



1 Einleitung und Zielsetzung

Im Zuge des begrenzten Vorkommens fossiler Rohstoffe, gewinnt die industrielle Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen zunehmend an Bedeutung. Deren stoffliche und energetische Nutzung ermöglicht es, wirtschaftlich nachhaltige Prozesse zu entwickeln, die eine ressourcenschonende Produktbildung erlauben. Dabei spielt vor allem deren ganzheitliche Nutzung eine große Rolle, da anfallende Nebenstoffströme oft noch Wertstoffkomponenten enthalten bzw. Reststoffströme z.B. in Biogasanlagen genutzt werden können. Dieser Thematik widmet sich die hier vorgestellte Arbeit, die im Rahmen des SynRg-Projektes [1] durchgeführt wurde. Ziel des SynRg-Projektes ist eine ganzheitliche Nutzung des nachwachsenden Rohstoffes Raps. Ausgehend von Versuchen zur genetischen Modifizierung der Pflanze, reicht das Vorhaben bis hin zur Herstellung biobasierter Kunststoffe, welcher aus den Zielprodukten Fettsäuren und Polyphenole synthetisiert wird. Dabei wird die Verwertbarkeit aller anfallenden Stoffströme untersucht und auf eine wirtschaftlich sinnvolle Nutzung überprüft. So gliedert sich das Projekt, durchgeführt von 10 Forschungseinrichtungen und 7 Unternehmen, in 7 Teilvorhaben. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind im Teilvorhaben 6 angesiedelt, welches sich mit der Aufarbeitung, Funktionalisierung und Polymerisation der Fette und Polyphenole beschäftigt. Als Ausgangsstoffstrom diente hierbei Rapsschrot, welches als Nebenprodukt bei der Ölgewinnung durch Pressen und wahlweise einer nachträglichen Extraktion mit Hexan mit bis zu 60 % (w/w) anfällt [2]. Dieses Nebenprodukt wird aktuell überwiegend als Tierfuttermittel verwertet [3] und stellt somit eine Konkurrenz zu der hier geplanten wertsteigernden Nutzung dar, die für eine abschließende Bewertung ausschlaggebend sein soll. Eine ausführliche Übersicht über den aktuellen Stand der Technik der nachfolgend beschriebenen Themen befindet sich im Abschnitt 2.

Alternative Nutzungsweisen dieses Stoffstromes werden bereits seit Jahrzehnten untersucht, wobei der Fokus auf der Isolierung von proteinreichen Fraktionen und deren Trennung von der Phytinsäure und den Polyphenolen liegt. Auch sind Methoden zur Gewinnung der Polyphenole und Phytinsäure in der Literatur dargestellt, allerdings gibt es bisher nur bzgl. der Proteine Bestrebungen Produkte auf den Markt zu bringen. Aber auch hier existieren bislang keine Anlagen im industriellen Maßstab. Des Weiteren ist bisher kein Verfahren beschrieben, das die Aufarbeitung aller drei Wertstofffraktionen (Polyphenole, Phytinsäure und Proteine) bis zum vermarktbaren Reinheitsgrad beinhaltet. Meist wird nur die Gewinnung von Phytinsäure oder den Polyphenolen neben der Proteinfraction gezeigt, da letztere mit 40 % (w/w) den Großteil an Wertstoffen ausmacht.

Genau hier setzt diese Arbeit an, denn eine Nutzung der Polyphenole ist nur dann wirtschaftlich sinnvoll durchzuführen, wenn auch die Proteine und Phytinsäure isoliert und verkauft werden können. Ziel ist es demnach, ein Verfahren zu entwickeln, das dieses Vorhaben realisieren kann und einen wirtschaftlichen Betrieb ermöglicht. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf dem Einsatz von neuartigen Adsorbentien zur Gewinnung der Sinapinsäure, die vom Projektpartner Clariant Produkte GmbH (Moosburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Der adsorptiven Aufarbeitung steht die Extraktion gegenüber, die hier als alternative Aufarbeitungsform untersucht wird. Für die Phytinsäure werden ebenfalls Partikelsysteme eingesetzt, aber auch die Gewinnung durch Fällungsreaktionen wird untersucht. Da die Proteingewinnung in der Literatur bereits ausführlich dargestellt ist, wird hierfür der klassische Ansatz der Fällung, aber auch eine adsorptive Gewinnung betrachtet. Letztendlich soll eine Aussage getroffen werden, ob es sich bei der Gewinnung von Sinapinsäure, Phytinsäure und Protein aus Rapsschrot wirklich um ein wertsteigerndes Verfahren handelt oder der direkte Verkauf profitabler ist. Zur Abschätzung wird die Software SuperPro Designer eingesetzt.

Als alternative Rohstoffquelle für Polyphenole galt es zu dem, Weizen und Traubentrester zu betrachten. Gerade bei der Gewinnung von Polyphenolen wird oftmals die Verwendung von Traubentrester diskutiert, welcher sich innerhalb erster Versuche aber als nicht sinnvoll für das SynRg-Projekt herausstellte und in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt wird. Bei der Aufarbeitung von Polyphenolen aus Weizen wird auf die gewonnenen Erkenntnisse des Rohstoffes Rapsschrot zurückgegriffen und eine Übertragung der entsprechenden Verfahren durchgeführt. Hierbei gilt es vor allem einen Weg zu finden, die Konkurrenz zu der bestehenden industriellen Nutzung des Weizens zu umgehen bzw. einen Weg zu finden, die Gewinnung der Ferulasäure in diese Prozesse zu integrieren.

