

Abschlussbericht

Innovatives biotechnologisches Verfahren zur Herstellung eines natürlichen Vernetzungsmittels aus Ernteabfällen der Olivenproduktion zur Modifikation und Stabilisierung von Proteinen und Zuckerderivaten für Lebensmittel- und Kosmetikprodukte



Aktenzeichen: AZ 13210

Eco-X-Linking



Koordinator: N-Zyme BioTec GmbH, Darmstadt,
Dr. Jens Zotzel



Universität Hamburg

Universität Hamburg, Institut für Biochemie,
AK Kosmetikwissenschaft;
Frau Prof. Martina Kerscher



Biozoon GmbH, Bremerhaven
Herr Matthias Kück

Projektbeginn: 01.06.2008

Laufzeit: 28 Monate

Inhaltsverzeichnis:

- 1. Zusammenfassung**
- 2. Anlass und Zielsetzung**
- 3. Verwendete Methoden**
 - 3.1 Ökoeffizienzanalyse (Externer Dienstleister: Fa. IFU-Hamburg)
 - 3.2 Methoden zur Aktivierung von Oleuropein
 - 3.2.1 Fermentative Aktivierung
 - 3.2.1.1 Methoden zur Isolierung von Mikroorganismen
 - 3.2.1.2 Methoden zur Identifikation von Mikroorganismen
 - 3.2.1.3 Kultivierung von Mikroorganismen auf Agarplatten und in Schüttelkolben bzw. Rührreaktoren (4 x 1 L, Braun Biotech)
 - 3.2.1.4 Methoden zum Nachweis von beta-Glucosidase-Aktivität (Agar-Platten/Lösung)
 - 3.2.2 Enzymatische Aktivierung
 - 3.3 Nachweis von Oleuropein-Aglykon
 - 3.3.1 Nachweis über RP-HPLC
 - 3.3.2 Nachweis über Messung der Gelatinevernetzungszeit
 - 3.3.3 Nachweis über Vernetzung von globulären Proteinen und SDS-PAGE-Analyse
 - 3.3.4 Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie
 - 3.3.5 Nachweise mittels massenspektrometrischer Untersuchungen
 - 3.4 Toxikologische Untersuchungen (Externer Dienstleister: Fa. Harlan RCC)
 - 3.5 Zellkulturversuche (AKK)
 - 3.6 Charakterisierung, Trocknung und Anreicherung von OP-Aglykon
 - 3.6.1 Anreicherung von Oleuropein-Aglykon mittels Membranfiltration
 - 3.6.2 Entwicklung von Membranverfahren im Technikumsmaßstab
- 4. Ergebnisse und Diskussion**
 - 4.1 Olivenreststoffe – Qualität und Verfügbarkeit
 - 4.2 Herstellung eines wässrigen Olivenblattextraktes
 - 4.3 Enzymatische und fermentative Aktivierung von Oleuropein im Olivenblattextrakt
 - 4.3.1 Fermentative Aktivierung von Oleuropein
 - 4.3.2 Enzymatische Aktivierung von Oleuropein
 - 4.4 Scale-Up: Enzymatische Aktivierung von Oleuropein im Olivenblattextrakt
 - 4.5 Konzentration und Reinigung von Oleuropein-Aglykon
 - 4.6 Kenndaten und Anwendungsversuche von enzymatisch aktiviertem Oleuropein
 - 4.6.1 Lagerstabilität von Oleuropein-Aglykon (kommerzieller Olivenblattextrakt)
 - 4.6.2 Lagerstabilität von Oleuropein-Aglykon (Olivenblattextrakt eigene Herstellung)
 - 4.6.3 Lagerstabilität von gereinigten Oleuropein-Aglykon
 - 4.7 Anwendungsversuche
 - 4.8 Toxikologische Bewertung
 - 4.9 Ökoeffizienzanalyse

1. Zusammenfassung

Zielsetzung des Projektvorhabens war es, unter Verwendung biotechnologischer Produktionsprozesse ein nachhaltiges und ökonomisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Vernetzerprodukten - Oleuropein-Aglykon und Derivate - aus Olivenreststoffen zu etablieren. Basierend auf der Strukturähnlichkeit zu Glutaraldehyd sollte der Herstellungsprozess von Oleuropein-Aglykon vergleichend im Rahmen einer Ökoeffizienzanalyse bewertet werden. Anwendungsversuche im Lebensmittel- und Kosmetiksektor sollten die Funktionalität sowie das Einsatzpotenzial des Olivenvernetzers zeigen.

Als Grundlage zur Etablierung des Verfahrens musste vor allem die beste Olivenreststoffquelle mit hoher Konzentration von Oleuropein und dessen Derivaten und gleichbleibender Qualität identifiziert werden, um eine kurz- und mittelfristige Lösung zur Herstellung von Olivenvernetzerprodukten zu ermöglichen. Mit den Olivenreststoffen Alperujo (Trester) und Olivenwaschwasser (*olive mill waste water*, OMWW) konnten keine definierten und qualitativ gleichbleibenden Ergebnisse erreicht werden. Die Aussicht zur mittelfristigen Nutzung dieser Reststoffe sollte vorort und die Probennahme und Analyse sollte von qualifiziertem Personal erfolgen. Durch Testung auf den Oleuropein-Gehalt zahlreicher Olivenblätter, unterschiedlicher Sorten und in Abhängigkeit von der Erntezeit konnte eine Landkarte der Olivenblätterqualität erstellt werden. Als Resümee dieser Analysen konnte in der abschließenden Bewertung mehrfach bestätigt werden, dass sich das Olivenblatt als Reststoff und Ausgangsprodukt zur Herstellung von natürlichen Vernetzerprodukten eignet.

Mit der Entwicklung und Etablierung eines Öleuropein-Extraktionsverfahrens auf Wasserbasis konnte in den Aktivierungsversuchen im Verlauf des Projektes auf kommerziell verfügbare Olivenblattextrakte verzichtet werden. Käufliche Olivenblattextrakte liegen preislich bei etwa 35 bis 80 €/kg (20 %; w/w Oleuropein), werden auf Basis alkoholischer Extraktion hergestellt und enthalten zur Standardisierung und für die Sprühtrocknung Trägerstoffe, die - wie in Versuchen gezeigt werden konnte - einen negativen Einfluss auf die Aktivierung zum Oleuropein-Aglykon hatten.

Für die biotechnologische Aktivierung von Oleuropein im Olivenblattextrakt wurden kommerzielle beta-Glucosidase-Produkte bzw. Enzymformulierungen mit beta-Glucosidase-Nebenaktivität eingesetzt. Desweiteren wurde die Aktivierbarkeit des Oleuropeins durch Fermentation mit Milchsäurebakterien der Familie *Lactobacillaceae*, von denen bekannt ist, dass sie beta-Glucosidase exprimieren, untersucht.

Die Aktivierung von Oleuropein zu Oleuropein-Aglykon durch Fermentation in einem mit Olivenblattextrakt angereicherten Medium konnte mit *Lactobacillus plantarum* gezeigt werden. Die Ausbeute an Oleuropein-Aglykon erreichte auch nach mehrtägiger Kultivierungszeit nur Werte bis zu <70 %. Eine Korrelation der Lactobacillen-Wachstumsrate mit der Bildung von Oleuropein-Aglykon konnte gezeigt werden. Als problematisch beim Mediumdesign zur Verbesserung der Biomassebildung stellte sich heraus, dass die Zugabe von Stickstoffquellen für das Wachstum der Mikroorganismen essentiell ist, aber gleichzeitig auch die Gefahr besteht, dass gebildetes Oleuropein-Aglykon mit den primären Aminogruppen von Mediumbestandteilen reagieren kann. Auch wenn die Machbarkeit der Aktivierung zum Oleuropein-Aglykon mittels Lactobacillus-Fermentation gezeigt werden konnte, bedarf es aber noch tiefgreifender Arbeiten, um den Fermentationsprozess an den Aktivierungsprozess zu adaptieren.

Wesentlich effektiver gestaltete sich die Aktivierung von Oleuropein mit kommerziellen Enzymformulierungen. Durch zahlreiche Screeningversuche und nachfolgende Optimierungsansätze konnten Reaktionsbedingungen eruiert werden, die einen wirtschaftlichen Herstellungsprozess erwarten lassen. Das Scale-up der Aktivierung im Rührkessel ist beim Einsatz von standardisierten Enzymen einfacher im Vergleich zur Maßstabsvergrößerung von Fermentationsprozessen. Nach 8 Monaten Projektlaufzeit - wie im Projektplan vorgesehen - wurden nach Bewertung beider Aktivierungsmöglichkeiten, die Versuche zur fermentativen Aktivierung gestoppt und der Fokus der Arbeiten auf die Etablierung einer Prozesskette mittels enzymatischer Aktivierung zur Herstellung von Oleuropein-Aglykon herangezogen.

Die Überführung der enzymatischen Aktivierungsversuche zum Oleuropein-Aglykon konnte von BZN aus dem Labormaßstab in den Technikumsmaßstab erfolgreich durchgeführt werden.

Zur Herstellung gereinigter Oleuropein-Aglykon-Formulierungen mussten Strategien zur Konzentrierung etabliert werden. Von der Fa. IFU-Hamburg wurden uns die energetischen Daten für gängige Konzentrierungsverfahren (Ultrafiltration, Gefriertrocknung, Sprühtrocknung und Vakuumdestillation) zur Verfügung gestellt. Basierend auf dem niedrigsten Energieindex der Membranfiltration wurde der Arbeitsschwerpunkt auf dieses Verfahren gelegt. Versuche bei BZN mit unterschiedlichen Membranen zeigten, dass die Nanofiltration zur Konzentrierung von Oleuropein bzw. aktiviertem Oleuropein-Aglykon geeignet ist. Die Überführung in den Technikumsmaßstab konnte ebenfalls erfolgreich demonstriert werden. Beide Komponenten konnten problemlos um mehr als das 10-fache konzentriert werden, ohne die Membranen zu verstopfen.

Zur Anreicherung von Oleuropein-Aglykon wurden zahlreiche Adsorbentmaterialien getestet. Mit FPX66 konnten im Verlauf der Projektzeit die besten Konzentrierungsergebnisse erreicht werden. Nach Elution mit EtOH und Abdampfen des Lösungsmittels konnte Oleuropein-Aglykon mit einer Konzentration von etwa 30% (w/w) gewonnen werden. Technische Glutaraldehydprodukte weisen Konzentration von 25 – 40% (w/w) auf.

Die *in vitro* Zell-Untersuchungen von Oleuropein-Aglykon bei AKK und der Fa. Harlan RCC als externer Dienstleister ergaben indifferente Ergebnisse. Basierend auf diesen Resultaten weisen die Mengen von Oleuropein-Aglykon und dessen Derivaten - wie sie beim Verzehr von Olivenöl bzw. Oliventee aufgenommen und als gesundheitsfördernd in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben werden - zytotoxisches Potenzial auf. Die Resultate aus diesen Untersuchungen zeigten deutlich, dass die Bewertung in Abhängigkeit von der Applikation vorgenommen werden muss. Zahlreiche Anwendungsversuche haben die Funktionalität der Olivenvernetzer gezeigt, indem beispielsweise temperaturstabile und vernetzte Hydrogele, Hackfleisch und Gelatine mit veränderten physikalischen Eigenschaften hergestellt werden konnten. Da bei der Anwendung die Olivenvernetzer abreagieren,

wäre es sicherlich sinnvoll das toxikologische Potential der vernetzten Produkte zu überprüfen und nicht das der Einzelsubstanzen. Diese Vorgehensweise wird auch durch zahlreiche Diskussionen mit Herstellern von Biomedizinprodukten bestätigt, da nur der Anwender in der Lage ist, das notwendige Design für die toxikologischen Untersuchungen in dem jeweiligen Anwendungsgebiet auf Basis des jeweiligen regulatorischen Umfeldes zu definieren und anschließend die Resultate applikationsspezifisch bewerten zu können. Folgerichtig ist eine Bewertung der Zytotoxizität nur nach Vorliegen der Produktformulierung sicher möglich.

Im Rahmen des Projektvorhabens konnte durch die Zusammenarbeit der Projektpartner der in Abb. 1 schematisch dargestellte Herstellungsprozess etabliert werden. Alle Daten wurden als Grundlage für die Ökoeffizienzanalyse durch die Fa. IFU-Hamburg herangezogen.



Abb. 1: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Oleuropein-Aglykon (Stand der Technik nach Abschluss des Projektvorhabens Eco-X-Linking).

In der Ökoeffizienzanalyse (ÖEA) durch die Fa. IFU-Hamburg wurde der Herstellungsprozess des synthetisch hergestellten Glutaraldehydes (erdölbasiert) mit dem aus der Nutzung von Olivenreststoffen und unter Einsatz biotechnologischer Methoden hergestellten Oleuropein-Aglykon verglichen. Als Gesamtfazit kann aus der ÖEA geschlossen werden, dass sich beide Prozesse ökologisch auf gleichem Niveau befinden, während der seit Jahren etablierte und optimierte, auf billigem Rohöl basierte Glutaraldehyd-Herstellungsprozess ökonomisch noch überlegen ist. Steigende Rohölpreise sowie die Optimierung des Oleuropein-Aglykon-Herstellungsprozesses sowie Skaleneffekte lassen aussichtsreich erwarten, dass alleine durch Erhöhung der Ausbeute im Verfahren, Reduktion von Wasser bei der Extraktion, Reduktion von EtOH und Gewinnung von Koppelprodukten - neben der Verbesserung der ökologischen Daten - auch die Kosten für Oleuropein-Aglykon erheblich reduziert werden können, um hieraus mittel- und langfristig ein zu Glutaraldehyd konkurrenzfähiges Produkt herstellen zu können.

2. Anlass und Zielsetzung des Projekts

Pro Jahr fallen bei einer Weltproduktion von mehr als 15.000.000 t Oliven Olivenreststoffmengen von mehr als 30.000.000 t als Olivenblätter, Olivenöl-Abwasser und Oliventrester (Pomace, Alperujo) an (Niaounakis and Halvadakis; 2006). Bei Wachstumsraten der Olivenölindustrie von über 3 % werden jährlich neue Olivenbäume zur Gewinnung von Olivenöl bzw. Tafelolivenproduktion gepflanzt, was wiederum zu höheren Mengen von Nebenprodukten der Olivenindustrie führt. Die biologische Abbaubarkeit und Verwertbarkeit ist durch den hohen phenolischen Anteil in den Reststoffen stark eingeschränkt und führt in den olivenanbauenden Regionen zu erheblichen Umweltbelastungen. Zahlreiche Lösungskonzepte zur Nutzung der flüssigen und festen Olivenrestströme wie deren Verbrennung zur Energiegewinnung, Kompostierung, Nutzung als Dünger oder Tiernahrung führten bisher zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen.

Mit Oleuropein enthalten Olivenreststoffe ein Vorläufermolekül eines natürlichen Vernetzers, das durch gezielte biokatalytische Modifikation (Abspaltung von Glucose) zum so genannten Oleuropein-Aglykon umgesetzt werden kann. Hier entsteht zunächst ein ringförmiges Halbacetal, das nach Ringöffnung zu dialdehydischen, vernetzungsaktiven Molekülen umgewandelt werden kann (Abb. 2).

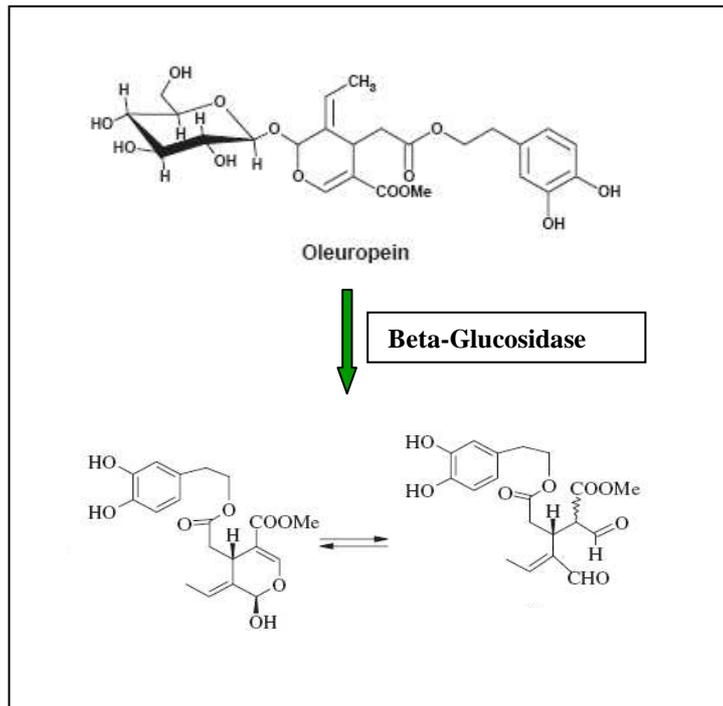


Abb. 2: Beta-Glucosidase katalysierte Aktivierung von Oleuropein zum Oleuropein-Aglykon

Die Aglykone, sind strukturell (C5-Grundgerüst mit zwei Aldehydgruppen) mit Glutaraldehyd vergleichbar, enthalten aber Substituenten, wie z.B. einen antioxidativen Anteil (Hydroxytyrosol). Zur Herstellung des vernetzungsaktiven Oleuropein-Aglykons aus Oleuropein ist eine enzymvermittelte Abspaltung von Glukose mittels beta-Glucosidase erforderlich, ein Prozess, der auch bei der Verarbeitung von Olivenöl und Tafeloliven durch Katalyse der in den Oliven selbst vorkommenden beta-Glucosidase auftritt.

Das bifunktionelle Dialdehyd (Vernetzung, antioxidativ), welches auch in Extra Virgin Olive Oil (EVOO) enthalten ist und in zahlreichen Literaturstellen als gesundheitsfördernde Substanz beschrieben wird (Agalias *et al.*, 2005; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2007, Servili *et al.*, 2006; Selvaggini *et al.*, 2006; Al-Azzawie *et al.*, 2006; Gonzales *et al.*, 1991; de Castro and Japon-Lujan, 2006), soll eine Substanz-Plattform für zahlreiche Anwendungen bieten.

Die Arbeitsschwerpunkte im Projektvorhaben lagen vor allem in der Identifizierung und Formulierung eines geeigneten Olivenreststoff-Ausgangsproduktes, der Selektion des besten biokatalytischen Aktivierungsverfahrens (fermentative oder enzymatische Aktivierung), der Etablierung eines geeigneten Produkt-Anreicherungsverfahrens als Grundlage für die Ökoeffizienzanalyse, der toxikologischen Bewertung der gereinigten Olivenvernetzer sowie in

Anwendungsversuchen im Nahrungsmittel- bzw. Kosmetiksektor zur Überprüfung der Funktionalität des Olivenvernetzers.

Das Projektvorhaben war so organisiert, dass die Basisentwicklung sowie die Optimierungsversuche zur Etablierung des Olivenvernetzer-Herstellungsprozesses im Labormaßstab von N-Zyme, das Scale-up der Prozesse von BZN durchgeführt wurden. Anwendungsversuche im Lebensmittelbereich wurden partiell auch von der Firma Döhler unterstützt. Das Anwendungspotenzial des Olivenvernetzers in kosmetischen Fragestellungen sollte von der Universität AKK und der Fa. Dr. Rieks GmbH eruiert werden. Bereits vor Projektstart verlor der Projektverbund mit dem Ausscheiden der Fa. Dr. Rieks GmbH (Insolvenzverfahren) einen Kompetenzträger bei der Herstellung von kosmetischen Formulierungen (w/o- bzw. o/w-Emulsionen). Der multifunktionale Olivenvernetzers sollte in kosmetischen Formulierungen hinsichtlich Stabilität, antimikrobieller Aktivität und antioxidativen Potenzials bewertet werden. Die entstandene Lücke im Kosmetikbereich konnte während der Projektlaufzeit nicht mehr geschlossen werden. Aber durch Kooperationen mit Medizinprodukte-Herstellern konnte ein neues aussichtsreiches Anwendungsfeld im Biomedizinsektor erschlossen werden. Toxikologische Untersuchungen der Olivenvernetzer wurden von AKK und der Fa. Harlan als Unterauftrag durchgeführt. Die Ökoeffizienzanalyse erfolgte durch die Fa. IFU-Hamburg.

3. Verwendete Methoden

3.1 Ökoeffizienzanalyse (Externer Dienstleister: Fa. IFU-Hamburg)

Die Ökobilanz wurde nach DIN EN ISO 14040 & 14044 erstellt. Es wurde kein „critical review“ durchgeführt, wodurch die vergleichende Analyse unter dieser DIN nicht der Öffentlichkeit präsentiert werden darf.

Annahmen und Rahmenbedingungen:

Die angewandte Methode basiert auf der Veröffentlichung von: P. Saling, *et al*, Eco-efficiency analysis by BASF - The Method, Int. J. LCA 2002, 7, 4, 203-218.

Das Risikopotential wurde aufgrund mangelnder Informationen als ökologischer Indikator nicht berücksichtigt. Für die Ökobilanz wurden Datensätze aus der Datenbank *ecoinvent* benutzt, die Modelle wurden mit *Umberto* erstellt und die ökologischen Ergebnisse der Ökoeffizienz-Analyse wurden mit der Methode des *Ecoindicator 99* überprüft und diskutiert.

3.2 Methoden zur Aktivierung von Oleuropein

Durch Abspaltung der Glucose von Oleuropein kann das Molekül in seine aktivierte Form (Oleuropein-Aglykon) überführt werden. Als Strategie zur Überprüfung des Aktivierungspotenzials von Oleuropein wurden im Projekt Lactobazillen aus der Stammsammlung von N-Zyme, Mikroorganismen-Isolate aus Olivenreststoffen sowie kommerziell erhältliche beta-Glucosidasen verwendet und auf ihre Produktivität und Effektivität zur Bildung des Oleuropein-Aglykons untersucht.

3.2.1 Fermentative Aktivierung

3.2.1.1 Methoden zur Isolierung von Mikroorganismen

Aus Olivenblättern, Oliventrester und Olivenwaschwasser verschiedener mediterraner Herkunftsorte wurden Mikroorganismen isoliert. Die Olivenblätter und der Oliventrester wurden hierzu in 50 mL MRS-Nährmedium, welches ein Standardmedium für die Kultivierung von Laktobazillen darstellt, gegeben. Die Inkubation der Kulturen erfolgte in Standkulturen für 72 h bei 37 °C. Von den bewachsenen MRS-Nährmedien sowie vom Olivenwaschwasser, wurden Mikroorganismen mit Hilfe eines Spatels unter sterilen Bedingungen auf MRS-Agar Platten ausgestrichen und für weitere 72 h bei 37 °C anaerob sowie aerob kultiviert.

Nach morphologischer Charakterisierung wurden die Mikroorganismen mit Hilfe von Vereinzelungsausstrichen auf MRS-Agar in Reinkultur gewonnen..

3.2.1.2 Methoden zur Identifikation von Mikroorganismen

Nach morphologischer Klassifizierung (vorwiegend Hefen und Lactobazillen) wurden die Mikroorganismen mittels molekularbiologischer Methoden identifiziert. Hierzu wurde die DNA der Mikroorganismen-Reinstämme isoliert, mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Für Bakterien wurde das nexttec™ Clean Columns Kit und für die Isolation der DNA von Hefen wurde das MasterPure Yeast DNA Purification Kit verwendet. Die DNA-Reinigung erfolgte mittels Qiaquick PCR Purification Kit von Qiagen. Die Analyse der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des Agilent DNA 1000 Kit und dem Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt.

3.2.1.3 Kultivierung von Mikroorganismen auf Agarplatten und in Schüttelkolben bzw. Rührreaktoren (4 x 1 L, Braun Biotech)

Milchsäurebakterien, wie z.B. *L. plantarum*, wurden zur Stammhaltung und zum beta-Glucosidase-Nachweis (Zugabe von X-Glu) auf MRS-Agarplatten kultiviert. Ciafardini *et al.* (1994) beschrieben das Wachstum eines von Oliven isolierten Lactobazillen auf MRS-Agar-Platten, welche 1 % Oleuropein enthielten. Zur Isolierung, Anreicherung und Selektion der Mikroorganismen wurde MRS-Agar ggf. zusätzlich Olivenblattkonzentrat mit Oleuropein zudosiert.

