typische Fälle der Säulenüberladung sind zu unterscheiden. Zum einen die Konzentrationsüberladung, bei der die Konzentration bei gleich bleibendem Dosiervolumen erhöht wird. Dabei zeigen die Peaks mit zunehmender Überladung eine Deformierung (Fronting, Tailing), gleichzeitig verschieben sich die Peakmaxima zumeist in Richtung Totzeit. Zur Konzentrationsüberladung ist eine ausreichende Löslichkeit des zu trennenden Gemischs im Lösungsmittel aber auch in der mobilen Phase erforderlich. Zum zweiten die Volumenüberladung, die eingesetzt wird, wenn die Löslichkeit des Gemischs gering ist oder das Produkt nicht aufkonzentriert werden kann. Mit zunehmender Volumenüberladung verbreitern sich die Peaks, bleiben aber weitgehend symmetrisch. Die dritte Möglichkeit der Säulenüberladung, ist die Stoffüberladung. Sie tritt dann ein, wenn die injizierte Stoffmenge so groß ist, dass sich kein richtiges Gleichgewicht mehr einstellen kann. Dazu können Dispersionseffekte führen, bei denen das Gemisch mit der mobilen Phase über die Säule verteilt wird. Weiter kann das Sorbens deaktiviert werden, da nach einer massiven Probenaufgabe die stationäre Phase „belegt“ ist und die nachfolgenden Moleküle ohne Wechselwirkungen von der mobilen Phase weitergetragen werden. Als weiterer Effekt der Stoffüberladung können nicht-lineare Adsorptionsisothermen aufgrund großer Probenkonzentrationen zu Tailing führen (UNGER 1994).

In der Praxis wird zumeist eine Kombination aus Konzentrations- und Volumenüberladung realisiert, bei denen dann alle drei Überladungsfälle eintreten.

Zur Trennung größerer Substanzmengen steht neben der Säulenüberladung die angesprochene Vergrößerung der Säule (Scale-Up, Maßstabsvergrößerung) zur Verfügung. Dabei sind folgende Hinweise zu beachten (MACHEREY-NAGEL 2007):

- „Eluenten-Gradienten sind für präparative Trennungen nicht zu empfehlen, da sie in jeder Hinsicht großen Aufwand bedeuten. Wenn nötig muss die Probe vorher entsprechend aufbereitet werden“
- „Je besser die Auflösung im analytischen Chromatogramm, desto stärker kann die präparative Säule beladen werden.“

Nach der Optimierung der Trennung an kleinen Säulen (analytisch oder semi-präparativ in Scout-Säulen), kann die lineare Maßstabsvergrößerung aller beteiligter Größen, wie Flussrate, Probenvolumen bzw. Probenmenge mit einem Multiplikations-Scale-Up-Faktor (scaling factor) durchgeführt werden. Der Scale-Up-Faktor kann mittels Gl. 44 berechnet

werden, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Längen der Säulen im Idealfall gleich sein sollten. Wird von analytischen Säulen ausgegangen, so sind häufig auch die Innendurchmesser der Kapillaren zu vergrößern.

$$(Gl. 44) \quad M_P = M_A \cdot \underbrace{\frac{L_P \cdot d_P^2}{L_A \cdot d_A^2}}_{\text{scaling factor}} \quad \text{bzw.} \quad V_P = V_A \cdot \underbrace{\frac{L_P \cdot d_P^2}{L_A \cdot d_A^2}}_{\text{scaling factor}} \quad \text{bzw.} \quad \dot{V}_P = \dot{V}_A \cdot \underbrace{\frac{L_P \cdot d_P^2}{L_A \cdot d_A^2}}_{\text{scaling factor}}$$

M_P, M_A = Aufgabemenge auf die präparative bzw. analytische Säule

V_P, V_A = Aufgabevolumen auf die präparative bzw. analytische Säule (bei konst. $C_{\text{Aufgabegut}}$)

\dot{V}_P, \dot{V}_A = Eluentenvolumenstrom der präparative bzw. analytische Säule

L_P, L_A = Länge der präparativen bzw. analytischen Säule (möglichst gleich)

d_P, d_A = mittlerer Durchmesser der präparativen bzw. analytischen Säule

3.4 Stand der Wissenschaft und Technik zur Isolierung sekundärer Pflanzenstoffe

Bisher sind hauptsächlich pflanzliche Gesamtextrakte oder Saftkonzentrate von marktwirtschaftlicher Bedeutung gewesen, so dass das vorliegende Themenfeld relativ wenig untersucht ist. Vereinzelt werden Verfahren zur Reinigung (Flüssig-Flüssig-Extraktionen und Adsorptionsverfahren (C18-Materialien)) und vor allem Klärung sowie Aufkonzentrierung von Gesamtextrakten und Fruchtsäften mit Membranverfahren (CASSANO et al. 2003, FERNÁNDEZ et al. 2003, GILEWICZ-LUKASIK et al. 2007) beschrieben (Patente siehe unten). Dabei kommt in der Lebensmitteltechnologie die UF in der Fruchtsaftindustrie eher zur Klärung zum Einsatz, um Unreinheiten wie Hefen, Schimmel, Bakterien, Kolloide, Proteine, Tannine und Polysaccharide abzutrennen, die das Endprodukt destabilisieren (IONICS 2004) und weniger zur Isolierung oder Aufkonzentrierung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Weiter wurden einige wenige organische UF/NF-Membranen hinsichtlich ihrer Selektivität ausgesuchter Polyphenole untersucht, wie Anthocyane aus roten Trauben und Blaubeeren mittels Diafiltration (SONG 1999) sowie Koffein und Catechin aus Grüntee (NWUHA 2000).

Einzelpolyphenole oder auch andere sekundäre Pflanzenstoffe, die nicht synthetisch herzustellen sind, werden im mg- bis g-Maßstab bisher als Standards mit der konventionellen semi-präparativen Säulenchromatographie und selten auch mit den in der Entwicklung befindlichen Flüssig-Flüssig-Chromatographien gewonnen (Gegenstromverteilungs-Chromatographie (CPC, Centrifugal Partition Chromatography oder auch CCC, Counter-Current Chromatography) (Delaunay et al. 2002) und deren Weiterentwicklung High-Speed Counter-Current Chromatography (HCCC, HSCCC) (LI et al. 2000, CHEN et al. 2001, LEI et al. 2001)). Großtechnisch hingegen sind diese Flüssig-Flüssig-Chromatographien wegen ihrer Komplexität und Probleme des Up-Scalings (planetare Rotation der Coils, organische Lösungsmittel wie z. B. Hexan, Chloroform, Butanol) schwer einsetzbar, so dass die Säulenchromatographie im Nieder- und Hochdruckbereich präferiert wird (SCALBERT 2002). Die stationären Phasen der semi-präparativen Säulenchromatographie bestehen zumeist aus silikagelbasierenden C8- oder C18-Materialien und neuerdings auch aus porösen, synthetischen Polymeren, wie PS-DVB-Harzen (polystyrene-divinylbenzene) (MASQUÉ et al. 1999, YAMAMOTO et al. 2007), die pH-stabiler sind und ebenfalls als RP-Chromatographie mit wässrigen Methanol, Ethanol, Acetonitril und ähnlichen Laufmitteln zur Isolierung von Polyphenolen eingesetzt werden. Dabei ist anzumerken, dass bisher lediglich Pflanzenphenole chromatographisch gewonnen wurden, deren Anteile im Extrakt relativ hoch sind, wie z. B. Isoflavone aus Sojabohnen (YANG 2001) und Resveratrol sowie deren Derivate aus *Polygonum cuspidatum*

(japanischer Staudenknöterich) (CHU et al. 2005). Präparative Isolierungen einzelner Polyphenole aus Extrakten oder Säften vielfältiger phenolischer Inhaltsstoffe geringer Konzentrationen, wie aus Weinen, sind ebenfalls beschrieben (DELAUNAY 2002), wobei sich nach detaillierter Betrachtung herausstellt, dass hier selbst nach Anwendung der HCCC lediglich Fraktionen mit Phenolgruppen und nicht Einzelpolyphenole gewonnen wurden. Vielmehr scheint eine Kombination von Trenntechniken zur Isolierung komplexer Phenolextrakte zu führen, wie an Theaflavinen aus Schwarztee mit einer HCCC und Sephadex LX-20-Säule gezeigt (YANG et al. 2008). Eine Kombination von Membranverfahren und Chromatographie wird in der vorliegenden Literatur nicht beschrieben.

Weiter sind zur Gewinnung und Reinigung phenolischer Pflanzenstoffe Patente angemeldet, die die oben beschriebenen Verfahren beinhalten:

HILTON et al. 1982: Hilton B.W., Lin R.I., Topor M.G., Processed Anthocyanin Pigment Extracts, US Patent 4320009

HOWARD 2001: Howard A.N., Method of Producing High Flavonol Content Polyphenol Compositions, US Patent 6238673

LANGSTON 1985: Langston M.S.K., Anthocyanin Colorant from Grape Pomace, US Patent 4500556

NAFISI-MOVAGHAR et al. 1999: Nafisi-Movaghar K., Svanoe T.T., Seroy W.A., Method for Extraction of Proanthocyanidins from Plant Material, US Patent 5912363

SHRIKHANDE et al. 2003: Shrikhande A.J., Race E.J., Wightman J.D., Sambueso R.D., Process for Extraction, Purification and Enrichment of Polyphenolic Substances from Whole Grapes, Grape Seeds and Grape Pomace, US Patent 6544581

WALLIN 1980: Wallin B.K., Process of Purified Plant Anthocyanin Colors, US Patent 4221577

Abschließend sollen weitere Verfahren zur Isolierung von Polyphenolen angesprochen werden, die Gegenstand der Forschung sind. So könnten möglicherweise Polyphenole relativ selektiv aus überkritischen Gasen gefällt oder selektiv mit überkritischen Gasen gegebenenfalls unter Beimischung von Ethanol aus den Rohstoffen extrahiert werden, ähnlich, wie es bei der Gewinnung für Standards (z. B. ICE-2-Standard) der Bittersäuren aus Hopfen der Fall ist (FÖRG 2001).

4 Material und Methoden

4.1 Analytik

Die Aufgabenstellung jedes Prozessschrittes definiert die zu analysierenden Parameter. So ist das Ziel der Extraktion und Enzymierung möglichst viele Polyphenole in wenig Extrakt zu überführen. Der Erfolg wird mittels einzelner Polyphenole, dem Gesamtpolyphenolgehalt und der antioxidativen Kapazität bestimmt. Die Abtrennung des Raffinats (Feststoffs) durch Pressung bzw. Dekantierung und die anschließende Klärung des Extraktes wird anhand der Trockenmasse (%TM) des Raffinats und des Klärgrades des Extraktes bestimmt. Die Beurteilung der Trennleistung der Membranfiltrationsschritte und die dabei stattfindende Aufkonzentrierung beinhaltet die Zuckeranalytik, Säureanalytik sowie die Phenol- und Gesamtphenolanalytik, die Bestimmung der antioxidativen Kapazität und die Ionenanalytik. Die Chromatographie erfordert zur Reinheitsbestimmung der Fraktionen ebenfalls die für die Membranfiltration notwendige Analytik.

4.1.1 Antioxidative Kapazität (TEAC-Methode)

Die Definition der antioxidativen Kapazität (TAC, total antioxidant capacity) kann als Fähigkeit einer Substanz oder eines Substanzgemisches verstanden werden, welches oxidative Prozesse beendet bzw. unterbricht oder verlangsamt. Zu ihrer Bestimmung sind unterschiedliche Testsysteme geläufig, die unterschiedliche Ergebnisse liefern können (BADERSCHNEIDER et al. 1999). Gemeinsam haben sie, dass in einer Testlösung ein definiertes oxidatives Milieu erzeugt wird, welches dann durch das Antioxidant gehemmt, unterbrochen oder reduziert wird. Wird das oxidative Milieu kontinuierlich erzeugt, so ist die Zeit der Hemmung bzw. Unterbrechung (lag-Phase, lag-time) der oxidativen Kapazität des Test-Milieus proportional zur antioxidativen Kapazität der eingesetzten Probe. Wird das Oxidant einmalig in einer definierten Stärke gebildet, so entspricht die Herabsetzung des Oxidants der antioxidativen Kapazität. Der erhaltene Wert wird in Bezug zu einer Referenz-Probe gesetzt, welche beim TEAC-Test TroloxTM ist, ein antioxidatives, wasserlösliches Vitamin E-Derivat, und so die antioxidative Kapazität als Trolox - Equivalente angibt. Welches Testsystem eingesetzt wird, hängt u. a. von den zu erwartenden antioxidativen Inhaltsstoffen (lipophil oder hydrophil), dem pH-Wert und von der Matrix der Probe ab. In der Wein- und Fruchtsaftanalytik hat sich der bereits angesprochene TEAC-Test (Trolox-Equivalent-Antioxidative-Capacity) (MILLER et al. 1995) durchgesetzt, der bereits einige Modifikationen durch MILLER et al. (1996) selber, MILLER und RICE-EVANS (1997) und RE et al. (1999) erfahren hat, wobei Letztere hier zur Anwendung kommt. Im Gegensatz zu MILLER et al. (1993) und MILLER und RICE-EVANS (1997), die Metmyoglobin als Katalysator zur Bildung des Radikalkation ABTS^{•+} verwendeten, haben RE et al. (1999) unter Federführung von RICE-EVANS Kaliumpersulfat eingesetzt, so dass auch alkoholische Getränke >20 %Vol EtOH ohne Denaturierung des Metmyoglobins gemessen werden können. Weiter wird hier die Entfärbung des gebildeten Radikals gemessen und nicht, wie ursprünglich eine verminderte Radikalbildung. Diese Methode wird als praktikabel für wasser- und lipidlösliche Antioxidantien aus Lebensmittelextrakten beschrieben und entspricht somit unseren Anforderungen.

Funktion:

Durch Zugabe von Kaliumpersulfat zu einer Lösung aus ABTS wird das langlebige, grün gefärbte Radikalkation ABTS^{•+} erzeugt, welches bei 734 nm photometrisch gemessen wird. TroloxTM bzw. die antioxidative Probe reduziert die Bildung des Radikalkations ABTS^{•+} entsprechend ihrer antioxidativen Kapazität und unterdrückt damit die Färbung der Reaktionslösung. Die Intensität der „Entfärbung“ ist proportional zur antioxidativen Kapazität.

Chemikalien:

ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), als Diammoniumsalz, Summenformel $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ mit der Molmasse 548,68 g/mol, Sigma-Aldrich #11557-1G, Abb. 61

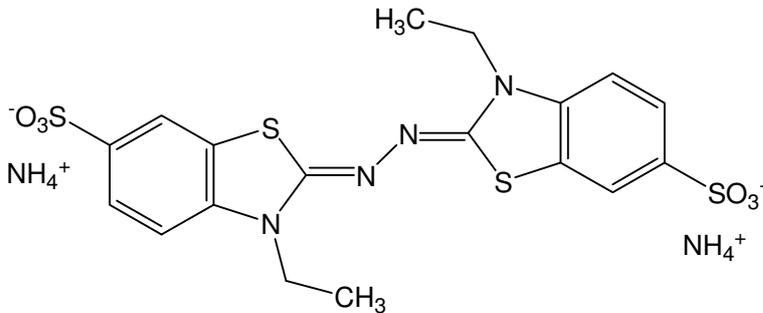
Trolox™C (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure), Fluka #56510, Abb. 61

Entmineralisiertes Wasser

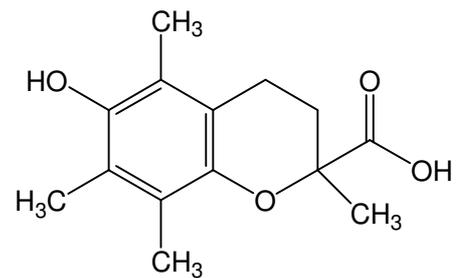
di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei, K_2HPO_4 , 174,18 g/mol, Fluka #60055

Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei, KH_2PO_4 , 136,09 g/mol, Fluka #60219

Kaliumpersulfat, $K_2(SO_4)_2$, 270,32 g/mol, Fluka #60490



Diammonium 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)



6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure

Abb. 61: Strukturformeln von ABTS-(NH_4)₂ und Trolox™C

Herstellung der Lösungen:

PBS (Phosphate buffered saline) (pH-Wert 7,4):

3,570 g di-Kaliumhydrogenphosphat und 0,615 g Kaliumdihydrogenphosphat werden mit entmineralisiertem Wasser (Deionat) in einem 500 mL Messkolben gelöst.

ABTS-Stammlösung (5 mmol/L):

66 mg ABTS in 25 mL Messkolben mit PBS lösen.

ABTS-Arbeitslösung (500 μ mol/L):

1 / 10 – Verdünnung der ABTS-Stammlösung. Die Ansatzgröße hängt von der Probenmenge ab. Pro zu messende Probe werden bei einer Doppelbestimmung 2*500 μ L ABTS-Arbeitslösung benötigt. Bei maximal 50 Proben inkl. Kalibrierstandards (5 Stück) werden somit 50 mL benötigt, so dass 5 mL ABTS-Stammlösung in 45 mL PBS verdünnt werden.

Kaliumpersulfat (10 mmol/L):

270 mg $K_2S_2O_8$ mit PBS in 100 mL Messkolben lösen.

Trolox™C-Stammlösung (2,5mmol/L):

64 mg Trolox™C in wenig Alkohol aufnehmen und mit PBS in 100 mL Messkolben lösen. Alternativ kann 64 mg Trolox™C mit PBS in 100 mL Messkolben mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst werden.

Trolox™C-Standards (0,000; 0,100; 0,200; 0,300; 0,400 mmol/L):

Die in Tab. 13 angegebenen Trolox™C-Stammlösungs-Volumina werden mit PBS in 10 mL Messkolben verdünnt.

Tab. 13: Ansatz der Kalibrierlösungen zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode

Trolox™C-Standard [mmol/L]	Trolox™C-Stammlösung [mL]	Messkolben [mL]
0,000	0	10
0,100	0,4	10
0,200	0,8	10
0,300	1,2	10
0,400	1,6	10

Durchführung (in Anlehnung an NIKFARDJAN 2001):

Zum Einsatz kommt ein UV/VIS-Spektrometer DU-800 der Firma Beckman. Das Absorptionsmaximum des grünen Radikalkations liegt bei 734 nm (Abb. 63). Die Reaktionslösungen werden direkt in 1,5 mL Einweg-Küvetten mit 1 cm Schichtdicke nach Tab. 14 pipettiert und auf 20 °C in einem Küvettenhalter temperiert.

Tab. 14: Zusammenstellung der Reaktionsgemische zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität nach der TEAC-Methode

	Vorlage in 1,5 mL Einweg-Küvette und Temperierung auf 20 °C				Reaktionsstart
	ABTS [µL]	Trolox [µL]	Probe [µL]	PBS [µL]	K ₂ S ₂ O ₈ [µL]
Blindwert	500	0	0	300	0
Standard 0,000	500	0	0	100	200
Standard 0,100	500	100	0	0	200
Standard 0,200	500	100	0	0	200
Standard 0,300	500	100	0	0	200
Standard 0,400	500	100	0	0	200
Probe n.1	500	0	100	0	200
Probe n.2	500	0	100	0	200

Hinweise zu Tab. 14:

ABTS = ABTS-Arbeitslösung 500 µmol/L

Trolox = Trolox™C-Standardlösungen 0,1 bis 0,4 mmol/L Trolox-Equivalente

Probe = reale Proben, gegebenenfalls verdünnt und Trübung berücksichtigt

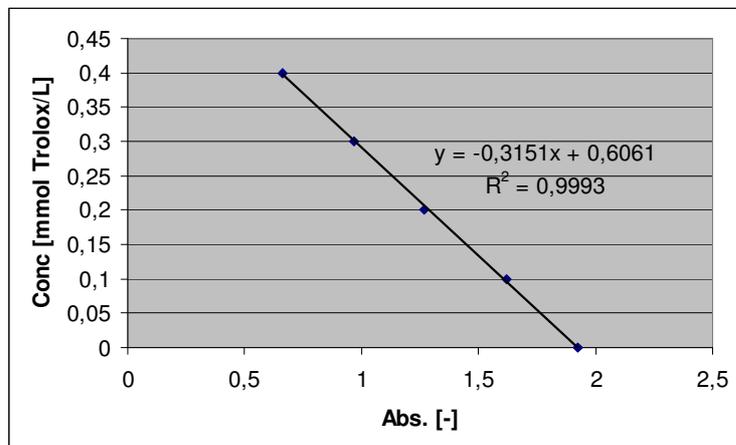
PBS = PBS mit pH-Wert 7,4

K₂S₂O₈ = Start der Reaktion durch Zugabe der Kaliumpersulfatlösung

Probe n.1 und Probe n.2 = Doppelbestimmung der n Proben

Mit der Kaliumpersulfatlösung wird die Reaktion gestartet, die ebenfalls bei 20 °C durchgeführt wird. Zur besseren Durchmischung der Reaktanten, wird nach Zugabe des Starterreagenz mit derselben Pipette (200 µL) die Reaktionslösung aufgenommen und wieder in die Küvette abgelassen. Nach einer Reaktionszeit von exakt 12 min, ist die Absorption zu messen. Es sind jeweils Doppelbestimmungen durchzuführen. Die Mittelwerte der erhaltenen Absorptions-Werte (Extinktionen) ergeben für die Standards eine Kalibriergerade mit negativer Steigung, da die Farbigkeit mit zunehmender antioxidativer

Kapazität abnimmt. Die Konzentrationen der Standards werden als Ordinate und die gemittelten Extinktionen als Abszisse gewählt, um aus der sich ergebenden Geradengleichung der Kalibrierung direkt ohne Umformung die antioxidative Kapazität der zu messenden Proben berechnen zu können (Abb. 62). Der kalibrierte Bereich reicht von 0,0 – 0,4 mmol/L TroloxTMC-Equivalenten, so dass die Proben gegebenenfalls zu verdünnen sind.



Abs.	Konz. [mmol Trolox / L]
1,9232	0
1,6198	0,1
1,2685	0,2
0,9686	0,3
0,6631	0,4

Abb. 62: Beispiel einer TEAC-Kalibriergeraden mit Gl. und Bestimmtheitsmaß

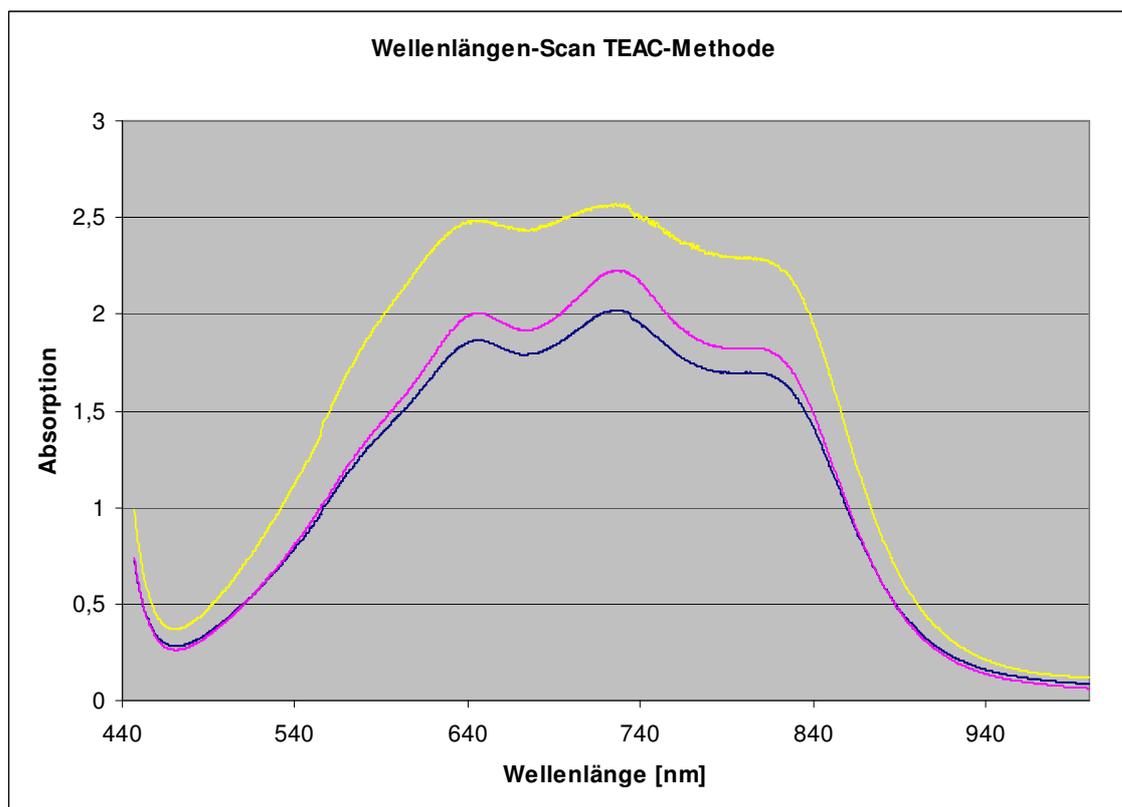


Abb. 63: VIS-Scan des farbigen ABTS^{•+}-Radikals mit Absorptionsmaximum bei 734 nm

In Abb. 64 ist die Reaktionskinetik von TroloxTMC-Standardlösungen bei 734 nm über 20 min aufgenommen. Gut ist die zunehmende Verzögerung der Bildung des farbigen ABTS^{•+}-Radikals mit steigendem TroloxTMC-Gehalt, also steigender antioxidativer Kapazität in der Probe zu sehen. Nach 12 min Reaktionszeit ist eine gute lineare Beziehung zwischen antioxidativer Kapazität und Färbung gegeben. Mit zunehmender Reaktionszeit verlaufen die Linien weniger parallel, was negative Auswirkungen auf das Bestimmtheitsmaß hätte.

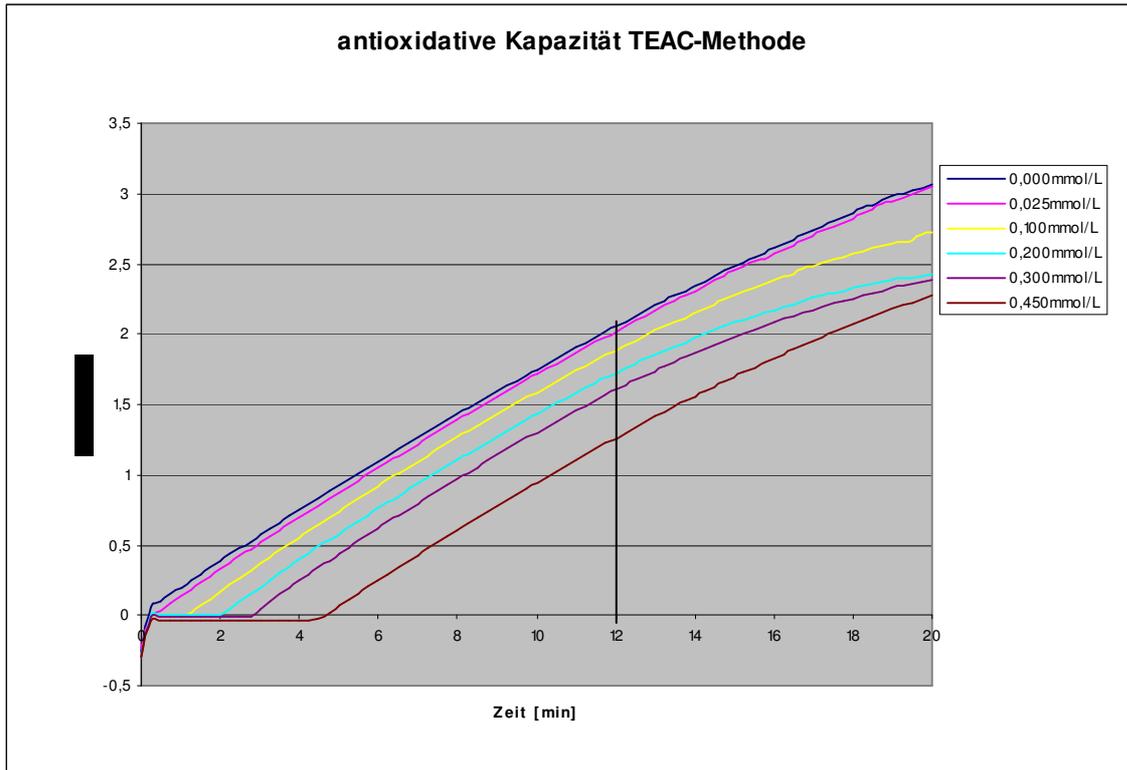


Abb. 64: Reaktionskinetik zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode

Die Stabilität der Reagenzien ist nach NIKFARDJAN (2001) mit 1 Tag $K_2S_2O_4$, 4 Wochen PBS und alle weiteren Lösungen mit 2 Wochen angegeben.

4.1.2 Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode)

In der Fruchtsaft- und Weinanalytik hat sich in den letzten 40 Jahren die so genannte Folin-Ciocalteu-Methode zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts durchgesetzt. Sie basiert auf einer kalorimetrischen Methode von SINGLETON und ROSSI (1965) und wird heute in verschiedenen, optimierten Variationen als spektroskopische Methode angewendet (MÖBIUS und GÖRTGES 1974, TANNER und BRUNNER 1979, RITTER 1994, LUCENA et al. 2005, PESCHEL et al. 2006).

Funktion:

Durch Zugabe des Folin-Ciocalteu-Reagenz (FCR) in eine phenolische Lösung, werden ihre Hydroxylgruppen oxidiert und das Reagenz selber zu einem blau gefärbten und photometrisch erfassbaren Molybdän-Wolfram-Komplex reduziert. Die Intensität der Absorption bei 765 nm ist direkt proportional des Gesamtphenolgehalts (TPC = total phenolic content). Als Bezugssubstanz wird häufig Gallussäure, aber auch (+)-Catechin eingesetzt und der Gesamtphenolgehalt in mgGAE/L oder mgCE/L angegeben (GAE = gallic acid equivalents, CE = (+)-catechin equivalents).

Wie auch bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität, stehen die verzuckerten Pflanzenphenole nicht zur Oxidation zur Verfügung und werden somit auch nicht erfasst. Eine enzymatische Zuckerabspaltung könnte Abhilfe schaffen, deren Entwicklung noch aussteht. Weiter ist anzumerken, dass der Test unspezifisch ist und davon ausgegangen wird, dass reduzierende „nicht“-Phenole in einem vernachlässigbar kleinen Anteil Einfluss nehmen. Die Ergebnisse sind demnach als Vergleichswerte untereinander zu verstehen. Selbst andere Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehalts sind mit diesen Methoden nicht bzw. nur bedingt vergleichbar.

Chemikalien:

Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz

($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) Fluka #47641

Natriumcarbonat, Na_2CO_3 , 105,99 g/mol, Fluka, #71351

Gallussäure, $(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COOH}$, Sigma Aldrich #G7384-100G

Herstellung der Lösungen:

Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz ist gebrauchsfertig von Fluka bezogen.

Natriumcarbonat (20 %ig):

Die Ansatzgröße hängt von der Probenmenge ab. Pro zu messende Probe werden bei einer Doppelbestimmung $2 \cdot 200 \mu\text{L}$ Na_2CO_3 -Lösung benötigt. Bei maximal 50 Proben inkl. Kalibrierstandards (5 Stück) werden somit 25 mL benötigt, so dass 5 g Na_2CO_3 wasserfrei in einem 25 mL Messkolben mit entmineralisiertem Wasser zu lösen sind.

Gallussäure-Stammlösung (1.000 mg GAE/L):

In einem 10 mL Messkolben werden 10 mg Gallussäure in entmineralisiertem Wasser gelöst. Der Ansatz ist ausreichend zur einmaligen Kalibrierung mit Doppelbestimmung von fünf Gallussäure-Standards 1, 10, 50, 100 und 200 mg GAE/L.

Gallussäure-Standards (1, 10, 50, 100 und 200 mg GAE/L):

Die in Tab. 15 angegebenen Gallussäure-Stammlösungs-Volumina werden mit entmineralisiertem Wasser in 10 mL Messkolben angesetzt.

Tab. 15: Ansatz der Kalibrierlösungen zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts mit der Folin-Ciocalteu-Methode

Gallussäure-Standard [mg GAE/L]	Gallussäure - Stammlösung [μL]	Messkolben [mL]
1	10	10
10	100	10
50	500	10
100	1.000	10
200	2.000	10

Durchführung:

Zum Einsatz kommt ein UV/VIS-Spektrometer DU-800 der Firma Beckman. Das Absorptionsmaximum des blauen Molybdän-Wolfram-Komplex liegt bei 750 nm (Abb. 66). Die Reaktionslösungen werden direkt in 1,5 mL Einweg-Küvetten mit 1 cm Schichtdicke nach Tab. 16 pipettiert. Mit der Natriumcarbonatlösung wird die Reaktion gestartet. Zur besseren Durchmischung der Reaktanten, wird nach Zugabe des Starterreagenz mit derselben Pipette (200 μL) die Reaktionslösung aufgenommen und wieder in die Küvette abgelassen. Nach einer Reaktionszeit von 30 min, ist die Absorption zu messen. Es sind jeweils Doppelbestimmungen durchzuführen. Die Mittelwerte der erhaltenen Absorptions-Werte (Extinktionen) ergeben für die Standards eine Kalibriergerade mit positiver Steigung, da die Farbigkeit mit zunehmendem Gesamtpolyphenolgehalt ebenfalls zunimmt. Die Konzentrationen der Standards werden als Ordinate und die gemittelten Extinktionen als Abszisse gewählt, um aus der sich ergebenden Geradengleichung der Kalibrierung direkt ohne Umformung den Gesamtphenolgehalt der zu messenden Proben berechnen zu können (Abb. 65). Der kalibrierte Bereich reicht von 1 – 200 mgGAE/L, so dass die Proben gegebenenfalls zu verdünnen sind.

Tab. 16: Zusammenstellung der Reaktionsgemische zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts mit der Folin-Ciocalteu-Methode

	Vorlage in 1,5 mL Einweg-Küvette				Reaktionsstart
	FCR [μ L]	GA-Std [μ L]	Probe [μ L]	H ₂ O [μ L]	Na ₂ CO ₃ [μ L]
Blindwert	50	0	0	750	200
Standard 1	50	100	0	650	200
Standard 10	50	100	0	650	200
Standard 50	50	100	0	650	200
Standard 100	50	100	0	650	200
Standard 200	50	100	0	650	200
Probe n.1	50	0	100	650	200
Probe n.2	50	0	100	650	200

Hinweise zu Tab. 16:

FCR = Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz

GA-Std = Gallic acid Standards mit 1, 10, 50, 100 und 200 mg GAE/L

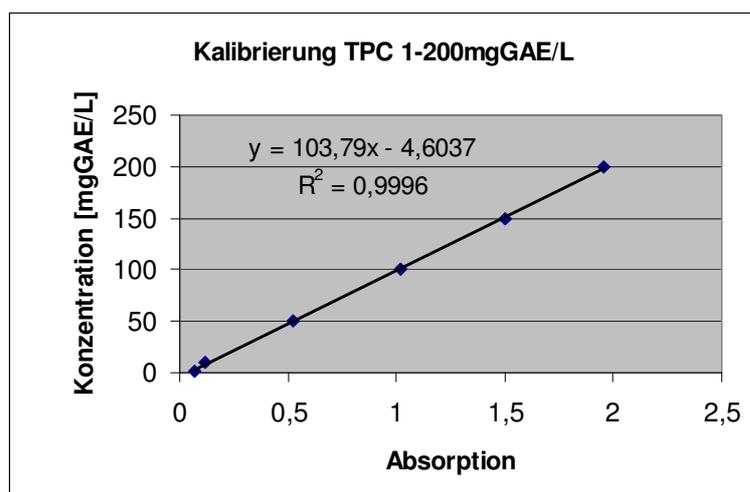
Probe = reale Proben, gegebenenfalls verdünnt und Trübung berücksichtigt

H₂O = entmineralisiertes Wasser

Na₂CO₃ = Start der Reaktion durch Zugabe der Natriumcarbonatlösung

Probe n.1 und Probe n.2 = Doppelbestimmung der n Proben

Als Bezugssubstanz wurde in dieser Arbeit Gallussäure gewählt, da diese um den Faktor 10 günstiger als (+)-Catechin ist. Die Löslichkeit von Na₂CO₃ liegt bei 210 g/L, so dass eine 20 %ige Na₂CO₃-Lösung als Reaktionsstarterlösung hergestellt wurde. Die Reaktionszeit wurde mit 30 min festgelegt, da die Farbreaktion bereits weit vorangeschritten und eine gute Linearität von Absorption (Extinktion) und Gallussäure-Konzentration gegeben ist (Abb. 65 und 67). Weiter ist in Abb. 67 gut zu sehen, dass sich bis 200 mg GAE/L relativ konstante Absorptionskurven ergeben und bei 300 mg GAE/L die Messgenauigkeit des Geräts wegen der bereits sehr dunkelblauen Lösung unzureichend ist.



Konz. [mgGAE/L]	Abs.
1	0,06590
10	0,11935
50	0,52530
100	1,01975
150	1,50460
200	1,95475

Abb. 65: Beispiel einer TPC-Kalibriergeraden mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß

Ergebnisse flüssiger Proben (Wein, Säfte) werden in mgGAE/L und für Extrakte fester Proben (Trester) in mgGAE/g Einwaage angegeben oder nach Bestimmung der Trockenmasse in mgGAE/kgTM.

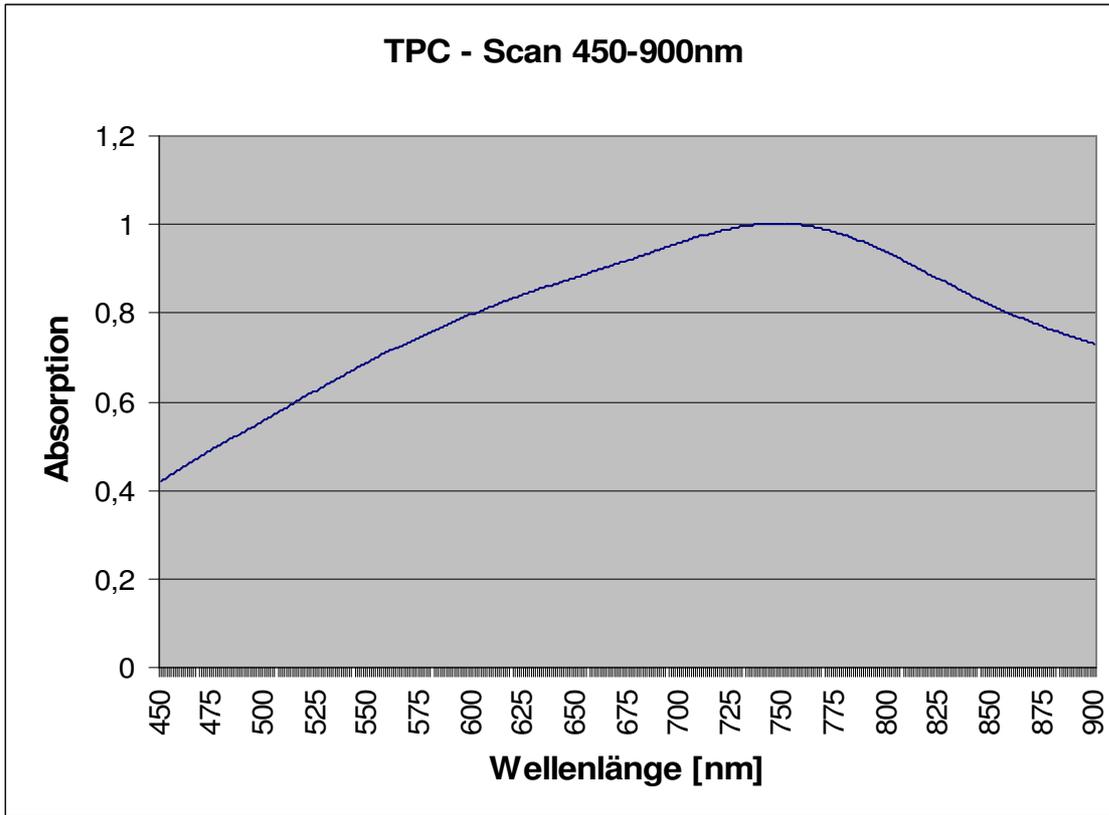


Abb. 66: VIS-Scan des Molybdän-Wolfram-Komplex mit Absorptionsmaximum bei 750 nm

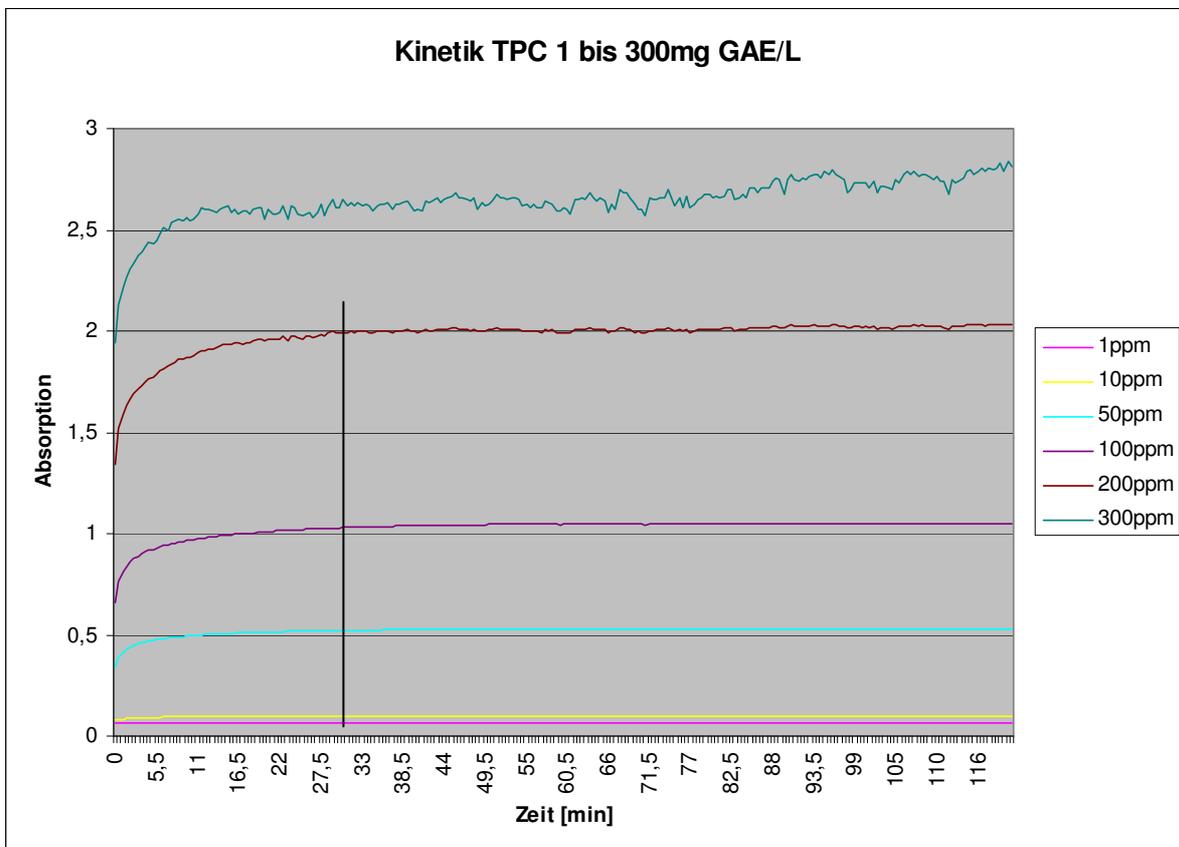


Abb. 67: Kinetik zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mit der Folin-Ciocalteu-Methode und Gallussäurestandards von 1 bis 300 ppm und einer Reaktionszeit von 2h

4.1.3 Polyphenolanalytik

Die Analytik der Pflanzenphenole ist in den letzten Jahren stetig verbessert worden. Durchgesetzt hat sich dabei die Analytik mittels HPLC-DAD und -MS. Hierbei wird zumeist eine RP-C18 oder RP-C8 Säule eingesetzt und als Eluenten dienen angesäuerte Acetonitril- oder Methanol-Gradienten (DE RIJKE et al. 2006, TSAO und YANG 2003, CASTELLARI et al. 2002, VRHOVSEK et al. 1997, RECHNER 2000). Die vorliegende Arbeit stützt sich dabei auf die Veröffentlichung von CASTELLARI et al. (2002).

Um die Auftrennung der Polyphenole zu verbessern, wurden zwei Merck Chromolith® - Säulen hintereinander geschaltet und der Eluentenvolumenstrom sowie das Gradientenprogramm an den zulässigen Druck von max. 200 bar angepasst. Weiter wurde der einzustellende pH-Wert auf 2,3 verringert, um die Peaks der Anthocyane schärfer zu erhalten.

Technische Daten der HPLC-Anlage:

Hersteller: VWR-Hitachi

Modell und Ausstattung: HPLC - LaChrom Elite, Pumpe L-2130 mit 4-Kanal-Niederdruckgradientenmischer, UV/VIS-Diodenarray-Detektor L-2450, Autosampler L-2200, Säulenthermostat L-2350, Organisator mit Stromversorgung und Eluenten-Wanne, externer Degaser UniFlows DG-2510, Software EZChrome Elite.

Säulen: Vorsäule Merck Chromolith® RP-18e, 5*4,6 mm, max. 200 bar, pH-Bereich 2-7,5

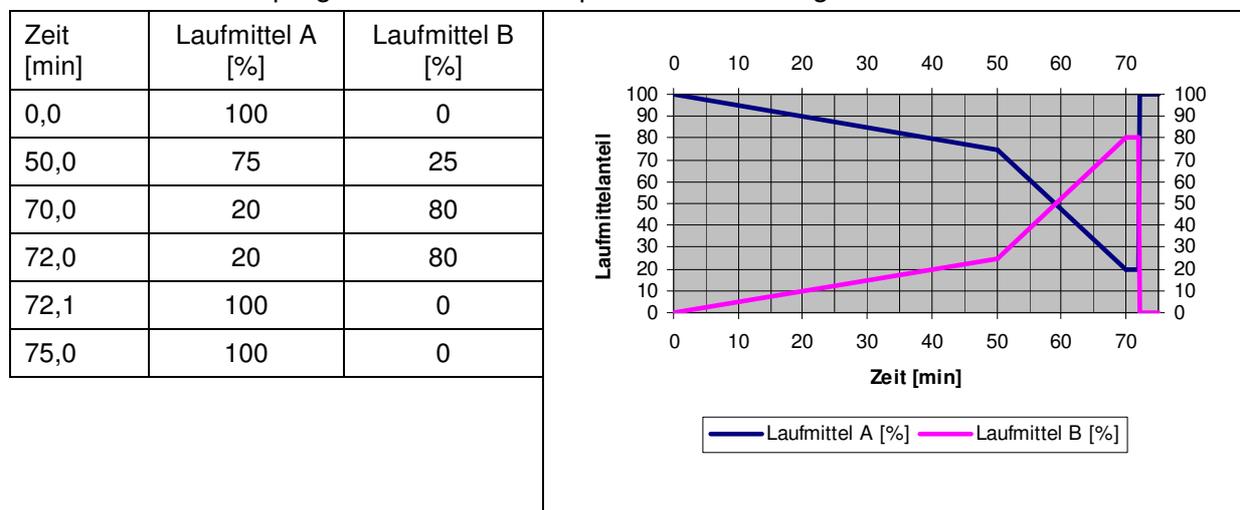
Säule 1 u. 2: Merck Chromolith® RP-18e, 100*4,6 mm, max. 200 bar, pH-Bereich 2-7,5, max. 45°C

Eluenten: Laufmittel A: 100 %Vol entmineralisiertes Wasser, mit Phosphorsäure auf pH-Wert 2,3 eingestellt (pH-Meter 744 von Metrohm), im Ultraschallbad 15 min entgast

Laufmittel B: 100 %Vol Methanol, mit Phosphorsäure auf pH-Wert 2,3 eingestellt, im Ultraschallbad 15 min entgast

Das Gradientenprogramm ist in Tab. 17 dargestellt. Der Säulenofen ist auf 30 °C temperiert, der Eluentenvolumenstrom beträgt 2,5 mL/min, die Injektionsvolumina betragen 50 µL für die Standards und 50 µL gegebenenfalls 20 oder 10 µL für aufkonzentrierte Proben.

Tab. 17: Gradientenprogramm zur Pflanzenphenolbestimmung



Chemikalien:

Dimethylsulfoxid 99,5 %ig, C₂H₆SO, 78,13 g/mol, Sigma-Aldrich #D-5879

Methanol 99,9 %ig, CH₄O, 32,04 g/mol, ρ = 0,79 g/mL, Roth #7342.1

ortho-Phosphorsäure 89 %ig, H₃PO₄, 98,0 g/mol, Merck #1.00564.2500

Durchführung:

Die Qualifizierung und Quantifizierung erfolgt über externe Standards. Zur Qualifizierung ist die Retentionszeit sowie das Wellenlängenprofil (Spektrum) von 200 – 550 nm der Standards heranzuziehen, da durch Matrixeffekte erhebliche Retentionszeitverschiebungen erfolgen können (Abb. 68). Die Wellenlängenprofile sind in Anhang I dargestellt, werden jedoch in der Software EZChrome automatisch über eine Pflanzenphenolspektren-Bibliothek, die mit den externen Standards angelegt wurde, verglichen und verwaltet.

In Kapitel 3.2.1.2 und 3.2.2.2 ist ein Überblick der zahlreichen, in Weinen und Apfelsaft enthaltenen Pflanzenphenole gegeben, die auch in den entsprechenden Treestern zu erwarten sind. Wie erwähnt, sind bei der Verwendung der HPLC-DAD-Analytik Standards erforderlich, wobei wegen deren Vielzahl eine Auswahl zu treffen ist. Es sind hierfür die in Trauben, Äpfeln, Weinen und Apfelsäften am häufigsten vorkommenden und quantitativ am stärksten vertretenen Substanzen auszuwählen, die zudem als Standards erworben werden können. So wurden anhand der Literatur und persönlichen Gesprächen (EDER 2005) die in Tab. 18 aufgeführten 29 Pflanzenphenolstandards ausgewählt.

Zur Quantifizierung wurden die Pflanzenphenole in drei Wellenlängen-Gruppen (280, 325, 520 nm) eingeteilt, bei denen Ihre Konzentrationen über die Flächen und Kalibriergeraden ermittelt wurden. Die Einteilung in die Wellenlängen-Gruppen erfolgte aufgrund ihrer Wellenlängenmaxima aus den UV/VIS-Spektren, deren tatsächliche Absorptionsmaxima in der Nähe der detektierten Maxima liegen, um möglichst kleine Bestimmungs- und Nachweisgrenzen erreicht werden konnten (Tab. 19, Abb. 69 bis 71, Anhang I).

Pflanzenphenolstandards:

Tab. 18: Ausgesuchte Pflanzenphenolstandards zur Qualifizierung und Quantifizierung von Pflanzenphenolen mittels HPLC-DAD aus Wein- und Apfeltrester

Bezeichnung		verfügbar bei Firma	Bestell-Nr.
Phenolcarbonsäuren			
Hydroxybenzoesäuren	<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	SigmaAldrich	H20059-100G
	Protocatechusäure	SigmaAldrich	P5630-10G
	Vanillinsäure	SigmaAldrich	H36001-25G
	Gallussäure	SigmaAldrich	G7384-100G
	Syringasäure	SigmaAldrich	S6881-5G
	Gentisinsäure	SigmaAldrich	149357-10G
	Kaffeensäure	SigmaAldrich	C0625-5G
Hydroxycimtsäuren	<i>p</i> -Cumarinsäure	SigmaAldrich	C9008-5G
	Ferulasäure	Fluka	46278
	Caftarinsäure	PhytoPlan	6106.98
	Sinapinsäure	Fluka	85430
	Chlorogensäure-Hemihydrat	Fluka	25700
Fortsetzung S. 94			

Bezeichnung		verfügbar bei Firma	Bestell-Nr.
Flavonoide			
Flavonole	Kämpferol-3-O-glucosid (Astragalin)	PhytoPlan	3242.97
	Quercetin-dihydrat	SigmaAldrich	Q0125-10G
	Quercetin-3-O-glucosid (Isoquercitrin)	SigmaAldrich	17793-10MG-F
	Myricetin (Cannabiscetin)	SigmaAldrich	M6760-10MG
Antho- cyanidine/ Anthocyane	Cyanidin-3-O-glucosid	Polyphenols	0201-1
	Delphinidin-3-O-glucosid (Mirtillin)	Polyphenols	1401-1
	Peonidin-3-O-glucosid	Extrasynthese	0929
	Petunidin-3-O-glucosid	Polyphenols	0501-1
	Malvidin	Extrasynthese	0913 S
	Malvidin-3-O-glucosid (Oenin)	Polyphenols	0601-1
Flavan-3-ole	(+)-Catechin	Carl Roth	6200.1
	(-)-Epicatechin	PhytoPlan	3305.99
	(-)-Epicatechin-3-O-gallat	PhytoPlan	3307.99
	(-)-Epigallocatechin	PhytoPlan	3306.99
Proantho- cyanidine	Proanthocyanidine B2 (Ec-(4 β →8)-Ec)	Extrasynthese	0984
Stilbene			
Einfache Stilbene	<i>trans/cis</i> -Resveratrol	SigmaAldrich	R5010-100MG
Phenylpropane			
Tyrosol (2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol)		Fluka	79058

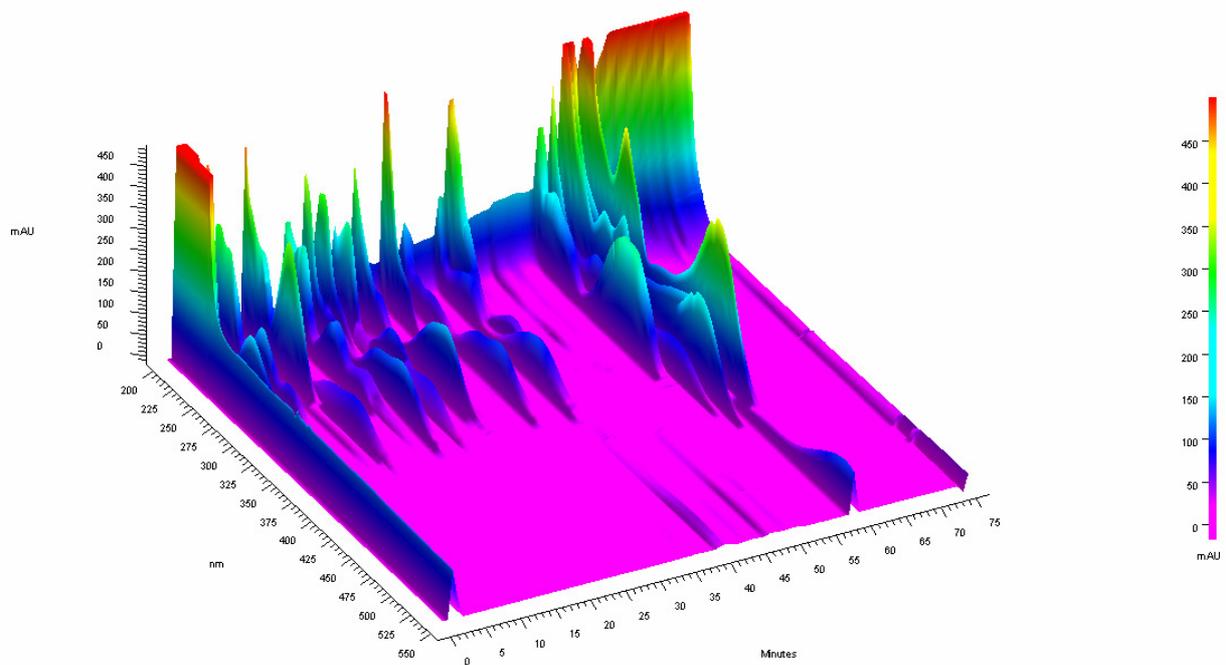


Abb. 68: Dreidimensionales I/λ/t-Chromatogramm von 29 Pflanzenphenolstandards

Tab. 19: Retentionszeiten der Standardsubstanzen, Angabe der Wellenlängenmaxima und Zuordnung zur Detektion für quantitative Auswertung mittels EZChrome – Software

Peak	Substanz	Retentionszeit [min]	λ_{\max} des Wellenlänge-Spektrums 200 – 550 nm	detektiert bei [nm]
1	Gallussäure	3,74	215, 271	280
2	Protocatechusäure	6,63	205, 260, 294	280
3	p-Hydroxybenzoesäure	10,37	256	280
4	Tyrosol	11,07	220, 276	280
5	Gentisinsäure	11,44	211, 328	325
6	Caftarsäure	11,95	218, 238, 328	325
7	Vanillinsäure	16,25	218, 261, 292	280
8	(+)-Catechin	18,38	279	280
9	Kaffeesäure	18,81	217, 235, 322	325
10	(-)-Epigallocatechin	20,29	270	280
11	Chlorogensäure	22,04	218, 235, 325	325
12	Syringasäure	22,58	217, 275	280
13	Proanthocyanidin B2	25,30	279	280
14	p-Cumarinsäure	25,93	226, 309	325
15	(-)-Epicatechin	29,51	278	280
16	Ferulasäure	32,67	217, 235, 322	325
17	Delphinidin-3-O-glucosid	34,77	274, 525	520
18	Sinapinsäure	37,67	236, 322	325
19	Cyanidin-3-O-glucosid	38,44	280, 515	520
20	(-)-Epicatechin-3-O-gallat	39,05	277, 516	280
21	Petunidin-3-O-glucosid	42,25	275, 525	520
22	Peonidin-3-O-glucosid	45,15	279, 516	520
23	Malvidin-3-O-glucosid	47,85	275, 527	520
24	trans-Resveratrol	51,65	215, 307	325
25	Quercetin-3-O-glucosid	53,76	257, 355	325
26	Myricetin	55,47	254, 373	325
27	Kämpferol-3-O-glucosid	56,77	265, 347, 549	325
28	Malvidin	58,00	270, 538	520
29	Quercetin	58,89	255, 372	280

Herstellung der Standardlösungen:

Qualifizierung und Quantifizierung der Pflanzenphenole:

Urstandards:

Zunächst werden Urstandards durch Einwaage der Standardsubstanzen (Tab. 18) von 1 mg in 1.000 μL Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt (etwa 1.000 ppm – Urstandards). Diese Urstandards sind bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ über mehrere Monate stabil.

Gebrauchsstandards:

Zur Qualifizierung wurden 10 mg/L (10 ppm) – Gebrauchsstandards aus den Urstandards mit entmineralisiertem Wasser hergestellt und einzeln zur Erstellung der Pflanzenphenolspektren-Bibliothek über die HPLC gefahren und deren Chromatogramme von 200 – 550 nm aufgenommen. Zur Quantifizierung wurde ein Mischstandard aller 29 Urstandards mit einer Konzentration von 30 mg/L hergestellt (29 Urstandards * je 100 µL + 433 µL entmineralisiertes Wasser = 3,333 mL mit 30,00 mg/L je Standard). Durch eine Verdünnungsreihe wurden hieraus weitere Gebrauchsmischstandards mit 20, 10, 5 und 3 mg/L hergestellt (Tab. 20). Zur Aufgabe auf die Chromatographiesäule mittels Autosampler L-2200 sind wenigstens 400 bis 500 µL in 1,5 mL Gewindeflaschen ((32*11,6) mm) erforderlich (Schraubkappen mit Loch und 60° Shore A Naturkautschuk).

Tab. 20: Verdünnungsreihe der Polyphenol-Mischstandards

Gebrauchsmischstandard	Anzahl Standards	Volumen Urmischstandard [µL]	Volumen H ₂ O [µL]	Gesamtvolumen [µL]
30 mg/L	3	400,0	0	400
20 mg/L	3	333,3	166,7	500
10 mg/L	3	166,7	333,4	500
5 mg/L	3	83,33	416,7	500
3 mg/L	3	50,00	450,0	500
	Summe	3 * 1.033,3 = 3.100 µL aus 3.333 µL Urmischstandard (30 mg/L)		

Die Gebrauchsmischstandards sind bei -30 °C einzufrieren und mehrere Monate stabil und bei Bedarf kurz vor der Kalibrierung aufzutauen.

Probenvorbereitung:

Zentrifugieren der Extrakte (6.000*g, 10 min) und 0,45 µm membranfiltrieren (Schleicher & Schuell, Membranfilter RC55 (regenerierte Cellulose, 0,45 µm, Durchmesser 47 mm)). Gegebenenfalls mit entmineralisiertem Wasser verdünnen.

