



**Regulierung einer Mikroorganismenflora mit
Oliventrestextrakten — Nutzung des fungiziden
und bakteriziden Potentials natürlicher Polyphenole
zur Kontrolle von Pflanzenkrankheiten**

Erstellt von:

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Institut für Lebensmitteltechnologie
Römerstraße 164, 53117 Bonn
Tel.: +49 228 734274, Fax: +49 228 734429
E-Mail: g.laufenberg@uni-bonn.de
Internet: <http://www.universitaet-bonn.de>

Gefördert vom Bundesministerium
für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.





INSTITUT FÜR LEBENSMITTELTECHNOLOGIE DER UNIVERSITÄT BONN

Schlussbericht

- Zuwendungsempfänger: Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Bonn
PD Dr.-Ing. Günther Laufenberg
- Förderkennzeichen: 514-43.10/02OE257
- Vorhabenbezeichnung: **Regulierung einer Mikroorganismenflora mit Oliventresterextrakten** – Nutzung des fungiziden und bakteriziden Potentials natürlicher Polyphenole zur Kontrolle von Pflanzenkrankheiten
- Laufzeit des Projektes: 01.11.2002 bis 31.12.2003

1	DAS PROJEKT	3
1.1	ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG	3
1.2	BEZUG DES PROJEKTES ZU DEN FÖRDERPOLITISCHEN ZIELEN	3
1.3	WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND, AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE	4
1.4	PLANUNG UND ABLAUF	5
2	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	MATERIAL	6
2.1.1	<i>Rohmaterial</i>	6
2.1.2	<i>Geräte</i>	7
2.1.3	<i>Mikroorganismen</i>	10
2.1.4	<i>Enzyme</i>	14
2.1.5	<i>Chemikalien</i>	15
2.2	METHODEN	17
2.2.1	<i>Chemische Rohmaterialeigenschaften</i>	17
2.2.1.1	Wassergehalts des Oliventresters	17
2.2.1.2	Restölgehalt	17
2.2.1.3	Proteingehalt	18
2.2.1.4	Ballaststoffgehalt	19
2.2.1.5	Aschegehalt	20
2.2.1.6	Gesamtpolyphenolkonzentration	21
2.2.1.7	pH-Wert	21
2.2.2	<i>Physikalische Rohmaterialeigenschaften</i>	21
2.2.2.1	Vermahlung und Fraktionierung	21
2.2.2.2	Wahre Dichte	22
2.2.2.3	Scheinbare Dichte und Porosität	22
2.2.2.4	Wasserbindungskapazität	22
2.2.2.5	Schwellungskapazität	23
2.2.2.6	Spezifische Oberfläche	23
2.2.3	<i>Analytik</i>	23
2.2.3.1	Gesamt-Polyphenolbestimmung	23
2.2.3.2	Einzelsubstanz-Analytik	26
2.2.3.2.1	Dünnschichtchromatographie	26
2.2.3.2.2	HPLC	34
2.2.3.2.3	Präparative LC	38
2.2.4	<i>Optimierung der Extraktionsausbeute</i>	39
2.2.4.1	Physikalische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung	40
2.2.4.2	Biochemische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung	41
2.2.4.3	Chemische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung	42
2.2.5	<i>Modifikation des Wirkungsspektrums</i>	43
2.2.5.1	Lösungsmittelauswahl	43
2.2.5.2	Saure und alkalische Hydrolyse	44
2.2.5.3	Enzymatische Modifikation	45
2.2.5.4	Ultraschall-Behandlung	45
2.2.6	<i>Mikrobiologie</i>	45
2.2.6.1	Schimmelpilze	45
2.2.6.2	Bakterien	48
2.2.7	<i>Pflanzenversuche</i>	50
2.2.7.1	Chlorophyllfluoreszenz-Test	50
2.2.7.2	Protektive Wirkung gegenüber <i>Botrytis cinerea</i> -Befall	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	CHEMISCHE ROHMATERIALEIGENSCHAFTEN	51
3.1.1	<i>Wassergehalts des Oliventresters</i>	51
3.1.2	<i>Restölgehalt</i>	51
3.1.3	<i>Proteingehalt</i>	51
3.1.4	<i>Ballaststoffgehalt</i>	51
3.1.5	<i>Aschegehalt</i>	52
3.1.6	<i>Gesamt-Polyphenolkonzentration</i>	52
3.1.7	<i>pH-Wert</i>	53
3.2	PHYSIKALISCHE ROHMATERIALEIGENSCHAFTEN	54
3.2.1	<i>Vermahlung und Fraktionierung</i>	54

3.2.2	<i>Wahre Dichte</i>	56
3.2.3	<i>Scheinbare Dichte und Porosität</i>	56
3.2.4	<i>Wasserbindungskapazität</i>	56
3.2.5	<i>Schwellungskapazität</i>	57
3.2.6	<i>Spezifische Oberfläche</i>	58
3.3	OPTIMIERUNG DER EXTRAKTIONS-AUSBEUTE	59
3.3.1	<i>Physikalische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung</i>	60
3.3.2	<i>Biochemische Wirkstofffreisetzung</i>	66
3.3.3	<i>Chemische Wirkstofffreisetzung</i>	67
3.4	MODIFIKATION DES WIRKSTOFFSPEKTRUMS	69
3.4.1	<i>Extraktionsmittelauswahl</i>	69
3.4.2	<i>Saure und alkalische Hydrolyse</i>	82
3.4.3	<i>Enzymatische Modifikation</i>	88
3.4.4	<i>Ultraschall-Behandlung</i>	90
3.5	HEMMWIRKUNG AUF BAKTERIEN	91
3.6	PFLANZENVERSUCHE	92
3.6.1	<i>Chlorophyllfluoreszenz-Test</i>	92
3.6.2	<i>Protektive Wirkung gegenüber Botrytis cinerea – Befall</i>	93
3.7	NUTZEN UND VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE	94
3.8	MÖGLICHKEITEN DER ANWENDUNG DER ERGEBNISSE FÜR EINE AUSDEHNUNG DES ÖKOLOGISCHEN LANDBAUS	94
4	BISHERIGE UND GEPLANTE AKTIVITÄTEN ZUR VERBREITUNG DER ERGEBNISSE	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	98
6	GEPLANTE UND ERREICHTE ZIELE, WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN	101
7	LITERATURVERZEICHNIS	103

1 Das Projekt

1.1 Ziele und Aufgabenstellung

Die Regulierung von Pilzkrankheiten stellt ein großes Problem im ökologischen Landbau dar. Die momentan existierenden Möglichkeiten zur Pilzbekämpfung sind stark beschränkt, und es besteht ein großer Bedarf an Alternativen zu ökologisch bedenklichen kupfer- und schwefelhaltigen Pflanzenschutzmitteln. Die EG-Öko-Verordnung schreibt vor, dass der Einsatz schwermetallhaltiger Fungizide in den nächsten Jahren weiter eingeschränkt werden muss. Daher werden dringend alternative Präparate benötigt, die in ihrer Herstellung, Anwendung und in ihrem Verhalten im Ökosystem den Grundgedanken des ökologischen Landbaus entsprechen. Diese Grundgedanken sind das Wirtschaften im Einklang mit der Natur, die Verwirklichung einer nachhaltigen Entwicklung und das Streben nach geschlossenen Stoffkreisläufen.

Oliventrester, ein Abfall-Produkt der Olivenöl-Produktion, ist aufgrund seiner antimikrobiellen Inhaltsstoffe schwer kompostierbar und stellt somit ein Entsorgungsproblem dar. Neben ihren fungiziden und bakteriziden Eigenschaften [10, 18] wirken die Ölbaum-Polyphenole antioxidativ [11, 16]. Aus diesem Grund werden sie für die anticancerogene und kardioprotektive Wirkung der oliven(öl)-reichen mediterranen Diät verantwortlich gemacht [7, 25, 170]. Phenolische Verbindungen spielen in Pflanzen eine große Rolle bei der Abwehr gegenüber Pathogenen [105, 145]; ihnen wird aber auch eine biologische Wirksamkeit gegenüber abiotischen Stressfaktoren (UV-B-, Hitzestress) zugesprochen [152].

Ziel des Projektes war es, die phenolischen Inhaltsstoffe des Oliventresters zu gewinnen und einen potentiellen Einsatz als natürliches fungizides Pflanzenschutzmittel zu evaluieren.

Es musste untersucht werden, in welchem Maße sich diese Substanzen freisetzen und extrahieren lassen. Zu diesem Zweck sollten Rohmaterialeigenschaften ermittelt, Prozesse zur Freisetzung der Inhaltsstoffe identifiziert und Extraktionsmethoden entwickelt werden. Die Extrakte sollten hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften in in-vitro Versuchen mit relevanten Mikroorganismen evaluiert werden. In weiteren Untersuchungen galt es, Methoden zu identifizieren, durch die das Wirkungsspektrum hinsichtlich der fungiziden Wirksamkeit optimiert werden kann.

Anfängliche Pflanzenversuche sollten aufzeigen, in wie weit sich die in-vitro Versuche auf Versuche mit Pflanzenmaterial übertragen lassen und ob das angedachte Endziel, die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels, realistisch erscheint.

1.2 Bezug des Projektes zu den förderpolitischen Zielen

Es ist das Ziel der Bundesregierung, den Anteil der ökologisch bewirtschafteten Fläche bis zum Jahre 2010 von derzeit 3,2% auf 20% zu steigern. Um dies zu erreichen, müssen Wachstumshemmnisse beseitigt und die Wettbewerbsfähigkeit gesteigert werden. Das vorgestellte Projekt liefert einen direkten Beitrag zur Erreichung der erklärten Ziele. Die Regulierung von Pilzkrankheiten stellt ein großes Problem im ökologischen Landbau dar, weil bislang kein adäquates Fungizid zur Verfügung steht und der Einsatz von ökologisch bedenklichen Kupferpräparaten künftig verringert werden muss. Die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels nach den Anforderungen des ökologischen Landbaus würde mengenmäßige Ertragssteigerungen und die Reduzierung von Qualitäts- und

Mengenschwankungen ermöglichen. Somit wäre die Wettbewerbsfähigkeit gegenüber der konventionellen Landwirtschaft deutlich gesteigert.

Das vorgestellte Projekt verfolgt ein holistisches Konzept der Produktion von Gütern, d.h. die Wirkstoffe werden in ihrer ökologischen Verträglichkeit vom Rohstoff bis zum fertigen Produkt betrachtet (Produktlinienkonzept). Als Rohstoff dient Oliventrester, bisher ein Abfallprodukt der Speiseölproduktion. Die Wertschöpfung dieses Produktstromes wird durch Einbringung in einen neuen Produktionskreislauf gesteigert. Zusätzlich bietet das Konzept eine Lösung für die Entsorgungsproblematik der Reststoffe der Olivenölproduktion.

Das Endprodukt wird aufgrund seiner natürlichen Herkunft vollständig biologisch abbaubar sein und die aufgeschlossenen Oliventrester können als Bodenverbesserungsmittel den Anbauflächen beigegeben werden. Der Kreislauf der Ressourcen ist damit gewahrt.

In dem vorgestellten Projekt wird sowohl bei der Wahl der eingesetzten Materialien als auch bei der Entwicklung von Prozessen die Umweltverträglichkeit berücksichtigt. Somit ergibt sich für das angestrebte Produkt eine Ökobilanz, die den Grundideen des ökologischen Landbaus entspricht.

Das Projekt hat demnach einen starken Bezug zu den förderpolitischen Zielen des „Programms des BMVEL zur Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie von Maßnahmen zum Technologie- und Wissenstransfer im ökologischen Landbau“ im Bereich Pflanzenschutz.

1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die antimikrobiellen Eigenschaften der Olivenpolyphenole sind schon seit längerer Zeit bekannt. Neben fungiziden und bakteriziden Eigenschaften werden ihnen teilweise auch antivirale Eigenschaften zugesprochen [10, 61, 84, 86, 87, 123]. Allerdings sind die zugrundeliegenden Wirkmechanismen und bioaktiven Wirkungen noch nicht vollständig aufgeklärt. Literaturseitig vorhandene Informationen sind großteils aufgrund der hohen Spezifität nicht direkt auf das Vorhaben übertragbar.

Erheblicher Forschungsaufwand wird derzeit betrieben, um die antioxidativen Eigenschaften dieser Substanz-Gruppe zu charakterisieren und ihre ernährungsphysiologischen Wirkungen zu ergründen. Diskutiert werden positive gesundheitliche Einflüsse wie z.B.

- Schutz vor LDL-Oxidation
- anticancerogene Wirkung
- blutdruckregulierende Wirkung
- immunmodulierende Wirkung
- entzündungshemmende Wirkung [7, 25, 26, 170]

Die meisten Forschungen beziehen sich auf die Polyphenole im Olivenöl. Es existieren Methoden für deren Aufreinigung zur quantitativen Analyse [1, 54, 60, 109]. Generell ist die Polyphenolanalytik jedoch hochkomplex und bedarf zeitintensiver Methodik und spezialisierter Apparatechnik.

Es gibt Bemühungen, die Olivenöl-Gewinnung so zu gestalten, dass mehr der wertgebenden Polyphenole (Gesundheitsaspekt, Haltbarkeitsverlängerung/Oxidationsschutz) in die Ölphase übergehen [44, 66, 91, 113]. Der Großteil der Polyphenole verbleibt jedoch aufgrund ihrer lipophoben Eigenschaften in dem Abfallprodukt Oliventrester und im abgetrennten Frucht- und Waschwasser [52, 142, 143]. Versuche, diese Substanzen aus den Reststoffen zu gewinnen und einer neuen Verwendung zuzuführen sind uns nicht bekannt. (Extrakt aus

Olivenblättern ist käuflich erwerbbar und wird z.T. in Nahrungsergänzungsmitteln und in der Kosmetik-Industrie eingesetzt.)

Das Projekt konnte also nicht an bestehende gesicherte Kenntnisse und Methoden anknüpfen, sondern startete von einem sehr anfänglichen Stadium.

1.4 Planung und Ablauf

In der ersten Phase des Projektes wurden die Eigenschaften des Rohmaterials ermittelt. Dies war nötig, um adäquate Vorbehandlungsprozesse für das Rohmaterial identifizieren zu können. Hauptaugenmerk lag hierbei auf der chemischen Zusammensetzung des Oliventresters. Ebenso wurden weitere Aspekte wie Vermahlbarkeit, Adsorptionsverhalten und andere physikalische Eigenschaften berücksichtigt. Neben der Bestimmung der Gehalte an Major Komponenten wie Fetten, Proteinen und Ballaststoffen galt es, eine Polyphenolanalytik zur

- Bestimmung des Wirkstoffanteils
- Bestimmung des Wirkungsspektrums
- Identifikation von Leitsubstanzen

aufzubauen.

Polyphenole sind Minor Komponenten in dem pflanzlichen Gewebe. Damit sich deren Gewinnung lohnt, müssen diese möglichst effizient freigesetzt und extrahiert werden. Für diesen Zweck wurden unterschiedliche physikalische, chemische und biochemische Prozesse auf deren Eignung, die Wirkstoffe freizusetzen, untersucht.

Die Extraktion sollte nicht nur hinsichtlich der Ausbeute optimiert werden, sondern es ging auch darum, dasjenige Substanz-Spektrum aus dem Oliventrester zu extrahieren, welches die größte fungizide Wirksamkeit aufweist. Deshalb wurde die Extraktionsmittel-Auswahl hinsichtlich dieses Kriteriums durchgeführt.

Literaturseitig findet man Hinweise dafür, dass die hydrolytischen Spaltprodukte des mengenmäßig vorherrschenden Oleuropein eine stärkere antimikrobielle Wirksamkeit entfalten als das Oleuropein selber [63]. Deshalb wurde untersucht, ob sich adäquate Prozesse für diese Modifikation identifizieren lassen und ob hierdurch eine gesteigerte Wirksamkeit erzielt werden kann.

Die Versuche zur Extraktionsoptimierung und Rohmaterialaufbereitung mussten sowohl mit der Analytik als auch mit mikrobiologischen Versuchen gekoppelt werden, um eine Optimierung hinsichtlich Ausbeute und Wirksamkeit durchführen zu können.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurde eine Stammsammlung an Mikroorganismen aufgebaut, an denen die biologische Wirksamkeit in in-vitro Versuchen getestet werden kann. Die Mikroorganismen sollten einerseits für die Landwirtschaft relevante Pflanzenpathogene darstellen und andererseits in-vitro kultivierbar sein. Für die ausgewählten Mikroorganismen wurde ein Bearbeitungskonzept entwickelt, das geeignet ist, die hemmende Wirkung der Extrakte zu messen und zu quantifizieren.

Im weiteren Verlauf des Projektes wurde in ersten Pflanzenversuchen untersucht, ob sich die polyphenolhaltigen Extrakte phytotoxisch verhalten und ob die hemmende Wirkung auf die pflanzenpathogenen Pilze auch auf Pflanzenversuche übertragbar ist.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollte abgeschätzt werden, ob Oliventresterextrakte potentiell als fungizides Pflanzenschutzmittel genutzt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Rohmaterial

Oliventrester

Der verwendete Trester stammt aus Oliven, die nach ökologischen Richtlinien (Naturland, DIO-EL-01-BIO) von der Firma Friedrich Bläuel Organics in der Anbaugegend Mani bei Kalamata am Südpeloponnes (Griechenland) angebaut wurden. Es wurden Oliven der Sorte *Koroneiki* aus der Campagne 2002/03 verwendet.

Die Produktion des Olivenöls erfolgte wie folgt:

- Reinigen der Oliven mit Wasser zum Entfernen von Blättern, Schmutz etc.
- Vermahlen, 20-30 Minuten
- Malaxieren bei 27-30 °C, ca. 30 Minuten
- Zentrifugieren in einem Dekanter zur Trennung von Trester, Wasser und Olivenöl

Der Trester wurde am Dekanter gesammelt, direkt nach Deutschland geschickt, nach der Anlieferung vakuumverpackt und bei 7 °C im Kühlschrank gelagert. Oliventrester besteht aus dunkelbraunen Fruchtfleisch- und Schalenpartikeln und helleren Kernpartikeln.



Abb. 1: Oliventrester

Olivenblätterextrakt

EUROCHEM Feinchemie GmbH

Hydro-alkoholischer Extrakt aus den Blättern des europäischen Olivenbaumes *Olea europaea*

Charge Nr. 02K001, Nov. 2002

Zusammensetzung:

Phenolklasse	Phenol	Gehalt [%]
Oleuropeoside	Oleuropein	42,15
	Verbaskosid	1,80
	Demethyloleuropein	0,38
	Hydroxytyrosol	1,84
	Tyrosol	0,86
	Elenolin-7-O-Glycosidsäure	0,15
Flavone	Luteolin-7-O-Glycosid	0,48
	Luteolin	0,16
	Apigenin-7-O-Glycosid	0,92
	Diosmin-7-O-Glycosid	1,06
	Diosmetin	0,05

2.1.2 Geräte

Analysesiebe verschiedener Maschenweiten
Fa.: RETSCH GmbH & Co. KG, Haan

Autoklav
Fa.: WOLF, Geislingen
Bez.: Sanoclav M-ECZ

Brutschrank
GFL 3033

Chlorophyllfluoreszenzmessgerät
Fa.: Walz
Typ: PAM-2000

DC-Platten, Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,2 mm
Fa.: Merck

Eismaschine
Fa.: K.H. SPITZL GmbH, Bonn
Bez.: SCOTSMAN AF-10

Extraktor
Rührkesselreaktor (batch-Betrieb), 20 l, Rührer mit 3 Flügelrädern (senkrechte Rührblätter), Rührergeschwindigkeit stufenlos regelbar bis 1000 rpm, 4 Prallbleche, Siebboden mit Möglichkeit Filtrationsschichten einzuspannen, Extrakt lässt sich per Vakuumpumpe abpumpen und gleichzeitig filtrieren, temperierbar

Extraktionshülsen, 33 x 94 mm und 35 x 150 mm
Fa.: SCHLEICHER & SCHUELL GmbH, Dassel

Filterpapier

Fa.: SCHLEICHER & SCHUELL GmbH, Dassel

Typ: 595, Durchmesser 125 mm

Folien: Polyamid (außen) / Polyethylen (innen) 250 x 280 mm

Fa.: Weisser Maschinenbau & Großküchentechnik, Sasbach

Fritte, 4er, Porengröße 10-16 µm

Fa.: Jena Glas Scott Duran Mainz

HPLC

Pumpe: MERCK HITACHI, L-6200 Intelligent Pump

UV-Meter: MERCK HITACHI, 655A Variable Wavelength UV Monitor

Säule: MACHEREY-NAGEL, CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 HD Ser.No. 2065317

Schreiber: SHIMADZU, C-R5A Chromatopac

Impfbank

Fa.: GELAIRE FLOW LABORATOIRES

Typ: HF 72

Kugelmühle

Fa.: RETSCH GmbH & Co. KG, Haan

Typ: S100

Laborwaage

Fa.: SARTORIUS WERKE GmbH, Göttingen

Bez.: SARTORIUS portable

Typ: PT2100-000Vj

LC

Model EP-1 Econo Pump von BIO RAD

Model EM-1 Econo UV Monitor und Optics Module von BIO RAD

Model EV-1 Econo Buffer Selector von BIO RAD

Model 1327 Econo Recorder von BIO RAD

Model ES-1 Econo System Controller von BIO RAD

Säule: Hi LoadTM 16/60 SuperdexTM 76 prep grade

Sephadex: Lipophilic Sephadex LH-20, Bead size: 25-100µ, SIGMA-ALDRICH

Lichtmikroskop

Fa.: LEITZ WETZLAR

Typ: Diaplan

pH-Meter

Fa.: KNICK, Deutschland

Bez.: 765 Calimatic

Photometer

Fa.: PERKIN-ELMER GmbH, Düsseldorf

Bez.: LAMBDA 2 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER

Porosimeter

Fa.: QUANTACHROME

Typ: Poremaster 60

Präzisionswaage

Fa.: SARTORIUS WERKE GmbH, Göttingen

Bez.: 2842

Rotationsverdampfer

bestehend aus Büchi Waterbath B-480 und Büchi Rotavapor R-114

Fa.: BÜCHI LABORATORIUMS-TECHNIK AG, Flawil, Schweiz

Schütteltisch

Fa.: GERHARDT, Bonn

Typ: RO 10

Siebmaschine

Fa.: RETSCH GmbH & Co. KG, Haan

Typ: Vibrio

Soxhletapparatur (für die Ölgehaltbestimmung und zum Entölen)

bestehend aus Extraktionseinheit, Rückflusskühler und Rundkolben, 250 und 500 mL

SPE-Kammer

Fa.: Supelco

Typ: Preppy

SPE-Kartuschen

1. Chromabond C18 6ml/1000mg von Macherey-Nagel (Octadecyl-modifiziertes Gel)
2. Chromabond PA 6ml/1000mg von Macherey-Nagel (Polyamid 6)

Stomacher

Fa.: IUL INSTRUMENTS

Typ: Masticator

Surface Area Analyser

Fa.: MICROMERITICS

Typ: Gemini 2360

Tauchsieder

Fa.: JULABO LABORTECHNIK GmbH, Seelbach

Bez.: julabo PC4

Trockenschrank (zur Wassergehaltsbestimmung und zum Trocknen)

Fa.: HERAEUS GmbH, Hanau

Bez.: T 5042 E

Ultraschallgerät

Fa.: B. Braun Diesel Biotech Inc., Pennsylvania, USA

Bez.: Labsonic U

Vakuumpumpe

Fa.: SASKIA Hochvakuum- und Labortechnik GmbH, Ilmenau
Typ: MPC 050Z

Vakuumpackgerät

Fa.: VAC-STAR Verpackungsmaschinen AG, Bern, Schweiz
Bez.: VAC-STAR 2000 GST

Wasserbad

Fa.: KOTTERMANN, Hänigsen
Typ: 3044

Zentrifugalmühle

Fa.: RETSCH GmbH & Co. KG, Haan
Typ: ZM 100

Zentrifuge

Fa.: HERAEUS Kendro Laboratory Products, Osterode
Bez.: BIOFUGE primo R

Zentrifuge

Fa.: HERAEUS SEPATECH GmbH, Deutschland
Bez.: Biofuge A

Zuteilgerät

Fa.: RETSCH GmbH & Co. KG, Haan
Typ: DR 100/15-40

2.1.3 Mikroorganismen

Pilze

Alternaria solani

Systematische Stellung:

Reich:	<i>Protista</i>
Abteilung:	<i>Eumycota</i>
Unterabteilung:	<i>Deuteromycotina</i>
Klasse:	<i>Hyphomycetes</i>
Ordnung:	<i>Hyphomycetales</i>
Familie:	<i>Dematiaceae</i>
Gattung:	<i>Alternaria</i>
Art:	<i>Alternaria solani</i>



Abb. 2: *Alternaria solani*

Makroskopische Merkmale :

Grün-graues, gleichmäßig flach wachsendes Mycel

Temperaturoptimum:

25-27 °C

Mykotoxine:
Keine bekannt

Geographische Verbreitung:
Weltweit, besonders: Südeuropa, Nordweststaaten der USA, Südastralien, Indien, Afrika

Wirtskreis:
Arten der Familie der *Solanaceae* (Tomate, Kartoffel, Paprika und Eierfrüchte),
selten *Brassica*-Arten

Krankheitsbezeichnung:
Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel und Tomate

Symptome:
Braune, scharf begrenzte Blattflecken mit konzentrischen Ringen.
Vorzeitiges Absterben des Laubes. Faulige Stellen auf den
Knollen.



Abb. 3: *Alternaria solani* - Befall

Konventionelle Fungizide:
Kartoffel: Kupferoxychlorid (z. B. Fuguran[®])
Tomate: Dichlorfluanid (z. B. Euparen[®])
[24, 78]

Botrytis cinerea

Systematische Stellung:
Deuteromycotina, Hyphomycetes, Hyphomycetales, Moniliaceae

Makroskopische Merkmale:
Bauschiges, weiß-braun-grünliches Mycel

Temperaturoptimum:
21 °C

Mykotoxine:
keine bekannt

Geographische Verbreitung:
Weltweit in kühlen und wärmeren Regionen

Wirtskreis:
Weinrebe, Erdbeere, Himbeere, Gurke, Salat, Tomate,
Rot- und Weißkohl, Acker- und Buschbohne, Hopfen u. a.

Krankheitsbezeichnung:
Grauschimmel



Abb. 4: *Botrytis cinerea*

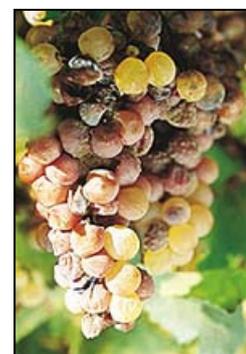


Abb. 5: *B.cinerea*-
Befall

Symptome:

Früchte sind von einem grauen Mycel bedeckt, typische Fäulnissymptome an der Pflanze

Konventionelle Fungizide:

Dichlorfluamid (z. B. Euparen®)

[24, 78]

*Ceratocystis fimbriata***Systematische Stellung:**

Ascomycota, Emdomycetes, Ascomycetidae, Ophiostomatales

Makroskopische Merkmale:

Flaches, regelmäßig schwarzes Mycel

Temperaturoptimum:

25 °C

Mykotoxine:

Keine bekannt

Geographische Verbreitung:

Tropen und Subtropen (Südamerika, Westafrika, Australien, Asien)

Wirtskreis:

Süßkartoffel, Zuckerrohr, Kaffee, Kautschuk

Krankheitsbezeichnung:

Schwarzfäule der Süßkartoffel, Kaffee- und Kakaokrebs, Platanenwelke

Symptome:

Typische Welke- bzw. Fäulnissymptome, schwarze Flecken auf Blattwerk und Früchten, welche sich teils im Speichergewebe fortsetzen

Konventionelle Fungizide:

Keine mit Zulassung in der EU (Stand 05.2003)

Bemerkung:

Dieser Pilz tritt im Pflanzenreich saprophytisch und parasitär, dies jedoch primär in den Tropen, in Erscheinung. Die Auswahl als Versuchsobjekt fand in diesem Fall vorrangig aus praktischen Gründen statt. (Hohe Wachstumsgeschwindigkeit, Sensibilität gegenüber Veränderungen des Substrates)

[64, 148]



Abb. 6: *Ceratocystis fimbriata*



Abb. 7: *C.fimbriata* - Befall

Fusarium culmorum

Systematische Stellung:
 Detreromycotina, Hyphomycetes, Tuberculariales,
 Tuberculariaceae

Makroskopische Merkmale:
 Weiß bis rosafarbenes, bauschiges junges Mycel, gelbliches altes Mycel

Temperaturoptimum:
 25 °C

Mykotoxine:
 Desoxinivalenol, Zearalenon, Trichothecene u. a.