Um während der Kultivierung Oleuropein-spaltende Aktivität ermitteln zu können, wurde das Nährmedium mit unterschiedlichen Mengen Olivenblattextrakt (OBEP, mit Oleuropein) versetzt. Desweiteren wurde modifizierte MRS Bouillon (mmMRSBouillon) entwickelt, die im Gegensatz zum üblichen MRS-Nährmedium keinen Fleischextrakt oder Pepton enthält, um ein Abreagieren des *de novo* gebildeten Oleuropein-Aglykons zu unterbinden. Zur Stammerhaltung wurden Mikroorganismen-Isolate als Kryokulturen bei -80 °C gelagert.

3.2.1.4 Methoden zum Nachweis von beta-Glucosidase-Aktivität auf Agar-Platten und in Lösung

Zur Identifizierung und Selektion von beta-Glucosidase bildenden Bakterien wurde das Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucopyranosid (X-Glu) eingesetzt (Ciafardini *et al.* (1994)). Dabei führt die Bildung von beta-Glucosidase zur Abspaltung von Indoxyl, welches zum unlöslichen Indigo oxidiert wird. Blau gefärbte Kolonien sind daher ein Hinweis für die Expression von beta-Glucosidase (Abb. 3).

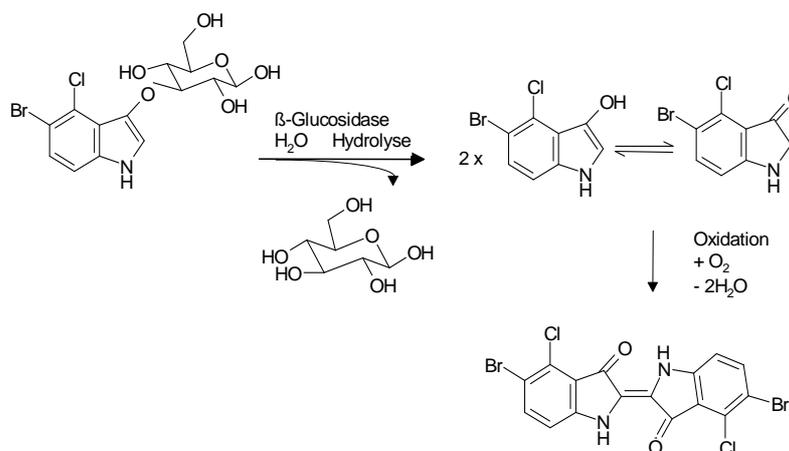


Abbildung 3: Hydrolyse von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucopyranosid durch beta-Glucosidase

Zur Ermittlung der beta-Glucosidase-Aktivität in Lösung wurde die Bestimmungsmethode der OIV (Internationale Organisation für Rebe und Wein) herangezogen. Die Methode beruht auf der enzymatischen Abspaltung der beta-Glucose von 4-Nitrophenol (Substrat: 4-NP- β -D-glucopyranosid). Unter Einwirkung des Enzyms wird 4-Nitrophenol aus dem Substrat freigesetzt, wodurch eine Gelbfärbung sichtbar wird. Die Menge des freigesetzten 4-Nitrophenols wird photometrisch bei 405 nm ermittelt.

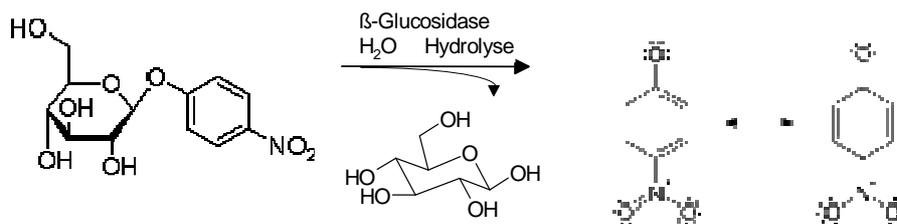


Abb. 4: Hydrolyse des Substrates 4-Nitrophenol zum Nachweis von beta-Glucosidase-Aktivität

3.2.2 Enzymatische Aktivierung

Kommerziell verfügbare Enzymprodukte (22 Enzym-Formulierungen) sowie Versuchsprodukte (Amano, AB-Enzymes, Biocatalysts, Danisco, DSM, Erbslöh, National Enzyme Company, Novozymes) mit beta-Glucosidase-Aktivität (Haupt- und Nebenaktivitäten) wurden auf das Potenzial zur Herstellung von Oleuropein-Aglykon getestet. Bei den Aktivierungsversuchen standen im Wesentlichen die Einflüsse der Temperatur, des pH-Werts und des Oleuropein/Enzym-Verhältnisses auf die Oleuropein-Aglykon-Bildungsrate im Fokus.

3.3 Nachweis von Oleuropein-Aglykon

3.3.1 Nachweis über RP-HPLC

Die Überprüfung der enzymatischen und fermentativen Oleuropein-Aglykon-Bildung erfolgte mittels RP-HPLC mit DAD-Detektor.

3.3.2 Nachweis über Messung der Gelatinevernetzungszeit (GVZ)

Die Bestimmung der Gelatinevernetzungszeit (GVZ) dient zur Beurteilung der Fähigkeit einer Lösung zur Vernetzung von Proteinen. Die Gelatinevernetzung wurde durch Zugabe von 500 μ L der zu analysierenden Lösung zu 4,5 mL einer auf 60 $^{\circ}$ C temperierten Gelatine-Lösung (10 % (w/w)) gestartet. Die Vernetzungsreaktion erfolgte bei 60 $^{\circ}$ C im Wasserbad. In regelmäßigen Abständen wurden die Proben

optisch beurteilt. Die Gelatinevernetzungszeit ist definiert als die zur Bildung eines stabilen Gels notwendige Reaktionszeit.

3.3.3 Nachweis über Vernetzung von globulären Proteinen und nachfolgende SDS-PAGE

Reaktionsansätze mit Oleuropein-Aglykon wurden in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur mit unterschiedlichen globulären Proteinen (z.B. Casein, Gluten, Zein) inkubiert und die Aggregatbildung der Proteine durch kovalente Vernetzung der Monomere zu Multimeren mittels SDS-PAGE analysiert. Mittels Silberfärbung wurden die vernetzten Proteine nach Abschluss der Elektrophorese visualisiert.

3.3.4 Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung und Charakterisierung von Oleuropein und Oleuropein-Aglykon wurde ebenfalls die Dünnschichtchromatographie (Kieselgel) eingesetzt. Als Laufmittelsysteme wurden Chloroform/Methanol/Essigsäure (90/10/1) und Chloroform/Ethylacetat/Essigsäure (50/50/1)-Systeme untersucht. Als Farbreagenzien zur Visualisierung der aufgetrennten Substanzen wurde UV-Licht, Anisaldehyd-Lösung, Folin-Lösung, FeCl₃-Lösung; Fehling-Lösung; Purpald-Lösung (4-Amino-5-hydrazino-1,2,4-triazol-3-thiol) und Cuminaldehyd-Lösung getestet.

3.3.5 Nachweise mittels massenspektrometrischer Untersuchungen

Die massenspektrometrischen Analysen von Reinsubstanzen wurden an der TU-Darmstadt durchgeführt.

3.4 Toxikologische Untersuchungen (Externer Dienstleister: Fa. Harlan)

Die toxikologischen Untersuchungen der Olivenvernetzer wurden von der Fa. Harlan als externem Dienstleister durchgeführt. Die *in vitro*-Studien wurden mit dem XTT-Test-System mit der Mauszelllinie L929 durchgeführt.

3.5 Zellkulturversuche (AKK)

In vitro-Zellkulturversuche mit verschiedenen Olivenvernetzerformulierungen sowie Glutaraldehyd wurden mit HaCaT-Keratinocyten durchgeführt. Mittels Neutralrot-Test wurden sowohl der *Release*-Test als auch *Uptake*-Tests durchgeführt. Die Vitalität der Zell-Linie wurde mittels MTT-Test ermittelt.

3.6 Charakterisierung, Trocknung und Anreicherung von OP-Aglykon

Zur Konzentrierung, Charakterisierung und Herstellung von Olivenvernetzer-Formulierungen wurden Sprühtrocknungsversuche (Mini-Sprühtrockner B290, Büchi), Gefriertrocknungen (Gefriertrockner Christ Beta 1-8), Partikelgrößenbestimmungen (Mastersizer, Malvern Instruments), Restfeuchtebestimmung (Sartorius MA45), Einkonzentrierungsuntersuchungen, Flüssig/Flüssig-Extraktion EtOH, Ethylacetat, Aceton, Hexan, Terpen u.a.) und Batch-Adsorber-Versuche (30 verschiedene Materialien) durchgeführt.

3.6.1 Anreicherung von Oleuropein-Aglykon mittels Membranfiltration

Ziel der Membranfiltration-Verfahrens-Entwicklung war die schonende Konzentrierung des Oleuropein-Aglykons bis zum gewünschten Konzentrationsgrad. Die flüssige Phase wurde im geschlossenen Kreislauf aus einem Vorratsbehälter mittels leistungsstarker Pumpe unter Druck durch ein Membranfiltrationsmodul gefördert. Im Membranmodul strömt das Produkt entlang der Membranoberfläche und wird mittels Druckdifferenz durch die dichte Membran teilweise filtriert. Die Produktzirkulation kann beliebig oft wiederholt werden, bis der gewünschte Konzentrationsfaktor des Mediums (Retentat) erreicht wird. Die Abbildung 5 zeigt eine allgemeine Darstellung eines Spiral-Wickel-Moduls.

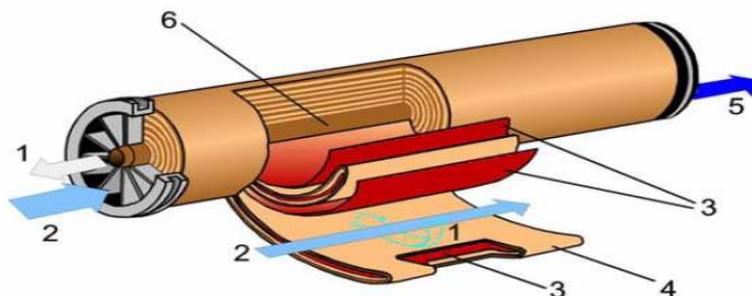


Abbildung 2. Spiralwickelmodul: 1 Permeat, 2 Stoffstrom, 3 Abstandhalter, 4 Membrantasche, 5 Retentat, 6 Permeatsammelrohr (G.U.N.T Gerätebau GmbH)

Abb. 5: Spiral-Wickel-Modul zur Konzentration von Oleuropein-Aglykon

Aufgrund der Molekülgröße des Oleuropein-Aglykons (378 g/mol) sind sowohl Nano- als auch Umkehrosrose-Membrantechniken denkbar. Die Laboranlage P-28 (0,5 L)

ist eine Kleinanlage für Versuche mit Flach- oder Kapillarmembranen. Je nach Betriebsweise können Mikrofiltrations-, Ultrafiltrations- und Umkehrosmoseversuche durchgeführt werden. Die Anlage ist für einen Druckbereich bis 40 bar, Strömungsgeschwindigkeiten von 0,1-6 m/s und Temperaturen von 0° bis 90°C ausgelegt. Diese Parameter erlauben Versuche unter Bedingungen, welche praktisch den gesamten Bereich der industriellen Membran-verfahren abdecken. In Abbildung 6 ist der Aufbau der Anlage dargestellt.

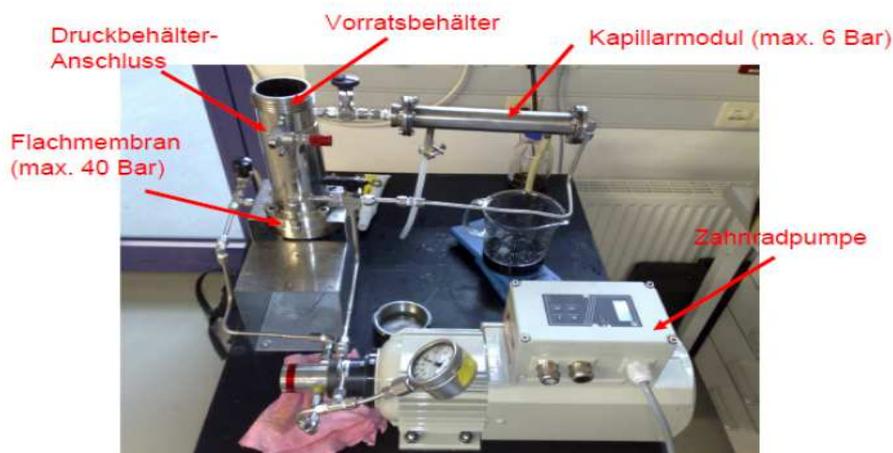


Abbildung 6: Maschinentyp; OS-MUR-P Typ P-28 für Umkehrosmose und Ultrafiltration; Membranzelle und Tangentialströmung; Baujahr 1991; Hersteller Osmota Membrantechnik GmbH

Aufgrund der Pumpenleistung der Anlage kann ein Druck von nur maximal 10 bar erreicht werden. Für das Erreichen von höheren Drucken bis 40 bar wird zusätzlich ein Stickstoffbehälter mit 200 bar Innendruck angeschlossen. Das maximale Vorratsvolumen der Laboranlage beträgt 500 ml. Die Arbeitstemperatur der Anlage darf im Bereich zwischen 0° und 90°C liegen. Für die Konzentrierung von OP-Aglykon wurde eine Reihe von gängigen Membrantypen untersucht, die in der Lebensmittelindustrie für die Konzentrierung von Fruchtsäften und Pflanzenextrakten verwendet werden (Mikrofiltrations-Modul, atech innovations GmbH; Flachmembran: Nadir PM UP 005, Nadir PM UP 020, Nadir PM UP 120, Nadir UC 030; Typ CE, RO; Typ DK, NF).

3.6.2 Entwicklung von Membranverfahren im Technikumsmaßstab (Membrananlage ttz-Umweltinstitut, 150 L)

Für die Versuche wurde aktivierter Olivenextrakt (hergestellt von der Fa. N-Zyme BioTec) eingesetzt. Die Konzentrierung des Oliverblattextrakts erfolgte mittels Crossflow-Filtration in der experimentellen Membranfiltrationsanlage des ttz Umweltinstituts.

Beim Membran-Modul handelt es sich um ein Spiral-Wickel-Modul speziell entwickelt für Tests im Technikumsmaßstab (siehe Abb. 7)

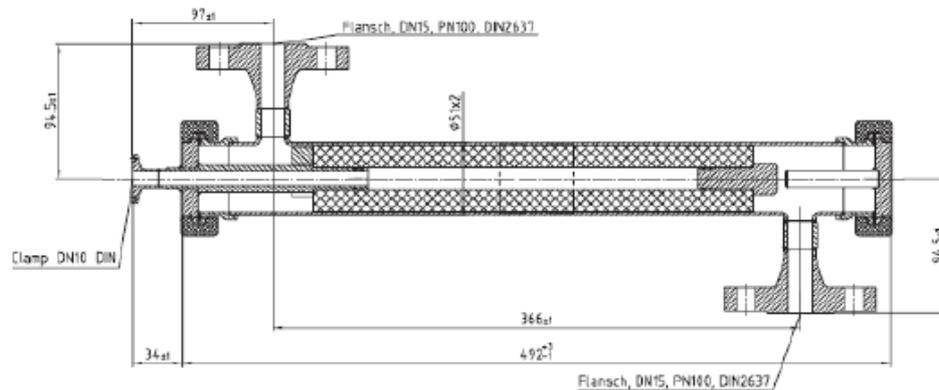


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Membran-Wickel-Moduls

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Isolierung von phenolischen Substanzen aus *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) führt zu einem Substanzgemisch mit dem es möglich ist, gelöste Gelatine kovalent zu vernetzen und damit irreversibel zu gelieren (Abb. 8)

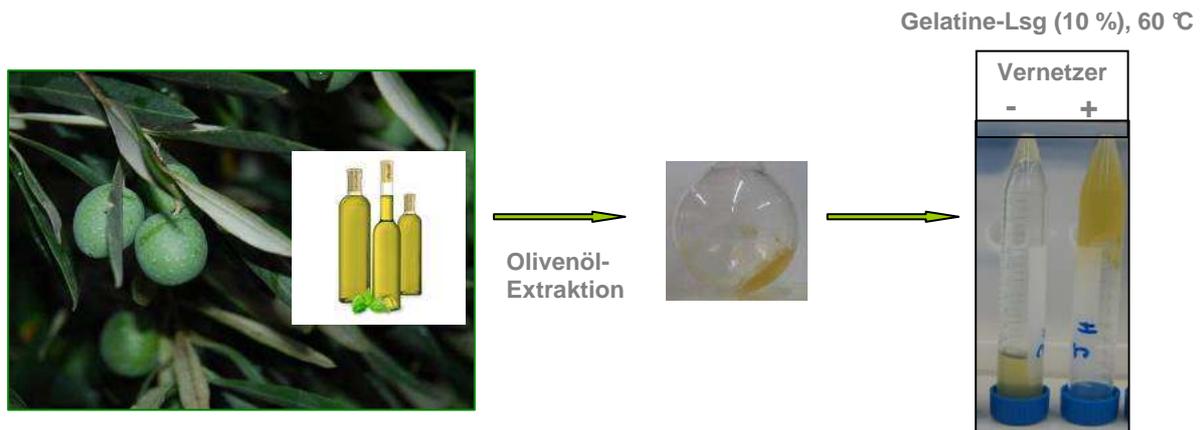


Abb. 8: Isolierung von Olivenölinhaltsstoffen zur Vernetzung von Gelatine

Für die Gelierung der Gelatine ist Oleuropein-Aglykon und deren Derivate verantwortlich. Das Grundgerüst von Oleuropein-Aglykon ist ein C5-Rückgrat mit zwei endständigen Aldehydgruppen, welches strukturell vergleichbar mit Glutaraldehyd ist (Abb. 9).

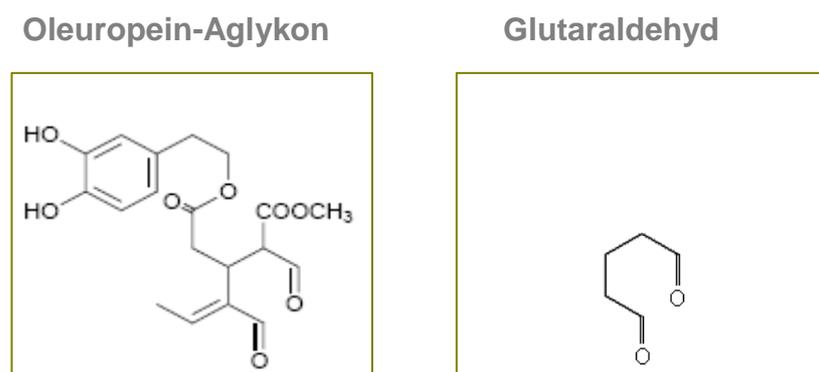


Abb. 9: Oleuropein-Aglykon hat das gleiche C5-Grundgerüst mit zwei endständigen Aldehydgruppen wie Glutaraldehyd – aber mit zusätzlichen funktionellen Gruppen (z.B. Hydroxytyrosol, Carboxymethylrest).

Oleuropein-Aglykon und deren Derivate in EVOO werden als gesundheitsfördernde Substanzen beschrieben, siehe Tabelle 1 (z.B. Luque de Castro *et al.*, 2006).

Tab. 1: Gesundheitsfördernde Effekte der Olivenölphenole

OBP	Krankheiten	Effekte
Oleuropein und dessen Derivate	Herzerkrankung	Schutz der Haut vor Oxidanzien, Schutz vor Herzinfarkt und Herzrhythmusstörungen
	Krebs	Bewahrung der Strukturintegrität von Enzymen und Schutz vor vorzeitigem Zelltod
	Antivirale Aktivitäten	Phytoalexinbildung, stimuliert durch β -Glucosidasen pathogener Induktoren, Inhibition einer in vitro Infektion durch Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS), Steigerung des Immunsystems gegen Krankheiten und Insektenstiche
	Fettleibigkeit	Regulation des Lipidstoffwechsels
3,4-DHPEA	Herzerkrankung	Verhinderung der Blutplättchenagglomeration und Eicosanoid-Produktion, Regulation der menschlichen Erythrocytenbildung, Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Blutplasmas
	Krebs	Inhibierung von Gewebswucherung und Förderung der Apoptose von Tumorzellen
	Asthma	Reduktion freier Radikale in den Bronchien
	Knochen	Vorbeugung von Arteriosklerose
	Diabetik	Vorbeugung von Diabetes
Oleocanthal	Entzündungen	Natürlicher Entzündungshemmer (vergleichbar mit Ibuprofen)
Olivenöl BPs	Herzerkrankungen	Lipoproteinoxidationsschutz
	Krebs	Schutz vor Prostata-, Brust- und Darmkrebs, Verhinderung frühzeitiger Apoptose

Nach Abspaltung von Glucose entsteht aus Oleuropein das Aglykon und in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und Enzymspektrum können hierbei zahlreiche Oleuropein-Aglykon-Derivate entstehen (siehe Abb. 9).

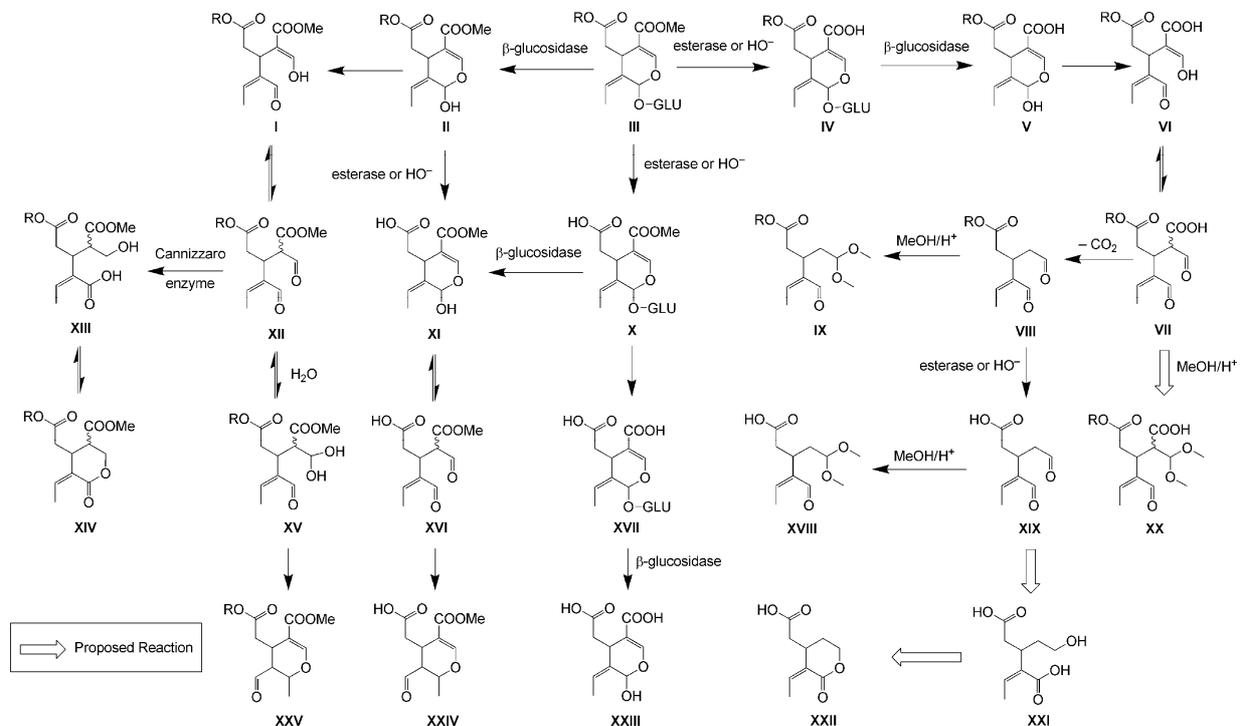


Abbildung 9: Übersicht von möglichen Reaktionen mit Oleuropein-Aglykon und deren Derivate (Deglukosilierungen, Isomerisierungen, Decarboxylierung, Oxidationen, Umlagerungen); (Obied *et al.* 2007)

Ziel des Projektvorhabens ist es Oleuropein-Aglykon und deren Derivate zu nutzen, um hieraus natürliche, nachhaltige, vernetzende Produkte für zahlreiche Applikationen herzustellen. Die Isolierung der aldehydischen Moleküle aus Olivenöl ist ökonomisch und ökologisch nicht sinnvoll. Da aber Olivenreststoffe aus der Olivenernte und Tafelolivenherstellung (Olivenblätter, Olivenwaschwasser, Olivensalzlauge, Oliventrester) Oleuropein enthalten, soll Oleuropein-Aglykon durch Nutzung biotechnologischer Prozesse hergestellt und angereichert werden und das hieraus gebildete natürliche Vernetzungsmittel im Rahmen einer Ökoeffizienzanalyse mit dem chemischen Pendant Glutaraldehyd verglichen werden.