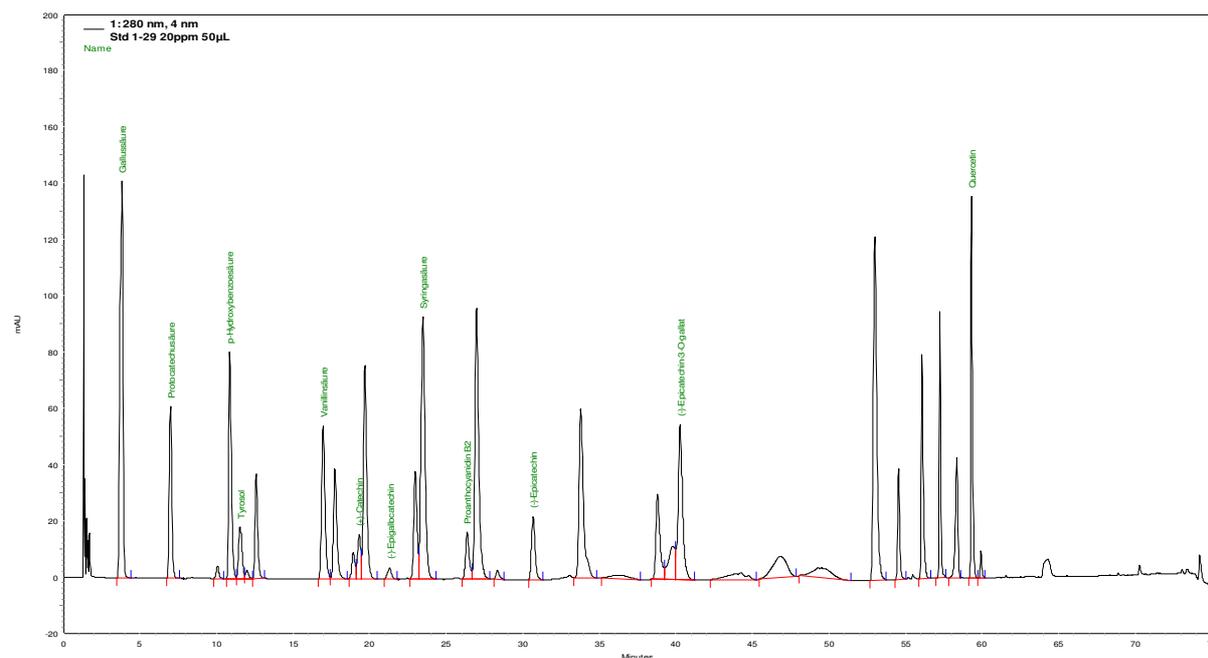


Abb. 69: Zweidimensionales I/t-Chromatogramm von Pflanzenphenolstandards bei 280 nm. (Zuordnung der Peaks siehe Tab. 19)

Technische Daten der HPLC-Anlage:

Hersteller: VWR-Hitachi

Modell und Ausstattung: HPLC - LaChrom Elite, Pumpe L-2130 mit 4-Kanal-Niederdruckgradientenmischer, UV/VIS-Diodenarray-Detektor L-2450 und nachgeschalteter RI Detektor L-2490, Autosampler L-2200, Säulenthermostat L-2350, Organisator mit Stromversorgung und Eluenten-Wanne, externer Degaser UniFlows DG-2510, Software EZChrome Elite

Vorsäule: Hamilton PRP-X500 H⁺-Form, (7,8 * 5) mm, max. 1000 psi (69 bar), max. 90 °C

Säule: Hamilton HC-75 H⁺-Form, (7,8 * 305) mm, particle size 10 µm, max. 1000 psi (69 bar), max. 1,0 mL/min, operating temperature 25 – 90 °C,

Eluenten: 2,5 mM H₂SO₄, im Ultraschallbad 15 min entgast

Bedingungen:

Die Konzentration des Eluenten wurde auf 2,5 mM H₂SO₄ festgelegt, um den Apfelsäure-RI-Peak, der in der originalen Veröffentlichung zwischen den Zuckern Glucose und Fructose liegt und diese weit überschneidet, gesamt in den Glucose-RI-Peak zu setzen. Die Apfelsäure wird dann über das UV-Chromatogramm ausgewertet und deren Konzentration in die RI-Chromatogrammfläche umgerechnet und von der Fläche des Glucose-Apfelsäure-RI-Peaks subtrahiert, so dass rechnerisch die reine Glucose-Fläche angegeben werden kann.

Weitere Bedingungen:

Aufgabevolumen: Um die Empfindlichkeit der Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu verbessern, wurden statt 5 µL 20 µL aufgegeben.

Säulenofentemperatur: Die Säulentemperatur wurde bei 65 °C der Originalarbeit belassen.

Fließgeschwindigkeit und Analysenzeit: Der Volumenstrom wurde von 0,8 mL/min der Originalarbeit auf 0,6 mL/min reduziert, um die Säule zu entlasten (etwa 15 bar) und das Chromatogramm zeitlich auf 30 min zu strecken.

UV-Detektion: 214 nm, RI-Detektion bei 35 °C (Std-Chromatogramme in Abb. 72)

Chemikalien: Schwefelsäure 95 %ig, H₂SO₄, 98,08 g/mol, ρ = 1,84 g/mL, Roth #4623.5

Durchführung:

Herstellen der Standards:

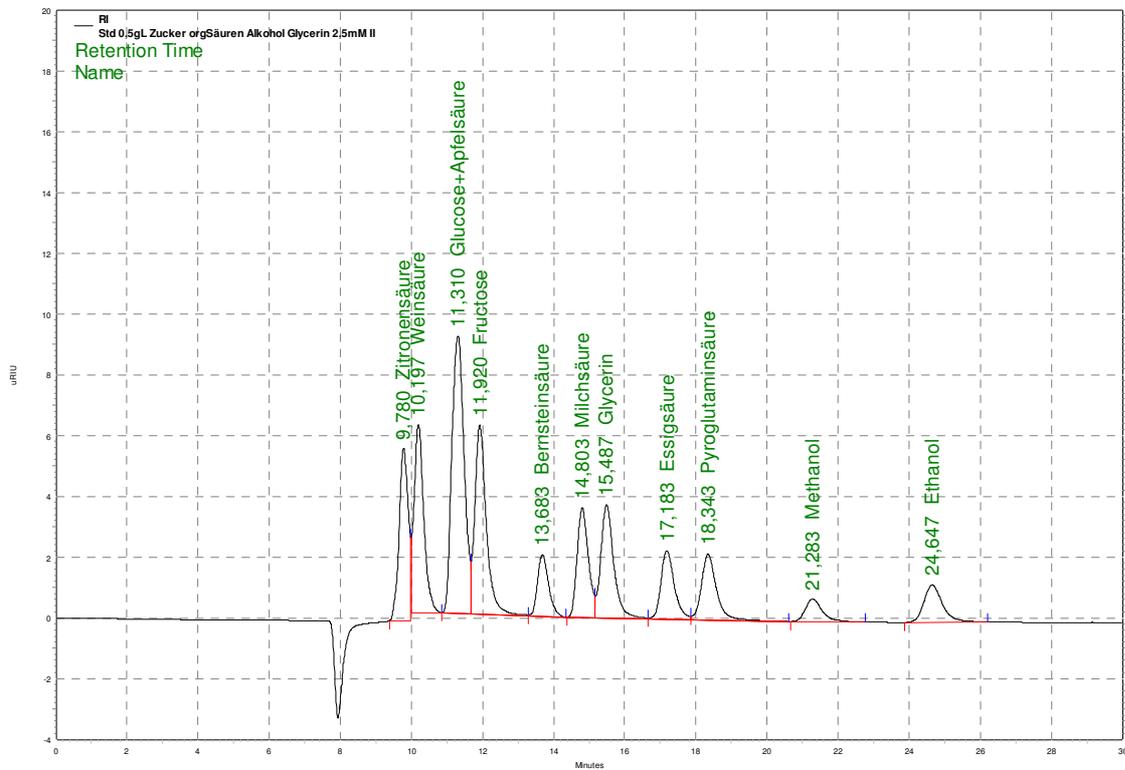
Die Qualifizierung und Quantifizierung erfolgt über externe Standards. Zur Qualifizierung werden die Retentionszeiten einzeln gefahrener 1 g/L Standards herangezogen. So sind zunächst Urstandards mit 100 g/L Standardsubstanzen in 10 mL Messkolben (Apfelsäure 20 mL) herzustellen und diese auf 1 g/L zu verdünnen (100 µL Urstandards in 10 mL Messkolben mit entmineralisiertem Wasser auffüllen). Als Standardsubstanzen für organische Säuren werden gerne Salze verwendet, so dass sich abweichende Einwaagen zu 1 g in 10 mL Messkolben ergeben. Bernsteinsäure und Pyroglutaminsäure haben geringe Wasserlöslichkeiten (K_L Bernsteins. = 67 g/L und K_L Pyroglutamins. = 52 g/L), so dass diese als 50 g/L Urstandards hergestellt werden. Zur Quantifizierung sind aus den Urstandards Mischstandards der 12 zu analysierenden Substanzen mit 5, 2, 1, 0,5 und 0,1 g/L herzustellen (Tab. 22 und 23). In Tab. 21 sind die Einwaagen der Salze angegeben und in Abb. 72 UV- und ein RI-Chromatogramme mit Angaben der Retentionszeiten eines 0,5 g/L-Standards.

Probenvorbereitung:

Wie auch bei der Probenvorbereitung zur Einzelpolyphenolbestimmung werden die Extrakte zentrifugiert (6.000*g, 10 min) und mit 0,45 µm Membranen filtriert (Schleicher & Schuell, Membranfilter RC55, regenerierte Cellulose, Durchmesser 47 mm, #10410212). Weiter sind

die Proben gegebenenfalls mit entmineralisiertem Wasser 1:20 oder 1:50 zu verdünnen und im Ultraschallbad 5 min zu entgasen.

RI-Chromatogramm



UV-Chromatogramm

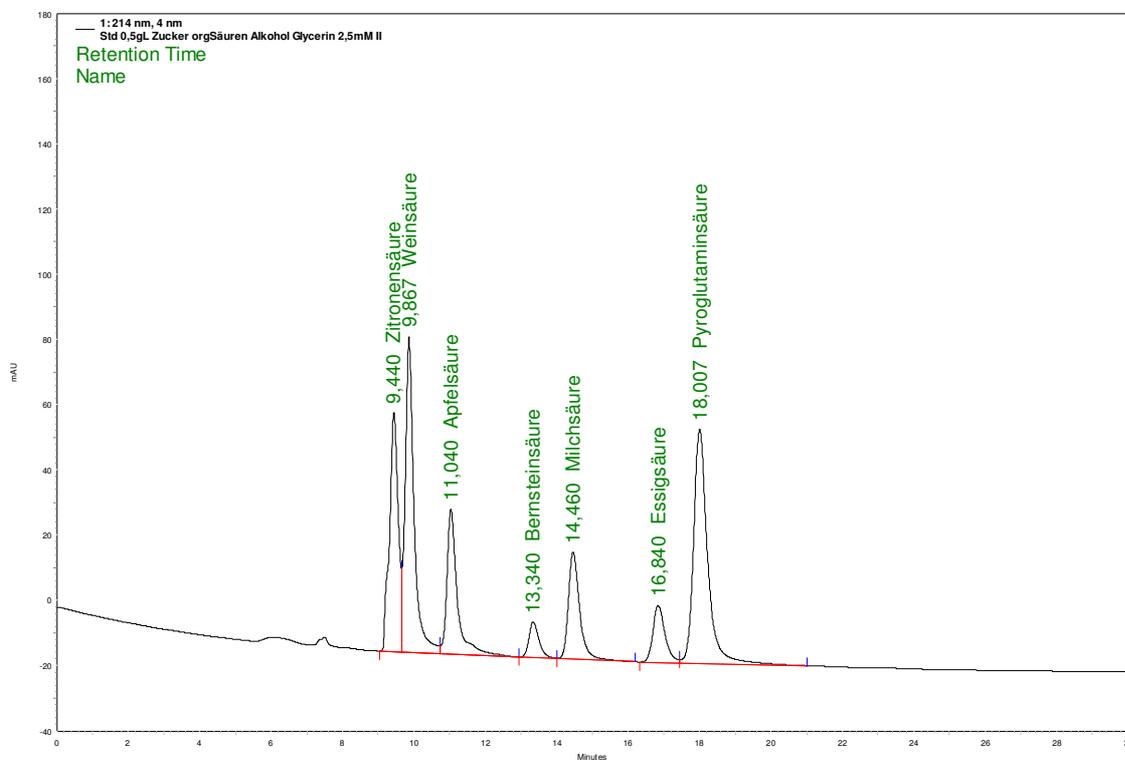


Abb. 72: RI- und UV-Chromatogramme der Standards zur Analyse der Zucker, org. Säuren, Glycerin und Alkohole in Wein- und Apfeltrestereextrakten inkl. Retentionszeiten [min]

Tab. 21: Einwaagen der Urstandards zur HPLC-Analyse von org. Säuren, Zuckern, Glycerin und Alkoholen in Weinen, Apfelsaft und ihren Tresterextrakten

Urstandard	Substanz zur Einwaage	Einwaage 100 g/L Std in 10 mL Meßk.	Hersteller
1. Zitronensäure	Zitronensäure ≥99% ig	1,000 g	Sigma Aldrich
2. Weinsäure	Dinatriumtetrat-Dihydrat ≥99,5 %ig	1,533 g	Merck
3. Glucose	Glucose-Monohydrat ≥99,5 %ig	1,100 g	Roth
4. Apfelsäure	DL-Apfelsäure 99% ig	2,000 g in 20 mL	Fluka
5. Fructose	Fructose ≥99 %ig	1,000 g	Sigma Aldrich
6. Bernsteinsäure	Bernsteinsäure ≥99,5 %ig	1,000 g in 20 mL	Fluka
7. Milchsäure	Natrium-L-Lactat 99 %ig	1,244 g	Fluka
8. Glycerin	Glycerin 99,0–100,5 %ig (ρ=1,258 g/mL)	1,000 g (0,795 mL)	Merck
9. Essigsäure	Natriumacetat wasserfrei ≥99 %ig	1,366 g	Fluka
10. Pyroglutaminsäure	DL-Pyroglutaminsäure ≥99 %ig	1,000 g in 20 mL	Fluka
11. Methanol	Methanol ≥99,8 %ig (ρ=0,79 g/mL)	1,000 g (1,266 mL)	Roth
12. Ethanol	Ethanol ≥99,8 %ig (ρ=0,79 g/mL)	1,000 g (1,266 mL)	Roth

Tab. 22: Herstellung der Verdünnungen der Urstandards zu Gebrauchsmischstandards zur HPLC-Analyse von org. Säuren, Zuckern, Glycerin und Alkoholen

Gebrauchsstandard	Urstandard Nr. (aus Tab. 21)	V _{Urstandard} [μL]	H ₂ O [mL]	Messkolben
5 g/L Mischstandard	1 - 12	12 * 500	4,000	10 mL
2 g/L Mischstandard	1 - 12	12 * 200	7,600	10 mL
1 g/L Mischstandard	1 - 12	12 * 100	8,800	10 mL
0,5 g/L Mischstandard	1 - 12	12 * 50	9,400	10 mL
0,1 g/L Mischstandard	1 - 12	12 * 10	9,880	10 mL

Tab. 23: Herstellung der Verdünnungen des Urstandards zu Gebrauchsmischstandards zur HPLC-Analyse von Apfelsäure

Gebrauchsstandard	Urstandard Nr. (aus Tab. 21)	V _{Urstandard} [μL]	H ₂ O [mL]	Messkolben
5 g/L Apfelsäurestandard	4	500	9,500	10 mL
2 g/L Apfelsäurestandard	4	200	9,800	10 mL
1 g/L Apfelsäurestandard	4	100	9,900	10 mL
0,5 g/L Apfelsäurestandard	4	50	9,950	10 mL
0,1 g/L Apfelsäurestandard	4	10	9,990	10 mL

Die jeweils erhaltenen 10 mL Gebrauchsmisch- und Apfelsäurestandards werden auf 20 verschließbare 1,5 mL PP-Röhrchen („Eppis“) mit je 500 μL aufgeteilt und bei -30 °C eingefroren und sind so über viele Monate stabil. Nach Bedarf ist jeweils eine Kalibrierreihe aufzutauen und direkt einzusetzen.

4.1.5 Ionanalytik

Die zu analysierenden Ionen wurden nach den Anwendungsanleitungen der Firma DIONEX (1995, 1996) mittels Ionenchromatographie durchgeführt.

Technische Daten der Anlage zur Ionenchromatographie:

Hersteller: Dionex

Modell und Ausstattung: DX-120 IonChromatograph für isokratische Anwendungen mit Suppressoren (Anion ASRS®-Ultra 4-mm, Kation CSRS®-Ultra 4-mm), Detection Stabilizer Model DS4-1, Leitfähigkeitsdetektor ED40, Software Chromeleon

Säulen: Anionen: IonPac® AG14 Guard Column 4* 50 mm und
IonPac® AS14 Analytical Column 4 * 250 mm, 9 µm
Kationen: IonPac® CG12A Guard Column 4* 50 mm und
IonPac® CS12A Analytical Column 4 * 250 mm

Weitere Bedingungen:

Fließgeschwindigkeit: Anionen 1,2 mL/min
Kationen 1,0 mL/min

Säulentemperatur: RT

Laufmittel: Anionen: 3,5 mM Na₂CO₃ / 1,0 mM NaHCO₃
Kationen: 20 mM Methansulfonsäure

Chemikalien:

Natriumcarbonat ≥99,5 %ig, Na₂CO₃, 105,99 g/mol, Fluka #71350

Natriumhydrogencarbonat ≥99,5 %ig, NaHCO₃, 84,01 g/mol, Merck #1.06329.1000

Methansulfonsäure ≥99,0 %ig, CH₄O₃S, 96,10 g/mol, ρ=1,482 g/mL, Fluka #64280

Standards Kationen (jeweils mit 1000 mg/L):

Natrium Na⁺, als Natriumnitrat in 0,5 mol/L Salpetersäure, Merck #1.70238.0500

Ammonium NH₄⁺, als Ammoniumchlorid, Merck #1.19812.0500

Kalium K⁺, als Kaliumnitrat in 0,5 mol/L Salpetersäure, Merck #1.70230.0500

Magnesium Mg²⁺, als Magnesiumnitrat in 0,5 mol/L Salpetersäure, Merck #1.19788.0500

Calcium Ca²⁺, als Calciumnitrat in 0,5 mol/L Salpetersäure, Merck #1.19778.0500

Standards Anionen (jeweils mit 1000 mg/L):

Chlorid Cl⁻, als Natriumchlorid, Merck #1.19897.0500

Nitrat NO₃⁻, als Natriumnitrat, Merck #1.19811.0500

Phosphat PO₄³⁻, als Kaliumdihydrogenphosphat, Merck #1.19898.0500

Sulfat SO₄²⁻, als Natriumsulfat, Merck #1.19813.0500

Nitrit NO₂⁻, als Natriumnitrit, Merck #1.19899.0500

Durchführung:

Ansatz der Laufmittel:

Anionen (3,5 mM Na₂CO₃ und 1,0 mM NaHCO₃): Zunächst wird eine Stammlösung mit 350 mM Na₂CO₃ und 100 mM NaHCO₃ angesetzt. Dazu werden rechnerisch 3,7097 g Na₂CO₃ und 0,8401 g NaHCO₃ in einem 100 mL Messkolben eingewogen und mit entmineralisiertem Wasser mit 17,8 MΩ/cm oder besser gelöst und zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Stammlösung ist über mehrere Wochen stabil und ist lediglich 1:100 mit entmineralisiertem Wasser gleicher Qualität zum Herstellen des Laufmittels zu verdünnen (10,00 mL in 1000 mL Messkolben).

Kationen (20 mM CH₄O₃S): Dazu sind 1,922 g (= 1,303 mL) Methansulfonsäure in einem 1.000 mL Messkolben mit entmineralisiertem Wasser (Qualität 17,8 MΩ/cm oder besser) zu lösen und zur Eichmarke aufzufüllen.

Ansatz der Standards:

Aus Vorversuchen mit Weinen, Apfelsaft und Tresterextrakt wurden die Zielkonzentrationen der Standards festgelegt. Aus der Literatur (DIONEX 1995, 1996) sind die Retentionszeiten bereits bekannt, so dass direkt Urmischstandards mit 100 ppm Na⁺, 50 ppm NH⁴⁺, 200 ppm K⁺, 50 ppm Mg²⁺ und 50 ppm Ca²⁺ als Kationenurmischstandard sowie 100 ppm Cl⁻, 50 Nitrit NO²⁻, 50 ppm NO³⁻, 50 ppm PO₄³⁻ und 200 ppm SO₄²⁻ als Anionenurmischstandard herzustellen waren. Diese Urmischstandards sind bei -30 °C über Monate stabil und wurden daher in 1,5 mL PP-Röhrchen („Eppis“) portioniert eingefroren. Bei Bedarf wurden mittels Verdünnungen aufgetauter Urmischstandards die Kalibriergeraden der Ionenanalytik erstellt. Der Ansatz der Urmischstandards und der Verdünnungen für die Kalibrierung sind in Tab. 24 gezeigt.

Tab. 24: Herstellung der Urmischstandards und deren Verdünnung zu Kalibrierreihen

	Herstellung Urmischstandard			Herstellung der Verdünnungen zur Kalibrierung			
	Soll- C _{Urmischstd} [ppm]	V _{1.000 ppm} Standards in	H ₂ O in 100 mL Messkolben	Verd 1:5 [ppm]	Verd 1:10 [ppm]	Verd 1:20 [ppm]	Verd 1:40 [ppm]
Kationen							
Na ⁺	100	10 mL	55,00 mL	20	10	5	2,5
NH ₄ ⁺	50	5 mL		10	5	2,5	1,25
K ⁺	200	20 mL		40	20	10	5
Mg ²⁺	50	5 mL		10	5	2,5	1,25
Ca ²⁺	50	5 mL		10	5	2,5	1,25
		Σ 45,00 mL					
Anionen							
Cl ⁻	100	10 mL	55,00 mL	20	10	5	2,5
NO ₂ ⁻	50	5 mL		10	5	2,5	1,25
NO ₃ ⁻	50	5 mL		10	5	2,5	1,25
PO ₄ ³⁻	50	5 mL		10	5	2,5	1,25
SO ₄ ²⁻	200	20 mL		40	20	10	5
		Σ 45,00 mL					

In Abb. 73 sind Kalibrier-Chromatogramme mit Retentionszeiten der Kationen und Anionen und Chromatogramme eines methanolischen Extrakts (10 g Feuchttrester in 100 mL MeOH, 30 min, siedend unter Rückfluss) dargestellt.

Probenvorbereitung:

Wie auch bei der Probenvorbereitung zur Einzelpflanzenphenolbestimmung, werden die Extrakte zentrifugiert (6.000*g, 10 min) und mit 0,45 µm Membranen filtriert (Schleicher & Schuell, Membranfilter RC55, regenerierte Cellulose, Durchmesser 47 mm, #10410212). Weiter sind die Proben mit entmineralisiertem Wasser 1:20 oder 1:50 zu verdünnen und im Ultraschallbad 5 min zu entgasen. Bei hohen Phenolcarbonsäuregehalten, wie in diesem Fall, sind die verdünnten Proben zuvor über Absorberkartuschen von den Phenolen zu befreien (Varian GmbH, Bond Elut – C18 Kartuschen 500 mg, 3 mL, #12162028). Die Kartuschen können mit Methanol/Aceton/verd. HCl regeneriert werden. Das Vorgehen der Polyphenolentfernung mittels C18-Kartuschen ist in Abb. 74 gezeigt.

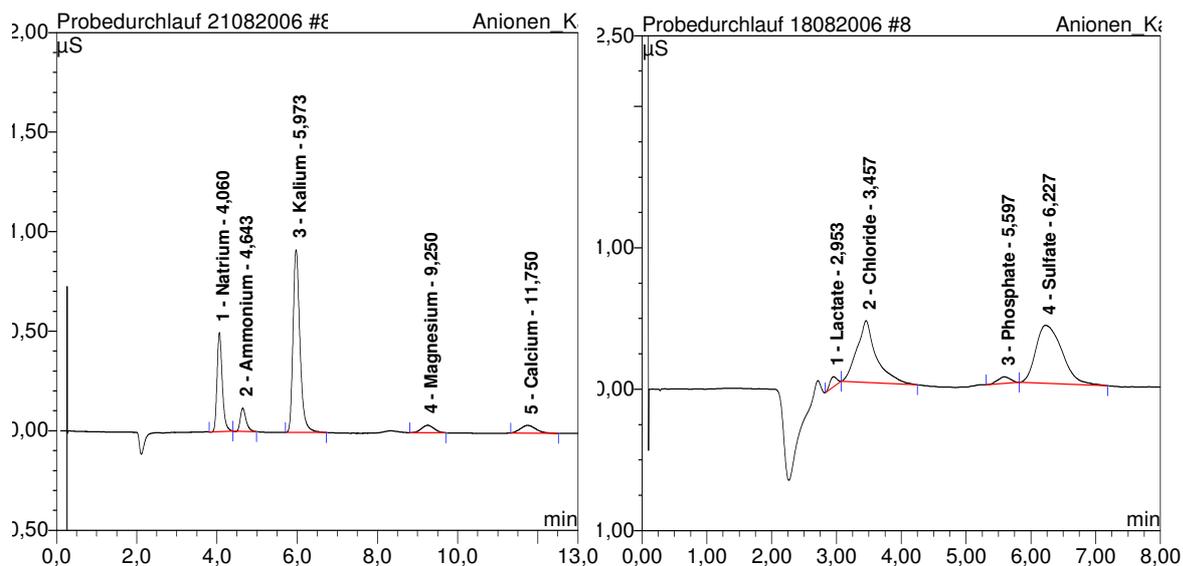
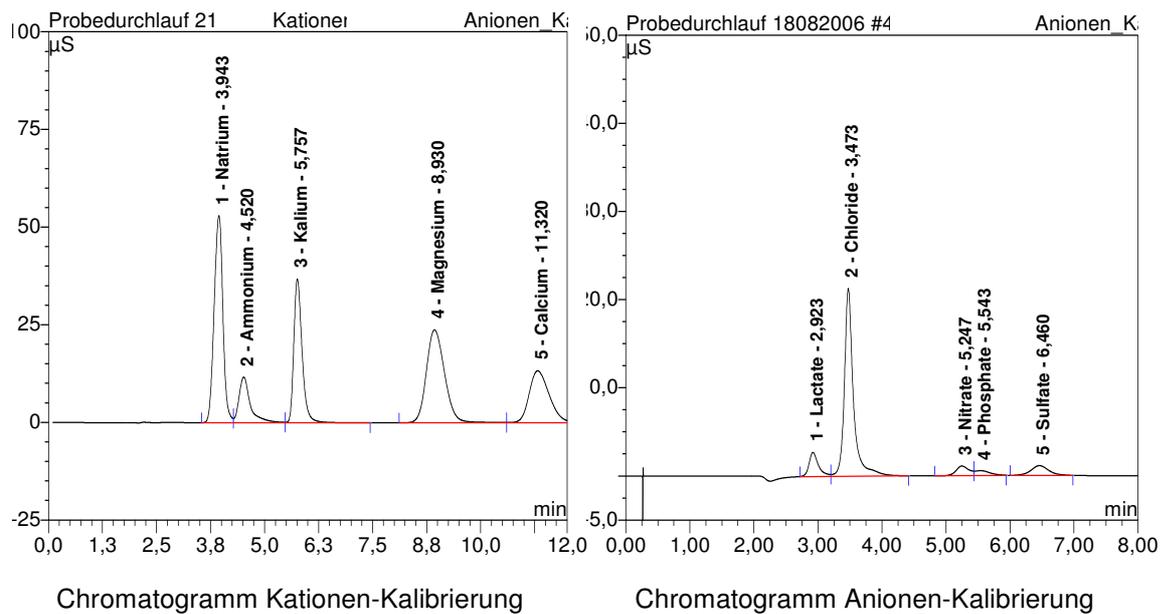
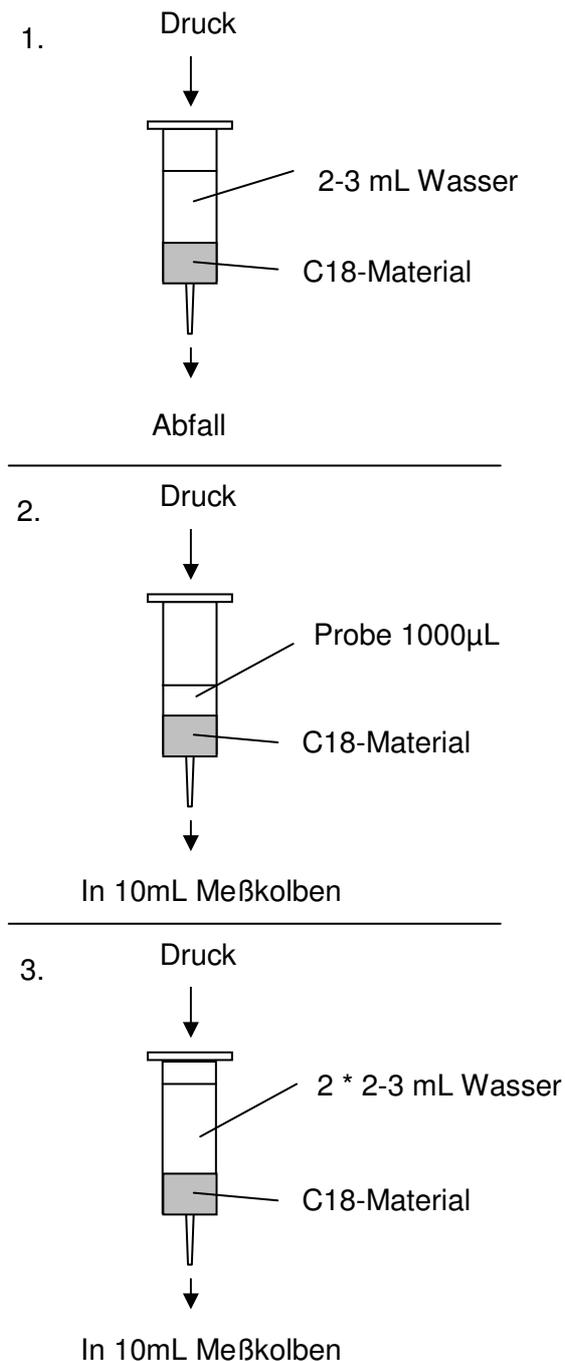


Abb. 73: Kalibrier-Chromatogramme mit Retentionszeiten der Kationen und Anionen und Chromatogramme eines methanolischen Extrakts



Probenvorbereitung:

1. Konditionierung des C18-Materials:

2 – 3 mL entmineralisiertes Wasser auf die C18-Füllung geben und mittels aufgesetzter 50 mL - Spritze und Abdichtung zur Kartusche durch das C18-Material drücken. Etwa 1 mm Wasserüberstand belassen. C18-Material ist vollständig mit Wasser benetzt.

2. Probenaufgabe und Polyphenol-Adsorption:

1.000 µL Probe (max. 10 – 15 % Vol org. LM wie z. B. MeOH, EtOH, Aceton, ggf. 1:10 Verdünnung mit entmineralisiertem Wasser) in die Kartusche pipettieren und ebenfalls mit aufgesetzter 50 mL - Spritze und Abdichtung zur Kartusche durch das C18-Material drücken und dabei in 10 mL Messkolben auffangen. Polyphenole sind auf C18-Material adsorbiert, Ionen gehen durch.

3. Auswaschen der Ionen aus der Kartusche:

2 * 2 – 3 mL entmineralisiertes Wasser in Kartusche pipettieren und mit aufgesetzter 50 mL - Spritze und Abdichtung zur Kartusche durch das C18-Material drücken und dabei in selben 10 mL Messkolben auffangen, wie unter Punkt 2. Ionen sind aus den Zwischenräumen und Poren im 10 mL Messkolben überführt, Polyphenole weiter auf dem C18-Material adsorbiert.

4. Probenverdünnung im Meßkolben:

10 mL Messkolben mit entmineralisiertem Wasser bis Eichmarke auffüllen und 1:10 Verdünnung bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigen.

5. Regeneration der Kartusche:

2 * 2 – 3 mL Methanol und 2 * 2 – 3 mL Aceton durch C18-Material drücken, ggf. leicht ansäuern (max. pH 3). Im Trockenschrank bei 50 °C trocknen.

Abb. 74: Probenvorbereitung zur Ionenchromatographie für Proben mit hohem Polyphenolgehalt

4.1.6 Weitere Analytik

Zur weiteren Beurteilung und Bilanzierung der Trennergebnisse ist der Glührückstand zu bestimmen, der in der Lebensmitteltechnologie auch als Aschegehalt bezeichnet wird. Weiter ist zur Berechnung der antioxidativen Kapazität [$\text{mmol Trolox}_{\text{Equiv.}}/\text{g TM}$] und des Gesamtphenolgehalts [$\text{mg GEA}/\text{g TM}$] bei Bezug auf die Trockenmasse diese zu bestimmen. Beide Analysen werden nach der deutschen amtlichen Sammlung (AS) von Untersuchungsverfahren des §35 LMBG durchgeführt.

4.1.6.1 Glührückstand (Asche)

Das Verfahren L31.00-4 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (Januar 1997) ist die europäische Norm zur Bestimmung der Asche in Frucht- und Gemüsesäften und verwandten Produkten, wozu auch die hier untersuchten Extrakte aus Trester, aber auch die Feuchttrester selber gezählt werden können.

Die Asche ist somit der Rückstand eines Frucht- oder Gemüsesaftes oder eines verwandten Produktes, nachdem die organischen Verbindungen und das Wasser durch Veraschen völlig entfernt worden sind. Der Glührückstand wird in g/L oder g/kg angegeben.

Geräte:

Schnell-Verascher: Hersteller Harry Gestigkeit, Type SVR/E, Betriebstemp, 550 °C (bis 950 °C) mit elektronischer Temperaturregelung, Aufnahme von Porzellantiegeln bis zu 50 mm Durchmesser, mit 2 Etagen: obere Etage Trocknung, Vorwärmung und untere Etage Veraschung.

Exikkator

Analytische Waage auf 0,1 mg

Porzellantiegel 50 mm Durchmesser

Grundlage des Verfahrens:

Die Asche wird nach Veraschung der Untersuchungsprobe bei 525 ±25°C und Abkühlung im Exikkator gravimetrisch bestimmt.

Durchführung:

In zuvor getrockneten und gewogenen 50 mm Porzellantiegeln werden 2 - 6 mL oder 2 - 6 g Probe auf 0,1 mg genau eingewogen und auf der ersten Etage des Schnellveraschers eingedampft und getrocknet. Anschließend wird in der zweiten Etage bis zur Massenkonstanz verascht (Einstellungen 550 °C, 4 h) (Abweichungen zum Verfahren L31.00-4: Platinschale 80 mm Durchmesser mit flachem Boden, Muffelofen 525 ±25 °C, Einwaage 25 mL bzw. 25 g). Vor jeder Wägung ist die Probe in einem Exikkator auf Raumtemperatur abzukühlen. Weiter ist zu beachten, dass sich bei Temperaturen >600 °C Chloride verflüchtigen und daher max. 550 °C erlaubt sind. Die veraschte Probe muss weiß sein, um auszuschließen, dass nichtveraschte Kohle enthalten ist, gegebenenfalls ist die Probe abzukühlen, mit H₂O₂ (30 % p. a.) zu durchfeuchten erneut zu trocknen und zu veraschen.

Berechnung für Trester:

$$(Gl. 45) \quad G_m = \frac{(m_2 - m_1)}{m_{Probe}} \cdot 1000 \quad \text{bzw.} \quad G_v = \frac{(m_2 - m_1)}{V_{Probe}} \cdot 1000$$

$G_{m \text{ bzw. } v}$ = Glührückstand auf die Masse oder das Volumen bezogen

m_1 = Masse des leeren Tiegels

m_2 = Masse des Tiegels mit Asche

m_{Probe} = Masse der Probeneinwaage (Trester)

V_{Probe} = Volumen der eingesetzten Probe (Tresterextrakte, Wein, Traubensaft, Apfelsaft)

4.1.6.2 Trockenmasse (gravimetrisch)

Das Verfahren L31.00-18 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (Januar 1997) ist die europäische Norm zur Bestimmung der gesamten Trockensubstanz in Frucht- und Gemüsesäften und verwandten Produkten, wozu auch die hier untersuchten Extrakte aus Trestern, aber auch die Feuchttrester selber gezählt werden können.

Die gesamte Trockensubstanz ist somit der Rückstand eines Frucht- oder Gemüsesaftes oder eines verwandten Produktes, nachdem das gesamte Wasser und andere flüchtige Bestandteile bei 70 °C und 6,6 kPa durch Verdampfung entfernt worden sind (neben Wasser auch Alkohole, ätherische Öle, CO₂ und gegebenenfalls Reaktionswasser aus Maillard-Reaktionen). Die Trockensubstanz wird als Massenanteil zur eingewogenen Probe in Prozent [%] angegeben.

Geräte:

Trockenschrank mit Ventilationseinrichtung: Hersteller Heraeus, Type Serie 6.000, Betriebstemp. 70 bzw. 110 °C mit elektronischer Temperaturregelung

Vakuum-Trockenschrank: Hersteller Heraeus, Type Serie 6.000, Betriebstemp. 70 °C mit elektronischer Temperaturregelung, Vakuumpumpe zur Erzeugung von min 6,6 kPa im Trockenschrank

Exikkator

Analytische Waage auf 0,1 mg

Aluminiumschalen mit Durchmesser 85 mm und Höhe 25 mm mit Glasstab, 20 g Seesand

Grundlage des Verfahrens:

Zur Bestimmung des Massenverlusts durch Trocknen wird die Probe sorgfältig mit Kieselgur oder einem ähnlichen Material (hier Seesand) gemischt. Die Mischung wird vorgetrocknet und anschließend 2 h in einem Vakuumtrockenschrank bei 70 ± 1 °C und einem Druck von etwa 6,6 kPa (66 mbar) getrocknet.

Durchführung:

In zuvor getrockneten (110 °C, min. 4 h im Trockenschrank mit Ventilationseinrichtung) und nach Abkühlung im Exikkator gewogenen Aluminiumschalen mit 20 g Seesand und Glasstab (m_1) werden etwa 15 g Probe auf 1 mg genau und zügig eingewogen (m_{Probe}) und mit dem Seesand mittels Glasstab verrieben. Anschließend folgt die Vortrocknung bei 70 °C im Trockenschrank mit Ventilationseinrichtung. Zum Endtrocknen wird die Probe in einen Vakuumtrockenschrank mit 6,6 kPa bei ebenfalls 70 °C gegeben und bis zur Massenkonstanz getrocknet (etwa 2 h) (m_2) (Abweichungen zum Verfahren L31.00-18: Aluminiumschale mit 85 mm Durchmesser * 25 mm Höhe ohne Deckel, Glasstab verbleibt in der Schale, etwa 20 g Seesand zur Verreibung, 110 °C Trockenofen mit Ventilationseinrichtung, statt Vakuumtrockenschrank). Vor jeder Wägung ist die Probe in einem Exikkator auf Raumtemperatur abzukühlen (Berechnung (Gl. 46)).

$$\text{(Gl. 46) } TM = \frac{(m_2 - m_1)}{m_{\text{Probe}}} \cdot 100[\%]$$

TM = Trockenmasse

m_1 = Masse leere Schale, Seesand u. Glasstab

m_2 = Masse Schale, Seesand, Glasstab u. Trockenrückstand

m_{Probe} = Masse der Probeneinwaage (Tresters)

4.1.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie-Blau reagiert mit basischen Aminosäuren (aus denen Proteine aufgebaut sind). Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm. Nach einer Kalibrierung des Systems mit bekannten Proteinkonzentrationen, können durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge der Summenparameter „Gesamtproteingehalt nach Bradford“ ungekannter Proben quantitativ bestimmt werden. Da unterschiedliche Proteine auch eine unterschiedliche Anzahl an Aminosäuren besitzen, ist die richtige Auswahl der Kalibrierstandards von Bedeutung. Es sollte ein Protein gewählt werden, welches den zu analysierenden Proteinen nahe kommt. International hat sich dabei das Rinder-Serum-Albumin durchgesetzt, wobei in der Mikrobiologie auch gerne Hühnerei-Lysozym für bakterielle Proteine eingesetzt wird.

Chemikalien:

Albumin-Protein Standard: BSA, Sigma # P-0914 (1mg BSA/mL, 0,15M NaCl, 0,05% NaN₃)

Coomassie Blau – Lösung: Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad # 600-0005

Geräte: Beckman DU-800, Wellenlängeneinstellung: 595 nm, Hintergrund: 320 und 400 nm

Durchführung:

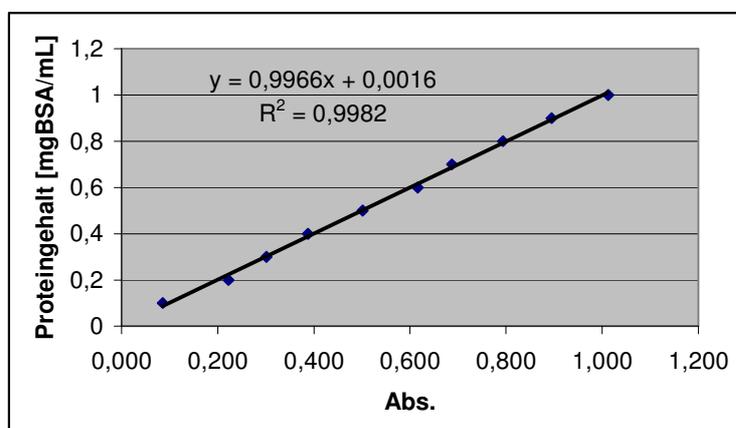
Herstellung der Bradford-Gebrauchslösung (V_{Bradford}): ¼ Verdünnung des Bio-Rad 600-0005

Herstellung der Standards: Verdünnungsreihe des Rinder-Serum-Albumin-Standards Sigma P-0914 laut Tab. 25 direkt in 1 cm Einwegküvetten pipettieren. Doppelbestimmungen. Messung nach 15 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur (Abb. 75).

Proben: 20 µL Probe + 1.000 µL Bradford-Gebrauchslösung direkt in 1 cm Einwegküvette, gegebenenfalls Verdünnung der Probe. Doppelbestimmungen. Messung nach 15 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur.

Tab. 25: Kalibrierstandards der Gesamtproteinbestimmung

BSA-Std	1,0 mg/L	0,9 mg/L	0,8 mg/L	0,7 mg/L	0,6 mg/L	0,5 mg/L	0,4 mg/L	0,3 mg/L	0,2 mg/L	0,1 mg/L
$V_{\text{BSA, Sigma}}$ [µL]	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2
V_{Wasser} [µL]	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
V_{Bradford} [µL]	1.000									
V_{Σ} [µL]	1.020									



Conc BSA [mg/mL]	Abs 1	Abs 2	Durchschnitt Abs
0,1	0,0888	0,0823	0,086
0,2	0,2184	0,2268	0,223
0,3	0,3037	0,2989	0,301
0,4	0,3974	0,3779	0,388
0,5	0,5018	0,5010	0,501
0,6	0,6059	0,6262	0,616
0,7	0,6936	0,6811	0,687
0,8	0,7616	0,8255	0,794
0,9	0,8558	0,9339	0,895
1,0	1,0900	0,9357	1,013

Abb. 75: Kalibriergerade Gesamtproteinbestimmung ($\lambda = 595$ nm, Raumtemperatur)

4.2 Versuchsaufbau und Durchführung

4.2.1 Verfahrenstechnisches Konzept zur präparativen Isolierung

Das aufgestellte Konzept der präparativen Isolierung ist in Abb. 76 verdeutlicht. Dabei ist der Rohstoff zunächst zu zerkleinern, gegebenenfalls enzymatisch aufzuschließen und mit einem Wasser/Ethanol-Gemisch zu extrahieren. Die Feststoffe werden anschließend mittels Pressen oder Dekanter abgetrennt (gegebenenfalls kann das Extrakt über selbstentleerende Tellerseparatoren mit großer äquivalenter Klärfläche oder über eine Mikrofiltration feinstgeklärt („poliert“) werden). Weiter kann das Raffinat zur Verbesserung der Ausbeute erneut extrahiert oder direkt als Byproduct in der Landwirtschaft oder Biogasherstellung verwertet werden. Aus dem abgetrennten Extrakt sollen anschließend mittels Ultra- und Nanofiltration mit „Cut-Offs“ von 200 bis 15.000 Da die zu isolierenden Pflanzenphenole (Phenolcarbonsäuren, Stilbene und Flavonoide) als Zwischengrößenfraktionen gewonnen und aufkonzentriert werden und stellen damit bereits Produktfraktionen dar. Teile der vorgereinigten und aufkonzentrierten Zwischenfraktionen (z. B. OPC und Monoflavonoide) können mittels präparativer Chromatographie in ihre reinen Einzelsubstanzen bzw. nach ihrer Polarität in Fraktionsgruppen aufgetrennt werden. Als letzter Schritt ist eine Trocknung z. B. mittels Spüh- oder Walzentrockner denkbar, wobei eine hohe Membranrückhaltung der Zucker ein Trägermittel wie Maltodextrin erfordert, um ein Verklumpen des Trockenpulvers zu vermeiden.

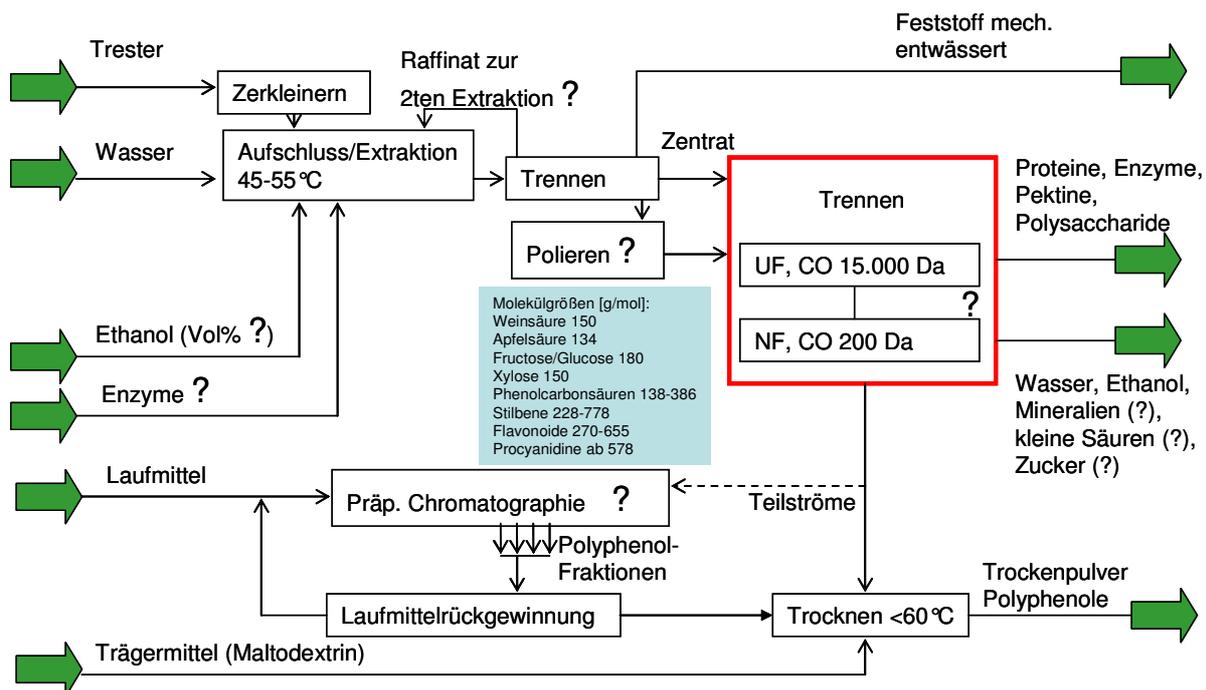


Abb. 76: Verfahrensfliessbild zur Gewinnung von sekundären Pflanzenstoffen aus Trester

Somit ergeben sich einige wesentliche Fragen zur Gesamttechnologie, die es zu klären galt:

1. Welche Extraktionsmittelzusammensetzung und welches organische Extraktionsmittel eignen sich zur Gewinnung von Polyphenolen aus Treestern?
2. Welche Menge an Extraktionsmittel in Bezug auf die Rohstoffmenge ist einzusetzen?
3. Ist ein enzymatischer Aufschluss sinnvoll?
4. Wie effektiv ist die erste Extraktion und sind weitere Extraktionen der Raffinate sinnvoll?

5. Welche Trester oder Byproducts sind besonders reich an Polyphenolen und somit interessant für die präparative Isolierung?
6. Wie ist eine Zentrifugale Raffinatabtrennung und gegebenenfalls „Polierung“ auszulegen?
7. Die Kernfrage: Wie selektiv bezüglich der zu gewinnenden Polyphenole und der weiteren abzutrennenden Inhaltsstoffe (organische Säuren, Zucker, Salze (Ionen) Proteine, gelöste Pektinstoffe) sind die am Markt verfügbaren organischen und anorganischen Membranen mit „Cut-Offs“ von 200 bis 15.000 Da?
8. Wie wäre eine präparative chromatographische Isolierung denkbar?
9. Welchen Einfluss haben teilgereinigte Präparate im Vergleich zu Rohextrakten auf die präparative Chromatographie?

4.2.2 Enzymierung und Extraktion

Als großtechnische Extraktionsmittel sind Ethanol, Methanol, Aceton und Wasser denkbar. Weiter ist gegebenenfalls ein enzymatischer Aufschluss, wie in der Rotwein- und Apfelsaftherstellung gängig, durchzuführen, so dass sich die in Tab. 26 und 28 dargestellten Versuchsmatrizes ergeben. Weitere auf die Extraktion einflussnehmende Parameter, wie Enzymmenge, Enzymierungszeit und -temperatur, Extraktionstemperatur, -zeit, Zerkleinerungsgrad und weitere Extraktionsmittel, sind hier nicht berücksichtigt, da auf Angaben vom Enzymhersteller und auf Ergebnisse aus der Literatur zurückgegriffen wurde.

Labormaßstab: Die unterschiedlichen, gefrorenen Trester wurden mit einer Labormühle (Braun MR 6500 BC) mit Messereinsatz zerkleinert und je Extraktion 15 g des reinen Tresters oder Mischtresters (3 Rot- und 3 Weißweintrester zu gleichen Teilen bzw. 2 Apfeltrester) in die Enzymierungs- und Extraktionsapparatur (Abb. 77) eingewogen.

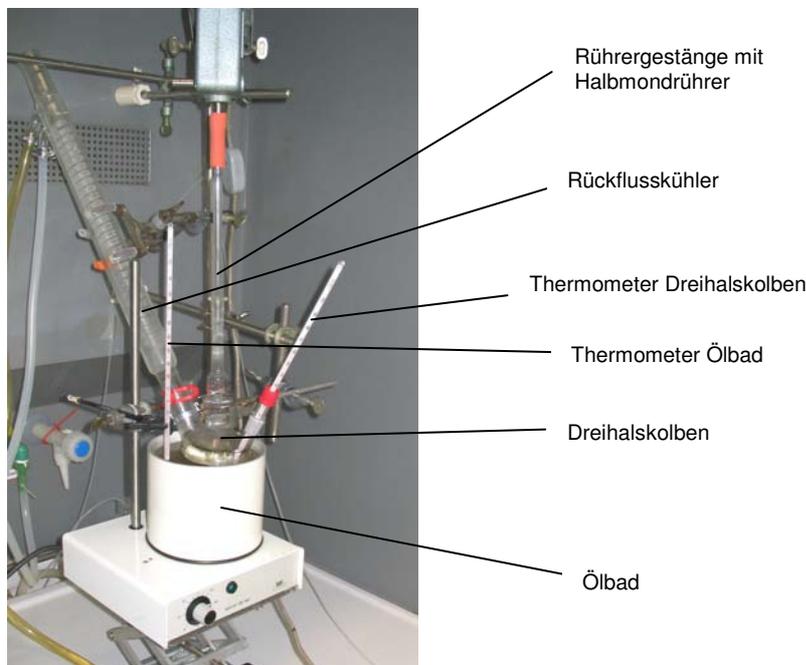


Abb. 77: Extraktionsapparatur mit 250 mL Dreihalskolben, Halbmondrührer, Rückflusskühler, Thermometer und Ölbad

Wenn eine Enzymierung vorgesehen war, wurden 50 mL Wasser in den Dreihalskolben auf die Extraktionsprobe eingefüllt und mit 50 µL Enzympräparat versetzt (Enzyme laut Tab. 26 Teil C und Tab. 27).

Tab. 26: Versuchsmatrix zum enzymatischen Aufschluss und Extraktion von Polyphenolen aus Weintrestern

Extrakt Nr.	Wasser [mL]	Enzymierung	Methanol [mL]	Ethanol [mL]	Aceton [mL]	Bemerkung
Teil A: Untersuchungen mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln an Mischrestern						
1	0	nein	150	0	0	Mischweintrester
2	50	nein	100	0	0	Mischweintrester
3	100	nein	50	0	0	Mischweintrester
4	125	nein	25	0	0	Mischweintrester
5	0	nein	0	150	0	Mischweintrester
6	50	nein	0	100	0	Mischweintrester
7	100	nein	0	50	0	Mischweintrester
8	125	nein	0	25	0	Mischweintrester
9	0	nein	0	0	150*	Mischweintrester
10	50	nein	0	0	100	Mischweintrester
11	100	nein	0	0	50	Mischweintrester
12	125	nein	0	0	25	Mischweintrester
13	150	nein	0	0	0	Mischweintrester
Teil B: Untersuchungen zu unterschiedlichen Mengen an Extraktionsmittel						
14	40	nein	0	80	0	Mischweintrester
15	30	nein	0	60	0	Mischweintrester
16	20	nein	0	40	0	Mischweintrester
17	10	nein	0	20	0	Mischweintrester
Teil C: Untersuchungen zur Enzymierung** von Mischrestern aus der Weinherstellung						
18	50	3XL	0	100	0	Mischweintrester
19	50	Ultra SP-L	0	100	0	Mischweintrester
20	50	Superpress	0	100	0	Mischweintrester
21	50	nein	0	100	0	Mischweintrester
Teil D: Untersuchungen zu mehrfachen Extraktionszyklen						
22	50	nein	0	100	0	Raffinat aus Extraktion 21
23	50	nein	0	100	0	Raffinat aus Extraktion 22
Teil E: Untersuchung verschiedener Tresterproben von 3 Rot-, 3 Weißweinen						
24	50	nein	0	100	0	Trester von Zweigelt
25	50	nein	0	100	0	Trester von Blaufränkisch
26	50	nein	0	100	0	Trester von Blauburgunder
27	50	nein	0	100	0	Trester von Grüner Veltliner
28	50	nein	0	100	0	Trester von Weißburgunder
29	50	nein	0	100	0	Trester von Riesling

* hier bei Siedetemp. Aceton 56°C extrahieren, **Details zu den Enzymen in Tab. 27

Tab. 27: Herstellerangaben zu den eingesetzten Pektinasen zum biotechnologischen Aufschluss der Tresterzellwände

Enzym	Hersteller	empf. Temp.	optimaler pH	empf. Menge	empf. Zeit	Zugabe im Versuch	Bemerkungen
Pectinex 3X L	Novo Nordisk (Novozyme)	45 °C	4,7	5 - 10 mL/hL	2 h	50 µL	Saft- und Weinherstellung
Pectinex Ultra SP-L	Novo Nordisk (Novozyme)	65 °C	5,5 - 6,5	3 - 8 mL/hL	2h	50 µL	Apfel- und Birnenverflüssigung
Pectinol flüssig, extra konz.	Röhm & Haas (AB Enzymes)	55 °C	keine Angaben	15 - 75 mL/hL	1 - 3 h	50 µL	Obstsaft- und Obstmaischebehandlung

Tab. 28: Versuchsmatrix zum enzymatischen Aufschluss und Extraktion von Polyphenolen aus Apfeltrestern

Extrakt Nr.	Wasser [mL]	Enzymierung	Methanol [mL]	Ethanol [mL]	Aceton [mL]	Bemerkung
Teil A: Untersuchungen mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln an Mischrestern						
30	50	nein	100	0	0	Mischapfeltrester
31	0	nein	0	150	0	Mischapfeltrester
32	50	nein	0	100	0	Mischapfeltrester
33	100	nein	0	50	0	Mischapfeltrester
34	125	nein	0	25	0	Mischapfeltrester
35	50	nein	0	0	100	Mischapfeltrester
Teil B: Untersuchungen zu unterschiedlichen Mengen an Extraktionsmittel						
36	40	nein	0	80	0	Mischapfeltrester
37	30	nein	0	60	0	Mischapfeltrester
38	20	nein	0	40	0	Mischapfeltrester
Teil C: Untersuchungen zur Enzymierung von Mischrestern aus der Apfelsaftherstellung						
39	50	3XL	0	100	0	Mischapfeltrester
40	50	Ultra SP-L	0	100	0	Mischapfeltrester
41	50	Superpress	0	100	0	Mischapfeltrester
42	50	nein	0	100	0	Mischapfeltrester
Teil D: Untersuchungen zur mehrfachen Extraktionszyklen						
43	50	nein	0	100	0	Raffinat aus Extraktion 43
44	50	nein	0	100	0	Raffinat aus Extraktion 44
Teil E: Untersuchung verschiedener Tresterproben von 2 Apfelsäften						
45	50	nein	0	100	0	Trester von Tafeläpfeln
46	50	nein	0	100	0	Trester von Boskopäpfeln

Das Ölbad wurde auf 45 °C vorgeheizt, so dass anschließend die Enzymierung 2 h unter Rühren und Rückfluss durchgeführt werden konnte. Anschließend wurden 100 mL Extraktionsmittel (Ethanol absolut, Riedel-de Haen, # 32221) zugegeben, das Ölbad auf die Extraktionstemperatur von 60 °C aufgeheizt und ebenfalls 2 h unter Rühren und Rückfluss extrahiert. Das Ölbad wurde zum Abkühlen des Extraktes entfernt. Nach Abkühlung wurde das Extrakt über einen Membranfilter (GE Water & Process Technologies, Nylon 0,45 µm, Durchmesser 47 mm) genutscht und bei -30 °C eingefroren. Bei Extraktionen ohne Enzymierung entfiel der Enzymierungsteil, so dass nach der Einwaage von jeweils 15 g Trester die gesamte Menge Extraktionsmittel laut Tab. 26 und 28 zugegeben und 2 h unter Rückfluss und Rühren extrahiert wurde (Methanol Rotisol[®], Roth, #7342.1; Aceton purum, Fluka, # 00585). Bemerkung: Nach Auftauen der Extrakte, waren zumeist Ausfällungen von überwiegend Weinsäure- und Apfelsäuresalzen zu sehen, welche mittels Zentrifugation entfernt wurden, da diese bei den Analysen störend wirken (6.000*g, 10 min, Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R). Für größere Mengen, z. B. Vorversuche zu den Filtrationen der organischen Membranen, für die min. 1,2 L pro Lauf notwendig sind (bei VCF=4) stand eine vergleichbare Apparatur im 2 L – Maßstab zur Verfügung.

Technikumsmaßstab: Die zu untersuchenden anorganischen Membranen haben im vorliegenden Fall eine Filterfläche von 0,35 m²/Elemente, so dass die entsprechenden Technikumsanlagen große Kreislaufvolumina aufweisen und entsprechende Mengen Extrakt herzustellen waren (24 L pro Membranfiltrationslauf (bei VCF=4), in Summe >500 L, die in mehreren 160 L - Chargen „frisch“ vor den Filtrationsläufen hergestellt wurden). Der Ablauf ähnelt dem des Labormaßstabes. Der erste Schritt beinhaltete die Zerkleinerung der Trester mit einer Reibe (Alexanderwerk) mit 2 mm Lochweite (Austragsspaltweite = „scheinbarer Durchmesser“). Um Verblockungen im Dekanterzulauf der später folgenden Raffinatabtrennung zu vermeiden und um die Diffusionswege im Extraktionsgut weiter zu verkürzen, wurde eine zweite Nasszerkleinerung (Schneidmühle der Firma Stephan) mit einer Austragsspaltweite von 0,5 mm gewählt. Dazu wurde zuvor der Wasseranteil des Extraktionsmittels von 64 L in einem 200 L Doppelmantelrührbehälter zugegeben, durchmischt und mit einer Exzentrerschneckenpumpe über die Schneidmühle zerkleinert. Anschließend folgte die Zugabe des Ethanolanteils von 16 L, so dass ein 20 Vol%-iges Extraktionsmittel resultierte und damit der Flammpunkt des Ethanol/Wasser-Extraktionsmittels auf 60 °C abgelöscht werden konnte. So war eine Extraktion bei maximal 50 °C mit einer Sicherheit von 10 K ohne weitere Explosionsschutzmaßnahmen durchzuführen. Nach einer zweistündigen Extraktion im dampfbeheizten 200 L Doppelmantelrührbehälter bei 45 bis 50 °C folgte die Abtrennung des Raffinats vom Extrakt mittels Vollmantelschnecken zentrifuge (Dekanter der Firma Sharples P600, $\Sigma \approx 500 \text{ m}^2$, $n=6.000 \text{ U/min}$, $n_{\text{Diff}}=4 \text{ U/min}$, Zulauf=80-100 L/h). Das Raffinat wurde zur Ausbeuteerhöhung erneut mit gleichen Extraktionsmittelvolumina und gleichen Extraktionsbedingungen extrahiert und dekantiert. Das Extrakt beider Läufe wurde vereinigt, gegebenenfalls zur Feinstklärung (Polierung) über einen selbstentleerenden Tellerseparator (Westfalia Separator SA1, $\Sigma \approx 1.400 \text{ m}^2$) gepumpt und anschließend bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

Das Probenmaterial bestand aus drei Rotwein- und drei Weißweintrestern sowie zwei Apfeltrestern, die aus der Ernte 2006 stammten. Der Trester wurde direkt nach der Pressung entnommen und bei -30 °C tiefgefroren.