Geographische Verbreitung:
 Weltweite Verbreitung

Wirtskreis:
 Getreide, Kartoffeln, Spargel, Nelken

Krankheitsbezeichnung:
 Fusarium-, Sämlings-, Fuß- und Ährenkrankheit

Symptome:
 Schlechte Samenentwicklung (Fehlstellen), allgemein gehemmttes Wachstum, braune Verfärbungen an Wurzel und Halmbasis, rosa Belag auf den Ähren

Konventionelle Fungizide:
 Carboxin + Prochloraz (z. B. Prelude UW[®])
 [78, 177]

Phytophthora infestans

Systematische Stellung:
 Mastigomycotina, Oomycetes, Pernosporales, Pythiaceae

Makroskopische Merkmale:
 Weißes, leicht bauschiges Mycel

Temperaturoptimum:
 18 °C

Mykotoxine:
 Keine bekannt



Abb. 8: *Fusarium culmorum*



Abb. 9: *F.culmorum*-Befall



Abb. 10: *Phytophthora infestans*

Geographische Verbreitung:
Weltweit

Wirtskreis:
Arten der Familie der *Solanaceae* (Tomate, Kartoffel und Eierfrüchte),
zudem zahlreiche Kräuter

Krankheitsbezeichnung:
Kraut- und Knollenfäule

Symptome:
Braune Flecken an Blattspitzen, weißer Belag an der Unterseite,
auf den Knollen braune Flecken, welche sich im Speichergewebe
fortsetzen



Abb. 11: *P. infestans*-
Befall

Konventionelle Fungizide:
Maneb (z. B. Trimangol®)
[21,24, 78]

Bakterien

Spezies	Hersteller	Spezifikation
<i>Escherichia coli</i>	DSM	V517
<i>Klebsiella terrigena</i>	DSM	2687
<i>Lactobacillus curvatus</i>	LBT	112
<i>Enterococcus durans</i>	DSM	20633
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM	291
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM	10

2.1.4 Enzyme

Name	Hersteller	Enzymart	pH- Optimum	Temperatur- optimum [°C]	Zeit [h]	Empfehlung des Herstellers
Olivex	NOVO NORDISK	Pektinasen Hemicellulasen Cellulasen	5,5	35	-	-
Laccase	ASA Spezial- enzyme GmbH	Phenoloxidase	-	30	-	-
Corolase LAP	AB ENZYMES GmbH	Exo-Proteinase	6-9	bis 70	-	Kombination mit einer Endo- Proteinase
Corolase 7089	AB ENZYMES GmbH	Endo- Proteinase	7-8	55	-	Kombination mit anderen Proteinasen

Name	Hersteller	Enzymart	pH-Optimum	Temperatur-optimum [°C]	Zeit [h]	Empfehlung des Herstellers
Rohapect CM	RÖHM ENZYME GmbH	Cellulase	8-9	50	-	Kombination mit Corolase 7089
Rohament CL	RÖHM ENZYME GmbH	Cellulase	4-5	50-60	2-3	Kombination mit Pektinasen
Rohavin CXL	RÖHM ENZYME GmbH	Pektinase, Cellulase	3,2	15-50	1-2	-
Rohapect MA plus	RÖHM ENZYME GmbH	Pektinase	-	25-30	1-2	sorgfältige Verteilung
Rohapect VR-C	RÖHM ENZYME GmbH	Proteasen Hemicellulase	-	18-50	-	-
Cellulast 1,5L FG	NOVO NORDISK	Cellulase	-	35	-	-
	FLUKA	Laccase (von <i>Trametes versicolor</i>)	-	25-30	-	-
	FLUKA	α -Amylase (von <i>Aspergillus oryzae</i>)	-	25-30	-	-
	FLUKA	Amyloglucosidase (von <i>Aspergillus niger</i>)	-	25-30	-	-

2.1.5 Chemikalien

- Acetonitril (Roth)
- Aceton (Merck)
- Agar-Agar, Pulver (Roepert)
- Aqua bidestillata
- Aqua distillata
- Borsäure (Merck)
- Bromocresol Grün (Merck)
- Butanol-(1) pro analysis (Merck)
- Calciumcarbonat, CaCO₃ (Merck)
- (+)-Catechin-Hydrat > 98 % (Fluka)
- Celite® 545 (Merck)
- Chloramphenicol (Fluka)
- Citronensäure, wasserfrei, zur Synthese (Merck)

- m-Cumarsäure > 98 % (Fluka)
- p-Cumarsäure > 98 % (Fluka)
- Dichlormethan zur Synthese (Merck)
- Diethylether zur Analyse (Merck)
- 3,4-Dihydroxybenzoesäure \geq 97 % (Fluka)
- EDTA (Merck)
- Eisen-III-Chlorid krist. rein (Merck)
- Epichlorhydrin, rein > 98%
- Essigsäure \geq 99 % (Fluka)
- Ethanol 70%, vergällt
- Ethanol 96%, vergällt
- Ethanol \geq 99,5 % (Merck)
- Ethanol LiChrosolv[®] gradient grade (Merck)
- Ethylacetat (Merck)
- Ferulasäure > 98 % (Fluka)
- Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Fluka)
- Fleischpepton, Pulver, pankreatisch verdaut (Roepert)
- Formaldehyd 36,5% (Riedel-de Haën[®])
- Gallussäure-Monohydrat > 98 % (Fluka)
- n-Hexan (Merck)
- p-Hydroxybenzoesäureethylester \geq 99 % (Sigma)
- 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure > 96% (Merck)
- *trans*-4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure \geq 99 % (Sigma-Aldrich)
- *trans*-o-Hydroxymtsäure > 97% (Aldrich)
- *trans*-p-Hydroxymtsäure > 98 % (Aldrich)
- Kaffeesäure ~ 97 % (Fluka)
- Kaliumhydroxid (Merck)
- Kjeldahl Tabletten (Merck)
- Magnesiumhydroxidcarbonat, MgHCO₃ (Riedel-de-Haën)
- Malzextrakt, Pulver (Extrakt Chemie)
- Methanol (Merck)
- Methanol Rotisol[®] HPLC (Roth)
- Methylrot (Merck)
- 2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat (MES) (Merck)
- Natriumhydroxidplättchen, NaOH, rein (Merck)
- Natriumcarbonat wasserfrei (Merck)
- Natronlauge 1mol/l (Merck)
- Natronlauge, Titrisol[®] 0,1mol/l (Merck)
- Oleuropein, ~ CHR (Roth)
- Petroleumbenzin, Siedebereich 60-80 °C p.a. (Merck)
- 1-Propranol zur Analyse (Merck)
- 2-Propanol purum \geq 99,0% (Fluka)
- Salpetersäure 65% (Merck)
- Salzsäure 32% (Merck)
- Salzsäure 1mol/l (Merck)
- Schwefelsäure 95 – 98%, reinst (Merck)
- Schwefelsäure 25% (Merck)
- Stickstoff (Air Products)

- Synthetische Luft (Air Products)
- Tannin p.a. (Fluka)
- Toluol p.a. (Merck)
- TRIS p.a. (Merck)
- Tyrosol $\geq 97\%$ (Fluka)
- Tween 80®* (Polyaethylenglycolsorbitanoleat) (Fluka) (*= Trademark of ICI Amerika Inc.)
- Vanillinsäure $>97\%$ (Fluka)
- V-8 Gemüsesaft (Krings)
- Wasserstoff (Air Products)
- Wasserstoffperoxid, H_2O_2 , 30 %, stabilisiert, zur Synthese (Merck)

2.2 Methoden

2.2.1 Chemische Rohmaterialeigenschaften

2.2.1.1 Wassergehalts des Oliventresters

Eine genau eingewogene Menge Oliventrester wird in einem Trockenschrank bei $102 \pm 2\text{ °C}$ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator wird der Wassergehalt durch Differenzwägung bestimmt [106].

$$W [\%] = \frac{(m_v - m_n)}{m_{TE}} \cdot 100\% \quad (4.9)$$

Wobei: W = Wassergehalt [%]

m_v = Gewicht von Keramischale und Einwaage vor dem Trocknen [g]

m_n = Gewicht von Keramischale und Einwaage nach dem Trocknen [g]

m_{TE} = Gewicht des eingewogenen Tresters [g]

2.2.1.2 Restölgehalt

Ungefähr 10 g getrockneter Oliventrester werden mit einer Präzisionswaage in eine Extraktionshülse eingewogen und für ca. 3 Stunden in einer Soxhlet-Apparatur mit Petrolether extrahiert. Anschließend wird das Extraktionsmittel in einem Rotationsverdampfer entfernt, der Glaskolben getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und mit einer Präzisionswaage gewogen. Der Restölgehalt O wird nach folgender Formel berechnet

$$O [\%] = \frac{(m_{S1} - m_{S2})}{m_{T\text{Rex}}} \cdot 100\%$$

Wobei: O = Restölgehalt [%]
 m_{S1} = Masse des Siedekolbens mit extrahiertem Restöl [g]
 m_{S2} = Masse des leeren Siedekolbens vor der Extraktion [g]
 m_{TRex} = Masse des extrahierten Tresters [g]

[106]

2.2.1.3 Proteingehalt

Chemikalien:

konz. Schwefelsäure, Kjeldahl Tabletten (Merck), 40%ige Natronlauge, 4%ige Borsäure, 0,1M Salzsäure, Indikator (0,3g Bromocresol Grün, 0,165g Methylrot in 500ml Ethanol)

Der Proteingehalt wird nach der Methode nach Kjeldahl ermittelt. Hierbei wird nach einem Mineralisierungsschritt gefolgt von einer Destillation der Gesamtstickstoffgehalt durch Titration bestimmt. Über den Konvertierungsfaktor 6,25 kann hieraus der Proteingehalt errechnet werden.

Es werden 3g getrockneter Trester zusammen mit 50ml Schwefelsäure und zwei Kjeldahl-Tabletten in einem 250ml-Rundkolben einer Kjeldahl-Apparatur vorgelegt. Das Gemisch wird erhitzt und so lange sieden gelassen bis eine klare Lösung vorliegt und der Protein-Aufschluss abgeschlossen ist. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung in einen 250ml Kolben überführt und mit dest. Wasser bis auf 250ml aufgefüllt. Von diesem Kolben werden 25ml Lösung in ein 100ml Kolben überführt und mit 25ml 40%iger Natronlauge versetzt, was zur Entstehung von Ammoniakgas führt. Dieser Kolben wird an eine Destillationsapparatur angeschlossen und das Gas wird in ein Auffanggefäß mit 50ml 4%iger Borsäure + Indikatorlösung geleitet. Diese Lösung wird mit 0,1M Salzsäure titriert, bis die Farbe von grün nach rosa umschlägt. Der Stickstoffanteil kann nach folgender Formel errechnet werden.

$$N[\%] = V \cdot 0,0014 \cdot \frac{100}{\frac{A}{10}}$$

mit V = Volumen an 0,1 molarer HCl
 A = Gewicht der Probe

Der Proteinanteil wird nach folgender Formel ermittelt.

$$Protein[\%] = N \cdot 6,25$$

[81, 106, 118]

2.2.1.4 Ballaststoffgehalt

Chemikalien:

Celite[®]545, Aceton, Ethanol 95%, Ethanol 78%, 6M Natronlauge, 0,56M Salzsäure, MES/TRIS-Pufferlösung (pH=8,3)

Der Gehalt an unlöslichen, löslichen Ballaststoffen und der Gesamtgehalt wird enzymatisch-gravimetrisch (nach §35 LMBG) ermittelt. Die einzelnen Fraktionen werden isoliert ausgefällt und gravimetrisch vermessen [6].

1g getrockneter und entfetteter Oliventrester wird mit 40ml MES/TRIS-Pufferlösung versetzt, mit einem Magnetrührer gemixt und im Wasserbad auf 96°C erhitzt. Um die Stärke zu entfernen wird das Gemisch mit 100µl α-Amylase-Lösung versetzt. Nach 30 Minuten wird die Lösung auf 60°C abgekühlt und es werden 100µl Protease-Lösung zur Proteinzersetzung hinzugegeben. Nach weiteren 30 Minuten Rühren werden 5ml Salzsäure (0,56M) hinzugegeben und der pH-Wert mit 6 molarer Natronlauge auf einen Wert zwischen 4,0 und 4,7 eingestellt. Verbleibende Stärke wird durch die Zugabe von 300µl Amyloglucosidase-Lösung (bei 60°C) abgebaut.

Nach dem enzymatischen Abbau wird die abgekühlte Lösung mittels Vakuumpumpe durch einen Filtertiegel gesaugt, der mit 1g getrocknetem (über Nacht bei 103°C) Celite[®]545 befüllt ist. Das Becherglas wird 2 mal mit 10ml 70°C heißem Wasser nachgespült, um sicherzustellen, dass alle Rückstände in den Tiegel gelangen. Nachdem die Rückstände im Filter 2 mal mit 15ml Ethanol (95%) und 15ml Aceton (78%) gewaschen wurden, wird der Filtertiegel bei 103°C für 16 Stunden getrocknet und erneut gewogen.

Das erhaltene Filtrat wird gewogen und es wird die vierfache Menge an 60°C heißem Ethanol zugefügt, um die löslichen Ballaststoffe auszufällen. Nach 1 Stunde wird diese Lösung filtriert und der Filtrerrückstand wird 3 mal mit 15ml Ethanol (78%), 2 mal mit 10ml Ethanol (95%) und 3 mal mit 10ml Aceton gewaschen. Der Filtrerrückstand wird über Nacht bei 103°C getrocknet. Das Gewicht des Rückstandes abzüglich des Gewichts an Protein und Asche machen den Anteil an löslichen Ballaststoffen aus.

Der Gehalt an unlöslichen Ballaststoffen kann anhand der folgenden Gleichung ermittelt werden:

$$\% - DF = \frac{\frac{m_{R1} + m_{R2}}{2} - m_P - m_A - m_B}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \cdot 100$$

mit	m_{R1}, m_{R2}	Gewicht des Rückstandes [mg]
	m_P	Gewicht des im Rückstand enthaltenen Protein [mg]
	m_A	Gewicht der im Rückstand enthaltenen Asche [mg]
	m_B	Blindwert [mg]

mit	$m_B = \frac{m_{R1-blind} + m_{R2-blind}}{2} - m_{P-blind} - m_{A-blind}$
-----	---

m_1, m_2	Gewicht der Probe [mg]
------------	------------------------

Fraktionierte Extraktion zur Ballaststoff-Analyse

Chemikalien:

0,1M Natriumphosphat-Puffer (pH=7,5), 0,2% EDTA (pH=3,3), Ethanol, 24%iges Kaliumhydroxid (p.a.>86%), 0,1M Acetat Puffer (pH=4,0), 17,5 %ige Natronlauge, 20%ige Salzsäure, essigsäure Natriumchlorid-Lösung (100ml Wasser, 2g NaCl, 5ml Essigsäure)

Der Anteil an Cellulose, Hemicellulose und Lignin wird bestimmt, indem die verdaulichen Kohlenhydrate und Protein enzymatisch und chemisch in Lösung gebracht werden und die unverdaulichen Rückstände filtriert und gravimetrisch quantifiziert werden. Für diese Analyse-Methode ist es wichtig mit Probenmaterial zu arbeiten, das gut getrocknet, entfettet und fein gemahlen ist.

1g Probe wird in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 20ml Natriumphosphat-Puffer (pH=7,5) und 50µl Protease-Lösung versetzt und für 2 Stunden auf 37°C gehalten. Danach wird die Lösung filtriert und der Protein-freie Rückstand wird mit EDTA versetzt und 1 Stunde lang auf 85°C gehalten, um das lösliche Pektin zu extrahieren. Danach folgt erneut ein Filtrationsschritt.

Zu dem erhaltenen Rückstand werden 30ml Acetat-Puffer und 0,2ml Pectinase-Lösung gegeben, um die verbleibenden Pektine zu entfernen. Nach 2,5h bei 25°C wird die Lösung filtriert und der Filtrerrückstand getrocknet und gewogen.

Um das Lignin zu entfernen werden 40ml essigsäure Natriumchlorid-Lösung zugegeben und das Gemisch wird eine Stunde bei 75°C gerührt. Danach wird eine Filtration durchgeführt und der Rückstand wird mit destilliertem Wasser und Ethanol gewaschen bevor er 16 Stunden lang bei 50°C getrocknet und dann gewogen wird. Aus der Gewichts-differenz ergibt sich der Lignin-Anteil.

Der Lignin-freie Rückstand wird für jeweils 2 Stunden bei 15°C mit 15 ml Kaliumhydroxid-Lösung (24%) und mit Natronlauge (17,5%) extrahiert. Der Rückstand der anschließenden Filtration ergibt den Cellulose-Anteil (unter Berücksichtigung des Asche-Gehaltes).

Das Filtrat wird mit 20%iger Salzsäure auf den pH-Wert 5,0 eingestellt und mit dem 5fachen Volumen an Ethanol versetzt. Die ausfallende Hemicellulose wird abfiltriert, mit 45ml 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und gewogen [81, 118].

2.2.1.5 Aschegehalt

Die eingewogene Probenmenge wird im Muffelofen bei ca. 525°C verascht, dann im Exsikkator abgekühlt und erneut gewogen. Aus der Gewichts-differenz lässt sich der Aschegehalt errechnen [106].

$$\text{Asche}[\%] = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1} \cdot 100$$

mit W_1 = Gewicht des leeren Veraschungstiegels
 W_2 = Gewicht des Veraschungstiegels und der Probe vor dem Veraschen
 W_3 = Gewicht des Veraschungstiegels und der Asche

2.2.1.6 Gesamtpolyphenolkonzentration

Getrockneter Oliventrester wird in der Zentrifugalmühle (1 mm Siebeinsatz) vermahlen. 20g des vermahlenden Tresters werden mit 100ml Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1) versetzt und 2 Stunden gerührt. Danach wird der Extrakt per Filtration von dem Trester getrennt und die Feststoffe werden sukzessiv 3 weitere Male der Extraktion unterworfen.

Die Polyphenolkonzentrationen der Extrakte werden nach der photometrischen Methode nach Folin-Ciocalteu ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Über die Konzentrationen der 4 Extrakte lässt sich der Polyphenolanteil im getrockneten Oliventrester ermitteln, indem die absoluten Mengen der Polyphenole in den Extrakten auf die Tresterleinwage bezogen werden.

$$\text{Phenolanteil} = \frac{\sum_{i=1}^4 c_i \cdot V_i}{m_{\text{Trester}}}$$

mit c_i = Polyphenolkonzentration im Extrakt der i-ten Extraktion
 V_i = Volumen des Extraktionsmittels der i-ten Extraktion
 m_{Trester} = Einwage des Oliventresters

2.2.1.7 pH-Wert

10g getrockneter, gemahlener, entfetteter Oliventrester werden mit 100ml destilliertem Wasser versetzt und mind. 30 Minuten mit einem Magnetrührer gemixt. Der pH-Wert wird mittels pH-Meter bestimmt. Zusätzlich wird überprüft, welche Molmengen an Salzsäure bzw. Natronlauge notwendig sind, um den pH-Wert dieser Lösung um 2 Einheiten zu senken bzw. zu erhöhen. Durch den Vergleich der notwendigen Stoffmengen an Säure und Lauge mit den Mengen, die nötig wären, um denselben pH-Sprung in reinem Wasser zu bewirken kann man Aussagen über die Puffereigenschaften des Tresters treffen.

2.2.2 Physikalische Rohmaterialeigenschaften

2.2.2.1 Vermahlung und Fraktionierung

Die Vermahlungseigenschaften des Tresters werden sowohl mit einer Zentrifugalmühle als auch mit einer Kugelmühle untersucht. Der Einsatz der Kugelmühle lässt eine Nassvermahlung zu. Anzahl der Mahlkugeln und Drehzahl des Mahlbeckers können variiert und deren Einfluss auf das Zerkleinerungsergebnis ermittelt werden.

Für den Einsatz der Zentrifugalmühle muss der Oliventrester getrocknet werden. Um die thermische Belastung möglichst gering zu halten wird der Trester für ca. 24 Stunden bei 65°C in dünner Schicht im Trockenschrank getrocknet.

Eine auf die Vermahlung folgende Siebklassierung ermöglicht die Aufteilung in definierte Partikelgrößefraktionen. Diese können separat auf ihren Gehalt an Polyphenolen bzw. ihre Extrahierbarkeit untersucht werden.

2.2.2.2 Wahre Dichte

Die Dichte von vermahlenem Oliventrester wird pyknometrisch nach der Methode von Gay-Lussac bestimmt. Hierbei wird die Verdrängung von Flüssigkeit durch die eingetauchten Feststoffe gemessen.

Ein leeres Pyknometer wird gewogen (m_P), dann mit Oliventrester befüllt und erneut gewogen (m_{P+S}). Die Gewichts Differenz stellt das Probengewicht m_S dar. Das mit Trester befüllte Pyknometer wird mit Hexan aufgefüllt und nochmals gewogen (m_{P+S+H}). Schließlich wird das Pyknometer lediglich mit Hexan befüllt und gewogen (m_{P+H}).

Die Dichte von Luft ($\rho_A = 0,0012 \text{ g/cm}^3$) und Hexan ($\rho_H = 0,712 \text{ g/cm}^3$) sind bekannt. Somit kann die Dichte der Probe durch folgende Formel ermittelt werden [106].

$$\rho_T = (\rho_H - \rho_A) \cdot \frac{m_S}{m_S - (m_T - m_H)} + \rho_A$$

mit

$$m_T = m_{P+S+H} - m_{PA}$$

$$m_H = m_{P+H} - m_P$$

2.2.2.3 Scheinbare Dichte und Porosität

Die scheinbare Dichte und Porosität wird durch das Porosimeter „Poremaster 60“ ermittelt. Das Gerät arbeitet nach dem Quecksilber Intrusions Prinzip nach DIN 66133.

Für die Analyse werden ca. 0,5 g getrockneter, vermahlener Oliventrester der Partikelgrößenfraktion von 0,125mm bis 0,355mm Durchmesser benötigt.

2.2.2.4 Wasserbindungskapazität

Die Wasserbindungskapazität wird durch die Zentrifugationsmethode nach Weber ermittelt. Getrocknetes Probenmaterial (300mg) wird in einem Zentrifugenröhrchen mit 10ml destilliertem Wasser versetzt und bei Raumtemperatur für 24 Stunden auf dem Schütteltisch bewegt. Dann werden die Proben bei 8000 upm für 20 Minuten zentrifugiert. Nachdem der flüssige Überstand vorsichtig entfernt worden ist wird das Gewicht des feuchten Probenmaterials ermittelt [176].

Die Wasserbindungskapazität WBC wird ausgedrückt in g Wasser pro g trockenes Probenmaterial und wird berechnet durch folgende Formel:

$$WBC = \frac{m_2 - m_1}{m_S}$$

mit

$$m_1 = \text{Gewicht des Zentrifugenröhrchens}$$

$$m_2 = \text{Gewicht des Zentrifugenröhrchens + geschwollenes Probenmaterial}$$

$$m_3 = \text{Gewicht des Probenmaterials}$$

2.2.2.5 Schwellungskapazität

Die Schwellungskapazität wird nach der „bed volume“ Methode nach Weber ermittelt. 500mg getrocknetes Probenmaterial (F_D) werden in einen Messzylinder gefüllt. Der Messzylinder wird mit 5ml destilliertem Wasser befüllt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Volumen der aufgeschwollenen Probe V_{SW} wird an der Skala des Messzylinders abgelesen [176].

Die Schwellungskapazität SC wird durch die folgende Gleichung berechnet:

$$SC = \frac{V_{SW}}{F_D}$$

2.2.2.6 Spezifische Oberfläche

Zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche wird der Surface Area Analyser „Gemini 2360“ (Micromeritics Instrument Corporation) mit StarDriver Software genutzt. Gemini 2360 arbeitet nach der BET-Methode DIN 66131, wobei die volumetrische Stickstoff-Adsorption bei 77K gemessen wird. Für die Analyse werden ca. 2 g getrocknetes Probenmaterial einer definierten Partikelgröße benötigt [33, 108].

2.2.3 Analytik

2.2.3.1 Gesamt-Polyphenolbestimmung

Für die Gesamtphenolbestimmung wird das Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz von Singleton und Rossi genutzt. Dieses bewirkt bei Vorhandensein phenolischer Substanzen eine Farbreaktion. Im Spektralphotometer kann die Lichtabsorption gemessen werden, welche mit der Phenolkonzentration korreliert. Für das Projekt wurde die Vorgehensweise nach Tanner und Brunner modifiziert [127, 159]. Optimierungen wurden hinsichtlich Wellenlänge, Reaktionszeit und Bezugssubstanz durchgeführt. Auf die Optimierungsarbeit wird in diesem Bericht nicht näher eingegangen.

Die Vorgehensweise sieht wie folgt aus (bei der Verwendung von 1ml Messküvetten):

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
destilliertes Wasser	840 μ L beim Reagenzienblindwert 850 μ L
Probe	10 μ L
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz	50 μ L
Proben sorgfältig mischen und 3-8 Minuten warten	
gesättigte Na_2CO_3 -Lösung	100 μ L
Proben sorgfältig mischen	
Messung der Absorption nach einer Stunde Wartezeit bei 720 nm	

Als Bezugssubstanz für die Konzentrationsberechnung wurde teils Tannin teils Oleuropein gewählt. Bei der Konzentrationsbestimmung von Standardlösungen (mit bekannten Konzentrationen) von folgenden phenolischen Substanzen hat die Verwendung von Tannin als Bezugssubstanz im Mittel sehr genaue Ergebnisse und Wiederfindungen ergeben.

<u>Substanz</u>
Catechin
m-Cumarsäure
p-Cumarsäure
3,4-Dihydroxybenzoesäure
Ferulasäure
Gallussäure
p-Hydroxybenzoesäureethylester
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure
<i>trans</i> -4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure
<i>trans</i> -o-Hydroxyzimtsäure
<i>trans</i> -p-Hydroxyzimtsäure
Kaffeesäure
Oleuropein
Olivenblätterextrakt
Tannin
Tyrosol
Vanillinsäure

Aufgrund der guten Wiederfindung wird für Versuche zur Extraktionsausbeute-Optimierung die Tannin Eichkurve zugrunde gelegt.

Laut Literatur kann man davon ausgehen, dass Oleuropein die mengenmässig vorherrschende phenolische Substanz im Oliventrester ist. Daher ist es sinnvoll, die Gesamtphenolfraction des Oliventresters als Oleuropein-Äquivalenz zu berechnen. Aus diesem Grund wird z.B. bei mikrobiologischen Versuchen die Oleuropein-Eichkurve zur Konzentrationsbestimmung genutzt.