4.1 Olivenreststoffe – Qualität und Verfügbarkeit

Die Qualität der Olivenreststoffe bildet die Basis zur Etablierung effizienter und ökonomischer Prozesse, um hieraus Vernetzerformulierungen für verschiedene Applikationen herstellen zu können.

Innerhalb des Projektes konnten über zahlreiche Kontakte zu Olivenblatt- und Extraktherstellern sowie zu verschiedenen olivenverarbeitenden Firmen und Genossenschaften (Olivenöl bzw. Tafelolivenhersteller) verschiedene Reststoffe (Olivenblätter, Oliventrester und Olivenwaschwasser) auf ihren Gehalt an Oleuropein untersucht werden.

In Oliventrester (Pomace), d.h. im verbliebenen Feststoffanteil nach dem Abpressen von Olivenöl, sowie Olivenwaschwasser (OMWW: *Olive mill waste water*), die flüssige Phase aus der Mazeration, Dekantieren und Waschen der Oliven, konnte Oleuropein nachgewiesen werden. Es stellte sich aber heraus, dass die Art der Probenahme, die Herkunft, die Lagerung sowie der Transport einen erheblichen Einfluss auf die Qualität dieser Reststoffe haben. Die Oleuropeingehalte in OMWW schwankten erheblich und werden von den Umweltgegebenheiten wie z.B. Sonneneinstrahlung, Regeneintrag und Temperatur stark beeinflusst. So konnten wir nachweisen, dass z.B. in einem Teich, bestehend aus Olivenwaschwasser, der Probenentnahmestort entscheidenden Einfluss auf den Oleuropein-Gehalt hat. Im Einleitungsbereich waren ausreichende Mengen des Vernetzervorläufermoleküls nachweisbar, während im Auslauf geringfügige Mengen an Oleuropein messbar waren. Die Nutzung dieser Reststoffe ist nach wie vor anstrengenswert, zumal es sich um einen Nebenstrom des Lebensmittels Olivenöl handelt. Eine zeitnahe Umsetzung ist nicht möglich, aber mittelfristig muss das Potenzial vorort und mittels strikter Prozessüberwachung eruiert werden.

Weitergehende Untersuchungen zur Gewinnung des Vernetzers aus Oliventrester wurden vorerst zurückgestellt, da Oleuropein bzw. Oleuropein-Derivate in den zur Verfügung stehenden Treestern nur in Spuren nachgewiesen werden konnten.

Das aussichtsreichste Potenzial zur Gewinnung eines natürlichen Olivenvernetzers weisen Olivenblätter auf. Olivenblätter werden als Lebensmittel eingestuft und werden in mediterranen Speisen als Gewürzbeigabe zugegeben. Oliventee ist

ebenfalls für seine gesundheitsfördernden Wirkungen bekannt. Aktuell werden Olivenblätterextrakte auch Getränken zudosiert (siehe hierzu Tab. 6 und 7).

Verschiedene Olivenblättersorten aus verschiedenen mediterranen Ursprungsländern und Regionen wurden auf Ihren Oleuropein-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Gehalte sich stark unterscheiden (Abb. 10) und

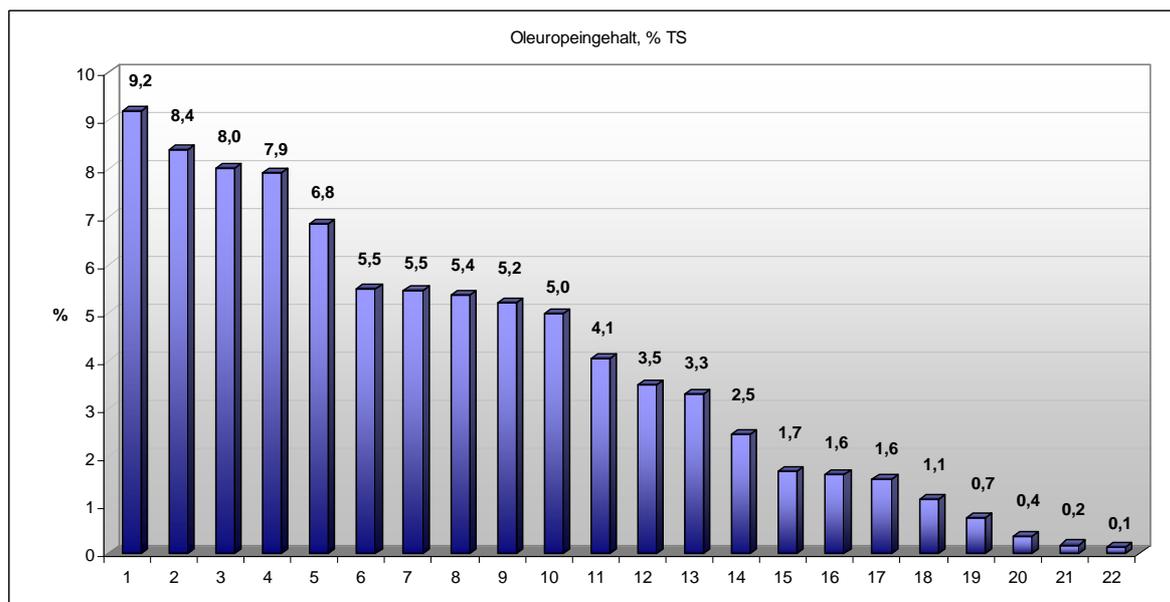


Abb. 10: Oleuropeingehalte verschiedener Olivenblättersorten aus verschiedenen Anbauregionen. 1) Mischung (Spanien, Ibiza) 2) Mischung (Spanien, Malaga), 3) Mischung (Spanien, Cordoba) 4) Mischung (Italien), 5) Manaki (Griechenland), 6) Koroneiki (Griechenland), 7) Picual (Spanien), 8) Mischung kommerziell Erhältlich (Spanien), 9) Mischung (Italien), 10) Mischung (Spanien), 11) Gemlik (Türkei), 12) Kommerzielles Produkt (Spanien), 13) Olivengenossenschaft (Italien), 14) Mischung (Türkei), 15) Memicik (Türkei), 16) Empeltre (Spanien), 17) Arbequina (Spanien), 18) Gemlik variety (Türkei), 19) Mischung (Türkei), 20) Gemlik variety 1 (Türkei), 21) Gemlik variety 2 (Türkei); 22) Memicik (Türkei),

dass insbesondere die Auswahl der Sorte einen entscheidenden Einfluss auf die aus den Blättern extrahierbare Oleuropeinmenge hat. Spanische Blätter wiesen durchschnittlich einen höheren Oleuropeingehalt auf, während in türkischen Blättern deutlich geringere Konzentrationen nachweisbar sind. In Spanien werden vorwiegend die Sorten Picual, Picudo und Hojiblanca angebaut, Sorten, die sich für die Herstellung des Olivenvernetzlers eignen.

Alleine in Spanien und insbesondere in der Region Andalusien (größtes zusammenhängendes Olivenanbaugebiet der Welt, siehe Abbildung 11) könnten basierend auf dem Reststoff Olivenblatt mehrere tausend Tonnen Olivenvernetzer hergestellt werden.



Abb. 11: Linkes Bild: in Andalusien (in der Nähe von Granada) aufgenommenes Bild von Olivenplantagen; rechtes Bild: Google-Maps-Ansicht von Olivenplantagen in Andalusien – jeder Punkt entspricht einem Olivenbaum.

Somit stellt die Verfügbarkeit von Olivenblättern als Nebenprodukt der Olivenernte keinen limitierenden Faktor zur Herstellung von natürlichen Vernetzerprodukten stellt für das Vorhaben dar.

Für die Entwicklung von, Olivenvernetzerformulierungen, wurde zu Projektbeginn vorerst mit kommerziellen Olivenblattextrakten mit standardisierten Oleuropeingehalten gearbeitet. Der Vergleich von z.B. zwei kommerziell verfügbaren Olivenblattextrakten verdeutlichte, dass die Verfahren zur Gewinnung der Produkte unterschiedlich sind. Obwohl die Olivenblattextrakte auf 20 % (w/w) Oleuropein standardisiert wurden, zeigt bereits das Erscheinungsbild die Verschiedenheit, die auch durch Messung der Partikelgröße (siehe Abb. 12) bestätigt wurde.

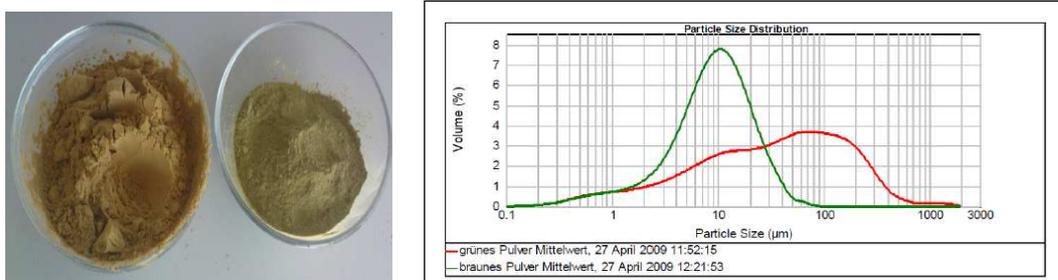


Abb. 12: Erscheinungsbild und Partikelgrößenmessung von Olivenblattextrakten der Fa. 1 (braun) und Fa. 2 (grün).

Beide Extrakte lösen sich nicht vollständig in Wasser und unterscheiden sich hinsichtlich der Sedimentbildung. Die meisten bisher getesteten Extrakte enthalten z.B. Chlorophyll, was darauf schließen lässt, dass die Extraktion in Gegenwart von alkoholischen Lösungen stattgefunden hat. Die ethanolische Extraktion ist jedoch zur Herstellung eines Olivenvernetzlers für Lebensmittelanwendungen aus lebensmittelrechtlichen Gründen nicht geeignet bzw. mit einem stark erhöhten regulatorischen Aufwand verbunden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Bildung von Oleuropein-Aglykon durch Aktivierung von Oleuropein mit beta-Glucosidasen abhängig von den Extrakten war und großen Schwankungen unterlag. Basierend auf oben beschriebenen Erkenntnissen wurde von N-Zyme BioTec - zusätzlich zum vorgesehenen Projektplan – ein Extraktionsverfahren zur Herstellung eines standardisierten, wässrigen Olivenblattextraktes entwickelt und etabliert.

4.2 Herstellung eines wässrigen Olivenblattextraktes

In Spanien konnten potenzielle, zukünftige Partner gefunden werden, die N-Zyme mit unterschiedlichen Olivenblattchargen belieferten. Basierend auf diesen Olivenblättern wurde ein wässriges Extraktionsverfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, Oleuropein mit einer Ausbeute von 80 % zu gewinnen.

Innerhalb der letzten Monate ist es gelungen, die Fa. Plantextrakt (Martin-Bauer-Gruppe) als Kooperationspartner zu gewinnen. Das bei N-Zyme etablierte Extraktions- und Konzentrationsverfahren wurde zu Plantextrakt transferiert und ein Analysenabgleich durchgeführt. Diese Zusammenarbeit ermöglicht die industrielle Produktion von Olivenblattkonzentrat mit einer spezifizierten, gleichbleibenden Qualität.

4.3 Enzymatische und fermentative Aktivierung von Oleuropein im Olivenblattextrakt

Im Rahmen des Projektplans wurde die enzymatische und fermentative Aktivierung von Oleuropein in Olivenblattkonzentrat vergleichend untersucht. Bis zum Meilenstein 1 sollte eine Entscheidung getroffen werden, welche dieser Methoden für eine geplante technische und nachfolgende industrielle Umsetzung am vielversprechendsten ist.

Die Grundlage für beide Aktivierungsmethoden ist die enzymatisch (beta-Glucosidase) katalysierte Abspaltung von Glucose, damit aus dem inaktiven

Oleuropein die vernetzende, dialdehydische Form des Oleuropeinaglykon gebildet werden kann (siehe Abb. 12)

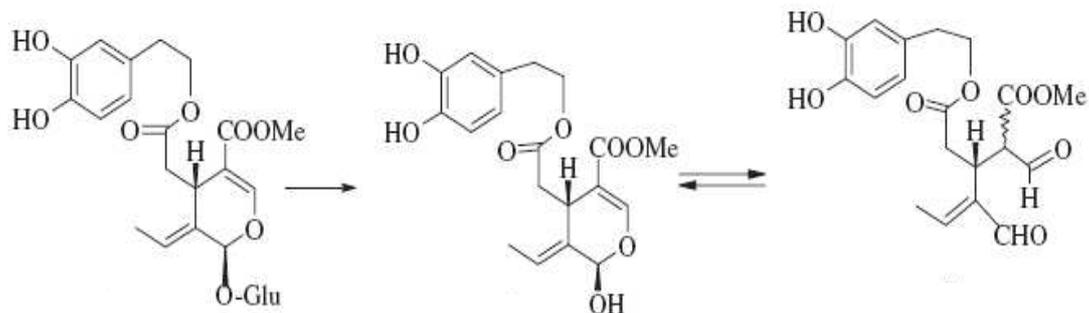


Abbildung 12: Aktivierung von Oleuropein zum Oleuropein-Aglykon durch Abspaltung der Glukose mittels beta-Glucosidase (Guiso and Marra, 2005)

Nachfolgend werden zuerst die Ergebnisse der fermentativen und anschließend die der enzymatischen Aktivierung dargestellt.

4.3.1 Fermentative Aktivierung von Oleuropein

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei spontanen Milchsäurefermentationen während der Herstellung von Tafeloliven Oleuropein zum Oleuropein-Aglykon umgewandelt wird (Ciafardini *et al.*, 1994). Die Überführung der spontan stattfindenden in eine gesteuerte Fermentation war Gegenstand der geplanten Untersuchungen. Nachfolgend sind die Ergebnisse zur fermentativen Aktivierung von Oleuropein zum Oleuropein-Aglykon aufgeführt.

Als Strategie zur Identifizierung von beta-Glucosidase-bildenden Mikroorganismen wurden Milchsäurebakterien der N-Zyme BioTec-Stammsammlung eingesetzt sowie Mikroorganismen, die von Tafeloliven, Oliventrester und Olivenwaschwasser isoliert werden konnten. Die Kultivierung erfolgte in MRS-Bouillon oder auf MRS-Agarplatten, welche üblicherweise für das Wachstum von Laktobazillen herangezogen werden.

Von den unterschiedlichen Substraten konnten auf MRS-Agar-Platten zahlreiche Mikroorganismen kultiviert werden. Erstaunlich war die Vielzahl an Mikroorganismen, die auf kommerziell erhältlichen Tafeloliven nachgewiesen werden konnten.

Abbildung 13 zeigt ein typisches Erscheinungsbild einer MRS-Platte mit „Tafeloliven-Mikroorganismen“.



Abb.13: Mikroorganismen isoliert von kommerziell erhältlichen Tafeloliven aus einem Olivenspezialitätengeschäft kultiviert auf einer MRS-Agarplatte

Insgesamt wurden auf MRS-Platten 63 verschiedene Mikroorganismen erfolgreich in Reinkultur kultiviert. Unter diesen konnten zehn Hefen identifiziert werden, die unter dem Mikroskop eine deutliche Knospenbildung erkennen ließen. Daneben konnten weiterhin, basierend auf makroskopischen sowie mikroskopischen Untersuchungen, 14 verschiedene Pilz- oder Actinomycetenkolonien mit einer typischen filamentartigen Struktur nachgewiesen werden. Die meist etwas kleineren weißlich bis leicht gelblichen Kolonien zeigten unter dem Mikroskop eine Stäbchen- bzw. Kokken-Form.

Bei der Reinkulturherstellung wurde der Fokus des Screenings gezielt auf Milchsäurebakterien gelegt, da aus der wissenschaftlichen Literatur bekannt ist, dass diese die Enzymausstattung zur Abspaltung der Glucose aus Oleuropein haben können (Landete *et al.*, 2007; Marsilio *et al.*, 1997; Ciafardini *et al.*, 1994). Vereinzelt wurden aber auch Hefen in Reinkultur dargestellt und molekularbiologisch identifiziert.

Zur Identifizierung beta-Glucosidase-bildender Mikroorganismen wurden die Kulturplatten vor der Beimpfung mit Mikroorganismen zusätzlich mit X-Glu ($C_{14}H_{15}BrClNO_6$) bestrichen. Beta-Glucosidase bildende Mikroorganismen spalten das synthetische Substrat, wodurch ein blauer Farbstoff (Indigo) entsteht.

In Abbildung 14 ist beispielhaft der Nachweis von beta-Glucosidase von *Lactobacillus plantarum* zu sehen.

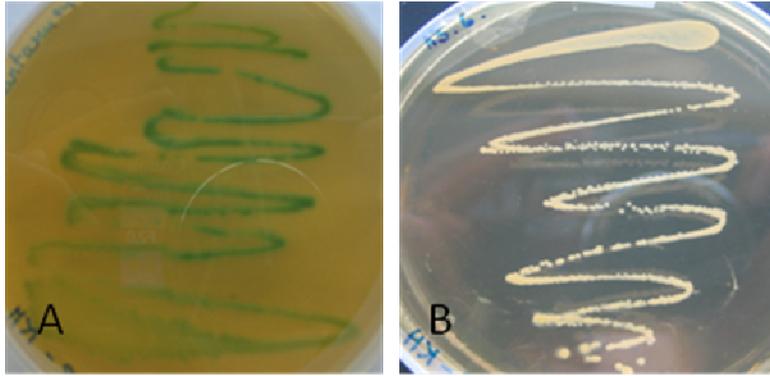


Abb. 14: *Lactobacillus plantarum* auf MRS-Agar (M-78-07cLAC_LPL1) Referenzstamm. (A) Blau gefärbte Kolonien, verursacht durch Hydrolyse des beta-Glucosidase-Substrats X-Glu ab dem dritten Tag. (B) Kultur auf MRS-Medium ohne chromogenes Substrat.

Mit dem spezifischen Farbsubstrat-Assay konnten 26 Reinkulturen mit beta-Glucosidase-Aktivität identifiziert werden.

In orientierenden Versuchen wurden von diesen 26 Reinkulturen mit einer Impföse Zellmaterial entnommen und in MRS-Flüssigmedium mit Oleuropein überführt. Während der anschließenden Kultivierung wurde der Abbau von Oleuropein bzw. die Bildung von Oleuropein-Aglykon untersucht.

Weiterhin wurden zur spezifischen Identifizierung der Reinkulturen DNA-Techniken eingesetzt

Folgende Arten konnten aus den Tafeloliven-Isolaten identifiziert werden:

- *Lactobacillus plantarum* (NZBT-SKN 00140),
- *Pediococcus parvulus* (NZBT-SKN 00145)
- *Acetobacter pasteurianus* (NZBT-SKN 00210)
- *Pichia anomala* (NZBT-SKN 8G2G2)
- *Saccharomyces cerevisiae* (NZBT-SKN 00174)
- *Debaryomyces hansenii* (NZBT-SKN 00198)

Für weiterführende Untersuchungen wurden zwei Stämme von *Lactobacillus plantarum* als Fermentationskeim zur Aktivierung von Oleuropein herangezogen. Sowohl der neu aus Tafeloliven isolierte *L. plantarum* (NZBT-SKN 00140) wie auch ein Hausstamm zeigten auf X-Glu-Platten eine im Vergleich zu den anderen Organismen verstärkte Bildung des blauen Farbstoffes. In *in-vitro* Assays mit dem synthetischen Substrat Glc-pNP konnte die Expression von beta-Glucosidase bestätigt werden. Aufgrund einer besseren Umsetzung von Oleuropein zu

Oleuropein-Aglykon erfolgten die Kultivierungsversuche mit dem Isolat *L. plantarum* (NZBT-SKN 00140).

Für die Kultivierung der Laktobazillen wurde eine modifizierte MRS-Bouillon (mmMRS-Bouillon) entwickelt. Auf Glucose wurde verzichtet, damit *L. plantarum* als C-Quelle bevorzugt die enzymkatalytisch abgespaltene Glucose aus Oleuropein nutzen sollte. Auf Pepton und Fleischextrakt wurde beim Nährmediumdesign ebenfalls verzichtet. Als Stickstoffquelle diente nur Hefeextrakt sowie der im Olivenblattextrakt enthaltene Proteinanteil.

Die Bildungsrate von Oleuropein-Aglykon korrelierte mit dem Wachstum von *L. plantarum* (siehe Abb. 15). Mit der Stagnation des Bakterienwachstums stoppte auch die Bildung von Oleuropein-Aglykon.

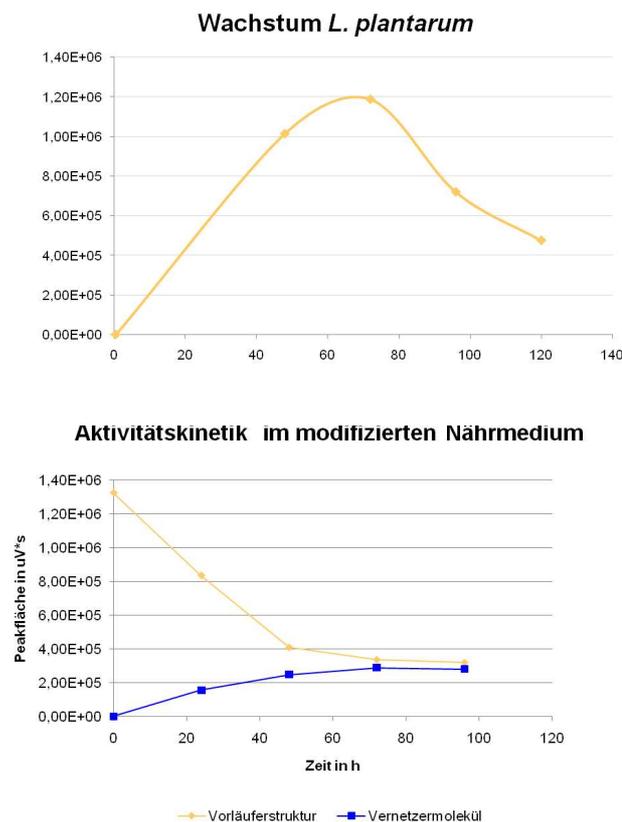


Abb. 15: Bildung von Oleuropein-Aglykon während der Fermentation von *L. plantarum* NZBT-SKN 00140. Bestimmung der KBE auf MRS und Bestimmung von Oleuropein/Oleuropein-Aglykon mittels RP-HPLC.

Die prinzipielle Machbarkeit zur fermentativen Aktivierung mittels *Lactobacillus plantarum* konnte gezeigt werden (Diplomarbeit Marco Nici). Obwohl das Verfahren

vielversprechende Ergebnisse zeigte, sind die Ausbeuten im Vergleich zur bei der enzymatischen Aktivierung erzielten Ausbeute sehr gering. Außerdem unterlag die Oleuropein-Aglykon-Bildungsrate starken Schwankungen und Oleuropein wurde nicht vollständig hydrolysiert. Basierend auf den noch notwendigen Arbeiten zur Aktivierung von Oleuropein mittels Fermentation wurde die enzymatische Aktivierung nach dem Stand der Technik als zielführender und ökonomischer bewertet. Der Schwerpunkt der Arbeiten wurde daher nach 8 Projektmonaten auf die enzymatische Herstellung von Oleuropein-Aglykon mittels kommerziell erhältlichen beta-Glucosidasen gelegt. Wie im Projektplan vorgesehen, gelang es, in der vorgesehenen Zeit stabile, mit Oleuropein-Aglykon vernetzte Gelatine-Gele herzustellen.

4.3.2 Enzymatische Aktivierung von Oleuropein

Zur enzymatischen Aktivierung von Oleuropein zu Oleuropein-Aglykon wurden 22 Enzympräparationen auf ihr Potenzial getestet. Als Substrat wurde in den ersten Versuchsreihen standardisierter Olivenblattextrakt verwendet. Als Analysemethoden wurden die RP-HPLC mit DAD-Detektion sowie die Gelatinevernetzungszeit (GVZ) herangezogen. Während der enzymatischen Reaktion konnten in Abhängigkeit von der verwendeten Enzymlösung immer wieder Umwandlungsreaktionen vom zunächst durch Glucose-Abspaltung gebildeten aktiven Oleuropein-Aglykon zu einem inaktiven Oleuropein-Aglykon-Derivat festgestellt werden.