Weintrester:

Zweigelt, Weingut der Stadt Wien Cobenzel, pneumatische Tankpresse, 20 kg
Blafränkisch, Weingut Remushof Jagschitz, pneumatische Kolbenpresse, 100 kg
Blauburgunder, Weingut der Stadt Wien Cobenzel, pneumatische Tankpresse, 20 kg
Grüner Veltliner, Weingut der Stadt Wien Cobenzel, pneumatische Tankpresse, 20 kg
Weißburgunder, Weingut der Stadt Wien Cobenzel, pneumatische Tankpresse, 20 kg
Riesling, Weingut der Stadt Wien Cobenzel, pneumatische Tankpresse, 20 kg

Apfeltrester, je 20 kg:

Tafeläpfel (Verschiedene Sorten), HBLA Klosterneuburg, Bandpresse, trüber Direktapfelsaft
Boskop (saurer Mostapfel) , HBLA Klosterneuburg, Bandpresse, trüber Direktapfelsaft

4.2.3 Membranfiltration

Für Untersuchungen der Membranen standen zwei Rührzellen (Labormaßstab mit Füllvolumina 1.600 und 32 mL) und zwei Test-Membrananlagen (Technikumsmaßstab mit Füllvolumina 50 und 10 L) zur Verfügung. Die organischen Flachmembranen wurden dabei in den Rührzellen untersucht (Abb. 78), in denen Strömungsverhältnisse entsprechend eines Cross-Flow-Betriebes simulieren werden können. Die Parameter Temperatur, Druck, Strömungsgeschwindigkeit lassen sich mit Kühl- bzw. Heizschlangen, retentatseitiger Stickstoffüberlagerung (treibende Kraft der Filtration) und die Rührerdrehzahl einstellen. Die anorganischen Membranen wurden in den zwei Test-Membrananlagen untersucht (Abb. 79). Die ausgewählten organischen Flachmembranen sind in Tab. 29 und die keramischen Membranelemente in Tab. 30 angeführt und spezifiziert.

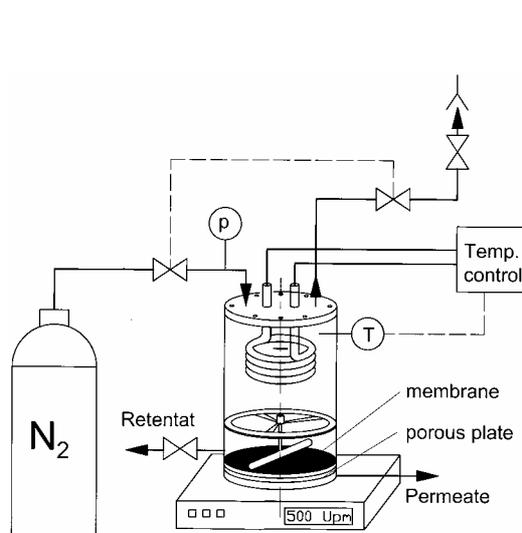


Abb. 78: Rührzelle (1.600 mL) mit KIKA®-Magnetrührer ($d_{\text{Filter}}=15 \text{ cm}$)

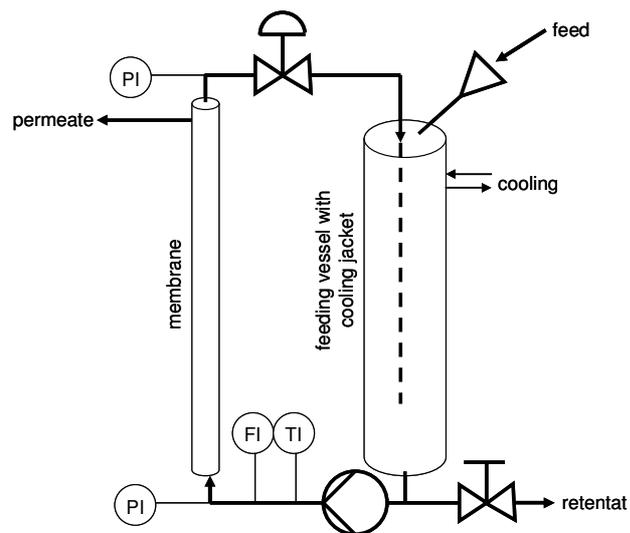


Abb. 79: Test-Membrananlage der Firma New Technology Anlagenbau GmbH

Durchführung der Versuche mit organischen Membranen:

Das Minimalvolumen des Retentats liegt in der 1.600 mL Rührzelle bei 300 mL (Rührer zur Erzeugung der Querströmung taucht gerade noch in das Retentat ein), so dass für Versuche ein Feed-Volumen von 1.200 mL bei einer Aufkonzentrierung von $VCF=4$ festgelegt wurde. Die transmembranen Drücke wurden nach Literatur- und Erfahrungswerten mit 5, 7 bzw. 30 bar festgelegt. Die Rührerdrehzahl wurde auf 500 U/min eingestellt, was einer Reynolds-Zahl von $Re=17.708$ entspricht. Zusätzlich wurde mit einer 32 mL Rührzelle ($d_{\text{Filter}}=25 \text{ mm}$, $n_{\text{Rührer}}=880 \text{ U/min}$) der Firma Membrane Products Kiryat Weizmann Ltd. gearbeitet (Anhang VII), die ein Minimalvolumen des Retentats von 8 mL aufweist. Bei diesem Versuchsaufbau, wurden zum Tresterextrakt 28 Polyphenol-Standards mit je 30 mg/L hinzugegeben. Die Versuchsabläufe (Kaskadenschaltungen) sind mit den Angaben der eingesetzten Membranen, der verwendeten transmembranen Drücke, Feed-Volumina und Aufkonzentrierungsfaktoren in Abb. 80 dargestellt.

Durchführung der Versuche mit anorganischen Membranen:

Test-Membrananlage 1: Die Test-Membrananlage 1 weist ein Minimalvolumen des Retentats von 6 L auf (Pumpe saugt keine Luft an), so dass bei einem Aufkonzentrierungsfaktor von $VCF=4$ ein Feed-Volumen von 24 L pro Lauf erforderlich war. Die Anlage selbst hat eine Volumenkapazität von 10 L. Die verbleibenden 14 L wurden semikontinuierlich in 500 mL Schritten nach Abnahme von 500 mL Permeat in den Vorlagebehälter (feeding vessel) nachgegeben. Die Kühlung des Vorlagebehälters wurde so eingestellt, dass die Temperatur des umlaufenden Retentats konstant bei etwa 30 °C gehalten wurde. Der mittlere transmembrane Druck wurde anhand der Leistungsfähigkeit der Umlaufpumpe bei 3,25 bar

festgelegt. Der Einfluss von drei Überströmgeschwindigkeiten wurde an Rohextrakten und polierten Extrakten untersucht ($3 \text{ m/s} \pm 2,58 \text{ m}^3/\text{h}$, $4,5 \text{ m/s} \pm 3,87 \text{ m}^3/\text{h}$ und $6 \text{ m/s} \pm 5,16 \text{ m}^3/\text{h}$).

Test-Membrananlage 2: Die Test-Membrananlage 2 weist ein Minimalvolumen des Retentats von 12 L auf, so dass bei einem Aufkonzentrierungsfaktor von $VCF=4$ ein Feed-Volumen von 48 L pro Lauf erforderlich war. Die Anlage selbst hat eine Volumenkapazität von 50 L, so dass die gesamte Feed-Menge in die Anlage gegeben werden konnte. Auch hier wurde die Kühlung des Vorlagebehälters so eingestellt, dass die Temperatur des umlaufenden Retentats konstant bei etwa $30 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten wurde. Der mittlere transmembrane Druck wurde anhand der leistungsfähigeren Umlaufpumpe bei 3,25 bar und 4,4 bar festgelegt, um auch den Einfluss höherer transmembraner Drücke bei der Filtration von Rohextrakten untersuchen zu können. Die Überströmgeschwindigkeit wurde mit 6 m/s ($\pm 5,16 \text{ m}^3/\text{h}$ Umlaufvolumenstrom) festgelegt.

Tab. 29: Kommerzielle organische Membranen

Hersteller	Membran	Material aktive Schicht	pH	p_{max} [bar]	T_{max} [$^\circ\text{C}$]	MWCO	Bauart
Microdyn Nadir	MD020C P2N	PP	2-11	5	50	0,2 μm	Hohlfaser
Microdyn Nadir	P010F	PES	1-14	ca. 10	90	10.000 Da	Flachmembran
Microdyn Nadir	UF-PES-004H	PES	0-14	ca. 10	95	4.000 Da	Flachmembran
Microdyn Nadir	NF-PES10	PES	0-14	40	95	1.000 Da	Flachmembran
Microdyn Nadir	N30F	PES	0-14	40	95	300 Da	Flachmembran
Koch Memb. Sys.	MPF-34	unbekannt	0-14	35	70	200 Da	Flachmembran

Tab. 30: Kommerzielle NF/UF-Membranen aus keramischen Materialien

Hersteller	NMWC [kDa]	Material und Aufbau	pH-Stabilität	Querschnitt	Filterfläche [m ²]	Länge [m]	Channel-Durchmesser [mm]	Anzahl Channel
Tami Industries	1	Titanoxid asym.	0-14		0,35	1,2	3,6	23
Tami Industries	3	Titanoxid asym.	0-14		0,35	1,2	3,6	23
Tami Industries	5	Titanoxid asym.	0-14		0,35	1,2	3,6	23
Tami Industries	8	Titanoxid asym.	0-14		0,35	1,2	3,6	23
Tami Industries	15	Titanoxid asym.	0-14		0,35	1,2	3,6	23

1
3
5
8
15 [kDa]

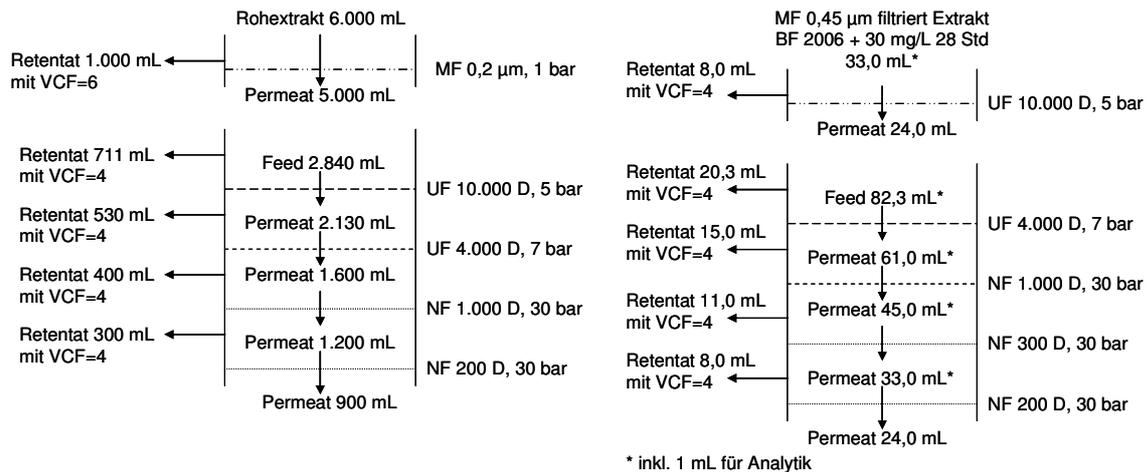


Abb. 80: Versuchsabläufe der Untersuchung zur Rückhaltung organischer Flachmembranen

Um die Membranen möglichst lange betreiben zu können (Fouling), ist eine zumeist chemische Reinigung erforderlich, so dass bei der Auswahl der Membranmaterialien (PES und Keramik) auf deren Beständigkeit gegenüber Natronlauge/Kalilauge und Salpetersäure/Schwefelsäure zu achten war. Gute Reinigungserfolge bei den keramischen Modulen, als auch der organischen Flachmembranen, ließen sich mit 10 %iger technischer KOH und NaOH bei 50 °C und 2-3 stündiger Reinigung mit hohen Überströmgeschwindigkeiten und offenem Gegendruckventil erzielen.

4.2.4 Isolierung mittels präparativer Chromatographie

Wie erwähnt, werden zur Trennung polarer Polyphenole im semi-präparativen Maßstab Reversed Phase C8- und C18-Materialien eingesetzt, die mit Acetonitril-, Ethanol- oder Methanol-Wasser-Eluenten betrieben werden. Eine Normalphasen-Chromatographie ist dadurch gekennzeichnet, dass die stationäre Phase polarer ist, als die mobile Phase, umgekehrt bei Reversed Phase-Anwendungen, bei denen die stationäre Phase unpolar gestaltet und das Laufmittel polar gehalten wird. Dabei besteht die stationäre Phase häufig aus Silicagel (Kieselgel), welches an der Oberfläche langkettige n-Alkane (z. B. C₈ oder C₁₈) gebunden hat (Abb. 81). Andere unpolare stationäre Phasen wären hydrophobe organische Polymere oder poröse Kohlenstoffe.

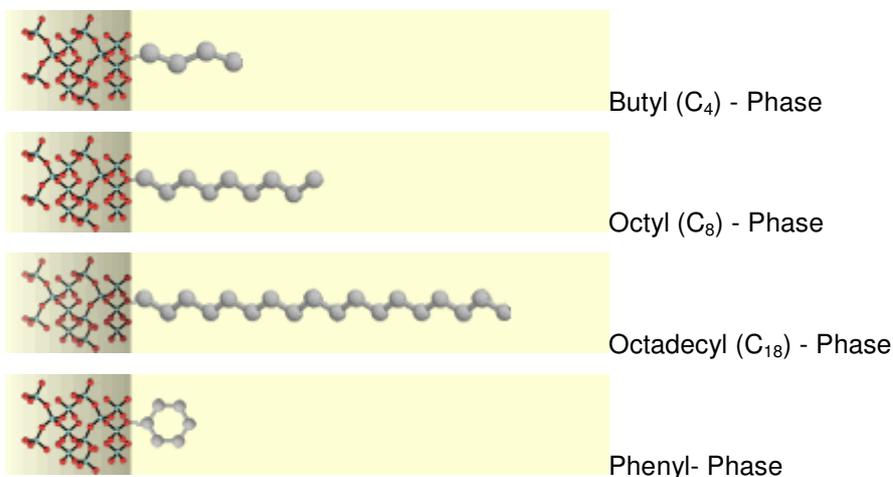
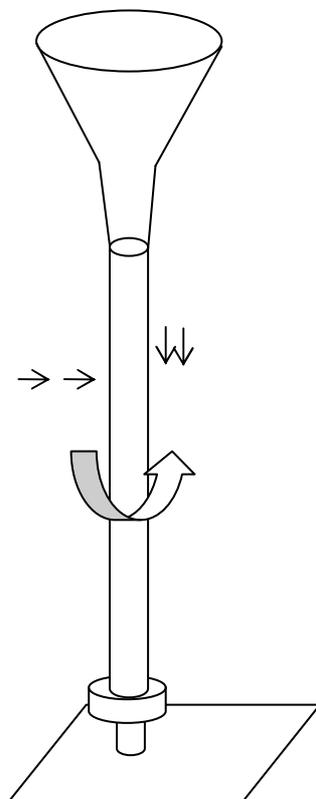


Abb. 81: Beispiele für Reversed-Phase-Chromatographie Kieselgele

Der Prozess zur Aufbringung der n-Alkane wird als Silanisation bezeichnet. Da jedoch bei weitem nicht alle Silanolgruppen mit n-Alkanen reagieren, kann ein weiterer Prozess

durchgeführt werden, bei dem die verbliebenen Silanolgruppen mit kleineren Molekülen, wie z. B. Trimethylchlorosilan oder Hexamethyldisilazan, umgesetzt werden („endcapping“). Das resultierende Harz weist dann eine geringere Silanol-Aktivität aus, was sich auf die Hydrophobizität auswirkt. Das Gel besitzt somit eine geringere Polarität, was zu einer Verschlechterung der Selektivität führt. Um die fehlende Selektivität auszugleichen, kommen neue Möglichkeiten des endcappings zum Einsatz, wie z. B. Amide oder Carbamate. Ein hydrophiles endcapping (mit polaren Gruppen) kommt dort zum Einsatz, wo polare Analyte reproduzierbar unter wässrigen Bedingungen zurückgehalten werden sollen. Bei dieser chromatographischen Trennung kann somit auch 100 % Wasser als Laufmittel zum Einsatz kommen (SCHMIDT-TRAUB 2005, MEYER 2004).

Die Entwicklung der präparativen Chromatographie erfolgte mit Hilfe einer Scout – Säule (300*6,5 mm), die mit in Frage kommenden Bulk-Säulenmaterialien im Trockenverfahren (Abb. 82) gepackt wurde. Prinzipiell ist zu entscheiden, ob ein säulenchromatographisches Verfahren als präparative LC oder präparative HPLC angedacht ist. Die präparative LC arbeitet mit niedrigen Drücken von wenigen bar (1-10 bar), so dass die Säule inkl. Füllmaterial sowie die Peripherie lediglich für den Niederdruckbereich ausgelegt werden müssen. Präparative HPLC – Anlagen hingegen, werden mit bis zu 100 bar betrieben, was einen erheblichen Aufwand im Umfeld bedeutet, jedoch wegen der kleineren Füllmaterialien bessere Trennergebnisse liefert (hohe Trennstufenzahlen, hohe Durchsätze und Beladung, schärfere Peaks). Die Vor- und Nachteile der LC und HPLC sind nach der technischen Entwicklung in einer Cost – Benefit – Analyse abzuwägen. Die zu testenden Bulk-Materialien orientieren sich überwiegend an der entwickelten Analytik, bei der mit unpolarem C18 – Material gearbeitet wird. Nachfolgend sind die Materialien mit Detailinformationen aufgeführt. Die wesentlichen Unterschiede der Materialien: mittlerer Partikeldurchmesser, gebrochenes oder sphärisches Material (Abb. 83), endcapped und nicht endcapped sowie Porendurchmesser von 60 und 120 Å.



1. Die Scout-Säule (300 * 6,5) mm ist zulaufseitig zu öffnen und mit einer HPLC-Pumpe unter Druck mit 1,5 – 2,5 mL/min und Methanol als Laufmittel zu entpacken und zu spülen.
2. Die Säule wird anschließend im Trockenschrank (50-90 °C) getrocknet und die zulaufseitige Säulenschraubung mit Fritte im Ultraschallbad in Methanol 15 min gereinigt und ebenfalls im Trockenschrank getrocknen.
3. Auf die Säule wird zulaufseitig ein Trichter gesetzt, dessen Stutzen mit der Säule plan abschließt und den gleichen Innendurchmesser besitzt.
4. In die aufrecht gestellte Säule wird über den Trichter wenig Packmaterial eingefüllt und durch senkrecht Klopfen (↓↓) der Säule auf ein Unterlegholz in der Säule verdichtet. Um eine plane Oberfläche des Materials zu erhalten, wird seitlich mit einem Holz gegen die Säule geschlagen (→→). Die Säule wird etwa 60° um ihre eigene Achse gedreht (↻) und erneut senkrecht geklopft und seitlich geschlagen. Dieser Vorgang wird bei 120° wiederholt. Jetzt kann weiteres Packmaterial in die Säule gefüllt werden und der Vorgang wiederholt werden, bis die Säule wenig überfüllt ist. Vorsicht: Bei kleinem Füllmaterial (15-25 µm) unter dem Abzug arbeiten!
5. Trichter vorsichtig abnehmen, mit Spatel Überstand abstreifen und leichten konkaven Überstand belassen. Fritte aufsetzen und Säule mit Verschraubung dicht verschleifen.
6. Säule 1,5-2,5 mL/min Methanol blasenfrei konditionieren. Fertig.

Abb. 82: Trockenpackverfahren der Scout-Säule mit Bulk-Materialien (WAGNER-LÖFFLER 2006)

Folgende Bulkmaterialien wurden getestet:

Hersteller Macherey-Nagel, Düren (BRD):

Gebrochenes Kieselgel-C18, nicht endcapped

1. Kieselgel Polygosil[®] 60C18, 60 Å, 15-25 µm, 100 g, Best.Nr: 711031.100
2. Kieselgel Polygosil[®] 60C18, 60 Å, 40-63 µm, 100 g, Best.Nr: 711500.100
3. Kieselgel Polygosil[®] 60C18, 60 Å, 63-200 µm, 100 g, Best.Nr: 711590.100

YMC Europe, Dinslaken (BRD):

4. ODS-A, sphärisch, hydrophob endcapped, 120 Å, 50 µm, 250 g, Best.Nr: AA12S50
5. ODS-AQ, sphärisch, hydrophob endcapped, 120 Å, 50 µm, 250 g, Best.Nr: AQ12S50 (für sehr wässrige Eluenten)

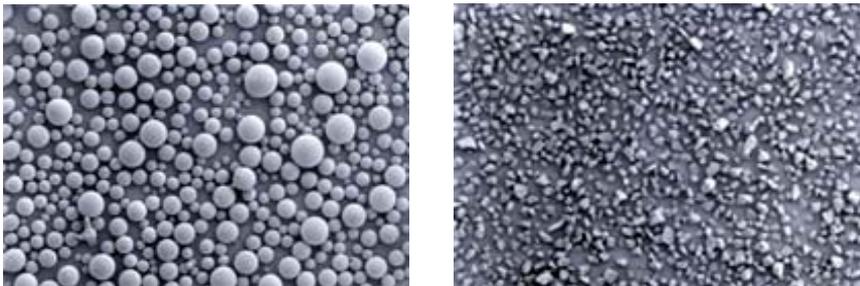


Abb. 83: Aufnahmen eines sphärischen und eines gebrochenen Harzes (MERCK 2007)

Säulen mit inhomogenen Festbetten weisen unsymmetrische Peaks und Verformungen auf (Abb. 84).

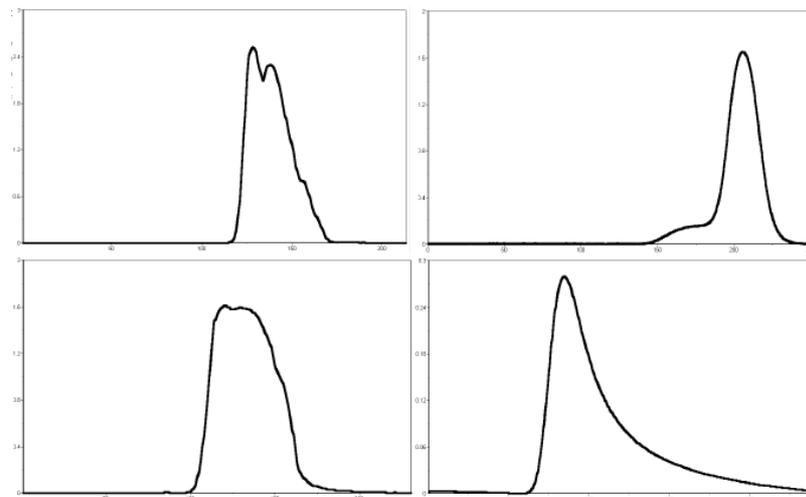


Abb. 84: Chromatogramme von Säulen mit inhomogenen Festbetten (LAIBLIN 2002)

Die Güte der Säulenpackungen und die Trenneffektivität wurden mit den Isoflavonen Formononetin und Biochanin A untersucht. Als Maß dienten die NTU bei einer Auflösung von $R \geq 1,5$. Auch wurde der Einfluss der Fließgeschwindigkeit untersucht. Je höher die Fließgeschwindigkeit ist, desto höher auch der resultierende Rückdruck der Säule, der in drei Druckbereiche mit kleiner 10 bar Niederdruck-, etwa 35 bar Mitteldruck- und max. 70 bar als Hochdruckbereich festgelegt wurden. Die beiden Isoflavone stellen mit mehr als 96 % den überaus dominierenden Anteil der Polyphenol aus Rotkleeextrakten dar (15 g „Gumpensteiner“ Rotklee in 150 mL Ethanol, 2 h, 50 - 60 °C unter Rühren und Rückfluss extrahiert und 0,45 µm membranfiltriert) und eignen sich somit als günstige Rohstoffquelle zur Beurteilung von stationären Phasen zur präparativen Isolierung von Polyphenolen aus Pflanzen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Traubentrester

5.1.1 Extraktions- und Enzymierungsversuche

Die Ergebnisse der Extraktionen der Weintrester sind mittels antioxidativer Kapazität (TEAC-Methode) und Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) ausgewertet und dargestellt. In den Abb. 85 und 86 ist ersichtlich, dass in beiden Auswertungen mit einer 66 Vol%-igen Aceton-Extraktion mit 71 gGAE/kgTM und 688 mmolTrolox/kgTM nach der ersten Extraktion ohne Enzymierungsschritt die höchsten Extraktionserfolge erzielt wurden. Für den Einsatz im Lebensmittelbereich eignet sich Ethanol, so dass auch hier die 66 Vol%ige Extraktion mit 39 gGAE/kgTM und 344 mmolTrolox/kgTM zwar deutlich niedriger als beim Aceton, jedoch die ausbeutereichste ethanolsche Extraktion darstellt. In einem großtechnischen Prozess sind die Kosten für den Explosionsschutz zu berücksichtigen und gegebenenfalls der Ethanolanteil auf 20 Vol% zu reduzieren, so dass die Extraktion bei 50 °C 10 K unterhalb des Flammpunktes (60 °C) durchgeführt werden kann, auch wenn dabei eine geringere Ausbeute in Kauf genommen werden muss.

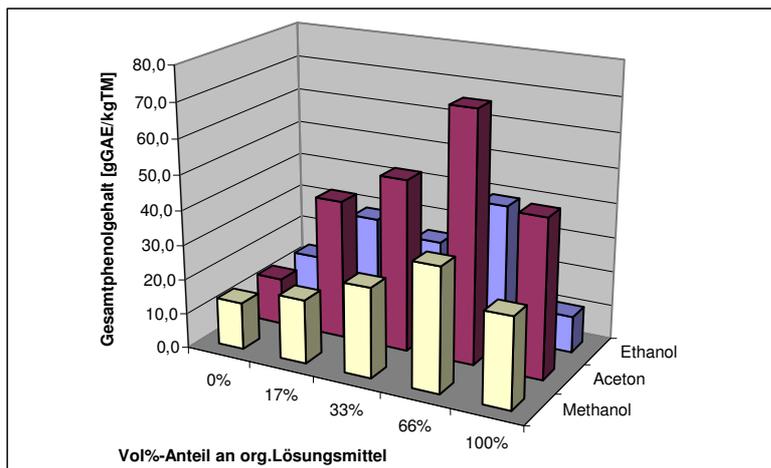


Abb. 85: Gesamtphenolgehalt von Weintresterextrakten mit verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Anteilen der organischen Lösungsmittel

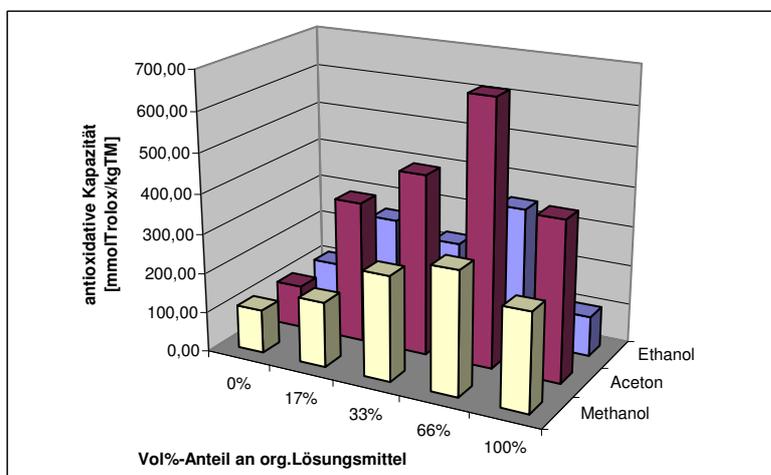


Abb. 86: Antioxidative Kapazität von Weintresterextrakten mit verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Anteilen der organischen Lösungsmittel

In Abb. 87 ist der Extraktionserfolg bei einer zweiten und dritten Extraktion des Raffinats aus der ersten Extraktion mit 66 Vol% ethanolischen Extrakten gezeigt. Die Ausbeute bezogen auf die Trockenmasse des eingesetzten Mischweintresters lässt sich deutlich steigern. So addieren sich die Ausbeuten (hier angegeben in gGAE/kgTM bzw. mmolTrolox/kgTM) der einzelnen Extraktionen. Um möglichst hohe Ausbeuten im Technikums-Maßstab zur Extraktgewinnung zu erzielen, wurde daher eine zweistufige Extraktion festgelegt.

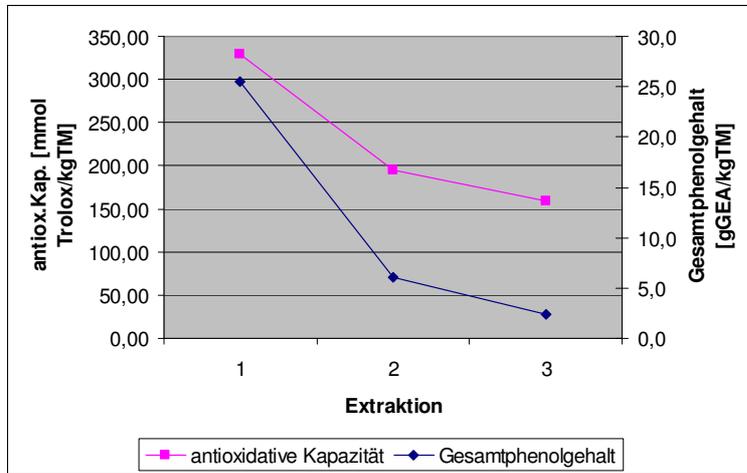


Abb. 87: Ausbeuteerhöhung durch zweite und dritte Extraktion des Weintrester-Raffinats der ersten Extraktion

Die Frage, welche Menge an Extraktionsmittel einzusetzen ist, um möglichst konzentrierte Extrakte zu erreichen, jedoch zugleich eine möglichst hohe Ausbeute, wird in Abb. 88 beantwortet. Wie zu erwarten war, steigt die Konzentration an antioxidativ wirkenden Inhaltsstoffen und Polyphenolen mit Abnahme des Volumens. Weiter ist im zweiten Diagramm verdeutlicht, dass die Ausbeute bezogen auf die Trockenmasse an eingesetztem Trester mit Verringerung des eingesetzten Extraktionsmittelvolumens beträchtlich sinkt, da die treibende Kraft der Konzentrationsdifferenz bei höheren Konzentrationen abnimmt. Ein vertretbares Optimum ist etwa bei einem Verhältnis von 15 g Trester und 60 mL Extraktionsmittel zu finden, gerade dann, wenn eine zweite Extraktion des Raffinats der ersten Extraktion angedacht ist. So wurde das einzusetzende Extraktionsmittelvolumen des zu gewinnenden Extrakts im Technikums-Maßstab mit 20 kg Trester und 2*80 L 20 Vol% Ethanol festgelegt.

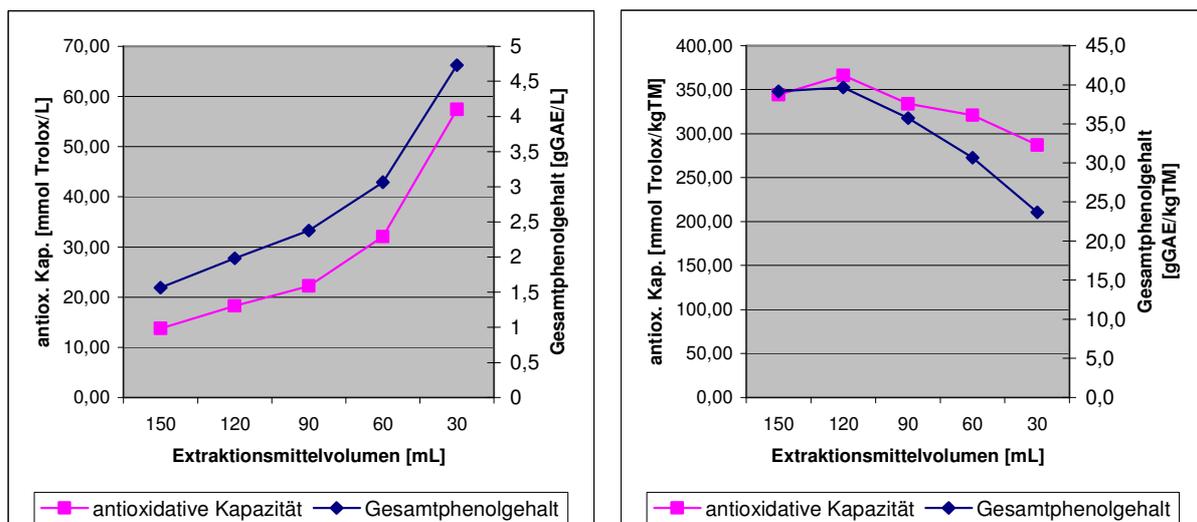


Abb. 88: Konzentrations- und Ausbeute-Diagramm bei Einsatz unterschiedlicher Extraktionsmittelvolumina und Weintrester als Rohstoff

Ein enzymatischer Aufschluss mittels pektolytischer Enzyme erzielte keine zusätzliche Ausbeute, - es sind keine Steigerungen der Ausbeuten, jedoch zumindest auch keine wesentlichen Reduktionen durch z. B. Polyphenoloxidasen erkennbar (Abb. 89).

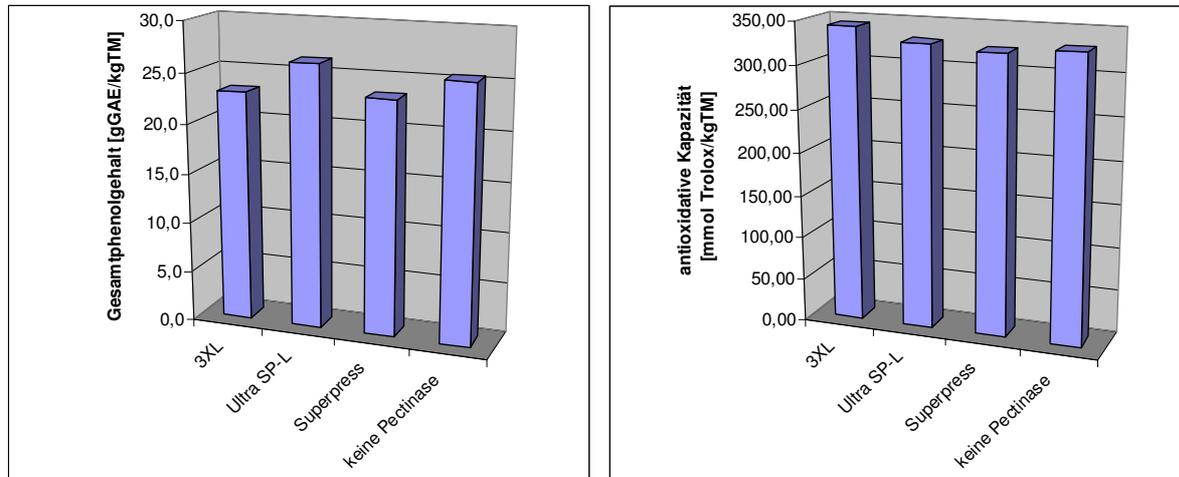


Abb. 89: Ergebnisse enzymatischer Aufschlüsse von Weintrester vor der Extraktion

Die Frage, welcher Rohstoff und insbesondere, ob Weißwein- oder Rotweintrester höhere Ausbeuten an Polyphenolen erzielt, konnte mit den Ergebnissen aus Abb. 90 geklärt werden. So zeigen die Ausbeuteergebnisse der sechs untersuchten Weintrester aus drei Sorten roten und drei Sorten weißen Trauben keine signifikanten Unterschiede. Damit wären alle untersuchten Weintrester als Rohstoff geeignet, vorausgesetzt, es sollen keine roten Anthocyane gewonnen werden, die lediglich in roten Trauben vorkommen.

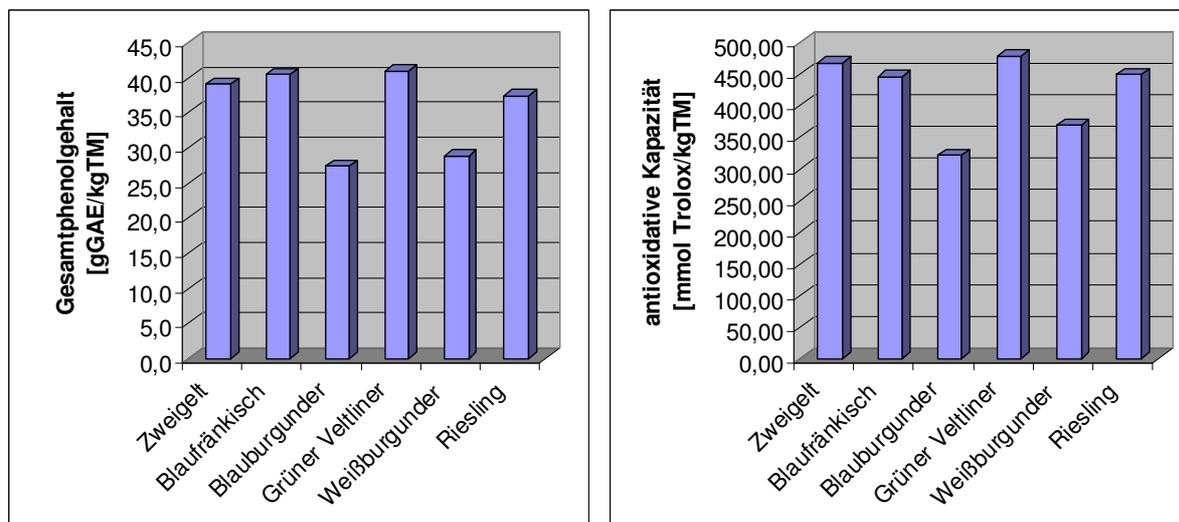


Abb. 90: Vergleich der Extraktionsausbeuten von drei Rot- und drei Weißweintrestern

Neben der Beurteilung der Weintrester anhand der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehalts, wurden die Einzelpolyphenole der Extrakte mittels RP-Chromatographie analytisch untersucht. Die Identifizierung der Einzelpolyphenole aus Tresterextrakten gestaltet sich dabei schwierig. Von besonderer Bedeutung war die Identifizierung über die einzelphenolcharakteristischen Spektren von 200 bis 550 nm und die Quantifizierung bei drei unterschiedlichen Wellenlängen von 280, 325 und 520 nm. Trotz guter Aufspaltung der Polyphenole und 29 Standardsubstanzen war lediglich eine begrenzte Anzahl an Polyphenolen qualitativ und quantitativ bestimmbar (Tab. 31). Deutlich hervorgehoben haben sich dabei die Flavan-3-ole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sowie bei den Rotweintrestern die Anthocyane Petunidin-3-O-Glucosid, Malvidin-3-O-Glucosid und ganz besonders das Anthocyanidin Malvidin im Zweigeltrester.

Tab. 31: Ergebnisse der Einzel-Polyphenolgehalte aus Weintrestern

	Polyphenolgehalte [mg/kgTM]									
	Gallussäure	(+)-Catechin	(-)-Epicatechin	Delphinidin-3-O-Glu	Petunidin-3-O-Glu	Malvidin -3-O-Glu	Quercetin-3-O-Glu	Kämpferol-3-O-Glu	Quercetin	Malvidin
Zweigelt	46	1396	457	521	2028	4956	-	-	660	21950
Blaufränkisch	66	5867	1569	764	7433	7323	-	-	424	5921
Blauburgunder	33	5856	1280	635	2360	1381	-	-	-	2396
GrünerVeltliner	34	10237	1482	-	-	-	955	759	-	-
Weißburgunder	7	11161	2650	-	-	-	593	605	-	-
Riesling	8	8853	1881	-	-	-	339	193	-	-

Die Trockenmassen, auf die die Ausbeuten bezogen wurden, sind in Tab. 32 aufgeführt. Zur weiteren Charakterisierung der Rohstoffe sind ebenfalls die Glührückstände angegeben.

Tab. 32: Trockenmassen und Glührückstände von Weintrestern

Byproduct	Trockenmasse [%TM]	Mittlerer Fehler des Mittelwerts [%TM]	Glührückstand [g/kg]
Weißburgunder	39,24	0,45	17,51
Riesling	34,99	0,90	20,35
Grüner Veltliner	34,30	1,46	16,50
Blauburgunder	49,26	0,28	30,43
Blaufränkisch	36,00	0,17	23,74
Zweigelt	33,46	0,75	27,53
Mischweintrester	38,82	1,19	22,68*

*rechnerisch

Ergebnisse der Extraktionen im Technikums-Maßstab:

Zwei Beispiele der Ergebnisse sollen die Ausbeuten der Technikums-Extraktionen des Rohstoffs Blaufränkisch-Trester verdeutlichen:

Extrakt 1 26.02.2007: (1.849 ± 37) mgGAE/L, (16,92 ± 0,10) mmolTrolox/L

Extrakt 2 26.02.2007: (707 ± 25) mgGAE/L, (7,84 ± 0,64) mmolTrolox/L

Extrakte 26.02.2007, gemittelt: (1.278 ± 45) mgGAE/L, (12,38 ± 0,65) mmolTrolox/L

△ (28,40 ± 1,00) gGAE/kgTM, (275 ± 14) mmolTrolox/kgTM

Mischextrakt 29.10.2007: (1.211 ± 17) mgGAE/L, (10,04 ± 0,09) mmolTrolox/L

△ (26,91 ± 0,38) gGAE/kgTM, (223 ± 2) mmolTrolox/kgTM

Wie zu erwarten war, ist die Konzentration an Antioxidantien und Phenolen im Extrakt 1 („frischer“ Trester als Edukt) höher, als im Extrakt 2 (Raffinat aus der ersten Extraktion als Edukt). Die Summe entspricht in etwa den Werten des Mischextrakts einer weiteren Charge, so dass die Reproduzierbarkeit der Extraktergebnisse gewährleistet war.

Mit einer Differenzdrehzahl von $\Delta n=4$ U/min (minimal einzustellende Δn) und einem Zulauf von 60, 80 und 100 L/h wurden die in Tab. 33 angeführten Trockenmassen und Klärgerade erreicht. Die Klärgerade wurden mit einer Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810R mit Ausschwingrotor, 10 mL Schleuderröhrchen, 4.000 U/min und 15 min Schleuderzeit bestimmt. Die Trockenmassen der abgetrennten Raffinate liegen etwas unterhalb der 36 %TM des eingesetzten Blaufränkisch-Tresters und steigen mit Zunahme des Zulaufs. Je höher der Zulauf, desto mehr Feststoff ist im Dekanter, so dass bei konstanter Differenzdrehzahl zwischen Schnecke und Trommel das resultierende Drehmoment des Pressvorgangs ansteigt und das Raffinat intensiver ausgepresst wird. Entgegengesetzt verhält sich der Klärgrad. Je höher der Zulauf ist, umso kürzer ist die mittlere Aufenthaltszeit eines abzutrennenden Partikels in der Maschine und umso trüber wird das Zentrat (Anteil der abschleuderbaren Feststoffanteile).

Tab. 33: Trockenmassen und Klärgerade der Raffinatabtrennung mittels Vollmantel-schnecken-zentrifuge der Charge 23.01.2007

Byproduct	Zulauf in den Dekanter [L/h]	Trockenmasse [%TM]	Mittlerer Fehler der Trockenmasse [%TM]	Abschleuderbarer Anteil im Zentrat [%]
Blaufränkisch-Trester	100	31,17	0,45	≈ 0,7
Blaufränkisch-Trester	80	28,89	0,90	≈ 0,5
Blaufränkisch-Trester	60	26,05	1,46	≈ 0,2

Um bessere Trennergebnisse zu erreichen, sind mehrere Schritte denkbar. Der Dekanter Sharples P600 hat einen Back-Drive-Antrieb zur Regelung der Differenzdrehzahleinstellung, der lediglich bis 4 U/min herunter zu regeln ist. Modere Dekanter sind auf 2 U/min einstellbar, so dass doppelt so viel Feststoff im Dekanter verbleibt und das Drehmoment und somit die Trockenmasse noch weiter gesteigert werden kann, ohne Klärleistung einzubüßen. Weiter könnte das Drehmoment durch einen steileren Winkel des konischen Teil der Trommel generiert werden oder eine größere Wehrscheibe (größerer Innendurchmesser) auf der Flüssigkeitsseite höhere Drehmomente ergeben, da die Trockenzone im konischen Teil der Trommel somit größer wäre und der Feststoff einen längeren Weg oberhalb des Flüssigkeitsring in der Trockenzone transportiert und gepresst werden würde. Eine größere Wehrscheibe verursacht jedoch einen größeren Energieverbrauch, da bei frei ausgetragenen Zentrat auf größerem Durchmesser auch rotierende Masse und damit mehr Energie ausgetragen wird, die der Primärmotor wieder nachspeisen muss. Weiter weist dieser Dekanter eine äquivalente Klärfläche von etwa 500 m² mit einer relativ kurzen Trommel (Länge/Durchmesser-Verhältnis von 2,4 (360/150) mm) auf. Um bessere Klärgerade zu erreichen, wäre eine Klärflächenerhöhung mit längerer Trommel denkbar, die ein Länge/Durchmesser-Verhältnis von 4 oder 5 aufweist und so die Klärleistung verdoppelt würde, da die äquivalente Klärfläche eines Dekanters maßgeblich aus der Länge des zylindrischen Teils der Trommel resultiert. Weiter ist anzumerken, dass der Feststoffabwurf nicht in einem konisch zusammenlaufenden Schacht münden sollte, da das Raffinat zur Brückenbildung neigt und so die Gefahr eines Rückstaus in den Dekanter besteht. Auch wäre es hilfreich, das Zulaufrohr so zu gestalten, dass es nicht im Innendurchmesser konisch verjüngt wird, auch wenn es schwingungstechnische Gründe hat, da die Kerne des Rohstoffs ebenfalls zur Brückenbildung neigen und den Zulauf blockieren.

5.1.2 Membranversuche

Zunächst sollen hier die Ergebnisse der anorganischen und der organischen Membranen hinsichtlich ihrer Permeatflüsse und anschließend ihrer Rückhaltungen dargestellt werden.

5.1.2.1 Permeatflüsse anorganischer Membranen

Wie zu erwarten war, nimmt der Permeatfluss mit der Dauer der Filtration ab und mit steigendem NMWC der Membranen zu. In den Abb. 91 und 92 sind die Fluss/Zeit-Diagramme und in den Abb. 93 und 94 die Fluss/VCF-Diagramme der untersuchten keramischen Membranen gezeigt. Die Versuche der 1, 5, 8, 8"neu" und 15 kDa-Membranen wurden auf der Test-Membrananlage 1 mit 24 L Feed-Volumen und einem VCF von 4 und im Falle der 15 kDa mit einem VCF von 5 jeweils mit einem transmembranen Druck von 3,25 bar durchgeführt, die 3 kDa-Membranläufe dagegen auf der Test-Membrananlage 2 mit 48 L Feed-Volumen und ebenfalls einem VCF von 4, was die längere Filtrationszeit erklärt. Die Erhöhung des transmembranen Drucks von 3,25 bar auf 4,4 bar auf der Test-Membrananlage 2 bei der Untersuchung der 3 kDa-Membran ergab eine erhebliche Steigerung der Flussrate von größer 70 %.

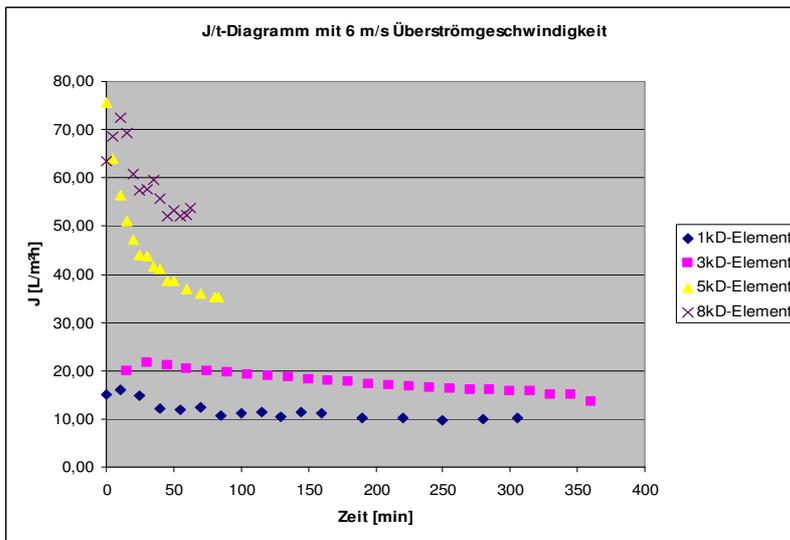


Abb. 91: Fluss/Zeit-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

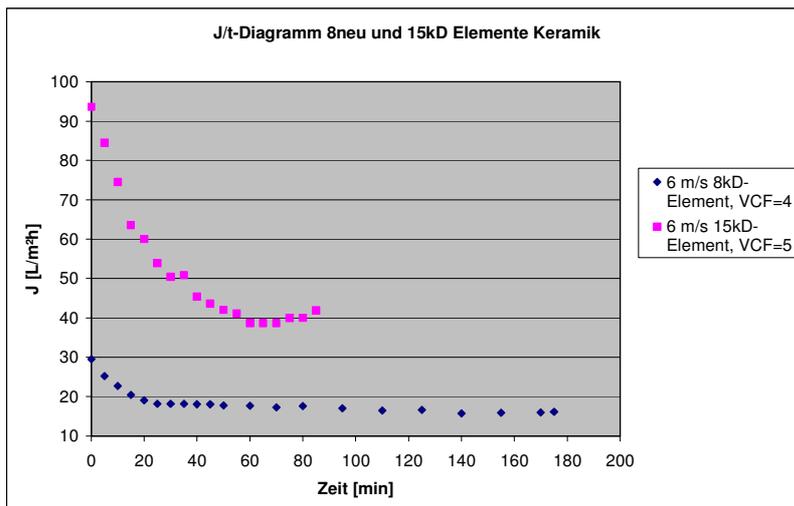


Abb. 92: Fluss/Zeit-Diagramm keramischer Membranen 8"neu", 15 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Wie bei den meisten Anwendungen, zeigt es sich auch im Rahmen dieser Arbeit, dass die Permeatflüsse in der Anfangsphase (instationäre Phase) bei Membranen mit größeren Cut-Offs wesentlich größer sind, als bei kleineren Cut-Offs, da u. a. der Porendurchmesser quadratisch in den Permeatfluss eingeht (Gl. 28a). Darüber hinaus kann angeführt werden, dass die Permeatflüsse, betrachtet aus praktischer Sicht, durchaus akzeptable Werte

aufweisen und, dass auch der zeitliche Verlauf der Permeate üblichen Erfahrungswerten entspricht.

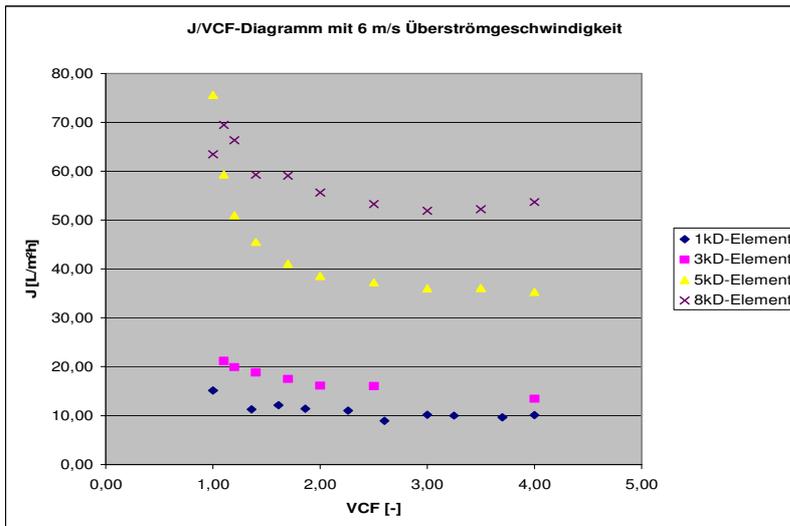


Abb. 93: Fluss/VCF-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, Überströmgeschwindigkeit $v=6$ m/s)

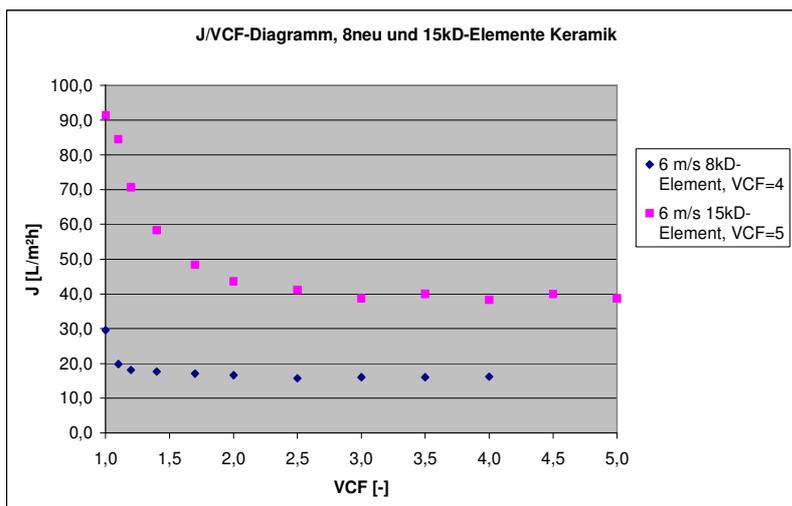


Abb. 94: Fluss/VCF -Diagramm keramischer Membranen 8 (neu), 15 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Weiter ist zu sehen, dass zwei 8 kDa-Membranen mit unterschiedlichen Flüssen getestet wurden. Beide Membranen haben die gleiche Geometrie und sind aus gesintertem TiO_2 gefertigt. Nachdem sich die erste 8 kDa-Membran (als einzige der getesteten Elemente bereits in Verwendung gewesen) nach ihren Wasserflüssen (Wasserwerte) und Permeatflüssen in die Reihe 1, 3, 5 und 8 kDa einfügt, weist sie eine unerwartet hohe Rückhaltung auf, so dass eine weitere 8“neu“ kDa- und zusätzlich eine 15 kDa-Membran gleicher Bauart angeschafft und diese ebenfalls mit Weintresterextrakt getestet wurden. Auch diese Membranen weisen kleinere Wasser- und Permeatflüsse sowie höhere Rückhaltungen als erwartet auf. Bei der Produktion der Membranen wird zunächst ein poröser Grundkörper (erste Schicht) mittels Extruder hergestellt. Anschließend folgen zwei dichtere Schichten feiner TiO_2 -Pulver, die jeweils einer Sinterung zur Porenbildung unterzogen werden. Die Qualitätsprüfung erfolgt durch Rückhaltungsbestimmungen mit Dextranen. Weisen Membranen nicht die gewünschte Rückhaltung auf, wird eine weitere Schicht aufgebracht. Die nachbearbeiteten Membranen erreichen dann die angegebene Rückhaltung, weisen jedoch einen reduzierten Permeatfluss durch die zusätzliche vierte

Schicht auf, - was im Falle der 8“neu“ und 15 kDa-Membranen offensichtlich zutrifft. Die hohe Rückhaltung der ersten 8 kDa-Membran lässt sich dadurch erklären, dass sie als einzige der untersuchten Membranen bereits für zahlreiche Versuche im Gebrauch war und somit undefinierbare Einlagerungen aufweisen könnte, die einen starken Einfluss auf die Rückhaltung von Antioxidantien und Polyphenolen haben.

Weiter wurde der Einfluss unterschiedlicher Überströmgeschwindigkeiten untersucht. Wie zu erwarten war, baut sich bei 3 m/s Überströmgeschwindigkeit eine stärkere Foulingschicht auf, als bei Überströmgeschwindigkeiten von 4,5 und 6 m/s. Dies trifft für jede der Membranen zu und ist exemplarisch in den Abb. 95 und 96 in den Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagrammen der 5 kDa-Membran gezeigt.

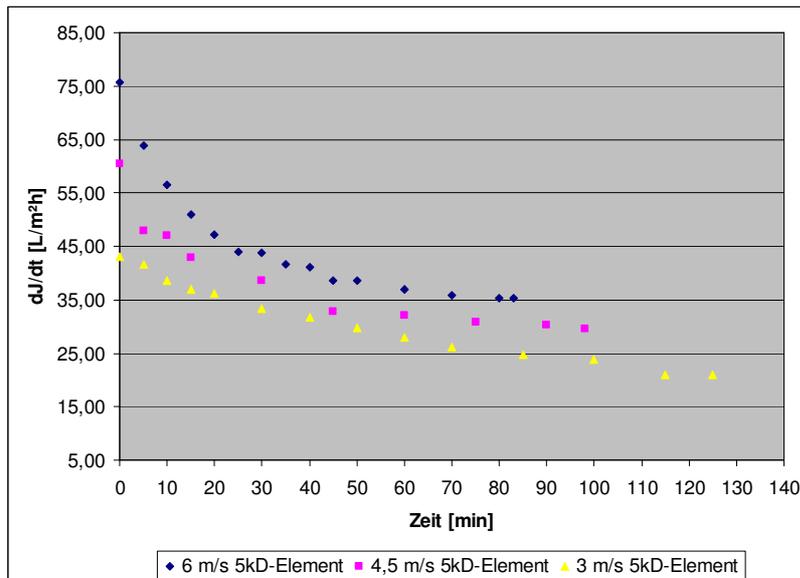


Abb. 95: Fluss/Zeit-Diagramm 5 kDa keramischer Membran bei unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten mit Weintrestereextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{transm}=3,25$ bar, $T_{Bezug}=30$ °C, VCF=4)

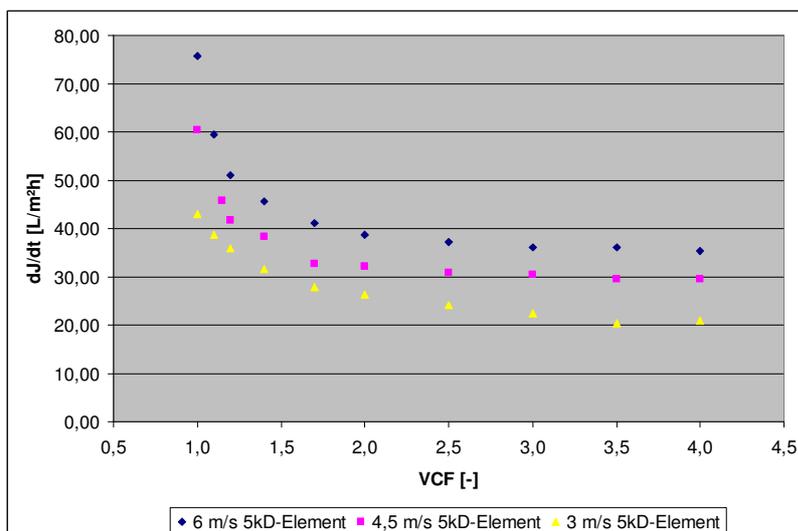


Abb. 96: Fluss/VCF-Diagramm 5 kDa keramischer Membran bei unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten mit Weintrestereextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{transm}=3,25$ bar, $T_{Bezug}=30$ °C)

Werden nun die „End“-Permeatflüsse nach einer Aufkonzentrierung von VCF=4 bei allen Überströmgeschwindigkeiten und den Membranen 1, 3, 5 und 8 kDa in ein Fluss/NMWC- und ein Fluss/Zeit-Diagramm (Abb. 97 und 98) übertragen, so kann eine gute Übersicht der zuvor getroffenen Aussagen gewonnen werden.

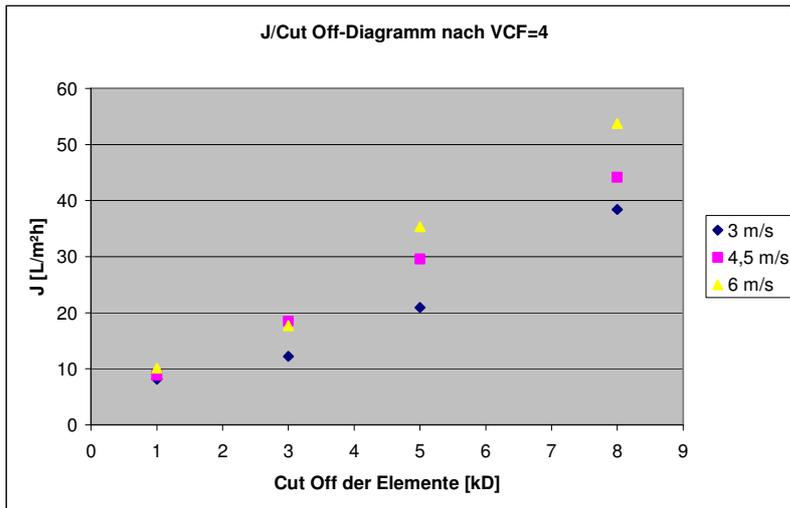


Abb. 97: Fluss/NMWC-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa und Überströmgeschwindigkeiten von 3, 4,5 und 6 m/s mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{transm}=3,25$ bar, $T_{Bezug}=30$ °C)

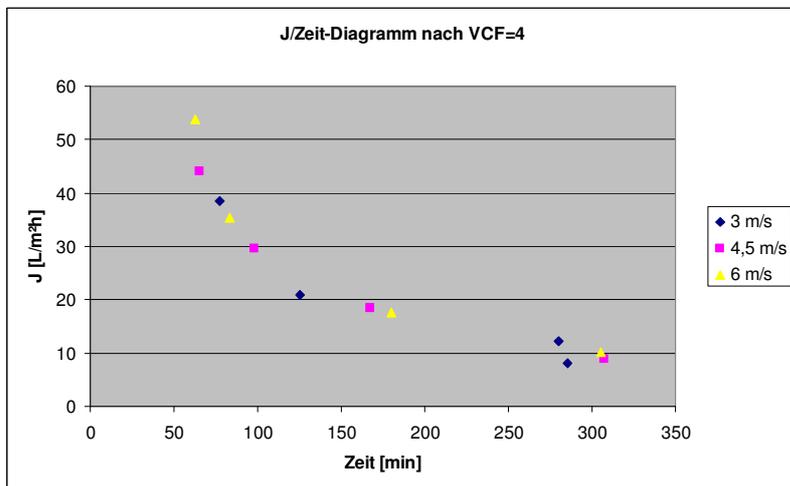


Abb. 98: Fluss/Zeit-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa und Überströmgeschwindigkeiten von 3, 4,5 und 6 m/s mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{transm}=3,25$ bar, $T_{Bezug}=30$ °C)

5.1.2.2 Permeatflüsse organischer Membranen

Flachmembranen sind zumeist in Form von Spiralmodulen (Wickelmodulen) und seltener als Plattenmodule konstruiert. Beide Modularten weisen Abstandhalter (Spacer) zwischen den Membranen auf, die eine Vorreinigung (Polierung) des Zulaufs mittels Tellerseparatoren oder Mikrofiltration erfordern, um eine Verblockung mit Fest- und Trubstoffen zu vermeiden. Diese Vorreinigung wurde im Falle des Weintresterextraktes mit einem MF-Hohlfasermodule ($0,2\ \mu\text{m}$) durchgeführt, für die eine eigene Filteranlage mit Schlauchquetschpumpe, Manometer, Thermometer, Feed- und Retentatbehälter sowie Permeatbehälter aufgebaut wurde. Auch hier wurde das Permeat/Zeit-Diagramm aufgezeichnet und ist in Abb. 99 wiedergegeben.