Des Weiteren wird in dieser Arbeit die Lipophilisierung der aus Rapsschrot und Weizen gewonnenen Sinapin- bzw. Ferulasäure gezeigt, welche neben dem Einsatz als Baustein für die biobasierten Kunststoffe weitere Anwendungsmöglichkeiten und -gebiete für Polyphenole aufzeigen soll. Durch eine Veresterung mit Fettalkoholen bzw. -säuren wird die Fettlöslichkeit, unter Beibehalt der anderen Eigenschaften, erhöht. Somit können vor allem ölbasierte Anwendungsgebiete im Bereich der Kosmetik- und Pharmaindustrie erschlossen werden. Hier soll die Machbarkeit einer enzymatischen mit der chemischen Derivatisierung verglichen und ein Nachweis zum Erhalt der antioxidativen Eigenschaften sowie der gesteigerten Lipophilie geführt werden.



2 Stand der Technik

2.1 Raps und Weizen

2.1.1 Wertschöpfungskette Rapsextraktionsschrot und -presskuchen

Da der für die Arbeit relevante Anteil des Rohstoffes Raps die Rückstände (Rapsschrot, -extraktionsschrot bzw. -presskuchen) nach der Ölgewinnung sind, wird nachfolgend nur auf diese eingegangen. Wenn von einer wertsteigernden Nutzung von Rapsextraktionsschrot bzw. -presskuchen gesprochen wird, dann ist fast ausschließlich von der Verwendung des Proteinanteils die Rede. Dabei spielen die sekundären Pflanzenstoffe wie Phytinsäure und Polyphenole eine untergeordnete aber dennoch wichtige Rolle, da sie großen Einfluss auf die spätere Verwendung der Proteinisolate haben [4, 5, 6, 7]. Die nachfolgende Darstellung der Aufbereitungsverfahren gliedert sich in Protein-, Polyphenol- und Phytinsäuregewinnung sowie weiteren Anwendungsmöglichkeiten. Dabei ist zu erwähnen, dass keines der nachfolgend beschriebenen Verfahren auf die Gewinnung aller drei Produktklassen in einem Prozess abzielt. Nähere Informationen über die Produkte werden in Abschnitt 3 dargestellt.

2.1.2 Proteine

Für die Proteingewinnung aus Rapsschrot stehen Standardverfahren zur Verfügung. Generell können dabei drei Grundproteinprodukte gewonnen werden: Die Samenmehle (40 – 50 % w/w Protein) fallen direkt nach der Ölgewinnung an und sind für den Einsatz in der Humanernährung nicht relevant. Bei fast allen Veröffentlichungen und Patenten geht es viel mehr um die Proteinkonzentrate (> 60 % w/w Protein), die durch Feststoffextraktion mit Wasser oder wässrigen Lösemitteln anfallen und um Proteinisolate (> 85 % w/w Protein), die durch wässrige Extraktion bei unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken gewonnen werden [8]. Auch sind dafür Vorbehandlungsmethoden beschrieben, bei denen durch mechanische und enzymatische Methoden die Proteinausbeute deutlich erhöht werden konnte [9]. Die Aufarbeitung von Proteinen aus Rapsschrot ist schon seit Jahrzehnten beschrieben und es wird zwischen der alkalischen Extraktion (erste Quelle El Nockrashy et al. 1977 [10]), der PMM-Methode (protein micellar mass; erste Quelle Owen et al. 1971 [11]), bei der die antinutritiven Glycosinolate entfernt werden, und der Herstellung spezifischer Proteinfractionen (erste Quelle Bhatti et al. 1968 [12]) unterschieden. Newkirk et al. [13] und Westfall et al. [14] beschreiben z.B. einen patentierten Prozess zur Gewinnung von Proteinen durch eine alkalische Extraktion, gefolgt von einer Proteinfällung. Im Patent von Wanasundara et al. [15] wird die Separation der Hauptproteine Cruzeferin und Napin gezeigt.

Auch Prozesse basierend auf Chromatographie, Ultrafiltration oder dem Einsatz von komplexierenden Mitteln sind bereits dargestellt [16, 17].

Derzeit befinden sich Rapsproteinisolate in der Phase der Markteinführung. Seit 2010 besitzt das Unternehmen der Burcon NutraScience Corporation für die Proteinprodukte PURATEIN® und SUPERTEIN™ die Genehmigung als Lebensmittel der U.S. Food & Drug Administration (FDA) [18]. In 2013 hat die Firma BioExx ebenfalls eine Genehmigung von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) für ihr Proteinisolat Isolexx™ erhalten [19]. Des Weiteren besitzt Axara Consulting eine Pilotanlage, mit der sie in der Lage ist hochreine Cruzeferin- und Napin-Proteinisolate herzustellen und sucht derzeit nach Investoren [20]. Trotz der Marktreife dieser Proteinisolate ist derzeit aufgrund des fehlenden Marktes noch kein Marktpreis festzumachen. Da die Rapsproteine voraussichtlich mit den Proteinisolaten aus Soja konkurrieren werden, könnte der Preis sich in ähnlichen Größenordnungen bewegen. Der Großhandelspreis von Sojaprotein liegt im Bereich von 1,5 \$/kg [21].