Abb. 16 zeigt beispielhaft die enzymatische Aktivierung von Oleuropein zu Oleuropein-Aglykon (aktiv) innerhalb einer 6 stündigen Inkubation. Auffällig war, dass bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h ein zusätzliches Signal entsteht, das vermutlich durch ein Oleuropein-Aglykon-Derivat verursacht wird, welches auch in Olivenöl nachgewiesen werden konnte.

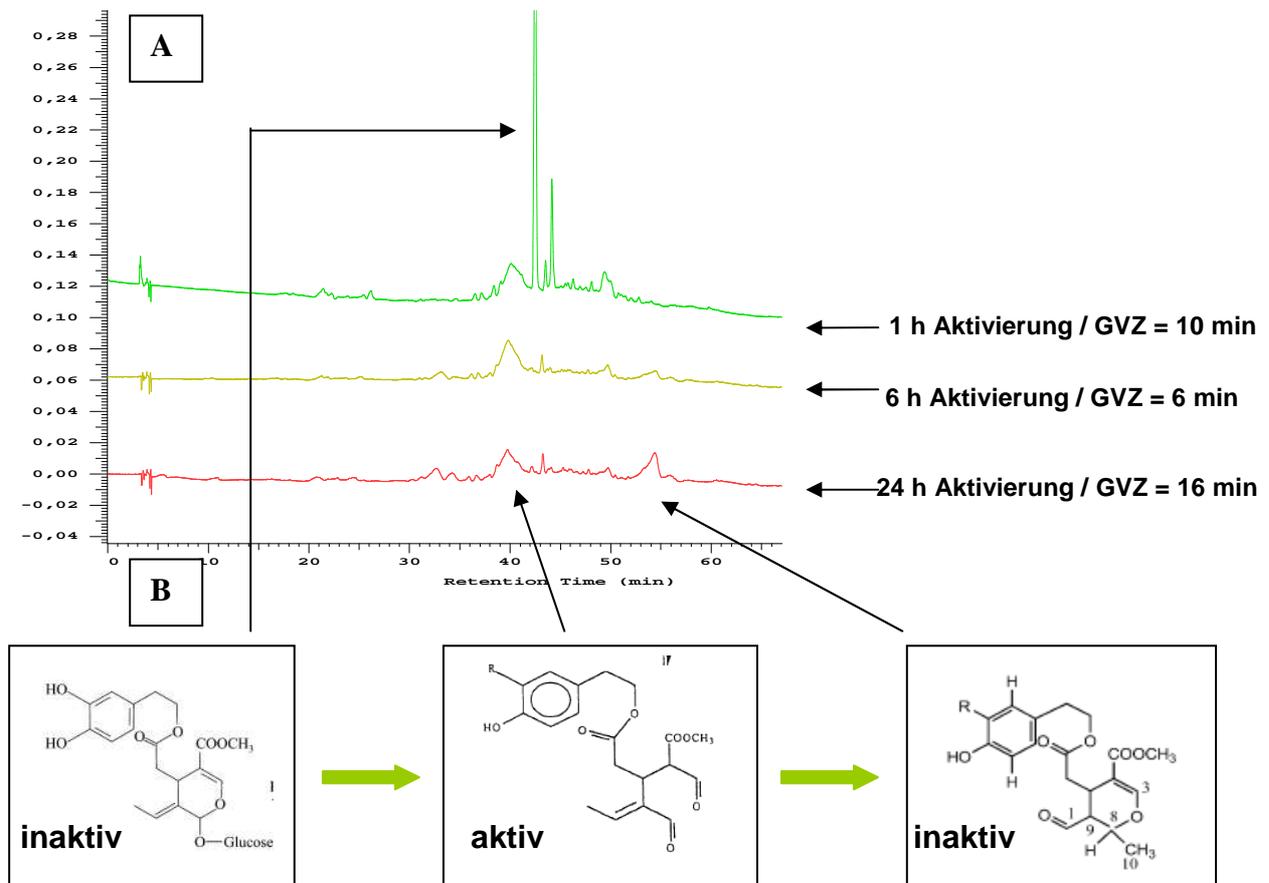


Abb. 16: Umlagerung von Oleuropein-Aglykon nach enzymatischer Aktivierung von Oleuropein. Aktivierungskinetik von Oleuropein mit beta-Glucosidase bei 45 °C mit zugehörigen Gelatinevernetzungszeiten (GVZ). A) RP-HPLC-DAD-Ergebnisse (280 nm; grün, gelb und rot = nach 1, 6 und 24-stündiger Inkubation); B) Aktivierung von Oleuropein zum aktiven Oleuropein-Aglykon-1 mit Dialdehydfunktion mit nachfolgender Umwandlung in die inaktive Form (Monoaldehyd, Oleuropein-Aglykon-2).

Die Umwandlungsreaktion nach enzymatischer Reaktion ist abhängig von der eingesetzten beta-Glucosidase-Formulierung, vom Olivenblattextrakt, von der Temperatur und dem pH-Wert.

Basierend auf den RP-HPLC-Daten und den Ergebnissen der Bestimmung der Gelatinevernetzungszeit wurden von 22 Enzymformulierungen 7 für weiterführende Untersuchungen herangezogen. In Abb. 17 sind die GVZ-Ergebnisse der Aktivierung von Oleuropein in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration dargestellt.

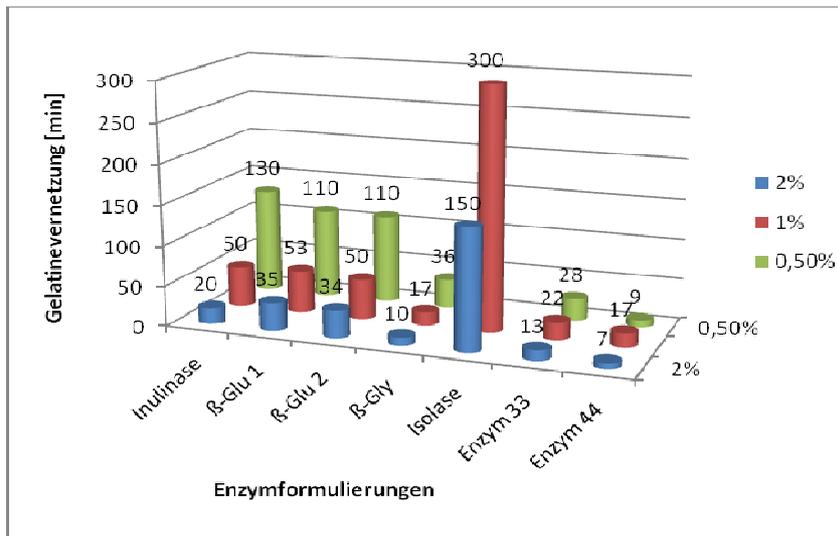


Abb. 17: Gelatinevernetzungszeit (GVZ) in Abhängigkeit der beta-Glucosidase-Formulierungen. Enzymatische Aktivierung von Olivenblattextrakt (20 %, Fa. Plantextrakt) mit unterschiedlichen Enzymformulierungen in Abhängigkeit von der Konzentration (2 %, 1 %, 0,5 %) nach einer Inkubationszeit von 24 h bei RT.

Unter Berücksichtigung der Bewertungskriterien Bildung von Oleuropein-Aglykon (aktiv und inaktiv), Nebenproduktbildung wie Hydroxytyrosol und Elenolsäure, Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit, Gelatinevernetzungszeit und -stabilität sowie Kosten, wurde Enzym44 als beste beta-Glucosidase-Formulierung identifiziert. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse einer Versuchsreihe, bei der Olivenblattextrakt der Fa. Plantextrakt in Abhängigkeit von der Temperatur (45, 50 und 55 °C) über einen Zeitraum von 24 h inkubiert wurde.

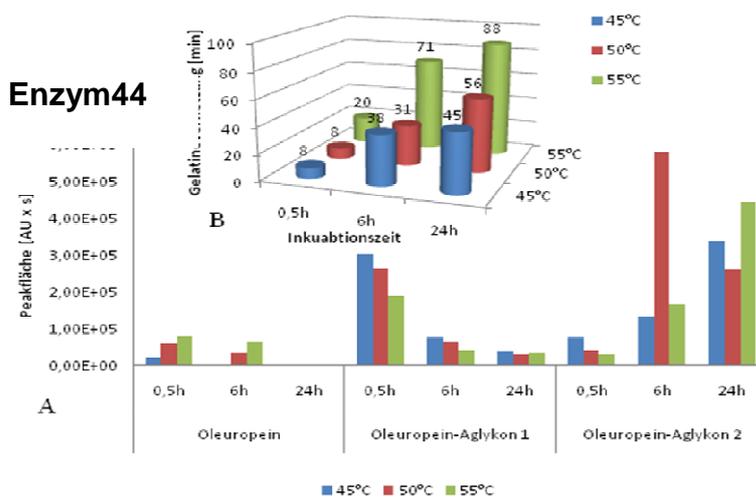


Abb. 18: Aktivierung von Oleuropein mit Enzym44 in Abhängigkeit von der Temperatur
 A) Ergebnisse der RP-HPLC; B) Gelatinevernetzungszeit: 20 % Olivenblattextrakt-Lösung, pH 5, wurde mit 2 % Enzym44 versetzt und bei 45°C, 50°C und 55°C inkubiert. Nach 0,5 h, 6 h und 24 h wurden Proben für die HPLC-Analyse sowie zur Ermittlung der GVZ entnommen.

Nach 30 min waren bei allen drei Temperaturen bereits 90 % des eingesetzten Oleuropeins zu Oleuropein-Aglykon-1 umgesetzt. Bei der Inkubation von Enzym44 mit Oleuropein bei 40 °C und 45 °C konnten nach einer Inkubationszeit von 30 min eine GVZ von 8 min erreicht werden. Eine Verlängerung der Reaktionszeit führte zur Bildung von inaktivem Oleuropein-Aglykon-2 bei gleichzeitiger Verschlechterung der Gelbildungszeit. In weiteren Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Umwandlung zu Oleuropein-Aglykon-2 bei höheren Temperaturen und höheren pH-Werten bevorzugt auftritt. Diese Ergebnisse zeigen, dass zuerst das aktive Oleuropein-Aglykon-1 gebildet wird und hieraus das inaktive Oleuropein-Aglykon-2. Optimale Gelatinevernetzungszeiten unter Berücksichtigung der Kosten eines Olivenblattextraktes (20 % Oleuropein; w/w) konnten mit einer Enzymkonzentration von 0,125 %, einer Temperatur von 22-25 °C sowie einem pH-Wert von 4 bei einer Inkubationszeit von 24 h ermittelt werden. Zur Überführung der Aktivierungsbedingungen in den technischen Maßstab erfolgte wie im Projektplan vorgesehen ein Daten- und Know-how-Transfer zu BZN.

Im späteren Verlauf des Projektes wurde bei den Aktivierungsexperimenten der Olivenblattextrakt aus eigener Herstellung eingesetzt. Durch Nutzung der statistischen Versuchsplanung (Design of experiments, Modde, Umetrics) (siehe Abb. 19) gelang es, die Oleuropein-Aglykon-2 Bildung zu unterbinden und damit das vernetzungsaktive Oleuropein-Aglykon-1 stabil in hoher Ausbeute herzustellen.

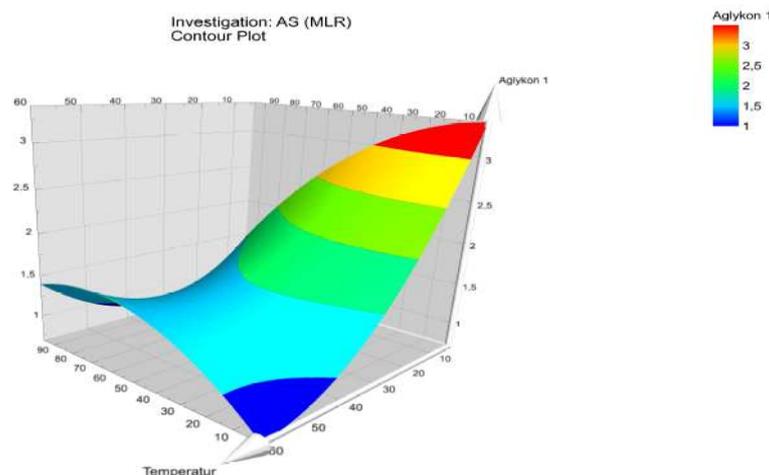


Abb. 19: Modde-Diagramm zur Ermittlung optimaler Versuchsparameter zur Aktivierung von Oleuropein-Aglykon

4.3.3 Scale-Up: Enzymatische Aktivierung von Oleuropein im Olivenblattextrakt

Nach erfolgreicher Implementierung konnte BZN die Ergebnisse aus 50 mL-Ansätzen bei N-Zyme bestätigen und vorerst in den 1 bis 5 L- Labormaßstab übertragen. Damit konnten ausreichende Mengen des Vernetzers für Stabilitäts- und Anwendungsuntersuchungen hergestellt werden. Für die Bereitstellung größerer Mengen für Aufkonzentrierungs-, Applikations- und Reinigungsversuche wurde im Verlauf des Projektes im 150 L-Maßstab gearbeitet.

4.3.4 Konzentrierung und Reinigung von Oleuropein-Aglykon

Die Konzentrierung von Extrakten und von gereinigten Oleuropein-Aglykon-Präparationen spielt eine zentrale Rolle bei der Herstellung von Oleuropein-Vernetzer-Produkten. Es wurden verschiedene Techniken zur Konzentrierung, wie Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Vakuumdestillation und Ultrafiltration, getestet. Basierend auf dem energetischen Vergleich der Konzentrierungsverfahren (IFU-Hamburg) wurde der Arbeitsschwerpunkt auf die Filtration gelegt, da hier der Energieindex um ca. den Faktor 15 – 45 niedriger liegt als bei den anderen möglichen Verfahren (Abb. 20).

Produktstrom	=	206	kg / Jahr	Produktstrom	=	203	kg / Jahr
Inputstrom	=	2615	kg / Jahr	Inputstrom	=	2608	kg / Jahr
Abfallstrom	=	2157	kg / Jahr	Abfallstrom	=	2153	kg / Jahr
Energiestrom	=	194045	kJ / Jahr	Energiestrom	=	8488893	kJ / Jahr
Inputindex	=	13	kg / kg	Inputindex	=	13	kg / kg
Abfallindex	=	10	kg / kg	Abfallindex	=	11	kg / kg
Energieindex	=	943	kJ / kg	Energieindex	=	41744	kJ / kg
Szenario UF				Szenario GF			
Produktstrom	=	202	kg / Jahr	Produktstrom	=	203	kg / Jahr
Inputstrom	=	15929	kg / Jahr	Inputstrom	=	2608	kg / Jahr
Abfallstrom	=	15478	kg / Jahr	Abfallstrom	=	2153	kg / Jahr
Energiestrom	=	2941937	kJ / Jahr	Energiestrom	=	2940713	kJ / Jahr
Inputindex	=	79	kg / kg	Inputindex	=	13	kg / kg
Abfallindex	=	77	kg / kg	Abfallindex	=	11	kg / kg
Energieindex	=	14570	kJ / kg	Energieindex	=	14461	kJ / kg
Szenario ST				Szenario VD			

Abb. 20: Energie-Szenarien zur möglichen Konzentration von Vernetzer-Formulierungen

UF = Ultrafiltration, GF = Gefriertrocknung; ST = Sprühtrocknung, VD = Vakuumdestillation, (IFU-Hamburg-Daten)

Zur Anreicherung von Oleuropein-Aglykon eignen sich als Membranverfahren sowohl die Umkehrosmose als auch die Nanofiltration (siehe Abb. 21)

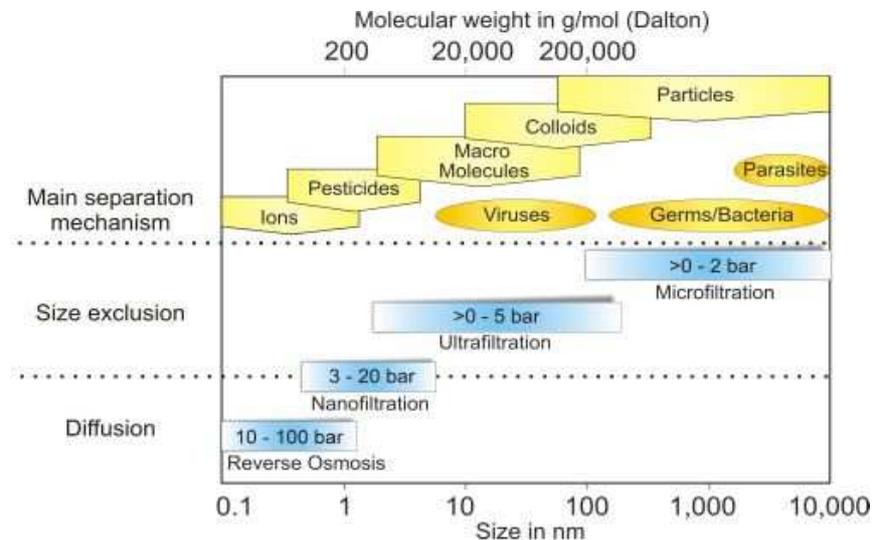


Abbildung 21: Anwendungsbereiche von Membranfiltrationen

In orientierenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass Oleuropein-Aglykon und dessen Derivate weder Osmose- noch Nanofiltrationsmembranen durchdringen konnten. Die Verwendung der Nanofiltration bringt gegenüber der Umkehrosmose folgende Vorteile mit sich:

- Reduzierung des Energieverbrauchs durch die geringere Triebkraft und das größere Durchflussvolumen
- Die breitflächige Trennung des Oleuropein-Aglykon von Zuckern und Salzen während der Anreicherung
- Geringere Zeiten für die Produktanreicherung

Für weiterführende Versuche wurde der Fokus daher auf die Nanofiltration gelegt. In Tabelle 2 sind Ergebnisse von Membranfiltrationsversuchen dargestellt.

Tabelle 2: Konzentrierungsergebnisse von aktiviertem Olivenblattextrakt mit verschiedenen Membrantypen.

Filter	Membranprozess	Filtereigenschaften	
		Negativ	Positiv
Ultrafiltrations-Modul (Atech innovations GmbH):	Mikrofiltration	Minderung des Permeatflusses durch die zunehmende Verstopfung	
Flachmembran: Nadir PM UP 005,	Nanofiltration	kein Permeatfluss, Verunreinigung der Membran	
Flachmembran: Nadir PM UP 020,	Ultrafiltration	kein Permeatfluss, Verunreinigung der Membran	
Flachmembran: Nadir PM UP 120,	Mikrofiltration	kein Permeatfluss, Verunreinigung der Membran	
Flachmembran: Nadir UC 030	Ultrafiltration	Starke Membranverunreinigung mit zunehmender Permeatflussminderung	
Flachmembran: Typ CE, OR	Umkehrosiose	Starke Membranverunreinigung, die schwankende Filtrationsqualität	Permeatfluss am Versuchsanfang
Flachmembran: Typ DK, NF	Nanofiltration	-	keine Filterverunreinigung, Stabiler Permeatfluss, gleichbleibende Qualität

Im Vergleich zu den anderen Membrantypen zeigt die Membran vom Typ DK, NF die besten Filtrationseigenschaften. Es stellte sich ein stabiler Permeatfluss ein und es entstand keine Filterverblockung. Im Vergleich zur DK, NF-Membran ist in Abbildung 22 das deutlich stärkere *Fouling* der Nadir-Membran zu erkennen, obwohl das gesamte Permeat-Volumen bei der DK,NF-Membran um 30-fach größer war. Der gleiche Effekt zeigte sich auch bei Verwendung anderer Nadir-Membranen, selbst bei deutlich größeren Porenweiten, bis hin zum Mikrofiltrationsbereich. Darin liegt vermutlich auch die Ursache dafür, dass die Membranen nahezu keinen Permeatfluss zeigten. Folgerichtig wurde die DK NF-Membran für die weitere Optimierung des Membranfiltration-Verfahren ausgewählt.



Abb. 22: Vergleich des Foulings von Membranen verschiedener Hersteller nach der Nanofiltration. links: Nadir UC005, 5 mL Permeat, rechts: DMS, Typ DK NF, 150 mL Permeat

Die Überprüfung unterschiedlicher N-Zyme-Extrakte mit der P28-Anlage zeigte mit der DK NF-Membran (DMS) reproduzierbare Ergebnisse. Die Verwendung von Alkohol ist nicht möglich, da die Membran hierdurch zerstört wird.

Im Technikumsmaßstab wurde die Konzentrierung von aktiviertem Olivenblattextrakt mit einem Spiral-Wickel-Modul durchgeführt. Die Anlage wurde speziell für die Mehrzweck-Membranfiltration entwickelt. Das hohe Einsatzvolumen der Anlage ermöglicht die maximale Annäherung an die Filtrationsverfahren im industriellen Maßstab. Für die Konzentrierung wurden 150 L eines aktivierten Olivenblattextrakts eingesetzt. In Tabelle 3 sind die Herstellerangaben des verwendeten Membran-Moduls aufgeführt.

Tab.: 3 Spezifikationen des Komposit-Membran-Moduls DK1812C-28 D für Filtrationsversuche im Technikumsmaßstab

Komposit-Membran NF							
Model	Klasse	Rückhalt %	Max. Druck bar	pH-Bereich (25°C)	typischer Flux (l/m ² *h/bar)	Membran-Fläche m ²	Max. Temperatur
DK	NF	98 MgSO ₄	41	1-11	38/7	0,37	90

Die Konzentrierung des Extraktes konnte erfolgreich ohne beeinflussende Ablagerungen auf der Membran durchgeführt werden. Eine Konzentrierung des aktivierten Olivenblattextraktes konnte um den Faktor 10 erreicht werden. Die RP-HPLC-Daten und Vernetzungsversuche bestätigten den Konzentrierungsfaktor, d.h. die Filtrationsmethode hatte keinen negativen Einfluss auf die Vernetzerkonzentration.

Die Permeatflussrate im Technikumsversuch (DK-Spiral-Wickel-Membranmodul) lag bei 40 L/m²h und war damit etwas größer als die Flussrate von etwa 30 L/m²h im Laborversuch mit den DK-Membranen. Im industriellen Maßstab ist zu erwarten, dass der Energieverbrauch der Membranfiltrationsanlage durch die Erhöhung der Produktivität mittels größerer Filterflächen reduziert werden kann.

Der aktivierte und konzentrierte Olivenblattextrakt (siehe Abb. 23) mit einer durchschnittlichen Oleuropein-Aglykon-Konzentration von 10-30 g/L ist braun und entspricht in seiner Zusammensetzung noch weitestgehend der Olivenblattzusammensetzung, da durch die Filtration keine Substanzen abgetrennt wurden.

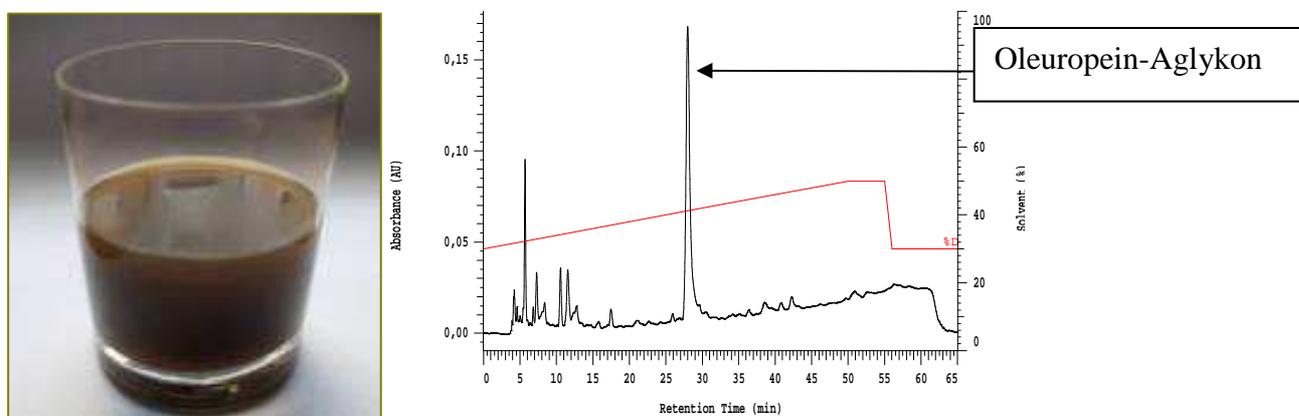


Abb. 23: Enzymatisch aktivierter und konzentrierter Olivenblattextrakt und das entsprechende RP-HPLC-Chromatogramm

Der aktivierte Extrakt (flüssig oder pulvrig) eignet sich für Anwendungen im Lebensmittelbereich, bei denen die Farbe nicht entscheidend ist, wie z.B. der Stabilisierung von Fleisch- und Wurstprodukten (siehe auch Anwendungsversuche 4.7). Die Stabilisierung/Vernetzung von Milchprodukten wie dies mit Transglutaminase durchführbar ist, kann aufgrund der starken Eigenfarbe ausgeschlossen werden. Um diese Anwendungsfelder zu erschließen, müssten weitere nahrungsmittelkonforme Prozess-Schritte zur Entfärbung integriert werden.