Anschließend wurde das Permeat über eine nach Abb. 80 beschriebene Membrankaskade der 1.600 mL Rührzelle von 10.000, 4.000, 1.000 und 200 Da chargenweise filtriert, wobei jeweils das Permeat der Membran mit größerem NMWC als Feed der folgenden Membran mit kleinerem NMWC diente. Aufgezeichnet wurden dabei die Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme (Abb. 100 und 101). Da mit unterschiedlichen transmembranen Drücken

gearbeitet wurde, sind die Kurven nicht direkt miteinander vergleichbar. Dennoch ist zu sehen, dass die erforderlichen transmembranen Drücke der dichten organischen Membranen erheblich größer sind, als die der anorganischen Membranen (wirtschaftlich annehmbare Permeatflüsse liegen üblicherweise bei > 5 L/m²h).

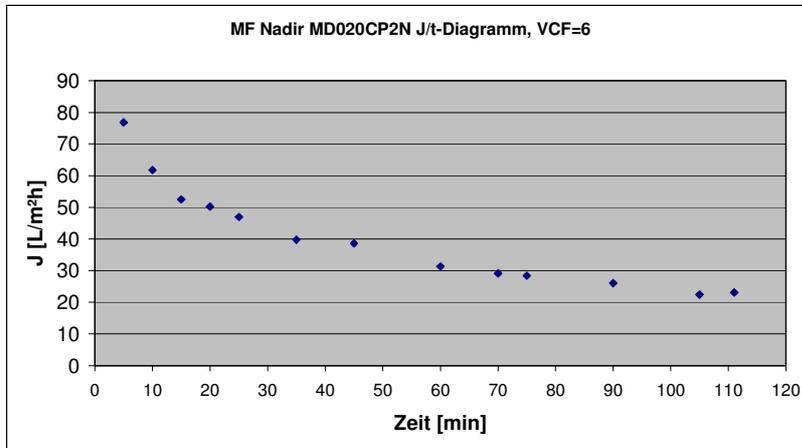


Abb. 99: Permeat/Zeit-Diagramm der Vorreinigung von Weintrestereextrakt mittels MF-Hohlfaser-Modul MD020 CP2N Microdyn Nadir ($p_{\text{transm}}=0,5$ bar, $T_{\text{Bezug}}=25$ °C, $v=6,5$ m/s)

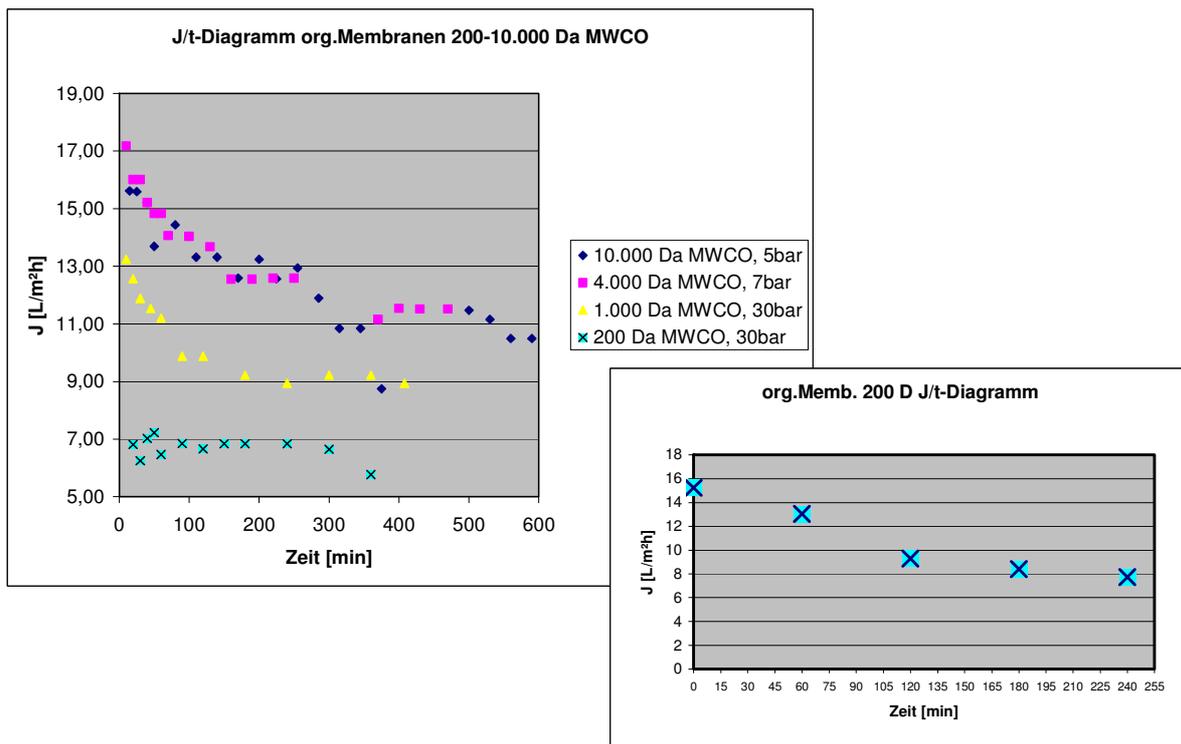


Abb. 100: Fluss/Zeit-Diagramm 10.000, 4.000, 1.000, 200 Dalton organische Membranen von Weintrestereextrakt ($p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}= 500$ U/min)

Eine Leckage des Ablassventils der 1.600 mL Rührzelle machte einen Abbruch der Filtration der 200 Da Flachmembran erforderlich, die mit der 32 mL Rührzelle wiederholt wurde und dessen Fluss/Zeit-Diagramm in das Diagramm der Abb. 100 eingebildet ist. Auch hier ist der End-Permeatfluss bei etwa 7 L/m²h, so dass im Fluss/VCF-Diagramm dieser End-Punkt bei einer Konzentration von VCF=4 nachgetragen wurde.

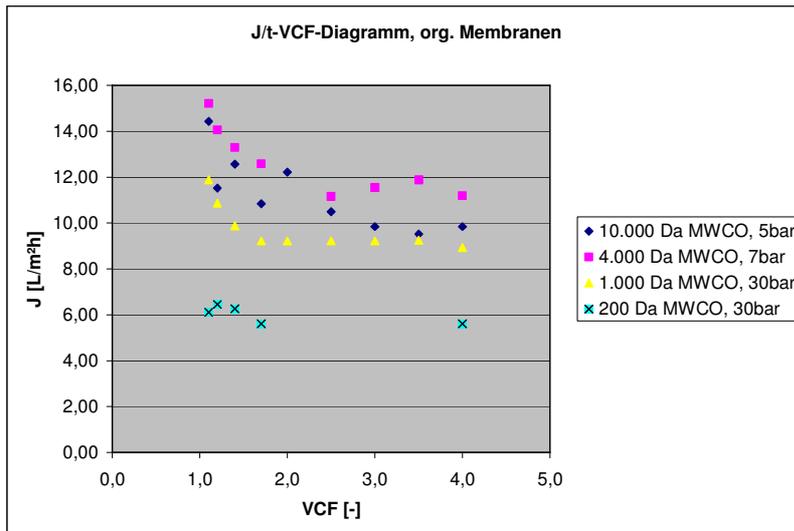


Abb. 101: Fluss/VCF-Diagramm 10.000, 4.000, 1.000, 200 Da organische Membranen von Weintrestereextrakt ($p_{transm}=5, 7$ und 30 bar, $T_{Bezug}=30$ °C, $n_{Rührer}= 500$ U/min)

Weiter wurden die Filtrationsversuche der 32 mL Rührzelle (Abb. 80) mit zugesetzten 28 Polyphenol-Standards durchgeführt. Die Fluss/Zeitdiagramme sind in Anhang VIII gezeigt.

5.1.2.3 Rückhaltungen anorganischer Membranen

Als Übersicht der Rückhaltung der Zielsubstanzen, eignen sich der Gesamtphenolgehalt und die antioxidative Kapazität aller Filtrationen mit anorganischen Membranen. Weiter werden im Detail die Rückhaltungen der Einzelpolyphenole, der organischen Säuren und Zucker, der An- und Kationen sowie Proteine ausgesuchter Membranfiltrationen dargestellt.

In Abb. 102 und 103 sind die Rückhaltungen der antioxidativ wirkenden Inhaltsstoffe und der Phenole der keramischen Membranen 1, 3, 5, 8 und 15 kDa bei unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten 3, 4,5 und 6 m/s gezeigt.

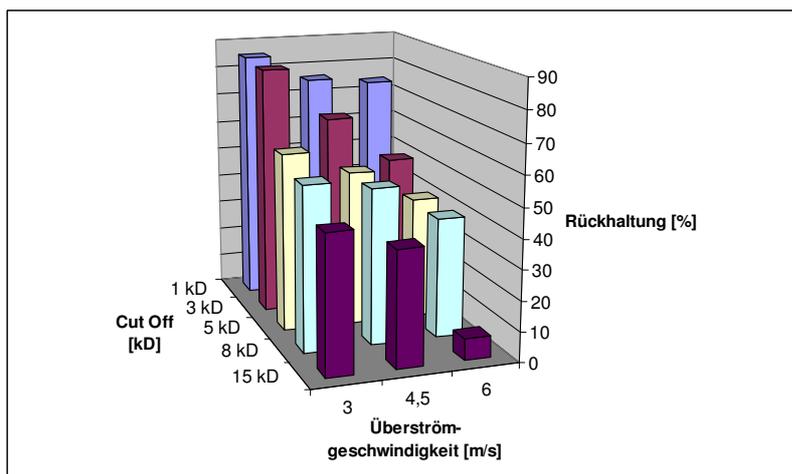


Abb. 102: Vergleich der Rückhaltung der Keramikmembranen 1, 3, 5, 8 und 15 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) (Weintrestereextrakte, $p_{transm}=3,25$ bar, $T_{Bezug}=30$ °C)

Erwartungsgemäß bildet sich mit höheren Überströmgeschwindigkeiten eine geringere Foulingschicht aus, die zu geringeren Rückhaltungen führt. Weiter sinkt, ebenfalls erwartungsgemäß, mit größeren NMWC der Membranen die Rückhaltung, was anhand der hohen Rückhaltungen von >80 % der 1 kDa-Membran und der stufenweisen Reduktion bis auf sehr geringe Rückhaltungen <5 % der 15 kDa-Membran dargestellt ist. Angemerkt sei,

dass das Extrakt ohne Feinstklärung (Polierung) mittels Mikrofiltration oder Tellerseparator eingesetzt wurde. Der Einfluss des Klärgerades des Rohextraktes ist erheblich und wurde anhand der Versuche mit keramischen Membranen und Apfeltresterextrakten als Feed im Detail untersucht und dargestellt.

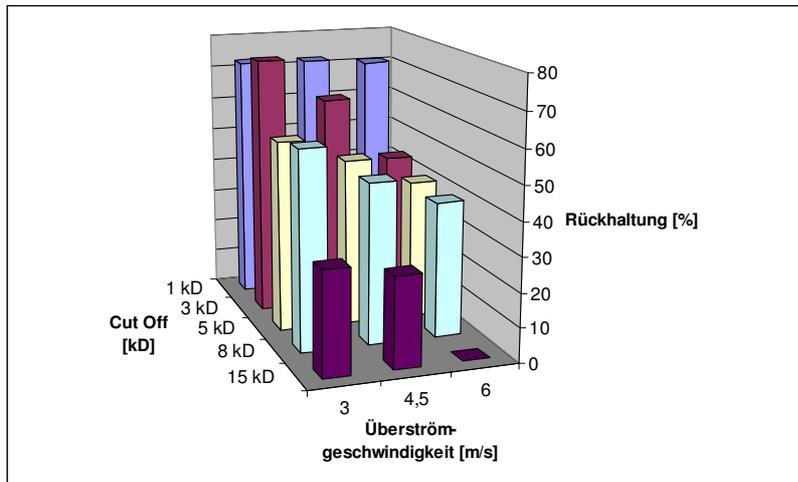


Abb. 103: Vergleich der Rückhaltung der Keramikmembranen 1, 3, 5, 8 und 15 kDa mittels antioxidativer Kapazität (TEAC-Methode) (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Die Rückhaltungen der mittels HPLC-Analytik erfassbaren Einzelpolyphenole der Membranversuche mit 6 m/s Überströmgeschwindigkeit sind in Abb. 104 dargestellt.

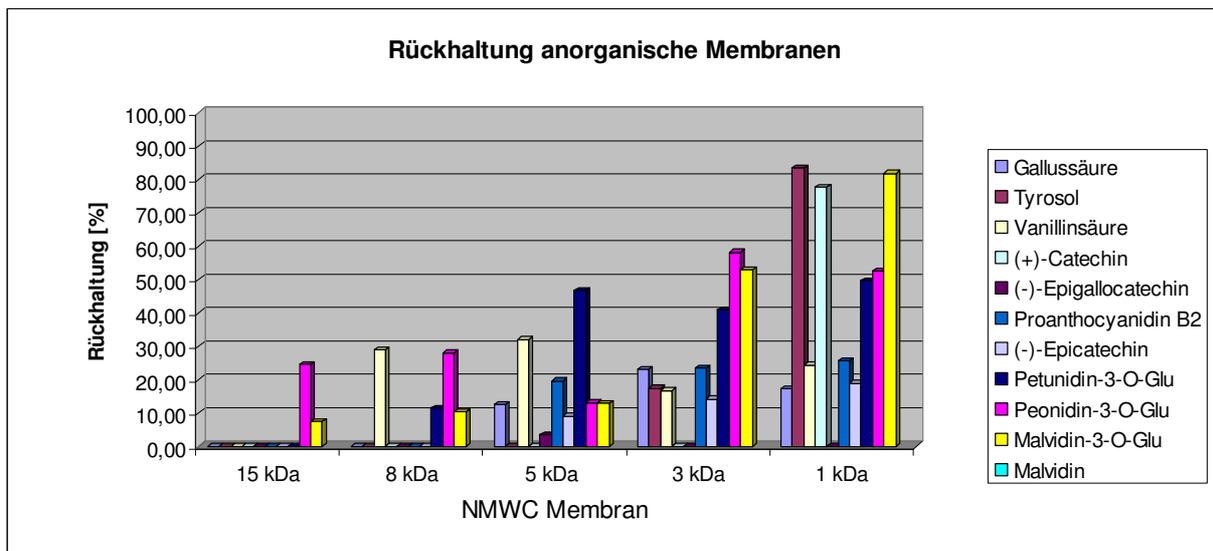


Abb. 104: Rückhaltungen einzelner Polyphenole keramischer Membranen (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Wie die Ergebnisse in Abb. 104 zeigen, sind gewisse „Rückhaltungstendenzen“ auch unabhängig von dem Größenverhältnis Substanzmolekülmasse/Porengröße ersichtlich. Wie auch vermutet werden konnte, legt dies nahe, dass die Rückhaltung von verschiedenen Faktoren, wie Deckschichtaufbau (Sekundärmembran), Adsorptionseffekten u. a. abhängig ist. Gleichzeitig kann festgestellt werden, dass Rückhaltungen, die hauptsächlich auf die Porengröße zurückzuführen sind, offensichtlich ab einem Cut-Off von etwa 1 kDa erkennbar werden. Dies ist beispielsweise an den Substanzen Tyrosol und (+)-Catechin deutlich zu sehen. Aus praktischer Sicht (industrielle Anwendung) ist die sich hier zeigende Komplexität des Rückhalteverhaltens im besonderen Maße zu beachten.

Weiter sind analytische Chromatogramme bei 280 nm als repräsentatives Beispiel in Abb. 105 gezeigt. Das Chromatogramm des Permeats der 8 kDa-Membran weist eine gute Basislinientrennung der Polyphenole auf, wohingegen im Retentat scheinbar OPCs, Tannine

und andere große Moleküle aufkonzentriert sind, jedoch beispielsweise (-)-Epigallocatechin und (-)-Epicatechin nicht aufkonzentriert vorliegen, also keine Rückhaltungen bei Einsatz der 8 kDa-Membran aufweisen (vgl. auch Anhang VI).

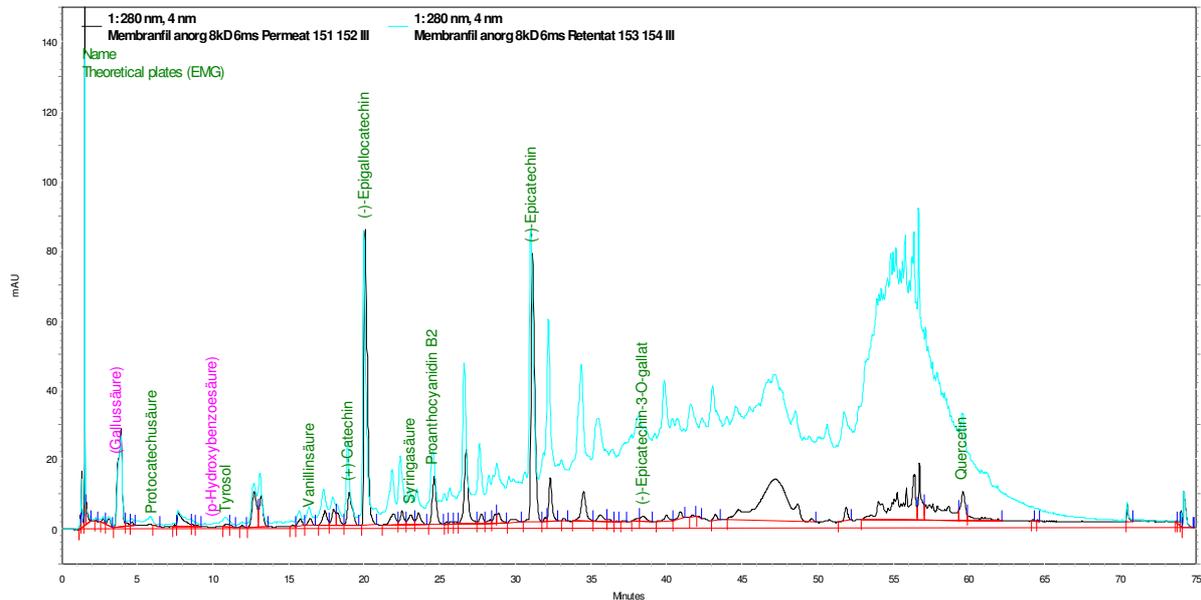


Abb. 105: Analytische Chromatogramme bei 280 nm vom Permeat und Retentat einer Filtration mit keramischer Membran (NMWC=8 kDa) eines Rotweintresterextrakts ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Vollständigkeitshalber wurden die Rückhaltungen der organischen Säuren und Zucker der keramischen Membranen bei einer Überströmgeschwindigkeit von 6 m/s in Abb. 106 aufgeführt. Dabei ist kein Trend der Rückhaltungen bei unterschiedlichen NMWCs zu sehen. Generell ist davon auszugehen, dass diese relativ kleinen Moleküle weniger von den Membranen, sondern vielmehr von sekundären Membranschichten und Porenveränderungen (Verblockungen) durch Extraktfeststoffpartikel zurückgehalten werden. Anzumerken ist noch, dass die in Abb. 106 zusammengefassten Ergebnisse mit einer gewissen analytischen Ungenauigkeit (insbesondere bei der Detektion von Apfelsäure durch Einfluss des Polyphenolhintergrundes im Chromatogramm) behaftet sind.

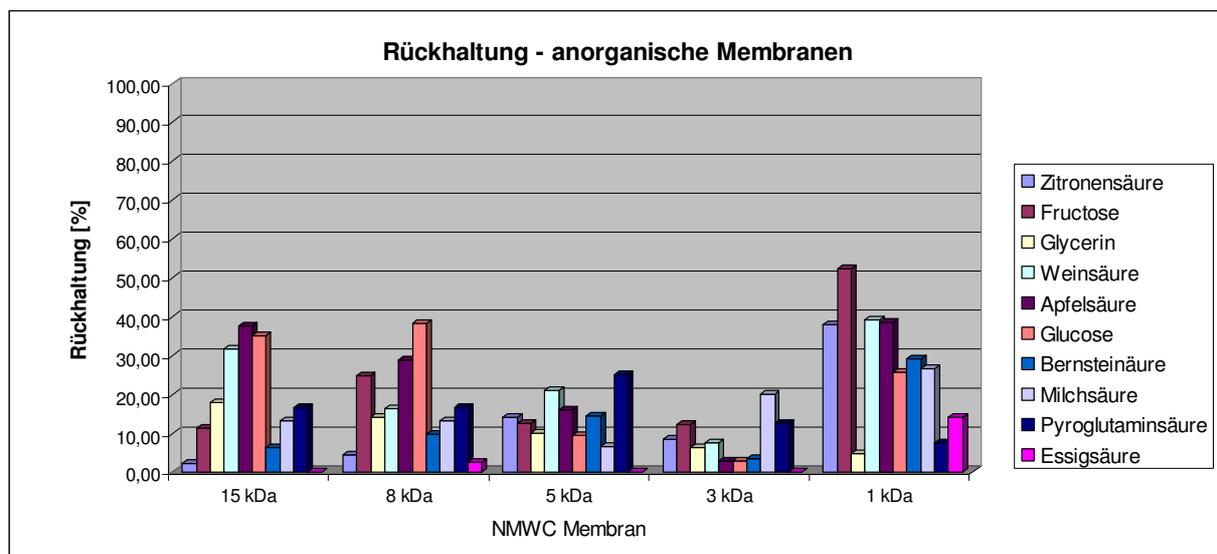


Abb. 106: Rückhaltungen organischer Säuren und Zucker keramischer Membranen (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Wie aus der Literatur bekannt, werden Ionen, insbesondere mehrwertige Ionen, lediglich mit der feinen Nanofiltration, die NMWC < 500 Da aufweisen, signifikant zurückgehalten, so dass die untersuchten keramischen Membranen entsprechend keine Rückhaltung von Ionen aufweisen. Denkbar wäre eine gewissen Rückhaltung von mehrwertigen Ionen mit keramischen Membranen die NMWC < 500 Da erreichen, wie eine Membran mit 480 Da, die von PUHLFÜRSS (2000) publiziert wurde. Vollständigkeitshalber soll als anschauliches Beispiel des Durchgangs der Ionen Abb. 107 dienen. Es sind lediglich minimale Abweichungen der übereinander gelegten Chromatogramme des Retentats, Permeats und Feeds der 8 kDa Membran zu sehen, die mit der Messungengenauigkeit der Ionenchromatographie erklärt werden können.

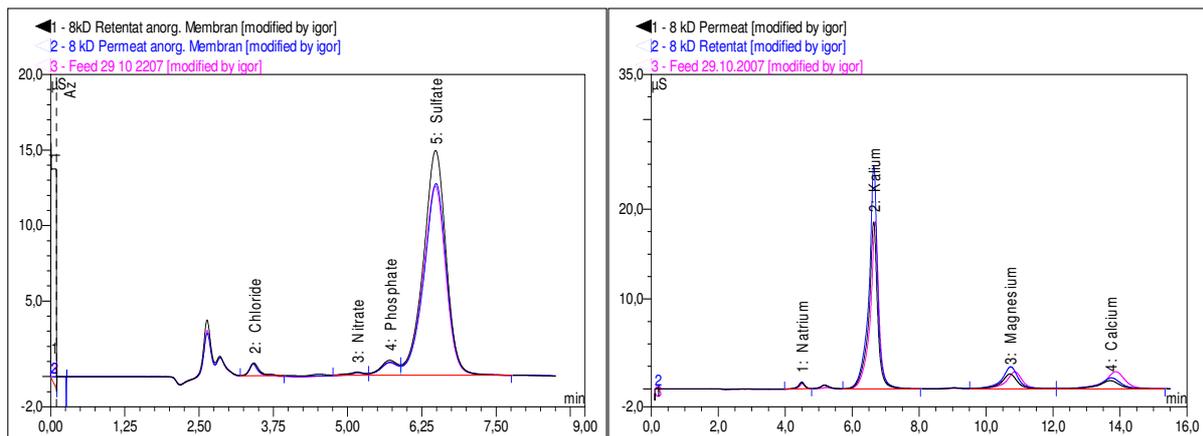


Abb. 107: Chromatogramme der Anionen und Kationen einer keramischen 8 kDa Membran (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Ebenfalls erwartungsgemäß, werden im Gegensatz zu den Ionen, die Proteine, gemessen nach dem Gesamtproteingehalt nach Bradford, von allen keramischen Membranen vollständig zurückgehalten.

5.1.2.4 Rückhaltung organischer Membranen

In Abb. 108 und 109 sind die Rückhaltungen der antioxidativ wirkenden Inhaltsstoffe und der Phenole des MF-Hohlfasermoduls und der organischen PES-Membranen mit NMWCs von 10, 4, 1 und 0,2 kDa aus den Kaskadenversuchen der 1.600 mL Rührzelle gezeigt.

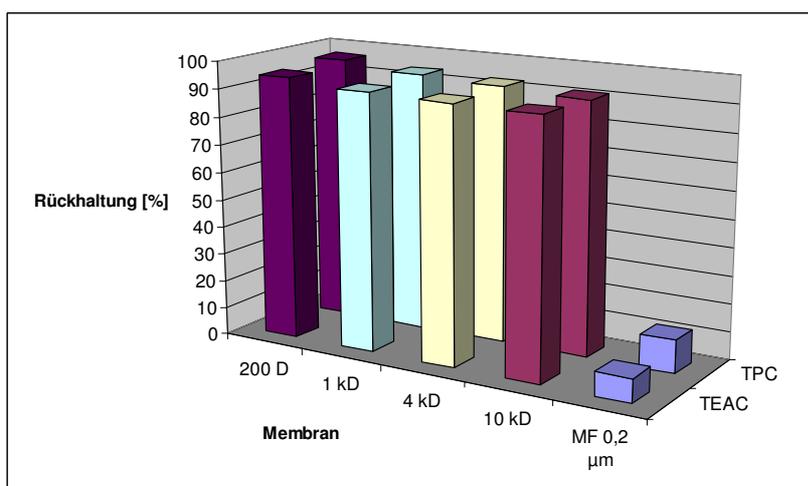


Abb. 108: Vergleich der „absoluten“ Rückhaltungen der MF und PES-Membranen 10, 4, 1 und 0,2 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (TPC) und antioxidativer Kapazität (TEAC), bezogen auf das Rohextrakt (Weintresterextrakte, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar)

Wie erwartet, weist die MF eine vernachlässigbare Rückhaltung auf. Bereits an der Entfärbung des Permeats der dichten 10 kDa Flachmembran war optisch zu erkennen, dass eine starke Rückhaltung der Anthocyane und Anthocyanidine vorliegen muss, was durch die Messdaten mit etwa 91 % Rückhaltung nach TPC und TEAC bestätigt wurde. Entsprechend gering ist die verbleibende Konzentration an antioxidativ wirkenden Inhaltsstoffen und Phenolen, so dass eine geringe kontinuierliche Abnahme bis etwa 95 % Rückhaltung nach TPC und TEAC der 200 Da Flachmembran resultieren. Wird die Rückhaltung nicht bezogen auf das Rohextrakt (absolute Rückhaltung, Abb. 108), sondern auf das jeweils vorhergehende Permeat, welches das Feed der Kaskadenschaltung des Versuchsaufbaus der organischen Membranen darstellt (relative Rückhaltung, Abb. 109), so ist zu sehen, dass die 10 kDa Membran mit 84 % (TPC) bzw. 91 % (TEAC) ebenfalls den größten Anteil der Rückhaltung ausmacht, wohingegen die Membranen mit NMWC von 4 und 1 kDa relativ geringe Mengen antioxidativ wirkender Inhaltsstoffe und Polyphenole zurückhalten und diese erst durch die 200 Da Membran nahezu vollständig aufkonzentriert werden. Mit anderen Worten: Da die Zielsubstanzen etwa 250 bis 1.000 g/mol aufweisen und lediglich Tannine und OPCs weit über dieses Molekulargewicht der ein oder zweifachverzuckerten „Mono“-Phenolcarbonsäuren, -Flavonoide und -Stilbene reichen, kann angenommen werden, dass durch die 10 kDa-Membran große, stark antioxidativ wirkende und Hydroxyl-Gruppentragende Inhaltsstoffe, was insbesondere für Tannine und OPCs, aber auch Pektinstoffe zutrifft, zurückgehalten werden, die „Mono“-Polyphenole eine geringe Rückhaltung durch die 4 und 1 kDa Membranen erfahren und erst nahezu vollständig von der 200 Da-Membran zurückgehalten werden. Zur Abschätzung anderer Kombinationen an Membranen (z. B. 10 kDa, ohne 4 kDa-Membran sofort auf eine 1 kDa-Membran), kann mit Addition der Rückhaltungen der dazwischen liegenden Membranen vorgegangen werden (im Beispiel Rückhaltung der 1kDa-Membran dann: $R_{1kDa}+R_{4kDa}$).

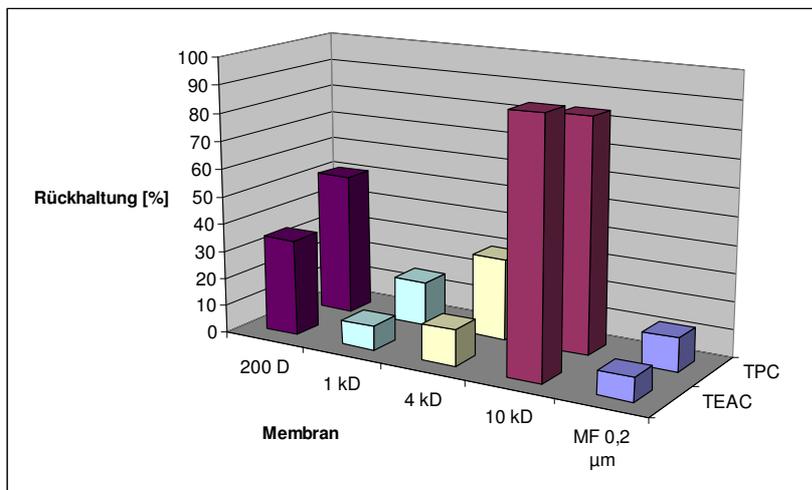


Abb. 109: Vergleich der „relativen“ Rückhaltungen der MF und PES-Membranen 10, 4, 1 und 0,2 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (TPC) und antioxidativer Kapazität (TEAC), bezogen jeweils auf das Permeat der vorhergehenden Membranfiltration (Weintresterextrakte, $T_{\text{Bezug}}=30\text{ °C}$, $p_{\text{transm}}=5, 7\text{ und }30\text{ bar}$, $n_{\text{Rührer}}=500\text{ U/min}$), - Hinweis: Bei der Berechnung der „relativen“ Rückhaltung wird als Konzentration des Feeds die Konzentration des Permeats der vorangegangenen Filtration der Kaskadenschaltung eingesetzt.

Werden nun die analytischen Chromatogramme des Permeats und des Retenats bei 280 nm der 10 kDa-Membran näher betrachtet (Abb. 110), so ist deutlich, dass polymerisierte Phenole, die zumeist ein Wellenlängenspektrum wie das des Proanthocyanidins B2 und die der Flavan-3-ole (+)-Catechin, (-)-Epicatechin sowie deren Gallate aufweisen (Anhang I und VI), im Retenat sehr zahlreich vorhanden und aufkonzentriert, jedoch im Permeat stark reduziert sind und so eine Basislinientrennung bzw. eine selektive Trennung von Polymeren und Monomeren vorgenommen werden konnte.

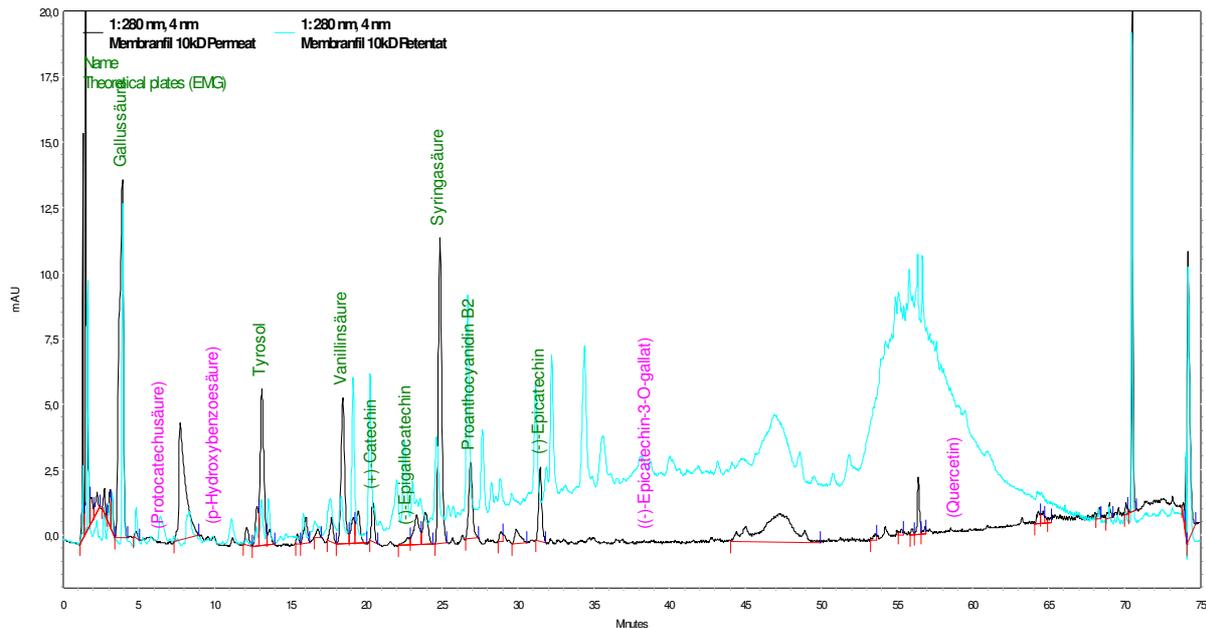


Abb. 110: Vergleich analytischer Chromatogramme des Retentats und Permeats der 10 kDa-PES-Flachmembran ($p_{\text{transm}}=5$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min, $V_{\text{Aufgabe}}=50$ μL)

Die Rückhaltungen der identifizierten Einzelpolyphenole sind in Abb. 111 dargestellt. Dabei zeigt sich ein ähnlicher Verlauf, wie bei den Auswertungen zu den antioxidativ wirkenden und phenolischen Inhaltsstoffen (Abb. 108 und 109). Bereits die relativ dichte 10 kDa-PES-Membran weist eine hohe Rückhaltung einzelner Polyphenole auf. Da das Extrakt mikrofiltriert wurde, entfallen die Einflüsse sekundärer Membranen aus Feststoffpartikeln, so dass lediglich Konzentrationspolarisationen zum Tragen kommen.

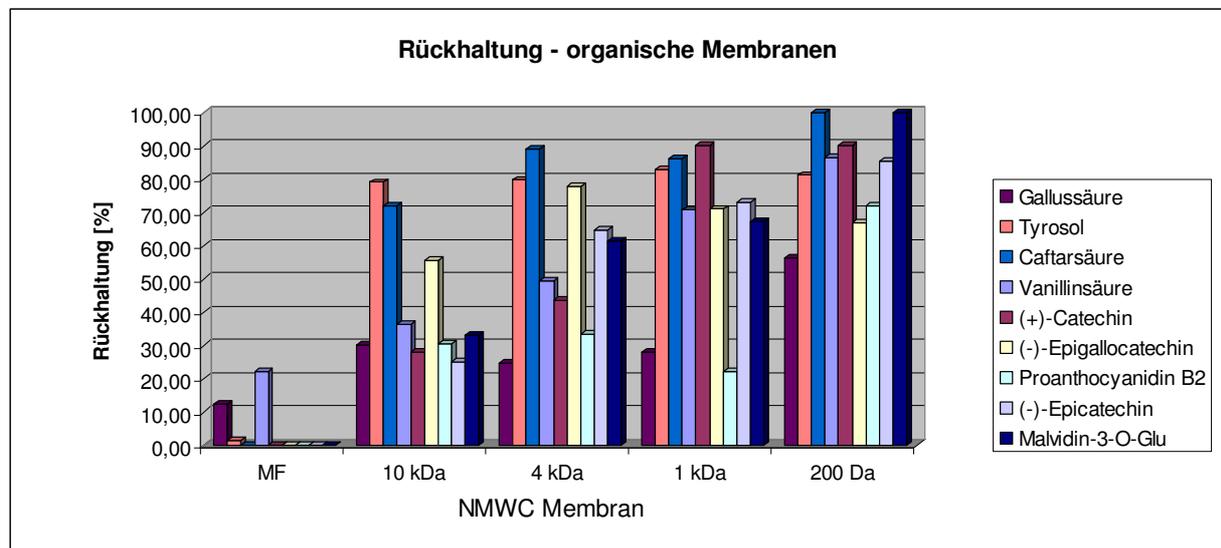


Abb. 111: Rückhaltungen einzelner Polyphenole organischer Membranen (Weintrester-extrakte, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

Die Rückhaltungen organischer Säuren und Zucker sind in Abb. 112 dargestellt. Die relativ kleinen Moleküle der organischen Säuren und Zucker weisen dabei für die Membranen mit NMWCs von 10, 4 und 1 kDa geringe Rückhaltungen auf und werden erst durch eine Membran mit 200 Da NMWC nahezu vollständig zurückgehalten. Ausgesuchte Chromatogramme der Analytik sind in Anhang IV enthalten.

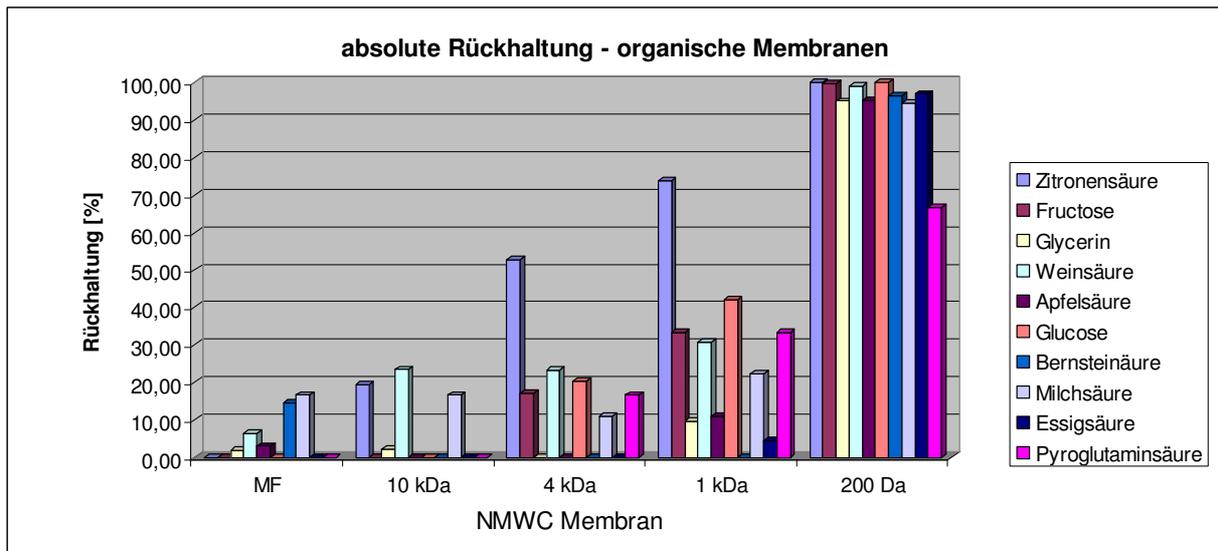


Abb. 112: Rückhaltungen organischer Säuren und Zucker organischer Membranen (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

Organische Membranen sind im Gegensatz zu den keramischen Membranen seit langem als Nanofiltrationen und Umkehrosmose verfügbar. Die Rückhaltung der Ionen ist daher zumindest für die 200 Da Membran zu erwarten. Als anschauliches Beispiel der Rückhaltung der Ionen, sollen die übereinander gelegten analytischen Chromatogramme des Retentats, Permeats und Feeds der 200 Da Membran in Abb. 113 dienen.

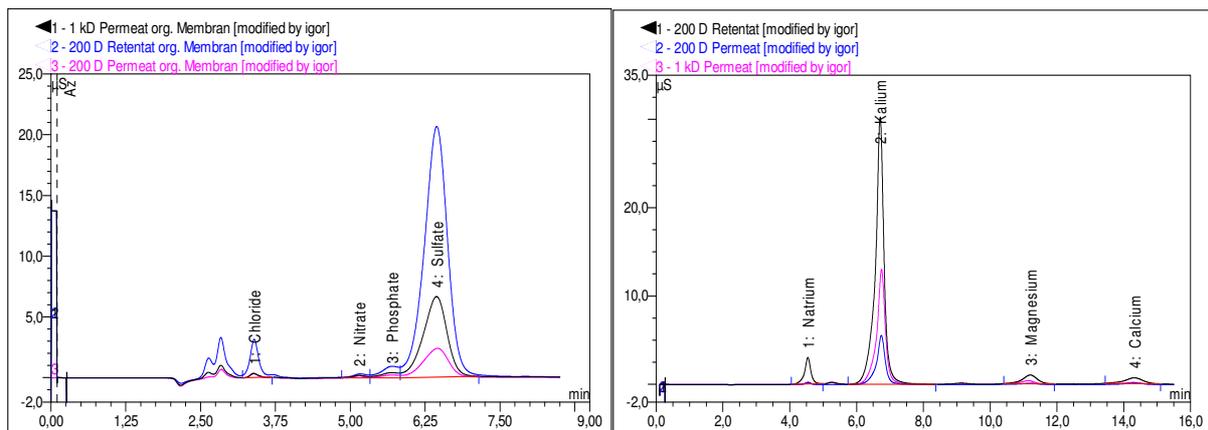


Abb. 113: Chromatogramme der Anionen und Kationen des Feeds, Permeats und Retentats einer organischen 200 Da Membran (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=30$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

Auch von untersuchten organischen Flachmembranen werden Proteine, gemessen nach dem Gesamtproteingehalt nach Bradford, bereits vollständig von der 10 kDa-Membran zurückgehalten, wohingegen die $0,2 \mu\text{m}$ MF-Hohlfasermembran diese passieren lässt.

Zur detaillierten Untersuchung der Rückhaltungen einzelner Polyphenole wurden 100 mL Rotweintresterextrakt (Blaifränkisch-Trester 20 Vol% EtOH) mit 28 Standards je 30 mg/L versetzt und nach Abb. 80 (Kaskadenschaltung mit 10, 4, 1, 0,3 und 0,2 kDa PES-Membranen) in der 32 mL Rührzelle filtriert. Die Rückhaltungen dieser 28 Einzelpolyphenole konnten so mit den Einflüssen der Extraktmatrix (Zucker, organische Säuren, Pektinstoffe, u. a.) untersucht werden und sind in Abb. 114 (Anhang IX) dargestellt. Weiter sind in Abb. 115 die Chromatogramme des $0,45 \mu\text{m}$ filtrierten Extrakts inkl. der 28 zugegebenen Standards (Feed) und des resultierenden Permeats der Filtration mittels 4 kDa-Membran zum Vergleich als repräsentatives Beispiel übereinander gelegt. Beide Abbildungen verdeutlichen die unterschiedlich starke Rückhaltung der einzelnen Polyphenole, so dass eine Vorfractionierung mittels Membranverfahren durchaus denkbar ist. So werden

beispielsweise die Anthocyane und einige weitere Polyphenole schon bereits von der 4 kDa-Membran stark zurückgehalten, wohingegen die meisten Phenolcarbonsäuren diese passieren und erst durch die 200 Da-Membran nahezu vollständig zurückgehalten werden.

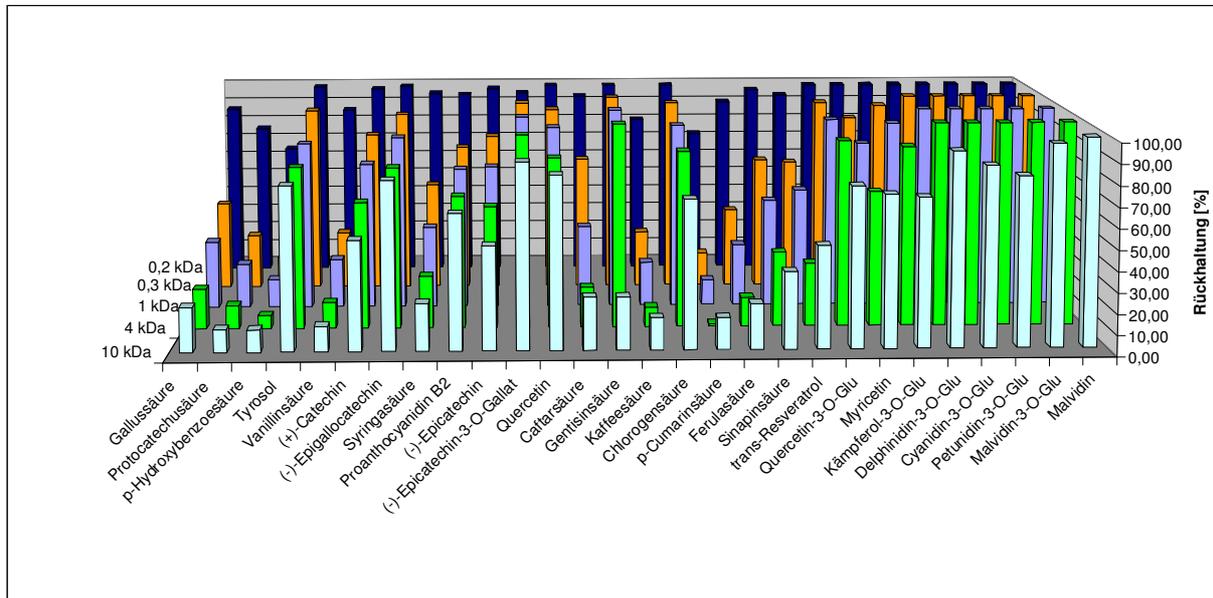


Abb. 114: Rückhaltungen einzelner Polyphenole organischer Membranen (Weintrester-extrakte inkl. 28 PP-Standards, 32 mL Rührzelle, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=21$ °C, $n_{\text{Rührer}}=880$ U/min)

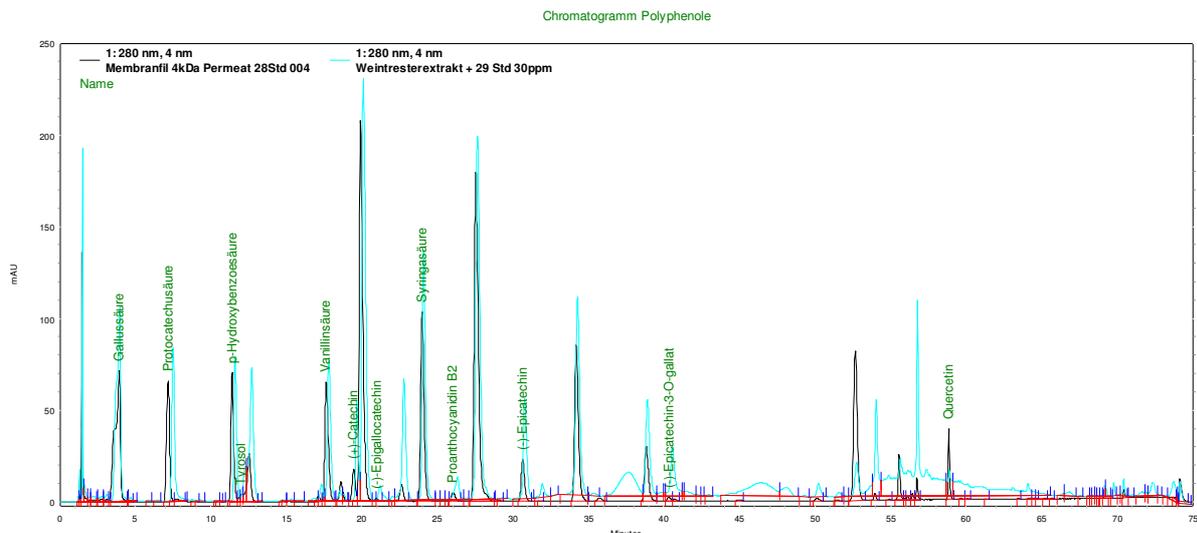


Abb. 115: Vergleich analytischer Chromatogramme (280 nm) des Permeats der 4 kDa-PES-Flachmembran und des Rohextrakts inkl. zugesetzter 28 Standards, $V_{\text{Inject}}=50$ μL (32 mL Rührzelle, $p_{\text{transm}}=7$ bar, $T_{\text{Bezug}}=21$ °C, $n_{\text{Rührer}}=880$ U/min)

5.1.3 Versuche zur präparativen Chromatographie

Zur Untersuchung der Trennleistung von Polyphenolen an RP-C18 Harzen mit angesäuerten Ethanol-Wasser-Eluenten wurden die Isoflavone Formononetin und Biochanin A aus Rotklee eingesetzt. Wie erwähnt, stellen sie mehr als 96 % aller Polyphenole in dem von uns verwendeten „Gumpensteiner“ Rotklee dar, sind relativ leicht zu analysieren, temperaturstabil (Untersuchungen zur Temperaturempfindlichkeit in Anhang V) und somit zur Beurteilung von Harzen als Polyphenolmodelllösung geeignet. Das Harz mit den vielversprechendsten Trenneigenschaften wurde dann zur Untersuchung der präparativen Isolierung von membrangereinigten Extrakten und Rohextrakten verwendet, so dass erste

Aussagen und Tendenzen zum Einfluss membranfiltrierter Extrakte getroffen werden können.

Untersucht wurden vier Harze in drei Druckbereichen (≤ 10 , ≈ 35 und ≤ 70 bar), wobei der Rückdruck der Kapillaren der HPLC-Anlage bereits erheblich zum Gesamtdruck beiträgt und zu berücksichtigen ist (1 mL/min \triangleq 10 bar Kapillarrückdruck der HPLC-Anlage, 1,5 mL/min \triangleq 15 bar, 2,0 mL/min \triangleq 20 bar, 2,5 mL/min \triangleq 24 bar, 3,0 mL/min \triangleq 28 bar). Die Auflösung der beiden zu trennenden Isoflavone wurde mit $R \geq 1,5$ festgelegt. Die präparative Chromatographie der Isoflavone sollte mit isokratischen Eluenten entwickelt werden. Daraus ergeben sich die Parameter Ethanol/Wasser-Zusammensetzung und die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, um die vorgegebene Auflösung und die einzustellenden Druckbereiche zu erreichen. Die Beurteilung der Harze erfolgte durch die Bestimmung der NTU_i sowie die Laufzeiten einer Charge (Produktivitätsgleichung Gl. 47) (Tab. 34). In Abb. 116 ist ein Chromatogramm zur Trennstufenbestimmung mit Angaben zu den Rotklee-Isoflavonen, Retentionszeiten und NTU_i (Theoretical Plates (EMG)) gezeigt.

$$(Gl. 47) P = \frac{c_{Aufgabe} \cdot V_{Aufgabe}}{t_{Ges} \cdot V_{Säule}}$$

P = Produktivität

$c_{Aufgabe}$ = Aufgabekonzentration

$V_{Aufgabe}$ = Aufgabevolumen

t_{Ges} = Gesamtlaufzeit einer Trennung (Charge)

$V_{Säule}$ = Säulenvolumen

Zu Tab. 34 ist anzumerken, dass die gebrochenen Füllmaterialien der Partikelgrößen 40-63 und 63-200 μm im Hochdruckbereich von 65 bar (Säulendruck_{Netto} = 27,6 bzw. 24,9 bar) (hohe Fließgeschwindigkeiten) verformte Peaks zeigen und damit zur NTU_i -Bestimmung mittel EZChrom-Software sowie manuell nicht geeignet waren. Dennoch konnte eine ausreichende Auflösung abgeschätzt werden. Zur Auswertung der NTU_i bei gebrochenen Harzen mit relativ großen Partikelgrößenverteilungen, wie es bei den zwei beschriebenen Harzen der Fall ist, ist möglicherweise das Trockenpackverfahren nicht geeignet, so dass ein Nass-Packverfahren unter Hochdruck (homogenere Säulenpackungen) einzusetzen wäre. Weiter sind im Niederdruckbereich Auswertungen nicht möglich, da keine ausreichende Trennung der Peaks erreicht werden konnte.

Wie erwähnt, ist neben der Trennstufenzahl auch eine möglichst kurze Laufzeit einer Charge ausschlaggebend für eine wirtschaftliche Trennung (Gl. 47). So weist das Harz ODS-A im Mitteldruckbereich zwar höhere Trennstufenzahlen als im Hochdruckbereich auf, benötigt jedoch mit 20 Minuten für einen Durchlauf 5 Minuten länger als im Hochdruckbereich. Im Vergleich dazu, benötigt im Mitteldruckbereich das gebrochene Harz mit Partikelgrößen von 63-200 μm unwirtschaftliche 285 min für eine Charge.

Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Untersuchungen der C_{18} -Harze:

- je kleiner die gebrochenen Harze und je höher die Fließgeschwindigkeiten, desto höher die Trennstufenzahlen für Polyphenole (linke Seite der van Deemter-Kurve)
- im Gegensatz dazu, ergeben bei dem sphärischen Material kleinere Fließgeschwindigkeiten höhere Trennstufenzahlen für Polyphenole, was jedoch auf Kosten der Laufzeit einer Trennung geht (rechte Seite der van Deemter-Kurve)
- sphärische Materialien ergeben im Vergleich zu gleichgroßen gebrochenen Materialien höhere Trennstufenzahlen für Polyphenole
- Höhere Fließgeschwindigkeiten ergeben kürzere Chargen-Laufzeiten

Tab. 34: Parametereinstellungen und NTU_i der präparativen Chromatographie von Isoflavonen aus Rotklee (Vorgaben: $R \geq 1,5$ und $p_{\text{Gesamt}} \leq 10, = 35$ und ≤ 70 bar)

Säulenfüllmaterial Hersteller, Typ Größe	Volumenstrom [mL/min]	Gesamtdruck/ Säulendruck [bar]	Laufmittel- zusammensetzung [%Vol Ethanol]	$NTU_{\text{Formononetin}}$ $NTU_{\text{Biochanin A}}$
M-N*, Polygoprep 15-25 μm	1,5	65 / 50,1	80	520 512
M-N, Polygoprep 40-63 μm	4	65 / 27,6	55	-**
M-N, Polygoprep 63-200 μm	4,3	65 / 24,9	30	-**
YMC, ODS-A 50 μm	2,4	65 / 42	70	330 391
M-N, Polygoprep 15-25 μm	1	35 / 24,6	100	486 470
M-N, Polygoprep 40-63 μm	2,2	35 / 13,8	70	150 178
M-N, Polygoprep 63-200 μm	2	35 / 15,6	45	94 140
YMC, ODS-A 50 μm	1,3	35 / 21,9	85	541 586
M-N, Polygoprep 15-25 μm	0,2	8 / 4,8	100	-***
M-N, Polygoprep 40-63 μm	0,5	8 / 2,1	95	277 306
M-N, Polygoprep 63-200 μm	0,6	8 / 1,2	100	-***
YMC, ODS-A 50 μm	0,3	8 / 3,9	100	-***

* Marcherey-Nagel

** Peaks verformt und zur Auswertung der NTU_i nicht geeignet, w zu hoch für inhomogene Packung

*** keine ausreichende Auflösung der Peaks ($R < 1,5$)

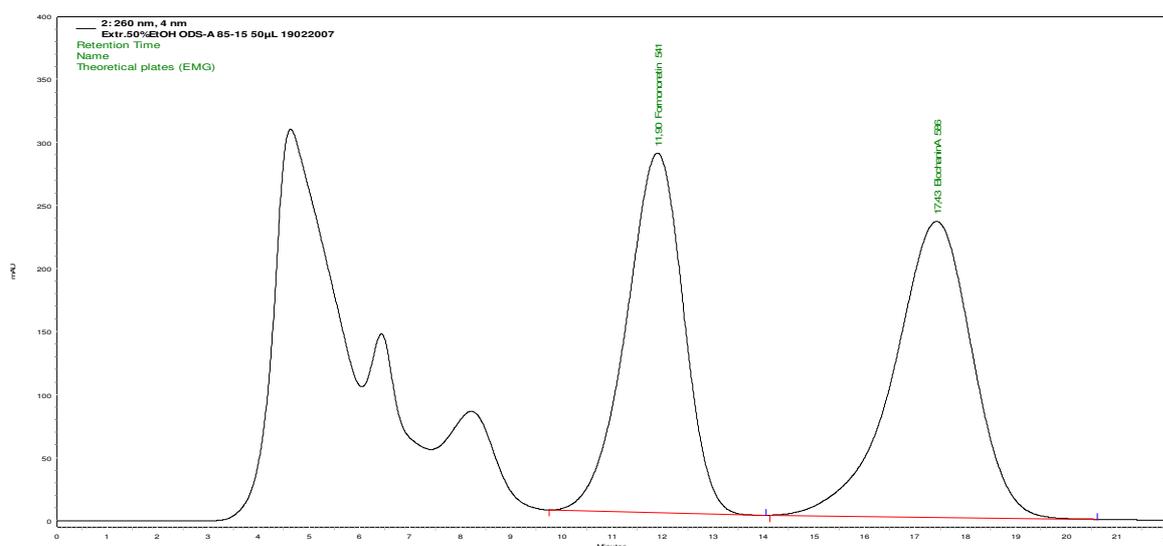


Abb. 116: Chromatogramm, Scout-Säule 6,5 * 300 mm, ODS-A, 120 Å, 50 μm , Laufmittel: Wasser / Ethanol (15/85,v/v), Volumenstrom: 1,3 mL/min, Druck: 35 bar, Temperatur: 40 °C, 50 μL Injektionsvolumen

Das Material YMC, ODS-A 50 µm hat im Hochdruckbereich mit 15 Minuten die kürzeste Chargenlaufzeit, arbeitet mit einem geringen Ethanolanteil im Laufmittel (sparsam) und weist mit 11.000 Trennstufen/m für Formononetin und 13.000 Trennstufen/m für Biochanin A hohe Trennstufenzahlen auf und wird somit zur weiteren Untersuchung von Polyphenolen aus Weintresterextrakten eingesetzt. Details zum Rohstoff Rotklee sind im Kapitel 5.3.2 gegeben.

Zur Entwicklung der präparativen Chromatographie zur Isolierung von Polyphenolen aus Weintresterextrakten wurden zunächst die Parameter Eluentenzusammensetzung und Fließgeschwindigkeit (Eluentenvolumenstrom) mit Standards (Std 1-29, 10 ppm) ermittelt und anschließend Rohextrakte sowie Permeate und Retentate aus den Fraktionen der Filtrationen mit keramischen und organischen Membranen untersucht. Bereits aus der Entwicklung der analytischen Chromatographie und der Literatur (präparative HCCC (DELAUNAY 2002)) war bekannt, dass eine vollständige Auftrennung aller Polyphenole präparativ mit isokratischer Elution auch mit mehreren Stufen schwer möglich ist, was sich während der Entwicklung bestätigen sollte. So ist eine ein- oder mehrstufige, isokratische Elution nicht geeignet zur Isolierung von Polyphenolen aus Weintresterextrakten. In Anlehnung an die Analytik wurde ein Gradientenprogramm entwickelt, welches die 29 Standards aus der Analytik möglichst gut trennt, wobei eine Basislinientrennung mit Ethanol als Laufmittel trotz Erhöhung der Trennstufenzahlen durch Einsatz einer zweiten, seriell geschalteten 200 mm Säule ($\Sigma=500$ mm) nicht erreicht werden konnte (Tab. 35, Abb. 117).