Da auf Grund der bereits bestehenden Anzahl an Veröffentlichungen und Patenten die Proteinaufarbeitung in dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle spielt, wird auf eine detailliertere Übersicht verzichtet. Letztere kann in den aktuellen Reviews von Aider et al. 2011 [22] und Tan et al. 2011 [23] eingesehen werden.

2.1.3 Polyphenole

Die Aufarbeitung von Polyphenolen aus Pflanzenmaterial ist ebenfalls gut beschrieben und es haben sich unterschiedliche Methoden bewährt. So sind Verfahren wie Lösemittlextraktion, Fest-Phasen-Extraktion, semi-präparative HPLC, Fällung, Adsorption sowie überkritische Flüssigextraktion [24, 25, 26, 27, 28] beschrieben, die oftmals in Kombinationen eingesetzt werden. Eine detaillierte und umfangreiche Übersicht über die generelle Aufarbeitung von Polyphenolen aus diversen Rohstoffquellen wurde von Naczk et al. [29] erstellt.

Bei der Polyphenolgewinnung aus Rapsschrot wird allgemein zunächst eine Feststoffextraktion mit Wasser oder organischen Lösungsmitteln durchgeführt [30, 31, 32, 33]. Krygier et al. [34] beschreiben z.B. ein Verfahren, bei dem Phenolsäuren mit einem Methanol-Aceton-Wasser-Gemisch extrahiert und anschließend alkalisch hydrolysiert werden. Die Hydrolysate werden durch Waschen mit Hexan und Extraktion in Diethylether-Ethylacetat gereinigt, bevor sie mittels Flüssig-Chromatographie weiter aufgearbeitet werden. Vuorela et al. [35] vergleichen die Extraktion von Polyphenolen mit unterschiedlichen Lösemitteln und den Einsatz von enzymatischer sowie chemischer Hydrolyse. Cai et al. [32] beschreiben eine vorherige Extraktion mit Hexan zum erneuten Entfetten des Rapsmehls und

einer anschließenden Extraktion mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen im Soxhlet Extraktor. Naczk et al. [36] untersuchen die Extraktion mit einer Kombination aus Methanol, Butanol und Salzsäure. Li-Jun et al. [37] stellen ein Verfahren basierend auf einer Heißwasserextraktion gefolgt von einer Metallion-Fällung der Polyphenole durch Zinkchlorid vor. Tzeng et al. [38] untersuchen die Abtrennung der Polyphenole durch eine chemische Vorbehandlung des Rapsschrot gefolgt von einer Membranfiltration. Niu et al. [39] und Zou et al. [40] zeigen den Einsatz von Mikrowellen während der Extraktion mit wässrigen Methanol und Ethanol.

Nach der Feststoffextraktion der Polyphenole werden zur weiteren Aufarbeitung die phenolischen Ester durch alkalische Hydrolyse gespalten und können nach Absenkung des pH-Wertes durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnen werden. Durch die Hydrolyse können nach Kozłowska et al. [41], Zadernowski et al. [42] und Naczk et al. [43] vor allem die gebundenen Polyphenole in Lösung gebracht werden. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Isolierung bzw. Aufreinigung der Polyphenole aus den Extrakten wird von Fenton et al. [44], Kozłowska et al. [41], Zadernowski et al. [42] und Naczk et al. [43] mittels Diethylether sowie von Krygier et al. [34] und Naczk et al. [33] mittels eines Gemisches aus Diethylether/Ethylacetat (1:1) beschrieben.

Weitere beschriebene Methoden zur Isolierung nach der Feststoffextraktion basieren auf einer Festphasen-Adsorption. Amarowicz et al. [45] zeigen den Einsatz von Sephadex LH-20 in einer Chromatographie zur Fraktionierung der Polyphenole. Diese Technik wird auch von Amarowicz et al. [46, 47] und Wanasundara et al. [48] verwendet. Des Weiteren ist auch der Einsatz von Reverse-Phase-Materialien im semi-präparativen Maßstab beschrieben, die üblicherweise bei der quantitativen Analytik in HPLC Systemen verwendet werden. Karamac et al. [49] zeigen eine weitere Methode basierend auf einer Größenausschluss-Chromatographie.

2.1.4 Phytinsäure

Die Gewinnung der Phytinsäure aus nachwachsenden Rohstoffen kann ebenso über verschiedene verfahrenstechnische Ansätze erfolgen. Die am häufigsten beschriebenen Methoden sind Lösemittlextraktion, gegebenenfalls unterstützt durch Mikrowellen oder Ultraschall, gefolgt von einer Fällung, Fest-Phasen-Extraktion oder Ultrafiltration [50, 51, 52, 53, 54]. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren basieren bzgl. Rapsschrot dabei vorwiegend auf der Trennung der Phytinsäure von den Proteinen, wobei eine Isolation bzw. Gewinnung der Phytinsäure nicht vorrangig angestrebt ist [55]. So zielen die meisten

Verfahren auf Prozessparameter ab, bei denen jeweils nur eine Komponente löslich ist und die andere anschließend durch Fällung oder Ultrafiltration abgetrennt werden kann [56].