Die ersten Adsorberversuche zur Anreicherung von Oleuropein-Aglykon mit kommerziell erhältlichen Olivenblattextrakten zeigten, dass die darin enthaltenen Trägerstoffe Maltodextrin, Stärke, Gummi arabicum und Siliziumdioxid nicht nur die Aktivierung negativ beeinflussen, sondern auch das Bindungs- und Elutionsverhalten an den Adsorbentien. Mit der Herstellung eines eigenen Olivenblattextraktes konnten diese Probleme ausgeschlossen werden. In Tabelle 4 ist eine Auswahl getesteter

Adsorber aufgeführt. In ersten Batch-Versuchsreihen wurde getestet, ob Oleuropein-Aglykon an das betreffende Harz bindet, um anschließend Elutionsstudien durchführen zu können.

Tabelle 4: Adsorber-Harz-Auswahl zur Überprüfung der Reinigung von Oleuropein-Aglykon

Adsorber/ Hersteller	Anmerkungen	Oleuropein-Aglykon [% gebunden]
Lewatit VP OC 1064/ Lanxess	Harz ohne funktionelle Gruppen, Farbstoffentfärbung	42
Lewatit AF 5/ Lanxess	/	70
Amberlite XAD 7 HP	/	89
Amberlite 1180 XAD	/	97
Lewatit K 2431/	Ionenaustauscher, Heterogene Katalyse, Sulfonsäure-Gruppe	Aglykon-Abbau
Lewatit VP OC 1065/	Benzylamingruppe; Entfärbung von Proteinlsg.; Adsorption von	21
CPG-LF 12x40 FE /	Aktivkohle-Granulat Wo sehen wir Chancen hinsichtlich	73,2
CAL FE 050608E /	Aktivkohle*Granulat	90,2
207 CP 2732 12x30US / Chemivron Carbon	Granulat AK kokosnusssbasiert; Entfernung von Chlor, Ozon, Geschmack & Geruch, Schadstoffe; Abbau von BSB/TOC	42
607 CP 2732 18x40US / Chemivron Carbon	säuregewaschen kokosnusssbasiert; für wässrige und organische Lösungen; Entfernung von Chlor, Ozon, Geschmack & Geruch, Schadstoffen & Pestiziden	74,4
Aktivkohle 1.02184 /	Pulver	80
Granucol GE / Erbslöh	Aktivkohle-Pulver	38
Granucol BI / Erbslöh	Aktivkohle-Granulat (löst sich in Wasser)	32
Ercarbon GE / Erbslöh	Aktivkohle-Granulat (löst sich in Wasser)	33
Ercarbon BI / Erbslöh	Aktivkohle-Pulver	64
Norit CA CF	/	6
Aktivcol FA	/	16
ADAKO AWK 50 8x30	/	5
Norit Row 0,8 Supra	/	/
Fractogel Emd SO3- /	/	/
Fractogel EMD COO- /	/	60
DEAE Sepharose /	/	30
Fractogel TMAE	/	23
Betonit Activit 2000	/	56
Amberlite FPX66	/	72
PVPP ISP	/	55

Adsorber-Materialien wie Aktivkohle, Amberlite und Lewatit waren in der Lage Oleuropein-Aglykon zu binden. Mit alkoholischen Lösungen als Elutionsmittel

konnten mit 2 Adsorbieren vielversprechende Ergebnisse mit Oleuropein-Ausbeuten von 50–60 % erreicht werden.

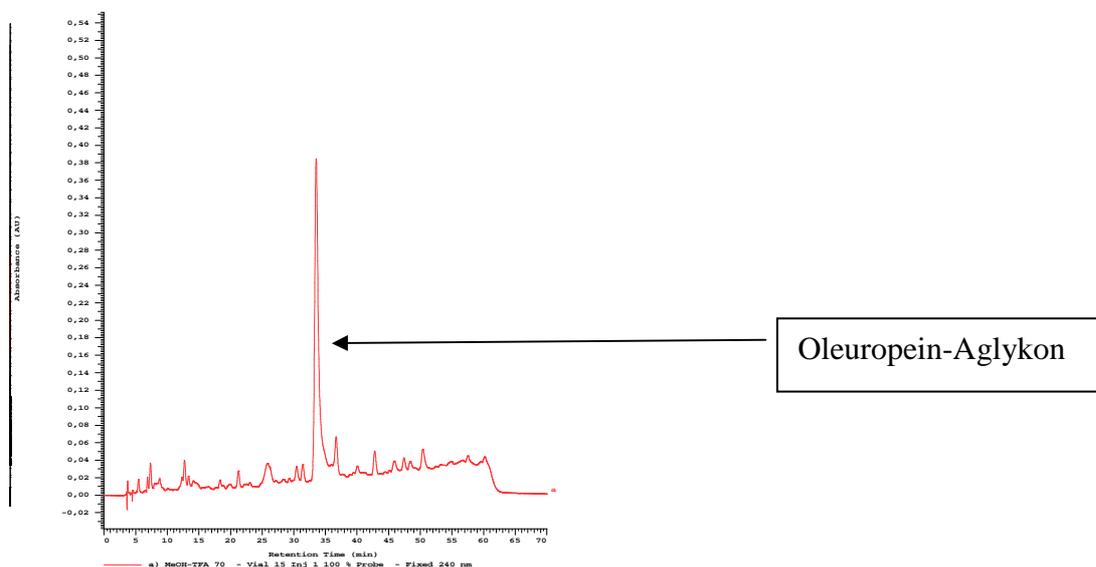


Abb. 24: RP-HPLC-Chromatogramm einer Oleuropein-Aglykon-Probe nach Desorption von Amberlite FPX66

Mit 30 kg FPX66 (mehr als 100-malige Verwendung) können nach Maßstabsvergrößerung aus etwa 200 kg Extrakt etwa 2,7 kg Oleuropein-Aglykon (P2 für Kosmetikanwendungen) mit einer pastösen Konsistenz gewonnen werden. Dazu wurde das Harz nach Binden des Oleuropein-Aglykons mit Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit mehr als 100 L Ethanol, das anschließend verdampft wurde. Dieses etablierte Reinigungsverfahren war Grundlage für die Ökoeffizienzanalyse bei der Fa. IFU Hamburg (siehe unter 4.9).

Die Fa. Dr. Riexs sollte im Unterauftrag die Bewertung von P2 (Kosmetikanwendungen) für Anwendungen im Kosmetiksektor vornehmen. Hierbei sollte vor allem das Potenzial des Vernetzers als Konservierungsstoff sowie dessen Stabilität in verschiedenen Kosmetikformulierungen bewertet werden. Resultierend aus der Insolvenz der Fa. Dr. Riexs konnte während des Projektes kein weiterer geeigneter Kosmetikpartner für das Projekt gewonnen werden.

Basierend auf bereits bestehenden Kontakten zum Biomedizin-Sektor, die im Bereich Transglutaminase-Technologie zur Herstellung von stabilisierten Bioimplantaten bestanden, konnten im Verlauf des Projektes Kooperationen geschaffen werden, mit dem Ziel, neuartige Biomatrizes unter Verwendung des neuen Vernetzers zu

etablieren. Um den Anforderungen von Medizinprodukten der Klasse III gerecht zu werden, war es notwendig, einen weiteren Reinigungsschritt für das Oleuropein-Aglykon zu entwickeln. Ausgehend von P2 wurden zusätzliche Reinigungsschritte (zusätzlicher Chromatographie-Schritt + Lösungsmittlextraktion) etabliert, um Oleuropein-Aglykon mit einer Reinheit von >80 % darstellen zu können. Mit P3 wird es möglich sein, Machbarkeitsstudien in Kooperation mit Biomedizinfirmen durchzuführen. Abbildung 25 zeigt das RP-HPLC-Chromatogramm von P3.

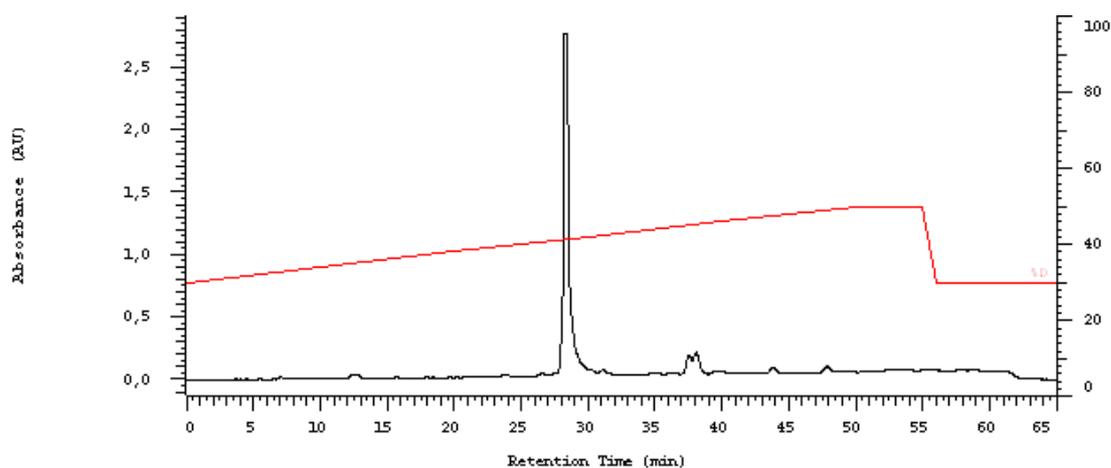


Abb. 25. RP-HPLC-Chromatogramm von gereinigtem Oleuropein-Aglykon (P3)

Der Herstellungsprozess des möglichen hochreinen Oleuropein-Aglykon Produktes (P3) wurden nicht bei der Bewertung der ÖEA berücksichtigt, da es sich hierbei um zusätzliche kostenintensive Reinigungsschritte für ein Produkt handelt, das gezielt im Biomedizinsektor eingesetzt werden soll.

Im Projektvorhaben ist es gelungen, Olivenblätter als geeigneten Reststoff der olivenverarbeitenden Industrie und als Basis für die zukünftige Produktion von natürlichen Vernetzerprodukten zu identifizieren. Aufbauend auf der Verfahrensentwicklung zur Produktion eines Oliventee-Konzentrates (P0), war es unter Einsatz von beta-Glucosidase möglich, ein Verfahrensprozess zu etablieren, mit dem es gelingen wird, Oleuropein-Aglykon-Formulierungen mit unterschiedlichen Reinheitsgraden für unterschiedliche Applikationen herzustellen (Abb. 26)

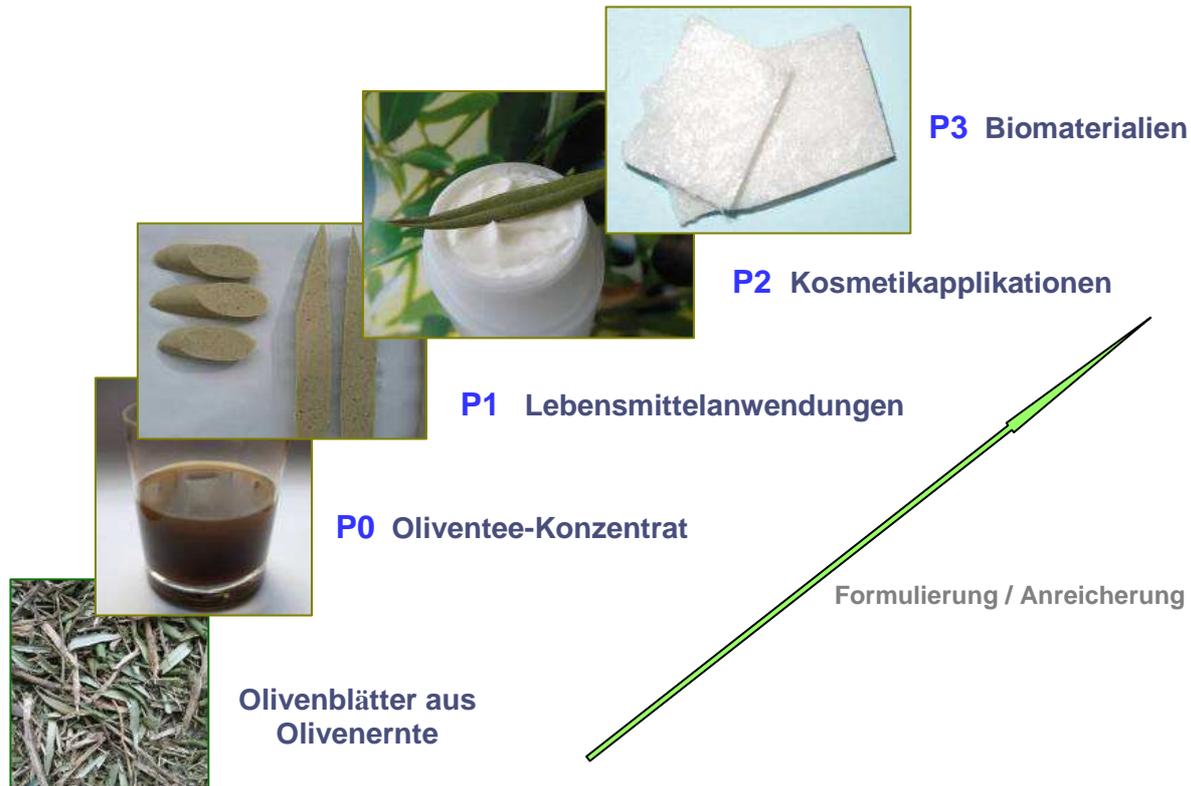


Abb. 26: Aus Olivenblättern hergestellter Oliventee-Konzentrat (P0) stellt die Grundlage zur Anreicherung von Vernetzern dar, die für unterschiedliche Anwendungsbereiche eingesetzt werden können. Für Lebensmittelanwendungen (P1) sollte das aktivierte Oliventee-Konzentrat nicht modifiziert werden, während für Kosmetikapplikationen (P2) eine Aufreinigung notwendig ist und für biomedizinische Anwendungen Oleuropein-Aglykon sehr rein produziert werden muss, um hiermit z.B. Kollagenimplantate zu stabilisieren.

4.6 Kenndaten und Anwendungsversuche von enzymatisch aktiviertem Oleuropein

4.6.1 Lagerstabilität von Oleuropein-Aglykon (kommerzieller Olivenblattextrakt)

Wie bereits geschildert erfolgten im ersten Projektabschnitt die Oleuropein-Aktivierung noch mit kommerziell verfügbaren Olivenblattextrakten, die einen standardisierten Oleuropein-Gehalt aufwiesen. In Untersuchungen zur Lagerstabilität stellte sich hierbei heraus, dass die enzymatisch aktivierten Olivenblattextrakte in wässriger Lösung nicht stabil sind (Abb. 27). Bereits nach einem Tag Lagerung eines aktivierten Olivenblattextraktes (20 %, w/w) bei 22 °C waren Aktivitätsverluste von 50 % feststellbar. Bei 4 °C war ein 50 %iger Aktivitätsverlust nach 8-10 Tagen zu beobachten. Diese Stabilitätsdaten ließen nach dem damaligen Stand der Technik nicht vermuten, dass es möglich wäre, ein flüssiges Vernetzerprodukt herzustellen.

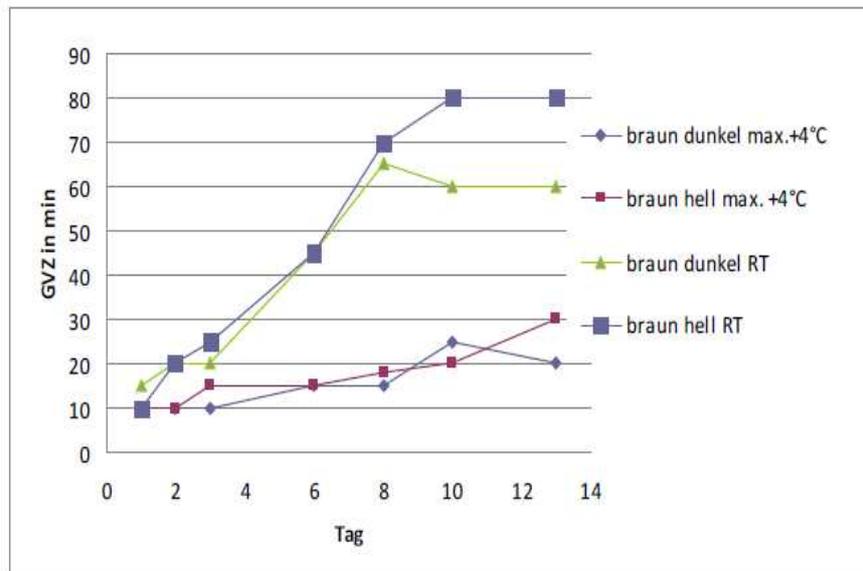
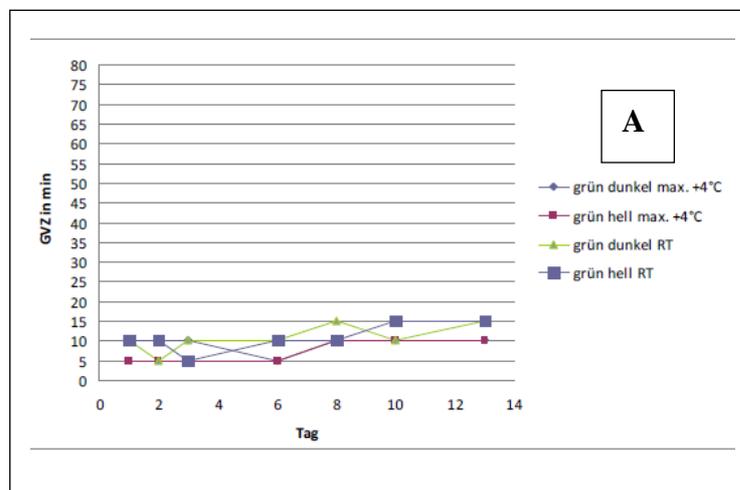


Abb. 27: Lagerung von wässrigem aktivierten Olivenblattextrakt

Lagerung von aktiviertem Olivenblattextrakt (braun, Fa. Plantextrakt) bei RT und 4 °C und unter Lichteinwirkung bzw. Lichtausschluss. Die Vernetzeraktivität wurde durch Ermittlung der Gelatinevernetzungszeit (GVZ) ermittelt.

Licht hatte keinen maßgeblichen Effekt auf die Stabilität enzymatisch aktivierter Extrakte weder bei Lagerung bei 4 °C noch bei RT. Basierend auf den schlechten Stabilitätsdaten in wässriger Lösung wurde untersucht, ob die Lagerstabilität der aktivierten Olivenblattextrakte durch Sprühtrocknung verbessert werden kann.

Die Aktivitätsverluste konnten während der Lagerung von getrocknetem, aktiviertem Olivenblattextrakt deutlich reduziert werden (Abb. 28), auch wenn eine Abhängigkeit der Stabilität vom Ausgangsprodukt und der damit verbundenen Hygroskopie der Extrakte zu verzeichnen war.



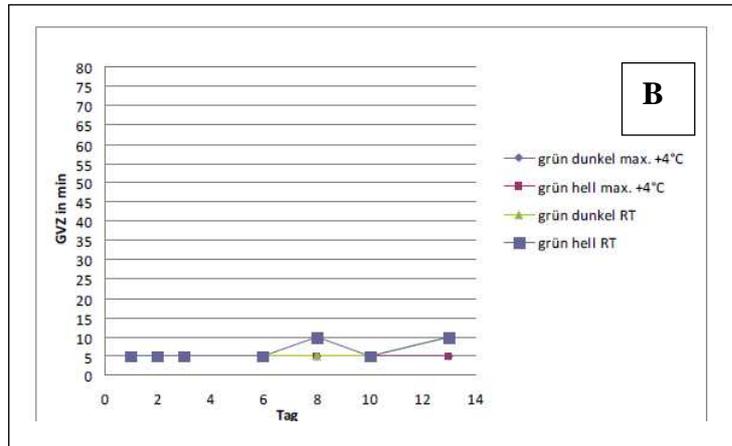


Abbildung 28 A und B: Stabilitätsuntersuchungen von aktivierten sprühgetrocknetem Olivenblattextrakten. A (grün, Firma 1) und B (Firma 2)

Bei den Sprühtrocknungsversuchen wurde zusätzlich Trägermaterial (Maltodextrin) mit einem Anteil von 30 % (w/w) eingesetzt.

Bei diesen Untersuchungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Trocknungstemperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der aktivierten Extrakte hat (siehe Abb. 29).

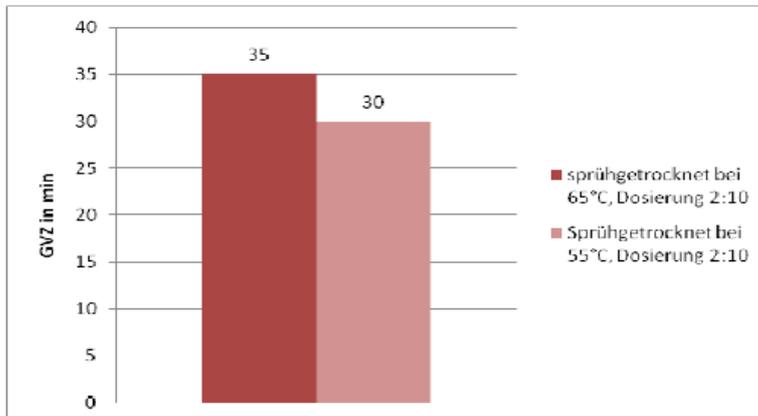


Abbildung 29: Gelatinevernetzung mit aktiviertem Olivenblattextrakt (Firma 1) nach Sprühtrocknung bei 65 °C bzw. 55 °C

Bei einer niedrigeren Sprühtrocknungstemperatur (55 °C) beträgt die GVZ 30 min, während sich die GVZ bei einer Trocknungstemperatur von 65 °C um ca. 15 % verschlechtert hatte.

4.6.2 Lagerstabilität von Oleuropein-Aglykon (Eigene Herstellung des Olivenblattextrakts)

Durch die Entwicklung und Herstellung eines eigenen Olivenblattextraktes konnten die Lagerstabilitäten erheblich verbessert werden. In Abb. 30 sind die Stabilitäten eines enzymatisch aktivierten Extraktes dargestellt, der bei etwa 22 °C (RT) bzw. 6 °C gelagert wurde. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben genommen und die Gelatinevernetzungszeit (GVZ) bestimmt. Deutlich ist die Abhängigkeit der Lagerstabilität von der Temperatur zu sehen. Während der gekühlte aktivierte Extrakt eine sehr gute Stabilität noch nach über 90 Tagen aufwies, zeigten sich beim RT-gelagerten Extrakt deutliche Aktivitätsverluste (Abb. 30). Im Gegensatz zu den kommerziellen Olivenblattextrakten, sind die Stabilitäten von Oleuropein-Aglykon auf Basis des Olivenblattextraktes aus eigener Herstellung wesentlich besser.