Tab. 35: Gradientenprogramm zur präparativen Isolierung von Polyphenolen aus Weintresterextrakten, 0,6 mL/min, 30 °C, 50 µL Aufgabevol., 500 mm Säule ODS-A 50µm

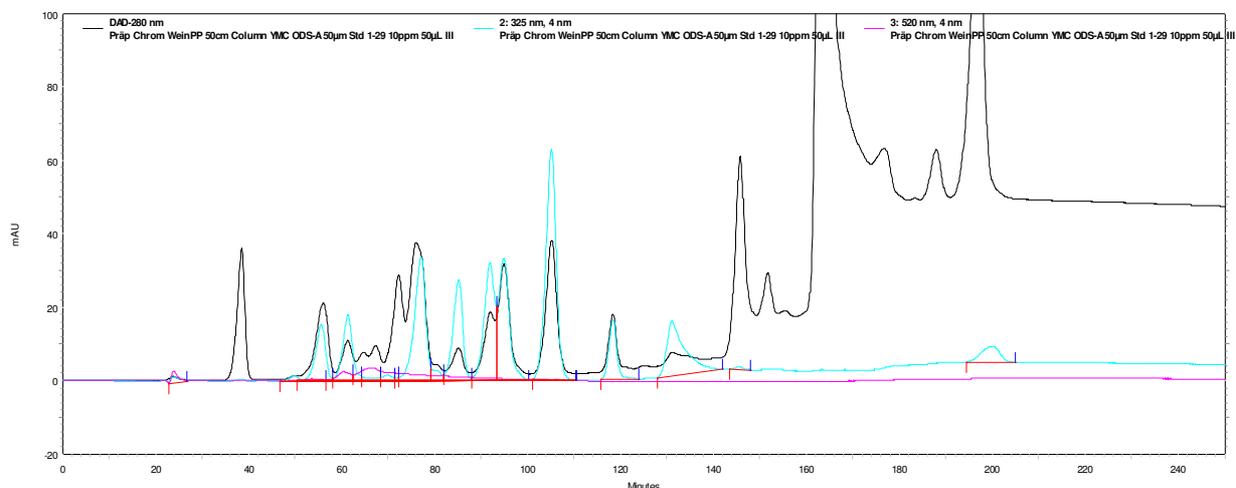
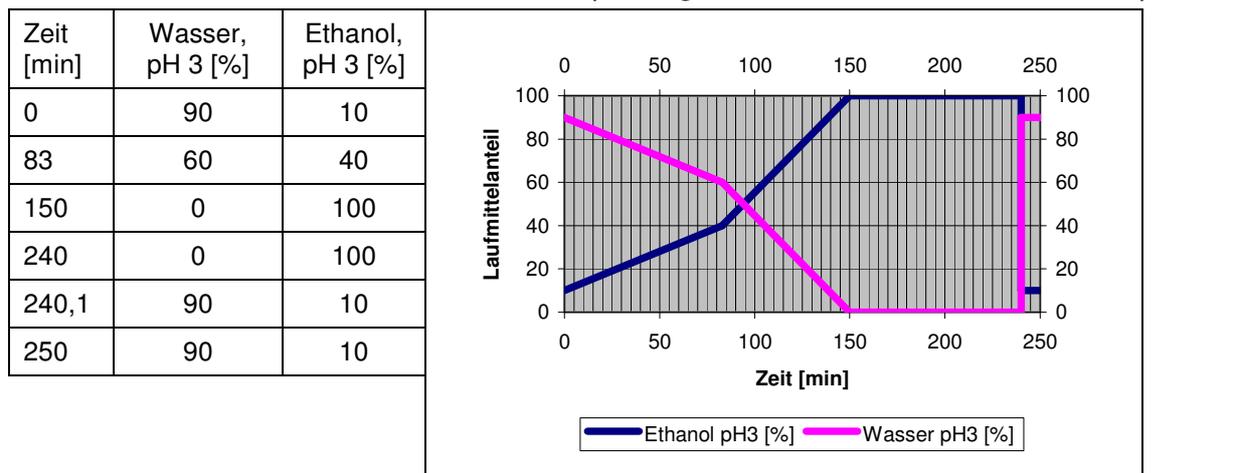


Abb. 117: Chromatogramme aus der präparativen Trennung von Polyphenolen (Std 1-29) (Injektionsvolumen 50 µL, Temperatur 30 °C, Volumenstrom 0,6 mL/min, resultierende Drücke 50-80 bar, Detektion bei 280, 325 und 520 nm)

Anschließend wurden semi-präparative Isolierungen der Rohextrakte (Feeds), Permeate und Retentate verschiedener Membranfiltrationen durchgeführt. Ausgesuchte Chromatogramme sind in Abb. 118 dargestellt und anschließend diskutiert.

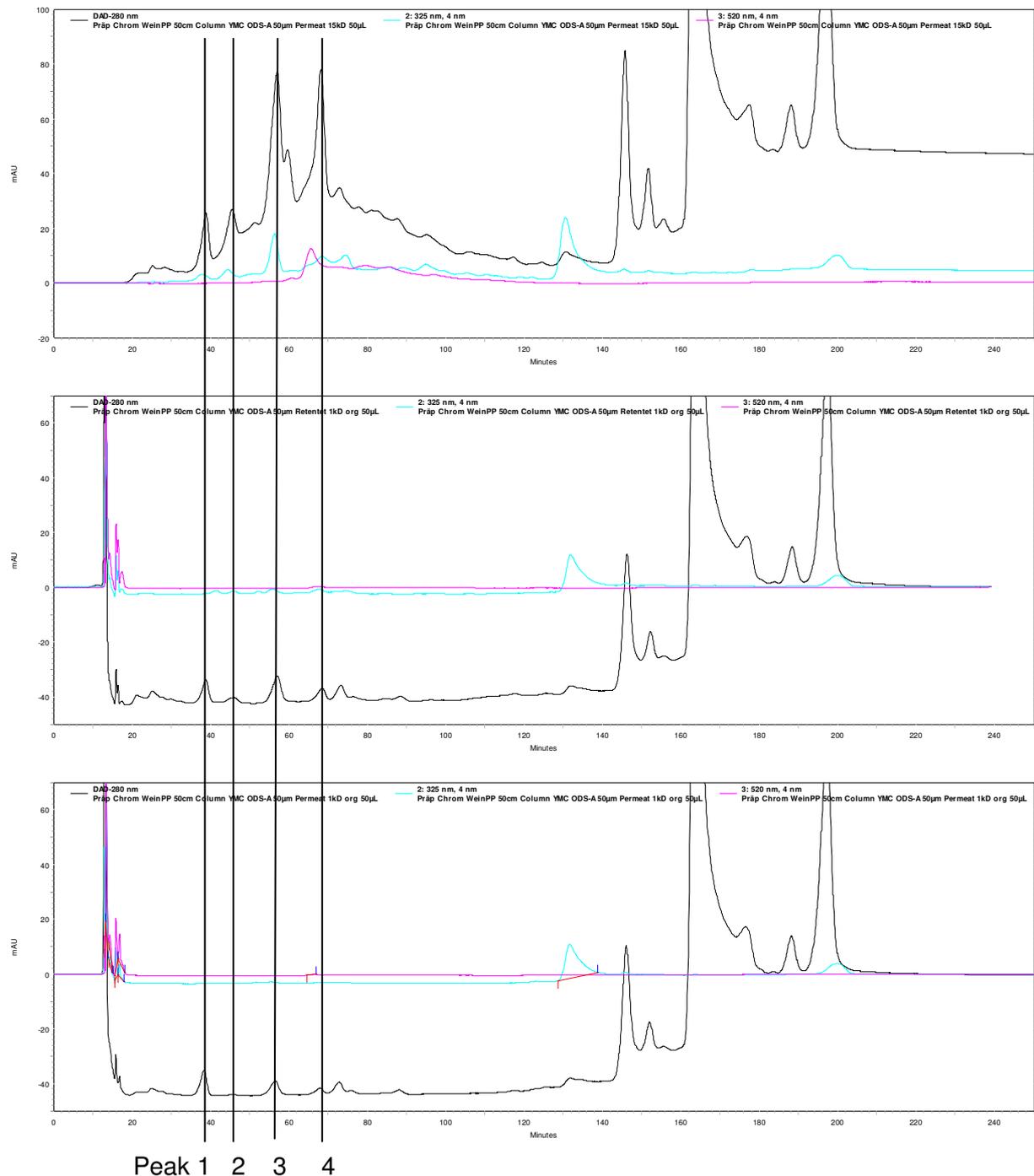


Abb. 118: Chromatogramme der präparativen Trennung von Einzelpolyphenolen membranfiltrierter Extrakte und Rohextrakte aus Blaufränkisch-Weintrester (Injektionsvolumen 50 μ L, Temperatur 30 $^{\circ}$ C, Volumenstrom 0,6 mL/min, resultierende Drücke 50-80 bar, Detektion bei 280, 325 und 520 nm)

Wie in Abb. 118 im ersten Chromatogramm eines Permeats einer keramischen 15 kDa Membran mit nahezu keiner Rückhaltung der Polyphenole und damit lediglich einer Abtrennung sehr großer Moleküle ersichtlich, ist eine präparative Isolierung einzelner Polyphenole aus Rohextrakten nicht möglich. Die Peaks unterschiedlicher Komponenten überlagern sich in allen drei Wellenlängenbereichen stark. Im zweiten Chromatogramm hingegen, welches das Retentat einer PES-Membran mit 1 kDa NMWC darstellt, sind die

Peaks 1, 2, 3 und 4 mit einer Basislinientrennung bei 280 und 325 nm möglich. Auch sind keine Peaks der roten Anthocyane und Anthocyanidine bei 520 nm enthalten. Weiter zeigt das Permeat der gleichen 1 kDa Membran, dass Peak 2 nahezu vollständig zurückgehalten wurde, wohingegen die Peaks 1, 3 und 4 nur sehr geringe Rückhaltungen aufweisen.

Obwohl weitere Untersuchungen erforderlich sind (die allerdings den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würden), zeigen die Membranversuche (Selektivitätseigenschaften) und insbesondere die in Abb. 118 dargestellten Ergebnisse, dass ein Hybridverfahren Nanofiltration/Chromatographie geeignet und vorteilhaft sein kann, um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im präparativen (industriellen) Maßstab zu isolieren bzw. zu gewinnen.

5.2 Apfeltrester

5.2.1 Extraktion und Enzymierungsversuche

Wie auch die Ergebnisse der Extraktionen der Weintrester, werden die Ergebnisse der Extraktionen der Apfeltrester mittels antioxidativer Kapazität (TEAC-Methode) und Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) dargestellt. In Abb. 119 ist zu sehen, dass eine 66 Vol%ige ethanolische Extraktion mit 3,5 gGAE/kgTM den höchste Gesamtpolyphenolgehalt und eine 66 bis 100 Vol%ige ethanolische Extraktion mit etwa 6,9 mmolTrolox/kgTM die höchste antioxidative Kapazität nach der ersten Extraktion ohne Enzymierungsschritt erzielt.

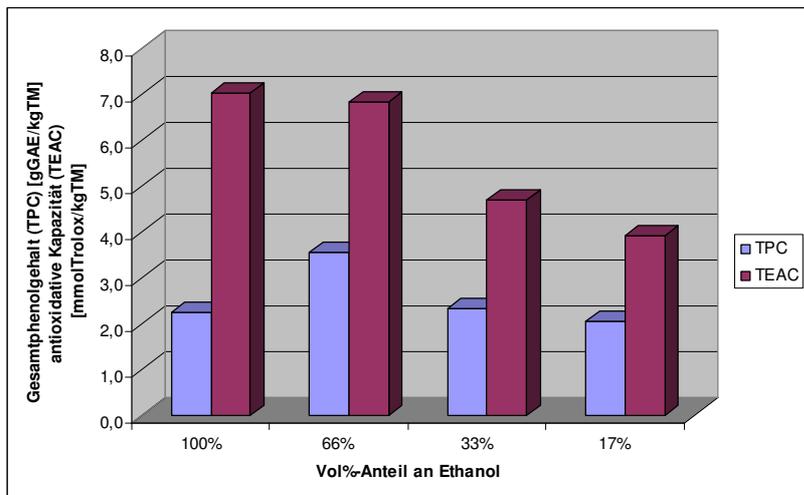


Abb. 119: Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität von Apfeltresterextrakten mit verschiedenen Anteilen an Ethanol im Extraktionsmittel

Neben Ethanol, wurden auch Methanol und Aceton als mögliche Extraktionsmittel untersucht und die Ergebnisse in Abb. 120 dargestellt. Wie auch bei den Betrachtungen zur Lebensmittelechtheit des Extraktionsmittels und des Explosionsschutzes bei Weintresterextrakten, wurde für den Technikums-Maßstab zur Apfeltrester-Extraktion ein Anteil von 20 Vol% Ethanol und eine Extraktionstemperatur von maximal 50 °C festgelegt.

Zu den Fragen der Ausbeuteerhöhung durch Mehrfachextraktionen und der enzymatischen Aufschlüsse sowie der erforderlichen Extraktionsmittelmenge, wurden ähnliche Ergebnisse, wie beim Weintrester erwartet und sind mit den Ergebnissen aus Abb. 121 bis 123 bestätigt. Somit wurde für den Technikumsmaßstab ebenfalls eine Zweifachextraktion mit je 80 L Extraktionsmittel auf 20 kg Apfeltrester ohne enzymatischen Aufschluss festgelegt.

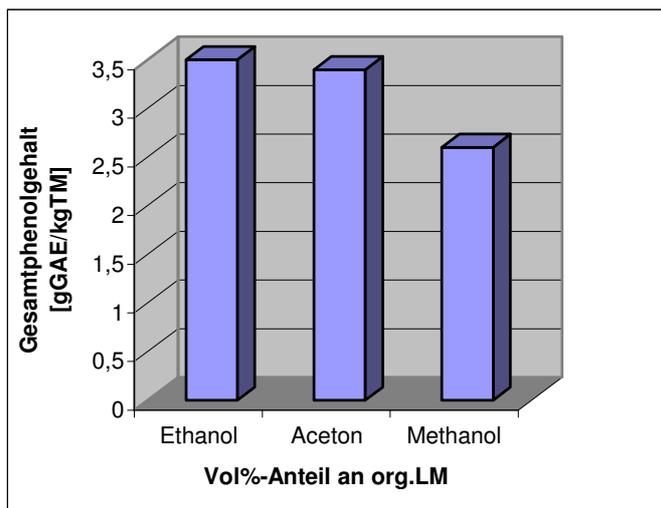


Abb. 120: Gesamtphenolgehalt von Apfeltresterextrakten mit verschiedenen org. Lösungsmitteln und 66 Vol% org. Lösungsmittel-Anteil im Extraktionsmittel

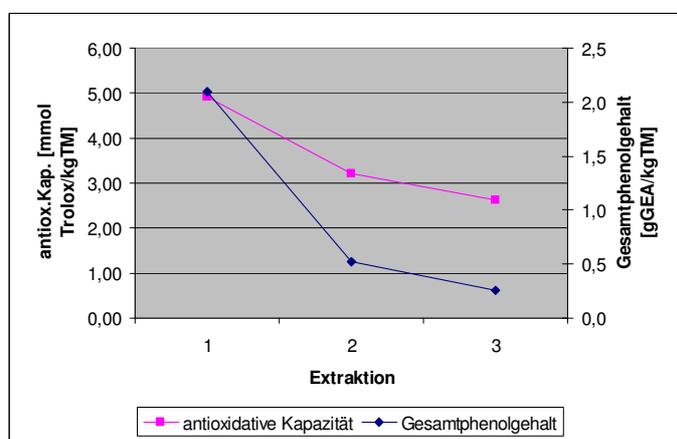


Abb. 121: Ausbeuteerhöhung durch zweite und dritte Extraktion des Apfeltrester-Raffinats der ersten Extraktion

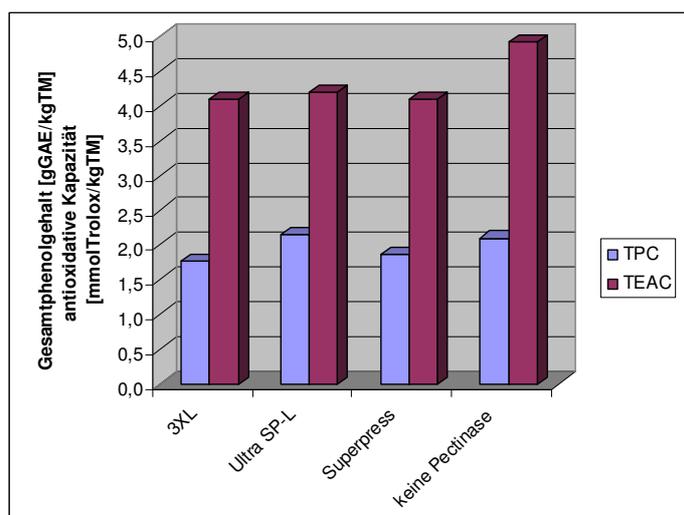


Abb. 122: Ergebnisse enzymatischer Aufschlüsse von Apfeltrester vor der Extraktion

Beim Vergleich der beiden untersuchten Apfeltrester mittels Gesamtphenolgehalt und antioxidativer Kapazität, schnitt der Boskopapfeltrester geringfügig besser ab als der Tafelapfeltrester. Insgesamt lässt sich sagen, dass Apfeltrester eine wesentlich geringere Ausbeute, als Weintrester aufweist, was möglicherweise mit dem großen Volumen/Schale-

Verhältnis der Äpfel im Vergleich zu Weintrauben begründet werden könnte. Ein direkter Vergleich ist in Kapitel 5.3.3 auch zu anderen Byproducts gezogen.

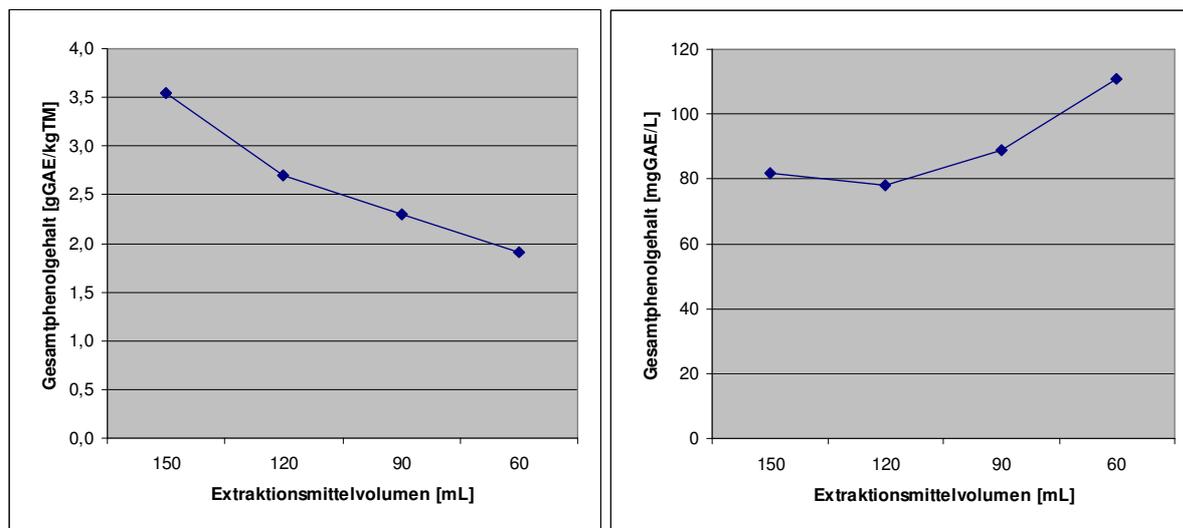


Abb. 123: Konzentrations- und Ausbeute-Diagramm bei Einsatz unterschiedlicher Extraktionsmittelvolumina, Apfeltrester

Ergebnisse der Extraktionen im Technikums-Maßstab:

Ergebnisse der Ausbeuten der Technikums-Extraktionen von Mischapfeltrester mit Anteilen von 1:1 (Boskop:Tafelapfel) sowie Nachweis der Reproduzierbarkeit:

Extrakt 1 22.10.2007: (26,75 ± 0,38) mgGAE/L, (0,274 ± 0,009) mmolTrolox/L

Extrakt 2 22.10.2007: (5,67 ± 0,01) mgGAE/L, (0,194 ± 0,002) mmolTrolox/L

Mischextrakt 22.02.2007: (13,99 ± 0,20) mgGAE/L, (0,209 ± 0,009) mmolTrolox/L
 \triangleq (0,485 ± 0,007) gGAE/kgTM, (7,24 ± 0,31) mmolTrolox/kgTM

Mischextrakt 12.11.2007: (14,28 ± 0,48) mgGAE/L, (0,245 ± 0,003) mmolTrolox/L
 \triangleq (0,295 ± 0,017) gGAE/kgTM, (8,48 ± 0,10) mmolTrolox/kgTM

Die Bestimmung der Einzelpolyphenole erwies sich bei den niedrigen Konzentrationen als schwierig. Lediglich zwei Polyphenole konnten eindeutig zugeordnet werden, selbst Quercetine (Quercetin und Quercetin-3-O-Glu) konnten nicht identifiziert werden, da die erhaltenen Peaks unter den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen. Eine Aufkonzentrierung mittels Membranfiltration mit einem NMWC von z. B. 200 Da könnte möglicherweise Abhilfe schaffen.

Die Trockenmassen, auf die die Ausbeuten bezogen wurden, sind in Tab. 36 aufgeführt. Zur weiteren Charakterisierung der Rohstoffe sind ebenfalls die Glührückstände aufgeführt.

Tab. 36: Trockenmasse und Glührückstände der Apfeltrester

Byproduct	Trockenmasse [%TM]	Mittlerer Fehler des Mittelwerts [%TM]	Trockenmasse [g/kg]
Tafelapfeltrester	21,52	0,28	4,20
Boskopapfeltrester	24,67	0,33	3,58
Mischapfeltrester	23,10*	0,43	3,89*

*rechnerisch

5.2.2 Membranversuche

5.2.2.1 Permeatflüsse anorganischer Membranen

Die Apfeltresterextrakte wurden mit keramischen Membranen mit Ausschlussgrenzen von 1, 3, 5, 8 und 15 kDa NMWC und einer Überströmgeschwindigkeit von 6 m/s untersucht. Weiter wurden drei Extrakte mit unterschiedlichen Klärgraden (1,0 %Vol abschleuderbare Anteile aus schlechtem Dekanterlauf, 0,5 %Vol aus gutem Dekanterlauf und mit Tellerseparator SA1 von Westfalia Separator poliertes Extrakt) mit ebenfalls 6 m/s und darüber hinaus das „polierte“ Extrakt mit zwei weiteren Überströmgeschwindigkeiten von 3 und 4,5 m/s mit der 5 kDa Membran untersucht. Die Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme sind in den Abb. 124 und 125 dargestellt. Wie auch beim Weintrester diskutiert, weisen die 8 und 15 kDa Membranen chargenbedingt unerwartet niedrige Wasserwerte und letztendlich auch Permeatflüsse der Apfeltresterextrakte auf, so dass diese zum Vergleich in eigenen Diagrammen dargestellt sind.

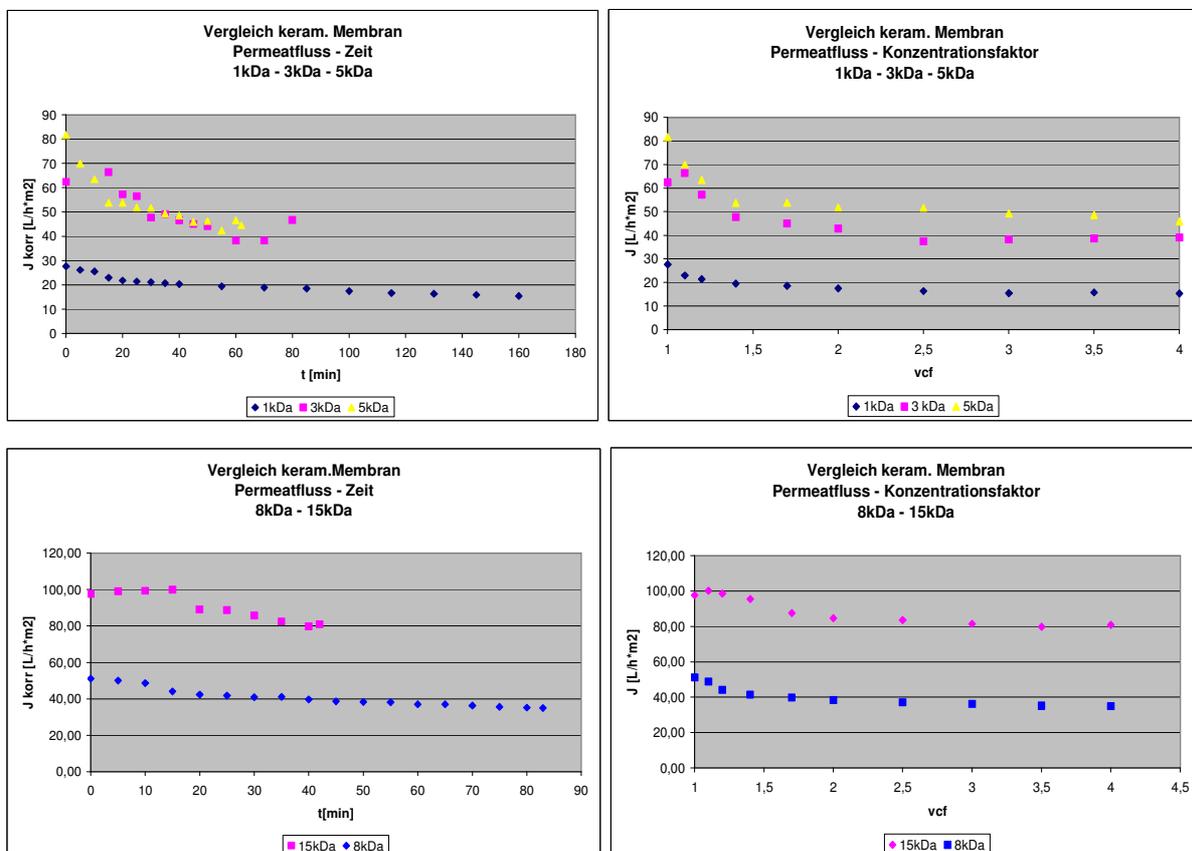


Abb. 124: Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme der Filtrationen von Apfeltresterextrakten mit keramischen Membranen mit 1, 3, 5, 8 und 15 kDa NMWC bei 6 m/s (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, Bezugstemperatur $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Beim Vergleich der Diagramme in Abb. 124 ist zu sehen, dass der Permeatfluss mit kleineren NMWCs erwartungsgemäß sinkt. Nicht ganz so deutlich wie beim Weintrester, zeigt sich das beim Vergleich der 3 und 5 kDa Membranen. Insgesamt betrachtet, liegen die Flüsse beim Apfeltrester etwas höher als beim Weintrester, so dass die 5 kDa Membran, die besonders viel zum Einsatz gekommen ist, bereits nach kurzfristigem Gebrauch Adsorptionseffekte zeigt. Trotz intensiver Reinigung mit 10 % technischer KOH bei 50 °C über mehrere Stunden ist eine Reduktion der Flüsse zu beobachten.

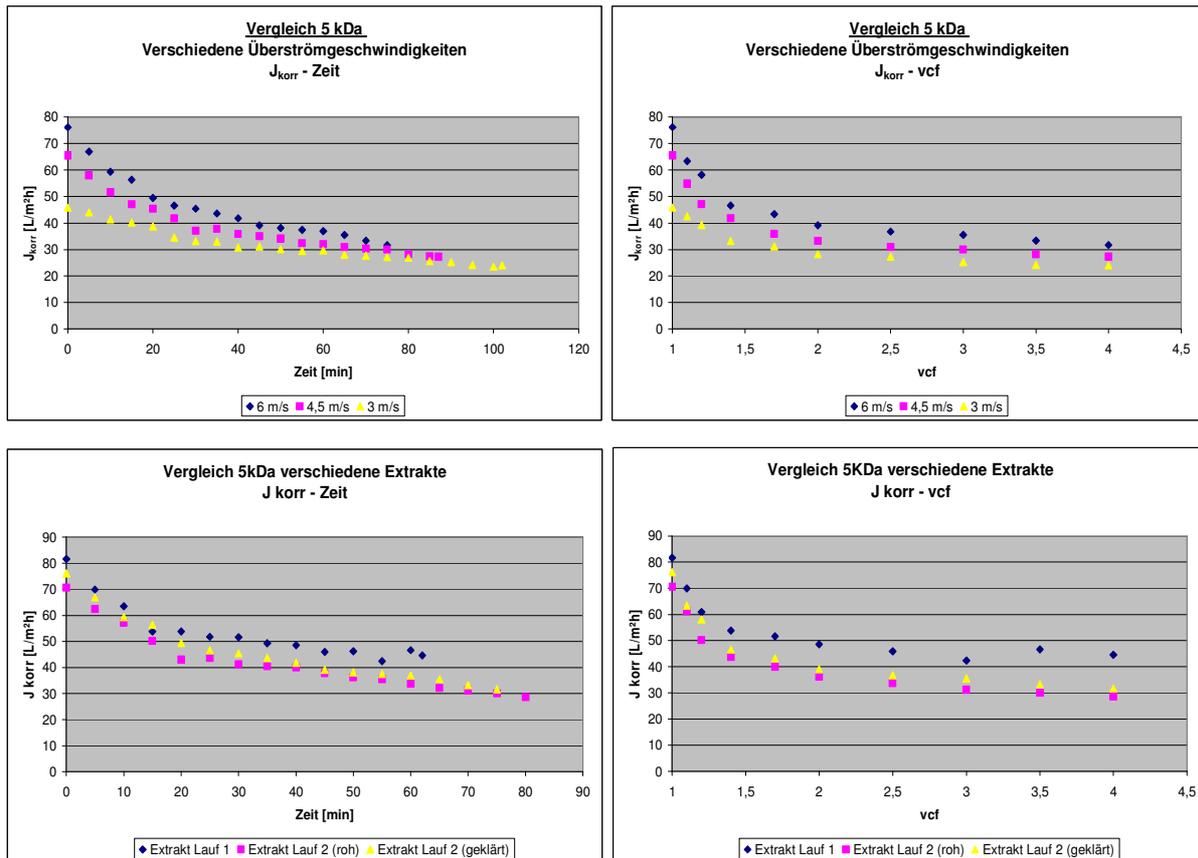


Abb. 125: Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme der Filtrationen von Apfeltresterextrakten mit keramischer 5 kDa Membran bei 3, 4,5 und 6 m/s sowie mit unterschiedlichen Klärgraden der Extrakte bei 6 m/s (mittlerer transmembraner Druck $p_{transm}=3,25$ bar, Bezugstemperatur $T_{Bezug}=30$ °C)

Weiter ist in Abb. 125 mit Übereinstimmung zu den Weintresterergebnissen in den oberen Diagrammen zu sehen, dass höhere Überströmgeschwindigkeiten kleinere Grenzschichten erzeugen und damit höhere Flüsse resultieren. Die Datenpunkte der Extrakte mit unterschiedlichen Klärgraden der unteren Diagramme in Abb. 125 liegen dicht beieinander, so dass der Einfluss des Klärgrades zumindest in Bezug zum Permeatfluss gering zu sein scheint. Der etwas höhere Fluss des Extraktes „Lauf 1“ könnte mit einem etwas höheren mittleren transmembranen Druck zu erklären sein, der schwer mittels der analogen Manometer einzustellen ist und nachgewiesener Maßen einen starken Einfluss hat.

5.2.2.2 Permeatflüsse organischer Membranen

Auch hier wurde die Vorreinigung zur Vermeidung von Verblockungen von Spiral- und Plattenmodulen mit einem Hohlfasermodule ($0,2 \mu m$) vorgenommen und eine Aufkonzentrierung um den Faktor $VCF=10$ erreicht. Nach einer Filtrationszeit von 200 min sind im Zeit/Permeatfluss-Diagramm deutlich die Effekte der Konzentrationspolarisation am Abfall des Flusses zu sehen (Abb. 126).

Anschließend wurde das Permeat über eine nach Abb. 80 beschriebenen Membranfiltrations-Kaskade in der 1.600 mL Rührzelle filtriert, wobei jeweils das Permeat der Membran mit größerem NMWC als Feed der folgenden, kleineren Membran diente. Aufgezeichnet wurden dabei die Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme (Abb. 127). Wie bei den Weintresterextrakten bereits erwähnt, wurde mit unterschiedlichen transmembranen Drücken gearbeitet, so dass die Permeatflüsse nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Dennoch ist zu sehen, dass der erforderliche transmembrane Druck der dichten organischen Membranen erheblich größer ist, als der der anorganischen Membranen. Besonders auffällig ist die

Abnahme des Flusses und damit die Dauer der Filtration zum Erreichen des VCF von 4 der 10 kDa-Membran im Vergleich zu den relativ hohen Flüssen der übrigen nachgeschalteten Membranen. Zu vermuten ist, dass die bei Filtrationen häufig störenden Pektinstoffe, die gerade in Apfeltrestern hohe Gehalte aufweisen, durch die 10 kDa-Membran überwiegend zurückgehalten werden und die weiteren Filtrationen weniger stark blockieren und entsprechend höhere Flüsse resultieren. Weiter ist zu sehen, dass im Verlauf der Filtration der 200 Da-Membran Konzentrationspolarisationseffekte besonders stark zum Tragen kommen.

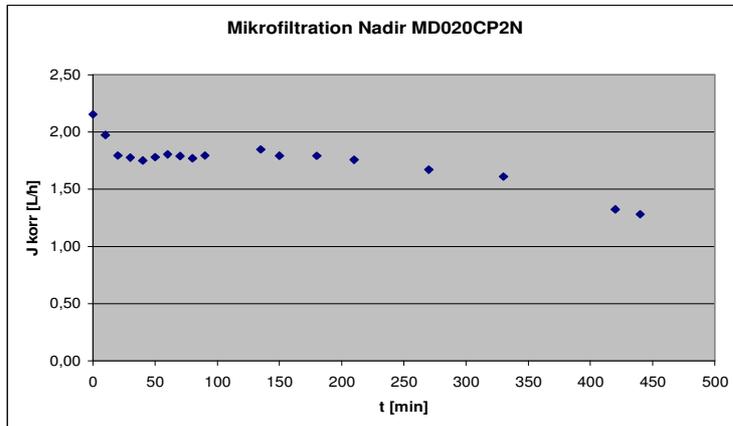


Abb. 126: Permeat/Zeit-Diagramm der Vorreinigung von Apfeltresterextrakt mittels MF-Hohlfaser-Modul MD020 CP2N von Microdyn Nadir 0,2 μm ($p_{\text{transm}}=0,5$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

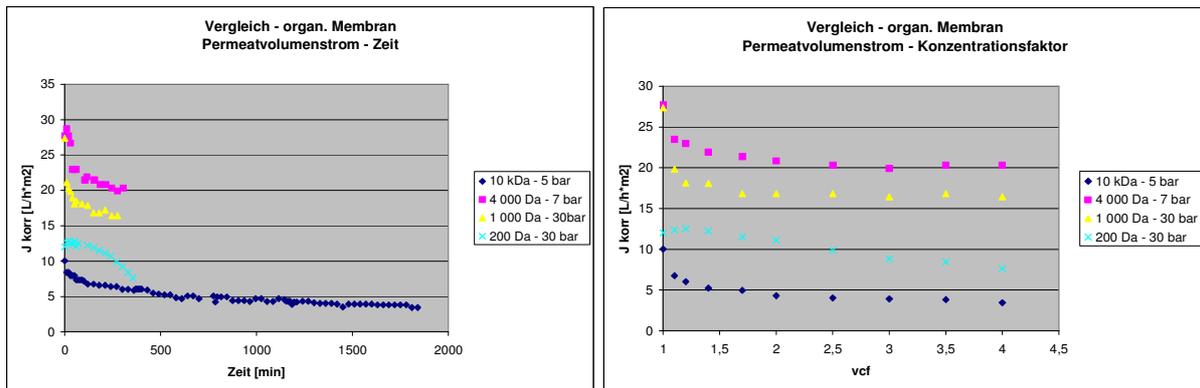


Abb. 127: Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme der Filtrationen von Apfeltresterextrakten mit PES-Membranen mit 10, 4, 1 und 0,2 kDa NMWC bei 500 U/min Rührerdrehzahl ($p_{\text{transm}}=5, 7, 30$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

5.2.2.3 Rückhaltungen anorganischer Membranen

Wie zu erwarten war, sinken die Rückhaltungen der keramischen Membranen mit größeren NMWCs, was am Beispiel des Gesamtphenolgehalts (TPC) in Abb. 128 zu sehen ist. Eine Ausnahme stellt die 15 kDa-Membran dar, deren Rückhaltung im Vergleich zur 8 kDa-Membran etwas größer ausfällt. Hier kann davon ausgegangen werden, dass ein starker Einfluss der Foulingsschicht (Sekundärmembran) vorliegt, welche sich auf poröseren Oberflächen stärker ausbilden, als auf relativ glatten Oberflächen. Der Einfluss unterschiedlich starker Foulingsschichten auf die Filtration ist nochmals in Abb. 129 verdeutlicht, in der die Rückhaltungen unterschiedlich geklärter Extrakte an der 5 kDa-Membran verglichen sind. Dabei weist das zusätzlich mit einem Tellerseparator geklärte Extrakt (Lauf 2) sehr viel niedrigere Rückhaltungen auf, als die beiden direkt aus dem Dekanter (ohne eine zusätzliche Klärung) eingesetzten Extrakte, was sich beim Vergleich der unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten in Abb. 130 wiederholt bestätigt.

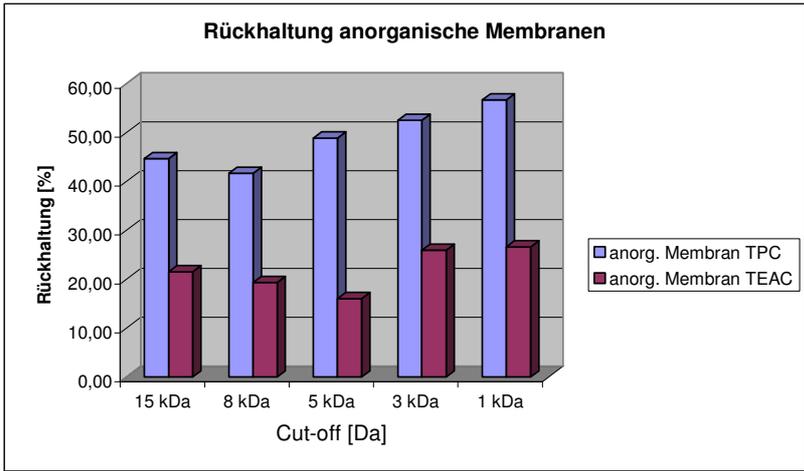


Abb. 128: Vergleich der Rückhaltung der Keramikmembranen 1, 3, 5, 8 und 15 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) und antioxidativen Kapazität (TEAC-Methode) ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

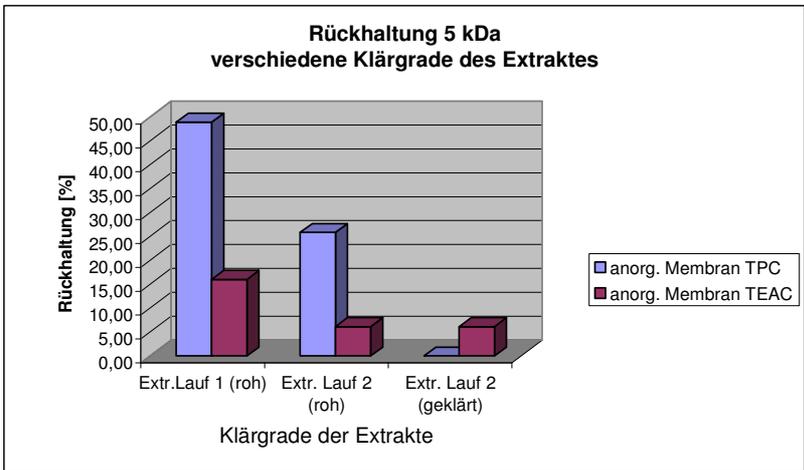


Abb. 129: Vergleich der Rückhaltungen der 5 kDa Keramikmembran mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) und antioxidativen Kapazität (TEAC-Methode) unterschiedlich geklärter Apfeltresterextrakte (Lauf 1_(roh) = 1,0 % abschleuderbare Anteile, Lauf 2_(roh) = 0,5 %, Lauf 2_(geklärt) < 0,1%) ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

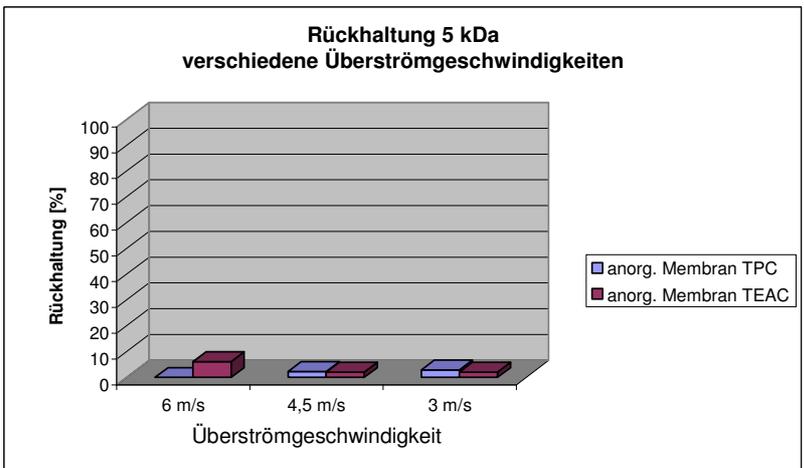


Abb. 130: Vergleich der Rückhaltungen der 5 kDa Keramikmembran mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) und antioxidativen Kapazität (TEAC-Methode) von polierten Apfeltresterextrakten mit unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Weiter ist zu berücksichtigen, dass der Gesamtphenolgehalt und die antioxidative Kapazität lediglich Summenparameter darstellen und damit nicht nur Flavonoide, Stilbene und Phenolcarbonsäuren erfasst werden, sondern auch sehr große Hydroxylgruppen-tragende Moleküle, wie beispielsweise Pektinstoffe.

Zur Auswertung der Rückhaltungen der organischen Säuren und Zucker war zunächst die Apfelsäurekonzentration über das UV-Chromatogramm aus dem Glucose-Apfelsäure-Peak des RI-Chromatogramms zu korrigieren. Die Resultate der Rückhaltungen sind in Abb. 131 dargestellt. Insgesamt ist eine geringe Rückhaltungen der organischen Säuren und Zucker zu verzeichnen. Eine Ausnahme der untersuchten Inhaltsstoffe, stellt beim Betrachten der Ergebnisse der Apfeltrester das Glycerin dar, welches mit > 60 % relativ stark von den Membranen mit 3 und 1 kDa NMWC zurückgehalten wird, was bei der Untersuchung von Weintresterextrakten nicht der Fall ist. Zu vermuten ist, dass Glycerin stark von den in Apfeltrester viel enthaltenen Pektinstoffen adsorbiert und mit diesen dann zurückgehalten wird oder Messungenauigkeiten der Analytik aufgetreten sind. Angemerkt sei, dass generell Adsorptionen im Zusammenhang mit Rückhaltungen zu hinterfragen sind.

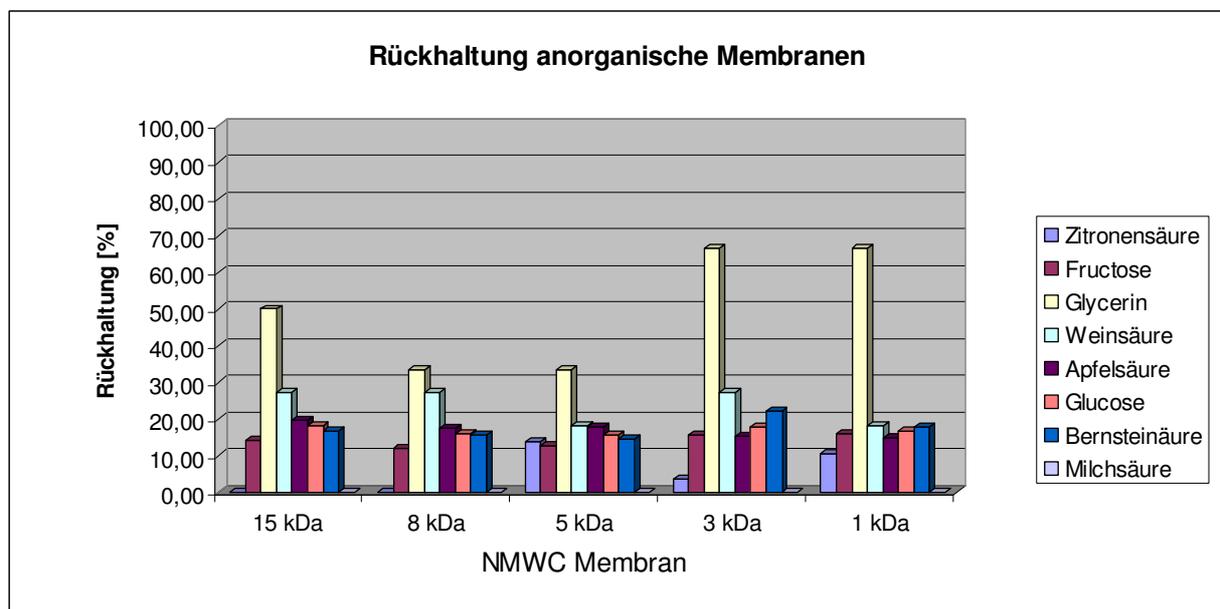


Abb. 131: Rückhaltung der anorganischer Membranen von organischer Säuren und Zuckern aus Apfeltresterextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C, $v=6$ m/s)

Da Ionen erst bei NMWCs im unteren NF-Bereich zurückgehalten werden, ist entsprechend keine Rückhaltung der Ionen an den untersuchten keramischen Membranen aus Apfeltresterextrakten nachzuweisen. In Abb. 132 sind vollständigshalber exemplarisch die Chromatogramme des Permeats, Retentats und Feeds der Filtrationsversuche der 5 kDa-Membran für Kat- und Anionen übereinander gelegt.

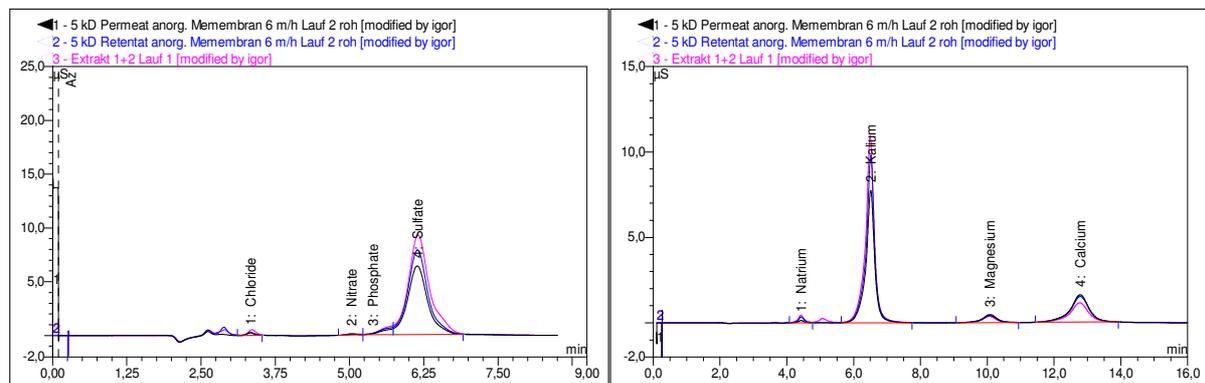


Abb. 132: Chromatogramme zur Rückhaltung einer keramischen 5 kDa-Membran von Anionen und Kationen aus Apfeltresterextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C, $v=6$ m/s)

5.2.2.4 Rückhaltungen organischer Membranen

Zunächst wurde die Rückhaltung der organischen Membranen mittels Gesamtphenolgehalt und antioxidativer Kapazität bestimmt und in Abb. 133 dargestellt. Im Gegensatz zu den Weintrestereextrakten, weist hier die MF-Membran eine relativ große Rückhaltung auf, was mit den zurückgehaltenen gelösten Pektinstoffen (Protopektine) zu begründen wäre. Der weitere Verlauf entspricht den Erwartungen, indem mit kleineren NMWCs die Rückhaltungen an antioxidativ wirkenden Inhaltsstoffen und der Phenole steigen und schließlich eine absolute Rückhaltung >95 % des Gesamtphenolgehalts an der 200 Da-Membran resultiert.

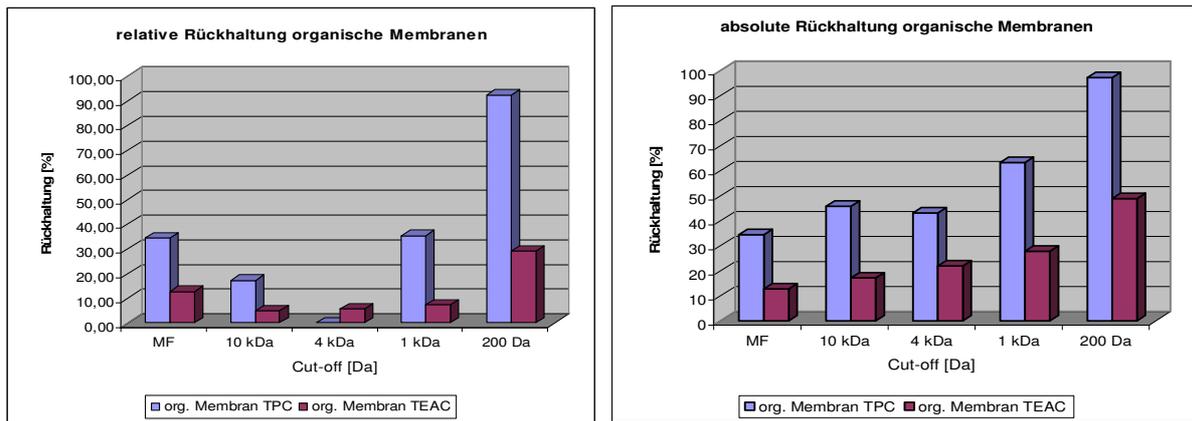


Abb. 133: Relative und absolute Rückhaltung organischer Membranen antioxidativer Inhaltsstoffe und Phenole aus Apfeltrestereextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Diese hohe Rückhaltung ist nochmals in Abb. 134 dargestellt. Die übereinander gelegten Chromatogramme bei 280 nm zeigen die Aufkonzentrierung der Polyphenole im 200 Da-Retentat und die Abreicherung der Polyphenole im 200 Da-Permeat im Vergleich zum Zulauf, der als Permeat aus der vorangegangenen 1 kDa-Filtration stammt.

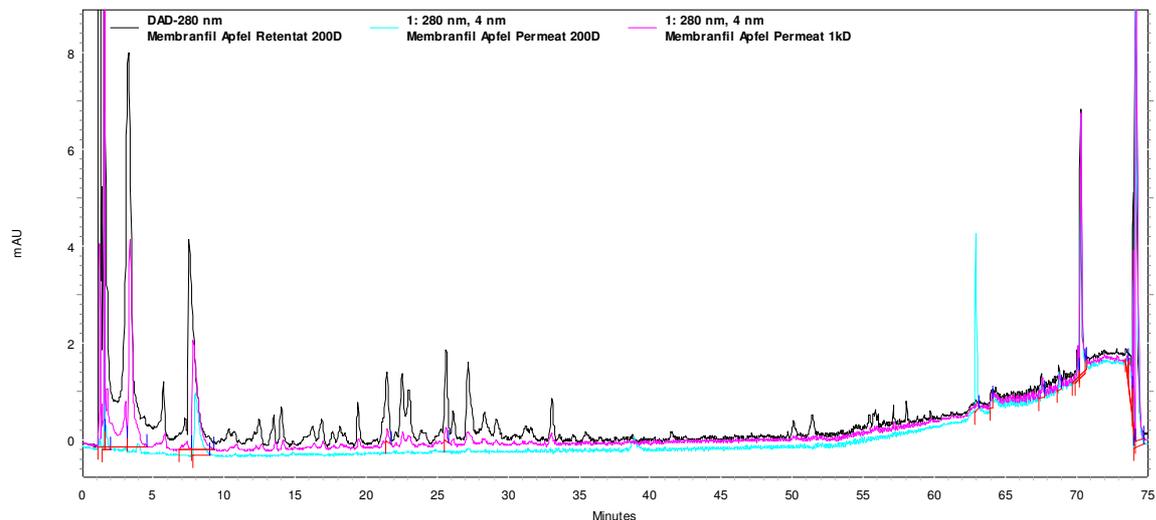


Abb. 134: Analytische Chromatogramme bei 280 nm vom Permeat, Retentat und Feed (Permeat 1 kDa) einer organischen Membran mit NMWC von 200 Da eines Apfeltrestereextrakts ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Die Rückhaltungen der organischen Säuren und Zucker sind in Abb. 135 dargestellt. Stärker, als bei den keramischen Membranen, ist hier ein Trend der Rückhaltungen zu erkennen. Je kleiner die NMWC ist, desto stärker die Rückhaltungen. Für Glycerin gelten die gleichen Betrachtungen, wie bei den keramischen Membranen.

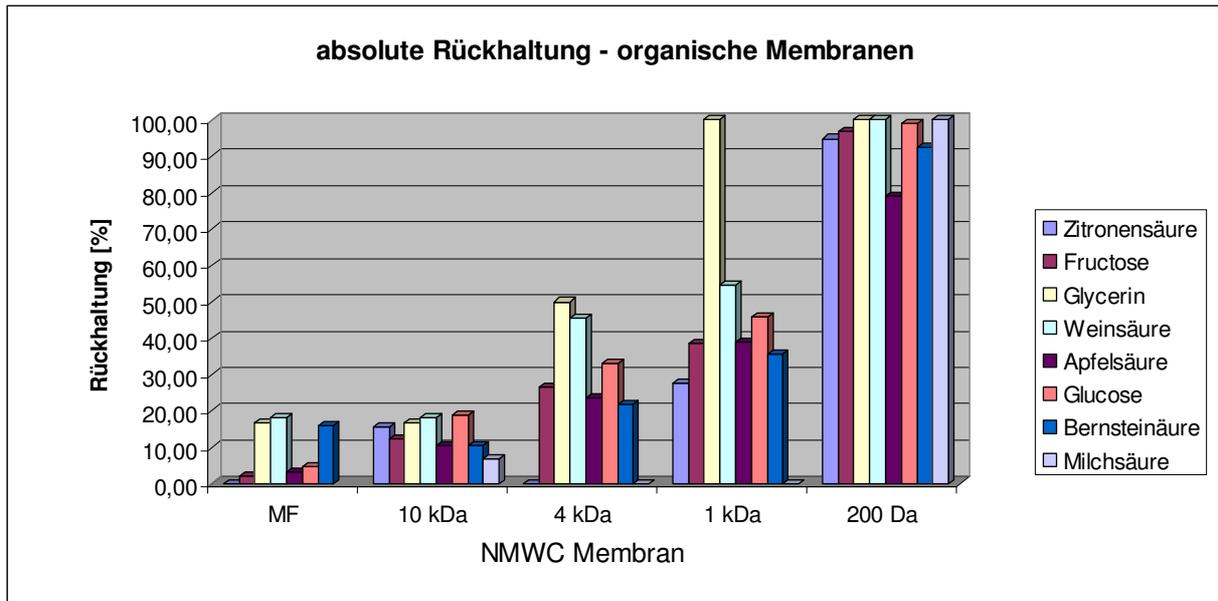


Abb. 135: Rückhaltungen organischer Membranen von organischen Säuren und Zuckern aus Apfeltresterextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Die Rückhaltungen der An- und Kationen sind erwartungsgemäß gering ausgefallen. So ist lediglich eine Darstellung der Rückhaltungen der 200 Da-Membran in Abb. 136 sinnvoll, die als einzige Membran nennenswerte Rückhaltungen aufweist.

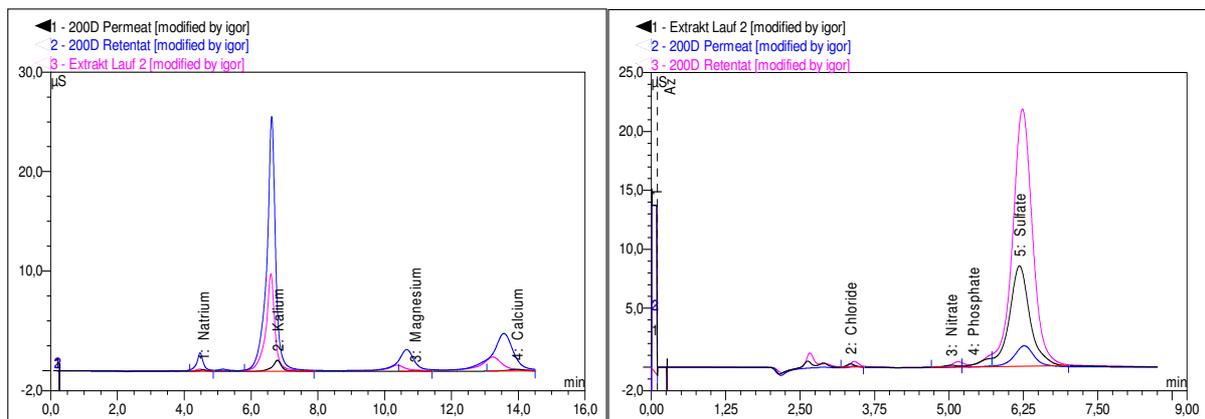


Abb. 136: Chromatogramme zur Rückhaltung von Anionen und Kationen aus Apfeltresterextrakten organischer Membranen

5.3 Allgemeines und Ergebnisse alternativer Byproducts

Zunächst sind allgemeine Informationen zu den jeweiligen alternativen Byproducts gegeben und anschließend Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen präsentiert. Abschließend sind die Gesamtphenolgehalte und die antioxidativen Kapazitäten der Extrakte der Rohstoffe zur Gewinnung sekundärer Inhaltsstoffe verglichen.

5.3.1 Biertreber

Biertreber ist ein Byproduct der Bierherstellung und beinhaltet häufig Reste an Hopfen (*Humulus lupulus* L., Arzneipflanze des Jahres 2007) oder Hopfeninhaltsstoffen, die

gesundheitsfördernde Wirkungen haben. Konkret handelt es sich hierbei um zahlreiche Polyphenole und Bittersäuren, die hohe antioxidative Kapazitäten aufweisen. Von besonderem Interesse ist das Polyphenol Xanthohumol und deren Derivate, die ausschließlich in den Lupulindrüsen des Hopfens vorkommen und in fortlaufenden Untersuchungen vorbeugende Aktivitäten gegen Krebs und Wachstumshemmungen gegenüber bestimmter Tumorzellen zeigen. Weiter wird von einer östrogenen Wirkung des Xanthohumol-Derivats 8-Prenylnaringenin berichtet (STEVEN und PAGE 2004, GERHÄUSER 2005) (Abb. 137).

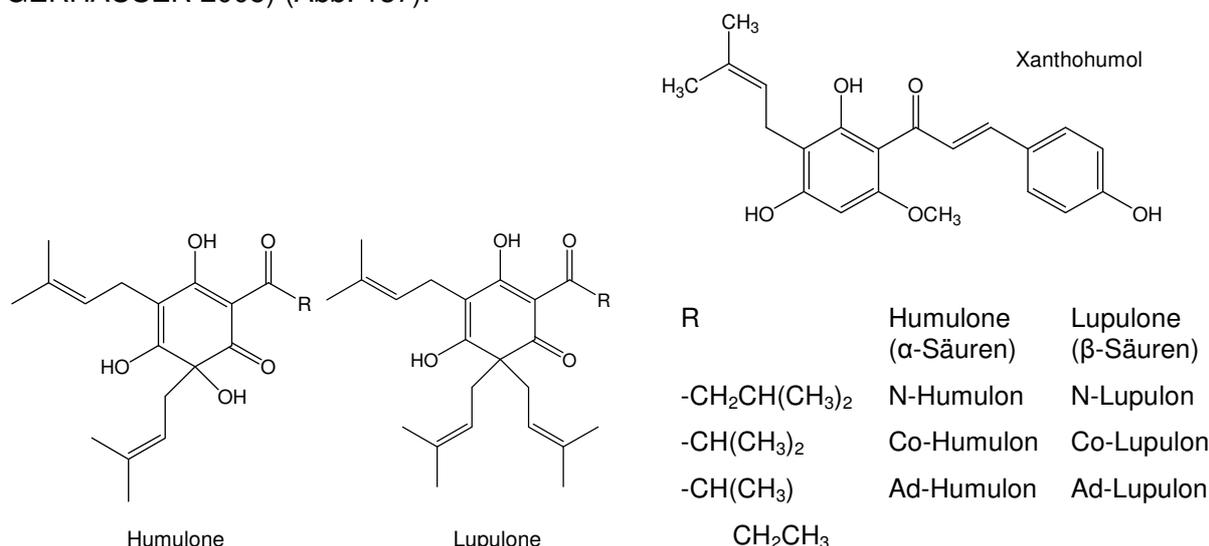


Abb. 137: Strukturen ausgewählter Bittersäuren und Xanthohumol aus Hopfen (KAC und VOVK 2007)

Zur Analytik ausgesuchter Biertreberinhaltsstoffe wurde die für Wein- und Apfeltresterextrakte entwickelte Methode erweitert, so dass das Gradientenprogramm in Tab. 37, die Retentionszeiten und Wellenlängenbereichszuordnungen in Tab. 38 und die in Abb. 136 dargestellten Wellenlängenspektren und Chromatogramme resultieren. Der Säulenofen wurde auf 30 °C temperiert, der Eluentenvolumenstrom auf 2,5 mL/min eingestellt und die Detektion mit einem DAD bei 200 – 400 nm durchgeführt. Als Standards dienen der Humulon- und Lupulon-Standard ICE-2 (Labor Veritas, Schweiz) und Xanthohumol (PhytoLab, Deutschland).

Tab. 37: Gradientenprogramm zur Analytik von phenolischen Inhaltsstoffen und Bittersäuren aus Biertreberextrakten

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	
0,0	100	0	Laufmittel A: 100 %Vol entmineralisiertes Wasser, mit Phosphorsäure auf pH-Wert 2,3 eingestellt (pH-Meter 744 von Metrohm), im Ultraschallbad 15 min entgast
50,0	75	25	
70,0	20	80	
72,0	0	100	Laufmittel B: 100 %Vol Methanol, mit Phosphorsäure auf pH-Wert 2,3 eingestellt, im Ultraschallbad 15 min entgast
82,0	0	100	
82,1	100	0	2,5 mL/min, 30 °C, 50 μ L Injektionsvolumen
85,0	100	0	

Weiter sind in Abb. 138 die Chromatogramme der zwei untersuchten Biertreber „3Kornale-Siebensternbräu“ und „Helles-Ottakringer“ (Chargen Juli 2007) zu sehen. Bei den Peaks mit einer Retentionszeit von 68,8 min, könnte es sich nach FORSTER et al. (2004) um Isoxanthohumol handeln.