Dennoch gibt es einige Arbeiten zur gezielten Gewinnung der Phytinsäure aus Rapsschrot. Sohling et al. [57, 58] und Li et al. [59] beschreiben ein patentiertes Verfahren mittels Einsatz von Anionenaustauschern. Auch Kang et al. [60] entwickelten eine Extraktion in eine organische Phase mit Alamine 336/n-octanol/sulfonated Kerosin, aus der die Phytinsäure mit alkalischen Lösungen zurück extrahiert wird. Zhou et al. [61] stellen ein kombiniertes Verfahren aus Extraktion, Stripping, Elektrodialyse und Vakuumkonzentrierung dar. Evans et al. [62] untersuchen die Fällung von Phytinsäure als Calcium-Phytat durch den Einsatz von Calciumchlorid. Weitere Untersuchungen zur Fällung wurden auch von Cho et al. [63] und de Boland et al. [64] durchgeführt. Die Methode zur Gewinnung von Phytinsäure mittels Ultrafiltration wird von Siy et al. [65] und Xu et al. [66] gezeigt.

2.1.5 Proteine, Sinapinsäure und Phytinsäure

Bislang sind kaum Verfahren beschrieben die alle drei Wertstofffraktionen in einem Prozess behandeln. Lediglich vom Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung [67] ist eine wässrige Extraktion von Rapspresskuchen zur Gewinnung von zwei Proteinfractionen, sowie einer anschließenden adsorptiven Aufarbeitung der Phytinsäure und Polyphenole beschrieben. Die Polyphenole werden dabei aber nur abgetrennt und nicht weiter genutzt.

2.1.6 Weitere Anwendungen

Weitere mögliche Verwendungszwecke von Rapspresskuchen sind vor allem die direkte Nutzung als Dünge- und Bodenverbesserungsmittel [68]. So sind nach der EU-Verordnung für ökologischen Landbau Pressrückstände beim biologischen Landbau zugelassen [69]. Eine ökonomische Verwendung ist dabei nach Schumann et al. [70] aber noch nicht gegeben. Erst eine wertsteigernde Nutzung durch Kombination verschiedener Produkte auf Presskuchenbasis könnte dies erreichen. Nach Graf et al. [71] lag 2006 der durchschnittliche Abgabepreis für Rapspresskuchen als organischer Dünger bei 0,03 – 0,06 €/kg. Im Vergleich besitzt derzeit Rapsschrot, welches vorwiegend als Futtermittel eingesetzt wird, einen Marktwert von 0,19 €/kg [72].

Des Weiteren wären die direkte energetische Verwertung und der Einsatz in Biogasanlagen möglich. Diese sind aber auf Grund nachteiliger Umwelteffekte durch den hohen NO_x-Emissionswert problematisch. Auch wäre die Wertschöpfung nach Schumann et al. [70] voraussichtlich niedriger. Ebenso ist die Nutzung als Ausgangsmaterial für die Produktion von „High added value“ Produkten wie Enzymen denkbar [73].

2.1.7 Polyphenolgewinnung aus Weizen

Als alternative Rohstoffquelle für die Polyphenolgewinnung wurden vom Projektpartner Saaten-Union Biotec GmbH (Leopoldshöhe, Deutschland) zwei Weizensorten (Indigo Z1 und Safrania) aus einer speziellen Züchtung zur Verfügung gestellt, die einen erhöhten Polyphenolgehalt besitzen sollten. Aus diesem Grund wird nachfolgend der Stand der Technik nur für die Isolierung von Polyphenolen aus Weizen dargestellt.

Wie auch bei der Polyphenolgewinnung aus Rapsschrot, können auch hier die gängigen Verfahren der Lösemittlextraktion, Fest-Phasen-Extraktion, semi-präparative HPLC, Fällung, Adsorption, sowie überkritische Flüssigextraktion angewendet werden. Speziell für Weizen sind in der Literatur die nachfolgenden Verfahren beschrieben.