Die genannten Eichgeraden und die dazugehörigen Geradengleichungen sind im Folgenden dargestellt:

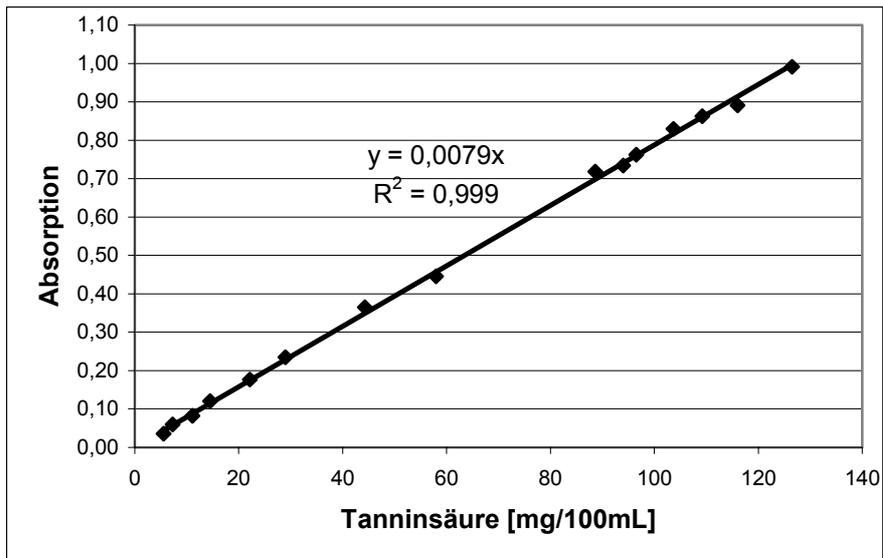


Abb. 12: Tannin-Eichgerade

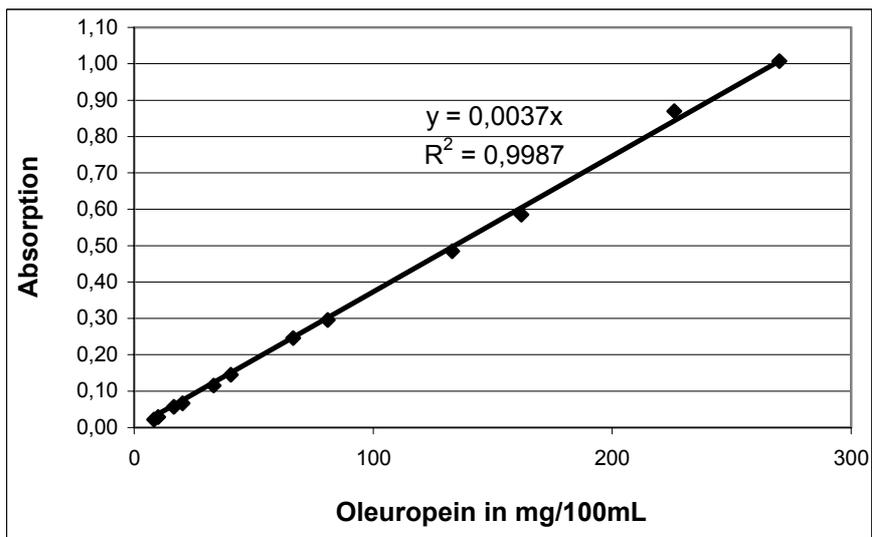


Abb. 13: Oleuropein-Eichgerade

2.2.3.2 Einzelsubstanz-Analytik

2.2.3.2.1 Dünnschichtchromatographie

Mit der Dünnschichtchromatographie lassen sich Substanzen qualitativ nachweisen und es können charakteristische Muster von Substanzspektren identifiziert werden. Außerdem wird die Dünnschichtchromatographie durchgeführt, um ein geeignetes Laufmittel für die Säulenchromatographie zu finden. Die Ergebnisse der DC lassen sich auf diese übertragen; sie gilt als Pilot-Technik zur Entwicklung säulen-chromatographischer Trennungen [150].

Die Proben werden mit einer Kapillare in unterschiedlichen Konzentrationen ein- oder zweifach im Abstand von 2 cm vom unteren Rand der DC-Platten aufgetragen. Bei zweimaliger Auftragung wird abgewartet, bis das Lösungsmittel des ersten Flecks verdampft ist. Nachdem das gesamte Lösungsmittel verdampft ist, wird die Probestelle markiert. Die Platte wird in eine Glaskammer gestellt, deren Boden mit der mobilen Phase bedeckt und die mit Lösungsmitteldämpfen gesättigt ist. Dabei wird ein direkter Kontakt zwischen Lösungsmittel und Probe vermieden. Die Entwicklung findet bei Zimmertemperatur unter dem Abzug statt. Die Platte wird aus der Kammer entfernt, wenn die mobile Phase 10 bzw. 12 cm auf der Platte zurückgelegt hat. Nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, wird die Platte mit wässriger 1%iger Eisen-III-chloridlösung besprüht. Dabei ergeben sich dunkle Flecke. Hergestellt wird diese Lösung mit 1 g FeCl₃, das in einem Glaskolben mit Schliff mit Aqua bidestillata ad 100 ml aufgefüllt wird. Die Lösung wird geschüttelt und danach in eine Sprühflasche überführt.

Als Proben werden 0,03 g Oleuropein in 0,6 ml Ethanol (OE) gelöst. 0,02 g werden in 0,4 ml Methanol (OM) gelöst.

Zur Optimierung des Lösungsmittels für den Olivenblätterextrakt werden je 0,1 g Olivenblätterextrakt in je 2 ml Methanol (Met), Ethanol (Eth), vergälltem Ethanol (Ethver) bzw. Isopropanol (Iso) gelöst. Die Isopropanollösung wird anschließend filtriert.

Zur Optimierung des Laufmittels für die HPLC und LC werden verschiedene mobile Phasen in unterschiedlichen Zusammensetzungen getestet. Dabei werden die Kammern mit den in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungsmitteln gesättigt.

Lösungsmittel A	Lösungsmittel B
Ethanol	
vergällter Ethanol	
Isopropanol	
1-Propanol	
Butanol-1	
Methanol	
Ethylacetat	
Methylenchlorid	
80% Wasser	20% Acetonitril*
70% Wasser	30% Acetonitril*
30% Wasser	70% Methanol*
95% Toluol	5% Diethylether
50% Isopropanol	50% Methanol
70% Isopropanol	30% Methanol
80% Isopropanol	20% Methanol
90% Isopropanol	10% Methanol

*Lösungsmittel nach CAPASSO1992 [36].

Zur Beurteilung der DC wird der Retentionsfaktor (R_F -Wert) herangezogen. Er ist definiert als $R_F = d_R/d_M$, wobei d_R und d_M lineare Entfernungen von der Startlinie sind. d_R ist der Abstand des Mittelpunktes des Flecks zur Startlinie, d_M der Abstand der Laufmittelfront zur Startlinie. R_F -Werte können variieren zwischen 1 für nichtretardierte Substanzen und annähernd Null.

Für die Laufmittel 1-Butanol, Ethanol, vergällter Ethanol, Isopropanol, Methanol und 1-Propanol werden je 2 Platten entwickelt. Das Auftragsschema auf die DC-Platten ist wie folgt:

1. DC-Platte	Iso:2x	Iso:1x	OM:2x	OM:1x	Met:2x	Met:1x
2. DC-Platte	Eth:2x	Eth:1x	OE:2x	OE:1x	Ethver:2x	Ethver:1x

wobei bedeutet:

Iso: Olivenblätterextrakt gelöst in Isopropanol
 OM: Oleuropein gelöst in Methanol
 Met: Olivenblätterextrakt gelöst in Methanol
 Eth: Olivenblätterextrakt gelöst in Ethanol
 OE: Oleuropein gelöst in Ethanol
 Ethver: Olivenblätterextrakt gelöst in vergälltem Ethanol

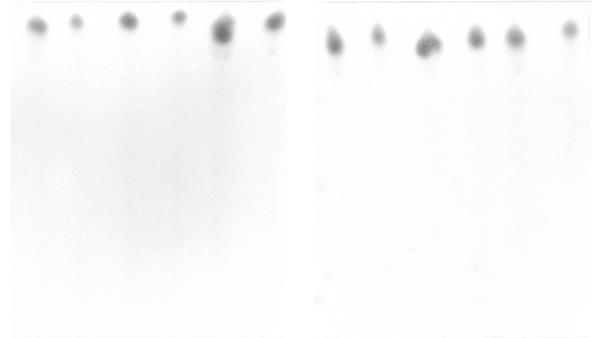
ferner

bedeutet 2x, dass die Probe zweifach aufgetragen wurde
 und 1x, dass sie einfach aufgetragen wurde

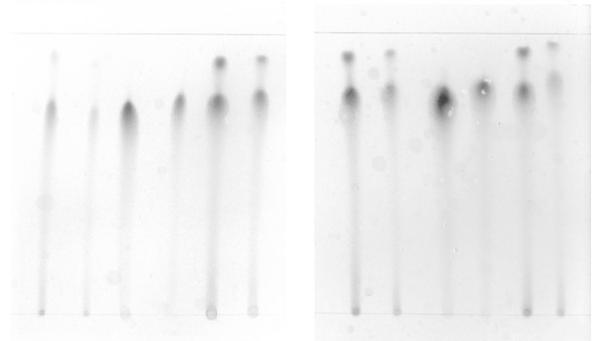
In der folgenden Tabelle sind die Resultate der DC zusammengestellt:

Laufmittel	Lauf- länge u. -Dauer	Probe	R _F -Werte	1. DC						2. DC			
				Iso:2x	Iso:1x	OM:2x	OM:1x	Met:2x	Met:1x	Eth:2x	Eth:1x	OE:2x	OE:1x
1-Butanol	10 cm 4,0 h	Eth	0,62 u. 0,91										
		Ethver	0,64 u. 0,93										
		Iso	0,62 u. 0,90										
		Met	0,64 u. 0,91										
		OE	0,67										
		OM	0,65										
Ethanol	12 cm 2,3 h	Eth	0,82 u. 0,86										
		Ethver	0,83 u. 0,86										
		Iso	0,87										
		Met	0,86 u. 0,89										
		OE	0,80										
		OM	0,86										
Vergällter Ethanol	12 cm 2,4 h	Eth	0,84 u. 0,89										
		Ethver	0,86 u. 0,89										
		Iso	0,83										
		Met	0,81 u. 0,87										
		OE	0,81										
		OM	0,83										
Isopropanol	10 cm 3,0 h	Eth	0,75 u. 0,90										
		Ethver	0,80 u. 0,92										
		Iso	0,80 u. 0,91										
		Met	0,80 u. 0,88										
		OE	0,74										
		OM	0,77										

Methanol	12 cm	Eth	0,90
	1,2 h	Ethver	0,91
		Iso	0,94
		Met	0,93
		OE	0,89
		OM	0,95



1-Propanol	10 cm	Eth	0,78 u. 0,92
	2,4 h	Ethver	0,82 u. 0,95
		Iso	0,73 u. 0,91
		Met	0,77 u. 0,90
		OE	0,81
		OM	0,74



Für jede Probe liegen zwei d_R -Werte vor, da jede Probe ein- und zweifach aufgetragen wurde. Aus diesen beiden Werten wird jeweils das arithmetische Mittel berechnet und daraus der R_F -Wert.

Das Auftragsschema für Methylenchlorid und Ethylacetat ist wie folgt:

OM:2x OM:1x Iso:2x Iso:1x

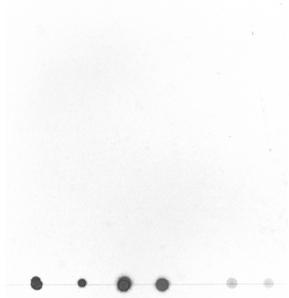
Laufmittel	Lauf- länge u. -Dauer	Probe	R _F -Werte	DC			
				OM:2x	OM:1x	Iso:2x	Iso:1x
Methylen- chlorid	10 cm ≈ 7 h	OM Iso	0 0				
Ethylacetat	10 cm ≈ 7 h	OM Iso	- -				

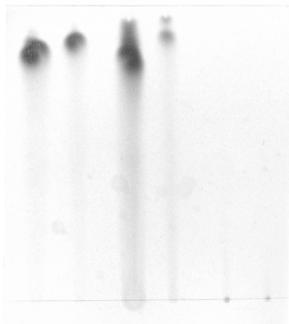
Bei dem Laufmittel Methylenchlorid löst sich die Probe nicht von der Grundlinie ab, d.h. sie läuft nicht.

Bei dem Laufmittel Ethylacetat laufen die Proben zwar, jedoch lediglich 1,8 bis 2 cm weit und es kommt zum *Tailing*, nicht zur Trennung.

Das Auftragsschema für die Gemische aus Wasser/Acetonitril und Wasser/Methanol, Toluol/Diethylether und Isopropanol/Wasser ist wie folgt:

OM:2x OM:1x Met:2x Met:1x Trester:2x Trester:1x

Laufmittel- gemisch	Lauf- länge u. -Dauer	Probe	R _F -Werte	DC					
				OM:2x	OM:1x	Met:2x	Met:1x	Trester:2x	Trester:1x
Wasser*: Acetonitril 80:20	10 cm ≈ 5 h	OM Met Trester	- - -						
Wasser*: Acetonitril 70:30	10 cm ≈ 5 h	OM Met Trester	- - -						
Wasser*: Methanol 30:70	10 cm 1,6 h	OM Met Trester	0,97 0,97 -						
Toluol: Diethylether 95:5	10 cm 0,6 h	OM Met Trester	0 0 0						

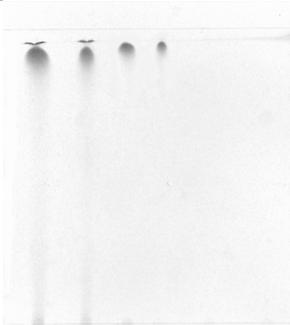
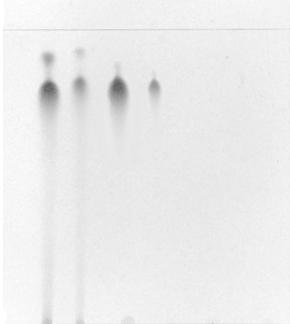
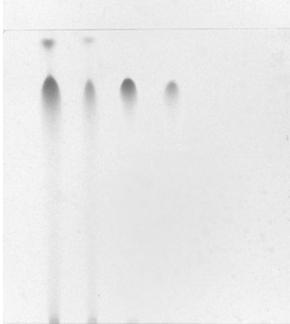
Laufmittel- gemisch	Lauf- länge u. -Dauer	Probe	R _F -Werte	DC					
				OM:2x	OM:1x	Met:2x	Met:1x	Trester:2x	Trester:1x
Isopropanol: Methanol 50:50	10 cm 1,8 h	OM Met Trester	0,87 0,86 u. 0,94 0						

*Lösungsmittel nach CAPASSO [36].

Bei den Laufmittelgemischen aus Wasser und Acetonitril dauert es sehr lange, bis 10 cm durchlaufen sind, nämlich etwa 5 h. Ferner kommt es zu keinem Ergebnis, da die Probe zerläuft, kein Fleck auszumachen und somit auch kein R_F-Wert berechenbar ist.

Das Auftragsschema für verschiedene Gemische aus Isopropanol/Methanol ist wie folgt:

Eth:2x Eth:1x OM:2x OM:1x

Isopropanol: Methanol	Lauf- länge u. -Dauer	Probe	R _F -Werte	DC			
				Eth:2x	Eth:1x	OM:2x	OM:1x
70:30	10 cm 2,0 h	Eth OM	0,91 0,94				
80:20	10 cm 2,0 h	Eth OM	0,79 u. 0,91 0,81				
90:10	10 cm 2,0 h	Eth OM	0,8 u. 0,95 0,8				

Getestet wurden also unterschiedliche Lösungsmittel. Völlig ungeeignet waren die Mischungen Wasser:Acetonitril 80:20 und 70:30, da sich dabei keinen auswertbaren Flecke auf der DC-Platte ergaben. Vielmehr zerlief die Probe, Flecken waren nicht zu erkennen, also auch keine einzelnen Probenbestandteile auszumachen. Die Laufmittel wurden nach CAPASSO [36] angewendet, allerdings konnten aus Kostengründen nicht die entsprechenden Platten eingesetzt werden. Ebenso ungeeignet waren Methylenchlorid und die Mischung Toluol:Diethylether 95:5, da sich in diesen Fällen die Proben nicht von der Grundlinie lösten.

Im Fall von Ethylacetat lösten die Proben sich zwar von der Grundlinie, wanderten aber nicht weit genug und es kam zu *Tailing*; also ist auch dieses Laufmittel ungeeignet. Im Falle von reinem Methanol, Ethanol, vergälltem Ethanol und den Mischungen Wasser:Methanol 30:70 sowie Isopropanol:Methanol 70:30 und 50:50 wanderten die Proben zu schnell. So kam es nicht zu einer Trennung der Olivenblätterextrakt-Bestandteile. Also sind auch diese als Laufmittel ungeeignet. Zu einer Trennung kam es bei folgenden Laufmitteln: 1-Butanol, Isopropanol, 1-Propanol sowie den Mischungen Isopropanol:Methanol 80:20 und 90:10. Die beste Trennung ergab sich bei Butanol, denn die beiden sich ergebenden Flecke liegen weit auseinander, mithin auch die R_F -Werte. Jedoch hatte es auch die längste Laufdauer. Die Ergebnisse von Isopropanol und 1-Propanol sind vergleichbar gut. Um die Laufzeit zu verkürzen, wurde Isopropanol mit Methanol gemischt. Das beste Ergebnis lieferte dabei die Mischung Isopropanol:Methanol 90:10. Diese Mischung wurde daher als Laufmittel für die Sephadex-Säule (LC) verwendet.

Beim Olivenblätterextrakt kam es mit der DC zwar meist zur Trennung des Substanzgemisches, jedoch entstanden lediglich zwei Fraktionen. Laut Analysezertifikat sind aber 14 verschiedene Polyphenole enthalten. Anhand der R_F -Werte kann bestimmt werden, welcher Fleck das Oleuropein darstellt. Wenn es zu einer Trennung kommt, ist immer der zweite Fleck das Oleuropein, da dieser einen ähnlichen R_F -Wert besitzt wie das reine Oleuropein, das als Standard mitlief. Ob das Oleuropein in Methanol oder Ethanol gelöst ist, hat keinen Einfluss auf die Lauflänge, da manchmal das in Methanol gelöste weiter läuft und manchmal das in Ethanol gelöste. In den meisten Fällen war es so, dass die einfach aufgetragene Probe weiter lief als die doppelt aufgetragene. Dies kann daran liegen, dass weniger Probenmaterial transportiert werden musste.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Dünnschichtchromatographie aufgrund der sehr schlechten Auftrennung der Polyphenole nicht als zufriedenstellende Methode zur Identifizierung einzelner Substanzen zur Charakterisierung des Polyphenolspektrums genutzt werden kann.

2.2.3.2.2 HPLC

Die Analyse von Polyphenolen erfolgt heute überwiegend mit einem Gradientenprogramm an einer RP-Säule.

Als Laufmittel A wird mit Essigsäure auf pH 3,1 eingestelltes Aqua bidestillata verwendet. Als Laufmittel B dient reines Methanol. Beide Laufmittel werden in gereinigte Flaschen abgefüllt und anschließend im Ultraschallbad für mindestens 15 min behandelt, um Luftblasen zu entfernen. Das verwendete Gradientenprogramm (nach Montedoro) lautet wie folgt [109]:

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	95	5
2	95	5
10	75	25
20	60	40
30	50	50
40	0	100

Nachdem das Gradientenprogramm beendet ist, wird mit Methanol gereinigt, bis die Grundlinie wieder gerade verläuft, also kein Peak mehr angezeigt wird.

Ferner werden verschiedene isokratische Laufmittel getestet.

Laufmittel A	Laufmittel B
100% Wasser*	
100% Acetonitril	
100% Methanol	
50% Methanol	50% Wasser*
10% Methanol	90% Wasser*
5% Methanol	95% Wasser*
2% Methanol	98% Wasser*
21% Acetonitril	79% Wasser*
21% Methanol	79% Wasser*
38% Methanol	62% Wasser mit 1% Essigsäure

*Mit 0,1 M H₃PO₄ auf pH 3 eingestellt.

Für den Aufbau der HPLC-Analytik werden folgende Lösungen verwendet:

- Oleuropein-Lösung: 0,002 g Oleuropein werden in 10 ml Methanol gelöst, davon werden jeweils 20 µl als Probe eingespritzt.
- Olivenblätterextrakt: 0,02 g Olivenblätterextrakt werden in 40 ml Methanol gelöst, durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert und 20 µl davon als Probe in die HPLC eingespritzt.
- wässriger Oliventresterextrakt: 1 Teil Trester wird mit 3 Teilen Wasser bei 100°C extrahiert. Danach wird der Trester abfiltriert und das Filtrat bei 13 000U/min für 10min zentrifugiert. Die Lösung wird mit Unterdruck durch eine 4er Fritte gezogen und 1:1 bzw. 1:4 mit Aqua bidestillata verdünnt. Es werden je 20 µl als Probe in die HPLC eingespritzt.

Die HPLC Parameter wurden wie folgt eingestellt:

Wellenlänge: 280 nm
 Verstärkung: 0,0025
 Flussgeschwindigkeit: 1,0 ml/min
 Probenvolumen: 20 µl
 Laufmittel: variabel

Beim der Verwendung des Gradientenprogramms kam es zu „Geisterpeaks“, die nicht eliminiert werden konnten. Vor diesem Hintergrund wird die Verwendung eines isokratischen Laufmittels vorgezogen.

Für die Bestimmung des Oleuropeins stellte sich als günstigste Mischung 38% Methanol und 62% Wasser mit 1% Essigsäure heraus. Wegen der hohen Viskosität dieses Gemischs ist jedoch der Rückdruck zu hoch, so dass nur langsamere Flussgeschwindigkeiten genutzt werden können. Durch Zumischen von Acetonitril wird der Rückdruck gesenkt. Dabei muss beachtet werden, dass sich der Polaritätsparameter der Mischung nicht ändert. Dieser ist ein

Maß für die Stärke des Lösungsmittels. Der Polaritätsparameter der mobilen Phase berechnet sich wie folgt [107]:

$$P'_{\text{Mischung}} = P'_{\text{Methanol}} \varphi_{\text{Methanol}} + P'_{\text{Wasser}} \varphi_{\text{Wasser}}$$

mit P' = Polaritätsparameter, wobei P'_1 und P'_2 die jeweiligen Polaritätsparameter der beiden Lösungsmittel sind, hier P'_1 Methanol und P'_2 Wasser. φ_1 und φ_2 sind ihre Volumenanteile.

$$P'_{\text{Mischung}} = 2,6 \cdot 0,38 + 0 \cdot 0,62 = 0,988$$

Bei Methanol:Wasser 38:62 kann nur eine Flussgeschwindigkeit von höchstens 1 ml/min eingestellt werden, da bei einer Erhöhung der Druck zu hoch wird und die Schläuche abplatzen bzw. Dichtungen undicht werden. Um die Flussgeschwindigkeit erhöhen zu können, wird das Gemisch auf Acetonitril umgerechnet, da Methanol eine höhere Viskosität hat und diese mit Acetonitril herabgesetzt wird. P' soll konstant gehalten werden.

$$\varphi_{\text{Acetonitril}} = P'_{\text{Mischung}} : P'_{\text{Acetonitril}} = 0,988 : 3,2 = 3,08 \approx 3,1$$

Es ergibt sich eine Mischung aus 31% Acetonitril und 69% Wasser. Es soll eine Mischung hergestellt werden, die sowohl Methanol als auch Acetonitril enthält. Die mobile Phase ist somit eine 1:1 Mischung der oben verwendeten Eluenten.

$$\text{Wasser: } 0,5 \cdot 62 + 0,5 \cdot 69 = 65,5 \approx 65$$

$$\text{Methanol: } 0,5 \cdot 38 = 19$$

$$\text{Acetonitril: } 0,5 \cdot 31 = 15,5 \approx 16$$

Es ergibt sich eine Mischung aus 65% Wasser, 19% Methanol und 16% Acetonitril.

Kontrolle:

$$P' = 0,65 \cdot 0 + 2,6 \cdot 0,19 + 3,2 \cdot 0,16$$

$$P' = 1,006 \approx 0,988$$

Als Laufmittel wird ein Gemisch aus 19% Methanol, 65% mit 1% Essigsäure angesäuertes Aqua bidestillata und 16% Acetonitril gewählt.

Mit dieser Methode lässt sich Oleuropein nach 8 Minuten detektieren. Folgende Abbildung zeigt das HPLC-Chromatogramm einer reinen 0,4%igen Oleuropein-Lösung.

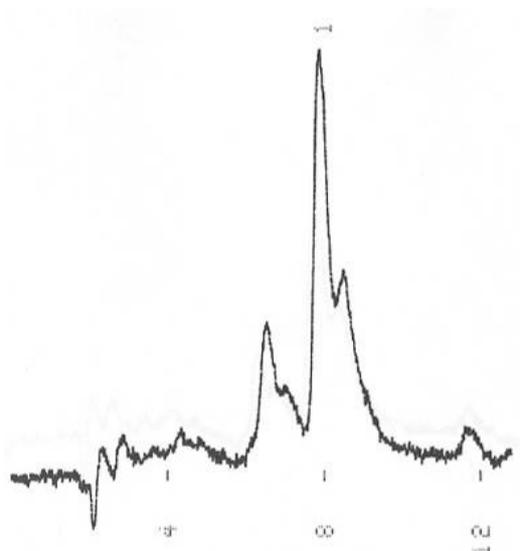


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm: 0,4% Oleuropein

Bei der Untersuchung von Olivenblätterextrakt lässt sich das Oleuropein ebenfalls wiederfinden. Allerdings gelang es nicht, auch weitere phenolische Komponenten chromatographisch zu erfassen.

Oliventresterextrakt konnte mit den untersuchten HPLC-Programmen nicht analysiert werden. Große Probleme bereiten vor allen Dingen Verunreinigungen/Nicht-Polyphenol-Extraktstoffe, die die Chromatographie stören. Aus diesem Grund wurde versucht, die Extrakte durch Festphasenextraktion (SPE) aufzureinigen und aufzukonzentrieren. Hierfür wurden die beiden SPE-Kartuschen Chromabond C₁₈ und Chromabond PA genutzt. Die Kartuschen werden in die, an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene SPE-Kammer eingesteckt. Die SPE-Kartuschen werden je zweimal mit 5 ml Methanol und danach mit 5 ml Aqua bidestillata konditioniert. Danach werden je 5 ml der Proben auf die Kartuschen aufgegeben. Nach dem Durchlauf wird jede Kartusche viermal mit 2 ml Aqua bidestillata gewaschen. Eluiert wird fünfmal mit 1 ml Methanol.

Nach dem Durchlauf von 0,3%iger Oleuropeinlösung und von Olivenblätterextrakt mit einer Oleuropeinkonzentration von 0,3% wurde mittels HPLC überprüft, wie viel Oleuropein in den Wasch- und Elutionsdurchläufen wiederzufinden ist. Die folgende Tabelle zeigt das Ergebnis.

Probe	Chromabond C ₁₈		Chromabond PA	
	Olivenblätter- extrakt	Oleuropein	Olivenblätter- extrakt	Oleuropein
1 Probenwasser	–	–	–	–
2 Waschwasser	–	–	–	–
3 Waschwasser	–	–	–	–
4 Waschwasser	–	–	++	+++
5 Waschwasser	–	–	++	++
6 Elutionsmethanol	+++++	++++	+++	+++
7 Elutionsmethanol	+++	+++	++++	++++
8 Elutionsmethanol	++	++	+++	++
9 Elutionsmethanol	–	–	+	–
10 Elutionsmethanol	–	–	–	–

wobei + für eine dreistellige $area_{10\text{ ml}}$ steht, ++ für eine vierstellige stehen, +++ für eine fünfstellige usw.

Bei der Chromabond PA-Kanüle geht Oleuropein ins Waschwasser über. Da mit dem Waschschrift jedoch nur Fremd- bzw. Störkomponenten entfernt werden sollen und darüber hinaus das Oleuropein über einen relativ langen Zeitraum eluiert wird, ist diese Säule negativ zu beurteilen. Bei der Chromabond C₁₈-Kanüle geht im Waschschrift kein Oleuropein ins Waschwasser über; es wird in drei Elutionsschritten eluiert. Da die Extraktion relativ schnell gelingt, ist diese Säule positiv zu beurteilen.

Allerdings konnte auch nach dem Einsatz der SPE-Kartuschen keine verwertbare HPLC-Analytik des Oliventresterextraktes erreicht werden.

2.2.3.2.3 Präparative LC

Die präparative LC kann genutzt werden, um einzelne Fraktionen/Substanzen in größerem Maßstab zu isolieren und auch um Proben für die HPLC aufzubereiten.

Als Säulenmaterial findet das Dextrangel Sephadex LH-20 Verwendung. Die amphiphilen Eigenschaften dieses Materials führen dazu, dass Sephadex LH-20 sowohl in schwach-, mittel- als auch in stark polaren Lösungsmitteln quillt. Es zeigt sowohl in Wasser und wässrigen Salzlösungen als auch in vielen organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol, Chloroform das gleiche Quellungsvermögen. Das Laufmittel besteht aus 10% Methanol und 90% Isopropanol. Etwa 10 g Sephadex LH-20 werden in 200 ml Laufmittel gequillt. Die senkrecht eingespannte Säule wird etwa zu einem Drittel mit Laufmittel gefüllt. Anschließend wird das gesamte suspendierte Gel in die Säule gegossen. Das untere Säulenende ist geöffnet, so dass das überschüssige Laufmittel abläuft. Das Gel wird kontinuierlich aufgegeben, damit eine regelmäßige Packung gewährleistet ist. Andernfalls würde das durchscheinende Gel Zonen unterschiedlicher Dichte aufweisen, die sich als helle und dunkle Stellen zeigten. Eine solche unregelmäßige Packung würde das Trennergebnis beeinflussen.