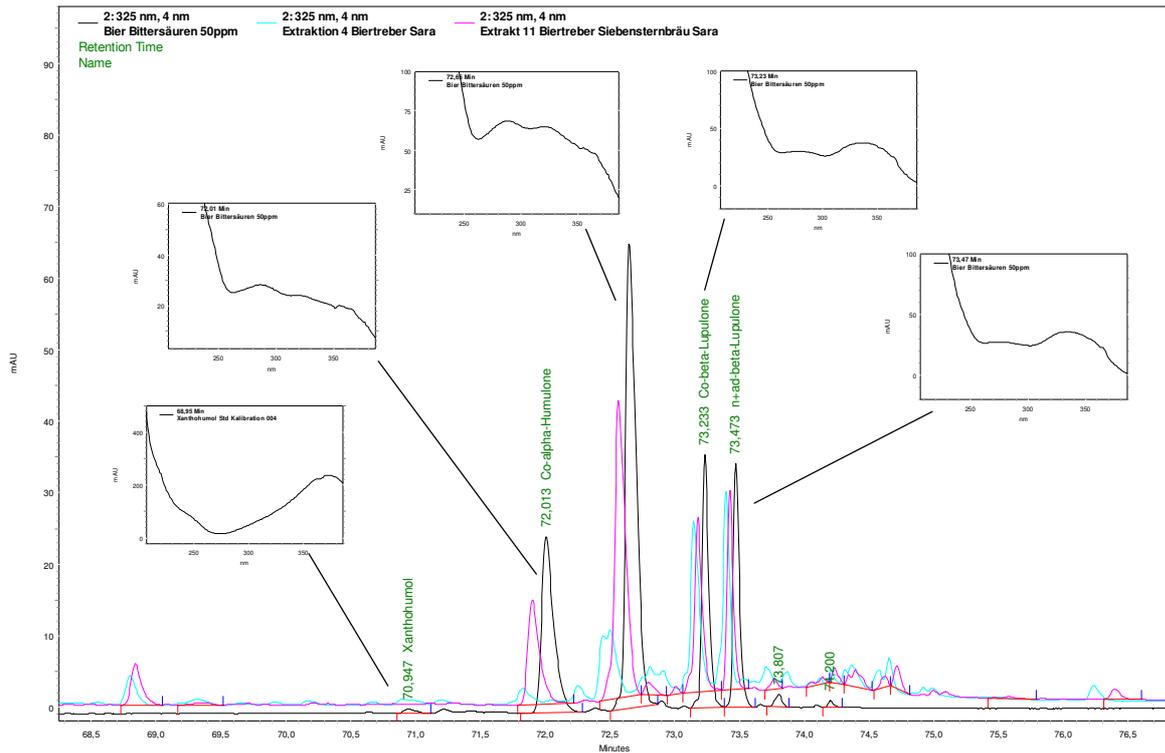


Abb. 138: Chromatogramme der Standards ICE-2 und Xanthohumol sowie ethanolische Extrakte der Biertreber 3Kornale-Siebensternbräu und Helles-Ottakringer sowie Spektren der Standardsubstanzen von 200 – 400 nm

Tab. 38: Detektierte und kalibrierte Substanzen mit Retentionszeiten und max. Wellenlängen

Erweiterung der Wein- und Apfelpolyphenolanalytik für Bierinhaltsstoffe				
Peak	Substanz	Retentionszeit [min]	λ_{\max} des Wellenlänge-Spektrums 200 – 550 nm	detektiert bei [nm]
30	Xanthohumol	68,80	373	325
31	Co-Humulon	72,01	287, 318	325
32	N+Ad-Humulon	72,65	289, 321	325
33	Co-Lupulon	73,24	278, 337	325
34	N+Ad-Lupulon	73,48	275, 334	325

Zur Untersuchung der Inhaltsstoffe von Biertrebern, wurden Extrakte mit unterschiedlichen Anteilen an Ethanol bzw. Aceton und Methanol in einer Extraktionsapparatur mit 250 mL Dreihalskolben, Rückflusskühler, Thermometer, Rührer und temperierbarem Ölbad hergestellt. Es wurde jeweils 15 g frischer Treber mit 150 mL Extraktionsmittel 2 Stunden unter Rückfluss bei etwa 60 °C extrahiert. Das Raffinat wurde über einen 0,45 µm -Filter (regenerierte Cellulose oder Nylon) abgetrennt und das Extrakt bei -30 °C bis zur Analyse tiefgefroren.

Die Ergebnisse der Biertreberextraktionen sind in Abb. 139 dargestellt. Daraus ist zu sehen, dass ein höherer Anteil an organischem Lösungsmittel im Extraktionsmittel zu höheren antioxidativen Kapazitäten und Gesamtphenolgehalten führt. Weiter sind in Tab. 39 die Ergebnisse der Xanthohumol-Bittersäuren-Analytik der 100 %Vol ethanolischen Extrakte der beiden untersuchten Biertreber angegeben.

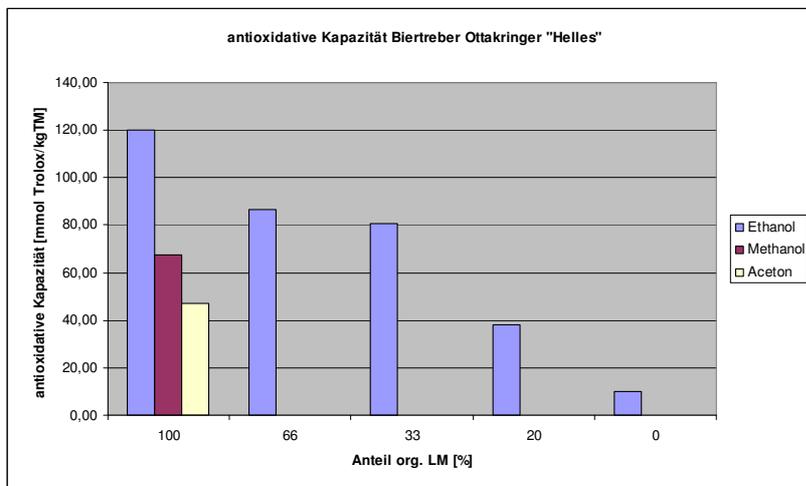
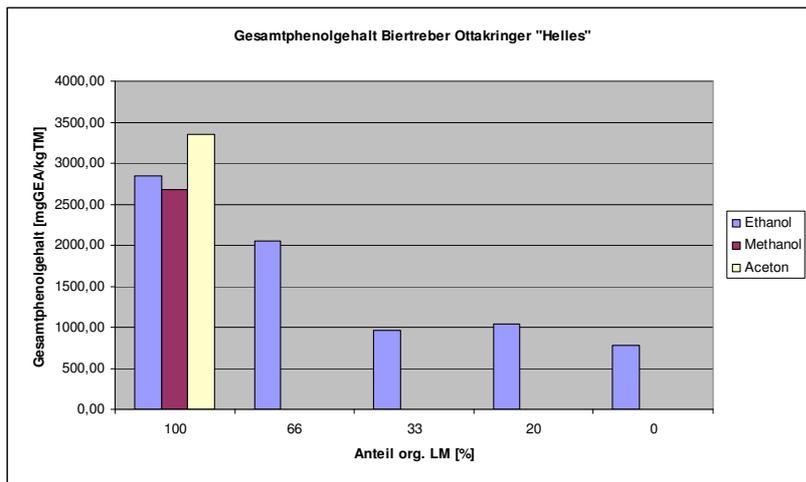


Abb. 139: Ergebnisse der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehalts der Biertreberextrakte aus 3Kornale-Siebensternbräu und Helles-Ottakringer

Tab. 39: Ergebnisse der Xanthohumol-Bittersäuren-Analytik der Biertreberextrakte aus 3Kornale-Siebensternbräu und Helles-Ottakringer

Treber	Polyphenol- und Bittersäuregehalte [mg/kgTM]*				
	Xanthohumol	Co-Humulon	N+Ad-Humulon	Co-Lupulon	N+Ad-Lupulon
HellesOttakr.	30	166	428	1666	1587
3Kornale7Stern	-	1112	1334	1606	1498

* mit 20,24 %TM HellesOttakringer, 20,80 %TM 3Kornale7Stern

5.3.2 Rotklee und Okara

Für Nahrungsergänzungsmittel und Therapeutika menopausaler Beschwerden, gewinnen Phytoöstrogene wie Isoflavone immer mehr an Bedeutung. Diese kommen in hohen Konzentrationen in Rotklee (*Trifolium pratense*) und Sojabohnen (*Glycine max (L.) Mer.*) vor und somit auch im Byproduct Okara (Sojakleie).

Phytoöstrogene werden in nur wenigen Pflanzenfamilien als Produkte des sekundären Metabolismus synthetisiert. Sie sind dem weiblichen Sexualhormon 17 β -Östradiol sterisch sehr ähnlich und wirken daher auch rezeptorvermittelt wie steroidale Östrogene (JUNGBAUER und MEDJAKOVITC 2005). Die Intensität der Wirkung ist zwar um ein Vielfaches geringer, als die der steroidalen Östrogene, jedoch kommen sie nach Verzehr phytoöstrogenhaltiger Pflanzen auch in 10 – 1.000fach höherer Konzentration im Körper vor (WATZL und LEITZMANN 2005). Darüber hinaus, werden Ihnen zahlreiche weitere gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Chemisch zählen sie zu der Gruppe der Polyphenole und werden weiter in Isoflavone, Lignane und Coumestane eingeteilt. Sie liegen unverzuckert als Aglycone oder verzuckert als Glycoside vor (bei Isoflavonen häufig an Position C7 des A-Ringes als -O-Gly) (Abb. 23) (XU et al. 2002, KENN et al. 2002, KULLING und WATZL 2003).

Die Analytik der Isoflavone wurde mittels HPLC-DAD bei 260 nm durchgeführt. Der Aufbau der HPLC ist mit dem der Wein- und Apfeltresterpolyphenolanalytik identisch. Lediglich die Eluenten und das Gradientenprogramm waren auf die neue Trennaufgabe abzustimmen (Tab. 40).

Tab. 40: Gradientenprogramm zur Analytik von Isoflavonen aus Rotklee und Sojabohnen

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	
0,0	80	20	Laufmittel A: 100 %Vol entmineralisiertes Wasser, mit Phosphorsäure auf pH-Wert 3 eingestellt (pH-Meter 744 von Metrohm), im Ultraschallbad 15 min entgast
24,0	30	70	
24,1	80	20	Laufmittel B: 100 %Vol Methanol, mit Phosphorsäure auf pH-Wert 3 eingestellt, im Ultraschallbad 15 min entgast 2 mL/min, 30 °C, 20 μ L Injektionsvolumen
27,0	80	20	

Die Isoflavon - Peaks wurden qualitativ anhand ihrer Retentionszeiten und deren charakteristischen Spektren von 200 bis 400 nm zugeordnet und quantitativ anhand der Peakflächen bestimmt (Tab. 41, Abb. 138).

Standards:

Daidzein, Genistein, Formononetin, Biochanin A, Sigma Aldrich, Austria

Glycitein, Glycitin, Daidzin, Genistin, PhytoLab, Deutschland

Tab. 41: Retentionszeiten der Rotklee- und Soja-Isoflavon-Standards mit Angabe der Wellenlängenmaxima und der detektierten Wellenlänge

Peak	Substanz	Retentionszeit [min]	λ_{\max} des Wellenlänge-Spektrums 200 – 400 nm	detektiert bei [nm]
1	Daidzin	6,80	251	260
2	Glycitin	7,57	258, 320	260
3	Genistin	8,81	260, 326	260
4	Daidzein	13,18	249, 303	260
5	Glycitein	14,06	257, 320	260
6	Genistein	15,49	260	260
7	Formononetin	18,25	249, 303	260
8	Biochanin A	20,95	261	260

Weiter sind in Abb. 140 Chromatogramme der 66 Vol% ethanolischen Extrakte der Rohstoffe „Gumpensteiner“ Rotklee aus dem Südburgenland und Okara der Burgenlandmilch Südfrisch GmbH dargestellt. Im Rotklee-Extrakt sind mit einem Anteil von > 95 % Formononetin und Biochanin A zu finden und im Okara-Extrakt Genistein, Daidzein und deren 7-O-Glycoside.

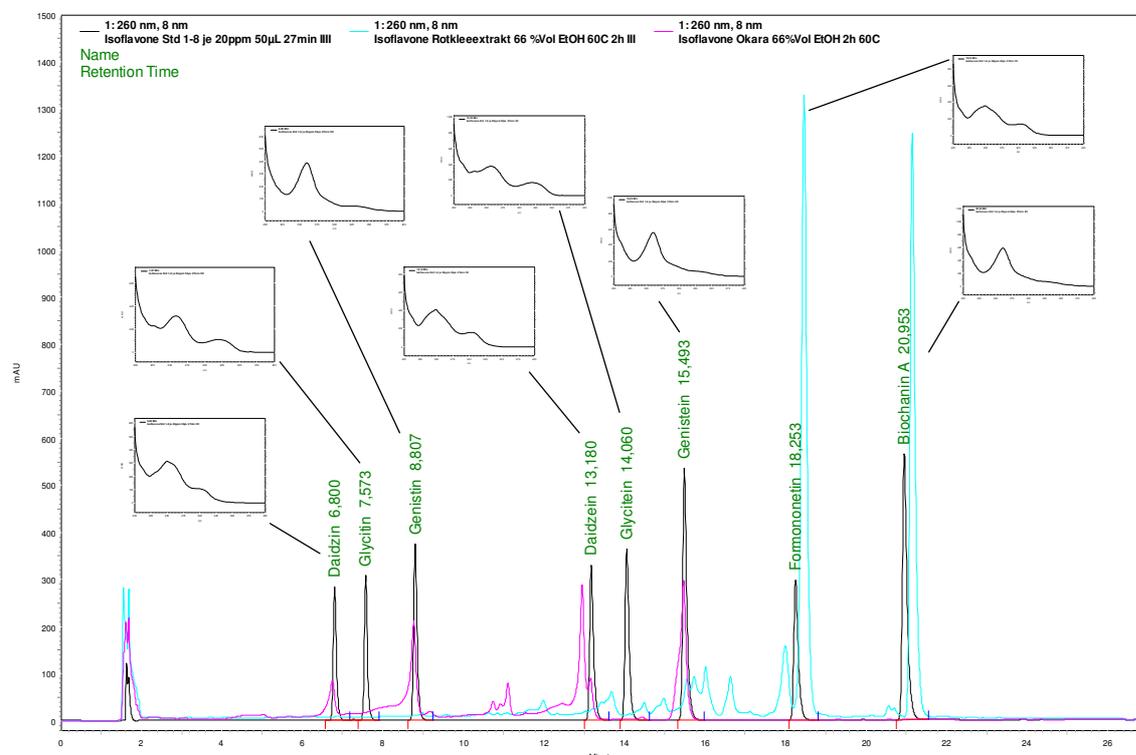


Abb. 140: Chromatogramme bei 260 nm der Isoflavonstandards sowie der Extrakte aus Rotklee und Okara

Wie auch beim Wein- und Apfeltrester, wurden die Rohstoffe zerkleinert und jeweils 15 g mit 100 mL Ethanol und 50 mL Wasser 2 Stunden unter Rückfluss bei 60 °C und stetigem Rühren extrahiert. Die Extrakte wurden über eine 0,45 µm Membran (regenerierte Cellulose) filtriert (genutscht) und bei -30 °C bis zur Analyse tiefgefroren.

Die Ergebnisse der Isoflavonanalytik sind in Tab. 42 dargestellt. Es wird davon ausgegangen, dass der Peak unmittelbar vor dem Daidzein sein Umlagerungsprodukt darstellt, da bei Alterungsuntersuchungen festgestellt wurde, dass der Gehalt an Daidzein abnimmt und in etwa gleichem Maße der Gehalt des Umlagerungsprodukts zunimmt.

Tab. 42: Ergebnisse der Isoflavonbestimmung in Extrakten aus Rotklee und Okara

Byproducts	Isoflavongehalte [mg/kgTM*]						
	Daidzin	Genistin	Daidzeinum- lagerungs- produkt	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
Okara	135	294	322	21	27	-	-
Rotklee	-	-	-	-	335	5808	2468

* mit 18,75 %TM Okara und 16,70 %TM Rotklee

5.3.3 Vergleich der Rohstoffe

Einen Überblick der untersuchten Byproducts der österreichischen Lebensmittelindustrie und Landwirtschaft ist in Tab. 43 gegeben. Zur Errichtung einer möglichen Anlage zur Gewinnung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, sind neben den Angaben der Gehalte an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen weitere Daten, wie Herkunft der Rohstoffe, bisherige Verwertung, anfallende Rohstoffmengen im Jahr und Verfügbarkeit, von Bedeutung. Um eine möglichst ganzjährige Auslastung zu erreichen, könnten die saisonal verfügbaren Rohstoffe frisch verarbeitet werden und in den verbleibenden Monaten die ganzjährig zur Verfügung stehenden Rohstoffe zum Einsatz kommen.

Tab. 43: Mögliche Byproducts der österreichischen Lebensmittelindustrie

Byproducts	Sekundäre Pflanzenstoffe	Herkunft	bisherige Hauptverwertung	Menge in AT [t/a]	Verfügbarkeit (Monate)
Weintrester (weiß/rot)	Phenolcarbonsäuren Stilbene Flavonoide	Weinland	Landwirtschaft	>60.000 t*	Aug-Okt
Apfeltrester	Phenolcarbonsäuren Flavonoide	Stmk, NÖ	Pektingew. Futtermittel	>30.000 t*	Sep-Okt
Bierhopfentreiber	Xanthohumole Bittersäuren	ganz AT, v. a. BrauUnion, v. a. ÖO, Szrg, Tirol	Futtermittel	>10.300**	ganzjährig
Okara (Sojakleie)	Isoflavone	Burgenland	Futtermittel LM-Zusatz	1.200 t***	ganzjährig
Rotklee	Isoflavone	Biolandwirte ganz AT	Futtermittel Saatgut	>20.000	Juli-Sep

* berechnet mit 25 % Pressrückstand/hL Wein und Apfelsaft, ** Stand 1995 Abfälle der Schlüsselnummer 114, *** berechnet mit 20 % Pressrückstand/hL Sojamilch zur Tofu-Herstellung oder als Kuhmilchersatz, stark wachsender Markt von Soja-Produkten aus Bioanbau (etwa 25 %/a)

Anhand der antioxidativen Kapazität und dem Gesamtphenolgehalt, lassen sich die Byproducts auch nach ihrem Gehalt an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen vergleichen. In Abb. 141 ist an den Ausbeuten zu sehen, dass sich Weintrester besonders gut und Apfeltrester weniger gut zur Gewinnung der SPS eignen. Die weiteren Rohstoffe befinden sich im Mittelfeld.

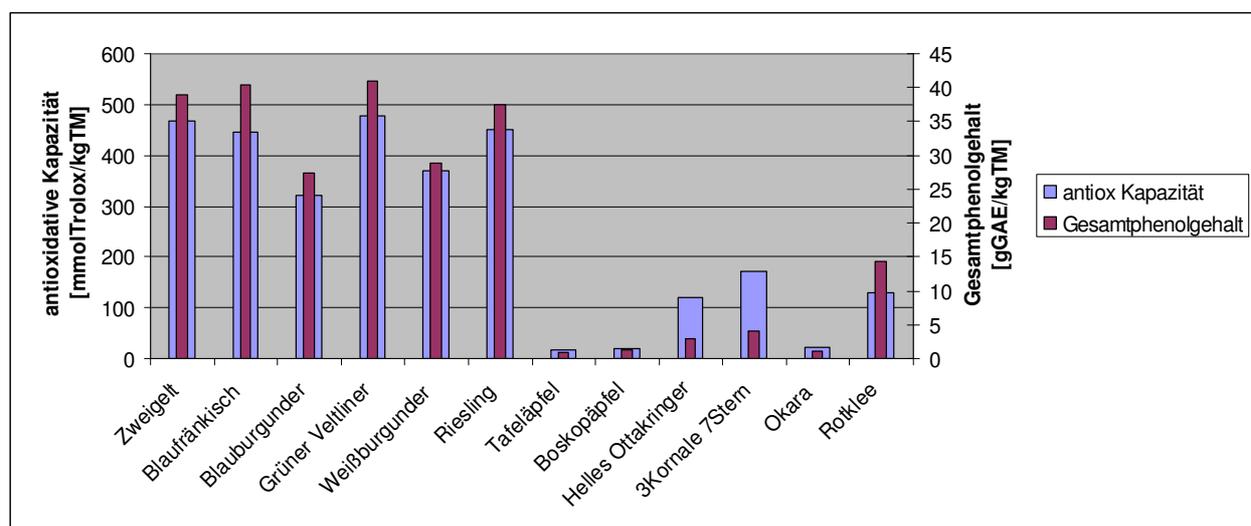


Abb. 141: Vergleich der Byproducts anhand der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehalts

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (Polyphenolen) wird aufgrund ihrer bioaktiven Wirkung zukünftig eine hohe Bedeutung zugesprochen. Das Anwendungsspektrum reicht von konventionellen Lebensmitteln über Functional Food bis zu Arzneimitteln (z. B. Krebsbekämpfung). Abgesehen von der Herstellung von Gesamtextrakten, sind defacto keine Technologien derzeit verfügbar, die für die industrielle Gewinnung gereinigter Extrakte oder gar einzeln isolierter Inhaltsstoffe geeignet wären. Vor diesem Hintergrund, lag das Ziel dieser Arbeit in der Entwicklung neuer Separationsstrategien zur Isolierung dieser Substanzen, wobei Membranverfahren und Chromatographie im Vordergrund des Interesses standen. Als repräsentative Rohstoffe wurden Wein- und Apfeltrester eingesetzt und weitere Alternativen in Form von Rotklee, Sojakleie und Biertreber auf gesundheitsfördernde sekundäre Inhaltsstoffe untersucht.

Extraktion

Im ersten Teil der Arbeit wurden Extraktionsversuche mit Weintrestern (Zweigelt, Blaufränkisch, Blauburgunder, Riesling, Grüner Veltliner, Weißburgunder) und Apfeltrestern (Boskop, Tafeläpfel) durchgeführt, um erstens akzeptable Ausbeuten zu erzielen und zweitens geeignete (realistische) Extrakte für nachfolgende membrantechnische und chromatographische Untersuchungen verfügbar zu haben. Bei der Verwendung eines Mischweintresters, wurden die höchsten Ausbeuten - hinsichtlich der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehalts (344 mmolTrolox/kgTM und 39 gGEA/kgTM) - mit einem ethanolischen Lösungsmittel von 67 Vol% erhalten. Mit Apfeltrestern wurden wesentlich kleinere Ausbeuten von etwa 6,7 mmolTrolox/kgTM und 3,2 gGEA/kgTM erreicht. Sinnvoll erscheint auch eine Mehrfachextraktion, um die Ausbeuten zu erhöhen. Hingegen führt ein enzymatischer (pektolytischer) Aufschluss zu keiner Verbesserung des Ergebnisses. Weitere Extraktionsmittel, wie Aceton und Methanol wurden zwar eingesetzt, ergaben vergleichbare Resultate, sind allerdings wegen ihrer Toxizität zur Herstellung eines Nahrungsergänzungsmittels oder Arzneimittels nicht geeignet. Unter Einbeziehung weiterer verfahrenstechnischer Aspekte (z. B. Explosionsschutz), wird im vorliegenden Fall für einen großtechnischen Maßstab eine Zweistufenextraktion mit Ethanol/Wasser 20/80 (v/v) (Flammpunkt >55 °C), einem Feststoff/Flüssigkeits-Verhältnis von 1:4, bei 50 °C und 2 h Extraktionszeit vorgeschlagen.

Abschließend sei noch hinzugefügt, dass die oben erwähnten alternativen Rohstoffquellen durchaus für die Gewinnung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen von Interesse sind. Dabei wies Rotklee 8,6 g Isoflavone/kgTM (Σ Genistein, Formononetin und Biochanin A) Sojakleie 800 mg Isoflavone/kgTM (Σ Genistein, Daidzein, Genistin und Daidzin) und Biertreber 30 mg Xanthohumol/kgTM und 3,9 bis 5,6 g Bittersäuren/kgTM auf.

Membranverfahren

Im Fokus des Interesses standen zunächst Membranuntersuchungen hinsichtlich Permeatfluss sowie Selektivität bezogen auf die wesentlichen Extraktinhaltsstoffe (einzelne Polyphenole, organische Säuren, Zucker, Ionen sowie Summenparameter TAC (total antioxidant capacity), TPC (total phenolic content) und Gesamtproteingehalt). Dabei wurden keramische Membranen mit NMWCs von 1, 3, 5, 8 und 15 kDa im Technikumsmaßstab mit 0,35 m² Elementen (Tami Industries) und mittleren transmembranen Drücken von 3,25 bar sowie Überströmgeschwindigkeiten von 6, 4,5 und 3 m/s untersucht. Weiter wurden organische PES-Flachmembranen mit NMWCs von 10, 4, 1, 0,3 und 0,2 kDa (Microdyn-Nadir und Koch) bei transmembranen Drücken von 5, 7 und 30 bar in zwei Rührfiltrationszelle (Filterfläche 176 cm² und 4,9 cm²) untersucht. Die umfangreiche Analytik der Inhaltsstoffe von Extrakten, Permeaten und Retentaten erfolgte mittels RP-C18-HPLC-DAD (Einzelpolyphenole), HPLC-DAD-RI mit H⁺-Säule (org. Säuren, Zucker), IC (An-, Kationen), TEAC-Methode (TAC), Folin-Ciocalteu-Methode (TPC) und Bradford-Methode (Gesamtproteine).

Die Permeatflüsse zeigen den üblich abnehmenden Verlauf, wobei keramische Membranen mittlere Leistungen zwischen 11 und 60 L/m²h und organische zwischen 7 bis 11 L/m²h aufweisen.

Anorganische Membranen weisen mit abnehmender Überströmgeschwindigkeit und Ausschlussgrenzen höhere Rückhaltewerte (gemessen anhand von TAC und TPC) auf. Sie reichen von 0 % (15 kDa-Membran, 6 m/s) bis > 80 % (1 kDa-Membran, 3 m/s). Generell zeigt es sich, dass die Deckschicht die Rückhalteeigenschaften maßgeblich beeinflusst, so dass selbst relativ kleine Polyphenole (250 bis 1.000 g/mol) von Membranen mit deutlich größeren Cut-Offs zurückgehalten werden.

Die untersuchten organischen Membranen weisen bereits bei einem NMWC von 10 kDa eine hohe Rückhaltung von >90 % (TAC, TPC) auf, was bis zu einem gewissen Grad überraschend ist. Ohne Detailuntersuchungen sind Erklärungen diesbezüglich nicht empfehlenswert, wobei sicherlich an Deckschichteinflüsse, Porenverblockungen und Adsorptionsphänomene gedacht werden muss. Die Rückhaltungen der organischen Säuren und Zucker steigen mit kleineren Ausschlussgrenzen von etwa 30 auf >95 %, Ionen werden lediglich von der 200 Da-Membran nachweislich zurückgehalten und Proteine bereits vollständig von der 10 kDa-Membran.

Werden die Analysenergebnisse der Einzelpolyphenolbestimmungen im Detail betrachtet, so fällt auf, dass in den Chromatogrammen der Feed- und Retentatlösungen sowohl bei organischen als auch bei anorganischen Membranen eine große Anzahl an Peaks mit ähnlichem Spektrum (200 bis 550 nm) vorliegt. Aus diesem Grund ist eine Basislinientrennung nicht möglich und die Identifizierung der 29 als Standards ausgewählten Wein- und Apfelpolyphenole erschwert. Diese polyphenolcharakteristischen Spektren ähneln denen der Flavanole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, deren Gallat-Derivaten sowie dem des Proanthocyanidins B₂, welches ein Dimer aus Flavanolen darstellt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um Polymere dieser Monoflavonoide handelt, wie z. B. OPCs und Tannine. Die Permeate hingegen, weisen eine gute Basislinientrennung auf, so dass sich Monoflavonoide leicht bestimmen lassen. Die Ergebnisse der Rückhaltungen von 28 zum Weintrestereextrakt zugesetzten Polyphenol-Standards (Filtrationen mit PES-Membranen in 32 mL Rührfilterzelle) zeigen deutliche Unterschiede. So werden beispielsweise Anthocyane und einige weitere Flavonoide schon bereits von der 4 kDa-Membran nahezu vollständig zurückgehalten, wohingegen die meisten Phenolcarbonsäuren diese passieren. Eine Abtrennung der Flavanol-Polymere mittels UF und NF mit zum Teil geringen Rückhaltungen der Monoflavonoide und Phenolcarbonsäuren sowie eine Vorfractionierung der einzelnen Polyphenole aus Wein- und Apfeltrestern erscheinen somit möglich.

Chromatographie

Die Entwicklung der präparativen Chromatographie zur Isolierung von Einzelpolyphenolen bzw. ausgewählte Polyphenolfractionen lehnt sich an die Analytik an. So wurden unterschiedliche C18-Harze (Macherey-Nagel und YMC) (15-25 µm, 40-63 µm, 63-200 µm, sphärisch, gebrochen) mittels Trockenpackverfahren in Scout-Säulen (6,5 x 300 mm) als RP-Chromatographie mit isokratischer Ethanol/Wasser-Elution eingesetzt und untersucht. Zur Auswahl eines möglichst effektiven Harzes für die Trennung von Polyphenolen wurde ein Rotkleeextrakt mit den beiden Hauptisoflavonen Formononetin und Biochanin A (>96 % Polyphenolanteil) verwendet. Die Trennmethode (hinsichtlich der Auflösung ($R \geq 1,5$)) wurde für jedes Harz mittels Flussrate und Eluentenzusammensetzung optimiert. Die Harze wurden anhand der Trennstufenzahlen (NTU) und der Laufzeit einer Charge beurteilt. Dabei wurden für 30 cm Scout-Säulen NTUs von 94 bis 520 mit Laufzeiten von 15 bis 285 Minuten ermittelt. Letzten Endes wurde zur Trennung von Weinpolyphenolen aus Trestern das sphärische Harz ODS-A mit 50 µm Partikeldurchmesser ausgewählt. Zur Verbesserung der Trenneigenschaften wurde eine zweite Säule (20 cm) hinzugefügt und darüber hinaus ein Elutions-Gradientenprogramm entwickelt. Weitere Parameter waren: Injektionsvolumen 50 µL, Temperatur 30 °C, Volumenstrom 0,6 mL/min, resultierende Drücke 50-80 bar, Detektion bei 280, 325 und 520 nm. Wie bereits aus den analytischen Chromatogrammen

der Feedlösungen, Retentate und Permeate ersichtlich, konnte gerade bei der semi-präparativen Chromatographie keine Basislinientrennung der Rohextrakt-Inhaltsstoffe erzielt werden, da auch hier wahrscheinlich Tannine und OPCs Monoflavonoide überlagern. Hingegen konnten bei der Auftrennung der Permeat-Inhaltsstoffe (organische Membranen mit 4 und 1 kDa NMWC) Basislinientrennungen und damit die Isolierung von Einzelpolyphenolen realisiert werden.

Obwohl weitere Untersuchungen erforderlich sind, kann zusammenfassend gesagt werden, dass ein Hybridverfahren Nanofiltration/Chromatographie geeignet und vorteilhaft sein kann, um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im präparativen (industriellen) Maßstab zu isolieren bzw. zu gewinnen. Unabhängig davon können mit Membranverfahren Extrakte teilweise fraktioniert und konzentriert werden, wobei eine effektive Rückgewinnung von Eluenten ebenfalls möglich ist. Gleichzeitig zeigt die Arbeit, dass eine chromatographische Trennung von Polyphenolen aus Extrakten mit komplexer Zusammensetzung (z. B. Wein- und Apfeltresterextrakte) aus praktischer Sicht kaum durchführbar ist. Hingegen ist dies in manchen Fällen, bei denen eine einfachere Matrix vorliegt (z. B. Rotklee- und Sojakleieextrakte), durchaus möglich.

7 Literaturverzeichnis

- AERTS et al. 1999: Aerts, R.J. et al.: Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, No.75, 1-12
- AMES et al. 1990: Ames, B.N., Profet, M., Gold, L.S., Dietary pesticides (99,99% all natural). *Proc Natl Acad Sci USA* 87 7777-7781
- AMICO et al. 2004: V.Amico, E.M. Napoli, A.Renda, G.Ruberto, C.Spatafora, C.Tringali, Constituents of Grape pomace from the Sicilian cultivar "Nerello Mascalese"; *Food Chemistry* 88 599-607
- AUSTIN et al. 2004: Austin, M.B. et.al., An Aldol Switch Discovered in Stilbene Synthases Mediates Cyclization Specificity of Type III Polyketide Synthase, *Chemistry & Biology*, 2004, Vol.11, 1179-1194
- BADERSCHNEIDER 2000: Baderschneider, B., Diss, Isolierung und Strukturaufklärung antioxidativ wirkender Verbindungen aus Weisswein, Uni CW zu Braunschweig, 2000
- BADERSCHNEIDER et al. 1999: B. BADERSCHNEIDER, D. LUTHRIA, A.L. WATERHOUSE and P. WINTERHALTER: Antioxidants in white wine (cv. Riesling), I. Comparison of different testing methods for antioxidant activity, *VITIS Band/Volume* 38 (1999)
- BADERSCHNEIDER und WINTERHALTER 2001: Baderschneider B., Winterhalter P., Isolation and characterisation of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignana from Riesling wine and screening for antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6) 2788-2798
- BELITZ et al. 2001: H.-D. Belitz., W.Grosch, P.Schieberle, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5.Aufl. Springer Verlag Berlin Heidelberg, ISBN 3-540-41096-1
- BENEDUM 2000: Benedum, J. Loew, D., Schilcher, H., *Arzneipflanzen in der Traditionellen Medizin-Kooperation Phytopharmaka*, Bonn, 3. überarbeitete Aufl., ISBN 3-929964-09-0
- BLAICH 2000: Rolf Blaich, Vorlesung: Biologie der Weinrebe (Weinbau I, Teil des Moduls H2287, Uni Hohenheim
- BORBALÁN et al. 2003: Angeles M. Alonso Barbalán, Luisa Zorro, Dominico A. Guillén, Carmelo Garcia Barroso, Study of polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power, *Journal of Chromatography A*, 1012 (2003) 31-38
- BRAVO et al. 1994: L. Bravo, R. Abia and F. Saura-Calixto, Polyphenols as dietary fiber associated compounds: comparative study on in vivo and in vitro properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1994), 1481-1487
- BRAVO und SAURA-CALIXTO 1998: Bravo L., Saura-Calixto F., Characterization of Dietary Fiber and the In Vitro Indigestible Fraction of Grape Pomace, *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (1998) 135-141
- BROCKHAUS 1996: *Die Enzyklopädie*, 20. überarb. und aktualisierte Auflage, Leipzig Mannheim, Brockhaus, ISBN: 3-7653-3101-5, S.699
- BUNZEL 2001: Bunzel, M., Diss, Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen, Uni Hamburg
- CARSON et al. 2001: Carson R.G., Patel K., Carlomusto M., Bosko C.A., Pillai S., Santhanam U., Weinkauff R.L., Iwata, K., Palanker L.R., Cosmetic compositions containing resveratrol, US Patent 6270780

- CASSANO et al. 2003: A. Cassano, E. Orioli, G. Galaverna, R. Marchelli, G. Di Silvestro, P. Cagnasso, Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes, *Journal of Food Engineering* 57 (2003) 153-163
- CASTELLARI et al. 2002: Massimo Castellari, Elisa Sartini, Alessandra Fagiani, Giuseppe Arfelli, Aureliano Amati; *Journal of Chromatography A* 973 (2002) 221-227
- CHAN et al., CHANG und KUO 1997: Chan, Chang und Kuo, Neoflavonoids from *Dalbergia Odorifera*, *Phytochemicals*, Vol 46, No 5 pp 947-949
- CHAN et al. 1997: Chan, S.-C. et al., Neoflavonoids from *Dalbergia Odorifera*; *Phytochemistry*, Vol.46, No.5, 947-949
- CHEN et al. 2001: Lei Chen, Yashan Han, Fuquan Yang, Tianyou Zhang, High-speed counter current chromatography and purification of resveratrol and piceid from *Polygonum cuspidatum*, *Journal of Chromatography A*, 907 (2001) 343-346
- CHU et al. 2005: Xin Chu, Ailing Sun, Renmin Liu, Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc by high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1097 (2005) 33-39
- CORNELL UNI 2006: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/chemical.html>, 05.12.2006
- CZAJA 1968: Czaja A.Th., *Mikroskopische Untersuchung von Obst*, Handbuch der Lebensmittelchemie, Band 5 / 2.Teil, S. 260-261
- DECKERT 1998: Deckert, P., Diss, Aufbau und Inbetriebnahme einer Pilotanlage zur simulierten Gegenstromchromatographie, Technische Universität Berlin
- DELAUNAY 2002: Jean-Claude Delaunay, Chantal Castagnino, Catherine Chèze, Joseph Vercauteren, Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography, *Journal of Chromatography A*, 964 (2002) 123-128
- DE RIJKE et al. 2006: Eva de Rijke, Pieter Out, Wilfried M.A. Niessen, Freek Ariese, Cees Gooijer, Udo A.Th.Brinkman; Analytical separation and detection methods for flavonoids; *Journal of Chromatography A* 1112 (2006) 31-63
- DIONEX 1995: Installation instructions and troubleshooting guide for the IONPAC® CG12A und CS12A, *Werksschriften ©Dionex Corporation Document No. 031132, Rev.01*
- DIONEX 1996: Installation instructions and troubleshooting guide for the IONPAC® AG14 und AS14 *Werksschriften ©Dionex Corporation Document No. 031199, Rev.01*
- DIXON 2004: Dixon R.A., "Phytoestrogens." *Annu Rev Plant Biol* 55;225-61. PMID: 15377220
- DIXON und STEELE 1999: Richard A. Dixon and Christopher L. Steele, Flavonoids and Isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering, Elsevier Science Ltd, *Trends in Plant Science*, review, Vol. 4, No.10, 394-400
- DOCUMENTATION AUSTRIAN WINE 2004: Austria – The Wine Country, www.winesfromaustria.com/edaten/fr_docu.html über www.austrian.wine.co.at
- DOKUMENTATION ÖSTERREICHISCHER WEINE 2005: www.weinausosterreich.at
- DONNELLY et al. 2001: Synthesis of neoflavones by ligand coupling reaction with aryllead triacetates, *Tetrahedron* 57 413-423
- DREWS 1968: Drews H., *Frisches Obst*, Mikroskopische Untersuchung von Obst, Handbuch der Lebensmittelchemie, Band 5 / 2.Teil, S.17-24

- DUSTMANN 2004: Heiko Dustmann, Diss, Analyse und Evaluierung der Auswirkungen des Angebots und der Nachfrage nach funktionellen Lebensmitteln auf die Ernährungsindustrie sowie auf vor- und nachgeschaltete Stufen der Wertschöpfung, TU München
- EDER 2005: persönliches Gespräch mit Reinhard Eder, Höheren Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg
- FACHGRUPPE OBSTBAU 2004: Godesberger Allee 142-148 , 53175 Bonn
- FERNÁNDEZ et al. 2003: S.S. Fernández, C.J. Menéndez, S. Mucciarelli, A. Pérez Padilla, Concentration and destillation of zampa (Atriplex lampa) extract by membrane technology, Desalination 159 (2003) 153-160
- FLESCHHUT 2004: Jens Fleschhut, Diss., Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen, Universität Karlsruhe
- FLOTTWEG 2007: www.flottweg.com
- FÖRG 2002: Alexander Förg, Diss., Hochdruck-Anreicherung polarer Pflanzenwirkstoffe ohne und mit integrierter adsorptiver Extraktreinigung, TU München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
- FORKMANN und MARTENS 2001: Gert Forkmann, Stefan Martens, metabolic engineering and applications of flavonoids, Elsevier Science Ltd., Current Opinions in Biotechnology, 12: 155-160
- FORSTER et al. 2004: Adrian Forster, Martin Ketterer, Andreas Gahr, Ein neuartiger xanthohumolangereicherter Hopfenextrakt und sein Einsatz für unfiltrierte Biere, Hopfenrundschau International 2003/2004, 65-71
- FRANZKE 1996: Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 3. Aufl., Hamburg Behr Verlag ISBN 3-86022-234-1
- FUGMANN 1997: Herausg.v. Burkhard Fugmann, Römpp-Lexikon „Naturstoffe“, Georg Thieme Verlag, ISBN: 3-13-749901-1
- GEDRICH et al. 2005: herausgegeben von Kurt Gedrich, Georg Karg und Ulrich Ottersdorf, Functional Food – Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz, Bericht der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Band 1, Karlsruhe 2005
- GERHÄUSER 2005: Clarissa Gerhäuser, Beer constituents as cancer chemopreventive agent, European Journal of Cancer, 41 (2005) 1941-1954
- GESCHER und STEWARD 2003: Gescher, A.J. und Steward, W.P., Relationship between Mechanisms, Bioavailability, and Preclinical Chemopreventive Efficacy of Resveratrol: A Conundrum, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, Vol.12, 2003: 953-957
- GIDDINGS 1965: J.C. Giddings, Dynamics of Chromatography – Principles and Theory, Verlag Marcel Dekkert Inc., ISBN 0-8247-1225-0
- GILEWICZ-LUKASIK et al. 2007: Barbara Gilewicz-Lukasik, Stanislaw Koter, Jacek Kurzawa, Concentration of anthocyanins by the membrane filtration, Separation and Purification Technology 57 (2007) 418-424
- GLASMACHER 2007: Skript zur Laborarbeit, Untersuchung einer Dialysemembran, Universität Hannover, Sommersemester 2007
- GLINSMANN 1996: Glinsmann, W.H.; Functional Food in North America, Nutrition Reviews, No.54, 33-37
- GÖKTÜRK BAYDAR und AKKURT 2001: Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR, Murat AKKURT, Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds, Turk. J. Agric. For. 25 (2001) 163-168

- GOLDBERG 2003: Gail Goldberg, Plants: Diet and Health, British Nutrition Foundation, Blackwell Publishing, ISBN 0-632-05962-1
- GOODMAN 2000 und 2001: Goodman D.W., Treatment for blood cholesterol with trans-resveratrol, US Patent 6022901, US Patent 6211247
- GRÜNER BERICHT 2005: www.grünerbericht.at, 46. Grüner Bericht, BGBl Nr.375/1992
- GUENDEZ et al. 2005: Ramila Guendez, Stamatina Kallithraka, Dimitris P. Ma kris, Panagiotis Kefalas; Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis sinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity, Food Chemistry 89 (2005) 1-9
- HAENEL 1991: H. Haenel, Ernährung, Flavour und Kultur im Wandel, Ernährung/Nutrition Vol. 15, Nr. 9 (1991) 528-531
- HARBORNE 1980: Harborne J.B. ed., The Flavonoids. Advances in Research, Chapman & Hall
- HARBORNE und BAXTER 1999: edit by Harborne und Baxter, The Handbook of natural Flavonoids. John Wiley, Chichester
- HARBORNE et al. 1999: Harborne, Baxter und Moss, Phytochemical Dictionary; a handbook of bioactive compounds from plants, second edition 1999, Taylor & Francis ISBN 0-7484-0620-4
- HABELBECK 2006: German Hasselbeck, Firmenschrift ERBSLÖH Geisenheim AG, Enzympräparate für die Fruchtsaftherstellung aus anwendungstechnischer Sicht, www.erbsloeh.com
- HEISS 2004: Rudolf Heiss: Lebensmitteltechnologie; Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung, 6.Aufl. Springer Verlag Berlin Heidelberg, ISBN 3-540-00476-9, 2004
- HELDT 2003: Heldt, H.W.; Pflanzenbiochemie, 3.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- HENKE 1999: Henke, Hans; Flüssig-Chromatographie, analytische und präparative Trennung, 1.Aufl., Vogel Buchverlag, Würzburg
- HESFORD und RUFFNER 2000: Frank Hesford und Hans Peter Ruffner, Roter Wein aus blauen Trauben, Getränketechnologie, Schweiz.Z.Obst-Weinbau Nr. 25, 2000, 649-652
- HESS 1991: Hess, W. F., Maschinen und Apparate zur Fest/Flüssig-Trennung, Essen, Vulkan Verlag 1991, Seite 299
- HILTON et al. 1982: Hilton B.W., Lin R.I., Topor M.G., Processed Anthocyanin Pigment Extracts, US Patent 4320009
- HOWARD 2001: Howard A.N., Method of Producing High Flavonol Content Polyphenol Compositions, US Patent 6238673
- IGNATOWITZ 1994: Eckard Ignatowitz, Chemietechnik, 5. Aufl., Verlag Europa-Lehrmittel, ISBN: 3-8085-7045-8
- IMS-HEATH 2005: www.imshealth.de
- IONICS 2004: Membrane technology benefits the food processing industry, Filtration+Separation, October 2004, 32-33
- IRMLER 2001: Herbert Walter Irmeler, Dynamische Filtration mit keramischen Membranen, Vulkan-Verlag GmbH, ISBN: 3-8027-2840-8
- JUNGBAUER und MEDJAKOVITC 2005: A. Jungbauer und S. Medjakovitc Phytoöstrogene in der Nahrung, Ernährung, 29, 10, 406-424

- KAC und VOVK 2007: Javor Kac, Tomaz Vovk, Sensitive electrochemical detection method for α -acids, β -acids and xanthohumol in hops (*Humulus lupulus* L.), Journal of Chromatography B, 850 (2007) 531-537
- KAMMERER et al. 2004: Dietmar Kammerer, Achim Claus, Reinhold Carle und Andreas Schieber; Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS, J.Agric.Food Chem., 52, 4360-4367
- KINDL 1994: Kindl, Helmut, Biochemie der Pflanzen, vierte, vollständig neubearbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Verlag
- KLÖCKL 2006: Klöckl, Ingo, Flavonoide, www.2k-software.de/ingo/farbe/nflavon.html
- KODAN 2002: Kodan, A. et al., A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis, PNAS, Vol.99, No.5, 3335-3339
- KOES 2005: Koes, R. et al., Flavonoids, a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathway, Trends in Plant Science, Vol.10, No.5, 236-242
- KOUBOVA und GUARENTE 2003: Koubova, J., Guarente L., How does calorie restriction work?, Genes and Development, No.17, 313-321
- KRASNOW und MURPHY 2004: Krasnow M.N. und Murphy T.M., Polyphenol Glucosylation Activity in Cell Suspensions of Grape (*Vitis vinifera*), J. Agriculture and Food Chemistry
- KRENN et al. 2002: L. Kenn et al., Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography, J. Chrom. B 777 (2002) 123-128
- KRÖGER 2003: Kröger, K., Lebenserwartung: Der Mythos vom Rotwein, Deutsches Ärzteblatt 100, Ausgabe 42, Seiten A-2706 / B-2260 / C-2120
- KULLING und WATZL 2003: S.E. Kulling und B. Watzl, Phytoöstrogene, Ernährungs-Umschau 50, 6 (2003) 234-239
- KUTSCHERA 2002: Kutschera, Ulrich, Prinzipien der Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, ISBN: 3-8274-1121-1
- LAIBLIN 2002: Tobias Laiblin, Diss, Charakterisierung der Verteilung in präparativen chromatographischen Säulen, TU Berlin
- LANDRAULT et al. 2002: Landrault N., Larronde F., Delaunay J.C., Castagnno C., Vergauteren J., Merillon J.M., Gasc F., Cros G., Teissedre P.L., Levels of stilbene oligomers and astilbin in french varietal wines and in grapes during noble rot development; Journal of Agriculture and Food Chemistry 50, 2046-2052
- LANDWIRTSCHAFTSKAMMER STMK 2004: Obsternte 1995-2004
<http://stmk.agrarnet.info/netautor/cache/tmpDL/2005.08.19/2.1.3.pdf>
- LANGCAKE et al. 1979: Langcake P, Cornford CA, Pryce RJ.; Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves; Phytochemistry 18, 1025-1027
- LANGSTON 1985: Langston M.S.K., Anthocyanin Colorant from Grape Pomace, US Patent 4500556
- LAPORNIK et al. 2005: Brigita Lapornik, Mirko Prosek, Alenka Golc Wondra, Comparison of extracts prepared from plant by-productes using different solvents and extraction time, Journal of Food Engineering 71 (2005) 214-222
- LAUFENBERG et al. 2003: Laufenberg, G., Kunz, B. and Nystroem, M., Transformation of vegetable waste into value added products, (A) the upgrading concept; (B) practical implementations, Review Article., Bioresource Technology, Vol.87, Issue 2, 167-198
- LEBENSMINISTERIUM 2005: www.lebensmittelnet.at/article/articleview/30184/1/8274

- LEI et al. 2001: Li Lei, Fuquan Yang, Tianyou Zhang, Pengfei Tu, Lijun Wu, Yoichiro Ito, Preparative isolation and purification of acteoside and 2'-acetyl acteoside from *Cistanches salsa* (C.A. Mey) G. Beck by high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 912 (2001) 181-185
- LI et al. 2000: Hua-Bin Li, Feng Chen, Tian-You Zhang, Fu-Quan Yang, Guo-Qing Xu, Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 905 (2001) 151-155
- LU und FOO 1999: Yinrong Lu, L.Yeap Foo; The polyphenol constituents of grape pomace, *Food Chemistry* 65 (1999) 1-8
- LUCENA et al. 2005: Rafael Lucena, Soledad Cárdenas, Mercedes Gallego, Miguel Valcárcel, Autoanalyser for continuous fractionation and quantitation of the polyphenols content in wines, *Journal of Chromatography A*, 1081, 127-131
- MACHEREY-NAGEL 2007: www.mn-net.com
- MANACH et al. 2004: Claidine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy and Liliana Jiménez, *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727-47
- MANACH et al. 2005: Manach, C., Andrzej Mazur and Augustin Scalbert, Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, *Current Opinion in Lipidology*, 16:000-000 MOL16111
- MARITA et al. 2001: Hiroyuki Morita, Hiroshi Noguchi, Joachim Schröder, Ikuro Abe; Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase, *Eur.J.Biochem.* 268, 3759-3766
- MARTENS 2005: Martens S, Mithofer A., "Flavones and flavone synthases" *Phytochemistry* 66(20), 2399-407. PMID: 16137727
- MARTENS und MITHÖFER 2005: Martens, S. and Mithöfer, A.: Flavones and flavone synthase, *Phytochemistry*, No.66, 2399-2407
- MASQUÉ et al. 1999: N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, Influence of Chemical Modification of Polymeric Resin on Retention of Polar Compounds in Solid-Phase Extraction, *Chromatographia* Vol. 50, No.1/1, July 1999, 21-26
- MASQUELIER 1987: Masquelier, J., Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. US Patent 4698360
- MAYR et al. 1996: Mayr, U., D. Treutter und W. Feucht, Phenolische Inhaltsstoffe des Apfels. *Erwerbsobstbau* 38 (1996), 8-12
- MERCK 2007: www.merck.com
- MEYER 2004: V.R.Meyer: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- MICRODYN-NADIR 2007: www.microdyn-nadir.de
- MILLER et al. 1995: N.J. Miller, G. Paganga, S. Wiseman, W.van Nielen, L. Tijburg, P. Chowienczyk, C.A. Rice-Evans, Total antioxidant activity of low density lipoproteins and relationship with α -tocopherol status, *FEBS Letter* 365 (1995) 164-166
- MILLER et al. 1996: Nicholas J.Miller, Cinzia Castelluccio, Lilian Tijburg, Catherine Rice-Evans; The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters – radical scavengers or metal chelators?, *FEBS Letters* 392, 40-44
- MILLER und RICE-EVANS 1997: Nicholas J.Miller und Catherine A.Rice-Evans, The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chemistry*, Vol. 60, No. 3, pp. 331-337

- MÖBIUS und GÖRTGES 1974: Polyphenolbestimmung für die Praxis, Die Weinwirtschaft, 29, S. 241-253
- MONAGAS et al. 2005: Maria Monagas, Begona Bartolome und Carmen Gomez-Cordoves, Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45: 85-118
- MORITA et al. 2001: Novel polyketides synthesized with a higher plant stilben synthase, Eur.J.Biochem. 268 (2001) 3759-3766
- NAFISI-MOVAGHAR et al. 1999: Nafisi-Movaghar K., Svanoe T.T., Seroy W.A., Method for Extraction of Proanthocyanidins from Plant Material, US Patent 5912363
- NAKAYAMA et al. 2000: Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Sato T, Kikuchi S, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Ueda T, Nakao M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T. "Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration." Science 290 (5494), 1163-6. PMID: 11073455
- NEGRO et al. 2003: C.Negro, L.Tommasi, A.Miceli, Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extract; Bioresource Technology 87 (2003) 41-44
- NIELSON 2004: W.K. Nielson: Membranfiltration und verwandte molekulare Separationsverfahren, Verlag Th. Mann
- NIKFARDJAM 2001: Nikfardjam, M.S.P., Diss., Polyphenols in white wines and grape juices and their changes during production, Justus von Liebig Universität Giessen
- NOVAMEX 2006: www.novamex.de
- NWUHA 2000: V. Nwuha, Novel studies on membrane extraktion of bioactive components of green tea in organic solvents: part I, Journal of Food Engineering 44 (2000) 233-238
- OHLROGGE und EBERT 2006: Membranen, Grundlagen, Verfahren und industrielle Anwendungen, Wiley VCH Verlag, Weinheim
- OKUDA und YOKOTSUKA 1996: Tohru Okuda und Koki Yokotsuka; Trans-Resveratrol Concentrations in Berry Skins and Wines from Grapes Grown in Japan, Am.J.Enol.Vitic., Vol.47, No.1, pp.93-99
- PESCHEL et al. 2006 : Wieland Peschel, Ferran Sánchez-Rabaneda, Wilfried Diekmann, Andreas Plescher, Irene Gartzia, Diego Jiménez, Rosa Lamuela-Raventós, Susana Buxaderas, Carles Codina; Food Chemistry, 97 (2006) 137-150
- PFEIFFER und RADLER 1985: Peter Pfeiffer und Ferdinand Radler; Hochleistungschromatographische Bestimmung von org. Säuren, Zuckern, Glycerin und Alkohol im Wein an einer Kationenaustauschersäule; Z.Lebensm.Unters.Forsch. 181 (1985) 24-27
- PHYTOLAB 2005: PhytoLab GmbH & Co. KG 2005 www.phytolab.de/analyse/allgemeine-analytik/flavonoide.php
- PLENIO 2007: H. Plenio, Skript Chromatographie, TU Darmstadt, Eduard-Zintl-Institut für Anorg. und Physikal. Chemie
- POLLY und TAYLOR 1999: Calculation of the absorption spectrum of chromones, J.Phys.Chem, A 1999, 103, 10343-10347
- PUHLFÜRSS et al. 2000: P.Puhlfürß, A.Voigt, R.Weber, M.Morbé: Microporous TiO₂ membranes with a cut off <500 Da, Journal of Membrane Science, 174, 123-133
- RADTKE et al. 1998: Radtke J, Linseisen, J., Wolfram, G., Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayrischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrstudie, Zeit. f. Ernährungswiss. 37 (1998) 190-197,
- RAUTENBACH und RAUCH 1977: R.Rautenbach und K.Rauch: Ultrafiltration und Umkehrosiose, Grundlagen und Technologie, Chem.Ing.Technik, 49 (1977) 223-231

- RAVEN et al. 2002: „Biologie der Pflanzen“ von Peter H. Raven, Ray E. Evert und Helena Curtis. Inhalt und Design by Andrea, Juli 2002, www.amleto.de/pflanzen/system/0uebersicht.htm
- RAY und BAGCHI 2001: Ray S.D. und Bagchi D., Prevention and treatment of acetaminophen toxicity with grape seed proanthocyanidin extract, US Patent 6245336
- RE et al. 1999: Roberta Re, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang, Catherine Rice-Evens; Antioxidant activity applying an improved ABTS Radical cation decolorization assay; Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, No. 9/19, pp 1231-1237
- RECHNER 2000: Andreas Rechner; Diss.; Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften; Justus-Liebig-Universität Giessen
- RENAUD und LORGERIL 1992: Renaud, S. and de Lorgeril, M., Wine, alcohol, platelets and the french paradoxon for coronary heart disease, The Lancet 339 (1992) 1523-1526
- REUTER 1967: H. Reuter: Strömungen und SAedimentation in der Überlaufzentrifuge, Chemie-Ing.Techn. 39, 5/6, 311-318
- RICE-EVANS et al. 1995: Catherine A. Rice-Evans, Nicholas J. Miller, George Paganga; Free Radical Biology a. Medicine, Vol. 20, No. 7, pp. 933-956
- RICHTER 1996: Gerhard Richter, Chemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, ISBN 3-13-103421-1
- RITTER 1994: Guido Ritter, Diss, Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben, Universität Giessen
- ROCHE LEXIKON MEDIZIN 1999: 4.Auflage; © Urban & Fischer Verlag, München
- RÖMPP-LEXIKON NATURSTOFFE 1997: Römpp-Lexikon „Naturstoffe“, Georg Thieme Verlag, ISBN: 3-13-749901-1
- RUBERTO et al. 2007: Giuseppe Ruberto, Agatino Renda, Carmelo Daquino, Vincenzo Amico, Carmela Spatafora, Corrado Trincali, Nunziatina De Tommasi, Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivares, Food Chemistry, 100, (2007) Pages 203-210
- SANCHEZ-MORENO et al. 2003: Concepción Sánchez-Moreno, Guohua Cao, Boxin Ou und Ronald L. Prior, Anthocyanin and Proanthocyanidin Content in Selected White and Red Wines. Oxygen Radical Absorbanc Capacity Comparison with Nontraditional Wine Obtain from Highbush Blueberry, J.Agric.Food Chem. 51 (2003) 4889-4896
- SATTLER 1995: Klaus Sattler, Thermische Trennverfahren, Grundlagen, Auslegung, Apparate, zweite Auflage, VCH, ISBN 3-527-28636-5
- SCALBERT 2002: Augustin Scalbert, Laurent Duval, Shuyun Peng, Bernard Monties, Polyphenols of Quercus robus L.: II. Preparative isolation by low-pressure and high-pressure liquid chromatography of heartwood ellagitannins, Journal of Chromatography A, 502 (1990) 107-119
- SCALBERT und WILLAMSON 2000: Augustin Scalbert und Gary Williamson, American Society for Nutrational Sciences (2000) 2073S
- SCHMIDT-TRAUB 2005: Schmidt-Traub Henner (Hrsg.), preparative chromatography, 1. Aufl., Wiley-VCH, ISBN: 3-527-30643-9
- SCHRÖDER 2004: Die Anti-Aging-Pille in Griffnähe?, Uni-Magazin 2004, No.6, S.30
- SCHRÖDER 2005: www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Resveratrol_de.html

- SCHWEDT 1994: Georg Schwedt, Chromatographische Trennmethode, 3. Aufl., Wiley-VCH Verlag, ISBN: 3527308679
- SCHWISTER 2005: Karl Schwister; Taschenbuch der Verfahrenstechnik, 2.Auflage, Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, ISBN 3-446-22843-8
- SCHLEE 1992: Schlee, D, Ökologische Biochemie, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1992
- SHRIKHANDE et al. 2003: Shrikhande A.J., Race E.J., Wightman J.D., Sambueso R.D., Process for Extraction, Purification and Enrichment of Polyphenolic Substances from Whole Grapes, Grape Seeds and Grape Pomace, US Patent 6544581
- SINGLELTON und ROSSI 1965: Singleton V.L., Rossi J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Am.J.Enol.Vitic., 16 (1965) 144-158
- SIVAN 2002: Sivan, G., edited by Hurst W.J., Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals CRC Press (2002) p. 363-384
- SOLEAS et al. 1997: Soleas G.J, Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., Wine as a biological fluid: History, production and role in disease prevention, J. Clin. Lab. Anal. 11(1997) 287-313
- SONG 1999: Liming Song, Diss, The development and optimization of membrane process for separation and purification of bioactive phytonutrients from grapes and blueberries, dissertation 1999, University of Arkansas
- SPIEKERMANN 2000: Uwe Spiekermann, Historischer Wandel der Ernährungsziele in Deutschland – Ein Überblick, <http://www.agev-rosenheim.de/tagung2000/spiekermann.pdf>
- SPIEKERMANN 2001: Uwe Spiekermann; Der Markt für Funktional Food - Überblick, Bedeutung und Perspektiven; IAKE, Mitteilungen Heft 8 (2001) S.25-36
- STATISTIK AUSTRIA 2005: www.statistik-austria.at
- STEFFAN 2005: Steffan B., Diss, Inhaltsstoffe aus Pflanzen der indonesischen Volksmedizin (Jamu): Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften, HHU Düsseldorf
- STEVEN und PAGE 2004: Jan F. Stevens, Jonathan E. Page, Molecules of Interest: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!, Phytochemistry, 65 (2004) 1317-1330
- STIEß 1997: Matthias Stieß, Mechanische Verfahrenstechnik 2, Springer Verlag, ISBN 3-540-55852-7
- STRASBURGER 1998: Eduard Strasburger, Lehrbuch der Botanik für Hochschulen von Peter Sitte, Hubert Ziegler, Friedrich. Ehrendorfer, Eduard Strasburger (Herausgeber), Fritz Noll (Herausgeber), Heinrich Schenck (Herausgeber), Verlag Spektrum Akad. Vlg., ISBN: 3827407796
- SUN 2002: Albert Y. Sun, Agnes Simonyi und Grace Y. Sun: The "French Paradox" and beyond: Neuroprotective effects of polyphenols; Free Radical Biology & Medicine, Vol.32, No.4, pp.314-318
- TAKOS et al. 2006: Takos, Adam Matthew Takos, Benjamin Ewa Ubi, Simon Piers Robinson, Amanda Ruth Walker, Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin, Plant Science, 170, Issue 3 (2006) 487-499
- TANNER und BRUNNER 1979: Tanner H. Brunner H.R., Bestimmung der Gesamtphenole (Folin-Ciocalteu-Methode) in Getränke Analytik; Untersuchungsmethoden für die Labor- und Betriebspraxis, 2.Auflage, Verlag Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft mbH, Schwäbisch Hall, S.91-92