Yongyan et al. [74] extrahieren die Polyphenole aus Buchweizen mit wässrigem Ethanol unter Einsatz von Mikrowellen und anschließender Filtration. Gasztonyi et al. [75] beschreiben ein Verfahren zur Isolierung auch der gebundenen Polyphenole durch eine Feststoffextraktion mit wässrigem Ethanol, gefolgt von einer alkalischen Hydrolyse, Neutralisation, Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und nachfolgender Trocknung. Adam et al. [76, 77] vergleichen den Gehalt an frei löslichen und gebundenen Polyphenolen. Dazu wird wässriges Ethanol ohne und mit nachfolgender alkalischer Hydrolyse verwendet. Die Isolierung erfolgt jeweils durch Mehrfachextraktion mit Ethylacetat. Yan-Yan et al. [78] und Rosa et al. [79] nutzen eine enzymatische Hydrolyse, um den Gehalt an extrahierbarer Ferulasäure zu steigern. Auch ein vorheriges Feinmahlen kann diese Ausbeute steigern, wie von Anson et al. [80] berichtet. Diese Methode wurde auch von Lempereur et al. [81] beschrieben, wobei als erster Schritt der Weizen mit Hexan entfettet wird, gefolgt von einer alkalischen wässrigen Extraktion (im Dunkeln unter Argon-Zufuhr) und anschließender pH-Wert-Senkung in den sauren Bereich. Die Polyphenole wurden danach mit Ether extrahiert und getrocknet. McCallum [82] beschreibt eine Extraktion mit wässrigem Acteon unter Stickstoffbegasung mit anschließender Isolierung der Polyphenole aus der organischen Phase. Nach dem Verdampfen und Rücklösen in Wasser können diese durch einen Chromatographie-Schritt mit Amberlite XAD2 aufgereinigt werden. Pussayanawin et al. [83] zeigen eine Extraktion mit verdünnter Schwefelsäure und anschließender enzymatischer Behandlung. Žilic et al. [84] untersuchten ein Verfahren mit wässrigem Aceton zur Isolierung der frei löslichen Polyphenole sowie einer Entfernung dieser mit PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) aus dem Lösungsansatz.

2.2 Lipophilisierung von Polyphenolen

Derivate von Phenolsäuren sind schon seit Jahren als effektive Antioxidantien in biologischen Systemen bekannt. Dort liegen sie als Ester von Kohlenhydraten, Fettsäuren und Proteinen vor [85, 86]. Die gute Löslichkeit in wässrigen Systemen ist dabei nachteilig für den Einsatz in hydrophoben Medien wie Schmiermitteln, Ölen, Cremes, Emulsionen usw. [87, 88]. Der Ansatz der Lipophilisierung bietet hier eine Möglichkeit Ester z.B. mit aliphatischen Ketten herzustellen, die auch in unpolarem Milieu löslich sind. Dabei behalten die entstandenen Ester ihre funktionellen Eigenschaften wie die antioxidative Aktivität, antimikrobielle Aktivität, UV-Absorption usw. [89, 90]. Solche Ester können chemisch oder enzymatisch hergestellt oder direkt synthetisiert werden. Eine Möglichkeit der chemischen Synthese basiert dabei nach Tawata et al. [91], Appendino et al. [92], Chen et al. [93] und Bankova et al. [94] auf der Veresterung der aliphatischen Hydroxylgruppe von Phenylethanol in Gegenwart von phenolischen Carboxylgruppen. Die chemische Veresterung wird vor allem durch den Einsatz von basischen oder sauren Katalysatoren durchgeführt [95]. Als nachteilig bei der chemischen Lipophilisierung ist die Hitzeempfindlichkeit und Oxidationsempfindlichkeit in alkalischen Lösungen von Phenolsäuren zu nennen. Des Weiteren laufen die Reaktionen oft unselektiv ab, wodurch in Nebenreaktionen Produkte entstehen, die nachträglich zusammen mit den Katalysatorrückständen entfernt werden müssen. Aus diesem Grund sind viele Aufreinigungsschritte notwendig [90, 96, 97, 98]. Für diese Arbeit ist vor allem die enzymatische Lipophilisierung von Bedeutung, weswegen nachfolgend ausführlicher auf diese eingegangen wird. Beispielhaft ist in Abb. 1 die enzymatische Lipophilisierung von Phenolsäuren mit Fettalkoholen dargestellt. Für die chemische Reaktion kann in dieser Abbildung die Lipase durch Schwefelsäure als Katalysator ersetzt werden.

Für die enzymatische Lipophilisierung werden vorwiegend Lipasen (meistens aus *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei* und *C. antarctica*), Esterasen (z.B. aus *Fusarium oxysporum*) und Cutinasen (z.B. *F. solani*) in wässrigen oder organischen Systemen eingesetzt. Dabei werden vorwiegend Phenolsäuren mit aliphatischen Alkoholen, Alkylglukosiden, langkettigen Alkoholen und Monosacchariden verestert [88, 99]. Erste Untersuchungen zur enzymatischen Veresterung durch Lipase CAL-B und Fettalkoholen wurden von Guyot et al. [100] berichtet. Buisman et al. [87] beschreiben die enzymatische Veresterung von Zimt- und Benzoesäure mit Octansäure in Cyclohexan. Weitkamp et al. [101] untersuchten eine Lösemittelfreie Veresterung durch Lipase B zwischen Methyl- und Ethyl-(Hydroxy)cinnamaten mit Fettalkoholen und Fettsäuremethylestern mit (Hydroxy)phenyl-propanolen. Sabally et al. [102] zeigten die Veresterung von Phenolsäuren mit Linolenyl-Alkohol im organischen

Lösemittel. Stevenson et al. [103] beschreiben die enzymatische Herstellung von verschiedenen Estergemischen auf Basis von Phenolsäuren mit 2-phenylethanol (PE), 4-hydroxy- (tyrosol) und 4-methoxy-ethanol (MPE), die als Functional Food Additives von Interesse sind. Karboune et al. [104] stellen die enzymatische Synthese von phenolischen Lipiden durch Acidolyse von Flaxöl mit Phenolsäuren dar.