Die Bedingungen der Chromatographie sind wie folgt:

- Verstärkung: 0,5 AUFS
- Wellenlänge: 280 nm
- Flussgeschwindigkeit: 0,7 ml/min
- Spannungsbereich: 1 V
- Blattvorschub: 6 cm/h
- Probenvolumen: 1 ml

Als Flussgeschwindigkeit werden 0,9 ml/min, 1,1 ml/min, 1,3 ml/min, 1,5 ml/min, 1,7 ml/min, 1,9 ml/min bzw. 2,1 ml/min geprüft.

Eine 5%ige Lösung von Olivenblätterextrakt in Laufmittel kann in drei Fraktionen aufgetrennt werden.

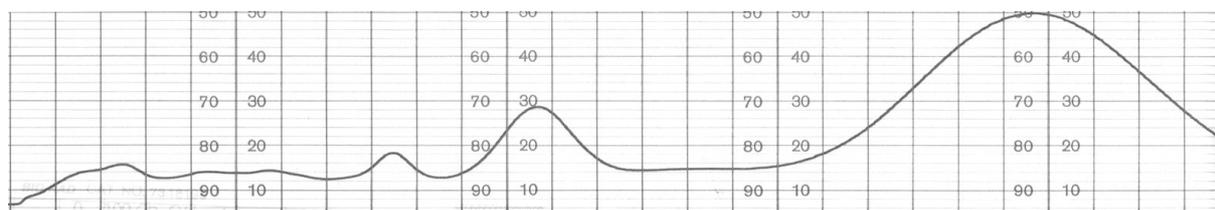


Abb. 15: LC-Chromatogramm: Olivenblätterextrakt

In der ersten Fraktion kann per HPLC Oleuropein nachgewiesen werden, wie in der folgenden Abbildung zu erkennen ist.

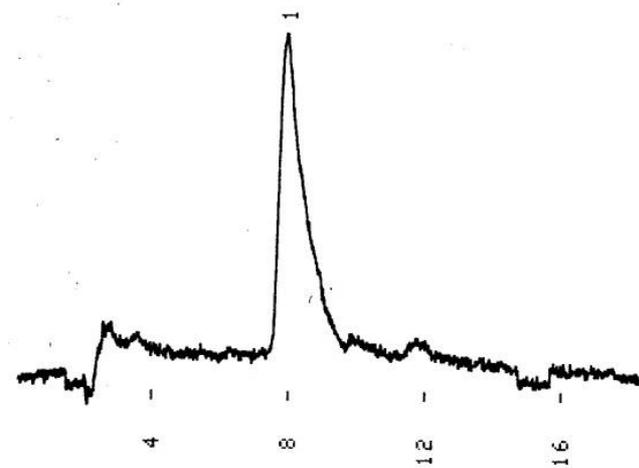


Abb. 16: HPLC-Chromatogramm der LC-Fraktion 1

Dies bedeutet, dass durch die Verwendung der präparativen LC eine Aufkonzentrierung von Oleuropein möglich ist.

Allerdings konnte auch nach der Verwendung der LC das Polyphenolspektrum nicht weiter aufgegliedert werden. Weiterhin bereiteten Verunreinigungen in den Extrakten auch bei der LC Probleme, was zu häufigen Verstopfungen führte.

2.2.4 Optimierung der Extraktionsausbeute

Anhand des modifizierten Gesamtpolyphenoltest nach Folin-Ciocalteu sollen effiziente Methoden zur Erhöhung der Extraktionsausbeute identifiziert werden. Da die Extraktkonzentrationen untereinander verglichen werden, müssen die Extraktionen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden. Nur die jeweils untersuchte, ausbeuteerhöhende Maßnahme wird variiert.

Die Standard-Bedingungen sind:

- einstufige, diskontinuierliche Extraktion
- Trester-Extraktionsmittel-Verhältnis von 1:3 (w/v)
- Extraktionsmittel: destilliertes Wasser
- Rührgeschwindigkeit: schnell genug, um alle Tresterpartikel in der Schwebelage zu halten
- Extraktionstemperatur: 20°C
- Extraktionsdauer: 4 Tage (Zeitdauer, die nötig ist, um bei der Extraktion von unbehandeltem Trester unter den gegebenen Bedingungen eine nicht mehr zunehmende Endkonzentration im Extrakt zu erzielen (siehe Punkt 3.3).)

Nach Ablauf der Extraktionen wird der Extrakt filtriert und das klare Filtrat bis zur Polyphenolkonzentrationsbestimmung bei 7°C kühl gelagert.

In diesen Versuchen wird die Gesamtpolyphenolkonzentration ausgedrückt in Tannin-Äquivalenten. Alle Versuche und Konzentrationsbestimmungen werden (mindestens) im doppelten Ansatz durchgeführt.

2.2.4.1 Physikalische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung

Temperatureinfluss

Die Extraktionen werden aus praktischen Gründen in verschlossenen Erlenmeyerkolben durchgeführt, die ins temperierte Wasserbad positioniert werden und mittels Magnetrührer gerührt werden. Die Extrakte bei 121°C werden im Druckautoklaven ohne zusätzliches Rühren hergestellt. Das Extraktionsmittel wird bereits vor der Zugabe temperiert. Zusätzlich zum Einfluss auf die Extraktionsausbeute wird der Temperatureinfluss auf die Extraktionsdauer ermittelt.

Trocknen

Oliventrester wird für ca. 24 Stunden bei 65°C in dünner Schicht im Trockenschrank getrocknet. Bei der Einstellung des Trester-Extraktionsmittel-Verhältnis wird der zuvor ermittelte Wassergehalt bzw. Trockenmasseanteil (siehe Punkt 3.1.1) des Oliventresters berücksichtigt. Der getrocknete Trester wird dann unter den Standardbedingungen extrahiert.

Vermahlung und Fraktionierung

Zentrifugalmühle

Vor der Zerkleinerung mit der Zentrifugalmühle muss der Oliventrester getrocknet werden (ca. 24 Stunden bei 65°C in dünner Schicht im Trockenschrank). Anschließend wird er mit einem 1 mm-Siebeinsatz vermahlen. Durch Siebklassierung mit dem Vibrio-Klassierer der Firma Retsch lassen sich die entstehenden Partikel in definierte Partikelgrößefraktionen aufteilen (siehe Punkt 3.2.1). Die einzelnen Fraktionen werden getrennt und in ihrer Gesamtheit auf die Extrahierbarkeit hin untersucht.

Kugelmühle

Durch Vorversuche werden zunächst die Parameter Vermahlungszeit, Geschwindigkeit und Anzahl der Mahlkörper festgelegt. Hierzu wird unbehandelter Oliventrester zusammen mit Wasser unter Variation der oben benannten Parameter in der Kugelmühle zerkleinert. Anschließend wird der Gesamtpolyphenolgehalt des Extraktes bestimmt. Nach den Vorversuchen, auf die in diesem Bericht nicht näher eingegangen wird, wurden folgende Bedingungen als Vermahlungsparameter gewählt:

- Drehzahl: 500 rpm
- Anzahl der Mahlkörper: 5
- Vermahlungszeit: 15 Min

Unbehandelter Oliventrester und das Extraktionsmittel Wasser werden im Verhältnis 1:2 (w/v) in den Mahlbecher gefüllt und der Oliventrester unter den oben bestimmten Parametern in der Kugelmühle zerkleinert. Anschließend wird der Inhalt des Mahlbeckers entnommen und ein Trester-Extraktionsmittel-Verhältnis von 1:3 (w/v) eingestellt. Der auf diese Weise vorbehandelte Trester wird bis zur Vollendung der Extraktionszeit von vier Tagen extrahiert.

Ultraschall-Extraktion

Unbehandelter Oliventrester wird mit dem Extraktionsmittel Wasser im Verhältnis 1:3 (w/v) in ein 600 mL Becherglas eingewogen. Um eine Erwärmung der Probe während der Ultraschallbehandlung zu vermeiden, wird sie mit Eis gekühlt. Aus dem gleichen Grund erfolgt die Ultraschallextraktion unter Intervallbehandlung; d. h. die Probe wird eine Minute unter direkter Beschallung bei einer Frequenz von 20kHz und bei der Maximalleistung von 350 Watt extrahiert, worauf eine einminütige Pause folgt. Die Behandlung wird insgesamt 20 Minuten durchgeführt. Danach wird das Becherglas entleert und der Trester wird weitere vier Tage unter Standardbedingungen extrahiert.

Einfrieren

Vorversuche haben ergeben, dass unbehandelter Trester durch Einfrieren nicht beeinflusst wird. Dies wird auf den Restgehalt an Öl zurückgeführt, das wahrscheinlich die Kristallbildung einschränkt und den pflanzlichen Zellen mehr Elastizität verleiht. Daher wird Oliventrester vor dem Einfrieren getrocknet und entölt. Um genügend Wasser zur Kristallisation zur Verfügung zu stellen, wird der Trester mit Wasser angesprüht, in Kunststofffolien in möglichst dicker Schicht vakuumverpackt und bei -18 °C und bei -70 °C fünf Tage lang eingefroren. Vor der viertägigen Extraktion wird der Trester in einem Trockenschrank bei 65 °C für 24 h aufgetaut und aus Gründen der Bilanzierung gleichzeitig getrocknet.

2.2.4.2 Biochemische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung

Vorversuche haben gezeigt, dass die Wirkung der Enzyme wahrscheinlich durch den Restölanteil im Oliventrester unterbunden wird. Der enzymatische Aufschluss wird daher mit entöltem Trester durchgeführt. Eine Übersicht über die einzelnen Ansätze und Kombinationen mit den entsprechenden Temperaturen und pH-Werten gibt die nachstehende Tabelle. Bei den Kombinationen werden Herstellerempfehlungen berücksichtigt. Oliventrester und Extraktionsmittel werden im Verhältnis 1:3 (w/v) in 300 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und der pH-Wert mit Essigsäure oder 0,1 M Natronlauge eingestellt. Zu jeder Probe muss eine entsprechende Nullprobe in gleicher Weise ohne Enzympräparat-Zugabe erstellt werden, da ein Temperatur- und pH-Wert-Einfluss auf das Extraktionsergebnis wahrscheinlich ist.

<u>Enzym/e</u>	<u>pH-Wert</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Menge</u>
Olivex	5,5	35 °C	1 mL
Laccase		30 °C	1 Spatelspitze
Rohavin CXL + Rohapect MA plus	4,0	35 °C	0,5 mL + 0,5 mL
Rohapect VR-C	7,0	35 °C	1 mL
Corolase 7089 + Rohapect CM	7,0	50 °C	0,5 mL + 0,5 mL
Corolase 7089 + Corolase LAP	8,0	50 °C	0,5 mL + 0,5 mL
Rohament CL + Rohavin CXL	4,5	50 °C	0,5 mL + 0,5 mL

Jeweils zwei Enzymproben und zwei Nullproben pro Ansatz werden in einem Wasserbad 2 Stunden auf Optimaltemperatur gehalten, ab und zu bewegt, und anschließend vier Tage extrahiert.

2.2.4.3 Chemische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung

Extraktion im alkalischen Milieu

Dem Extraktionsmittel Wasser werden unterschiedliche Mengen Natriumhydroxid-plätzchen zugesetzt, 0,5; 1 und 2 % (w/v). Vor der Bestimmung des Gesamtphenolgehalts werden die gewonnenen Extrakte mit Essigsäure auf den pH-Wert 6,5 eingestellt, um eine Beeinflussung des Tests durch einen veränderten pH-Wert zu verhindern. Die zugegebene Menge an Essigsäure wird als Verdünnungsfaktor in die Berechnung der Konzentration miteinbezogen.

Extraktion im sauren Milieu

Das Extraktionsmittel Wasser wird mit Essigsäure auf die pH-Werte, pH=2 und pH=4, eingestellt. Vor der Bestimmung des Gesamtphenolgehalts werden die gewonnenen Extrakte mit verdünnter Natronlauge auf den pH-Wert pH 6,5 eingestellt, um eine Beeinflussung des Tests durch einen veränderten pH-Wert zu verhindern. Die zugegebene Menge an Natronlauge wird als Verdünnungsfaktor in die Berechnung der Konzentration miteinbezogen.

Ethanolisches Extraktionsmittel

Reines Ethanol, sowie 90-, 80-, 70-, 60-, 50-, 40-, 30-, 20- und 10-%iges Ethanol wird als Extraktionsmittel eingesetzt und dessen Einfluss auf die Polyphenolausbeute ermittelt. Für diese Extraktionen wird entölter Trester benutzt, weil ansonsten auch größere Mengen Öl mitextrahiert würden. Das Trester-Extraktionsmittel-Verhältnis beträgt 1:3 (w/v).

2.2.5 Modifikation des Wirkungsspektrums

2.2.5.1 Lösungsmittelauswahl

Verschiedenen Extraktionsmittel vermögen sowohl unterschiedliche Mengen als auch unterschiedliche Spektren an Polyphenolen aus dem Oliventrester zu lösen.

Die Eignung folgender Lösungsmittel zur Polyphenolextraktion wird untersucht:

- Wasser
- Ethanol
- Methanol
- Acetonitril
- Aceton
- Ethylacetat
- Wasser-Ethanol (1:1) Gemisch, pH=9

Aufgrund der Schwierigkeiten beim Aufbau der Polyphenolanalytik können die Extrakte zwar hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit, nicht aber hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung untersucht werden.

Der Oliventrester wird vor der eigentlichen Polyphenolextraktion aus mehreren Gründen getrocknet und entölt:

- Die ausgewählten Extraktionsmittel lösen zum Teil auch das Öl aus dem Trester, welches dann einen Großteil der Extraktstoffe ausmacht.
- Das Entölen beschleunigt die hydrophile Polyphenolextraktion.
- Die Trocknung erleichtert den Entölungsprozess, weil das Wasser das Eindringen des hydrophoben Extraktionsmittels erschwert.
- In Vorversuchen hat sich das Entölen als ausbeuteerhöhende Maßnahme erwiesen.

Für die Versuche müssen größere Mengen Oliventrester entölt werden, weil für die nachgeschalteten mikrobiologischen Untersuchungen viel Extrakt zur Verfügung stehen muss. Dies ist nicht mit einer Soxhlet-Apparatur durchführbar. Deshalb werden 3 sukzessive, diskontinuierliche Extraktionen im Batch-Extraktor durchgeführt. Die Extraktions-Parameter für diese lipophile Extraktion lauten:

- Extraktionsmittel: Hexan
- Trester-Extraktionsmittel-Verhältnis 1:4 (w/v)
- Extraktionstemperatur: 20°C
- Extraktionszeit (pro Batch): 2 Stunden

Nach dem letzten Extraktionsdurchgang wird das Hexan, das nach der Filtration noch im Trester ist per Druckluft ausgetrieben.

Die gewählten Betriebsparameter für die Polyphenolextraktion lauten:

- Trester-Extraktionsmittel-Verhältnis 1:4 (w/v)
- Extraktionstemperatur: 20°C
- 2 sukzessive, diskontinuierliche Extraktionen
- Extraktionszeit (pro Batch): 2 Stunden

Von den abfiltrierten Extrakten wird sowohl die Gesamtpolyphenolkonzentration (ausgedrückt in Oleuropein-Äquivalenten) als auch die Gesamtextraktstoffkonzentration (Trockenmasse) bestimmt.

Die Extraktstoffe müssen für die nachgeschalteten mikrobiologischen Untersuchungen in die wässrige Phase überführt werden. Hierfür werden die Extrakte mit einer definierten Menge Wasser gemischt und aus dem Gemisch wird das Lösungsmittel unter Vakuum abdestilliert. Um sicher zu gehen, dass höchstens vernachlässigbare Reste an Extraktionsmittel in der wässrigen Phase zurückbleiben wird ein größeres Flüssigkeitsvolumen verdampft als das vorliegende Extraktionsmittelvolumen. So wird erreicht, dass alle Extraktstoffe im Wasser gelöst und/oder fein dispergiert sind. Nachträglich wird der pH-Wert der resultierenden Lösung gemessen und ggfls. mit konzentrierter Natronlauge oder Schwefelsäure auf einen Wert von pH=6 eingestellt. Durch die Kenntnis der Polyphenolkonzentration in den Extrakten kann man die Polyphenolkonzentration in der zurückbleibenden wässrigen Phase errechnen. Trotzdem wird diese nochmals durch den Folin-Ciocalteu-Test ermittelt.

Die so in die wässrige Phase überführten Hemmstoffe können nun in gewünschter Konzentration in die Nährböden für die Schimmelpilze eingebracht und auf ihr fungizides Potential untersucht werden (vgl. Punkt 2.2.6.1).

2.2.5.2 Saure und alkalische Hydrolyse

Mit einem Anteil von ca. 42% ist das Secoiridoid Oleuropein Hauptbestandteil des käuflich erworbenen Olivenblätterextraktes. Laut Literatur ist diese Substanz auch das im Oliventrester mengenmäßig am häufigsten vorkommende Polyphenol. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die hydrolytischen Spaltprodukte des Oleuropein, die Elenolsäure und das Hydroxytyrosol stärkere antimikrobielle Wirkungen aufweisen als das Oleuropein selbst [63]. Es wird untersucht, ob sich durch die Anwendung extremer Bedingungen (pH, Temperatur) eine solche Spaltung herbeiführen lässt und ob sich hierdurch veränderte antimikrobielle Eigenschaften ausmachen lassen.

Wässriger Olivenblätterextrakt mit definierter Konzentration wird auf vier beheizbare Gefäße mit Rückflusskühler aufgeteilt. Mit konzentrierter Schwefelsäure bzw. Natronlauge wird der Extrakt in den einzelnen Gefäßen auf den pH-Wert 1, 3, 10 und 12 eingestellt. Anschließend werden alle Proben eine Stunde lang bis zum Sieden erhitzt, dann abgekühlt und der pH-Wert wieder auf pH = 6 eingestellt. Die so behandelten Proben können mikrobiologisch evaluiert werden (vgl. Punkt 2.2.6.1).

Weiterhin werden die gleichen Untersuchungen durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Extrakte den besagten pH-Werten für 24 Stunden bei 20°C ausgesetzt werden.

2.2.5.3 Enzymatische Modifikation

β-Glukosidase

1%iger, wässriger Olivenblätterextrakt wird mit β-Glukosidase-Enzympräparat versetzt und für 12h bei 37°C gerührt. Die Kontrolle wird genauso behandelt, jedoch ohne den Zusatz des Enzympräparats. Beide Extrakte werden im mikrobiologischen Hemmtest (vgl. Punkt 2.2.6.1) miteinander verglichen.

Laccase

Wässriger Oliventresterextrakt wird mit Laccase-Enzympräparat versetzt und für 12h bei 25°C gerührt. Die Kontrolle wird genauso behandelt, jedoch ohne den Zusatz des Enzympräparats. Beide Extrakte werden im mikrobiologischen Hemmtest (vgl. Punkt 2.2.6.1) miteinander verglichen.

2.2.5.4 Ultraschall-Behandlung

Wässriger Oliventresterextrakt wird 10 Minuten lang einer Ultraschallbehandlung bei einer Frequenz von 20kHz und bei einem Leistungseintrag von 350 Watt unterzogen. Um ein Erwärmen der Probe zu verhindern wird diese mit Eis gekühlt und die Ultraschallbehandlung wird in 1-Minuten-Intervallen mit einminütigen Pausen durchgeführt. Die Hemmwirkung des ultraschallbehandelten Extraktes wird verglichen mit der Hemmwirkung von unbehandeltem Extrakt.

2.2.6 Mikrobiologie

2.2.6.1 Schimmelpilze

Nährmedien

Als Kulturmedium für die unter Punkt 2.1.3 genannten Schimmelpilze wird Malzextrakt-Agar (MEA) der folgenden Zusammensetzung benutzt:

30g Malzextrakt
20g Agar
3g Fleischpepton (pankreatisch verdaut)
1l Aqua dest.

Der pH-Wert des Mediums liegt zwischen 5,5 und 6. Nach 20minütigem Autoklavieren bei 121°C wird das auf ca. 60°C abgekühlte Nährmedium unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (Durchmesser: 9cm) gegossen.

Der Oomycet *Phytophthora infestans* bildet eine Ausnahme. Er wird auf V-8-Agar folgender Zusammensetzung kultiviert.

200ml V-8-Gemüsesaft
20g Agar
3g CaCO₃
800ml Aqua dest.

Stammhaltung

Die Anzucht der Schimmelpilze erfolgt im Brutschrank (ohne Beleuchtung) bei 25°C. Zur Inokulumgewinnung werden fünf bis acht Tage alte, sporulierende Kulturen verwendet.

Um die Pathogenität von *Phytophthora infestans* zu erhalten wird er monatlich einmal auf eine dünne Kartoffelscheiben überimpft. Diese werden zuvor mit Ethanol oberflächendesinfiziert. Nach dem Bewachsen der Kartoffelscheiben kann Mycel wieder auf V-8-Agar übertragen werden.

Hemmtest

Das jeweilige Nährmedium wird mit der gewünschten Menge an Extraktstoff/Hemmstoff versetzt. In dem Fall, dass es sich bei den Extraktstoffen um hydrophobe Flüssigkeiten handelt, werden diese unter Zusatz von 1% Tween 80 mit Hilfe eines Ultraturrax in dem Medium emulgiert. Handelt es sich bei dem Hemmstoff um eine hitzelabile Substanz, so wird diese in einer kleinen Menge Flüssigkeit gelöst und erst nach dem Autoklavieren durch Sterilfiltration dem Nährmedium zugefügt. Diese Technik wird auch genutzt, um zu untersuchen, ob das Autoklavieren einen Einfluss auf die Wirksamkeit hat.

Die Agar-Platten werden mit einem kreisförmigen, mycelbewachsenen Agar-Stück beimpft. Das Inokulum wird mit Hilfe eines ausgeglühten Korkbohrers (Durchmesser: 1cm) aus einer bewachsenen Agar-Platte der Stammhaltung ausgestochen und mittels ausgeglühter Impfnadel zentral auf die hemmstoffhaltige Agar-Platte platziert.



Abb. 17: Beimpfen der Agar-Platte

Der Durchmesser d des Mycels wird durch mindestens zwei Messungen wie in der folgenden Abbildung demonstriert ermittelt.

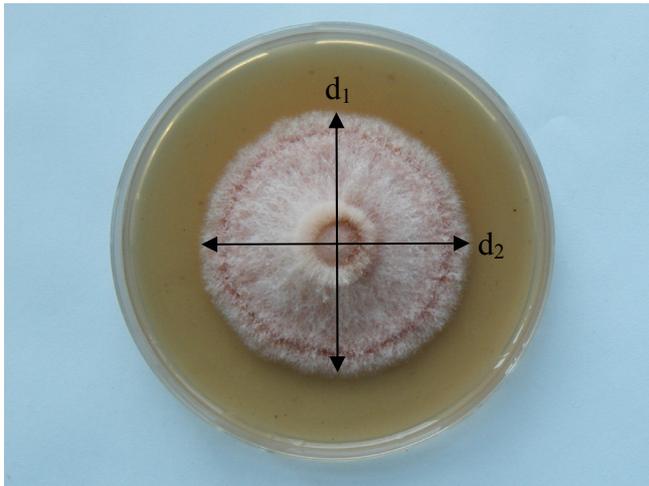


Abb. 18: Bestimmung des Myceldurchmessers

$$d = \frac{d_1 + d_2}{2}$$

Die Wachstumsinhibierung lässt sich prozentual ausdrücken, indem der Myceldurchmesser in Relation zum Myceldurchmesser auf den hemmstofffreien Kontrollplatten gesetzt wird.

$$\text{Inhibierung}[\%] = \left(\frac{d(K) - d(P)}{d(K) - 1\text{cm}} \right) \cdot 100$$

mit: $d(P)$ = durchschnittlicher Myceldurchmesser [cm] der Probe
 $d(K)$ = durchschnittlicher Myceldurchmesser [cm] der Kontrolle

von dem ermittelten Durchmesser wird 1cm subtrahiert, da das Inokulum bereits diesen Durchmesser hat.

Weitere Möglichkeiten, die Effekte zu quantifizieren sind die Angabe

- des prozentualen Wachstums: $\text{Wachstum} [\%] = 100 \% - \text{Inhibierung} [\%]$
- der Wachstumsgeschwindigkeit [mm/h]

2.2.6.2 Bakterien

Nährmedien und Kultivierung

Die Mikroorganismen liegen als MikrobankTM vor. Dies ist ein steriles Kryogefäß mit porösen Keramik-Kügelchen, die als Träger der Mikroorganismen die Lagerung und Kultivierung erheblich erleichtern. Die Kügelchen mit den immobilisierten Bakterien werden bei -70°C gelagert. Zum Ansetzen einer Arbeitslösung werden 100ml sterile Boullion mit einem Kügelchen inokuliert und anschließend inkubiert. Die resultierende Bakteriensuspension kann für alle weiteren Versuche eingesetzt werden.

Die ubiquitär vorkommenden Bakterien *E. coli*, *K. terrigena*, *P. putida* und *B. subtilis* haben keine besonderen Nährstoffansprüche. Sie werden auf dem Minimalmedium „Plate-Count-Medium“ (PC-Medium) kultiviert.

Zusammensetzung des PC-Mediums:

Chemikalie	g/l
Casein-Pepton (Trypton)	5
Hefeextrakt	2,5
D(+)-Glucose-Monohydrat	1
Agar	20

E. coli und *K. terrigena* werden bei 37°C mind. 48 Stunden lang inkubiert, *P. putida* und *B. subtilis* bei 30°C ebenfalls mind. 48 Stunden lang.

Zur Kultivierung der Milchsäurebakterien werden aufgrund ihrer hohen Nährstoffansprüche Vollmedien verwendet. Ein geeignetes Nährmedium stellt das MRS-Medium dar (nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE). Die Rezeptur für das verwendete MRS-Medium ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Chemikalie	g/l
Pepton aus Fleisch	20
Fleischextrakt	8
Hefeextrakt	4
D(+)-Glucose-Monohydrat	20
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2
Natriumacetat	5
Ammonium Citrate, dibasic	2
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,2
Mangan (II)-sulfat-1-hydrat	0,05
Agar-Agar	1 ml
Tween 80 [®]	20

Auf diesem Medium wird *L. curvatus* bei einer Bruttemperatur von 30°C und einer Brutzeit von 48 Stunden kultiviert.

E. durans wird auf TSB-Medium bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Die Zusammensetzung des TSB-Mediums ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Chemikalie	g/L
Casein-Pepton (Trypton)	17,5
Sojapepton	3,5
Natriumchlorid	5
D(+)-Glucose-Monohydrat	2,5
Di-Kaliumhydrogenphosphat	3,5
Hefeextrakt	3
Agar	20

Alle beschriebenen Medien können durch den Wegfall des Agar auch als Bouillon genutzt werden.

Hemmtest: Antibiotikablättchentest

Hemmstofflösungen der gewünschten Konzentration werden angesetzt und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

0,1ml der jeweiligen Bakteriensuspension werden auf erkaltete Agarplatten pipettiert und mit dem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Antibiotikatestblättchen (Durchmesser: 12,7mm) werden für wenige Sekunden in die Wirkstofflösung einer definierten Konzentration getaucht und dann auf die beimpften Agarplatten gelegt. Auf jede Platte wird als Kontrolle ein Testblättchen gelegt, das zuvor lediglich in steriles und destilliertes Wasser getaucht wurde.

Der Durchmesser der um die Testblättchen entstandenen Hemmzone wird nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden gemessen. Von dem gemessenen Durchmesser wird der Durchmesser des eigentlichen Plättchens ($d=1,27\text{cm}$) subtrahiert, da auch unter den hemmstofffreien Kontrollplättchen kein Bakterienwachstum stattfindet.

2.2.7 Pflanzenversuche

2.2.7.1 Chlorophyllfluoreszenz-Test

Der Chlorophyllfluoreszenz-Test wird an 20 Bohnenpflanzen im 2-Blatt-Stadium mit Hilfe des Chlorophyllfluoreszenz-Messgeräts PAM-2000 der Firma Walz durchgeführt. Für diese Untersuchung wird Oliventresterextrakt durch die Extraktion mit einem Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1) bei dem pH-Wert von pH=9 gewonnen. Das Ethanol wird verdampft und die zurückbleibende wässrige Lösung auf den pH-Wert pH=6 und einen Gesamtphenolgehalt von 300mg/100ml eingestellt. 20 μ l dieses Extraktes werden gleichmäßig auf eine runde Blattfläche von ca. 1,75cm² aufgetragen. Der Chlorophyllfluoreszenz-Test wird 1 Tag nach der Extraktapplikation durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz geschieht nach einer 30minütigen Dunkeladaptation. Ermittelt werden die minimale Fluoreszenz F_0 , die maximale Fluoreszenz F_m und die relative Fluoreszenz F_v/F_m .