- TCI GROUP 1999: Nutraceutical products and functional food additives 3rd Ed. March 1999, Technology Catalyst International Group/ USA
- TEUTEBERG 2002: Hans Jürgen Teuteberg, Der essende Mensch zwischen Natur und Kultur, Der Bürger im Staat – Nahrungskultur – Essen und Trinken im Wandel, 52. Jahrgang Heft 2 (2002) 179-187
- TOPPO 2000: Toppo F., Treatment for blood cholesterol with trans-resveratrol, US Patent 6048903
- TSAO und YANG 2003: Rong Tsao und Raymond Yang, Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition; towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1018 (2003) 29-40
- UMA MAHESWARI und RAO 2005: Antihepatotoxic effect of grape seed oil in rat, Indian Journal of Pharmacology, May-June, 2005 by M. Uma Maheswari, P. Rao, Byline: M. Uma Maheswari, P. Rao
- UNGER 1994: Unger K.K., Handbuch der HPLC, präparative Säulenflüssigchromatographie, GIT – Verlag, ISBN 3-921956-97-8
- UNI HANNOVER 2007: Vorlesung Grundoperationen der Filtration, Dipl.-Studium, Universität Hannover, <http://www.tci.uni-hannover.de/pdf/diplom-chemie-grundoperationen-filtration-folien.pdf>
- UNI HOHENHEIM 2006: www.uni-hohenheim.de/lehre370/weinbau/bild_hm/morphol/beepirem.htm
- UNI ULM 2007: Abteilung für Analytische Chemie und Umweltchemie, http://www.uni-ulm.de/uni/fak/natwis/anachem/Lehrveranstaltungen/analyt_chem_hauptstud/FP-Analytische%20Chemie/FP-HPLC_SkriptSS04neu.pdf
- US DEPARTMENT OF AGRICULTURE 2003: USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, www.nal.usda.gov/finic/foodcomp
- VAN DEEMTER et al. 1956: J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, Chemical Engineering Science, Volume 5, Issue 6, (1956) 271-289
- VAN DER SLUIS 1997: van der Sluis A.A., Dekker M., Jongen W.M.F., Flavonoids as bioactive components in apple products, Cancer Letter, Vol. 114, Issues 1-2 (1997) 107-108
- VAUCK und MÜLLER 2000: Wilhelm R.A. Vauck, Hermann A. Müller, Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik, 11., überarbeitete und erweiterte Auflage, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie im Wiley-VCH; ISBN 3-342-00687-0
- VRHOVSEK et al. 1997: Urska Vrhovsek, Silvia Wendelin und Reinhard Eder; Quantitative Bestimmung von Hydroxycinnamsäuren und Hydroxycinnamsäurederivaten (Hydroxycinnamaten) in Weißweinen mittels HPLC; Mitteilungen Klosterneuburg, 47 (1997) 164-172
- WADE 2003: Nicholas Wade, Life-Extending Chemical is found in certain red wines, New York Times August 24 (2003)
- WAGNER-LÖFFLER 2006: persönliches Gespräch mit Manfred Wagner-Löffler der Firma HPLC-Service, Vertrieb der Bulk-Harze von Macherey-Nagel in Österreich
- WALLIN 1980: Wallin B.K., Process of Purified Plant Anthocyanin Colors, US Patent 4221577
- WANG et al. 2003: Chang-Zeng Wang, Ulrich H. Maier, Michael Keil, Meinhard H. Zenk, Adelbert Bacher, Felix Rohdich and Wolfgang Eisenreich, Phenylalanine-independent biosynthesis of 1,3,5,8-tetrahydroxyxanthone. A retrobiosynthetic NMR study with root

- cultures of *Swertia chirata*, European Journal of Biochemistry, Volume 270, Issue 14 (2003) 2950-2958
- WATERMAN und MOLE 1994: Analysis of Phenolic Plant Metabolites, Blackwell Scientific Publications, Oxford, ISBN 0-632-02969-2
- WATZL und LEITZMANN 2005: Watzl, B. und Leitzmann, C.; Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln, 3. Aufl., Hippokrates Verlag ISBN 3-8304-5308-6
- WATZL und RECHKEMMER 2001a: Watzl, B. and Rechkemmer, G.; Phenolsäuren; Ernährungs-Umschau, Vol.48, No.10 (2001) 413-416
- WATZL und RECHKEMMER 2001b: Watzl, B. and Rechkemmer, G.; Flavonoide; Ernährungs-Umschau, Vol.48, No.12 (2001) 498-502
- WATZL und RECHKEMMER 2002: Watzl, B. and Rechkemmer, G.; Anthocyane; Ernährungs-Umschau, Vol.44, No.4 (2002) 148-150
- WEIN-1.NET 2006: www.wein-1.net, Weininformationen aus aller Welt
- WESTFALIA SEPARATOR 2006: Werksschrift von Westfalia Separator Food Tec GmbH: Separatoren und Dekanter in Weinkellereien, Best.Nr. 9997-6933-040/305 DE, Oelde (2006)
- WESTFALIA SEPARATOR 2007: www.gea-westfalia.de
- WIKIPEDIA 2006: www.wikipedia.org/wiki/Weinau_in_Österreich
- WIKIPEDIA 2006b: <http://de.wikipedia.org/wiki/Pektin>
- WINK 1999: Wink, Michael, Functions of Plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology, Annual Plant Reviews, Volume 3, Sheffield Academic Press, Blackwell, ISBN-13: 978-0849340864
- WINKEL-SHIRLEY 2001: Brenda Winkel-Shirley; Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology, Plant Physiology, Vol 126, (2001) 485-493
- WÜRIG und WOLLER 1989: Gottfried Würig und Richard Woller, Handbuch der Lebensmitteltechnologie: Chemie des Weines, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1989, ISBN 3-8001-5815-9
- XU et al. 2002: Z. Xu, Q. Wu, J.S. Godber, Stabilities of daidzin, glycitin, genistin, and generation of derivatives during heating, J.Agric. Food Chem., 50 (2002) 7402-7406
- YAMAMOTO et al. 2007 : Shuichi Yamamoto, Masashi Hakoda, Takahiro Oda, Marito Hosono, Rational method for designino efficient separations by chromatography on polystyrene-divinylbenzene resins eluted with aqueous ethanol, Journal of Chromatography A, 1162 (2007) 50-55
- YANG 2001: F. Yang, Y. Ma, Y. Ito: Separation and purification of isoflavones from a crude soybean extract by high-speed counter-current chromatography, Journal of Chromatography A, 928 (2001) 163-170
- YANG et al. 2008: Changjun Yang, Daxiang Li, Xiaochun Wan, Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods – An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea, Journal of Chromatography B, 861 (2008) 140-144
- YILMAZ und TOLEDO 2004: Y.Yilmaz und R.T. Toledo, Health aspects of functional grape seed constituents, Trends in Food Science & Technology 15 (2004) 422-433
- YILMAZ und TOLEDO 2006: Y.Yilmaz und R.T. Toledo, Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols, Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006) 41-48

8 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Wichtige phenolische Substanzen in Pflanzen mit Grundstruktur des Skeletts (GOLDBERG 2003, BRAVO und SAURA-CALIXTO 1998, HARBORNE 1980, FRANZKE 1996, WATERMAN 1994)
- Tab. 2: Zuordnung der Weinbaugebiete zu den Bundesländern und den Weinbauregionen
- Tab. 3: Hauptkomponenten von Weintrauben
- Tab. 4: Phenolcarbonsäuren in Weinen (MONAGAS et al. 2005)
- Tab. 5: Flavonoide in *Vitis vinifera* (MONAGAS et al. 2005)
- Tab. 6: Stilbene in Weinen (MONAGAS et al. 2005)
- Tab. 7: Vitamine mit Gehalten in Traubenkernöl und Traubenmost (WÜRDIG und WOLLER 1989, UMA MAHESWARI und RAO 2005, GÖKTÜRK BAYDAR und AKKURT 2001)
- Tab. 8: Hauptkomponenten von Äpfeln (2004 FACHGRUPPE OBSTBAU, DREWS 1968)
- Tab. 9: Wichtige Polyphenole in Äpfeln, zusammengestellt von RECHNER (2001)
- Tab. 10: Vitamine in Äpfeln (FACHGRUPPE OBSTBAU 2004, DREWS 1986)
- Tab. 11: Vergleich der Membranfiltrationsverfahren (IRMLER 2001, NIELSON 2004)
- Tab. 12: Bauarten von Membranmodulen
- Tab. 13: Ansatz der Kalibrierlösungen zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode
- Tab. 14: Zusammenstellung der Reaktionsgemische zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität nach der TEAC-Methode
- Tab. 15: Ansatz der Kalibrierlösungen zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts mit der Folin-Ciocalteu-Methode
- Tab. 16: Zusammenstellung der Reaktionsgemische zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts mit der Folin-Ciocalteu-Methode
- Tab. 17: Gradientenprogramm zur Pflanzenphenolbestimmung
- Tab. 18: Ausgesuchte Pflanzenphenolstandards zur Qualifizierung und Quantifizierung von Pflanzenphenolen mittels HPLC-DAD aus Wein- und Apfeltrester
- Tab. 19: Retentionszeiten der Standardsubstanzen, Angabe der Wellenlängenmaxima und Zuordnung zur Detektion für quantitative Auswertung mittels EZChrome – Software
- Tab. 20: Verdünnungsreihe der Polyphenol-Mischstandards
- Tab. 21: Einwaagen der Urstandards zur HPLC-Analyse von org. Säuren, Zuckern, Glycerin und Alkoholen in Weinen, Apfelsaft und ihren Tresterextrakten
- Tab. 22: Herstellung der Verdünnungen der Urstandards zu Gebrauchsmischstandards zur HPLC-Analyse von org. Säuren, Zuckern, Glycerin und Alkoholen
- Tab. 23: Herstellung der Verdünnungen des Urstandards zu Gebrauchsmischstandards zur HPLC-Analyse von Apfelsäure
- Tab. 24: Herstellung der Urmischstandards und deren Verdünnung zu Kalibrierreihen
- Tab. 25: Kalibrierstandards der Gesamtproteinbestimmung
- Tab. 26: Versuchsmatrix zum enzymatischen Aufschluss und Extraktion von Polyphenolen aus Weintrestern
- Tab. 27: Herstellerangaben zu den eingesetzten Pektinasen zum biotechnologischen Aufschluss der Tresterzellwände

- Tab. 28: Versuchsmatrix zum enzymatischen Aufschluss und Extraktion von Polyphenolen aus Apfeltrestern
- Tab. 29: Kommerzielle organische Membranen
- Tab. 30: Kommerzielle NF/UF-Membranen aus keramischen Materialien
- Tab. 31: Ergebnisse der Einzel-Polyphenolgehalte aus Weintrestern
- Tab. 32: Trockenmassen und Glührückstände von Weintrestern
- Tab. 33: Trockenmassen und Klärgerade der Raffinatabtrennung mittels Vollmantel-schnecken-zentrifuge der Charge 23.01.2007
- Tab. 34: Parametereinstellungen und NTU_i der präparativen Chromatographie von Isoflavonen aus Rotklee (Vorgaben: $R \geq 1,5$ und $p_{Gesamt} \leq 10, =35$ und ≤ 70 bar)
- Tab. 35: Gradientenprogramm zur präparativen Isolierung von Polyphenolen aus Weintresterextrakten, 0,6 mL/min, 30 °C, 50 µL Aufgabevol., 500 mm Säule ODS-A 50µm
- Tab. 36: Trockenmasse und Glührückstände der Apfeltrester
- Tab. 37: Gradientenprogramm zur Analytik von phenolischen Inhaltsstoffen und Bittersäuren aus Birtreberextrakten
- Tab. 38: Detektierte und kalibrierte Substanzen mit Retentionszeiten und max. Wellenlängen
- Tab. 39: Ergebnisse der Xanthohumol-Bittersäuren-Analytik der Birtreberextrakte aus 3Kornale-Siebensternbräu und Helles-Ottakringer
- Tab. 40: Gradientenprogramm zur Analytik von Isoflavonen aus Rotklee und Sojabohnen
- Tab. 41: Retentionszeiten der Rotklee- und Soja-Isoflavon-Standards mit Angabe der Wellenlängenmaxima und der detektierten Wellenlänge
- Tab. 42: Ergebnisse der Isoflavonbestimmung in Extrakten aus Rotklee und Okara
- Tab. 43: Mögliche Byproducts der österreichischen Lebensmittelindustrie

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung und Gliederung der sekundären Pflanzenwirkstoffe

Abb. 2: Mögliche Einsatzgebiete isolierter Pflanzenextrakte (WINK 1999), ergänzt und erweitert mit WATZL und LEITZMANN (2005), GLINSMANN (1996), KOUBOVA und GUARENTE (2003), SCHROEDER (2004)

Abb. 3: Pharmakokinetik einiger wichtiger Polyphenole in Blutplasma (FLESCHHUT 2004)

Abb. 4: Die am häufigsten in Lebensmitteln vorkommenden Phenolcarbonsäuren, zusammengestellt aus WATZL und RECHKEMMER (2001a), RECHNER (2000), BADERSCHNEIDER (2000) und RADTKE et al. (1998)

Abb. 5: Ausgesuchte Chinone (RICHTER 1996, KLÖCKL 2006)

Abb. 6: Ausgesuchte phenolische Ketone Picein, Danielon und Mallotophenon (HARBORNE und BAXTER 1999)

Abb. 7: Ausgesuchte Cumarine (HARBORNE und BAXTER 1999)

Abb. 8: Strukturformeln der Chromene Precocene 1 und 2 sowie des Chromons Khellin (POLLY und TAYLOR 1999, HARBORNE et al. 1999)

Abb. 9: Ausgesuchte Xanthone (HARBORNE et al. 1999, KLÖCKL 2006, WANG et al. 2003)

Abb. 10: Ausgesuchte Stilbene, Bibenzyl Demethylbatatasin IV, Phenanthren Coelogin und Dimer ϵ -Viniferin (HARBORNE et al. 1999)

Abb. 11: Grundstrukturen des heterozyklischen Ringes bei Flavonoiden (HARBORNE 1980)

Abb. 12: Flavan-Grundstruktur und abweichende Struktur der Peltogynoid Flavane mit abweichender Nummerierung der Ringe am Beispiel des Pubeschins

Abb. 13: Grundstruktur $C_6C_3C_6$ mit Pyran-Ring, Grundstrukturen der Flavane, Isoflavane und Neoflavane (HARBORNE 1980)

Abb. 14: Oxidationsgrade am O-heterozyklischen Ring mit Zuweisung der Untergruppen

Abb. 15: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavan-3-ole

Abb. 16: Grundstruktur und wichtige Vertreter der Flavan-3,4-diole

Abb. 17: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavanone

Abb. 18: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Dihydroflavonole (Flavanonole)

Abb. 19: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavone

Abb. 20: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Flavonole

Abb. 21: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Anthocyane (Flavyliumsalse)

Abb. 22: Beispiele für Biflavonoide

Abb. 23: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Isoflavonoide

Abb. 24: Grundstruktur und wichtigste Vertreter der Neoflavonoide (HARBORNE et al. 1999, CHAN, CHANG und KUO 1997, DONNELLY et al. 2000)

Abb. 25: Strukturen von Vertretern der Tannine (CORNELL UNI 2006)

Abb. 26: Schematische Darstellung der Hauptsynthesewege ausgesuchter Pflanzenphenole

Abb. 27: Vorgeschlagerener Mechanismus zur Chalcon- und Resveratrol-Biosynthese über Polyketide (MORITA et al. 2001)

Abb. 28: Biosyntheseweg ausgesuchter Flavonoide (HARBORNE 1988, RICHTER 1996, NAKAYAMA et al. 2000)

- Abb. 29: Regionale Verteilung des weltweiten Umsatzes von Functional Food (GEDRICH et al. 2005)
- Abb. 30: Weinanbauregionen in Österreich mit Angaben der Rebflächenanteile aus dem Jahr 1999 (DOKUMENTATION ÖSTERREICHISCHER WEINE 2005)
- Abb. 31: Weinanbaugebiete Österreichs (WIKIPEDIA 2006) mit Angaben zu den Anteile der gesamten österreichischen Rebanbauflächen im Jahr 1999 (DOCUMENTATION AUSTRIAN WINE 2004)
- Abb. 32: Fließbild zur Weinherstellung (BELITZ et al. 2001, HEISS 2004)
- Abb. 33: Botanische Klassifizierung der Weintrauben und Äpfel (STRASBURGER et al. 1998, BLAICH 2000, WIKIPEDIA 2006)
- Abb. 34: Aufbau einer Weintraube mit Zuordnung wichtiger phytotomischer Bestandteile (WESTFALIA SEPARATOR 2006)
- Abb. 35: Dünnschichtschnitt einer Weintraubenbeerenhaut im Lichtmikroskop (UNI HOHENHEIM 2006)
- Abb. 36: Beispiel eines Strukturausschnitts eines Pektinstoffs (WIKIPEDIA 2006)
- Abb. 37: Ausschnitt der Struktur eines Cellulosemoleküls (STRASBURGER et al. 1998, BELITZ et al. 2001)
- Abb. 38: Herstellung von klaren und trüben Apfelsäften (HEISS 2004)
- Abb. 39: Aufbau eines Apfels mit Zuordnung wichtiger phytotomischer Bestandteile (BROCKHAUS 1996)
- Abb. 40: Aktivitätscharakteristik und Stabilitätscharakteristik von Pektinase am Beispiel von Fructozym P der Firma ERBSLÖH Geisenheim AG (HABELBECK 2006)
- Abb. 41: Gibbs'sches Phasendiagramm zur Bestimmung der Extraktionsstufen bei Kreuzstromextraktion und Gegenstromextraktion (Fest/Flüssig-Extraktion) (SATTLER 1995)
- Abb. 42: Funktionsprinzip Vollmantelschneckenzentrifuge (FLOTTWEG 2007)
- Abb. 43: Funktionsprinzip selbstentleerender Tellerseparator (WESTFALIA SEPARATOR 2007)
- Abb. 44: Überlaufzentrifuge (STIEß 1997)
- Abb. 45: Filtrationsarten Dead-End-Filtration und Crossflow-Filtration (UNI HANNOVER 2007)
- Abb. 46: Crossflow Membranfiltration als Trennmethode suspendierter oder gelöster Stoffe nach Molekülgewicht und Größe
- Abb. 47: Rückhaltungsvermögen/Ausschlussgrenze-Diagramm einer keramischen TiO₂-Membran (PEG Cut-Off 480Da, 90% Rückhaltung)(PUHLFÜRSS et al. 2000) sowie eine allgemeine Darstellung eines Rückhaltungsvermögen/Ausschlussgrenze-Diagramms
- Abb. 48: Symmetrische und asymmetrische Membranen (GLASMACHER 2007)
- Abb. 49: Konzentrationsverlauf, Konzentrationspolarisation an der Membranoberfläche (HESS 1991)
- Abb. 50: Betriebsweisen von Membrananlagen (UNI HANNOVER 2007)
- Abb. 51: Charakterisierung des Moduls
- Abb. 52: Idealisierte Modelle einer Membran (GLASMACHER 2007)
- Abb. 53: Unterteilung chromatographischer Trenntechniken (HENKE 1999)
- Abb. 54: Schema einer HPLC-Apparatur (PLENIO 2007)
- Abb. 55: Das Chromatogramm und seine Kenngrößen (MEYER 2004)

Abb. 56: Sorptionsisotherme und deren zugehörige Chromatogramme (DECKERT 1998)

Abb. 57: Beschreibung der Peakasymmetrie (MEYER 2004)

Abb. 58: Van Deemter Kurve (VAN DEEMTER et al. 1956, SCHWEDT 1994)

Abb. 59: Schemata a) Eddy-Diffusion, b) Longitudinal-Diffusion, c) Masertransfer

Abb. 60: Trennstufenzahl/Massenbeladungs-, Produktionsrate/Säulenlängen-Diagramm der präparativen Chromatographie (www.mn-net.com)

Abb. 61: Strukturformeln von ABTS-(NH₄)₂ und TroloxTMC

Abb. 62: Beispiel einer TEAC-Kalibriergeraden mit Gl. und Bestimmtheitsmaß

Abb. 63: VIS-Scan des farbigen ABTS^{•+}-Radikals mit Absorptionsmaximum bei 734 nm

Abb. 64: Reaktionskinetik zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit der TEAC-Methode

Abb. 65: Beispiel einer TPC-Kalibriergeraden mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß

Abb. 66: VIS-Scan des Molybdän-Wolfram-Komplex mit Absorptionsmaximum bei 750 nm

Abb. 67: Kinetik zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mit der Folin-Ciocalteu-Methode und Gallussäurestandards von 1 bis 300 ppm und einer Reaktionszeit von 2h

Abb. 68: Dreidimensionales I/λ/t-Chromatogramm von 29 Pflanzenphenolstandards

Abb. 69: Zweidimensionales I/t-Chromatogramm von Pflanzenphenolstandards bei 280 nm. (Zuordnung der Peaks siehe Tab. 19)

Abb. 70: Zweidimensionales I/t-Chromatogramm von Pflanzenphenolstandards bei 325 nm. (Zuordnung der Peaks siehe Tab. 19)

Abb. 71: Zweidimensionales I/t-Chromatogramm von Pflanzenphenolstandards bei 520 nm. (Zuordnung der Peaks siehe Tab. 19)

Abb. 72: RI- und UV-Chromatogramme der Standards zur Analyse der Zucker, org. Säuren, Glycerin und Alkohole in Wein- und Apfeltresterextrakten inkl. Retentionszeiten [min]

Abb. 73: Kalibrier-Chromatogramme mit Retentionszeiten der Kationen und Anionen und Chromatogramme eines methanolischen Extrakts

Abb. 74: Probenvorbereitung zur Ionenanalytik mittels Ionenchromatographie für Proben mit hohem Polyphenolgehalt

Abb. 75: Kalibriergerade Gesamtproteinbestimmung (λ =595 nm, Raumtemperatur)

Abb. 76: Verfahrensbild zur Gewinnung von sekundären Pflanzensstoffen aus Trester

Abb. 77: Extraktionsapparatur mit 250 mL Dreihalskolben, Halbmondrührer, Rückflusskühler, Thermometer und Ölbad

Abb. 78: Rührzelle (1.600 mL) mit KIKA[®]-Magnetrührer (d_{Filter}= 15 cm)

Abb. 79: Test-Membrananlage der Firma New Technology Anlagenbau GmbH

Abb. 80: Versuchsabläufe der Untersuchung zur Rückhaltung organischer Flachmembranen

Abb. 81: Beispiele für Reversed-Phase-Chromatographie Kieselgele

Abb. 82: Trockenpackverfahren der Scout-Säule mit Bulk-Materialien

Abb. 83: Aufnahmen eines sphärischen und eines gebrochenen Harzes (www.merck.de)

Abb. 84: Chromatogramme von Säulen mit inhomogenen Festbetten (LAIBLIN 2002)

Abb. 85: Gesamtphenolgehalt von Weintresterextrakten mit verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Anteilen der organischen Lösungsmittel

Abb. 86: Antioxidative Kapazität von Weintresterextrakten mit verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Anteilen der organischen Lösungsmittel

Abb. 87: Ausbeuteerhöhung durch zweite und dritte Extraktion des Weintrester-Raffinats der ersten Extraktion

Abb. 88: Konzentrations- und Ausbeute-Diagramm bei Einsatz unterschiedlicher Extraktionsmittelvolumina und Weintrester als Rohstoff

Abb. 89: Ergebnisse enzymatischer Aufschlüsse von Weintrester vor der Extraktion

Abb. 90: Vergleich der Extraktionsausbeuten von drei Rot- und drei Weißweintrestern

Abb. 91: Fluss/Zeit-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 92: Fluss/Zeit-Diagramm keramischer Membranen 8 "neu", 15 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 93: Fluss/VCF-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, Überströmgeschwindigkeit $v=6$ m/s)

Abb. 94: Fluss/VCF -Diagramm keramischer Membranen 8 (neu), 15 kDa mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 95: Fluss/Zeit-Diagramm 5 kDa keramischer Membran bei unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $VCF=4$)

Abb. 96: Fluss/VCF-Diagramm 5 kDa keramischer Membran bei unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Abb. 97: Fluss/NMWC-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa und Überströmgeschwindigkeiten von 3, 4,5 und 6 m/s mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Abb. 98: Fluss/Zeit-Diagramm keramischer Membranen 1, 3, 5, 8 kDa und Überströmgeschwindigkeiten von 3, 4,5 und 6 m/s mit Weintresterextrakt (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Abb. 99: Permeat/Zeit-Diagramm der Vorreinigung von Weintresterextrakt mittels MF-Hohlfaser-Modul MD020 CP2N Microdyn Nadir ($p_{\text{transm}}=0,5$ bar, $T_{\text{Bezug}}=25$ °C, $v=6,5$ m/s)

Abb. 100: Fluss/Zeit-Diagramm 10.000, 4.000, 1.000, 200 Dalton organische Membranen von Weintresterextrakt ($p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}= 500$ U/min)

Abb. 101: Fluss/VCF-Diagramm 10.000, 4.000, 1.000, 200 Da organische Membranen von Weintresterextrakt ($p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}= 500$ U/min)

Abb. 102: Vergleich der Rückhaltung der Keramikmembranen 1, 3, 5, 8 und 15 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Abb. 103: Vergleich der Rückhaltung der Keramikmembranen 1, 3, 5, 8 und 15 kDa mittels antioxidativer Kapazität (TEAC-Methode) (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Abb. 104: Rückhaltungen einzelner Polyphenole keramischer Membranen (Weintresterextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 105: Analytische Chromatogramme bei 280 nm vom Permeat und Retentat einer Filtration mit keramischer Membran (NMWC=8 kDa) eines Rotweintresterextrakts ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 106: Rückhaltungen organischer Säuren und Zucker keramischer Membranen (Weintrestereextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 107: Chromatogramme der Anionen und Kationen einer keramischen 8 kDa Membran (Weintrestereextrakte, $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 108: Vergleich der „absoluten“ Rückhaltungen der MF und PES-Membranen 10, 4, 1 und 0,2 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (TPC) und antioxidativer Kapazität (TEAC), bezogen auf das Rohextrakt (Weintrestereextrakte, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar)

Abb. 109: Vergleich der „relativen“ Rückhaltungen der MF und PES-Membranen 10, 4, 1 und 0,2 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (TPC) und antioxidativer Kapazität (TEAC), bezogen jeweils auf das Permeat der vorhergehenden Membranfiltration (Weintrestereextrakte, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

Abb. 110: Vergleich analytischer Chromatogramme des Retentats und Permeats der 10 kDa-PES-Flachmembran ($p_{\text{transm}}=5$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min, $V_{\text{Aufgabe}}=50$ µL)

Abb. 111: Rückhaltungen einzelner Polyphenole organischer Membranen (Weintrestereextrakte, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

Abb. 112: Rückhaltungen organischer Säuren und Zucker organischer Membranen (Weintrestereextrakte, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

Abb. 113: Chromatogramme der Anionen und Kationen des Feeds, Permeats und Retentats einer organischen 200 Da Membran (Weintrestereextrakte, $p_{\text{transm}}=30$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}=500$ U/min)

Abb. 114: Rückhaltungen einzelner Polyphenole organischer Membranen (Weintrestereextrakte inkl. 28 PP-Standards, 32 mL Rührzelle, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=21$ °C, $n_{\text{Rührer}}=880$ U/min)

Abb. 115: Vergleich analytischer Chromatogramme (280 nm) des Permeats der 4 kDa-PES-Flachmembran und des Rohextrakts inkl. zugesetzter 28 Standards, $V_{\text{Inject}}=50$ µL (32 mL Rührzelle, $p_{\text{transm}}=7$ bar, $T_{\text{Bezug}}=21$ °C, $n_{\text{Rührer}}=880$ U/min)

Abb. 116: Chromatogramm, Scout-Säule 6,5 * 300 mm, ODS-A, 120 Å, 50 µm, Laufmittel: Wasser / Ethanol (15/85,v/v), Volumenstrom: 1,3 mL/min, Druck: 35 bar, Temperatur: 40 °C, 50 µL Injektionsvolumen

Abb. 117: Chromatogramme aus der präparativen Trennung von Polyphenolen (Std 1-29) (Injektionsvolumen 50 µL, Temperatur 30 °C, Volumenstrom 0,6 mL/min, resultierende Drücke 50-80 bar, Detektion bei 280, 325 und 520 nm)

Abb. 118: Chromatogramme der präparativen Trennung von Einzelpolyphenolen membranfiltrierter Extrakte und Rohextrakte aus Blaufränkisch-Weintrester (Injektionsvolumen 50 µL, Temperatur 30 °C, Volumenstrom 0,6 mL/min, resultierende Drücke 50-80 bar, Detektion bei 280, 325 und 520 nm)

Abb. 119: Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität von Apfeltrestereextrakten mit verschiedenen Anteilen an Ethanol im Extraktionsmittel

Abb. 120: Gesamtphenolgehalt von Apfeltrestereextrakten mit verschiedenen org. Lösungsmitteln und 66 Vol% org. Lösungsmittel-Anteil im Extraktionsmittel

Abb. 121: Ausbeuteerhöhung durch zweite und dritte Extraktion des Apfeltrester-Raffinats der ersten Extraktion

Abb. 122: Ergebnisse enzymatischer Aufschlüsse von Apfeltrester vor der Extraktion

Abb. 123: Konzentrations- und Ausbeute-Diagramm bei Einsatz unterschiedlicher Extraktionsmittelvolumina, Apfeltrester

Abb. 124: Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme der Filtrationen von Apfeltresterextrakten mit keramischen Membranen mit 1, 3, 5, 8 und 15 kDa NMWC bei 6 m/s (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, Bezugstemperatur $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Abb. 125: Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme der Filtrationen von Apfeltresterextrakten mit keramischer 5 kDa Membran bei 3, 4,5 und 6 m/s sowie mit unterschiedlichen Klärgraden der Extrakte bei 6 m/s (mittlerer transmembraner Druck $p_{\text{transm}}=3,25$ bar, Bezugstemperatur $T_{\text{Bezug}}=30$ °C)

Abb. 126: Permeat/Zeit-Diagramm der Vorreinigung von Apfeltresterextrakt mittels MF-Hohlfaser-Modul MD020 CP2N von Microdyn Nadir 0,2 μm ($p_{\text{transm}}=0,5$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}= 500$ U/min)

Abb. 127: Fluss/Zeit- und Fluss/VCF-Diagramme der Filtrationen von Apfeltresterextrakten mit PES-Membranen mit 10, 4, 1 und 0,2 kDa NMWC bei 500 U/min Rührerdrehzahl ($p_{\text{transm}}=5, 7, 30$ bar, $T_{\text{Bezug}}=30$ °C, $n_{\text{Rührer}}= 500$ U/min)

Abb. 128: Vergleich der Rückhaltung der Keramikmembranen 1, 3, 5, 8 und 15 kDa mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) und antioxidativen Kapazität (TEAC-Methode) ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C)

Abb. 129: Vergleich der Rückhaltungen der 5 kDa Keramikmembran mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) und antioxidativen Kapazität (TEAC-Methode) unterschiedlich geklärter Apfeltresterextrakte (Lauf 1_(roh) = 1,0 % abschleuderbare Anteile, Lauf 2_(roh) = 0,5 %, Lauf 2_(geklärt) < 0,1%) ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C)

Abb. 130: Vergleich der Rückhaltungen der 5 kDa Keramikmembran mittels Gesamtphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Methode) und antioxidativen Kapazität (TEAC-Methode) von polierten Apfeltresterextrakten mit unterschiedlichen Überströmgeschwindigkeiten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C)

Abb. 131: Rückhaltung der anorganischen Membranen von organischer Säuren und Zuckern aus Apfeltresterextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 132: Chromatogramme zur Rückhaltung einer keramischen 5 kDa-Membran von Anionen und Kationen aus Apfeltresterextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 133: Relative und absolute Rückhaltung organischer Membranen antioxidativer Inhaltsstoffe und Phenole aus Apfeltresterextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 134: Analytische Chromatogramme bei 280 nm vom Permeat, Retentat und Feed (Permeat 1 kDa) einer organischen Membran mit NMWC von 200 Da eines Apfeltresterextrakts ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 135: Rückhaltungen organischer Membranen von organischen Säuren und Zuckern aus Apfeltresterextrakten ($p_{\text{transm}}=3,25$ bar, $T_{\text{Bezug}}= 30$ °C, $v=6$ m/s)

Abb. 136: Chromatogramme zur Rückhaltung von Anionen und Kationen aus Apfeltresterextrakten organischer Membranen

Abb. 137: Strukturen ausgewählter Bittersäuren und Xanthohumol aus Hopfen (KAC und VOVK 2007)

Abb. 138: Chromatogramme der Standards ICE-2 und Xanthohumol sowie ethanolische Extrakte der Biertreber 3Kornale-Siebensternbräu und Helles-Ottakringer sowie Spektren der Standardsubstanzen von 200 – 400 nm

Abb. 139: Ergebnisse der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehalts der Biertreberextrakte aus 3Kornale-Siebensternbräu und Helles-Ottakringer

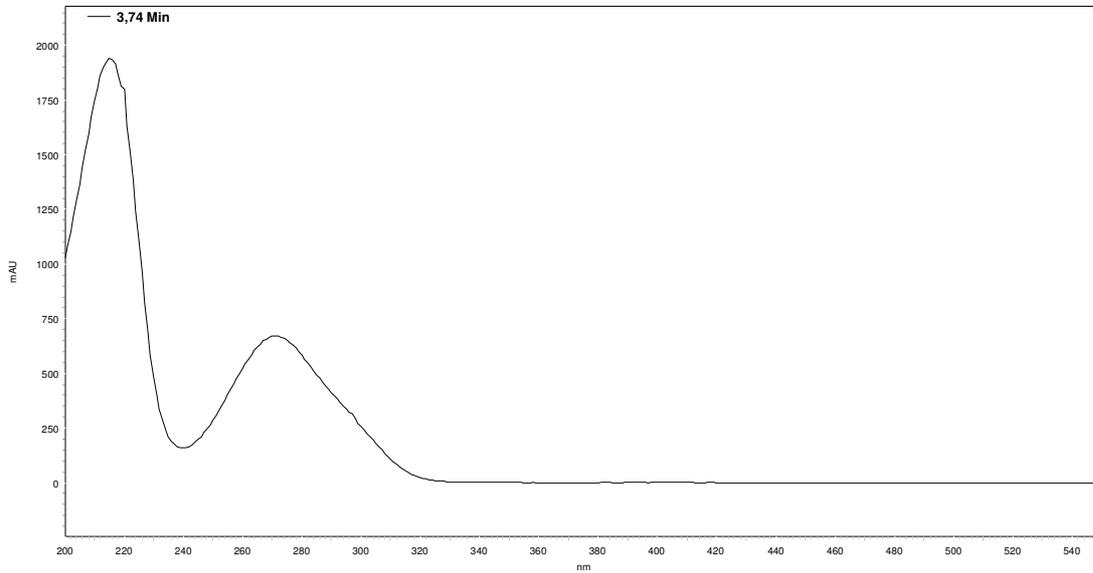
Abb. 140: Chromatogramme bei 260 nm der Isoflavonstandards sowie der Extrakte aus Rotklee und Okara

Abb. 141: Vergleich der Byproducts anhand der antioxidativen Kapazität und des Gesamtphenolgehalts

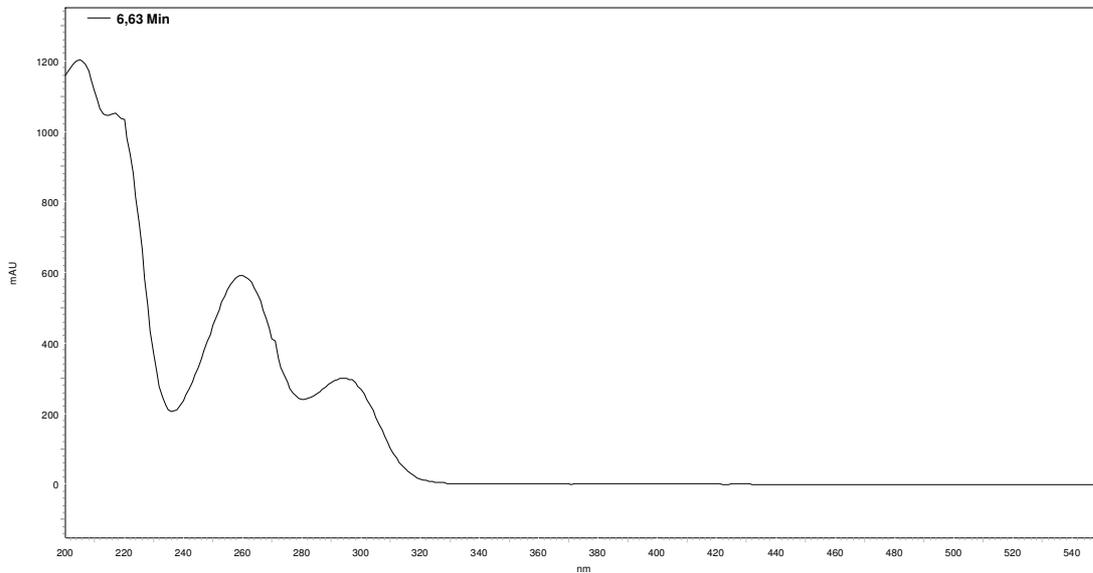
10 Anhang

Anhang I: Wellenlängenprofile der Pflanzenphenolstandards

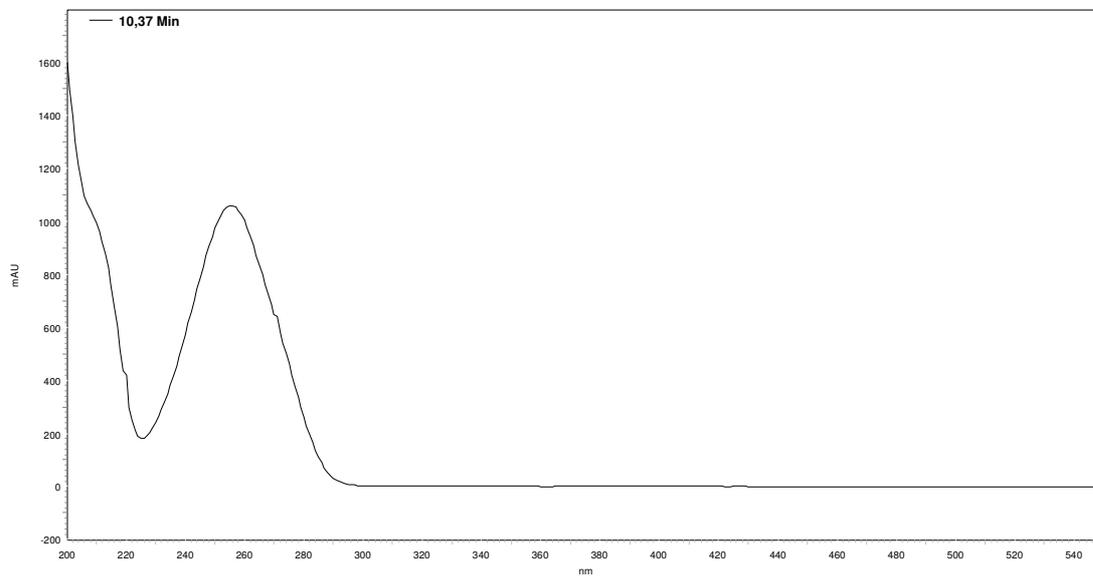
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
1	Gallussäure	215, 271	3,74	280



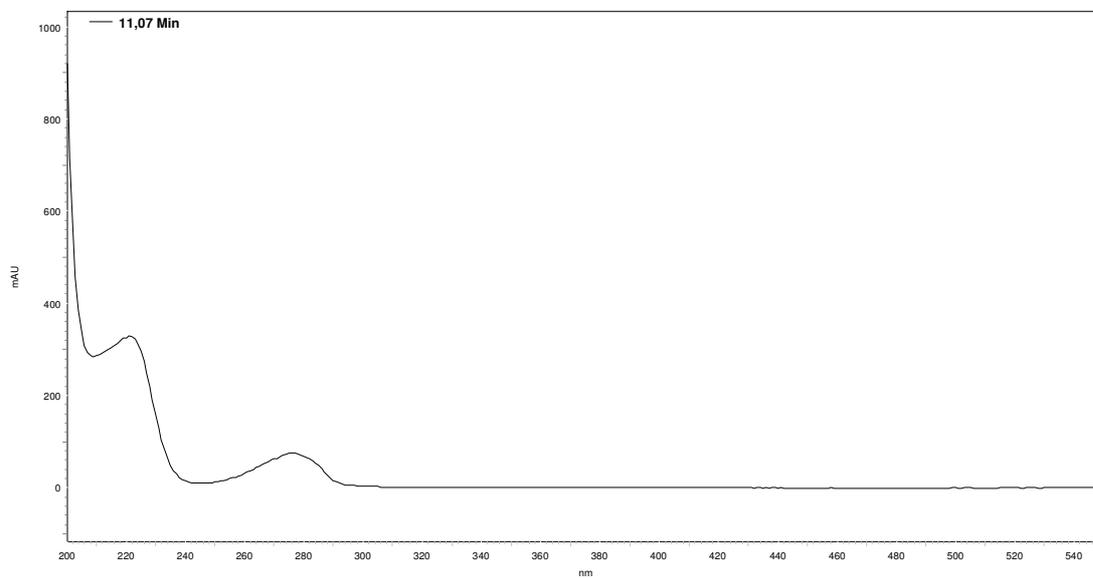
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
2	Protocatechusäure	205, 260, 294	6,63	280



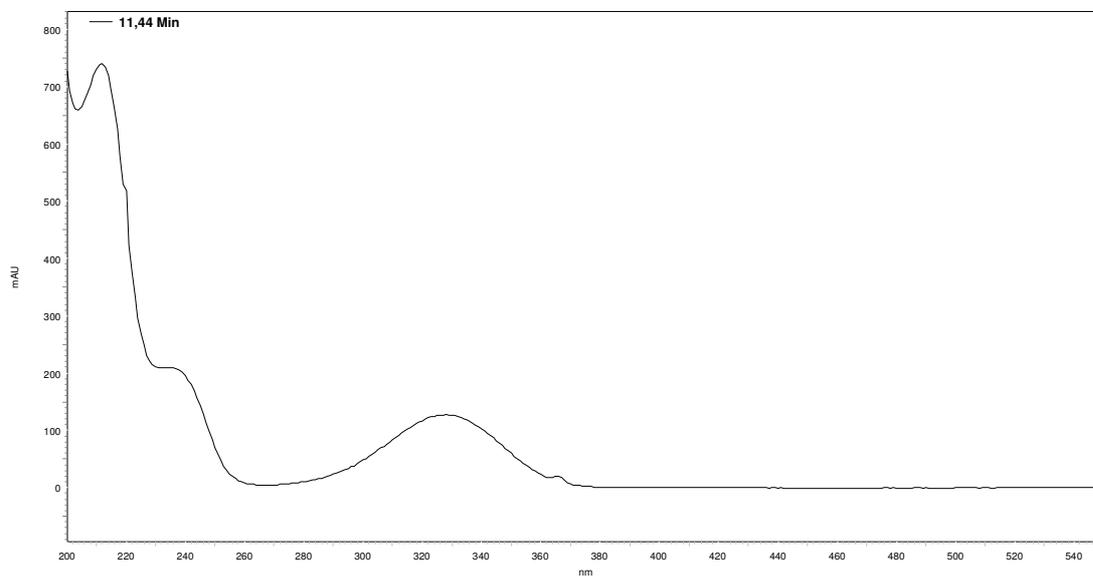
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
3	p-Hydroxybenzoessäure	256	10,37	280



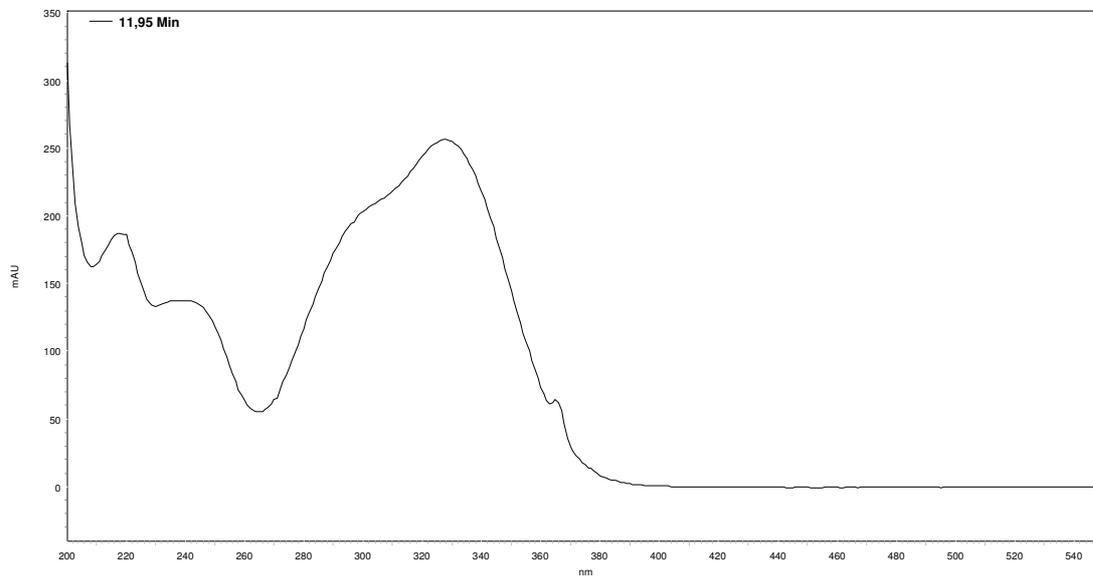
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
4	Tyrosol	220, 276	11,07	280



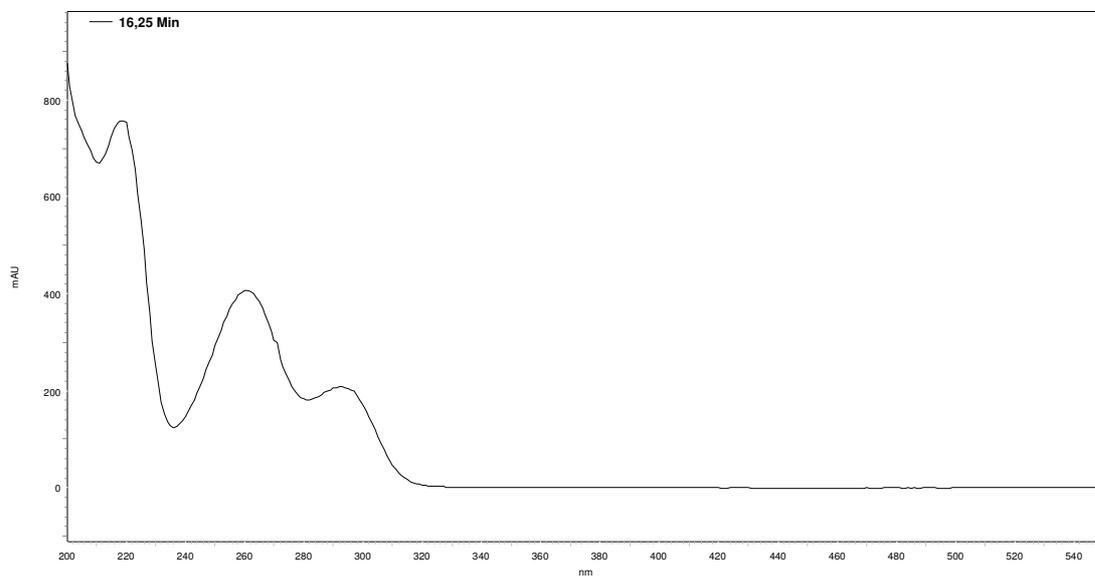
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
5	Gentisinsäure	211, 328	11,44	325



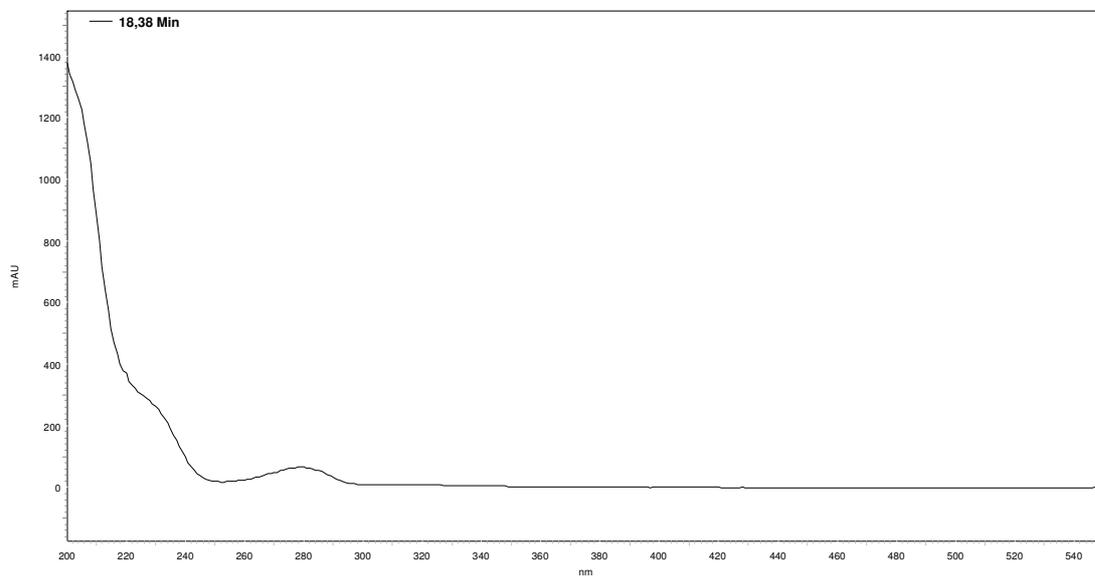
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
6	Caftarsäure	218, 238, 328	11,95	325



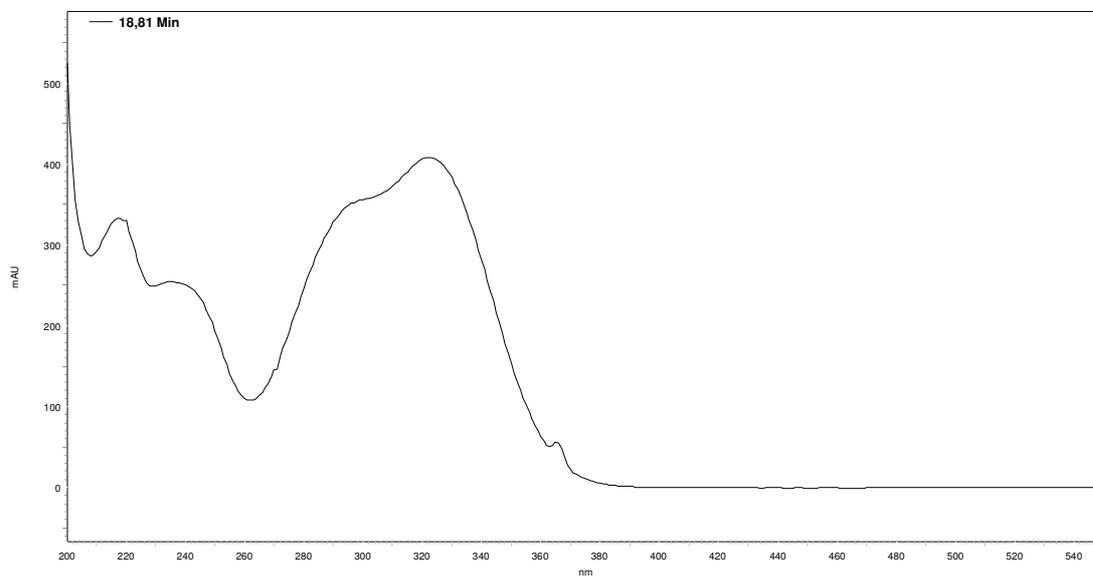
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
7	Vanillinsäure	218, 261, 292	16,25	280



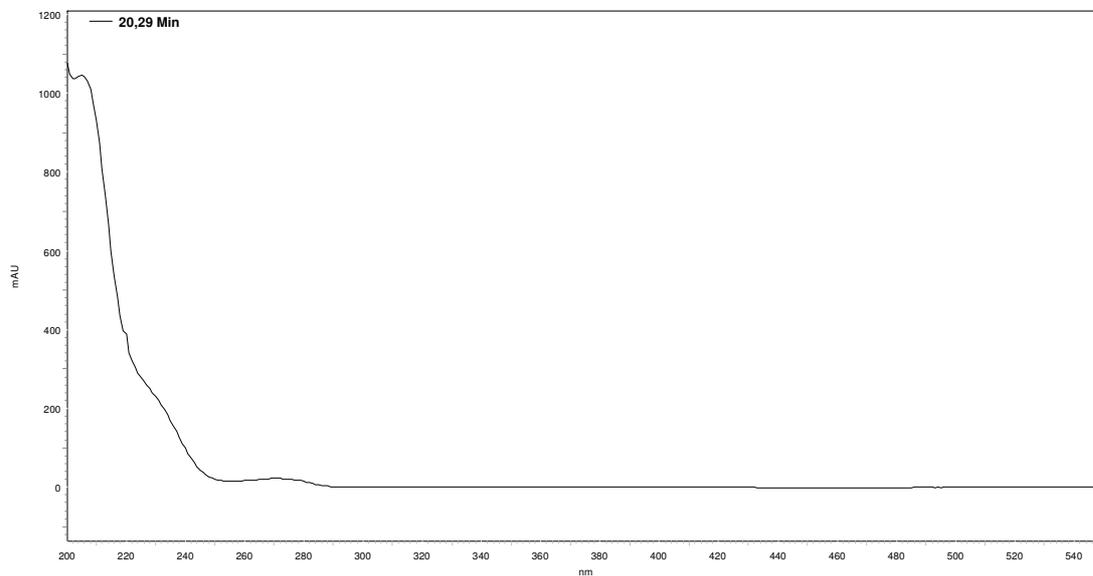
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
8	(+)-Catechin	279	18,38	280



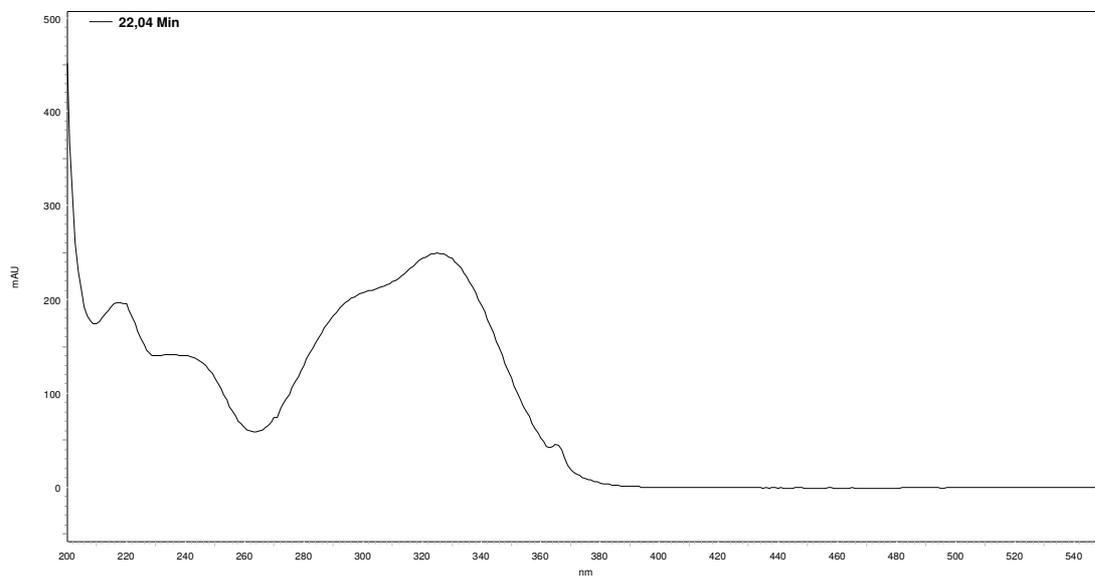
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
9	Kaffeesäure	217, 235, 322	18,81	325



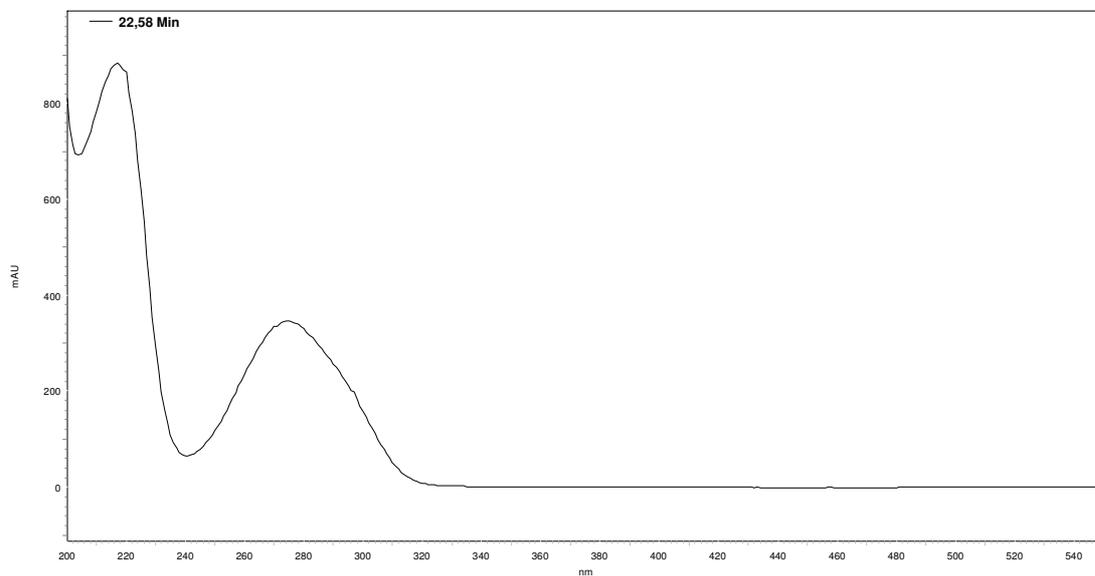
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
10	(-)-Epigallocatechin	270	20,29	280



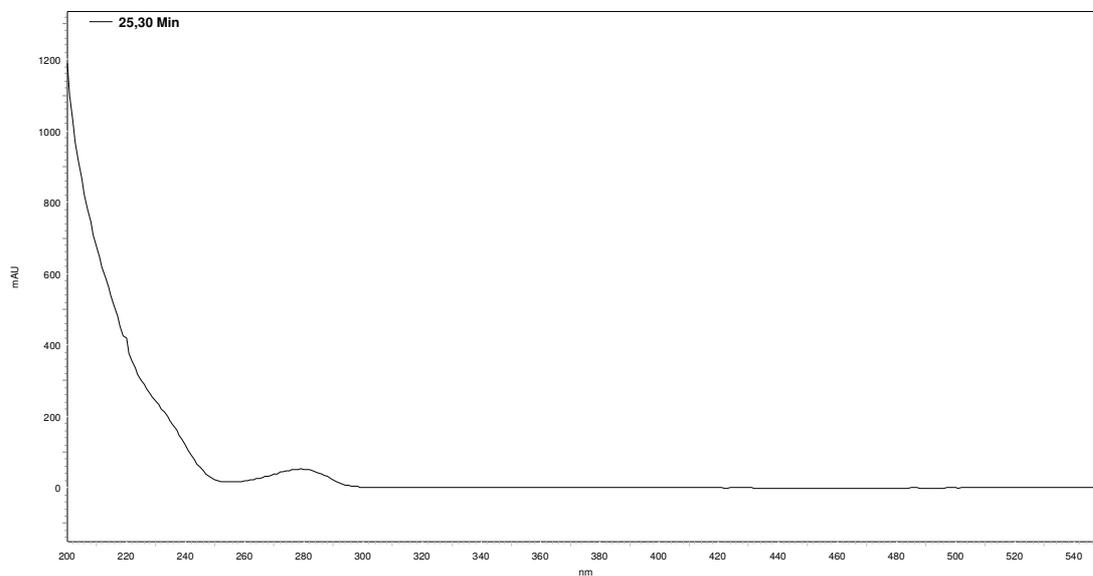
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
11	Chlorogensäure	218, 235, 325	22,04	325



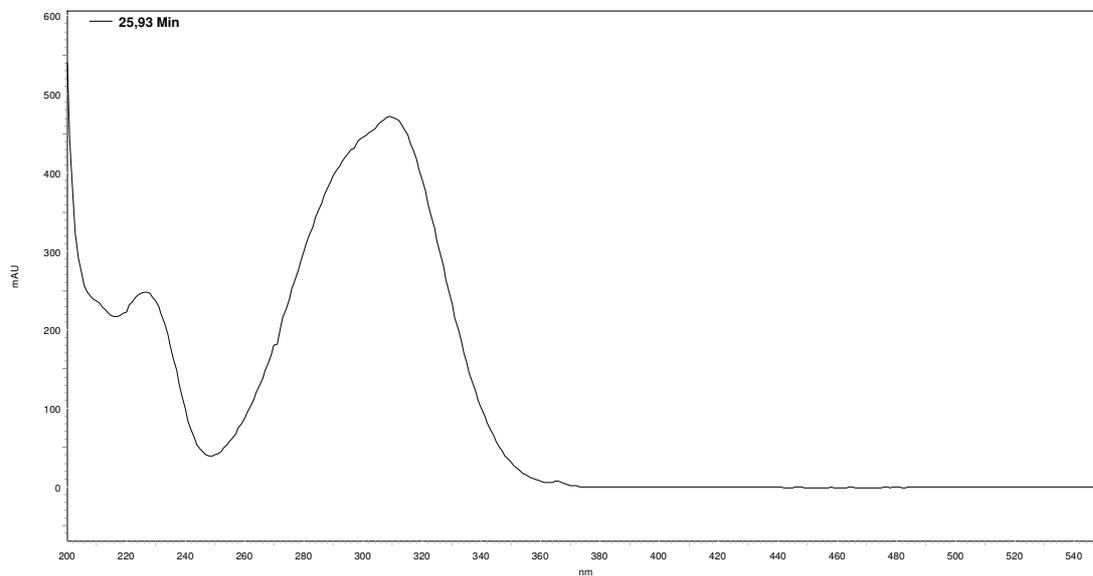
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
12	Syringasäure	217, 275	22,58	280