Weitere Veröffentlichungen zur enzymatischen Veresterung von Phenolsäuren in lösemittelfreien, organischen Systemen und binären Lösemittelsystemen sind von Guyot et al. [105], Katsoura et al. [106], Sabally et al. [102], Stamatis et al. [107] und Vosmann et al. [108] beschrieben. Ebenso gibt es bereits detaillierte Review Artikel zur Lipophilisierung von Polyphenolen und deren Anwendungen, die von Figueroa-Espinoza et al. [99] und Villeneuve [109] erstellt wurden.

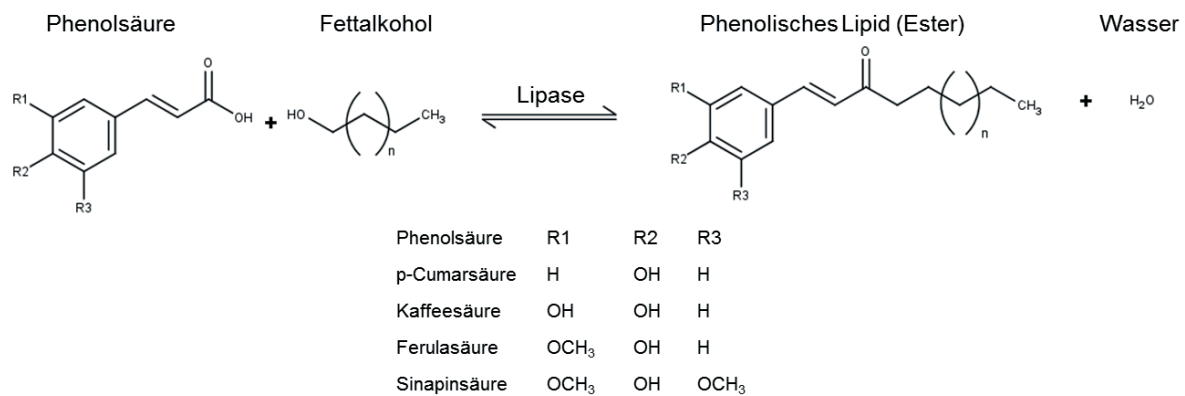


Abb. 1: Reaktionsgleichung der enzymatischen Lipophilisierung der Phenolsäuren mit Fettalkoholen durch Lipase; bei der chemischen Reaktion fungiert H₂SO₄ als Katalysator





3 Theoretische Grundlagen

3.1 Polyphenole

Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzenmetaboliten, die der Pflanze ihre organoleptischen Eigenschaften wie Geschmack, Geruch und Farbe verleihen. Enthalten sind diese in Gemüse, Früchten, Nüssen und Getreide [110]. Sie zählen darüber hinaus zu den Antioxidantien und es wird außerdem eine antikanzerogene Wirkung der Polyphenole vermutet, welche allerdings noch untersucht wird [111]. Auf Grund ihrer vielfältigen Eigenschaften haben sie in den letzten Jahrzehnten großes Interesse bei vielen Forschern, Ernährungswissenschaftlern und Konsumenten geweckt [112, 113]. Ihre Einteilung erfolgt nach der jeweiligen chemischen Struktur, wobei als Grundgerüst mindestens ein aromatischer Ring sowie eine Hydroxygruppe vorliegt [114], [115]. Die weitere Unterteilung richtet sich nach der Anzahl der Ringe und gebundenen funktionellen Gruppen [116]. Sie zählen weiterhin zu den amphiphilen Molekülen, sind also in polaren und unpolaren Medien löslich. Die Löslichkeit ist dabei stark abhängig von der Länge der Kohlenstoffkette sowie der Anzahl an Hydroxygruppen [117]. Allgemein sind Polyphenole in Wasser wesentlich schlechter löslich als in organischen Lösemitteln und im sauren Milieu stabiler als im alkalischen, in dem es zur Oxidation und Polymerisation kommen kann [118, 119].

Der Begriff „Polyphenol“ ist als Sammelbegriff zu verstehen, denn durch die nahezu unzähligen Konformationen werden sie in viele Haupt- und Untergruppen eingeteilt. Schon seit den 90ern sind mehr als 8.000 Strukturen bekannt [120], die vor allem in den Randschichten von Obst, Gemüse und Getreide vorkommen [121]. Herauszuheben sind die Phenolcarbonsäuren, die Flavonoide, die Stilbene und die Lignane, da diese am häufigsten vorkommen und den größten Anteil ausmachen [111]. Nachfolgend wird eine kurze Übersicht über diese Gruppen gegeben. Eine ausführliche Übersicht wurde von Manach et al. [113], Whiting et al. [112] und Handique et al. [116] erstellt. Des Weiteren ist eine umfangreiche Datenbank unter <http://www.phenol-explorer.eu> zu finden [122].

3.1.1 Phenolcarbonsäuren

Die Phenolcarbonsäuren werden in zwei Klassen unterteilt. Die Hydroxybenzoesäuren und die Hydroxyzimtsäuren. Diese unterscheiden sich durch ihre C₁-C₆- beziehungsweise ihre C₃-C₆-Grundstruktur. Nach den Flavonoiden sind die Phenolsäuren die zweitgrößte Gruppe der phenolischen Verbindungen in Lebensmitteln [115].