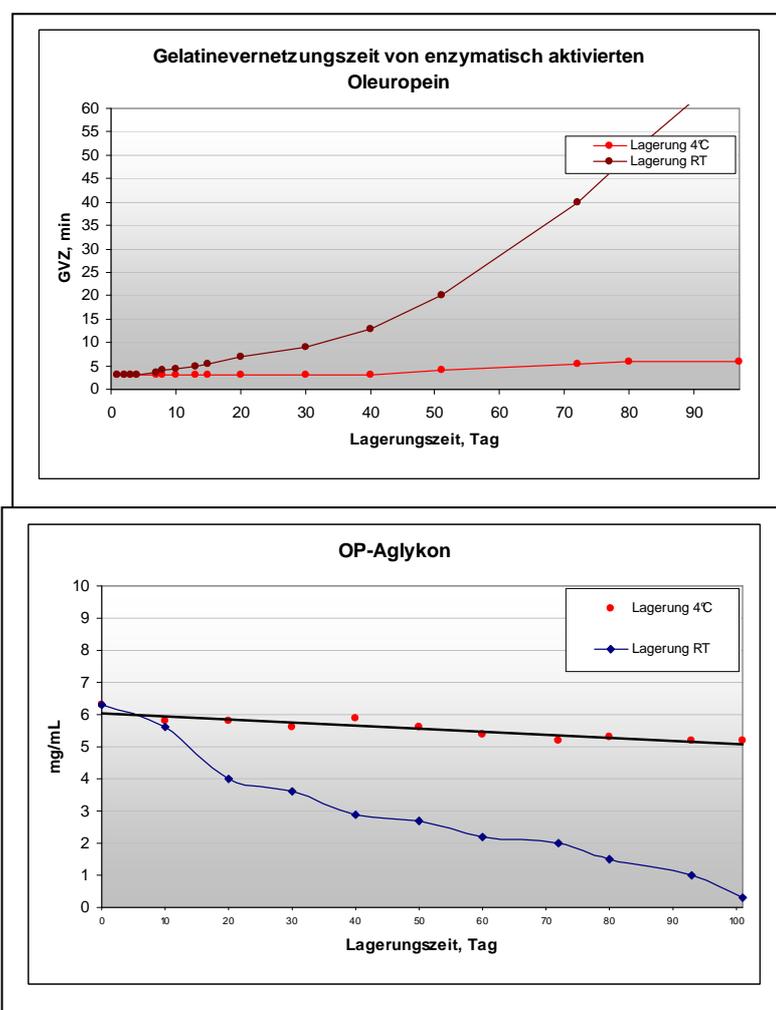


Abb. 30: Stabilitätsmessung von enzymatisch aktiviertem Extrakt (eigene Herstellung) nach Lagerung bei RT (ca. 22 °C) und 6 °C.

A: Messung der Gelatinevernetzungszeit (GVZ) in Abhängigkeit von der Lagerzeit

B: RP-HPLC-Messung der Oleuropein-Aglykon-Stabilität in Abhängigkeit von der Lagerzeit

Die Aktivitätsverluste korrelieren mit der Oleuropeinaglykon-Konzentration in den gelagerten Extrakten. Basierend auf den bisherigen Stabilitätsdaten wird es möglich sein, ein flüssiges Produkt herzustellen.

Aus Untersuchungen zur Pulverherstellung von aktivierten Extrakten auf Grundlage kommerzieller Olivenblattextrakte, die mittels Gefrier- und Sprühtrocknung hergestellt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die Gefriertrocknung zwar zu weniger Aktivitätsverlusten bei Lagerung des Produkts führt, die Pulverherstellung über Sprühtrocknung aber schneller und kostengünstiger ist. Da die neuen Extrakte, basierend auf dem Extraktions- und Aktivierungsverfahren von N-Zyme, eine höhere Temperaturstabilität aufweisen, wurde die weitere Entwicklung zur Herstellung pulveriger Formulierungen mittels Sprühtrocknung durchgeführt. Folgende Anforderungen wurden an das Herstellungsverfahren gestellt:

- geringe Prozesstemperatur bei der Herstellung (< 70°C)
- geringere Trocknungszeit
- geringer Trägerstoffanteil
- gute Fließeigenschaften des Pulvers,
- gute Lagerstabilität: Gelatinevernetzungszeit (GVZ), Hygroskopie

Die Ergebnisse der Versuche zeigen guten Fließeigenschaften und eine gute Lagerstabilität des pulvrigen aktivierten Olivenblattkonzentrates (Abb. 31).



Abb. 31. Aktivierter pulvriger Olivenblattextrakt nach der Sprühtrocknung.

Obwohl das Pulver nach mehreren Tagen der Lagertests keine Verklumpungen aufwies, wird empfohlen, das Pulver trocken in einer wasserdampfdichten Folie bei 4 °C bzw. bei der Raumtemperatur im Trockenlager aufzubewahren.

4.6.3 Lagerstabilität von gereinigtem Oleuropein-Aglykon

Die Lagerstabilitätstests von gereinigtem Oleuropein-Aglykon zeigten, dass die Stabilität stark von der Temperatur abhängig ist. Bei einer Lagertemperatur von -20 °C konnte nach etwa 6 Monaten noch eine 80%ige Restaktivität (basierend auf GVZ?) nachgewiesen werden (Abb. 32)

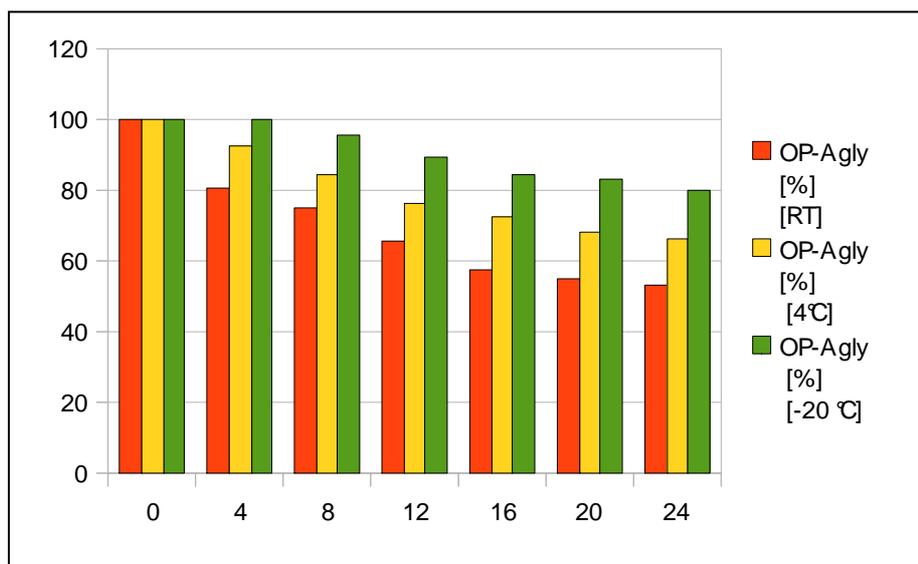


Abb. 32: Lagerstabilitätsuntersuchungen von gereinigtem Oleuropein-Aglykon bei RT, 4 °C und -20 °C

Die Versuche verdeutlichen aber auch, dass bei einer Lagertemperatur von etwa 22 °C in Wasser nach 6 Monaten nur noch eine Restaktivität von etwa 50 % nachzuweisen ist. Für Kosmetikanwendungen ist diese Stabilität nicht ausreichend. Die Entwicklung von stabilen Formulierungen muss daher im Fokus zukünftiger Produktentwicklungen stehen. Auch die Optimierung von pulverigen Produkten muss weiter verfolgt werden.

4.7 Anwendungsversuche

Gelatine findet in zahlreichen Arbeitsfeldern wie z.B. Lebensmittel, Medizin, Kosmetik und diversen technischen Bereichen Zugang. Die Ermittlung physikalischer Kenngrößen zur Modifikation von Gelatine mit dem Olivenvernetzer ermöglicht eine Einschätzung des Einsatzpotenzials der natürlichen Vernetzer. In verschiedenen Versuchsreihen konnte z.B. gezeigt werden, dass durch Zugabe von Oleuropein-Aglykon die Schmelztemperatur in Abhängigkeit von Gelatine (verschiedene Bloom-Werte) erhöht werden kann (Abb.33 und 34)

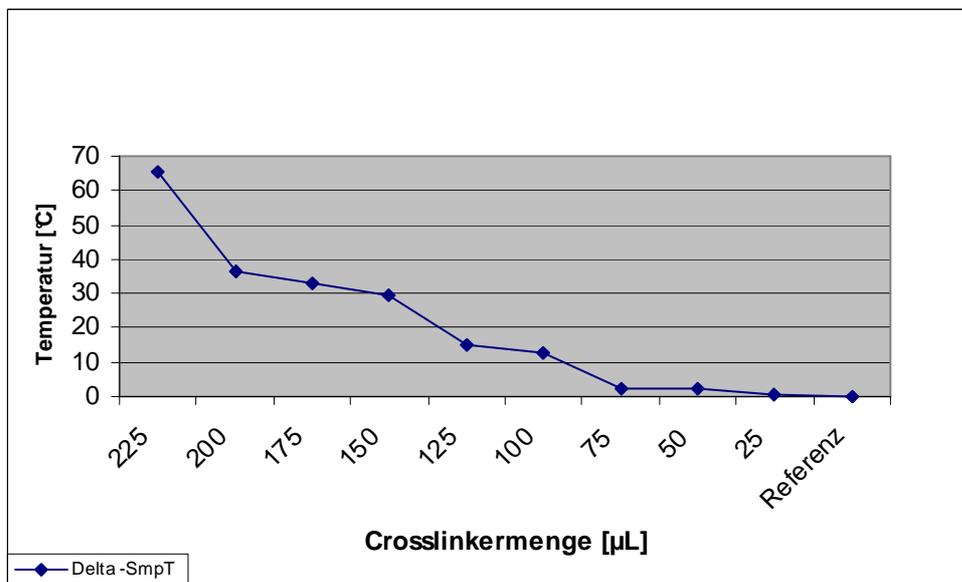


Abb. 33: Darstellung der Erhöhung der Schmelztemperatur einer ca. 180 Bloom-Gelatine ($\Delta\text{Smp-T}$)

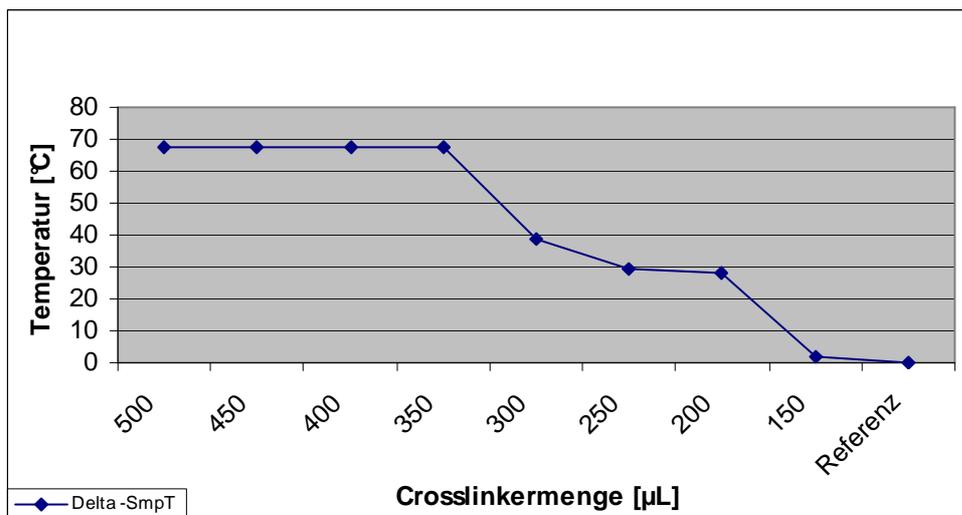


Abb.34: Darstellung der Erhöhung der Schmelztemperatur einer ca. 80 Bloom-Gelatine ($\Delta\text{Smp-T}$)

Neben der Erhöhung der Gelatineschmelzpunkttemperatur, kann auch die Gelierzeit (Erstarrung) bei niedrigen Temperaturen durch Zugabe des Vernetzers verkürzt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Einsatzgebiete für den natürlichen Vernetzer finden sich im Fleisch-, Milch- und Teigprodukte-Sektor. Im Backbereich liegt ein Hauptinteresse in der Generierung eines großen Brotvolumens, aber auch technologische Vorteile bei der Herstellung des Teiges sind gefragt. Bei zu stark klebenden Teigen kommt es häufig zu Maschinenausfällen, was zu erhöhten Kosten führt. In orientierenden Versuchen wurde der Einsatz des Olivenvernetzers zur Herstellung von Broten untersucht (Abb. 35).



Abbildung 35: Einsatz des Olivenvernetzers zur Herstellung von Broten

Linkes Bild: Brote mit unterschiedlichen Konzentrationen P1 vor und nach dem Backen (l. und r.).
Rechtes Bild: links mit P1 rechts ohne Stabilisator

Erste Versuche zeigten, dass bei Verwendung des natürlichen Vernetzers das Backvolumen negativ beeinflusst wird. Vermutlich wurden die zugegebenen Amylasen bzw. Xylanasen gehemmt. Eine Stabilisierung der Teige konnte aber festgestellt werden. Weitere Versuche sollen in Kooperation mit einer Backfirma erfolgen.

Im Fleischsektor werden bereits mehrere Tonnen eines vernetzenden Enzyms – der Transglutaminase – zur Stabilisierung von Fleischprodukten eingesetzt. Sollte der Olivenvernetzer vergleichbare Eigenschaften aufweisen, könnte dies ein großes Marktpotenzial darstellen.

Für die Machbarkeitsstudien wurden Stabilisierungsversuche mit Frikadellen und Hühnerfleisch durchgeführt. In ersten „Frikadellen-Versuchen“ und „Hühnerfleisch-Würstchenversuchen“ stand im Vordergrund, den Zusammenhalt des Fleisches bzw. den Wasseraustrittsverlust zu bewerten (Abb. 35).

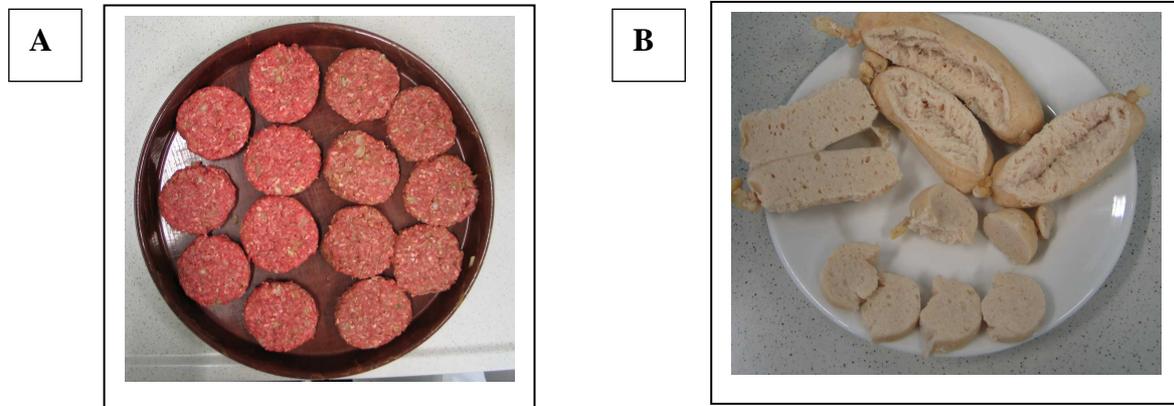


Abb. 36: Überprüfung des stabilisierenden Effektes des Olivenvernetzers bei Versuchen mit Frikadellen (A) und Hühnerfleischwürstchen (B)

Während der Wasserverlust nicht reduziert werden konnte war eine Stabilisierung der Fleischprodukte ohne störende Geschmacksänderungen deutlich erkennbar. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit dem Einsatz von bakterieller Transglutaminase.

In Zusammenarbeit mit der Getränketechnologiefirma Döhler wurde das Anwendungspotenzial bei der Herstellung von Getränkeemulsionen untersucht. Erste Ergebnisse zeigen, dass eine Stabilisierung erreicht werden kann. Bei den eingesetzten Olivenvernetzerkonzentrationen wurde weder der Geschmack noch die Farbe der Testgetränke maßgeblich beeinflusst, was eine entscheidende Rolle für den Einsatz im Getränkesektor spielt.

Die Anwendungsversuche des gereinigten Vernetzers im Kosmetikbereich wurden vorerst zurückgestellt. Durch das Ausscheiden der Fa. Dr. Riex im Projektvorhaben konnte diese Lücke nicht geschlossen werden. Über den Projektzeitraum konnten aber einige Firmen aus dem biomedizinischen Sektor identifiziert werden, bei denen die Anwendung des Olivenvernetzers Potenzial hätte. Das Interesse zur Herstellung von diversen Hydrogelen (Kollagen, Gelatine, Chitosan, etc), die durch einen neuen natürlichen Vernetzer stabilisiert werden können, ist groß - ebenso wie deren potenzielle Anwendungsfelder (Zahnmedizin, Wundaufgaben, Gewebekleber, etc).

Eine Kooperation mit einem international tätigen Medizinprodukte-Hersteller wurde bereits begonnen. Erste Versuche zur Stabilisierung von Biomaterialien bestätigten das Potenzial des Olivenvernetzlers. Gespräche mit weiteren Biomaterial-Herstellern wurden geführt und langfristige Zusammenarbeiten werden in Aussicht gestellt. Aus strategischer Perspektive ist daher das Thema Biomedizin in den Vordergrund gerückt.

4.8 Toxikologische Bewertung

Obwohl Oleuropein-Aglykon und dessen Derivate in Oliventee wie auch im Olivenöl bis zu einer Konzentration von 0,4 mg/mL vorkommen, waren im Rahmen des Projektes toxikologische Untersuchungen vorgesehen, um eine Abschätzung des Gefährdungspotenzials von gereinigten Oleuropein-Aglykon-Produkten zu ermöglichen.

Die cytotoxischen Untersuchungen wurden von AKK (Universität Hamburg) und von der Fa. Harlan RCC durchführt.

Untersuchungen bei AKK:

Für die Zellkulturversuche beim AKK wurden HaCaT-Keratinocyten eingesetzt und verschiedene OP-Aglykon-Formulierungen mit verschiedenen Reinheitsgraden getestet. Die cytotoxischen Untersuchungen wurden mit dem Neutralrot-Test sowie mit dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT) durchgeführt.

Beim Neutralrot-Test nehmen die Zellen das Neutralrot als nicht-ionisiertes Molekül auf und speichern dieses in den Lysosomen. Aufgrund des sauren pH-Wertes in den Lysosomen wird der Farbstoff protoniert und kann somit als Ion die Lysosomen durch die Membranen nicht mehr verlassen (Ionenfalle). Eine Veränderung der Durchlässigkeit der Zellmembranen führt zu einer vermehrten Abgabe oder auch zu einer verminderten Aufnahme des Farbstoffes. In den Untersuchungen wurde der „Release-Test“ durchgeführt, weil er bei kurzzeitiger Exposition ein effektives Screening und ein Lösen der Prüfsubstanzen in PBS erlaubt. Beim Release-Test werden die Zellen angefärbt und dann mit Prüfsubstanzen exponiert. Durch die mögliche irritative Wirkung kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Membranen und zu einer Abgabe des Farbstoffes in den Überstand. Die Farbintensität des Überstandes korreliert mit der irritativen Wirkung der Substanzen.

Der Neutralrot-Test wurde im ersten Teil des Projektvorhabens durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt standen Vernetzervorprodukte zur Verfügung, die neben OP-Aglykon noch einen hohen Anteil weiterer Blattextraktkomponenten, wie z.B. wasserlösliche Polyphenole, enthielten. In Abb.37 sind die Ergebnisse eines typischen Neutralrot-Test-Verlaufs dargestellt.

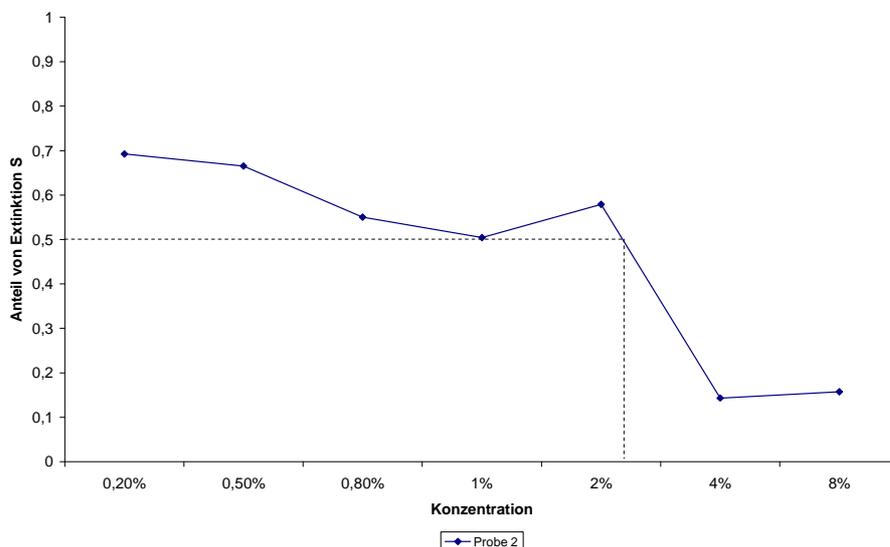


Abb. 37: Graphische Darstellung der gemessenen Extinktion nach Exposition von HaCaT-Keratinocyten im Neutralrot-Test. Es wurden IC50-Werte zwischen 1 – 2,5 % (10 – 25 mg/mL) ermittelt.

Im Vergleich hierzu wurde Glutaraldehyd als Vergleichssubstanz im Neutralrot-Test untersucht (Abb. 38).

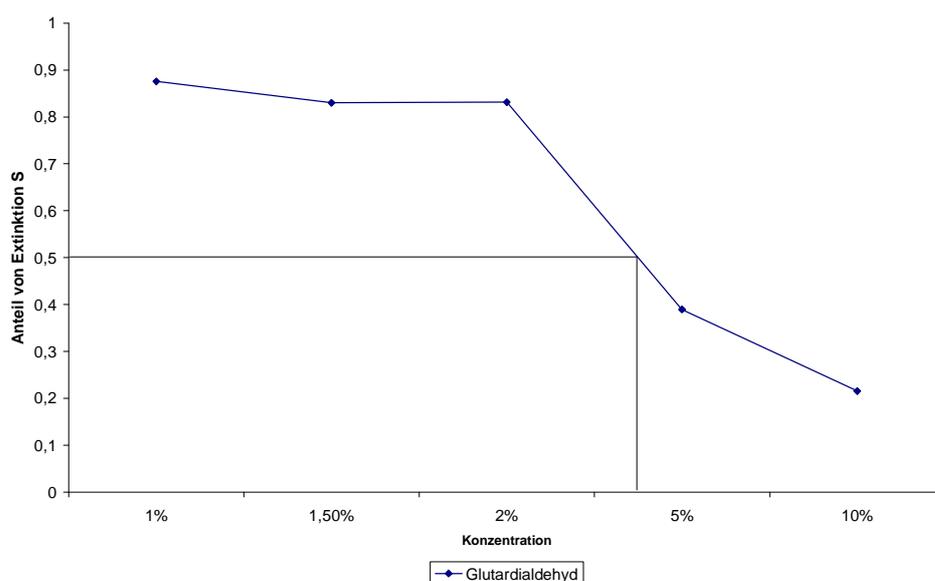


Abb. 38. Graphische Darstellung der Ergebnisse des Neutralrot-Test nach Exposition mit Glutaraldehyd. Mit Glutaraldehyd konnten IC50-Werte > 2,5 % (25 mg/mL) ermittelt werden.

Die getesteten OP-Agly-Formulierungen zeigten im Neutralrot-Test einem dem Glutaraldehyd vergleichbaren bis leicht erhöhten irritativen Einfluss auf die Zellmembran der Keratinocyten. Bei diesem Test führen Substanzen, die die Membranintegrität beeinflussen, zu niedrigeren IC50-Werten. Im strukturellen Vergleich weist Oleuropein neben dem C5-Gerüst und den dialdehydischen Funktionen noch weitere Derivatisierungen auf. Da es sich aber zu diesem Projektzeitpunkt noch nicht um reines Oleuropein-Aglykon handelte, kann kein direkter Bewertungsvergleich mit der Reinsubstanz Glutaraldehyd angestellt werden. Die hergestellten Olivenblattextrakte enthalten zahlreiche Substanzen (Triterpensäuren, Flavonoide, Anthocyane, diverse Zucker, Phenolsäuren, etc), die die Membranstruktur der Zellen beeinflussen können. Weiterhin kann aufgrund der starken Braunfärbung des Extraktes die photometrische Bestimmung bei den Analysen beeinflusst werden. Erschwerend kam hinzu, dass die OP-Aglykon-Proben zur Erhöhung und Sicherung der Lagerstabilität eingefroren wurden, das Auftauen der Proben aber zu Sedimentbildungen führte. Um eine Vergleichbarkeit zwischen OP-Aglykon und Glutaraldehyd zu ermöglichen, müssen hierzu Versuche mit Oleuropein-Aglykon-Formulierungen mit höheren Reinheiten durchgeführt werden. Es war zu vermuten, dass bei den untersuchten Aldehyden nicht die irritative Wirkung der Substanzen auf die Membranintegrität entscheidend ist, sondern vielmehr potenzielle chemische Reaktionen der reaktiven Aldehydgruppen mit Enzymen bzw. weiteren Zellbestandteilen. In weiterführenden Versuchen wurde daher der MTT-Assay durchgeführt, der die Vitalität der Zellen berücksichtigt und nicht nur die Zellwandintegrität. Die Vitalität basiert auf der metabolischen Aktivität zur Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). In lebenden Zellen wird MTT enzymatisch reduziert und in ein blaues, wasserlösliches Formansalz umgewandelt. Das Salz wird im Testverlauf extrahiert und photometrisch quantifiziert. Die Farbintensität des gebildeten Formansalzes kann mit der Anzahl lebender Zellen bzw. der Vitalität korreliert werden. Abb. 39 zeigt das Ergebnis einer MTT-Test-Reihe durch Einwirkung eines teilgereinigten OP-Aglykons.