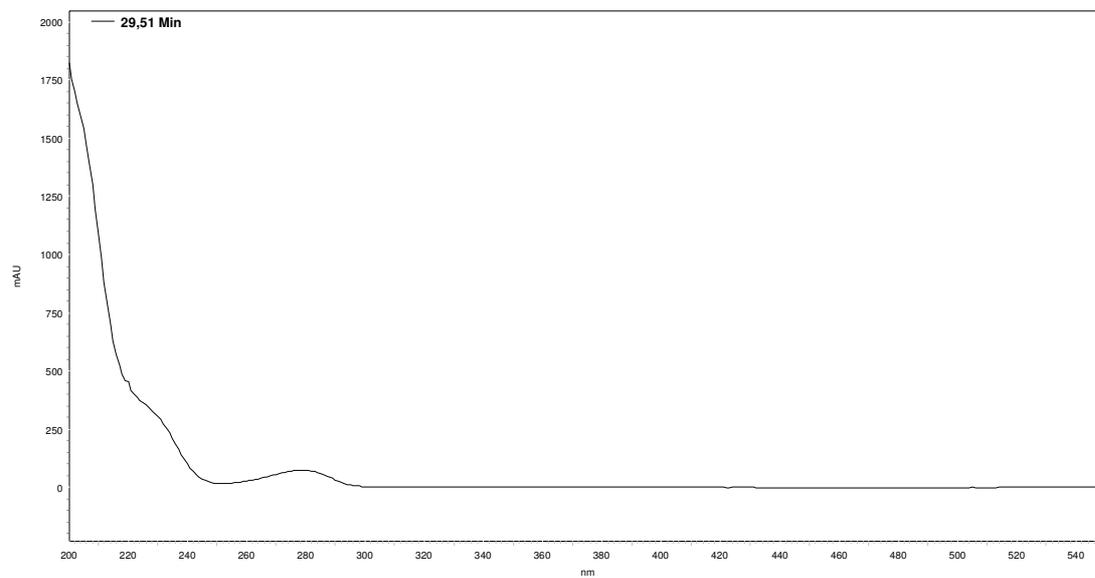
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
13	Proanthocyanidin B2	279	25,30	280



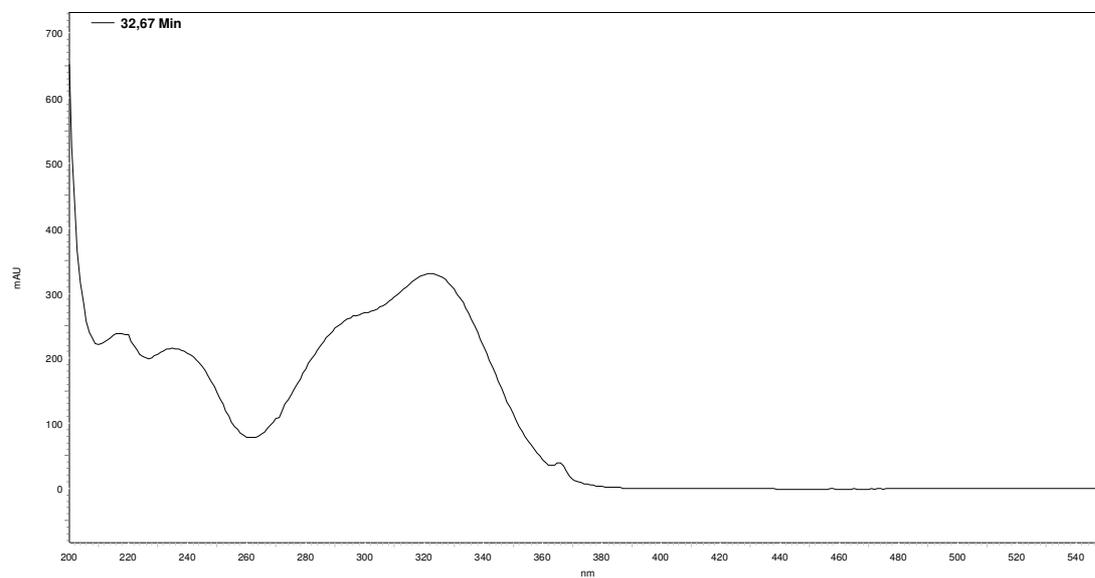
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
14	p-Cumarinsäure	226, 309	25,93	325



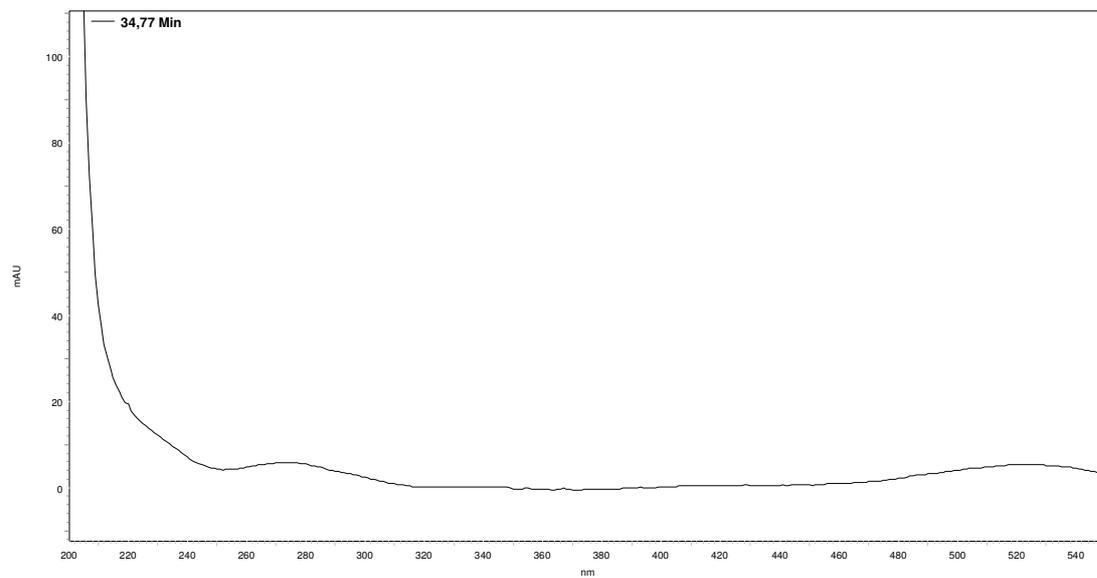
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
15	(-)-Epicatechin	278	29,51	280



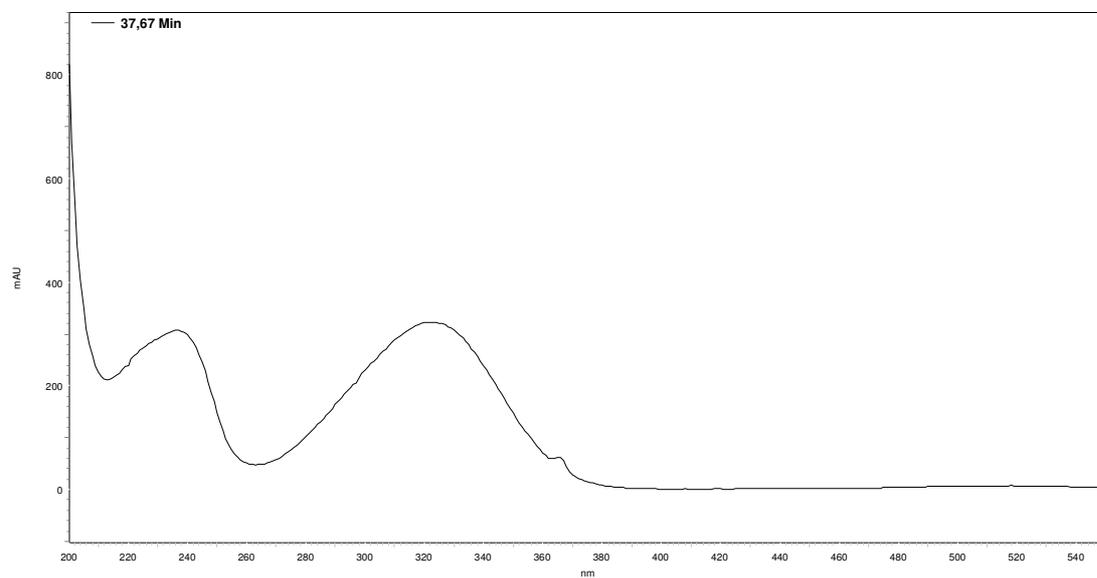
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
16	Ferulasäure	217, 235, 322	32,67	325



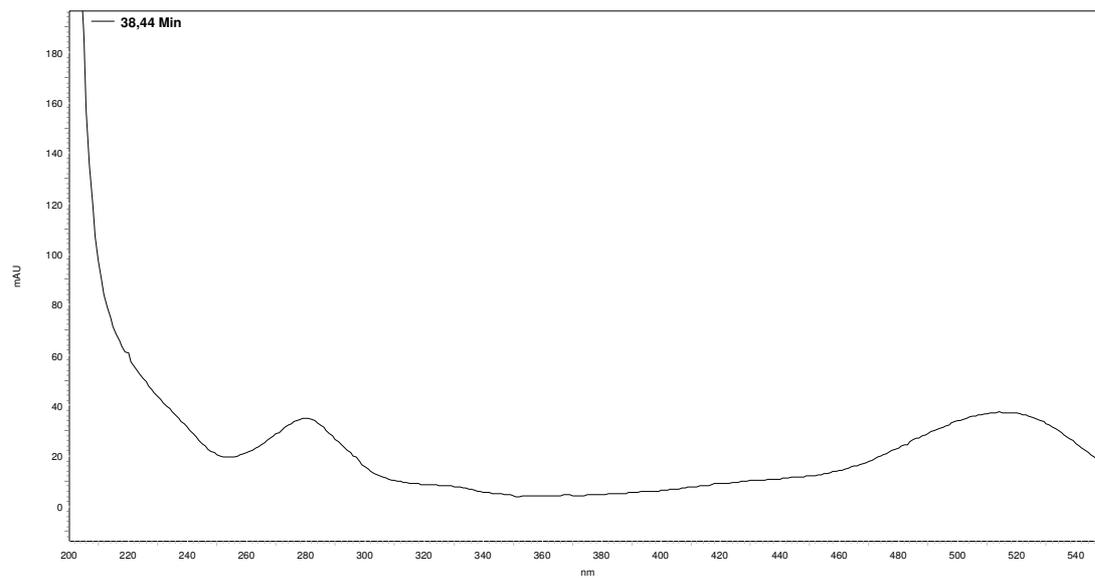
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
17	Delphinidin-3-O-Glu	274, 525	34,77	520



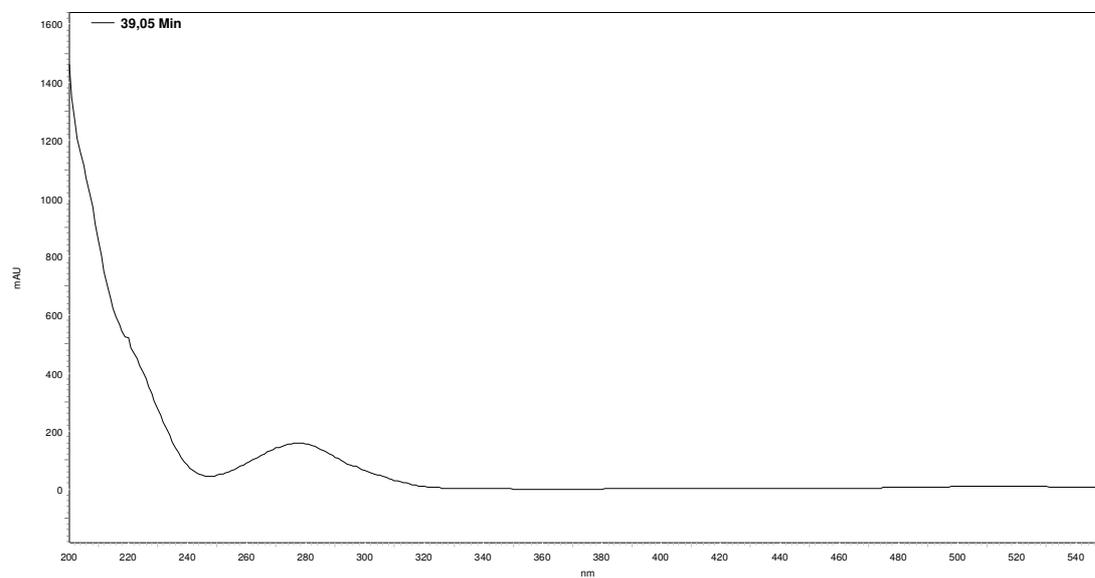
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
18	Sinapinsäure	236, 322	37,67	325



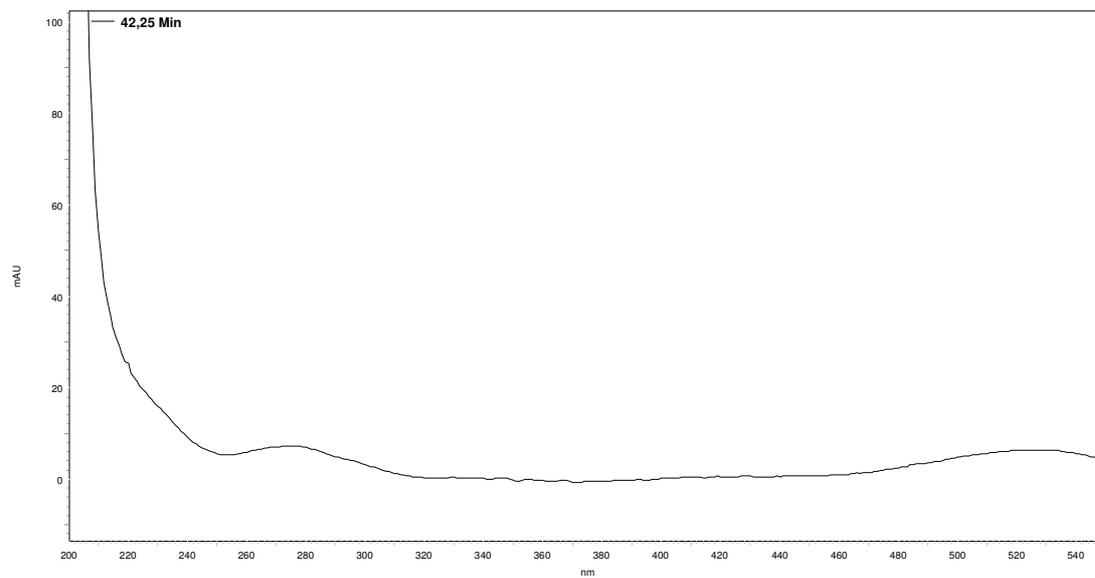
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
19	Cyanidin-3-O-Glu	280, 515	38,44	520



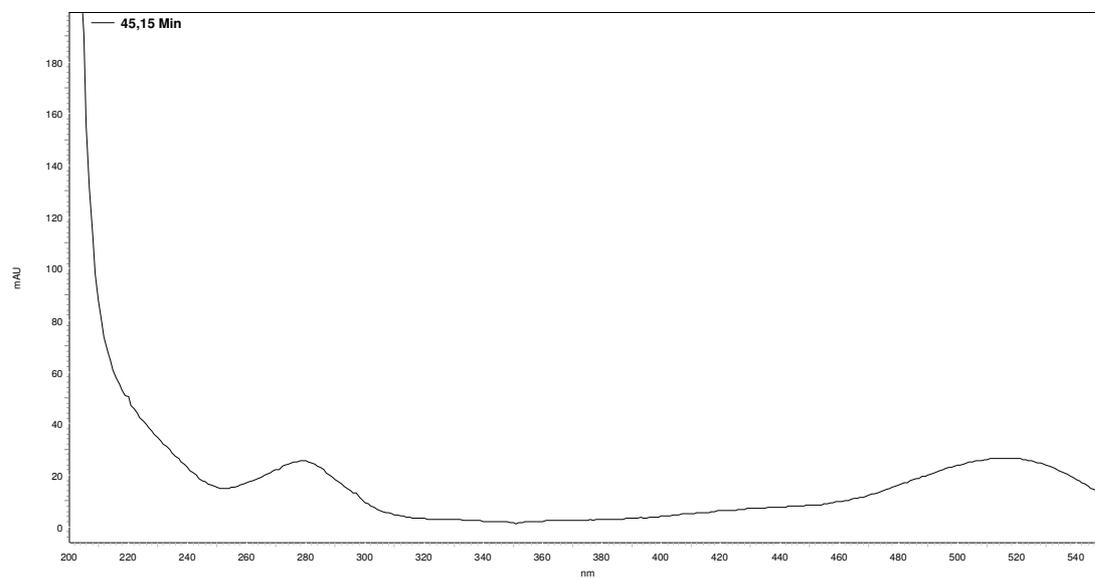
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
20	(-)-Epicatechin-3-O-gallat	277, 516	39,05	280



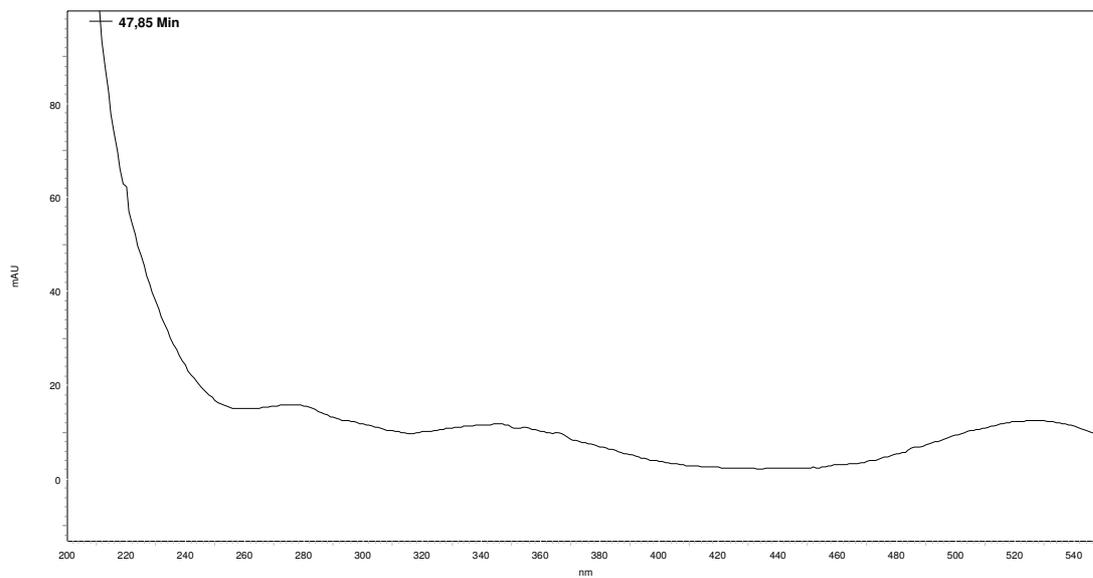
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
21	Petunidin-3-O-Glu	275, 525	42,25	520



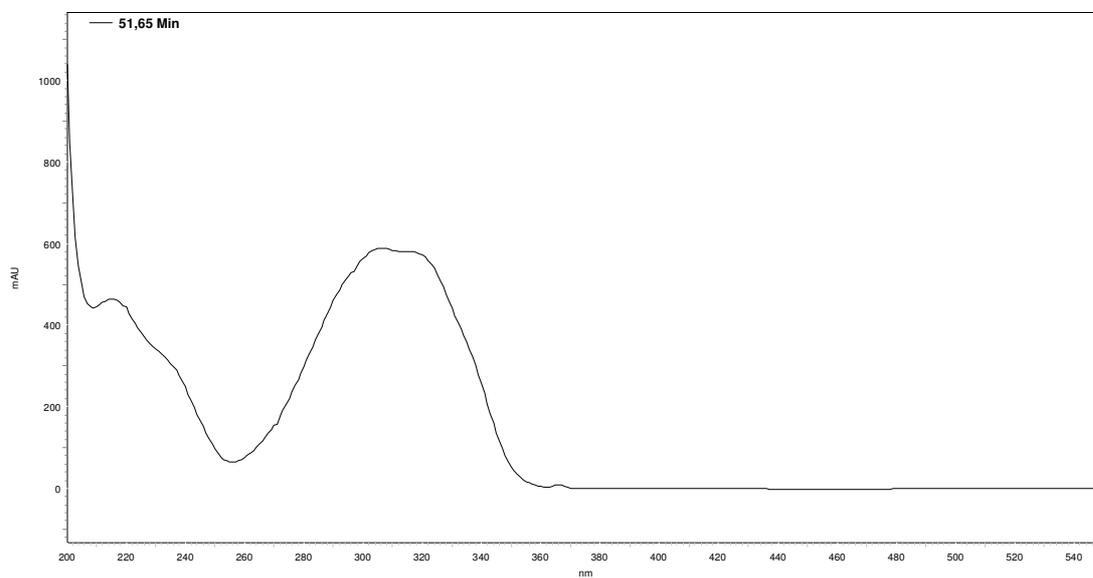
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
22	Peonidin-3-O-Glu	279, 516	45,15	520



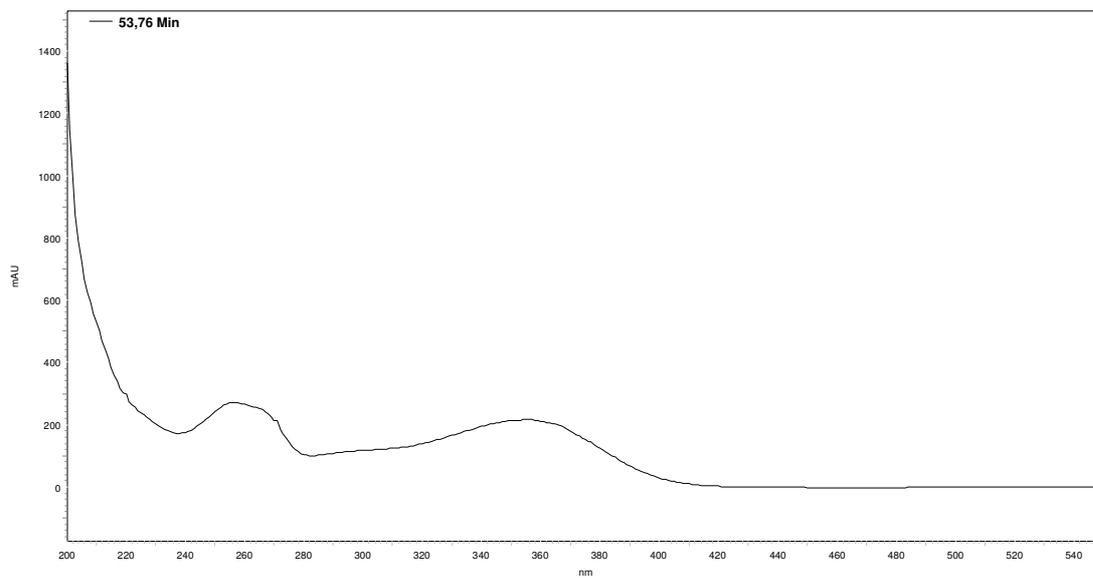
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
23	Malvidin-3-O-Glu	275, 527	47,85	520



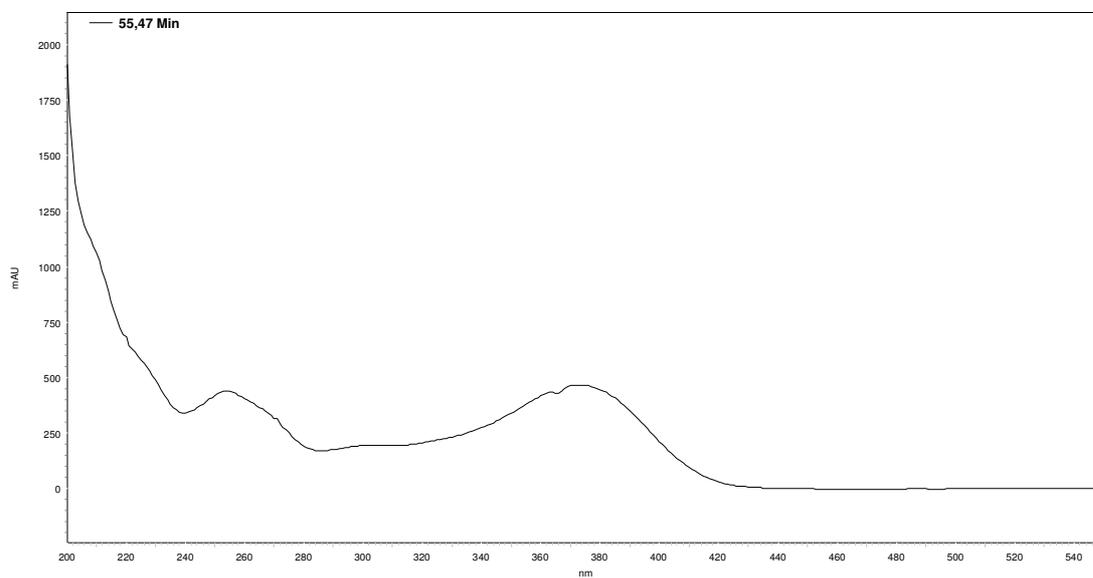
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
24	trans-Resveratrol	215, 307	51,65	325



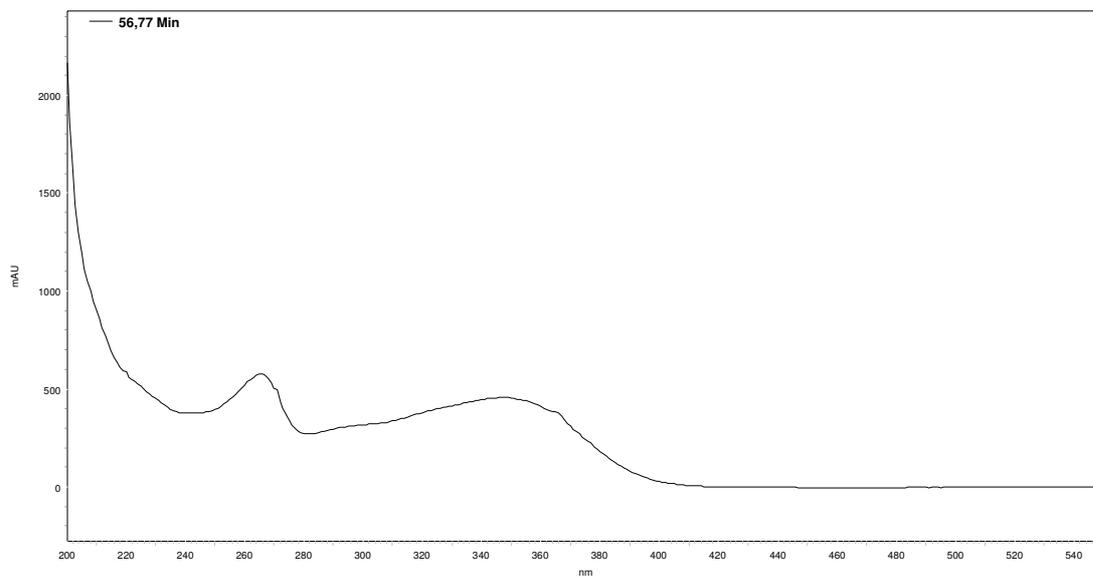
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
25	Quercetin-3-O-Glu	257, 355	53,76	325



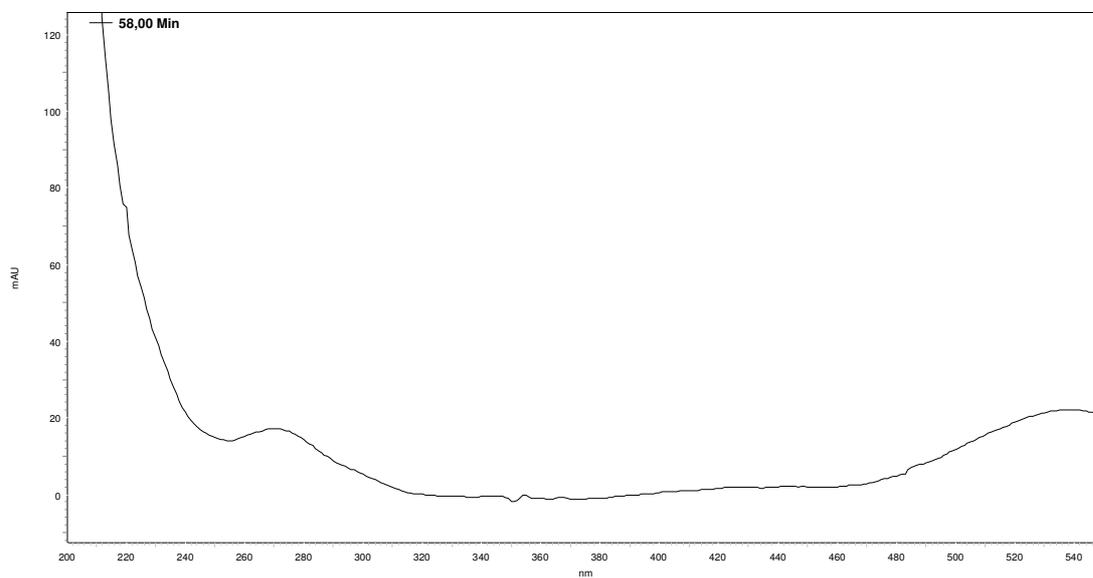
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
26	Myricetin	254, 373	55,47	325



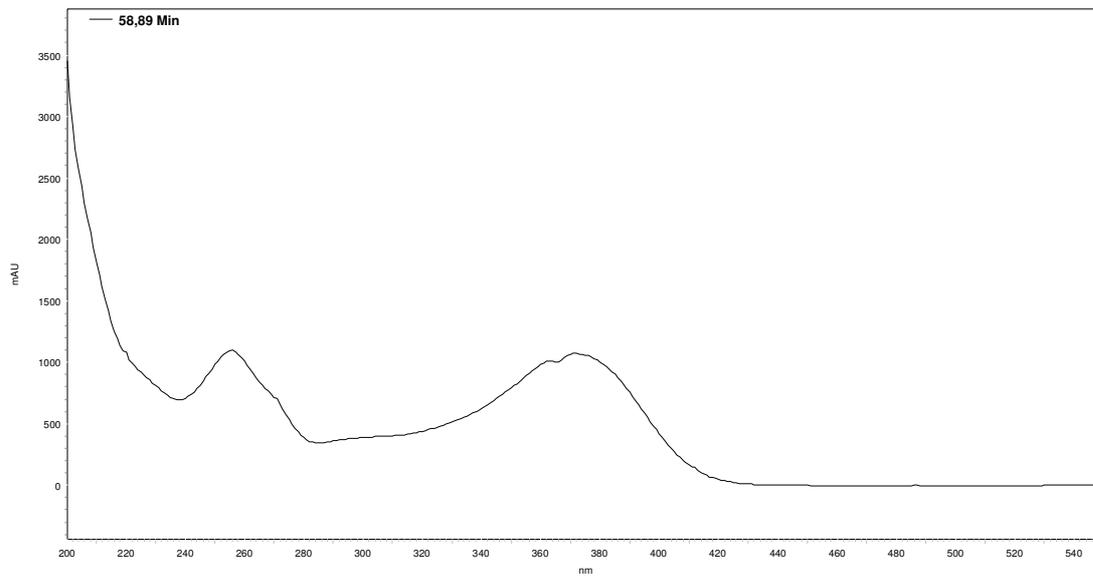
Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
27	Kämpferol-3-O-Glu	265, 347, 549	56,77	325



Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
28	Malvidin	270, 538	58,00	520



Nr.	Peak-Name	λ max [nm]	tR [min]	detected by [nm]
29	Quercetin	255, 372	58,89	280



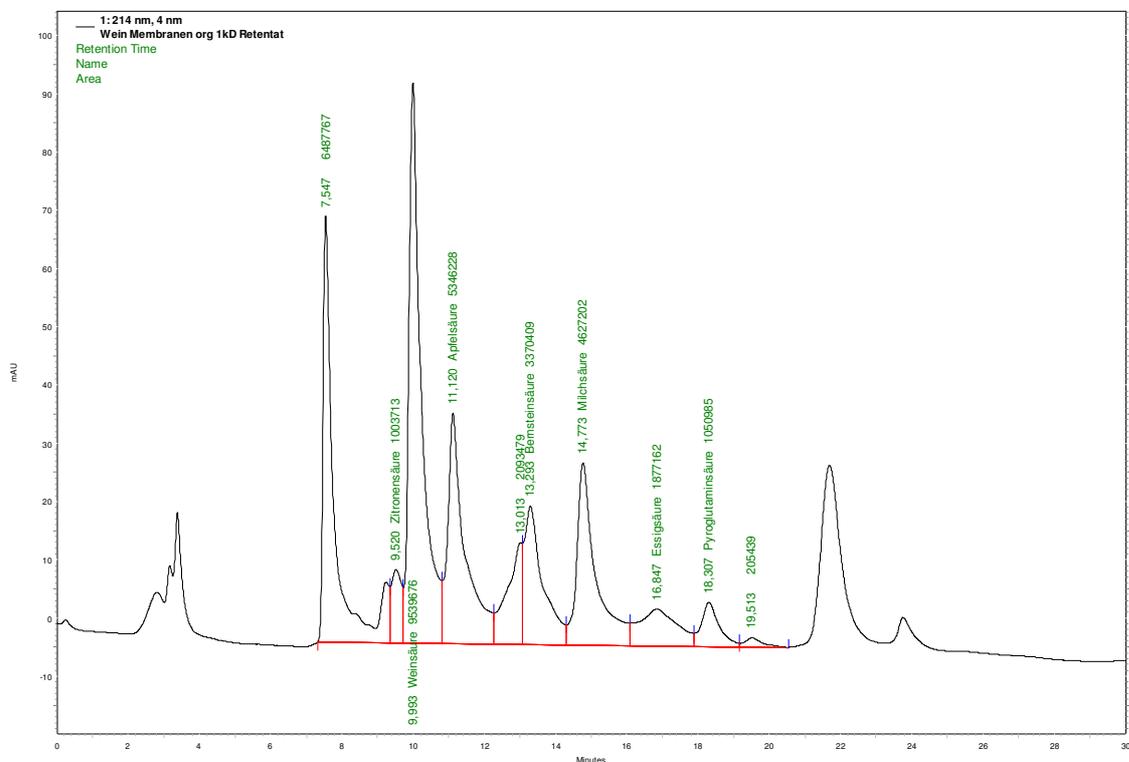
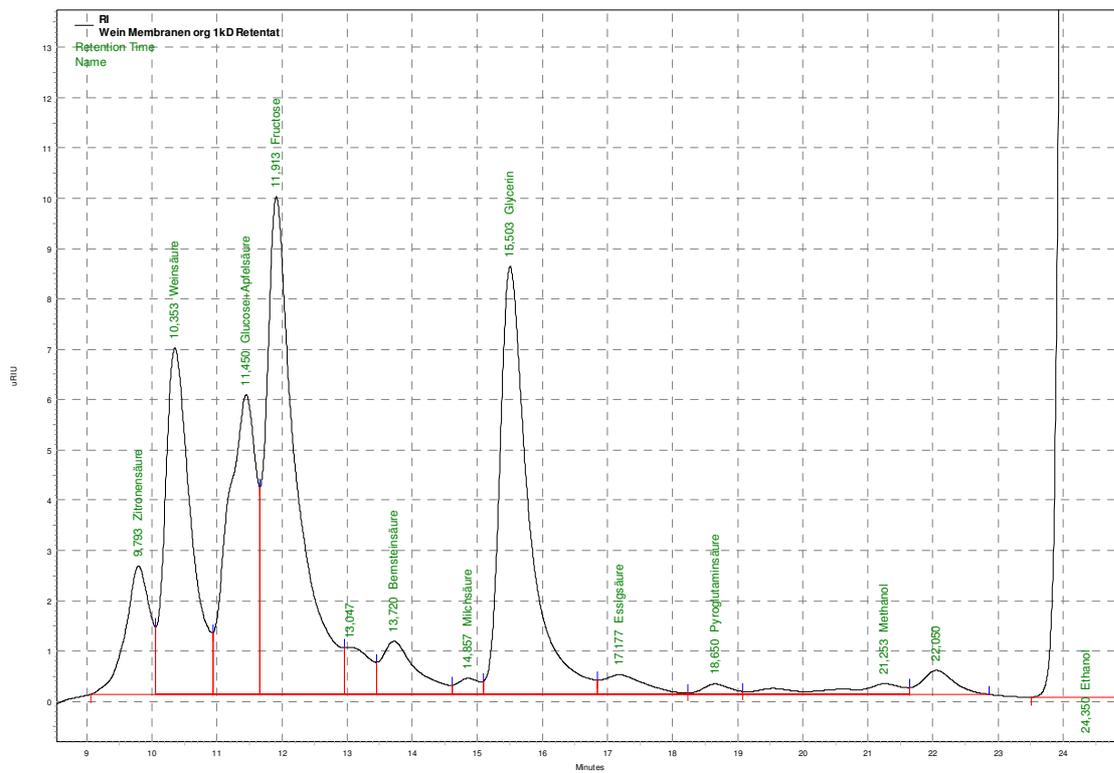
Anhang II: Beispiele von Testsubstanzen zur Bestimmung der spezifischen molekülstruktur-abhängigen Trenngrenze von Ultra- und Nanofiltrationsmembranen (IRMLER 2001)

Ultrafiltrationsmembranen		Nanofiltrationsmembranen	
Molekülmasse [g/mol, Dalton]	Testsubstanz	Molekülmasse [g/mol, Dalton]	Testsubstanz
5.200	Inulin	204	Tryptophan
10.000	Dextran T 10	342	Saccharose
12.000	A-Lactalbumin	595	Raffinose
14.600	Lysozym	761	Ponceau S
20.000	Dextran T 20	1.355	Vitamin B12
24.000	Casein	1,421	Bacitracin A
30.000	Carboanhydrase	alle Größen mit PEG = Polyethylenglykol	
33.000	Pepsin		
35.000	B-Lactoglobulin		
40.000	Dextran T 40		
64.000	Hämoglobin		
70.000	Dextran T 70		
94.000	Phosphorylase		
110.000	Dextran T 110, β -Globulin		
350.000	Sojaprotein 11S		
500.000	Dextran T 500		
2.000.000	Dextran Blau		

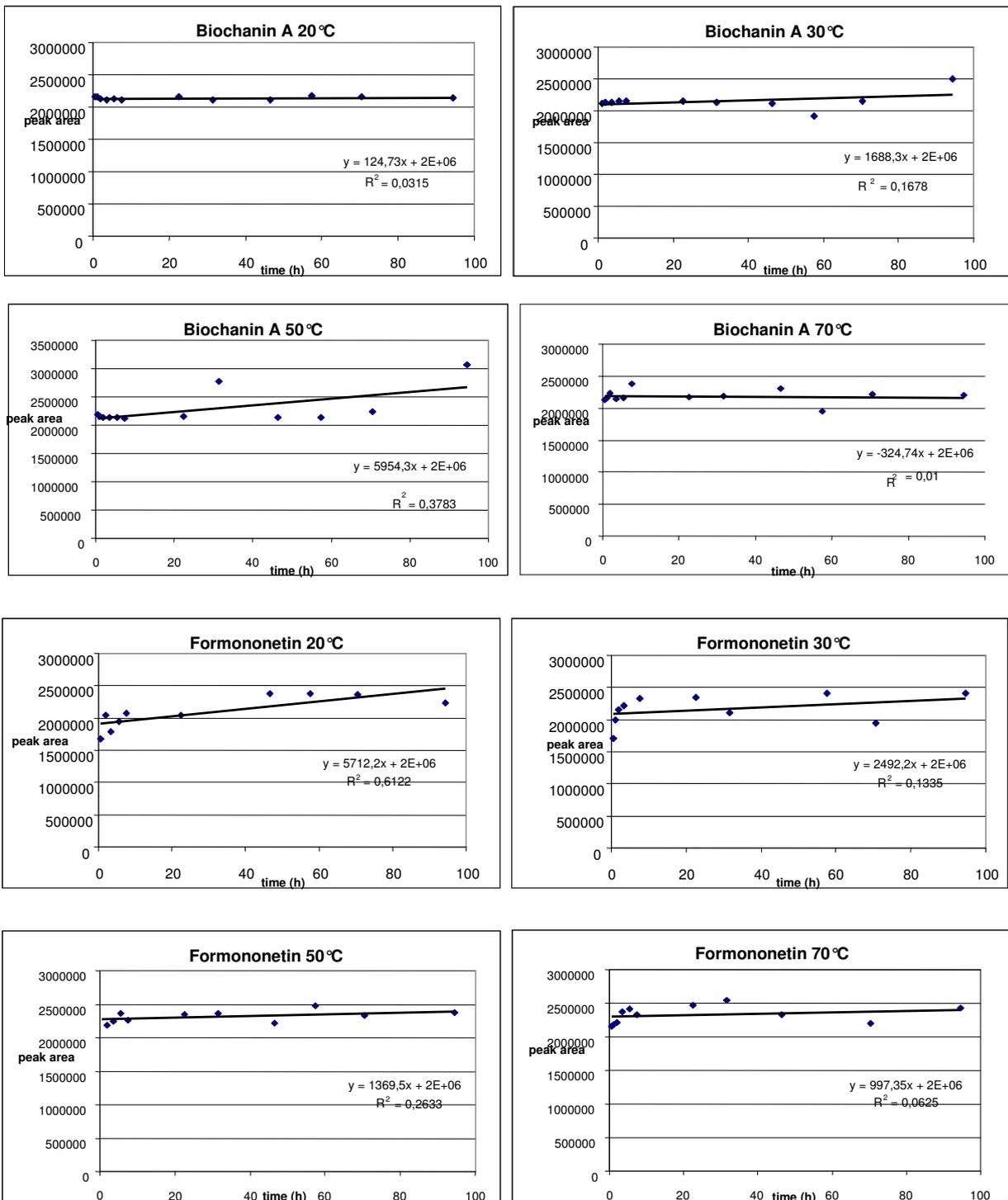
Anhang III: Auswahl von Membranmaterialien org. Polymere und Keramiken (NIELSON 2004, IRMLER 2001, OHLROGGE und EBERT 2006)

organische Polymere				
Material / Abkürzung	Verfahren			
	MF	UF	NF	UO
Zelluloseacetat / CA	x	x	x	x
Zellulosetriacetat / CTA	x	x	x	x
Zelluloseacetat-triacetatmischung / CA/CTA				x
Zellulosenitrat / CN	x			
Regenerierte Zellulose / RC	x	x		
Gelatine / GE		x		
Polyacrylnitril / PAN		x		
Polyvinylchlorid / PVC	x			
Polyamid (aromatisch) / PAN	x	x	x	x
Polysulfon / PS	x	x	x	
Polyethersulfon / PES	x	x	x	
Polyimid / PI		x	x	x
Polypropylen / PP	x			
Polytetrafluorethylen / PTFE	x			
anorganische Materialien				
Material / Abkürzung	Verfahren			
	MF	UF	NF	UO
Metallische Membranen	x			
Keramiken (oxidkeramisch z. B. Al ₂ O ₃ , TiO ₂ , ZrO ₂ , nichtoxidkeramische z. B. SiC und Glasmembranen)	x	x	x	
Kohlenstoffmembranen	x	x		

Anhang IV: Ausgesuchte Chromatogramme der Analytik zur Bestimmung der organischen Säuren und Zucker aus Weinstresextrakten
 Membranfiltrationsversuch: NMWC=1 kDa-PES, v=6 m/s, $p_{Transm}=3,25$ bar, $T_{Bezug}=30^{\circ}C$

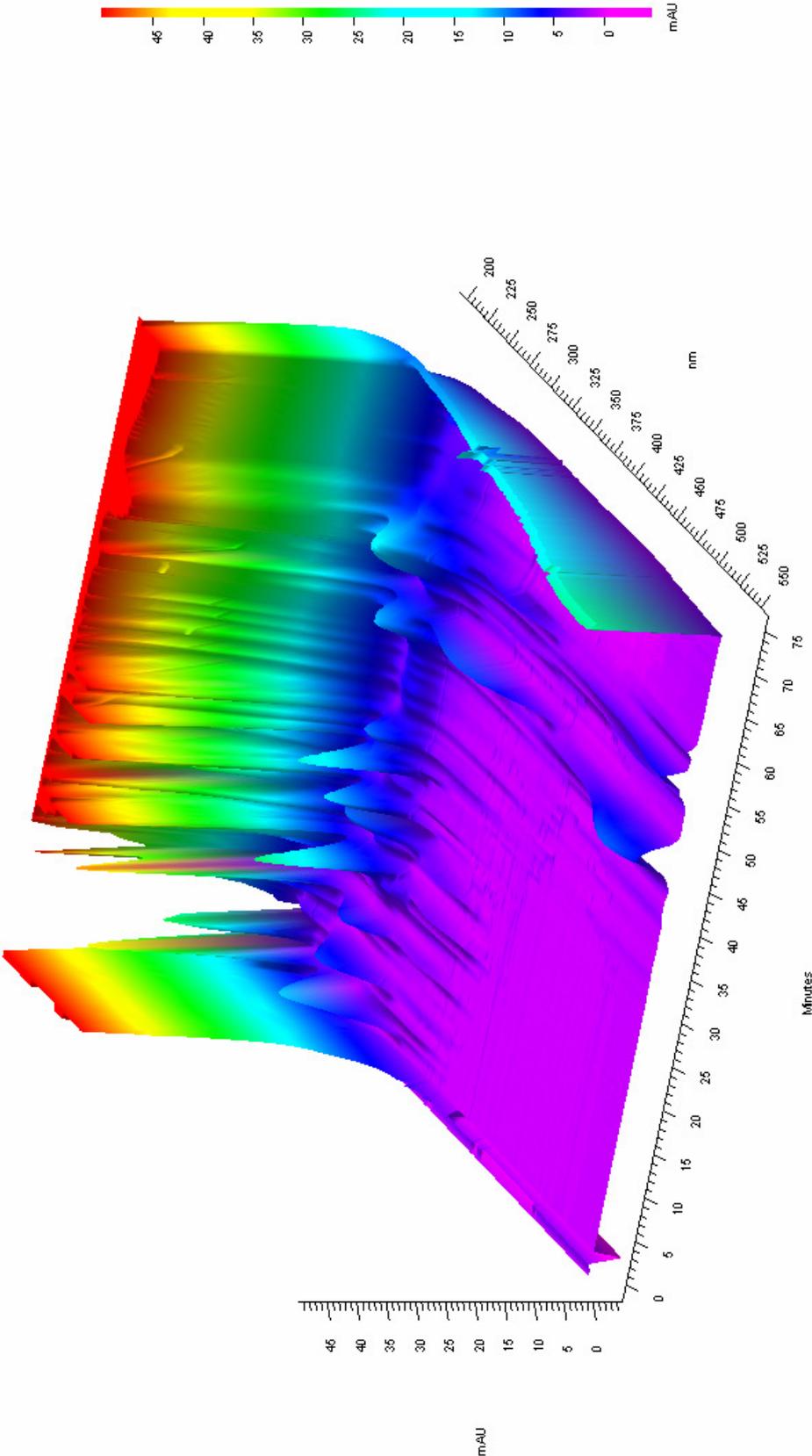


Anhang V: Temperaturstabilität der Isoflavone Biochanin A und Formononetin

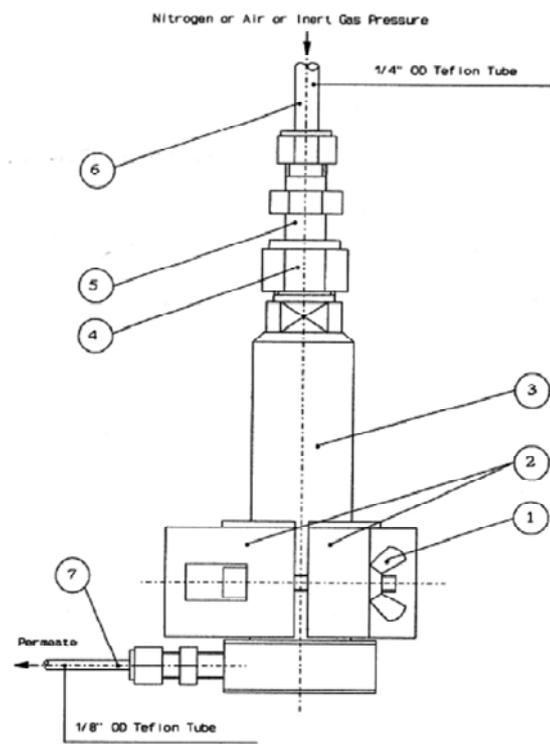


Es wurden vier Eppendorf Thermomixer (mit unterschiedlichen Temperaturen: Raumtemperatur (20°C), 30, 50 und 70°C) mit 1,5 mL PP-„Eppis“ mit jeweils 10*500 µL der durch präparative Chromatographie gewonnenen Fraktionen Biochanin A und Formononetin bestückt und nach definierten Zeiten entnommen und bei -30 °C bis zur HPLC-Analytik eingefroren. Die Ergebnisse der Temperaturempfindlichkeit sind in den oben dargestellten Peak-Area/Zeit-Diagrammen dargestellt. Daraus ist zu sehen, dass die Konzentrationen der beiden Isoflavone nicht abnehmen, sondern geringfügig ansteigen, was mit einer geringen Verdunstung durch die nicht absolut dicht verschließbaren Kunststoff-„Eppis“ zu erklären ist. Es ist somit von einer vernachlässigbaren Temperaturempfindlichkeit im Zeitrahmen von 100 h und Temperaturen bis 70 °C auszugehen.

Anhang VI: 3D-Chromatogramm des Feeds zur 1 kDa-Filtration mit keramischen Membranen

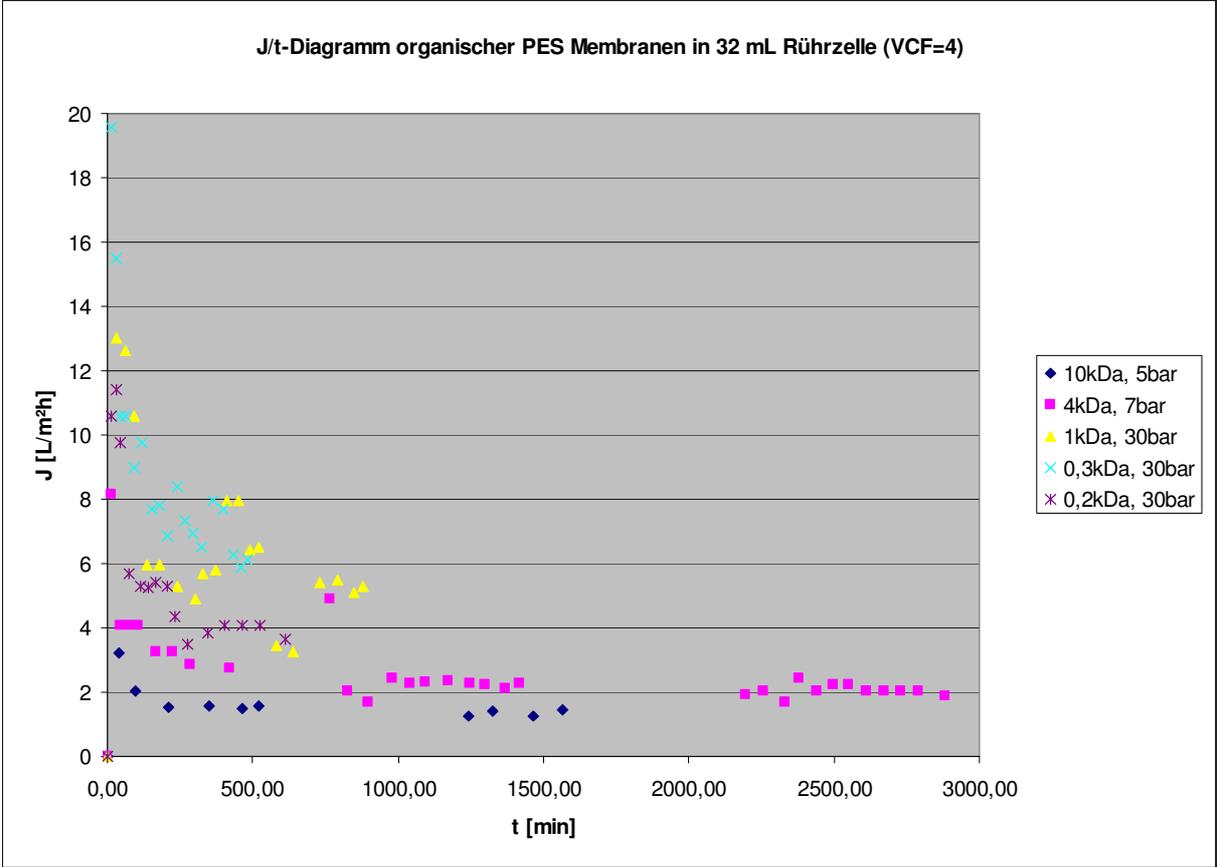


Anhang VII: Rührzelle der Firma Membrane Products Kiryat Weizmann Ltd.



- 1 Flügelschauben
- 2 Clamp
- 3 Rührzellenkörper
- 4 Überwurfmutter
- 5 Reduzierstück
- 6 Stickstoffanschluss
- 7 Permeatabnahme

Anhang VIII: Fluss/Zeit-Diagramm 10.000, 4.000, 1.000, 300, 200 Dalton organische Membranen von Weintrestereextrakt ($p_{transm}=5, 7$ und 30 bar, $T_{Bezug}=20$ °C, $n_{Rührer}= 880$ U/min)



Anhang IX: Tabelle zu Abb. 114: Rückhaltungen einzelner Polyphenole organischer Membranen (Weintrester-extrakte inkl. 28 PP-Standards, 32 mL Rührzelle, $p_{\text{transm}}=5, 7$ und 30 bar, $T_{\text{Bezug}}=21$ °C, $n_{\text{Rührer}}=880$ U/min)

Rückhaltung [%] 10 kDa Membran	Rückhaltung [%] 4 kDa Membran	Rückhaltung [%] 1 kDa Membran	Rückhaltung [%] 0,3 kDa Membran	Rückhaltung [%] 0,2 kDa Membran	Detektion bei 280 nm
21,36	19,67	33,29	44,13	87,66	Gallussäure
10,74	11,49	21,87	27,09	76,78	Protocatechusäure
10,55	6,40	13,82	15,47	65,75	p-Hydroxybenzoesäure
78,57	79,26	83,39	93,34	99,53	Tyrosol
12,16	12,64	24,16	28,41	87,07	Vanillinsäure
52,82	61,82	72,76	80,41	98,58	(+)-Catechin
80,98	78,96	86,34	91,23	100,00	(-)-Epigallocatechin
22,75	25,53	40,50	53,86	95,91	Syringasäure
65,16	64,87	70,15	73,83	95,31	Proanthocyanidin B2
49,94	59,66	71,25	79,46	98,48	(-)-Epicatechin
89,45	94,74	96,49	97,09	95,97	(-)-Epicatechin-3-O-Gallat
83,13	83,41	91,15	93,59	100,00	Quercetin
					Detektion bei 325 nm
25,37	19,53	40,27	67,20	94,11	Caftarsäure
25,37	100,00	100,00	100,00	100,00	Gentisinsäure
15,32	9,52	21,89	28,20	81,21	Kaffeesäure
71,64	86,38	91,97	96,93	100,00	Chlorogensäure
15,16	1,11	12,72	16,92	73,22	p-Cumarinsäure
21,76	14,13	30,80	39,84	90,78	Ferulasäure
36,93	36,40	53,39	66,52	97,46	Sinapinsäure
49,28	30,88	58,64	65,16	94,47	trans-Resveratrol
77,53	91,29	94,76	96,77	100,00	Quercetin-3-O-Glu
73,35	66,25	82,47	88,55	99,97	Myricetin
71,94	88,28	92,57	95,16	100,00	Kämpferol-3-O-Glu
					Detektion bei 520 nm
93,70	100,00	100,00	100,00	100,00	Delphinidin-3-O-Glu
86,99	100,00	100,00	100,00	100,00	Cyanidin-3-O-Glu
81,87	100,00	100,00	100,00	100,00	Petunidin-3-O-Glu
97,06	100,00	100,00	100,00	100,00	Malvidin-3-O-Glu
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	Malvidin

11 Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumaroyl-CoA-Ligase
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure
ANS	Anthocyanidin-Synthasen
AS	amtlichen Sammlung
AUS	Auron-Synthase
Bgld	Burgenland
BRD	Bundesrepublik Deutschland
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CCC	centrifugal counter-current chromatography
CE	(+)-catechin equivalents
CHI	Chalcon-Isomerase
CHS	Chalcon-Synthase
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Co-Enzym A
CPC	centrifugal partition chromatography
DAD	Dioden-Array-Detector
DCCC	droplet counter-current chromatography
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
F3'5'H	Flavonoid-3',5'-Hydroxylasen
F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylasen
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FCR	Folin-Ciocalteu-Reagenz
FLS	Flavonol-Synthasen
FNS	Flavon-Synthase
GA	Gallic acid
GAE	gallic acid equivalents,
GC	gas chromatography
GLC	gas liquid chromatography
GSC	gas solid chromatography
HLA	Höhere Bundeslehranstalt
HCCC	high-speed counter-current chromatography
HETP	height equivalent to a theoretical plate
HIDH	Hydroxyisoflavanonhydrogenase
HPLC	high performance liquid chromatography
HPRG	hydroxyprolinreiche Glykoproteine
HSCCC	high-speed counter-current chromatography
IFS	Isoflavon-Synthase
K	Kärnten
LAR	Leucoanthocyanidinreduktase
LC	liquid chromatography
LLC	liquid liquid chromatography
LM	Lebensmittel
LMBG	Lebensmittelbundesgesetz
MeOH	Methanol

MF	Mikrofiltration
MS	Massenspektroskopie
MWCO	molecular weight cut-off
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NF	Nanofiltration
NMWC	nominal molecular weight cut-off
NÖ	Niederösterreich
NTU	number of transfer units
OÖ	Oberösterreich
OPC	oligomere Procyanidine
ORAC _{PE}	oxygen radical absorbing capacity
Org.	Organisch
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PBS	Phosphate buffered saline
PC	papire chromatography
PE	Pektinesterase
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethersulfon
PKS	Polyketid-Synthase
PO	Phenoloxidasen
PP	Polypropylen bzw. Polyphenole
PPO	Polyphenoloxidasen
RI	infrarotes Licht
RL	Richtlinien
RLCC	rotation locular counter-current chromatography
RP	reversed phase
S	Salzburg
SFC	supercritical fluid chromatography
SO ₂	Schwefeldioxid
SPS	Sekundäre Pflanzenstoffe
Stmk	Steiermark
STS	Stilben-Synthase
T	Tirol
TAC	total antioxidant capacity
TC	thin layer chromatography
TEAC	Trolox-Equivalent-Antioxidative-Capacity
TM	Trockenmasse
TPC	total phenolic content
UF	Ultrafiltration
UFGT	UDP-Glucose/Flavonoid Glucosyltransferase
UO	Umkehrosmose
USA	united stats of america
UV	ultraviolettes Licht
V	Vorarlberg
VCF	Volumenkonzentrationsfaktor
VIS	visuelles Licht
VO	Verordnungen
W	Wien

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Ulf Jens Schubert
Adresse Kriemhildplatz 10/15
A – 1150 Wien
Geburtstag 13.09.1972
Geburtsort Darmstadt / Hessen
Land Deutschland
Staatsbürgerschaft deutsch
Familienstand ledig
Universität Universität für Bodenkultur Wien

Ausbildung

bis 1990 Realschule „Martin - Buber - Schule“ in Heppenheim
1990 – 1993 Ausbildung zum Chemikant, Firma „Carl Freudenberg“ in Weinheim
1993 – 1994 Fachoberschule „Peter - Behrens - Schule“ in Darmstadt, Fachbereich chemische/physikalische Technik
1994 – 1995 Grundwehrdienst, 2./ABC-Abwehrbataillon 750 in Bruchsal
1995 – 2000 Studium „Fachhochschule Darmstadt“, Fachbereich Chemische Technologie, Diplomarbeit an der „HBLVA für chemische Industrie“ in Wien, Fachhochschul-Abschluss: Dipl.-Ing.(FH)
2001 – 2004 Fernstudium „Universität Rostock“, Umweltschutz mit Fachstudium „technischer Umweltschutz“, Diplomarbeit an der „Universität für Bodenkultur Wien“, Universitäts-Abschluss: Dipl.-Umweltwiss.
2004 – 2008 Dissertation „Universität für Bodenkultur Wien“, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Abteilung für Lebensmittelbiotechnologie

Beruflicher Werdegang

2000 – 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Firma „Funktionswerkstoffe F & E GmbH“ in Eisenstadt / Österreich
2001 – 2005 Vertriebsingenieur für die Bereiche Industrie und Umwelttechnik, Firma „Westfalia Separator Austria GmbH“ in Wien / Österreich
2005 – 2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter, „Universität für Bodenkultur Wien“, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Abteilung für Lebensmittelbiotechnologie

Wien Februar 2008