2.2.7.2 Protektive Wirkung gegenüber *Botrytis cinerea*-Befall

Die Schutzwirkung von Oliventresterextrakt gegenüber einem *Botrytis cinerea*-Befall bei Apfel- und Tomatenpflanzen wird untersucht. Für diese Versuche wird Oliventresterextrakt durch die Extraktion mit einem Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1) bei dem pH-Wert von pH=9 gewonnen. Das Ethanol wird verdampft und die zurückbleibende wässrige Lösung auf den pH-Wert pH=6 und einen Gesamtphenolgehalt von 300mg/100ml eingestellt.

Jeweils 10 Tomaten- und Apfelpflanzen im 6- bis 8-Blatt-Stadium werden bis zur Tropfnässe mit Extrakt besprüht, während jeweils 10 weitere Tomaten- und Apfelpflanzen als Kontrollen unbehandelt bleiben. 24 Stunden nach der Applikation werden sowohl die behandelten Pflanzen als auch die unbehandelten Kontroll-Pflanzen mit *Botrytis cinerea* – Sporensuspension (ca. 3·10⁶ Sporen/ml) inokuliert. Alle Pflanzen werden für 48 Stunden bei 80% relativer Luftfeuchte inkubiert. Nach 7 Tagen wird die Stärke des Befalls anhand folgenden Boniturschemas ermittelt.

- 0 = kein Befall
- 1 = leichter Befall
- 2 = mittlerer Befall
- 3 = starker Befall

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Rohmaterialeigenschaften

3.1.1 Wassergehalts des Oliventresters

Der Wasseranteil des Oliventresters beträgt:

$$W = 53,2 \%$$

Somit enthält Oliventresters einen beträchtlichen Wasseranteil. Wenn das Trocknen des Tresters für die Rohmaterialaufbereitung oder die Extraktion für nötig empfunden wird, dann sollte dies zu einem frühen Zeitpunkt erfolgen. Somit werden Transportkosten eingespart und die mikrobiologische und chemische Stabilität des Tresters wird verbessert. Die Temperaturstabilität der wirksamen Inhaltsstoffe ist uns nicht bekannt. Polyphenole können teilweise mit Proteinen und auch Kohlenhydraten reagieren und an diese gebunden werden. Um solche Reaktionen zu vermeiden, sollte für eine Trocknung ein schonender Trocknungsprozess gewählt werden, bei dem hohe Temperaturen vermieden werden.

3.1.2 Restölgehalt

Der hohe Wassergehalt des Tresters macht es nötig, dass der Tresters vor der Bestimmung des Ölgehaltes getrocknet wird. Das Wasser würde das Eindringen des lipophilen Lösungsmittels in das Rohmaterial erschweren.

Nach Doppelbestimmung hat sich für den Tresters folgender Ölgehalt ergeben:

$$O = 13,7 \% \text{ (i. Tr.)}$$

Der Ölanteil erscheint hoch. Dieser Wert bezieht sich jedoch auf die Trockenmasse. Bezieht man den Ölgehalt auf das Feuchtgewicht, so liegt er bei

$$O = 6,4 \%$$

und liegt somit im Rahmen der normalen Ausbeute bei der Olivenölproduktion.

3.1.3 Proteingehalt

Der Proteingehalt des Oliventresters liegt bei ca. 6,2%.

3.1.4 Ballaststoffgehalt

Unlösliche Ballaststoffe machen ca. 65,3% des getrockneten Oliventresters aus, während die löslichen Ballaststoffe lediglich einen Anteil von ca. 5,5% darstellen. Somit besteht die Gesamtballaststofffraktion zu ca. 92% aus unlöslichen Ballaststoffen.

Diese Fraktion wurde in ihrer Zusammensetzung weiter aufgeschlüsselt. Das folgende Diagramm zeigt die Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe.

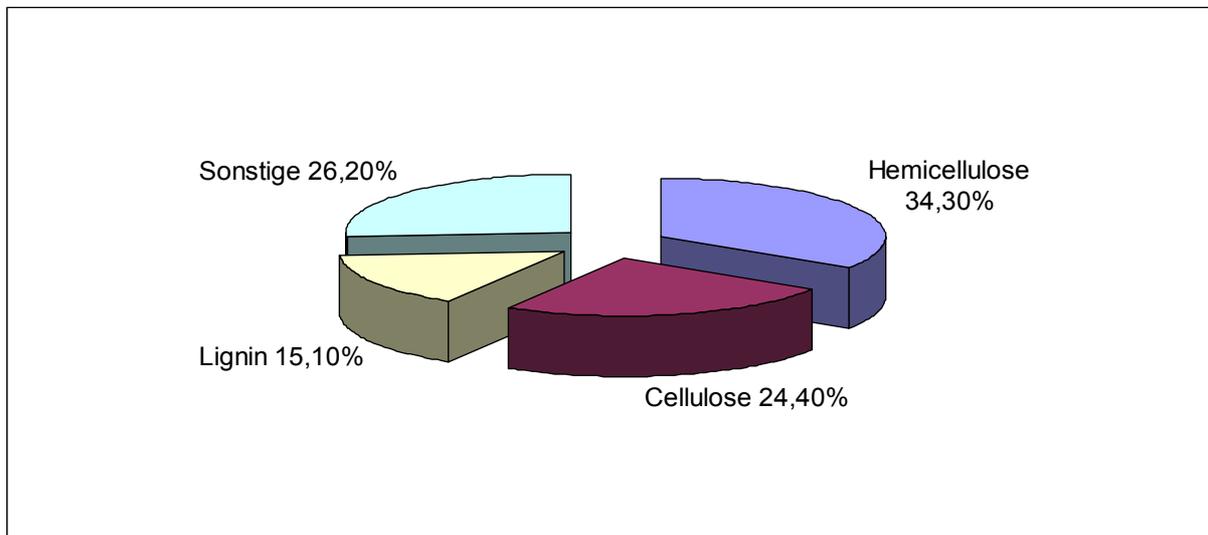


Abb. 19: Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe

Hauptanteile der Ballaststofffraktion sind Hemicellulose und Cellulose. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Pflanzenzellen mit einer stabilen Zellwand handelt.

3.1.5 Aschegehalt

Aschegehalt = 4,0%

3.1.6 Gesamt-Polyphenolkonzentration

Die Polyphenolkonzentrationen (berechnet als Tannin) der 4 aufeinanderfolgend gewonnenen Extrakte sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

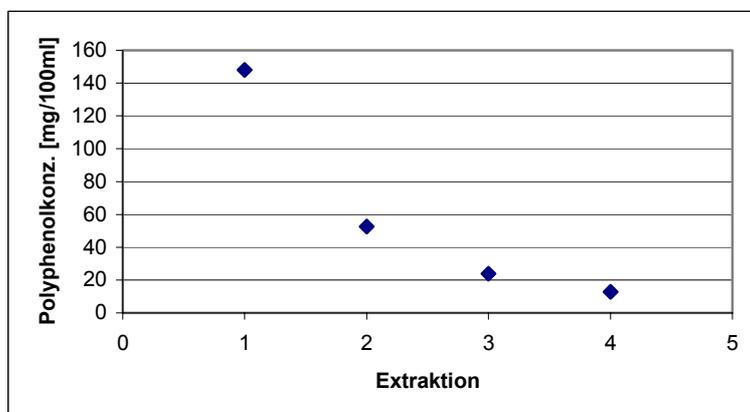


Abb. 20: Phenolkonz. 4 sukzessiv gewonnener Extrakte

Die Grafik verdeutlicht, dass 4 sukzessive Extraktionen unter den gewählten Bedingungen ausreichend sind, um die Polyphenole mit hinreichender Genauigkeit zu quantifizieren. Aus diesen Extrakt-Konzentrationen lässt sich die Gesamt-Polyphenolkonzentration im Oliventrester berechnen. Diese beträgt ca. 1,2% (berechnet als Tannin). Polyphenole stellen somit eine Minor-Komponente im Oliventrester dar. Damit sich deren Gewinnung lohnt, müssen diese möglichst effizient freigesetzt und extrahiert werden.

Die chemische Zusammensetzung des Rohmaterials (bezogen auf die Trockenmasse) wird im folgenden Diagramm noch mal zusammenfassend dargestellt.

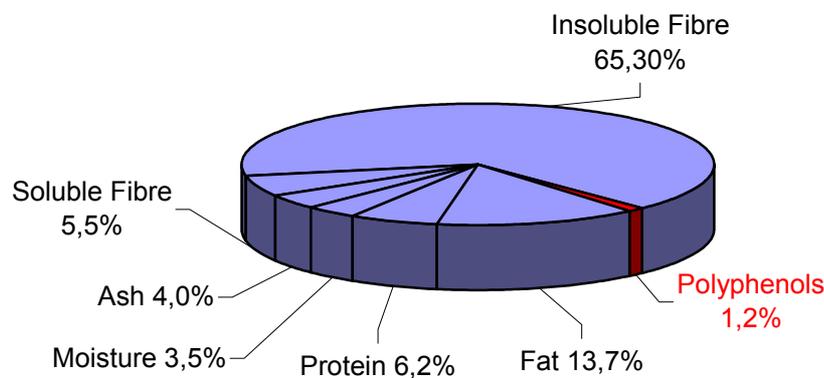


Abb. 21: chemische Zusammensetzung des Oliventresters

3.1.7 pH-Wert

10g Trester regulieren den pH-Wert von 100ml destilliertem Wasser auf einen Wert von pH = 4,8. Um den pH-Wert dieser Trester-Suspension um 2 pH-Einheiten zu senken bzw. zu erhöhen, benötigt man folgende Mengen an 0,25 molarer Salzsäure bzw. Natronlauge:

4,8 → 2,8: 7,5ml HCl (entspricht $1,875 \cdot 10^{-3}$ mol)
 4,8 → 6,8: 3,5ml NaOH (entspricht $8,75 \cdot 10^{-4}$ mol)

Um die gleiche pH-Änderung in reinem Wasser zu erzielen sind folgende Mengen bzw. Stoffmengen nötig:

4,8 → 2,8: 6,276ml HCl (entspricht $1,569 \cdot 10^{-3}$ mol)
 4,8 → 6,8: 0,063ml NaOH (entspricht $1,569 \cdot 10^{-5}$ mol)

Das bedeutet, dass für den Fall der pH-Wert-Senkung 1,22ml mehr Säure, bzw. $3,06 \cdot 10^{-4}$ mol mehr Hydroniumionen zugesetzt werden müssen, als in reinem Wasser. Für die pH-Wert-

Erhöhung um 2 Einheiten musste im Vergleich zu reinem Wasser 3,44ml mehr Lauge bzw. $8,59 \cdot 10^{-4}$ mol mehr Hydroxidionen zugesetzt werden.

Somit übt der Oliventrester im Wasser Puffereigenschaften aus. Diese sind in für eine pH-Wert-Änderung in den alkalischen Bereich ca. 2,8 mal stärker ausgeprägt als für eine Änderung zum Säuren hin. Für diese Eigenschaften könnten Reaktionen mit Zellwandpolymeren verantwortlich sein, wodurch die Hydroxid- bzw. Hydroniumionen abgefangen werden. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass besonders im alkalischen Bereich Zellwandbestandteile aufgeschlossen werden können.

3.2 Physikalische Rohmaterialeigenschaften

3.2.1 Vermahlung und Fraktionierung

Der Einsatz der Zentrifugalmühle erfordert ein vorheriges Trocknen des Oliventresters. Nach der Vermahlung mit 1mm Siebeinsatz konnte das resultierende Mahlgut in einer nachfolgenden Siebklassierung in folgende Partikelgrößefraktionen aufgetrennt werden.

- < 125 μ m
- 125 μ m - 250 μ m
- 250 μ m - 355 μ m
- 355 μ m - 500 μ m
- 500 μ m - 710 μ m
- > 710 μ m

Der Gewichtsanteil der einzelnen Fraktionen ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

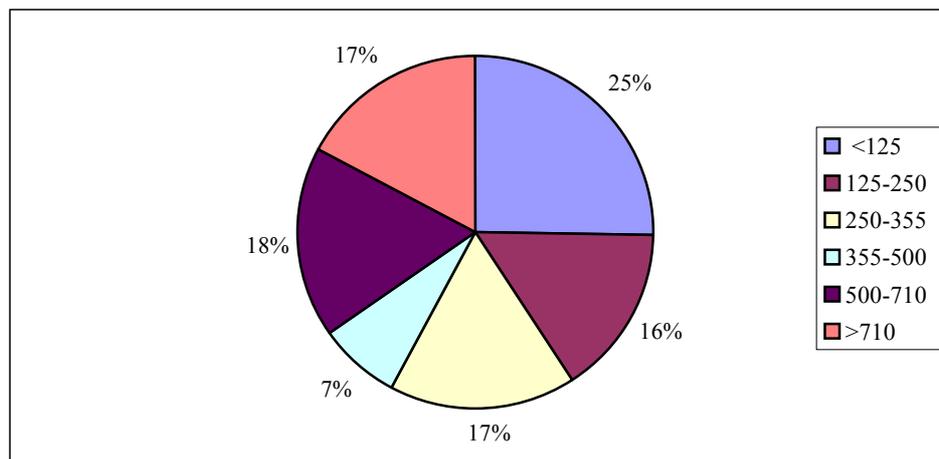


Abb. 22: Gewichtsanteile der unterschiedlichen Partikelfraktionen

Der Einsatz der Mühle ohne Siebeinsatz ermöglicht eine Separierung der Steinfraktion von der Fruchtfleischfraktion. Durch die unterschiedlichen Vermahlungseigenschaften bleiben die Kernpartikel während der gemeinsamen Vermahlung größer als die Fruchtfleischpartikel, so dass durch eine nachträgliche Siebung mit einem 1mm Analysesieb eine reine Olivensteinfraktion gewonnen werden kann. Die Fraktion <710 μ m kann als nahezu reine Fruchtfleisch-/Schalenfraktion betrachtet werden. Die Fraktion zwischen 710 μ m und 1000 μ m stellt eine Mischfraktion dar.



Abb. 23: Auftrennung in Kerne und Fruchtfleisch

(oben: Kernfraktion, unten links: Mischfraktion, unten rechts: Fruchtfleischfraktion)



Abb. 24: gemahlene Fruchtfleischfraktion (links) und Kernfraktion (rechts)

Der Gewichtsanteil dieser drei Fraktionen ist in der folgenden Grafik dargestellt.

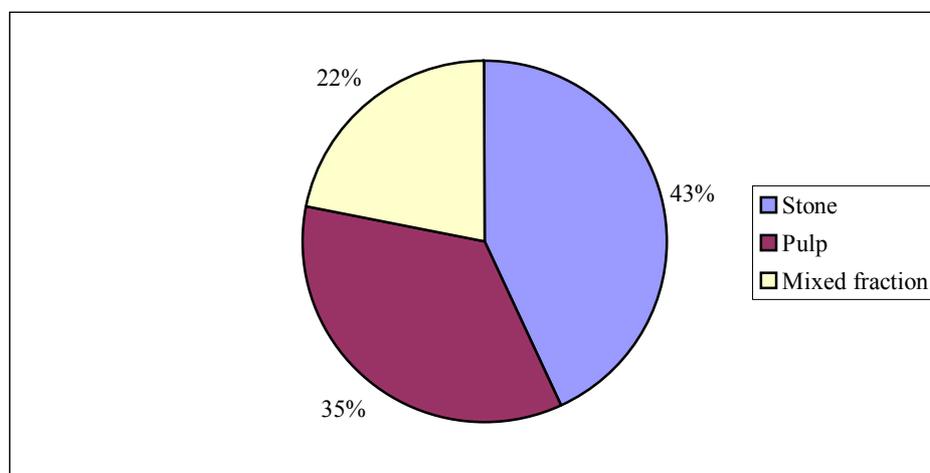


Abb. 25: Gewichtsanteile der getrennten Fraktionen

Der Einsatz der Kugelmühle zur Zerkleinerung des Tresters erwies sich als ungeeignet. Zwar bietet die Kugelmühle die Möglichkeit der Nassvermahlung; jedoch ist der feuchte Trester so zäh und elastisch, dass die Prallkräfte der Kugelmühle nicht ausreichen, um eine effiziente Zerkleinerung zu erzielen.

3.2.2 Wahre Dichte

Nach Siebklassierung von getrocknetem und vermahlenem Oliventrester wurde die Fraktion mit den Partikelgrößen von 0,125mm bis 0,250mm Durchmesser für die gravimetrische Bestimmung der wahren Dichte genutzt. Die ermittelte Dichte beträgt

$$\rho_w = 1,35 \text{ g/cm}^3$$

3.2.3 Scheinbare Dichte und Porosität

Die scheinbare Dichte und die Porosität werden automatisch durch die Poremaster Software ermittelt. Bestimmt wurden sie für die Oliventresterfraktion der Partikelgrößen von 0,125mm bis 0,250mm Durchmesser.

Die scheinbare Dichte beträgt $\rho_s = 0,8 \text{ g/cm}^3$

Die automatisch ermittelte Porosität beträgt 44%.

Dieser, durch das Porosimeter ermittelte Wert stimmt sehr gut mit dem Wert überein, den man über die zuvor bestimmte Wahre Dichte berechnen kann.

$$\text{Porosität} = 1 - \left(\frac{\sigma_s}{\sigma_w} \right) \cdot 100\% = 1 - \left(\frac{0,8 \text{ g/cm}^3}{1,35 \text{ g/cm}^3} \right) \cdot 100\% \approx 41\%$$

Der Trester besitzt eine hohe Porosität. Dies ist eine gute Voraussetzung für eine effiziente Extraktion. Es ermöglicht eine gute Penetration des Extraktionsmittels in die Partikel hinein und bietet viel Austauschfläche für den Stoffübergang an.

3.2.4 Wasserbindungskapazität

Für die Ermittlung der Wasserbindungskapazität nach der Zentrifugationsmethode nach Weber wurde die Partikelfraktion 125 – 250µm genutzt. Zusätzlich zur normalen „Mischfraktion“ wurden die reine Fruchtfleisch- und die Kernfraktion (ebenfalls 125 – 250µm) auf ihre Wasserbindungsfähigkeit hin untersucht.

Trester-Fraktion	Wasserbindungskapazität [mL/g]
125 – 250µm	1,73
Fruchtfleisch 125 – 250µm	2,10
Kerne 125 – 250µm	1,39

Oliventrester weist eine relativ große Wasserbindungskapazität auf. Dies lässt sich durch die hohe Porosität von über 40% erklären. In den Poren des Tresters kann viel Wasser an polare Zellwandbestandteile gebunden werden. Es ist zu erkennen, dass die Bindungskapazität für das Fruchtfleisch deutlich höher ist als für die Kerne. Das Ergebnis für die Mischfraktion liegt, wie zu erwarten, zwischen diesen beiden Werten.

3.2.5 Schwellungskapazität

Für die Versuche wurde sowohl die 125 – 250µm Fraktion als auch die 250 – 355µm Fraktion des Oliventresters genutzt. Weiterhin wurden Fruchtfleisch- und Kernfraktion getrennt voneinander auf ihre Schwellungseigenschaften hin untersucht.

Trester-Fraktion	Schwellungskapazität [mL/g]
125 – 250µm	3,3
250 – 355µm	3,05
Fruchtfleisch 125 – 250µm	3,9
Fruchtfleisch 250 – 355µm	3,4
Kerne 125 – 250µm	2,8
Kerne 250 – 355µm	2,4

Die Schwellungskapazität des Oliventresters ist partikelgrößenabhängig. Eine kleinere Partikelgröße führt zu einer stärkeren Schwellung. Durch den stärkeren Zellaufschluss ergeben sich mehr Anlagerungsstellen für das Wasser. Die Schwellungskapazität des Fruchtfleisches ist deutlich größer als die der Kerne.

Die Partikelgrößenabhängigkeit der Wasserbindungs- und Schwellungskapazität gibt Implikationen für die Extraktion des Tresters. Eine möglichst kleine Partikelgröße beschleunigt aufgrund der großen Fest-flüssig-Grenzfläche und der verkürzten Diffusionswege die Extraktion und erhöht evtl. die Ausbeute. Andererseits verschlechtert eine sehr kleine Partikelgröße die Separierung der Feststoffe von dem Extraktionsmittel (→ Verlust an Extraktstoffen) und erschwert die gesamte Handhabung und Prozessführung (z.B. Verstopfung von Filterschichten, Staubentwicklung). Daher muss bezüglich der Partikelgröße ein Kompromiss gefunden werden.

3.2.6 Spezifische Oberfläche

Oliventrester der Partikelgröße 125 - 355µm wurde für die Ermittlung der spezifischen Oberfläche (S_{BET}) genutzt. Der Surface Area Analyser „Gemini 2360“ hat für die Besetzung der Oberfläche von 1,97g Trester folgende Stickstoffmenge ermittelt.

Trester-Fraktion	Einwaage [g]	adsorbierter N ₂ [mg]	adsorbierter N ₂ [mol]	q _m [mol/g]	S _m (N ₂) [m ²]	S _{BET} [m ² /g]
125-355	1.97	0.0383	$2.7 \cdot 10^{-6}$	$1.39 \cdot 10^{-6}$	$16.2 \cdot 10^{-20}$	0.14

Mit Kenntnis der adsorbierten Menge Stickstoff und des Gewichts des Tresters kann die spezifische Oberfläche nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$S_{BET} = N_A \cdot q_m \cdot S_m$$

mit N_A = Avogadro-Zahl ($6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
 S_m = Fläche, die von einem adsorbierten Stickstoffmolekül belegt wird ($16.2 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$)
 q_m = Stoffmenge des adsorbierten Stickstoffs

$$q_m = \frac{2.7 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}{1.97 \text{ g}} = 1.39 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1}$$

Somit ergibt sich für die spezifische Oberfläche:

$$S_{BET} = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot 1.39 \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 16.2 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2 = 0.14 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$$

Bei einer Porosität von über 40% ist die spezifische Oberfläche des Tresters mit 0,14 m²/g sehr gering (Aktivkohle kann eine spezifische Oberfläche von mehreren hundert Quadratmetern pro Gramm erreichen). Dies indiziert, dass in dem Trester kein stark verzweigtes Porensystem bestehend aus Makro-, Meso-, und Mikroporen vorliegt. Denkbar ist auch, dass der Ölanteil des Tresters (vgl. Punkt 3.1.2) die Poren belegt und somit Stoffaustauschfläche für die Polyphenolextraktion unzugänglich macht. Somit wäre das Entölen des Tresters eine sinnvolle Probenaufbereitung vor der Polyphenolgewinnung.

3.3 Optimierung der Extraktionsausbeute

Die Optimierung der Extraktionsausbeute stellt einen wichtigen Aspekt dar. Gerade weil es sich um die Extraktion von Minor-Komponenten handelt, entscheidet die Ausbeute stark über die Rentabilität des Vorhabens. Mit welchem Aufwand man welche Ausbeute erreicht determiniert nicht nur die Wirtschaftlichkeit, sondern auch die Auswirkungen auf die Umwelt. So hängt die benötigte Menge an Energie, Extraktionsmitteln, Chemikalien, usw. stark von den Anforderungen an die Extraktionsausbeute ab.

Eine einstufige diskontinuierliche Extraktion von unbehandeltem Oliventrester bei 20°C, mit Wasser als Extraktionsmittel und bei einem Trester-Extraktionsmittel-Verhältnis von 1:3 (w/v) dient als Referenz für die untersuchten ausbeuteerhöhenden Maßnahmen.

Der Verlauf dieser Extraktion über einen Zeitraum von 12 Tagen ist in der folgenden Grafik dargestellt. Die Phenolkonzentration ist berechnet als Tannin-Äquivalente.

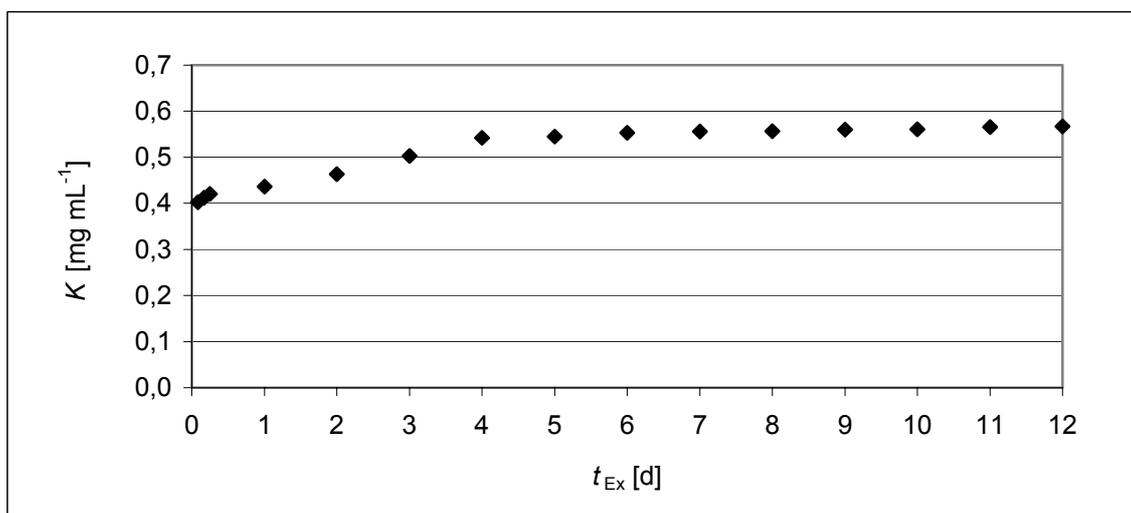


Abb. 26: Konzentration-Zeit-Verlauf

Erst nach einer Extraktionszeit von 4 Tagen wird eine maximale Konzentration von 0,542 mg·mL⁻¹ erreicht, die sich im weiteren Verlauf praktisch nicht mehr verändert. Dieser Wert wird in den weiteren Untersuchungen als Vergleichswert zur Beurteilung der angewandten Prozesse herangezogen.

3.3.1 Physikalische Prozesse zur Wirkstofffreisetzung

Temperatureinfluss

Vorversuche haben gezeigt, dass eine erhöhte Extraktionstemperatur die Extraktion stark beschleunigt.

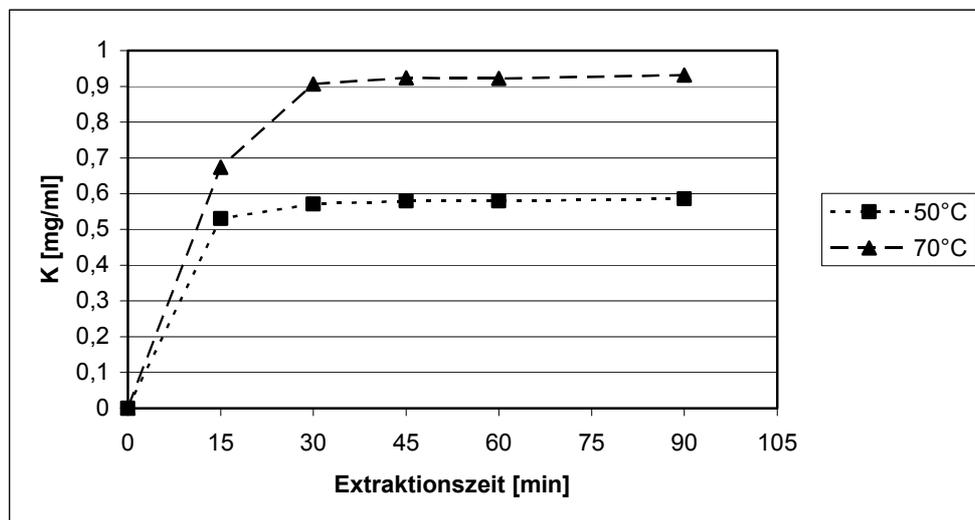


Abb. 27: Konzentration-Zeit-Verlauf bei 50°C und 70°C

Bereits nach ca. 30 Minuten wird eine annähernd maximale Phenolkonzentration erreicht. Dies geschieht bei der Referenz-Extraktion (bei 20°C) erst nach ca. 4 Tagen. Aus diesem Grund und um den Versuchsaufwand zu reduzieren wurden die Extraktionen zur Beurteilung des Temperatureinflusses abweichend von den Standardbedingungen bereits nach jeweils 30 Minuten abgebrochen.

Die nachfolgende Grafik zeigt die Phenolkonzentrationen der bei unterschiedlichen Temperaturen gewonnenen Extrakte.