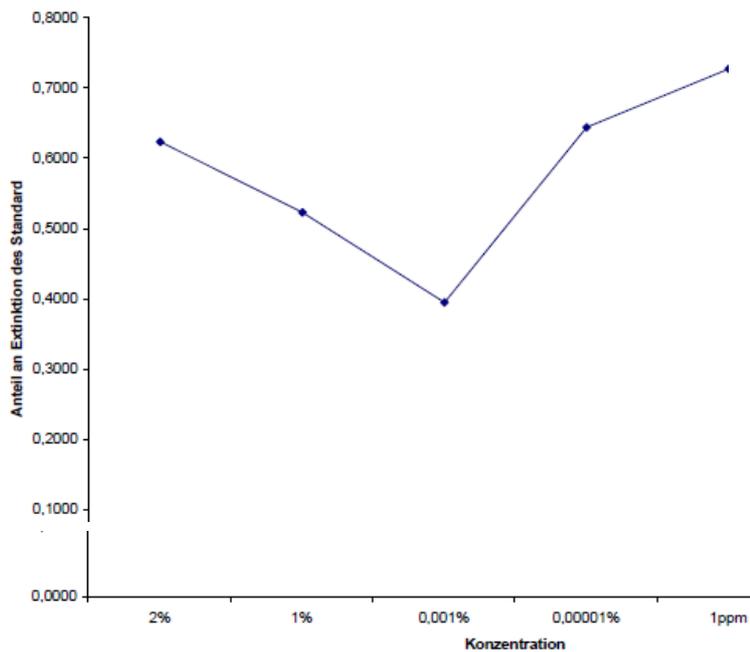


Abb. 39 Verlauf der Extinktion unter Verwendung von OP-Aglykon bis 1 ppm im MTT-Assay.

Die Vitalität der Keratinocyten nimmt bei einer Konzentrationserhöhung des Oleuropein-Aglykons von >1 ppm bis etwa 10 ppm stetig ab. Überraschenderweise kommt es im MTT-Assay zu einem Extinktionsanstieg bei Konzentrationen oberhalb von 10 ppm. Zur Diskussion stehen mögliche Farbreaktionen bzw. reduzierende Reaktionen der Catechol-Funktion des OP-Aglykons, die zu einer Beeinflussung der photometrischen Messung führt, aber nicht Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen zulässt. Die Bestimmung eines IC50 war daher für OP-Agly nicht möglich.

Bei der Verwendung von Glutaraldehyd im MTT-Assay konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abb. 40).

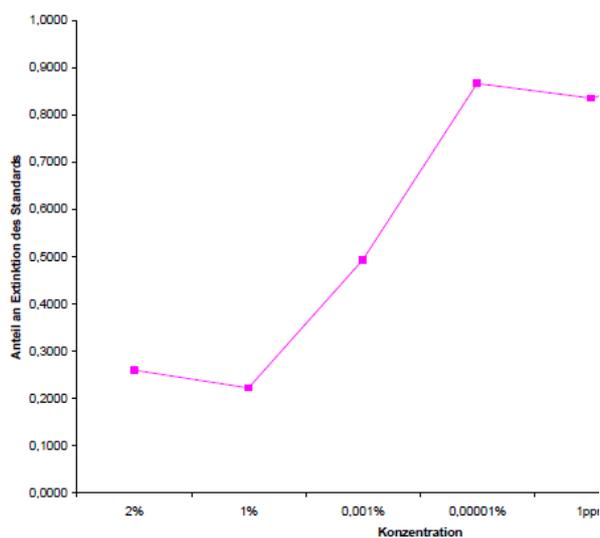


Abb. 40: Verlauf der Extinktion unter Verwendung von Glutaraldehyd von 1 ppm bis 2 % (MTT-Assay)

Für Glutaraldehyd konnte mit dem MTT-Assay ein IC₅₀ von 0,1 mg/mL ermittelt werden. Ein Vergleich von Oleuropein-Aglykon mit Glutaraldehyd im MTT-Test mit Keratinocyten (IC₅₀>25 mg/mL) ist daher schwierig.

Basierend auf einer Patentanmeldungsschrift (Fa. Henkel: „Mittel zur Behandlung des Haares oder der Haut, das einen Extrakt aus Pflanzen enthält, der der Familie der Oleaceae angehören“.), wurde ein Olivenblattextrakt (Oleuropein-Gehalt von 18-26 %) der Firma Flachsmann (heute Frutarom) auf zytotoxische Effekte überprüft. In der Anmeldung wurde mit dem MTT-Assay ein IC₅₀ von 3 mg/mL Olivenblattextrakt ermittelt.

In einer wissenschaftlichen Publikation von Tsai *et al.* (2000) wurden im MTT-Test mit CHO-K1-Zellen ebenfalls Glutaraldehyd und das Iridoid Genipin getestet. Hierbei konnten mit Glutaraldehyd IC₅₀-Werte zwischen 0,03 und 0,08 µg/mL ermittelt werden, was im Vergleich zu den Werten von AKK um einen etwa 1000fach geringeren IC₅₀-Wert entspricht. Mit Genipin, Aglykon des Geniposids, konnten von der Arbeitsgruppe aus Taiwan mit dem MTT-Assay IC₅₀-Werte von 90 µg/mL bis 180 µg/mL bestimmt werden. Entsprechend diesen Ergebnissen wies das Dialdehyd Genipin einen um den Faktor bis zu 3000 geringeren IC₅₀-Wert auf und wäre daher entsprechend den Aussagen der Autoren wesentlich weniger cytotoxisch.

Parallel zu den Untersuchungen beim AKK wurden als Unterauftrag cytotoxische Untersuchungen bei der Fa. Harlan RCC mit gereinigten OP-Aglykon-Proben, Oleuropein, Genipin und Glutaraldehyd durchgeführt. Harlan RCC verwendet für seine cytotoxischen Untersuchungen XTT, welches im Gegensatz zu MTT, nach Reduktion über metabolische Reaktion zu einem löslichen Formazansalz umgewandelt wird. Hierdurch wird eine höhere Sensitivität erreicht und es sind weniger Arbeitsschritte notwendig. Für die Testreihen wurden typischerweise Chinesische Hamsterzellen V79 eingesetzt. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die gereinigten OP-Agly-Proben und Glutaraldehyd IC₅₀-Werte um 10 µg/mL aufwiesen und Genipin IC₅₀-Werte von etwa 50 µg/mL. Für Oleuropein konnte bis zu einer Konzentration von 200 µg/mL kein cytotoxischer Effekt nachgewiesen werden und erst bei 1000 µg/mL wurde die Viabilität der Zellen um die Hälfte reduziert.

Im Gegensatz zu den Autoren aus Taiwan lagen die Analysenwerte des akkreditierten Labors der Fa. Harlan RCC für Glutaraldehyd und Genipin nur um etwa den Faktor 5 auseinander und nicht bis zu 3000. Anzumerken ist, dass Genipin

nur schwer in Wasser bzw. Puffer zu lösen ist, so dass in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung es zu großen Ergebnisunterschieden hinsichtlich der Zytotoxizität kommen kann.

Aus den intensiven und zielführenden Gesprächen mit der Fa. Harlan RCC wurde deutlich, wie schwierig die Bewertung zur Toxizität von Substanzen oder Formulierungen ist. Mit dem umfangreichen Produktportfolio der Fa. Harlan RCC können mannigfaltige Untersuchungen durchgeführt werden, deren Ergebnisse aber stets kritisch zu hinterfragen sind, da die Anforderungen sehr unterschiedlich sind. Beim Toxizitätsstudiendesign kann gezielt auf die Kundenanforderungen eingegangen werden, was notwendig ist, da sich viele Chemikalien oder andere Biomoleküle nicht in jedem Lösungsmittel bzw. Puffer lösen lassen bzw. nur über einen bestimmten Zeitraum stabil sind. Bei den Untersuchungen entsteht daher ein großes Variationspotenzial und die Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Laboratorien ist daher sehr schwierig. Beispielhaft sei hier erwähnt, dass bei der Besprechung des Prozessdesigns aufgefallen ist, dass im Medium zum Zellwachstum und für den Assay Supplemente mit Amino-Gruppen (z.B. verschiedene Aminosäuren) enthalten sind, die mit den Aldehyden über den Inkubationszeitraum reagieren können. Es könnte daher in Abhängigkeit vom Prozessdesign und der Reaktivität der Substanzen sein, dass nicht die aldehydischen-Gruppen von Oleuropein-Aglykon bzw. Glutaraldehyd und Genipin cytotoxisch bewertet werden, sondern die möglichen Reaktionsprodukte aus der Reaktion mit Mediumsbestandteilen.

Die Arbeiten beim AKK und der Fa. Harlan RCC verdeutlichten die Komplexität des Themas Toxizität von Oleuropein-Aglykon. Aufgrund der Variabilität der Ergebnisse, der mannigfaltigen Möglichkeit zur Erstellung eines Prozessdesigns von unterschiedlichen Testmethoden war es N-Zyme nicht möglich, eine toxikologische Einstufung der Substanzen aus Olivenreststoffen durchzuführen. Basierend auf den Ergebnissen der toxikologischen Untersuchungen waren im Projektvorhaben weitere Verträglichkeitsprüfungen (topischen Anwendungen mit Probanden) vorgesehen. Aufgrund der Insolvenz der Fa. Dr. Riexs GmbH als Anwendungs-Kompetenzträger im Kosmetiksektor, konnte auf Empfehlung von Frau Prof. Kerscher (AKK) Herr Ottmar Neugebauer als fachkundige Person gewonnen werden, um das Thema Probandenversuche mit Oleuropein-Aglykon zu diskutieren. Zur Durchführung

topischer Hautversuche hätte ein Gutachten zur toxikologischen Unbedenklichkeit von Oleuropein-Aglykon erstellt und ggf. der Ethikkommission vorgelegt werden müssen. Eine Unbedenklichkeit der Olivenvernetzer, die stark von der Anwendung und der Applikationsform (O/W oder W/O Emulsion, Zusatzstoffen, etc.) abhängt, zur Rechtfertigung von Probandenhautversuchen kann nach dem heutigen Kenntnisstand von N-Zyme ohne Unterstützung durch einen starken Firmenpartner im Kosmetiksektor nicht ausgestellt werden. Für zukünftige strategische Entwicklungen im Kosmetikbereich wird N-Zyme daher starke Allianzen mit Kosmetikfirmen suchen, um gemeinsam den Einsatz von OP-Aglykon in verschiedenen Kosmetikprodukten voranzutreiben.

Aktuell konnten wir über eine Internetrecherche ein Produkt von Nuvisage (www.nuvisage.com) identifizieren, welches Oleuropein-Aglykon aus Olivenblättern enthält.



Abb. 41: Creme von Nuvisage mit Oleuropein-Aglykon

Herstellerangaben: „Oleuropein aglycones from olive extract

- Oleuropein aglycones, extracted from olive leaves, are polyphenolic compounds shown to be powerful free radical scavengers (antioxidants).
- Studies done at Catalan Institute of Oncology in Spain conclude that oleuropein aglycones help explain low levels of breast and skin cancer in Mediterranean populations.“

N-Zyme wird in diesem Zusammenhang überprüfen, wer der Hersteller des Oleuropein-Aglykons ist bzw. ob wirklich diese Substanz enthalten ist. In einem ähnlichen Fall hat ein Hersteller sein Produkt (Verabreichung über Gelatine-Kapseln) damit beworben, dass dieses OP-Aglykon enthält. Nach einer intern durchgeführten RP-HPLC-DAD-Analyse konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Kapseln nur Olivenblattextrakt mit Oleuropein - ohne OP-Aglykon – enthielten.

Zur Darlegung der Unbedenklichkeit der Oleuropein-Derivate mit Aldehydstruktur können daher von N-Zyme vorerst nur bestehende publizierte und wissenschaftlich belegte Literaturangaben herangezogen werden. In Extra Virgin Olivenöl (EVOO) zum Beispiel können Oleuropein-Derivate mit einer Konzentration von bis zu 0,4 mg/mL Olivenöl nachgewiesen werden. In mediterranen Regionen werden pro Kopf und Tag etwa 40 mL EVOO konsumiert, das bedeutet es werden durchschnittlich pro Tag etwa 16 mg OP-Agly-Derivate (Dialdehyde) verspeist. Der vielfach publizierte und untersuchte gesundheitsfördernde Effekt von EVOO steht im Gegensatz zum ermittelten cytotoxischen Potenzial (IC50-Wert um 10 µg/mL), welches im Auftrag von N-Zyme durch die Fa. Harlan RCC im *in vitro*-Zellkultursystem bestimmt werden konnte.

Auch bei der Oliventee-Zubereitung gehen Oleuropein und deren Oleuropein-Aldehyd-Derivate in den Tee über. Für einen traditionellen griechischen Oliveblätterttee werden in Abhängigkeit von der Olivensorte nach dem Aufkochen von Olivenblättern unterschiedliche Substanzen extrahiert (Agalias *et al.* 2005), Tab. 5.

Tab. 5 Traditionelles griechisches Olivenblätterttee-Rezept (Agalias *et al.* 2005)

Bestimmung von Hydroxytyrosol, Oleuropein, Tyrosol und Elenoliksäure in Abhängigkeit von der Olivensorte.

Table 5. Quantity (mg) of oleuropein (OE), elenolic acid (EL), hydroxytyrosol (HT), and tyrosol (T) contained in decoctions of each variety, prepared from 50.0 g fresh leaves and 250 mL water

Cultivar name	HT	OE	T	EL
<i>Throumba</i>	1.189	49.649	0.410	13.170
<i>Gaidouroelia</i>	13.344	121.934	4.038	0.000
<i>Agrielia</i> (or var. <i>sylvestris</i>)	2.364	28.517	1.251	8.715
<i>Chrysoelia</i>	0.597	11.807	0.877	8.217
<i>Kalamon</i>	1.534	40.891	1.158	4.980
<i>Mastoeides</i>	4.074	50.043	20.537	33.146
<i>Koronaiiki</i>	23.964	40.448	1.268	9.519
<i>Amfissis</i>	1.760	32.626	1.429	10.329
<i>Agouromanaki</i>	1.833	32.963	1.473	12.981
<i>Megaritiki</i>	2.575	29.882	1.490	14.231

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass beim Trinken von 250 mL Olivenblätter-Tee neben Oleuropein (etwa 10 – 120 mg) auch beträchtliche Mengen des Aldehydes Elenoliksäure (5 – 30 mg) extrahiert und anschließend getrunken werden können, Mengen, die weit über den ermittelten IC50-Werten liegen. Olivenblätter werden schon seit Jahrhunderten als Tee genutzt.

Auch aktuell gibt es zahlreiche kommerziell erhältliche Olivenblätter zur Teezubereitung (Abb. 42).



Abb. 42: Beispiele von Olivenblättertteeherstellern

Olivenblätter werden auch in mediterranen Rezepten als Beilage serviert z.B. bei der italienischen Speise „Anatra muta alle foglie d’Olivo“ (Ente mit Olivenblättern).

In der Zeitschrift Stoffrecht (1/2006, „Das Gänseblümchen wird entblättert“) werden Olivenblätter über den Genusswert als Lebensmittel eingestuft: „Im Mittelmeerraum lassen sich alte Essenrezepte finden, wonach die Blätter zumeist kleingeschnitten als würzende Beigabe in Fleisch- oder Geflügelgerichten gereicht werden. Von diesem Hintergrund kann man Olivenblätter als Lebensmittel bezeichnen, ...“.

Von der Martin-Bauer-Gruppe - Spezialist bei der Herstellung von verschiedenen Extrakten und Tees - wurde auf Belege hingewiesen dass Olivenblätter vor 1997 in der Europäischen Union gehandelt wurden und demnach nicht als Novel Food einzustufen sind (in einzelnen europäischen Staaten unterliegen sie sogar gesetzliche Regelungen als Nahrungsergänzungsmittel oder Lebensmittel). Weiterhin kann wässrig extrahierter und konzentrierter Olivenblätterextrakt als Nahrungsmittel deklariert werden.

In Tab. 6 sind Beispiele europäischer und Tab. 7 weltweiter Lebensmittelprodukte, die Olivenblattextrakte enthalten, dargestellt.

Tab. 6: Nahrungsmittelprodukte (Beispiele) mit Oliveblattextrakt - Europa

O'leaf Pasta (Germany) Nudeln	Bionara: (Österreich) Getränk	Hartwall Felix: (Finnland) Getränk	KetoJuice: (England) Smoothie	Toto vino olive (French) Getränk	H2Olive: (Europa) Getränk	Olive Leaf Extrakt (Germany) Getränk*	KetoSlim: (England) Proteinriegel
							

Tab.7: Nahrungsmittelprodukte (Beispiele) mit Oliveblattextrakt – Weltweit

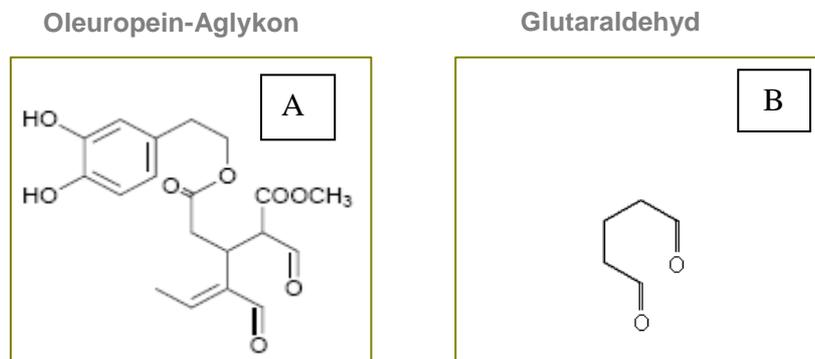
Tea & Joy (Malaisien) Essig	Cell-Nique (USA): Getränk	Dr Red Nutraceuticals (Australien): Kaffee	Kanro (Japan) Lutschtabletten	ALO (USA) Getränk	Nature's Goodness (Australien) Lutschtabletten
					

Es ist davon auszugehen, dass beim Produkt *Olive Leaf Extrakt*, welcher mit Lactobazillen fermentiert wurde, auch Oleuropein-Aglykon nachzuweisen ist.

Sowohl die Ergebnisse mit Olivenöl und Oliventee liefern Anhaltspunkte, dass Oleuropein und dessen aldehydische Abbauprodukte, wie Oleuropein-Aglykon, bereits seit Jahrhunderten von Menschen verspeist werden. Den aldehydischen Oleuropein-Derivaten im Olivenöl werden in der wissenschaftlichen Literatur gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeordnet und oftmals findet sogar eine Anreicherung der Aldehyde im Öl auch dadurch statt, dass beim Zermahlen der Oliven zur Olivenölgewinnung auch Olivenblätter beigemischt sind.

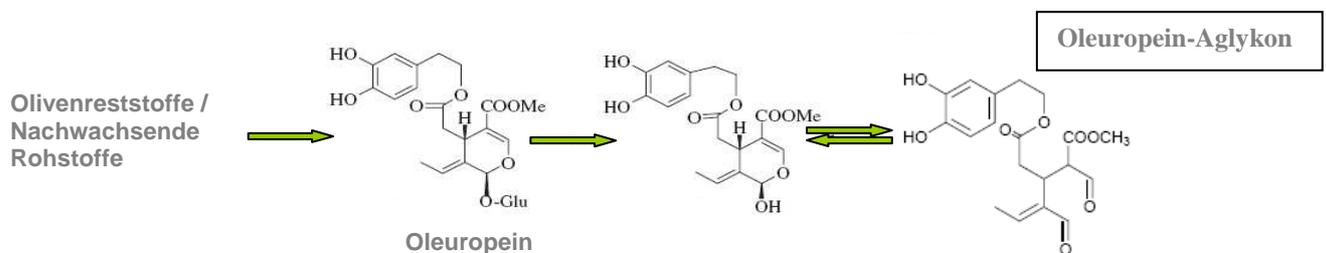
4.9 Ökoeffizienzanalyse

Für die Ökoeffizienzanalyse wurde der Herstellungsprozess von Oleuropein-Aglykon (A), der auf der Nutzung von Olivenreststoffen basiert, mit dem Produktionsprozess von Glutaraldehyd (B), welcher als Grundlage fossile Brennstoffe benötigt, verglichen.



Beide Moleküle weisen ein C5-Grundgerüst mit zwei endständigen Aldehydgruppen auf, wodurch Vernetzungsreaktionen ermöglicht werden. Oleuropein-Aglykon ist aber aufgrund seiner zusätzlichen Seitenketten komplexer aufgebaut und weist daher zusätzliche Eigenschaften wie z.B. Antioxidativität auf. Die Gegenüberstellung der Synthesewege von Oleuropein-Aglykon und Glutaraldehyd sind in Abb. 43 dargestellt.

Herstellung von Oleuropein-Aglykon



Herstellung von Glutaraldehyd

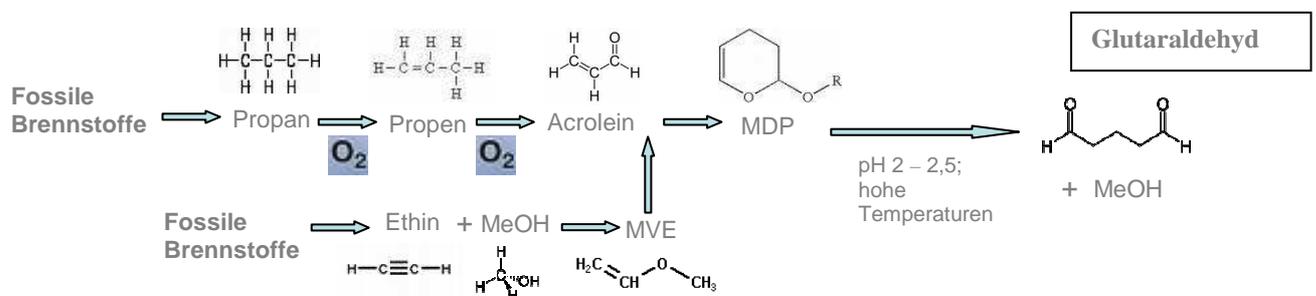


Abb.43 Synthesewege von Oleuropein-Aglykon und Glutaraldehyd (nach Dow Chemical und BASF)

Dow Chemical und BASF teilen sich den Markt zur Herstellung von Glutaraldehyd (Pentan-1,5-dial). Der Produktionsprozess ist seit Jahrzehnten etabliert und sehr effizient – aber abhängig von fossilen Brennstoffen, deren Verfügbarkeit endlich ist.

Die Anwendungsmöglichkeiten von Glutaraldehyd sind vielfältig:

- Desinfektionsmittel
- Vernetzer von Röntgenfilmen
- Ledergerbstoff
- Biozid (z.B. Wasserbehandlung)
- Konservierungsmittel für Industrieöle
- Konservierungsmittel für Kosmetikprodukte
- Stabilisator zur Herstellung von Kapseln
- Herstellen von Wursthüllen
- Stabilisierung von Implantaten
- Fixierung von Gewebeschnitten für die Mikroskopie,
- etc.

Die Möglichkeit, Glutaraldehyd durch das natürlich in Extra Virgin Olivenöl vorkommende und als Nebenprodukt der Nahrungsmittelindustrie anfallende Molekül Oleuropein-Aglykon zu substituieren, hat daher großes strategisches Interesse. Im Projektvorhaben lagen die Arbeitsschwerpunkte auf der Etablierung eines Herstellungsverfahrens, um eine erste Ökobilanz zwischen den beiden Verfahren zu ermöglichen, die die Grundlage für zukünftige Verfahrensoptimierungen darstellen soll.