3.1.1.1 Hydroxyzimtsäuren

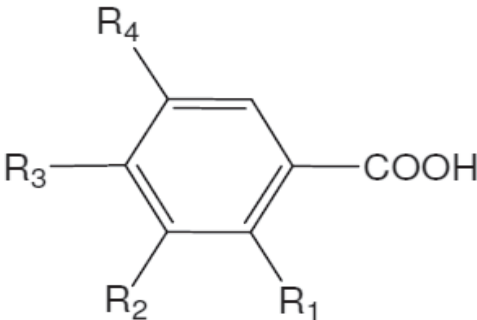
In unlöslicher Form sind Hydroxyzimtsäuren meist an polymere Zellwandbestandteile (Lignin, Polysaccharide, usw.) gebunden. Die saure Carboxylgruppe der Hydroxyzimtsäuren wird in den Pflanzen zum besseren Transport in die wasserlösliche freie Säureform überführt und/oder zum Erreichen einer verbesserten Wirkung mit Alkoholen, Aminen, Kohlenhydraten oder anderen Phenolen umgesetzt. In Weintrauben zum Beispiel kommen als Vertreter der Hydroxyzimtsäuren vornehmlich die Kaffeesäure, p-Cumarsäure sowie die Ferulasäure vor. Sie liegen in der Pflanze sowohl als trans- wie auch als cis-Form vor, wobei die aus sterischen und energetischen Gründen günstigere trans-Form überwiegt. Zwischen den Hydroxyzimtsäuren und Hydroxycarbonsäuren können sich Ester ausbilden, wodurch neue Phenole mit den Bezeichnungen Caftar-, p-Cutar- und Fertarsäure entstehen. Des Weiteren liegen sie häufig in gebundener Form als Ester mit Polysacchariden vor [123]. In Abb. 2 sind die Strukturen einiger wichtiger Hydroxyzimtsäuren dargestellt [115]:

Name		R ₄	R ₃	R ₂	R ₁
p-Cumasäure	H	H	H	H	
Kaffeesäure		H	OH	H	H
Ferulasäure		H	O CH ₃	H	H
Sinapinsäure		H	OCH ₃	OCH ₃	H
Cutarsäure		H	H	H	Weinsäure
Caftarsäure		H	OH	H	Weinsäure
Fertarsäure		H	OCH ₃	H	Weinsäure

Abb. 2: Strukturen einiger wichtiger Hydroxyzimtsäuren [124]

3.1.1.2 Hydroxybenzoesäuren

Die Hydroxybenzoesäuren kommen in essbaren Pflanzen in freier und veresterter Form generell nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Als wichtigste Quelle gilt der Tee, bei dem die Gallussäure die Hauptkomponente ausmacht [125]. Oft stellen sie Bestandteile komplexer Strukturen wie hydrolysierbare Tannine dar [126]. Eine der Hydroxybenzoesäure ist die Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure). Die Salicylsäure wird durch Abspaltung eines C₂-Fragmentes aus den Phenylpropanen gebildet und spielt eine wichtige Rolle als Mediator mit hormonellem Charakter in Pflanzen [115]. In Abb. 3 sind die Strukturen einiger wichtiger Vertreter der Hydroxybenzoesäuren gezeigt.



Name	R1	R2	R3	R4
p-Hydroxybenzoesäure	H	H	OH	H
Protocatechusäure	H	OH	OH	H
Gallusäure	H	OH	OH	OH
Vanillinsäure	H	OCH3	OH	H
Syringasäure	OH	OCH3	OH	OCH3
Salicylsäure	OH	H	H	H

Abb. 3: Strukturen einiger wichtiger Hydroxybenzoesäuren [124]

3.1.2 Flavonoide

Unter den Polyphenolen in Pflanzen nehmen die Flavonoide die größte und wichtigste Gruppe ein. Mittlerweile wurden über 8.000 verschiedene Flavonoide aus Pflanzen isoliert und charakterisiert. Flavonoide befinden sich überwiegend in den äußeren Randschichten der Pflanzen, Blätter und Früchte. Sie alle leiten sich strukturell vom Flavan (2-Phenylbenzodihydropyran) ab und sind durch eine C₆-C₃-C₆-Grundstruktur gekennzeichnet. Allein die große Anzahl der Verbindungen in dieser Gruppe macht es bereits notwendig, eine weitere Unterteilung vorzunehmen [115]. Sowohl die funktionellen Gruppen und deren Position an den aromatischen Strukturen, als auch der Grad der Oxidation der C₃-Verbindung sorgen für

die weitere Unterteilung in die Klassen Flavanone, Flavone, Flavanole, Flavane, Anthocyanidine, Leukoanthocyanidine, Isoflavonoide und Tannine [127] Eine Übersicht einiger Strukturen, abgeleitet vom Flavan, ist in Abb. 4 dargestellt.