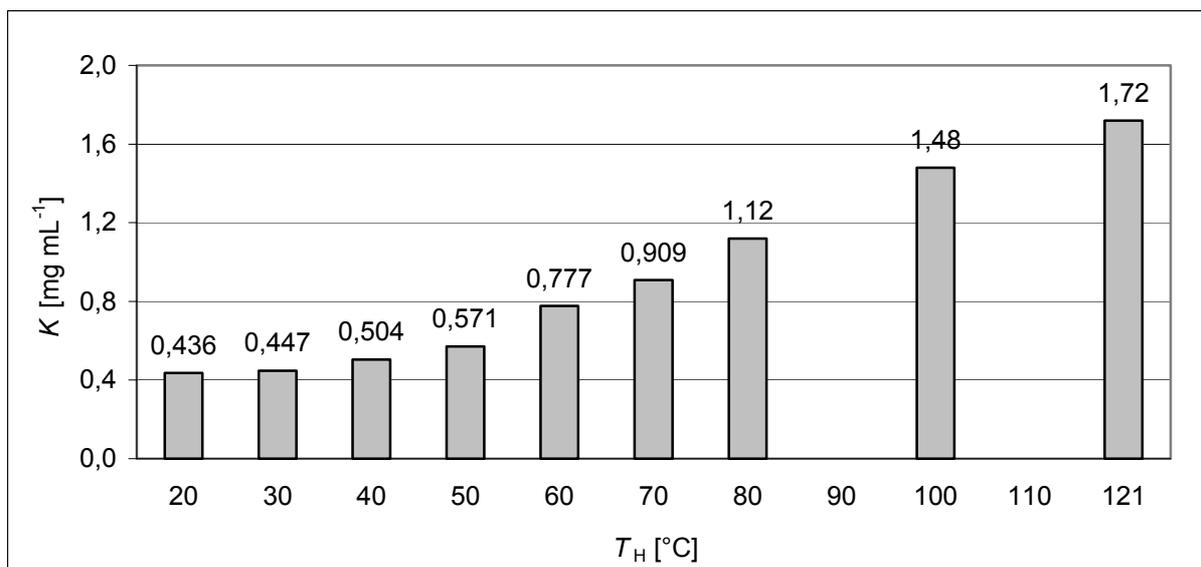


Abb. 28: Temperatureinfluss auf die Extraktion

Durch eine Erhöhung der Extraktionstemperatur lässt sich die Phenolkonzentration stark vergrößern. Die Konzentrationen bei 20, 30 und 40°C liegen unter dem Vergleichswert von $0,542 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dies ist einfach dadurch zu erklären, dass hier nach den 30 Minuten Extraktionszeit noch nicht die Maximalkonzentration erreicht wurde. Hier ist der beschleunigende Effekt einer erhöhten Temperatur noch nicht stark genug. Bei einer Temperatur von 50°C erzielt man bereits nach 30 Minuten eine Konzentration, die auch nach sehr langer Extraktion bei 20°C nie erreicht wird. Ab der Temperatur von 50°C nimmt die Konzentration mit steigender Temperatur bis zur höchsten, untersuchten Temperatur nahezu linear zu.

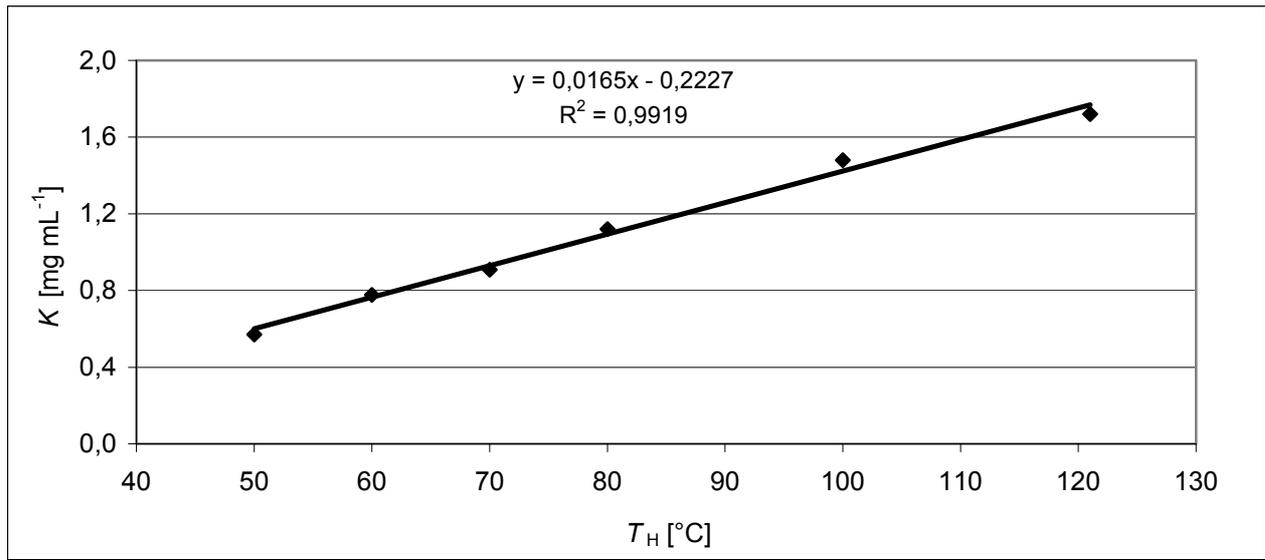


Abb. 29: linearer Konzentrationsanstieg in Abhängigkeit von der Temperatur

Die verbesserte Extraktstoffausbeute ist auf verschiedene Effekte zurückzuführen. Die Eigenschaften des Extraktionsmittels, des Extraktstoffs und des Trägers ändern sich bei erhöhter Temperatur. Aus dem Nernstschen Verteilungssatz geht hervor, dass die Verteilung des Extraktstoffs auf Träger und Extraktionsmittel temperaturabhängig ist [137, 166].

$$\text{NERNST-Verteilungssatz: } \frac{c_L}{c_{TR}} = k(p, T)$$

Die Wasserstoffbrückenbindungen der Wassermoleküle werden bei höherer Temperatur zunehmend getrennt. Dichte und Viskosität des Extraktionsmittels Wasser sinken, und die Energie, die zum Lösen der Phenole aufgewandt werden muss, ist geringer [8, 162].

Durch die veränderten Eigenschaften des Extraktionsmittels steigt die stoff- und temperaturabhängige Grenzflächenkonzentration. Damit vergrößert sich das Konzentrationsgefälle an der Phasengrenze, das treibende Gefälle der Diffusion. Nach dem FICK'schen Gesetz läuft diese somit schneller ab [166].

$$\text{FICK'sches Gesetz: } \frac{m_E}{t} = -D \cdot F \cdot \frac{dc}{ds}$$

Die in der Zeit, t diffundierende Extraktstoffmasse, m_E ist proportional zur Austauschfläche, F und zum Konzentrationsgefälle, dc/ds .

Neben den Eigenschaften des Extraktionsmittels wirkt sich eine Temperaturerhöhung auch auf die Eigenschaften des Extraktstoffs, die Phenole, aus. Der Diffusionskoeffizient, D ist direkt proportional zur Temperatur, T [141, 166].

$$D \approx \frac{T}{\eta \cdot r}$$

Bei höherer Temperatur steigt die Molekülgeschwindigkeit und das Molekül entkommt den anziehenden Kräften der Nachbarmoleküle leichter. Der Diffusionskoeffizient, D steigt infolgedessen und die Diffusion verläuft schneller. Auf der anderen Seite bewirkt auch die Abnahme der Viskosität, η des Extraktionsmittels eine Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten [8].

Weiterhin werden durch höhere Temperaturen mehr Polysaccharide aus den Zellwänden gelöst, wodurch sich ebenfalls eine bessere Ausbeute an Inhaltsstoffen ergibt. Unter erhöhter Temperatur wird das unlösliche Protopektin der Pflanzenzelle in lösliches Pektin überführt. Dabei lösen sich die Bindungen zwischen den Pektinmolekülen untereinander und die Bindungen mit Cellulose und Hemicellulose auf. Eine Zerstörung des Zellverbandes ist die Folge. Teilweise geht auch Hemicellulose in Lösung. Cellulose ist gegenüber Erhitzen weitgehend inert. Bei höherer Temperatur werden zusätzlich Zellwandproteine denaturiert [161].

Aus den Versuchen kann abgeleitet werden, dass die Polyphenolextraktion unter erhöhter Temperatur durchgeführt werden sollte. Die Ausbeute kann deutlich gesteigert werden. Weiterhin verkürzt sich die Extraktionszeit sehr stark. Aufgrund der starken Zeitverkürzung ist es wahrscheinlich trotz des Energieaufwandes für die Erwärmung wirtschaftlicher und umweltfreundlicher, wenn unter erhöhter Temperatur extrahiert wird. Ein Nachteil der erhöhten Temperatur ist, dass auch andere Substanzen des Tresters vermehrt in das Extraktionsmittel übergehen und somit einen noch größeren Anteil des Gesamtextraktstoffs ausmachen. Eine optimale Extraktionstemperatur kann ohne weiterführende Untersuchungen noch nicht empfohlen werden. Hierfür muss überprüft werden, ab welcher Temperatur unerwünschte Reaktionen auftreten und ab wann zu viele Nicht-Polyphenol-Extraktstoffe aus dem Trester gelöst werden.

Trocknen

Getrockneter Oliventrester wurde in dem gleichen Trestartrockenmasse-Extraktionsmittel-Verhältnis wie bei der Standardextraktion extrahiert.

	K [mg·mL⁻¹]
unbehandelt	0,542
Einwaage entsprechend der Trockenmasse	0,678

Alleine durch das Trocknen des Rohmaterials kann die Ausbeute um ca. 25% gesteigert werden. Durch den Trocknungsprozess scheint das Zellgewebe spröder und poröser zu werden, so dass die Phenole vermehrt freigesetzt werden können. Evtl. ist eine Denaturierung von Zellmembranproteinen für eine erhöhte Durchlässigkeit verantwortlich [161].

Der Trocknungsprozess ist energieaufwändig. Allerdings bringt eine Trocknung mehrere Vorteile mit sich:

- Ausbeuteerhöhung um ca. 25%
- verbesserte Lagerstabilität
- Transport wird ökonomischer und umweltfreundlicher (Gewichtsreduktion um mehr als die Hälfte)

Aus diesen Gründen wird eine möglichst schonende Trocknung des Oliventresters vorgeschlagen.

Vermahlen und Fraktionierung

Zentrifugalmühle

Oliventrestler wurde mit einer Zentrifugalmühle vermahlen. Zum einen wurde die gesamte Mahlgutfraktion extrahiert; zum anderen wurde das Mahlgut durch eine Siebklassierung in unterschiedliche Partikelgrößefraktionen aufgeteilt und diese wurden getrennt voneinander extrahiert. Die Gesamtphenol-Konzentrationen der resultierenden Extrakte sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

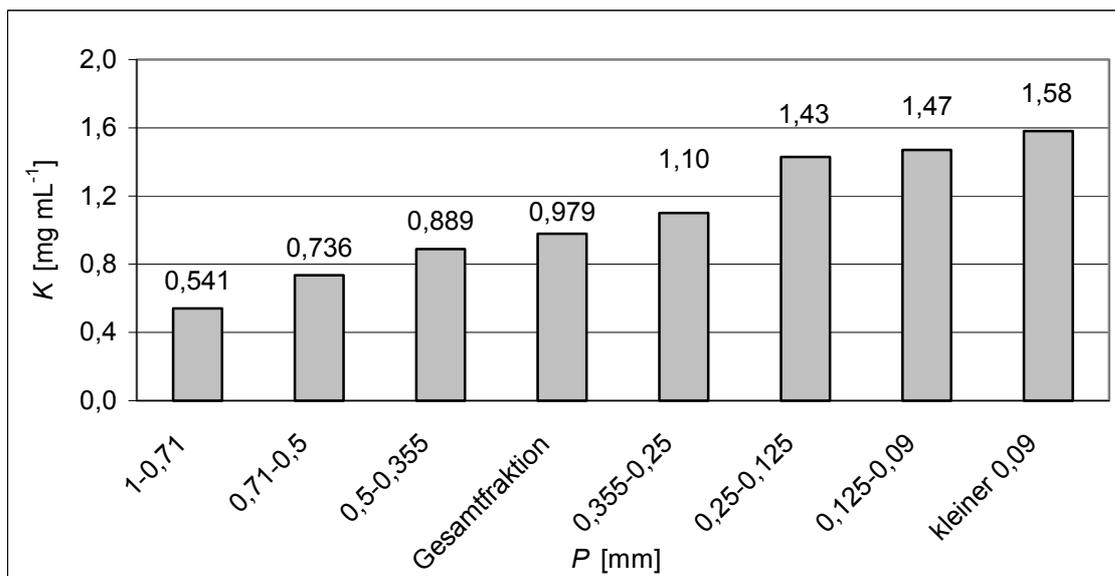


Abb. 30: Extraktion von Trester unterschiedlicher Partikelgröße

Weiterhin wurde die Kernfraktion des Tresters von der Fruchtfleischfraktion getrennt (vgl. 2.2.2.1). Von den getrennten Fraktionen wurde wiederum jeweils die Fraktion der Partikelgröße von 0,355 bis 0,25 mm einer Extraktion unterworfen.

Tresterbestandteil	Partikelgröße [mm]	K [mg·mL ⁻¹]
Kerne	0,355-0,25	0,548
Fruchtfleisch	0,355-0,25	2,66

Die Vermahlung ist eindeutig eine ausbeuteerhöhende Maßnahme. Bei den Konzentrationen der einzelnen Partikelgrößefraktionen überlagern sich jedoch zwei Effekte, die den Einfluss der Partikelgröße größer erscheinen lassen als er eigentlich ist. Die Steine haben andere Vermahlungseigenschaften als das Fruchtfleisch. Sie lassen sich schwerer und langsamer vermahlen. Daher wird bei der anschließenden Siebklassierung der Kernanteil bei jeder weiteren Klassierung abgereichert. Somit enthalten die feineren Fraktionen weniger Kernanteile als die größeren, was auch mit bloßem Auge anhand der Farbe zu erkennen ist.



Abb. 31: unterschiedliche Partikelgrößefraktionen des vermahlenden Tresters

Der höhere Kernanteil in den gröberen Fraktionen ist an der größeren Anzahl hellbrauner Partikeln zu erkennen.

Das Fruchtfleisch hat einen annähernd fünf mal höheren Polyphenolgehalt als die Kerne. Somit sind die sehr hohen Ausbeuten der feinen Fraktionen nicht nur auf die Zerkleinerung sondern auch auf die Abreicherung des Kernanteils zurückzuführen.

Dennoch ist eine Vermahlung eine wichtige und gleichzeitig wenig aufwändige Maßnahme. Zu kleine Partikelgrößen bringen jedoch Nachteile für Handhabung und Prozessführung mit sich. So kann beispielsweise bei kleinen Partikelgrößen aufgrund der stärkeren Schwell- und Wasserbindungseigenschaften das Extraktionsmittel schwerer und unvollständiger abgetrennt werden und folglich verbleiben mehr Extraktstoffe in dem Trester.

Kugelmühle

Nach einer Nassvermahlung mit der Kugelmühle kann die Extraktstoffausbeute um ca.15% gesteigert werden.

	K [mg·mL⁻¹]
unbehandelt	0,542
Kugelmühle	0,636

Diese Art der Vermahlung bietet den Vorteil, dass das Rohmaterial nicht getrocknet werden muss. Allerdings ist das Zerkleinerungsergebnis nicht gut (vgl. 3.2.1). Außerdem ist das Prinzip einer Kugelmühle im industriellen Maßstab nicht praktikabel (kleine Mahlbecher, keine kontinuierliche Arbeitsweise). Des Weiteren stellt die Trocknung des Tresters eine empfehlenswerte Maßnahme dar, so dass der Vorteil einer Nassvermahlung relativiert wird.

Ultraschall-Extraktion

Ultraschall zerstört Zellen, verteilt das Extraktionsmittel und erhitzt es gleichzeitig. Der Einfluss, den das Verteilen des Extraktionsmittels durch Ultraschall auf das Extraktionsergebnis hat, ist in dem vorliegenden Fall aufgrund der Extraktionsdauer von vier Tagen zu vernachlässigen. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Extraktion unter höherer Temperatur eine höhere Extraktstoffkonzentration erreicht wird. Bei der Ultraschallextraktion wird dieser Effekt durch Kühlen in einem Eisbad und durch die Intervallbehandlung unterbunden. Ohne Kühlen ist aufgrund der höheren Temperatur mit einer erhöhten Phenolkonzentration zu rechnen.

	K [mg·mL⁻¹]
unbehandelt	0,542
Ultraschall	0,523

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Ultraschall keine Steigerung der Extraktstoffausbeute erzielt werden kann. Eine Ultraschallbehandlung unter den gewählten Bedingungen (Frequenz: 20kHz, Leistung: 350W) ist demnach nicht geeignet, die stabile Zellstruktur des Tresters zu zerstören.

Einfrieren

Durch die Bildung von Eiskristallen können pflanzliche Zellen zerstört und Inhaltsstoffe freigesetzt werden. In Vorversuchen hat sich jedoch gezeigt, dass dies bei unbehandeltem Trester, vermutlich durch seinen Restgehalt an Öl, nicht der Fall ist. Bei zunächst getrocknetem, dann entöltem und anschließend wiederbefeuchtetem Trester konnte durch Einfrieren eine starke Ausbeuteerhöhung erreicht werden. Die Gefriereschwindigkeit und somit die Größe der sich bildenden Eiskristalle macht hierbei keinen Unterschied aus.

T [°C]	K [mg·mL⁻¹]
unbehandelt	0,542
-70	1,02
-18	1,06

Durch die Abfolge von notwendigen Behandlungsschritten ist dieser Prozess allerdings als unpraktikabel und sehr energieaufwendig abzulehnen.

3.3.2 Biochemische Wirkstofffreisetzung

Die Ansätze mit den Enzympräparaten Olivex, Rohavin CXL + Rohapect MA plus, Rohapect VR-C und Rohament CL + Rohavin CXL zeigen keinen Einfluss auf die Phenolkonzentration im Extrakt. Die Konzentrationen der Extrakte, bei denen durch die Wirkung von Enzymen eine Veränderung der Extraktstoffkonzentration erreicht wurde, sind mit den entsprechenden Kontrollen in der folgenden Tabelle dargestellt.

Probe	K [mg·mL ⁻¹]	ΔK bezogen auf die Kontrolle [mg·mL ⁻¹]
Kontrolle Laccase	0,929	
Laccase	0,471	-0,458
Kontrolle Corolase 7089 + Rohapect CM	1,22	
Corolase 7089 + Rohapect CM	1,34	0,120
Kontrolle Corolase 7089 + Corolase LAP	1,23	
Corolase 7089 + Corolase LAP	1,39	0,160

Das Enzympräparat OLIVEX, eine Mischung aus Pektinasen, Hemicellulasen und Cellulasen, führt im Vergleich mit dem Kontrollansatz ohne Enzymzugabe nicht zu einer höheren Phenolkonzentration im Extrakt. Da das Enzympräparat in der Lage ist, isolierte Olivenpolysaccharide zu 90% in Oligomere und Monomere zu spalten, kann man davon ausgehen, dass die Enzyme durch die Phenole des Oliventresters inaktiviert werden. Dies ist durchaus denkbar, weil Proteindenaturierung eine typische Eigenschaft von einigen Phenolen ist [167].

Durch die Kombination der Pektinasen Rohavin CXL und Rohapect MA plus und die Kombination der Cellulase Rohament CL mit der Pektinase Rohavin CXL ist ebenfalls keine Erhöhung der Extraktstoffausbeute gegenüber der Kontrolle zu erreichen. Bei dem Enzymansatz und der Kontrolle kann optisch eine Zelldesintegration beobachtet werden. Da diese Auflösung des Zellverbandes bei Ansatz und Kontrolle auftritt, ist sie auf die teilweise Auflösung des Pektins der Mittellamellen während der Behandlung bei 50 °C im Wasserbad zurückzuführen und nicht auf die Wirkung der Pektinasen [14, 161]. Ein Abbau der primären und sekundären Zellwand sowie der Cellulosemembran der Vakuolen durch die Cellulase Rohament CL findet trotz Zelldesintegration nicht statt, was ebenfalls auf die Hemmung der Enzyme durch die Phenole zurückgeführt wird [46, 167].

Die Anwendung der Laccase führt zu einer Verringerung der Phenolkonzentration im Vergleich zur Kontrolle. Ziel des Einsatzes der Laccase ist die Spaltung von Lignin. Damit sollen Zellinhaltsstoffe aus den ligninreicheren Olivenkernzellen verfügbar werden [126]. Anscheinend oxidiert die Laccase (Phenoloxidase) jedoch auch die Olivenpolyphenole, die hierdurch chemisch modifiziert werden und somit auch nicht mehr von dem Folin-Ciocalteu-Test erfasst werden [139].

Lediglich mit der Endo-Proteinase Corolase 7089 kann in Kombination mit der Exo-Proteinase Corolase LAP eine leichte Erhöhung der Phenolausbeute um 13 % und in Kombination mit der Cellulase Rohapect CM um 9,8 % im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erreicht werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht der Restölanteil, wie zunächst angenommen, eine Schutzschicht um die Oliventresterpartikeln bildet und die Enzyme hemmt. Nach enzymatischem Aufschluss von entöltem Trester kann nachgewiesen werden, dass die verwendeten Enzyme keinen bzw. nur geringen Einfluss auf die Phenolkonzentration und damit auf die Struktur der Zellwände ausmachen, da sie durch die Phenole im Oliventrester gehemmt werden.

Ein enzymatischer Aufschluss ist aufgrund dieser Ergebnisse nicht geeignet, die Extraktion von Phenolen aus Oliventrester zu fördern.

3.3.3 Chemische Wirkstofffreisetzung

Extraktion im alkalischen Milieu

Die folgende Grafik zeigt die Konzentrationen der Extrakte, die durch unterschiedliche Mengen an Natriumhydroxid (NaOH) im Extraktionsmittel gewonnen wurden, im Vergleich zu einem wässrigen Extrakt aus unbehandeltem Trester.

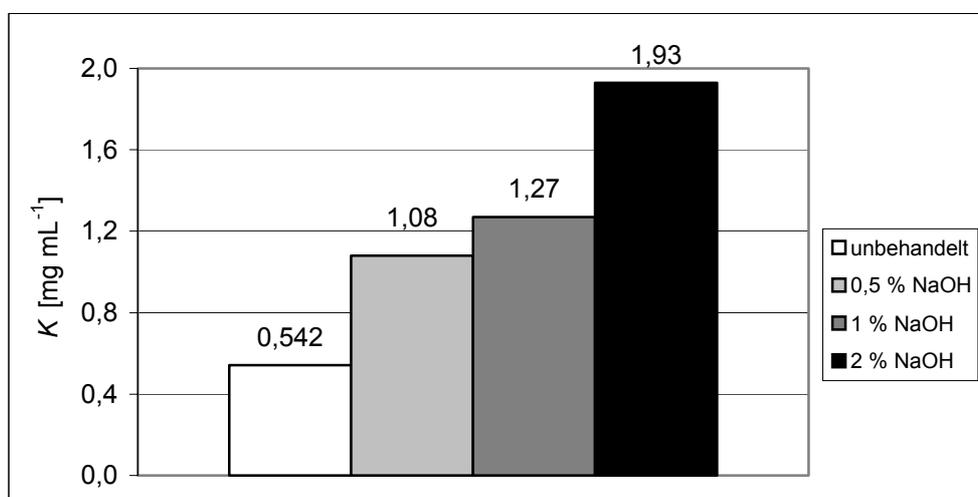


Abb. 32: Extraktion im alkalischen Milieu

Durch Extraktion mit 2 %iger Natronlauge (w/v) kann eine sehr hohe Phenolkonzentration von 1,93 mg·mL⁻¹ erreicht werden. Dies entspricht einer Steigerung um 256 % gegenüber einem Extrakt aus unbehandeltem Oliventrester.

Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Zerstörung der Olivenzellwände durch die Natronlauge zurückzuführen. Insbesondere Pektin ist in alkalischem Milieu nicht stabil und wird schon bei Raumtemperatur in Oligomere gespalten. Auch Hemicellulose kann durch starke Basen extrahiert werden [8, 15, 85, 161].

In wässrigen Extraktionsmitteln ist die Zugabe von Alkali sehr zu empfehlen. Es muss allerdings überprüft werden, ob die Polyphenole alkalistabil sind und nicht ihre Wirksamkeit verlieren.

Extraktion im sauren Milieu

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Extraktionsergebnisse mit angesäuertem Wasser als Extraktionsmittel.

pH-Wert	K [mg·mL⁻¹]
2	0,844
4	0,599

Auch durch Extraktion im sauren Milieu kann die Phenolausbeute gesteigert werden. Die Phenolkonzentration ist umso höher, je niedriger der pH-Wert liegt.

Beim chemischen Zellaufschluss durch Säure löst diese die Bindungen zwischen den Monomeren der Polysaccharide, insbesondere des Pektins. Dabei werden bei der Abspaltung von Rhamnose-Molekülen innerhalb des Pektins gleichzeitig Polysaccharid-Seitenketten, die an Rhamnose gebunden sind, abgetrennt [161]. Bei pH 3,0 - 4,0 ist Pektin stabil. Erst bei weiterem Absinken des pH-Werts werden die Bindungen der Pektinmonomere hydrolysiert [15]. Durch Extraktion bei einem pH-Wert von 2,0 kann die Phenolausbeute um 55,7 % erhöht werden. Dieser Effekt der Zellschädigung wird nur bei diesem geringen pH-Wert erreicht. Die geringe Konzentrationserhöhung um 10,5 % bei pH 4,0 ist evtl. auf eine teilweise Denaturierung von Zellwandproteinen, aber nicht auf eine Spaltung von Pektin zurückzuführen [15, 157].

Allerdings ist der Effekt der Zellschädigung weniger stark als bei der Verwendung von Natronlauge. Oliven besitzen einen hohen Gehalt an Cellulose und Hemicellulose. Diese Polysaccharide können nur durch starke Laugen aber nicht durch Säuren gespalten werden.

Ethanolisches Extraktionsmittel

Die Extraktion mit unterschiedlichen Ethanolanteilen im Extraktionsmittel wurde mit entöltem Trester durchgeführt. Die nachfolgende Grafik zeigt die Gesamtphenolkonzentration der Extrakte in Abhängigkeit vom Ethanolanteil des Extraktionsmittels, *E*.

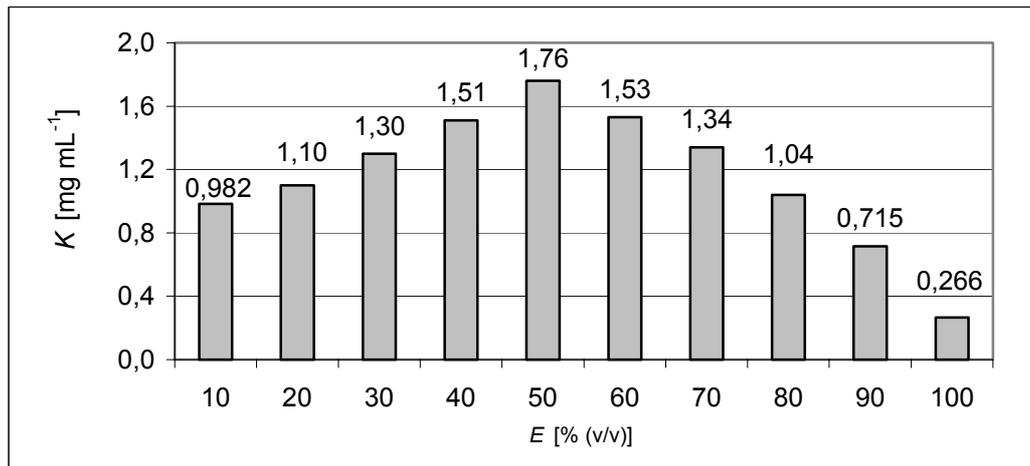


Abb. 33: Extraktion mit unterschiedlichen Anteilen an Ethanol

Durch die Zugabe von Ethanolanteilen kann die Ausbeute stark erhöht werden, wobei ein Wasser-Ethanol-Verhältnis von 1:1 die höchste Konzentration erbracht hat. Durch die Ethanolanteile ändern sich die Eigenschaften des Extraktionsmittels, wie z.B. die Polarität, Dichte und Viskosität. Hierdurch werden nicht nur unterschiedliche Mengen an Phenolen aus dem Trester gelöst, sondern auch ein unterschiedliches Spektrum an Substanzen. Welches Phenol-Spektrum im Sinne des Projektes die stärksten antimikrobiellen Eigenschaften ausübt kann auf Grund dieses Versuches nicht gesagt werden. Es kann jedoch gezeigt werden, dass durch die Variation des Extraktionsmittels auch die Ausbeute entscheidend verändert werden kann.

Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit, Betriebssicherheit und Umweltverträglichkeit ist Wasser als Extraktionsmittel anderen organischen Lösungsmitteln vorzuziehen. Wenn aber andere Extraktionsmittel ein wirksameres Phenolspektrum aus dem Trester zu extrahieren vermögen, dann ist dies im Sinne des Projektes ein sehr wichtiger Aspekt, so dass die genannten Nachteile in Kauf genommen werden müssen.

3.4 Modifikation des Wirkungsspektrums

3.4.1 Extraktionsmittelauswahl

Die Wahl des Extraktionsmittels ist der wichtigste Parameter einer Extraktion. Hierdurch wird das Spektrum an Substanzen bestimmt, die aus den Feststoffen herausgelöst werden. Weiterhin werden durch die Wahl des Extraktionsmittels Parameter wie Selektivität, Aufnahmekapazität für Extraktstoff, Ausbeute, aber auch Aspekte wie Wirtschaftlichkeit, Toxizität und Betriebssicherheit festgelegt. Weitere, generelle Anforderungen an ein Extraktionsmittel sind

- chemische und thermische Beständigkeit, um Verunreinigungen des Extraktstoffes und Extraktionsmittelverluste zu vermeiden
- niedrige Viskosität zur Erleichterung des Stofftransports
- geringer Dampfdruck bei Extraktionstemperatur zur Vermeidung von Extraktionsmittelverlusten

- leichte Abtrennbarkeit des Extraktionsmittels aus dem Extrakt, zur Erleichterung der Gewinnung des extraktionsmittelfreien Extraktstoffs und der Rückgewinnung des Extraktionsmittels
- geringer Preis und geringe Korrosionsneigung

In diesem Projekt geht es darum, das Spektrum an Substanzen aus dem Oliventrester zu extrahieren, welches die höchste fungizide Wirksamkeit aufweist. Deshalb wurden mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, die für eine Polyphenolextraktion in Frage kommen, Extrakte hergestellt und diese untereinander in ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit verglichen. Die untersuchten Lösungsmittel sind

- Wasser
- Ethanol
- Methanol
- Aceton
- Ethylacetat
- Acetonitril
- Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1), pH=9

Die Extraktion mit einem Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1) bei einem pH-Wert von pH=9 ist eine Schlussfolgerung aus den Versuchen zur Optimierung der Ausbeute. Die Optimierung des Extraktionsmittels ist noch nicht abgeschlossen. Hierzu werden noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Vor den eigentlichen Polyphenolextraktionen wird der Oliventrester getrocknet und es wird mit Hexan eine lipophile Extraktion durchgeführt, um den Restölanteil des Tresters zu entfernen. Hierfür wird der Trester zunächst getrocknet. Das erleichtert das Eindringen des hydrophoben Hexans in den Oliventrester. Das Entölen ist notwendig, weil die ausgewählten Extraktionsmittel zum Teil auch das Öl aus dem Trester lösen würden, welches dann einen Großteil des Gesamtextraktstoffs ausmachen würde. Außerdem hat sich das Trocknen und Entölen als ausbeuteerhöhende Maßnahme erwiesen.

Eine 4-stufige, lipophile Hexanextraktion (4 sukzessive Extraktionen für jeweils 1 Stunde, Trester-Lösungsmittel-Verhältnis 1:4 (w/v), T = 20°C) hat nachfolgende Ergebnisse gebracht.

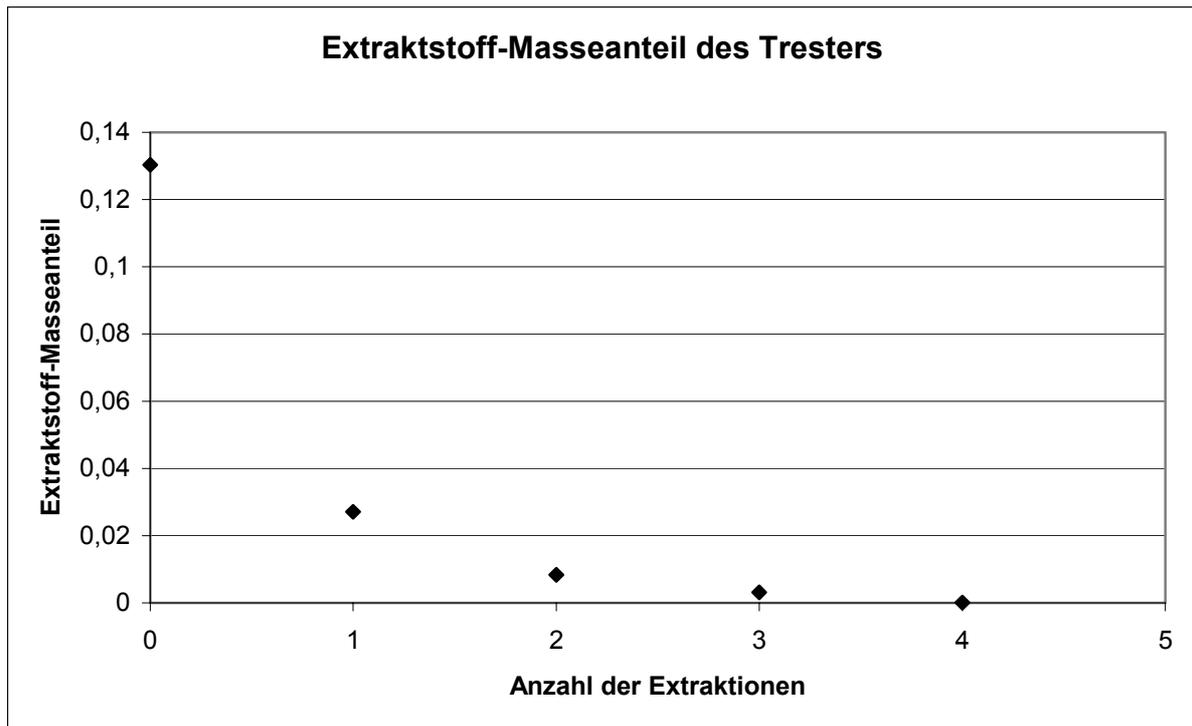


Abb. 34: Verlauf Extraktstoff-Masseanteil bei 4 sukzessiven Hexanextraktionen

Der Extraktstoff-Masseanteil im Feststoff μ errechnet sich wie folgt:

$$\mu = \frac{m_E - m_{ES}}{m_R}$$

mit m_E = Masse des Extraktstoffes
 m_{ES} = Masse des Extraktstoffes im Lösungsmittel
 m_R = Masse des Rückstands/Trägerstoffs

Der Extraktionsgrad φ dient als Bewertungsgröße der Extraktionsergebnisses. Er errechnet sich wie folgt:

$$\varphi = \frac{m_{E,R}}{m_E} = \frac{m_{S,R}}{m_{S,R} + m_{S,L}}$$

mit $m_{E,R}$ = Masse des Extraktstoffs im Rückstand
 $m_{S,R}$ = Masse des im Rückstand verbleibenden Lösungsmittels
 $m_{S,L}$ = Masse des abgetrennten Extraktionsmittels

Der Extraktionsgrad verläuft für die Hexan-Extraktion wie folgt:

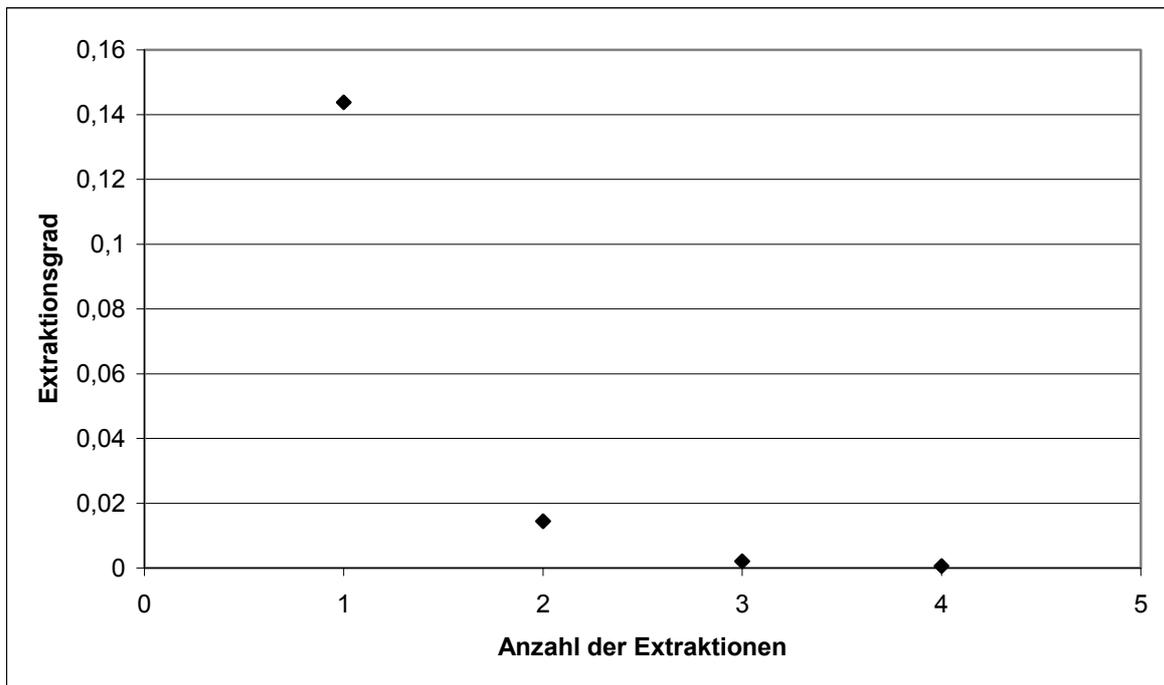


Abb. 35: Verlauf des Extraktionsgrads bei 4 sukzessiven Hexanextraktionen

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, dass drei sukzessive Extraktionen den Restölanteil auf ein ausreichend kleines Maß reduzieren.

Bei einer industriellen Anwendung dieses Prozesses kann das Hexan zu einem sehr hohen Prozentsatz zurückgewonnen werden. Das anfallende Olivenöl kann als Tresteröl zum menschlichen Verzehr verwendet werden. Allerdings muss es zuvor raffiniert werden.

Die Polyphenolextraktionen wurden als 2-stufige, diskontinuierliche Extraktionen durchgeführt. Die Gesamtpolyphenolkonzentration, der Gesamttrockenmassegehalt, der prozentuale Anteil der Phenole am Gesamtextraktstoff, das Verhältnis zwischen der Phenolkonzentration des Extraktes 1 zu der Konzentration des Extraktes 2 und das Verhältnis zwischen den Trockenmassekonzentrationen der 2 Extrakte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Extrakt	Gesamtphenolkonz. [mg/100ml]	Tr.masse [% (w/v)]	Phenolanteil am Gesamt- Extraktstoff [%]	Verhältnis Extr 1/Extr 2	Verhältnis Tr.m 1/Tr.m 2
Wasser 1	112,6	0,84	13,4		
Wasser 2	57,6	0,30	19,2	1,95	2,80
Ethanol 1	102,9	1,29	8,0		
Ethanol 2	24,3	0,27	9,0	4,23	4,78
Methanol 1	138,3	1,30	10,6		
Methanol 2	41,7	0,27	15,5	3,31	4,81
Aceton 1	63,8	0,83	7,7		
Aceton 2	18,4	0,25	0,0	3,47	3,32
Ethylacetat 1	16,2	0,06	27,0		
Ethylacetat 2	15,7	0,04	39,3	1,03	1,50
Acetonitril 1	67,3	0,25	26,9		
Acetonitril 2	16,7	0,10	16,7	4,03	2,50
H2O:EtOH 1:1 pH=9 1	346,0	1,40	24,7		
H2O:EtOH 1:1 pH=9 2	145,4	0,64	22,7	2,38	2,19

Es ist eindeutig zu erkennen, dass der Einfluss auf die Polyphenolausbeute sehr hoch ist. Während beispielsweise das Wasser-Ethanol-Gemisch erwartungsgemäß (vgl. 3.3.3) hohe Ausbeuten erzielt, ist die Polyphenolausbeute bei der Extraktion mit dem unpolaren Ethylacetat sehr niedrig. Der Phenolanteil an der Trockenmasse ist ein Maß für die erzielte Selektivität. Sie ist bei Ethylacetat am besten; jedoch ist diese Extraktion trotz der guten Selektivität aufgrund der geringen Ausbeute unbefriedigend. Die Verwendung des Wasser-Ethanol-Gemisches im alkalischen Milieu führt zu einer hohen Trockenmassekonzentration. Das war zu erwarten, weil in diesem Milieu ansonsten unlösliche Zellwandbestandteile gelöst werden können. Aufgrund der gleichzeitig sehr guten Ausbeute an Polyphenolen ist die Selektivität trotzdem als gut zu bewerten. Wenn das Verhältnis der Phenolkonzentrationen groß ist (wie zum Beispiel bei Ethanol), dann kann eine annähernd vollständige Extraktion dieser Stoffe in wenigen aufeinanderfolgenden Extraktionen erreicht werden. Hohe Werte sind also vorteilhaft und bedeuten, dass nur geringe Mengen an Extraktionsmittel benötigt werden. Wenn das Verhältnis der beiden Trockenmassekonzentrationen größer ist als das Verhältnis der Phenolkonzentrationen, dann bedeutet dies, dass der Übergang der Nicht-Phenol-Extraktstoffe ins Lösungsmittel schneller und leichter abläuft als der Übergang der Phenole. In diesen Fällen ist der Phenolanteil am Gesamtextraktstoff in dem 2. Extrakt höher als im ersten. Dieses Kriterium kann man ebenfalls zur Bewertung der Selektivität nutzen. In dieser Hinsicht ist Acetonitril ein gutes Extraktionsmittel für die Olivenpolyphenole.

Die Ausbeuten sind bei den nachgeschalteten mikrobiologischen Untersuchungen nicht von Belang, da hier alle Extraktstoffe in Wasser überführt werden und auf die gleichen Phenolkonzentrationen eingestellt werden.

Aufgrund des sehr großen Aufwandes und Umfangs der Versuche konnten diese mikrobiologischen Untersuchungen nur mit drei Organismen, bei Extrakten mit sehr geringer Ausbeute nur mit 2 Organismen durchgeführt werden. Leider war bei den Versuchen ein Großteil der hemmstofffreien Kontrollplatten wegen Kontaminationen nicht auswertbar. Deshalb konnten nicht die prozentuale Wachstumsinhibierung berechnet werden. Stattdessen wird der Myceldurchmesser der Pilze auf den unterschiedlichen Platten direkt miteinander verglichen.

Die folgenden Grafiken zeigen den direkten Vergleich der Hemmwirkung auf *Fusarium culmorum*. Die Phenolkonzentrationen wurden bei diesen Versuchen jeweils auf die Werte

150mg/100ml, 120mg/100ml, 90mg/100ml und 60mg/100ml eingestellt. Der wässrig-ethanolische Extrakt wurde nur in der Konzentration 90mg/100ml eingesetzt.

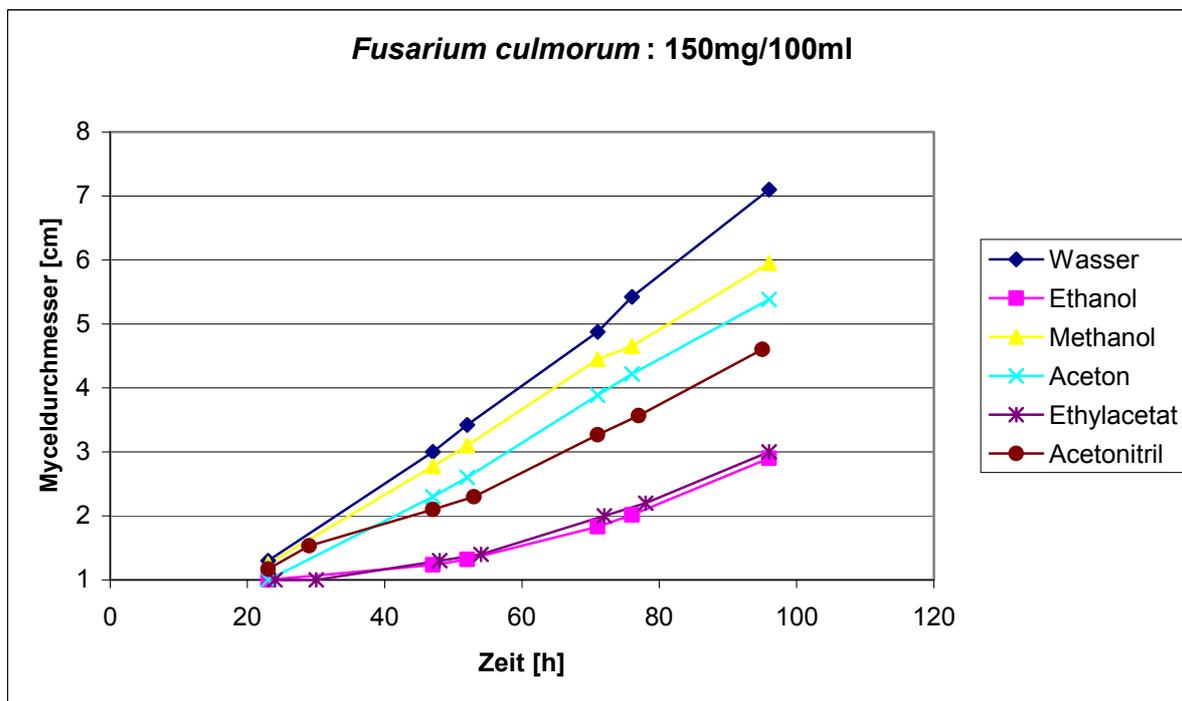


Abb. 36: Wachstum von *F.culmorum* bei 150mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

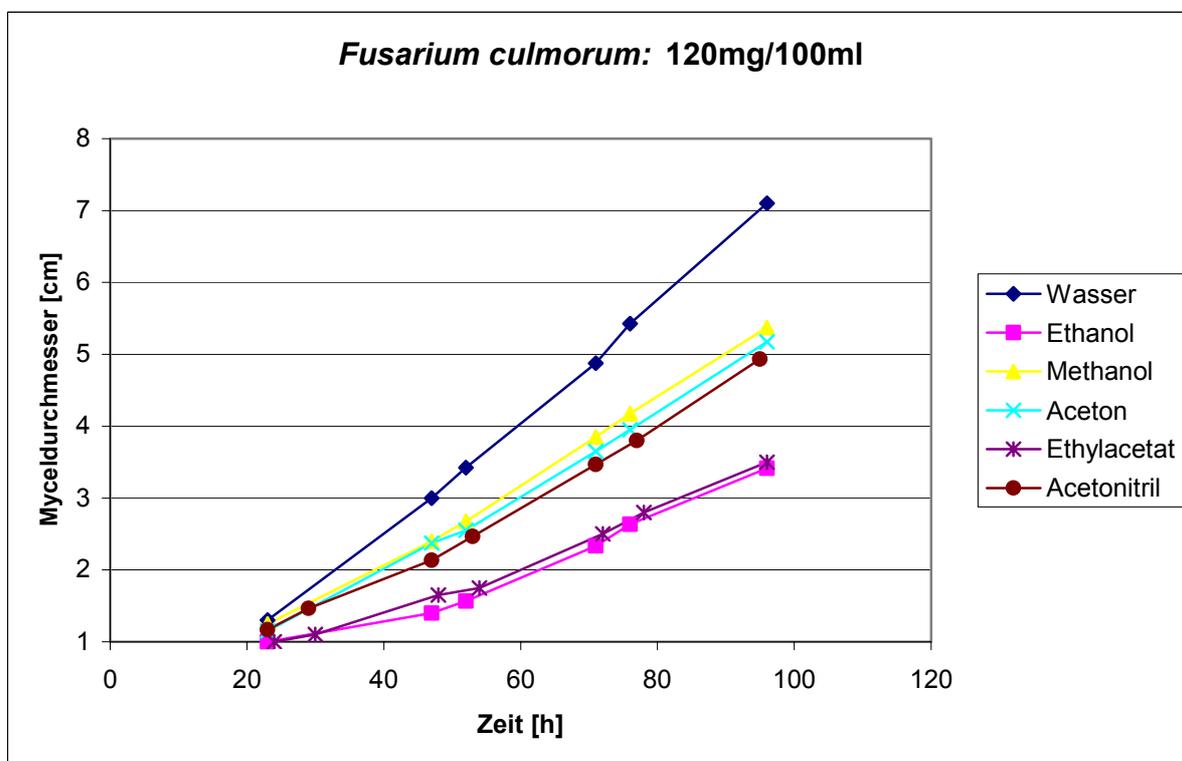


Abb. 37: Wachstum von *F.culmorum* bei 120mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

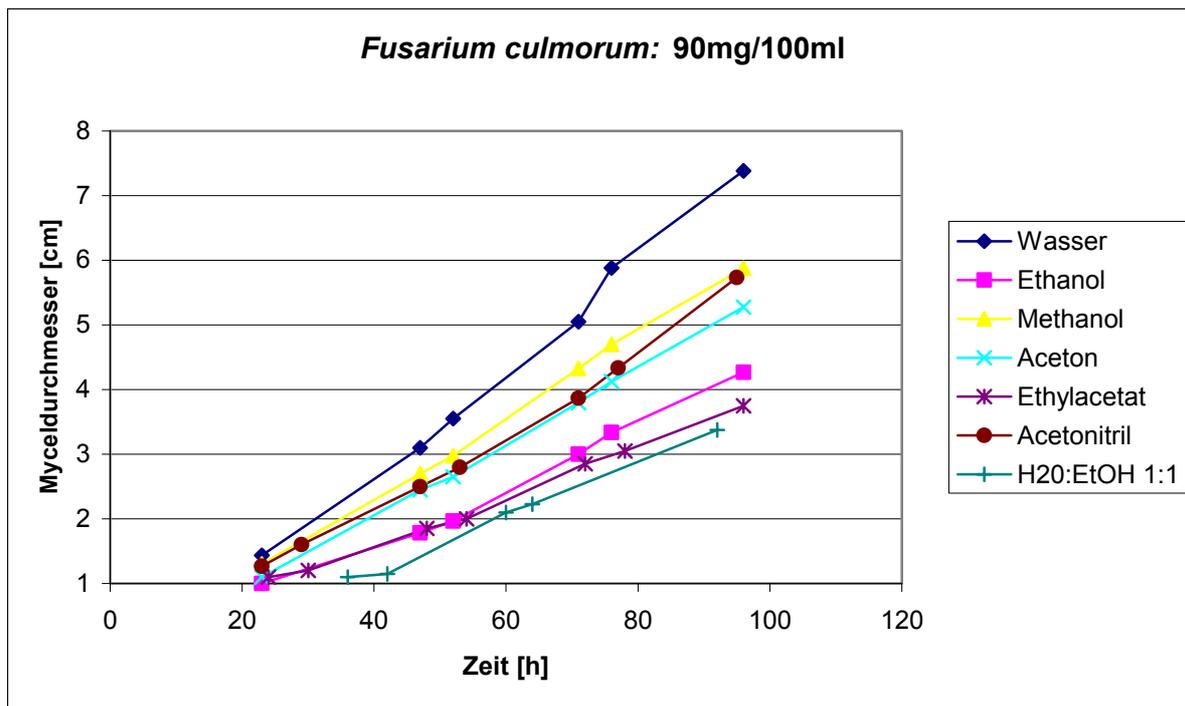


Abb. 38: Wachstum von *F. culmorum* bei 90mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

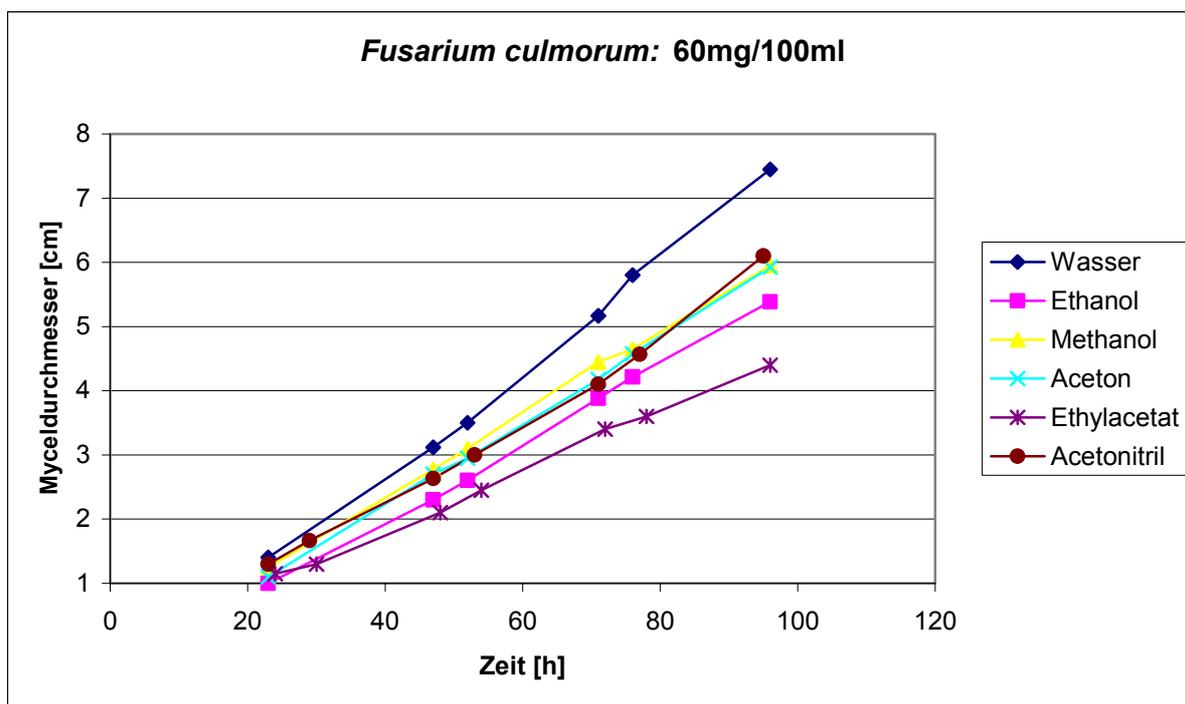


Abb. 39: Wachstum von *F. culmorum* bei 60mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

Die nächsten Diagramme zeigen die unterschiedlichen Hemmwirkungen auf *Phytophthora infestans*.