Im Projektkonsortium konnte das in Abb. 44 dargestellte Verfahren zur Herstellung von Oleuropein-Aglykon etabliert werden. Über das Projektende hinaus wurde bis Ende 2010 die ÖEA erstellt.

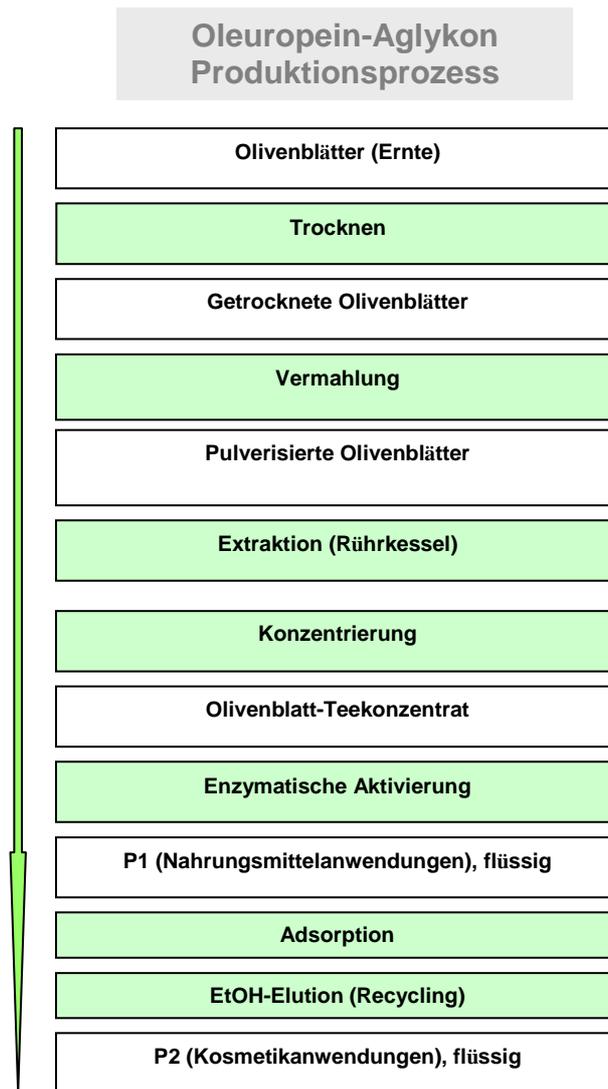


Abb. 44: Oleuropein-Aglykon-Herstellungsprozess - Grundlage für die Ökoeffizienzanalyse (ÖEA) durch Fa. IFU-Hamburg

Für den Einsatz von Oleuropein-Aglykon im Biomedizinsektor z.B. zur Stabilisierung von Hydrogelen zur Herstellung von Implantaten werden besondere Reinheitsanforderungen an das Produkt gestellt. Für die Kooperationen und Machbarkeitstudien wurden daher zusätzlich Reinigungsschritte etabliert. Die für dieses Arbeitsfeld benötigten Mengen an Vernetzern sind im Vergleich zu den zu erwarteten Mengen für den Kosmetikbereich gering und wurden daher nicht im Produktionsverfahren für die ÖEA berücksichtigt.

Die Prozessdaten zur Herstellung von Oleuropein-Aglykon sowie alle bekannten Informationen zum Glutaraldehyd-Herstellungsprozess wurden nach dem Stand der Technik zum IFU-Hamburg übermittelt. IFU-Hamburg hat durch eigene Recherchen detaillierte Datensätze und Produktionsdaten von Glutaraldehyd erarbeitet, um die notwendigen Stoffströme für die vergleichende ÖEA zu ermöglichen.

Bereits im Verlauf des Projektes war ersichtlich, dass wir Konzentrierungsschritte in unser geplantes Produktionsverfahren integrieren müssen. Als mögliche Verfahren standen die Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Vakuumdestillation und Ultrafiltration zur Diskussion und waren auch technisch durch BZN umsetzbar. Die hierzu vorhanden Datensätze (IFU-Hamburg) mit den entsprechenden Energieindices verdeutlichten, dass der Arbeitsschwerpunkt auf die Membranverfahren gelegt werden mussten, um weniger Energie zu verbrauchen und um Kosten zu sparen. Die Ultrafiltration (Energieindex 943 kJ/kg) weist im Vergleich zur Sprühtrocknung (Energieindex 14570 kJ/kg) einen um etwa 15fach geringeren Energieindex auf.

Nach Abschluss der Arbeiten und Etablierung des Oleuropein-Aglykon-Herstellungsverfahrens wurde die Ökobilanz zur Herstellung von 1 t Oleuropein-Aglykon der Produktion von 1 t Glutaraldehyd gegenübergestellt (IFU Hamburg). Die Mengenflüsse der beiden Vernetzer Oleuropein-Aglykon und Glutaraldehyd sind im Sankey-Diagramm-Format in Abbildung 45 dargestellt.

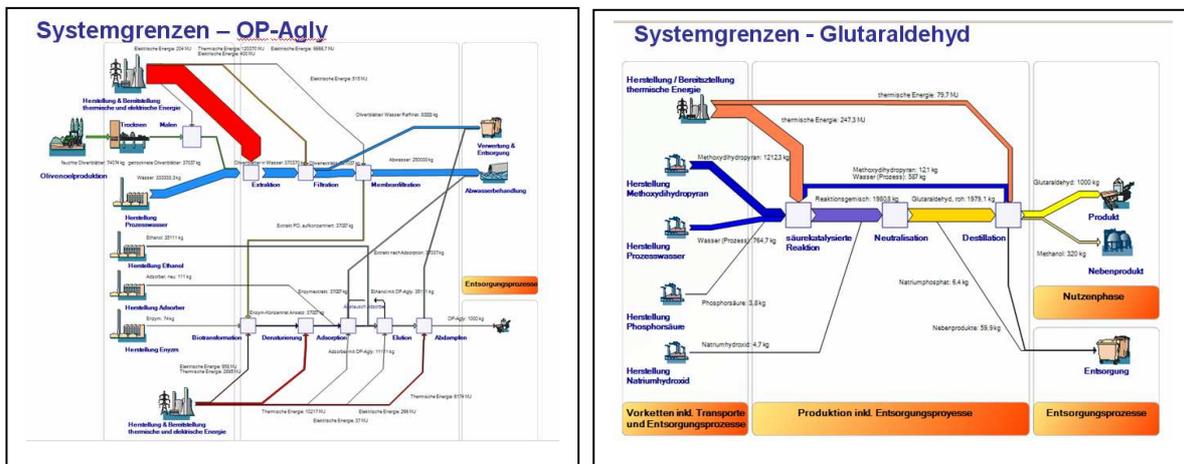


Abb. 45: Sankey-Diagramm-Vergleich zur Herstellung von OP-Agly (links) und Glutaraldehyd (rechts)

Bei der Herstellung von Oleuropein-Aglykon wurden mehrere Szenarien berücksichtigt wie z.B. Herstellungsort (Deutschland oder Spanien), Ethanol (Gewinnung konventionell oder aus Biomasse, einmalige Verwendung bzw. Wiederverwendung) bzw. Entsorgung der Biomasse (Kompostierung oder Verbrennung). In der Tabelle 8 sind die unterschiedlichen Szenarien von A bis E aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht der Szenarien zur Herstellung von Oleuropein-Aglykon

Varianten		A	B	C	D	E
Transportdistanz der Blätter	100 km/ 2000 km	2000 km	100 km	100 km	100 km	100 km
Verwertung der anfallenden Biomasse	Kompostierung/ Verbrennung	Kompostierung als Last	Kompostierung als Last	Verbrennung	Verbrennung	Kompostierung erzeugt keine Last
Ethanol-Verwendung	Mehrmals mit Destillation/ einmalige Nutzung	einmalige Nutzung	einmalige Nutzung	einmalige Nutzung	Mehrmals mit Destillation	Mehrmals mit Destillation

Für die Glutaraldehyd-Herstellung wurden Best-Case-, Worst-Case- und Default-Szenarien unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen (Druck/Temperatur/Hilfsstoffeinsatz), Ausbeuten und Verwendung von Nebenprodukten (Abfall, Weiterverwendung) aufgestellt.

Nach dem derzeitigen Kostenmodell liegt der Preis für synthetisch hergestelltes Glutaraldehyd um den Faktor 3-4 niedriger als nach dem heutigen Stand der Technik der Preis von Oleuropein-Aglykon.

Aus den Ökoeffizienzportfolioergebnissen wird ersichtlich (siehe Abb. 46), dass alle modellierten Szenarien zur Glutaraldehyd-Herstellung ökoeffizienter sind als die Vergleichsverfahren zur Produktion von Oleuropein-Aglykon. Die Unterschiede bezüglich der Ökoeffizienz bei der Glutaraldehyd-Herstellung sind gering.

Ergebnisse - Das Ökoeffizienzportfolio

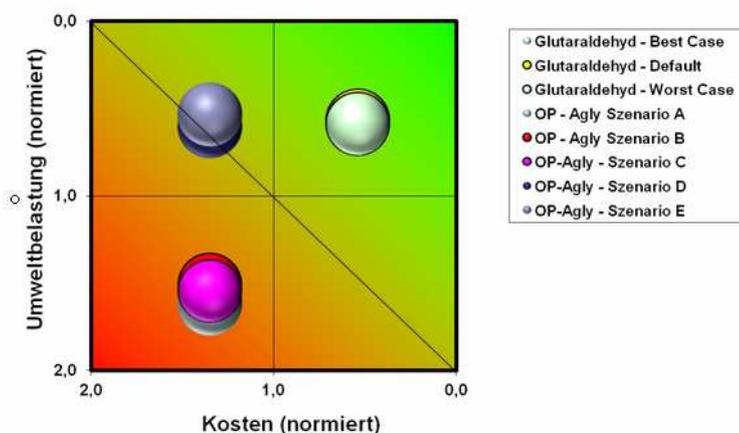


Abb. 46: Ökoeffizienzportfolioergebnisse der Szenarien zur Herstellung von Glutaraldehyd und Oleuropein-Aglykon.

Aus ökologischer Sicht ist das Oleuropein-Aglykon-Szenario E etwas umweltfreundlicher als das Best-Case-Szenario zur Glutaraldehyd-Herstellung. Die Oleuropein-Aglykon-Szenarien A, B, C sind sowohl aus ökologischer als auch aus ökonomischer Sicht weit abgeschlagen. Nach dem heutigen Stand der Technik ist in allen Vergleichen die Herstellung von Glutaraldehyd ökonomischer als die OP-Agly-Produktion.

Auch beim ökologischen Fingerprint (Abb. 47) sind fast alle Wirkungskategorien beim Glutaraldehyd-Herstellungsprozess vorteilhafter.

Der ökologische Fingerprint*

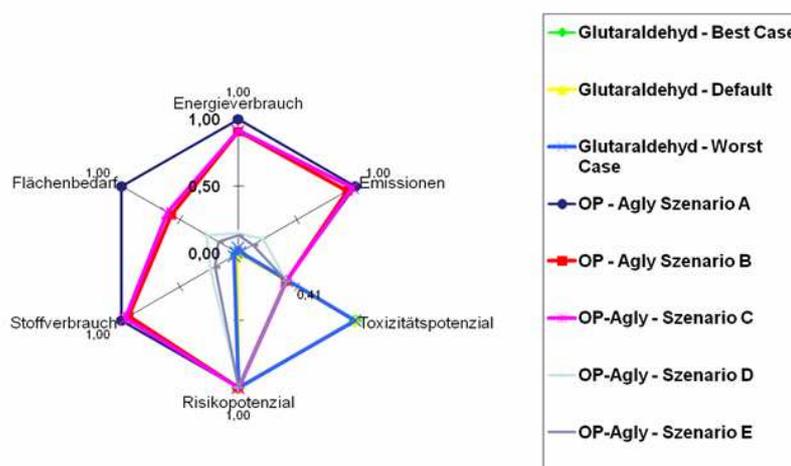


Abb. 47: Ökologischer Fingerprint der Herstellung von Glutaraldehyd und Oleuropein-Aglykon. *Darstellung normiert, jeweils schlechteste Alternative wird auf 1 gesetzt.

Ausnahme stellt hier das Toxizitätspotenzial dar, welches beim Oleuropein-Aglykon noch im Detail bewertet werden muss. Die Kategorie Risikopotenzial wurde aufgrund einer unsicheren Datenbasis nicht betrachtet.

Für die Ökobilanzierung können weitere Rechenszenarien durchgeführt werden, die ein Gewichtungsschema und Relevanzfaktoren berücksichtigen. Hierbei können z.B. gesellschaftliche Faktoren eine Rolle spielen. Weiterhin kann die Stabilität der Ergebnisse in Ökoeffizienzanalysen mit Hilfe von Sensitivitätsanalysen überprüft werden. Dabei werden sowohl die Eingangsdaten, die Systemgrenzen als auch die Gewichtungsfaktoren variiert und die Auswirkungen auf das Endergebnis betrachtet. Je nach Gewichtung der Ergebnisse und angewandter Methode variieren die Ökoeffizienzergebnisse leicht, bestätigen aber die prinzipielle Tendenz (Abb. 48)

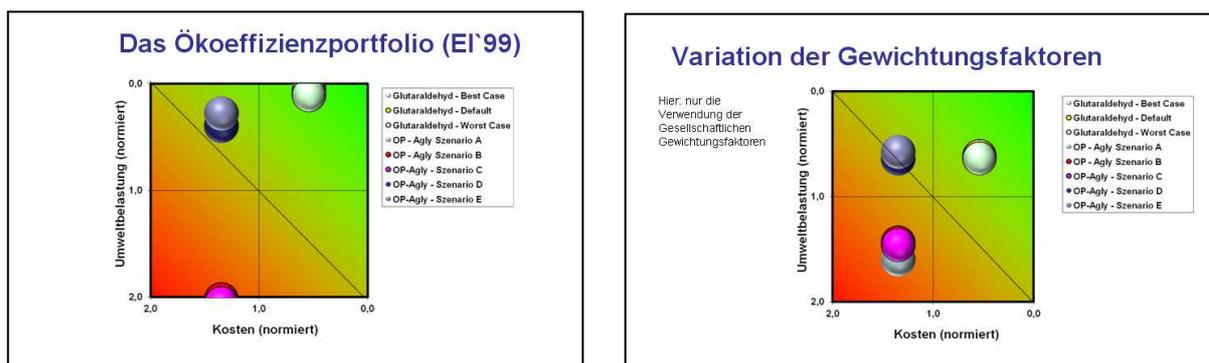


Abb. 48 Vergleich der Ökoeffizienzanalyse unter Verwendung von Ecoindicator `99 (linke Graphik) und durch Variation der Gewichtungsfaktoren (rechte Graphik).

Die Beispiele verdeutlichen, dass es bei den Sensitivitätsanalysen je nach Schwerpunkt zu tendenziellen Variationen im Ergebnis kommt. Bei der Anwendung von Ecoindicator `99 werden Schadstoffemissionen Wirkungskategorien (nach ISO 14040 ff) zugewiesen und mittels Division durch das durchschnittliche europäische Gesamtwirkungspotenzial normiert und Umweltaspekte werden so genannten Schadenskategorien (Auswirkung auf die menschliche Gesundheit, Qualität des Ökosystems, fossile und mineralische Ressourcen) zugeordnet. Als Ergebnis wirkt sich bei dieser Methode die Ökobilanz zu Gunsten des Glutaraldehydverfahrens aus. (Abb. 48 linke Seite). Im Gegensatz hierzu wird durch alleinige Verwendung von gesellschaftlichen Gewichtungsfaktoren die Umweltbelastung im Szenario D und E im Oleuropein-Aglykon-Prozess verbessert (Abb. 48, rechte Seite).

Die Sensitivitätsanalysen bestätigen die wesentlichen Aussagen des Ökoeffizienzportfolios. Die Szenarien D und E zur Herstellung von Oleuropein-Aglykon weisen hinsichtlich der ökologischen Betrachtungsweise vergleichbare Werte auf wie bei der Herstellung von Glutaraldehyd.

Aus ökonomischer Betrachtungsweise ist der Glutaraldehyd- dem Oleuropein-Aglykon-Herstellungsprozess überlegen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Oleuropein-Aglykon-Herstellungsprozess (Szenarien) ökologisch mit dem GA-Prozess konkurrieren kann. Zu bedenken ist hierbei, dass der Glutaraldehyd-Prozess seit Jahrzehnten von der industriellen Chemie (Dow Chemicals und BASF) optimiert wurde und zur Bewertung des

Aglykon-Herstellungsprozess ein Verfahren für die Ökoeffizienzanalyse herangezogen wurde, welches innerhalb von 28 Monaten Projektlaufzeit entwickelt wurde. Die ÖEA zeigt aber deutlich die Schwachpunkte im derzeitigen Oleuropein-Aglykon-Herstellungsprozess auf und kann daher genutzt werden, gezielt Optimierungen vorzunehmen.

Im Fokus zukünftiger Arbeiten stehen daher die Optimierung der Prozessausbeute von Oleuropein-Aglykon, die Reduktion von Wasser bei der Extraktion - da hierbei sehr viel Energie zum Aufheizen benötigt wird - sowie die Reduktion des Lösungsmittels Ethanol bei der Reinigung. Voraussetzungen für die Installierung eines wirtschaftlichen Prozesses sind die Aufarbeitung der Olivenblätter vorort, damit diese nicht mehr verbrannt werden müssen und das Recycling von Ethanol. Bei der ÖEA wurde weiterhin noch nicht berücksichtigt, dass ggf. für die Herstellung der Oleuropein-Aglykon-Produkte Energie aus der Verbrennung von Olivenkernen (2 kg Kerne entspricht der Energie von ca. 1 L fossilem Öl) genutzt werden kann, die bei der Ernte im mehrfachen Tonnenmaßstab pro Olivenmühle anfallen. Gleichwohl ist die südliche spanische Region Andalusien prädestiniert zur Nutzung von Solarenergie und die aktuellen Unruhen in den erdölliefernden Länder in Afrika und nahen Osten sowie die Endlichkeit des fossilen Ressourcen verdeutlichen, dass es mittelfristig zu drastischen Preiserhöhungen und letztendlich auch des synthetischen Vernetzers Glutaraldehyd kommen wird.

Sämtliche Optimierungen des Oleuropein-Aglykon-Herstellungsprozesses auf Basis des nachwachsenden Rohstoffes Olivenblatt, welche bei der Olivenernte als Reststoff anfallen, führen einerseits zu einer Preisreduktion, aber zusätzlich noch zu einem ökologischeren Produkt, da die Kosten mit der Energie korrelieren. Der *proof of concept* zur Herstellung von OP-Agly konnte gezeigt werden und die Ökoeffizienzanalyse kann in Gesprächen mit Technologiepartnern zur Optimierung des Prozesses und zur geplanten industriellen Umsetzung eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

- Agalias A. et al. (2005) Quantification of Oleuropein and related metabolites in decoctions of *Olea europaea* leaves from ten greek cultivated varieties by HPLC with diode array detection (HPLC-DAD).
J. Liquid Chrom. Rel. Technol. 28; 1557-1571
- Al-Azzawie et al. (2006) Hypoglycemic and antioxidant effect of Oleuropein in alloxan-diabetic rabbits.
Life Sciences 78; 1371-1377
- Amiot et al. (1986) Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation.
J. Agric. Food Chem. 34; 823-826
- Brenes, M, et al. (1995) Biochemical changes in phenolic compounds during spanish-style green olive processing
J. Agric. Food Chem. 43; 2702 - 2706
- Bouazis and Savadi (2005) Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunasion cultivar olive tree:
Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, 497-501
- Carrasco-Pancorba, A., et al. (2007) Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of Extra-Virgin Olive Oils :
J. Agric. Food Chem. 55; 4771-4780
- Ciafardini, G. et al. (1994) Hydrolysis of Oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation:
Appl. Envir. Micro. 60 ; 4142-4147
- Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents.
Clinical Microbiol. Reviews 12; 564-582.
- de Castro and Japon-Lujan (2006) State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives:
Trends Anal. Chem. 25; 501-510
- Elliott, G.A. et al. (1969) Preliminary safety studies with calcium-elenolate, an antiviral agent:
Antimicrob. Agents and Chemotherapy 173-176
- Erdmann S. M., Merk H.-F. (2003). Kontaktsensibilisierungen auf Externa.
Hautarzt 54; 331-337.
- Fernandez-Bolanos et al. (2002) Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo":
J. Agric. Food Chem. 50 ; 6804-6811
- Fleming H. P., Walter W. M., Etchells J. L. (1973). Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives.
Applied Microbiol. 26; 777-782.
- Fürst, W. und Banerjee, A (2005) Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity:
Soc. Thoracic surgeons 79, 1522-1529
- Garcia et al. (2003) Phenolic content of commercial olive oils :
Eur. Food Res. Technol. 216, 520-525
- Gonzales et al. (1991) Hypoglycemic activity of olive leaf:
Planta Med 58; 513-515
- Hagenmeyer et al. (2006) Ein Gänseblümchen wird entblättert:
Zeitschrift für Stoffrecht, 1-17
- Hamdi et al. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disrupter;
Biochem. Biophys. Res. Com. 334; 769 - 778
- Hänsel, R.: Hagers Handbuch der pharmaceutischen Praxis, Bd. 5 Drogen E-O, Springer, Berlin Heidelberg 1993

- Impellizzeri and Lin (2006) A simple high-performance liquid chromatography method for the determination of throat-burning Oleocanthal with probated antiinflammatory activity in extra virgin olive oils.
J. Agric. Food Chem. 54; 3204-3208
- IUCLID Datasheet; Glutaraldehyd CAS No. 111-30-8, European Commission, 2000
- Japon-Lujan and de Castro (2007) Static-dynamic superheated liquid extraction of hydroxytyrosol and other biophenols from Alperujo (a semisolid residue of the olive oil industry) :
J. Agric. Food Chem. 55 ; 3629-3634
- Kachouri and Hamdi (2006) Use of *Lactobacillus plantarum* in olive oil process and improvement of phenolic compounds content.
J. Food Eng. 77, 746-752
- Kim et al. (2000) Mechanism of covalent adduct formation of aucubin to proteins:
Tox. Lett. 114, 181-188
- Konno et al. (1999) Enzymatic activation of Oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree:
Proc. Natl. Acad. Sci. 96; 9159-9164
- Korting HC, Schindler S, Hartinger A, Kerscher M, Angerpointer T, Maibach HI. MTT-Assay and neutral red release (NRR)-assay: relative role in the prediction of the irritancy potential of surfactants.
Life Sci 1994;55:533-540.
- Menendez et al. (2007) Olive oil's principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells.
BMC cancer; 7; 1-19
- Motoyoschi K., Toyoshima Y., Sato M., Yoshimura M. (1979). Comparative studies on the irritancy of oils and synthetic perfumes to the skin of rabbit, guinea pig, rat, miniature swine and man.
Cosmetics & Toiletries 94; 41-48.
- Michael Niaounakis and Constantinos P. Halvadakis: OLIVE PROCESSING WASTE MANAGEMENT (2006)
- NIZO-Patent (EP1489135A, 2003) Use of secoiridoids, preferable Oleuropein for cross-linking biopolymers
- Obied et al. (2005) Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols:
J. Agric. Food Chem. 53; 9911-9920
- Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, Tatano T, Yagi K. A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative.
Biochem Int 1985; 10:205-211.
- Rodrigues et al. (2007) Effect of steam treatment of Alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of alperujo :
J. Agric. Food Chem. 55, 136-142
- Romeo and Poiana (2006) Ability of commercially available *Lactobacillus* strains as starter in brining and debittering of table olives:
Acta Alim. 36, 49-60
- Soler-Rivas, C. et al. (2000) Oleuropein and related compounds;
J. Sci. Food Agric. 80; 1013-1023
- Servili et al. (2006) The use of *Lactobacillus pentosus* 1MO to shorten the debittering process time of black table olives (Cv. Itrana and Leccino): A pilot-scale application:
J. Agric. Food Chem. 54, 3869-3875
- Unilever-Patent (EP0849353B, 1997) Debittering of olive oil
- Zotzel, J; Sarafeddin, A., Marx, S. (2007/2008) Mittel und Verfahren zur Gerbung von Häuten und Fellen (EP 07121380.5)
- Zuang V. The neutral red release assay: a review.
Altern Lab Anim 2001;29:575-99.