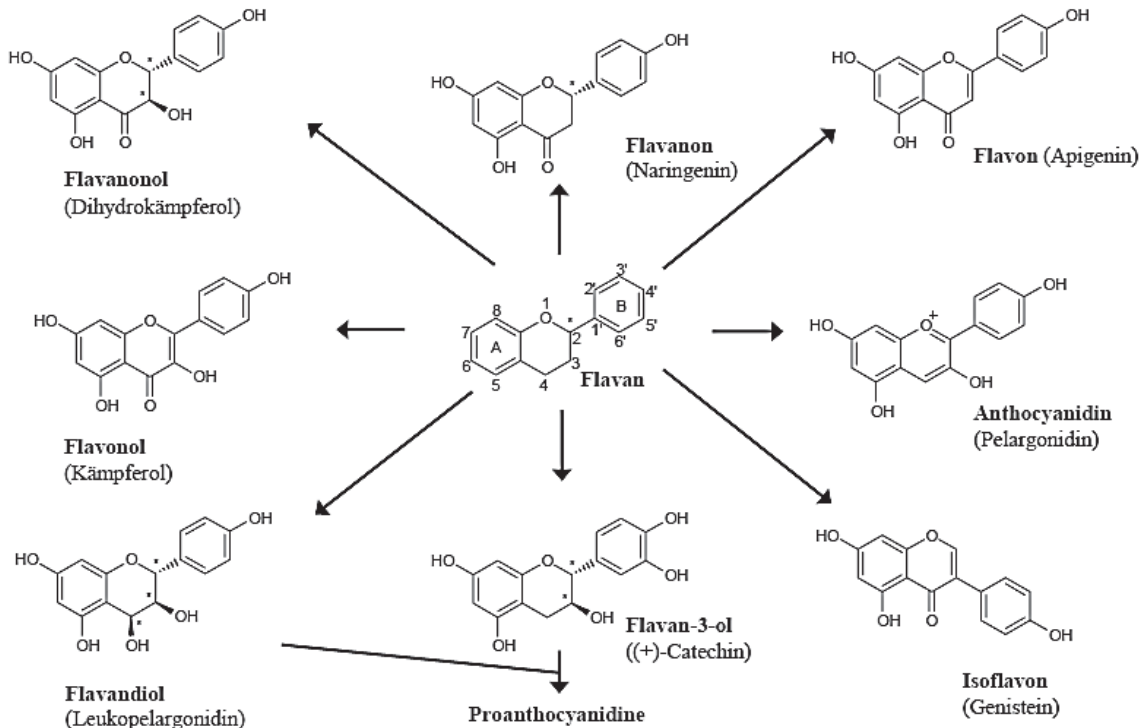


Abb. 4: Strukturformeln verschiedener Flavonoide, abgeleitet vom Flavan [128]

3.1.3 Stilbene

Stilbene gehören zu einer kleinen Gruppe der Phenylpropanoide welche durch eine C₆-C₂-C₆-Struktur (1,2-Diphenylethylen) charakterisiert sind. Dabei ist die generelle Grundeinheit bei Pflanzen das trans-Resveratrol [129]. Sie werden in verschiedenen Pflanzen als Stressmetabolite bei Schädlingsbefall produziert und werden als Antwort gegen Pathogene und als UV-Schutz genutzt [130]. Die wichtigsten Vertreter der Stilbene stellen das Resveratrol und sein Glukosid, das sog. „Piceid“, dar. Aufgrund der Doppelbindung in der Mitte des Moleküls existieren beide Formen sowohl in der trans- als auch in der cis-Form. Die in der Natur vorherrschende Form ist jedoch die trans-Form [131]. Mittlerweile wurde in Weinen und in der Familie der *Vitaceae* eine Vielzahl von stilbenischen Resveratrol-Abkömmlingen isoliert und identifiziert [132]. Das starke Interesse der Wein-Forschung an Resveratrol beruht auf seiner Wirkung in Weinreben, da dessen Biosynthese bei Befall der Pflanze durch Mehltau aktiviert wird. Des Weiteren wirkt es auch als Inhibitor der

Ribonucleotidreduktase und damit der DNS-Synthese in Säugetierzellen, weshalb es zur Tumorprävention genutzt werden kann [129].

Name	R1	R2	R3
trans-Resveratrol	OH	H	OH
cis-Resveratrol	OH	H	OH
trans-Piceid	Gluc	H	OH
cis-Piceid	Gluc	H	OH

Abb. 5: Strukturformeln der Wichtigsten Resveratrol-Abkömmlinge [124]; Gluc = Glucose

3.1.4 Lignane

Strukturell sind Lignane Dimere aus Phenylpropanoiden, die aus C₆-C₃-Körpern bestehen und über das β-C-Atom verbunden sind [133]. Lignane sind bioaktive Verbindungen, die besonders in Lein- und Sesamsamen in hohen Konzentrationen, aber auch in Getreiden, anderen Samen, Früchten und Gemüse zu finden sind [134]. Sie gehören zur Oberklasse der Phytoöstrogene, also östrogenähnlichen Stoffen und besitzen eine antioxidative Wirkung, welche ihnen ein hohes Potential als pharmazeutisches Produkt verleiht [135]. Die Grundstruktur der Lignane zeigt Abb. 6.

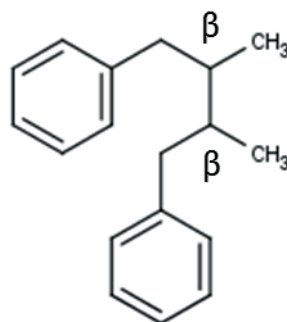


Abb. 6-Grundstruktur der Lignane [133]