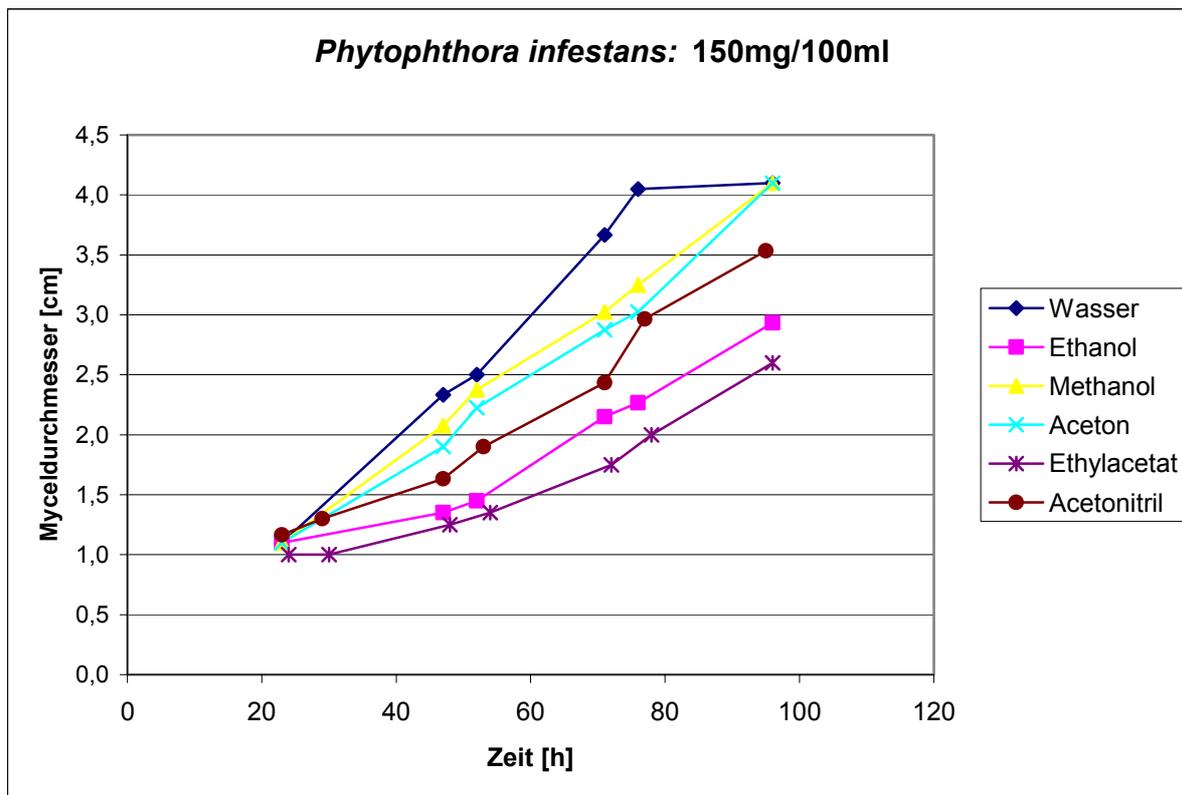


Abb. 40: Wachstum von *P.infestans* bei 150mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

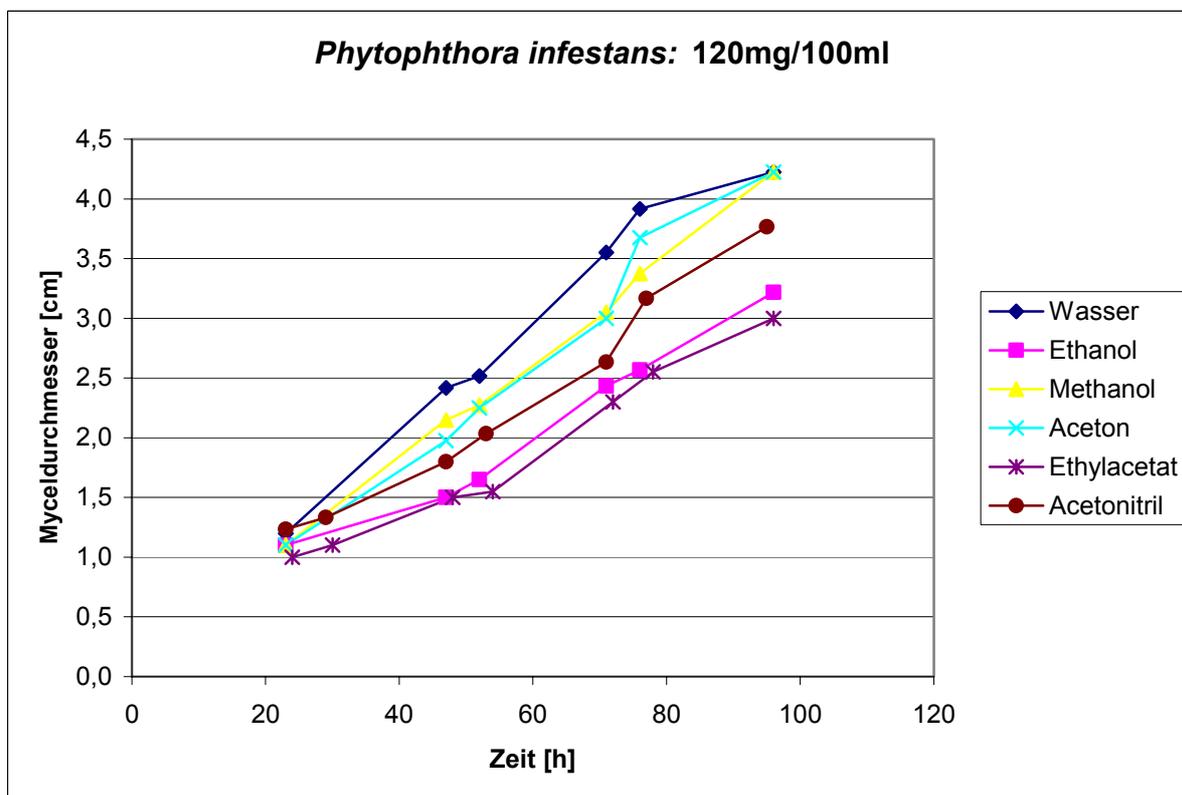


Abb. 41: Wachstum von *P.infestans* bei 120mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

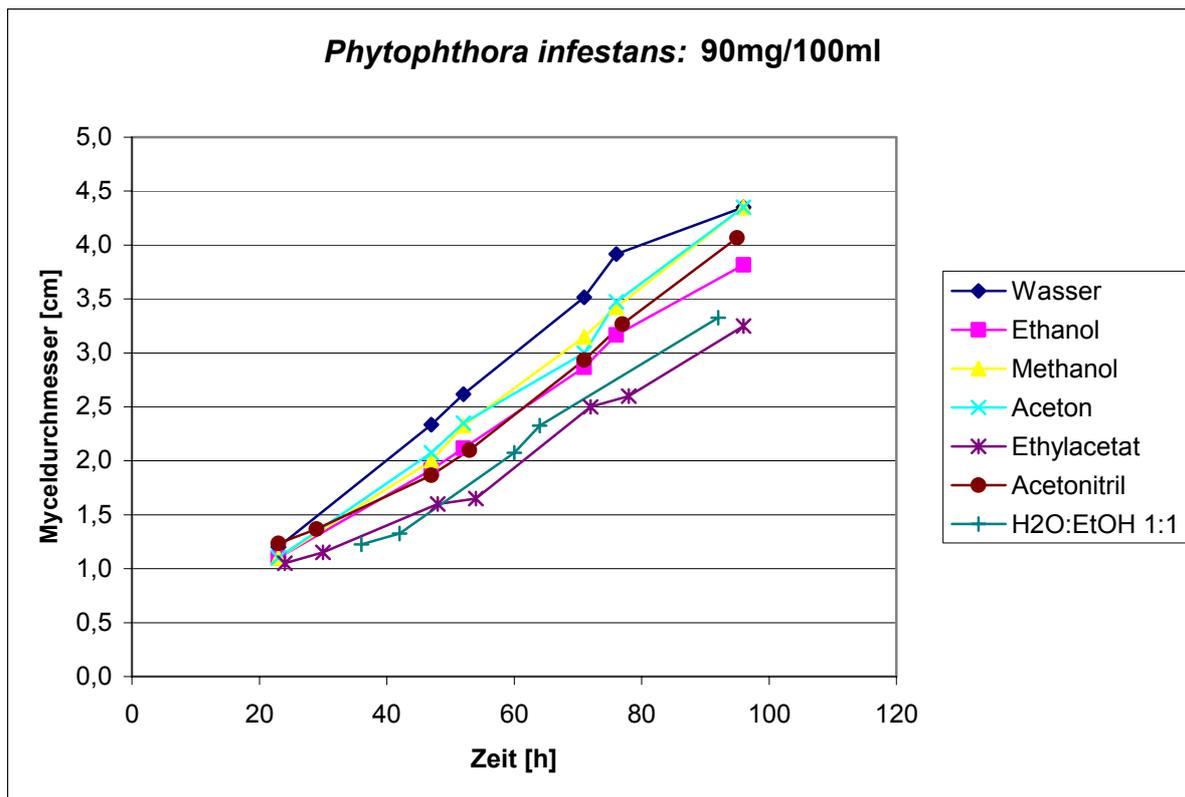


Abb. 42: Wachstum von *P. infestans* bei 90mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

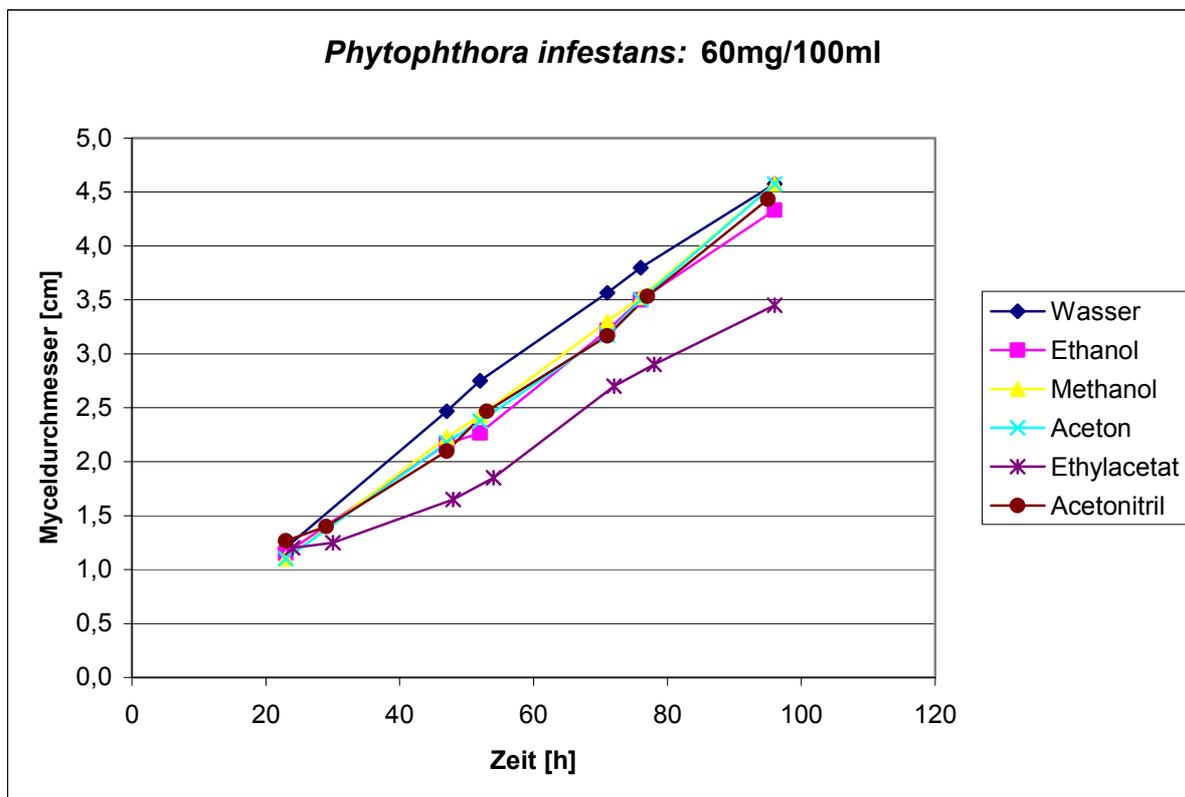


Abb. 43: Wachstum von *P. infestans* bei 60mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

Die nachfolgenden Abbildung zeigen die Hemmwirkung auf *Botrytis cinerea*. Hier konnten allerdings aus Gründen des Versuchsaufwandes der Ethylacetat- und Acetonitrilextrakt nicht

verwendet werden (die Phenolkonzentrationen dieser Extrakte waren so klein, dass sehr viel Extrakt notwendig war, um die angegebenen Konzentrationen einstellen zu können).

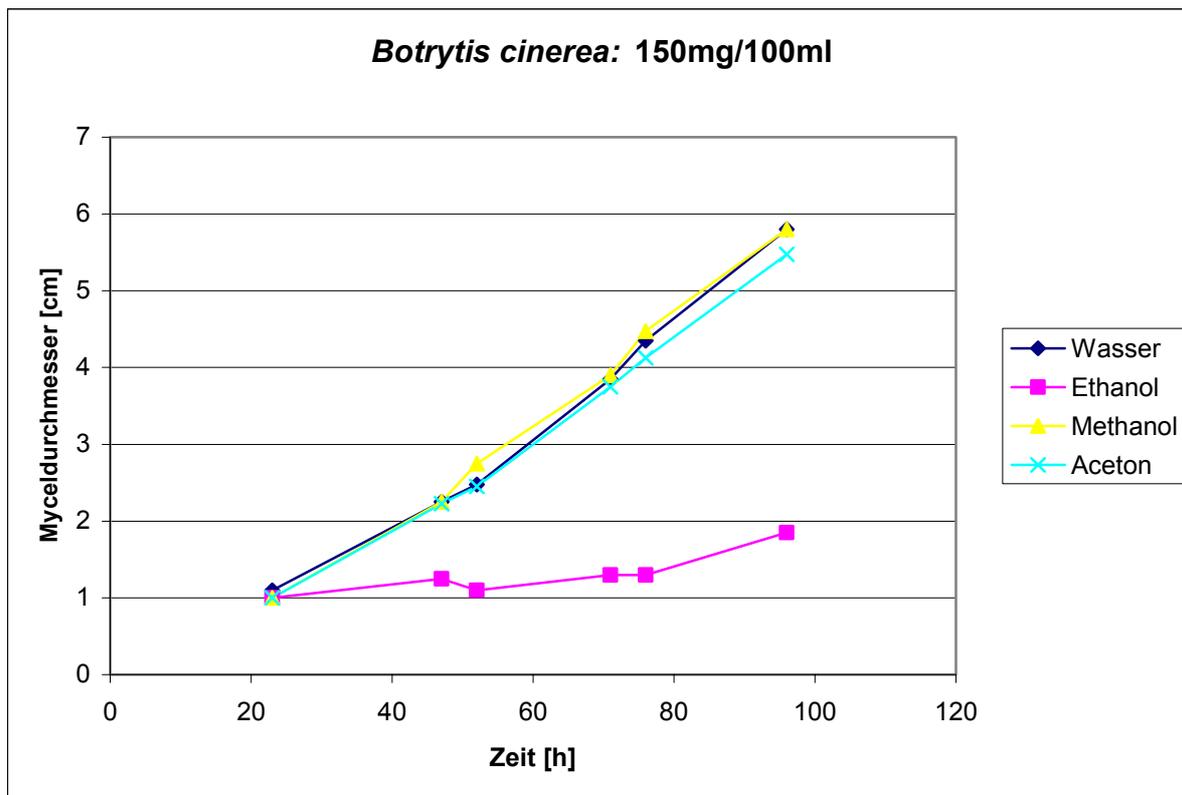


Abb. 44: Wachstum von *B.cinerea* bei 150mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

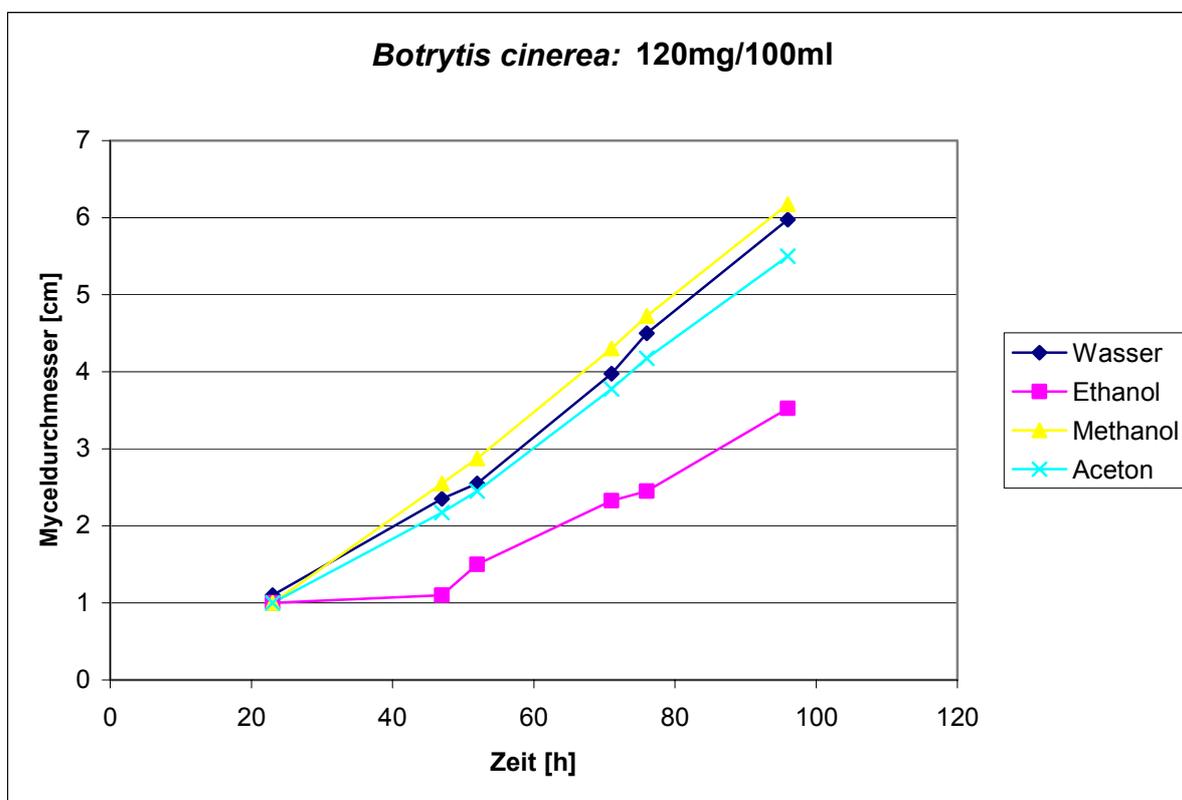


Abb. 45: Wachstum von *B.cinerea* bei 120mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

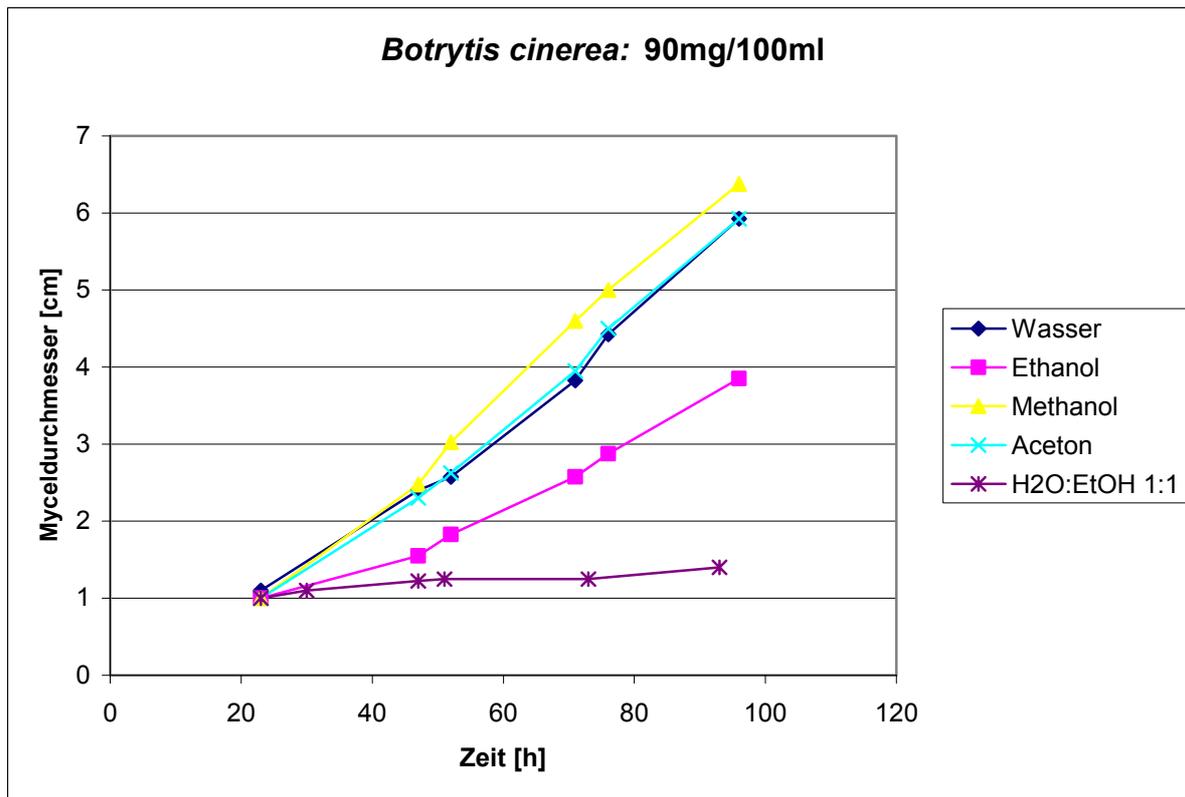


Abb. 46: Wachstum von *B.cinerea* bei 90mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

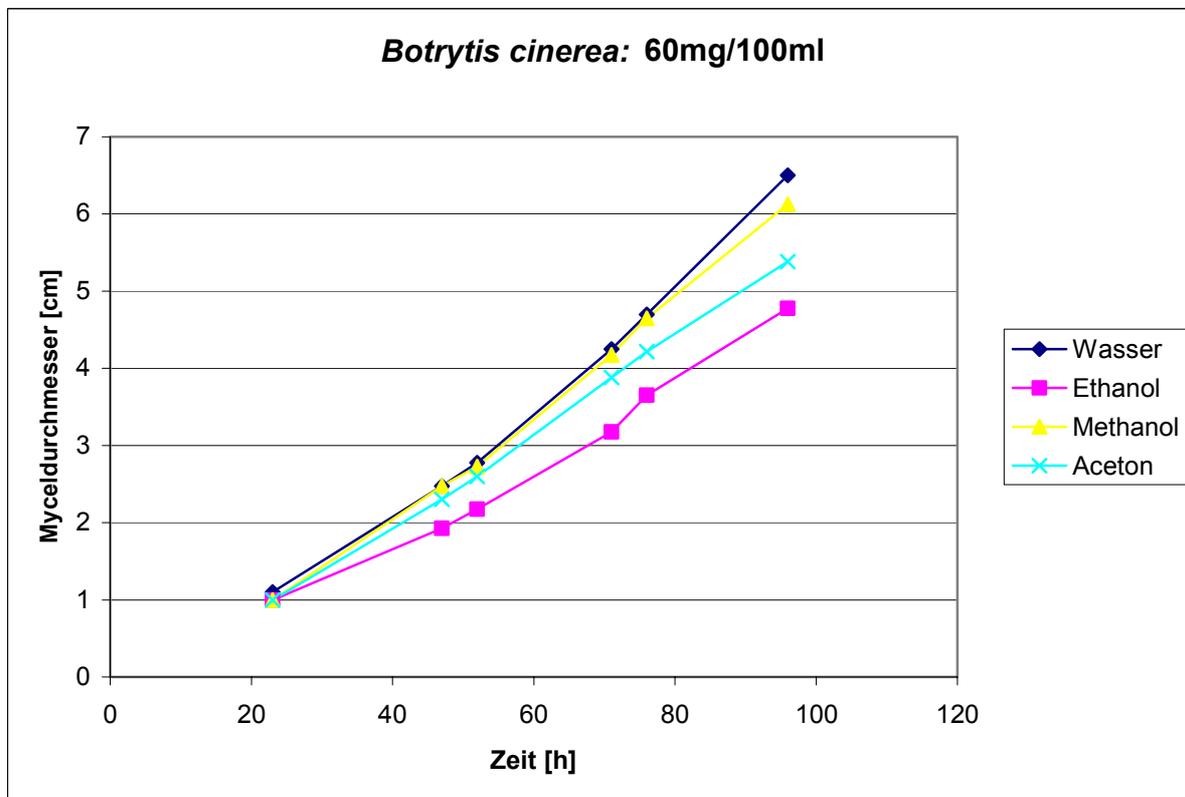


Abb. 47: Wachstum von *B.cinerea* bei 60mg/100ml Gesamtphenolkonzentration

In den Vergleichen zeigt sich ein eindeutiger Trend hinsichtlich der unterschiedlichen Wirksamkeiten der verschiedenen Extrakte. Der bei pH=9 gewonnene wässrig-ethanolische Extrakt weist den untersuchten Pilzen gegenüber die stärkste Wirksamkeit auf. Ähnlich effektiv ist auch der Ethylacetat-Extrakt. Dieser ist aber aufgrund der sehr kleinen Polyphenolausbeute für einen reellen Einsatz eher ungeeignet. Gute Hemmwirkungen, die sich ebenfalls von allen weiteren Extrakten absetzen erreicht man mit den Ethanolextrakten. Acetonitrilextrakte liegen im Mittelbereich und sind wirksamer als Methanol- und Acetonextrakte. Diese sind von ihrer Hemmwirkung sehr vergleichbar. Beide hemmen immer noch besser als die wässrigen Extrakte, die in diesem Vergleich eindeutig am schlechtesten abschneiden. Aus Kosten-, Umwelt- und Betriebssicherheitsgründen wären wässrige Extrakte eindeutig vorzuziehen. Allerdings kann die Verwendung von reinem Wasser als Extraktionsmittel nach diesen Untersuchungen nicht empfohlen werden.

Generell ist zu erkennen, dass sich die Hemmwirkungen in den hohen Konzentrationen deutlich unterscheiden, während sie sich bei kleiner werdenden Konzentrationen angleichen. Das ist einfach dadurch zu erklären, dass die wirksameren Extrakte in diesem Konzentrationsbereich an ihre untere Wirksamkeitsgrenze stoßen und diese sich somit an die Hemmergebnisse der Extrakte anpassen, bei denen die untere Wirksamkeitsgrenze schon unterschritten ist. Dies ist auch zu erkennen, wenn man die Hemmungen innerhalb der Konzentrationsreihe eines Extraktes vergleicht. Bei den stärker wirksamen Extrakten zeigt sich eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung, während die Wachstumskurven bei den unwirksameren Extrakten nahe beieinander liegen. Dieser Effekt wird in den folgenden drei Abbildungen veranschaulicht. Beispielhaft wurde Ethanolextrakt als gut wirksamer Extrakt, Acetonitrilextrakt als durchschnittlich wirksamer und wässriger Extrakt als schlecht wirksamer Extrakt gewählt.

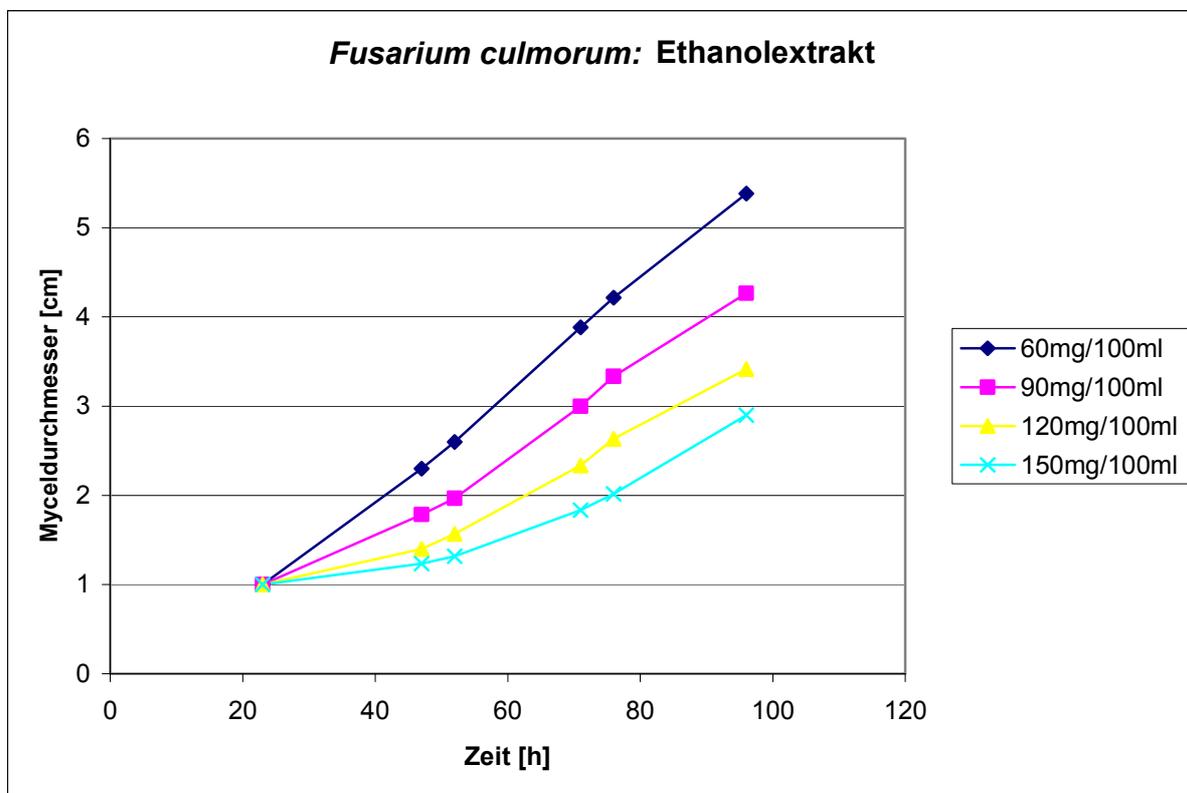


Abb. 48: Konzentrationsabhängige Hemmung von *F.culmorum* durch Ethanolextrakt

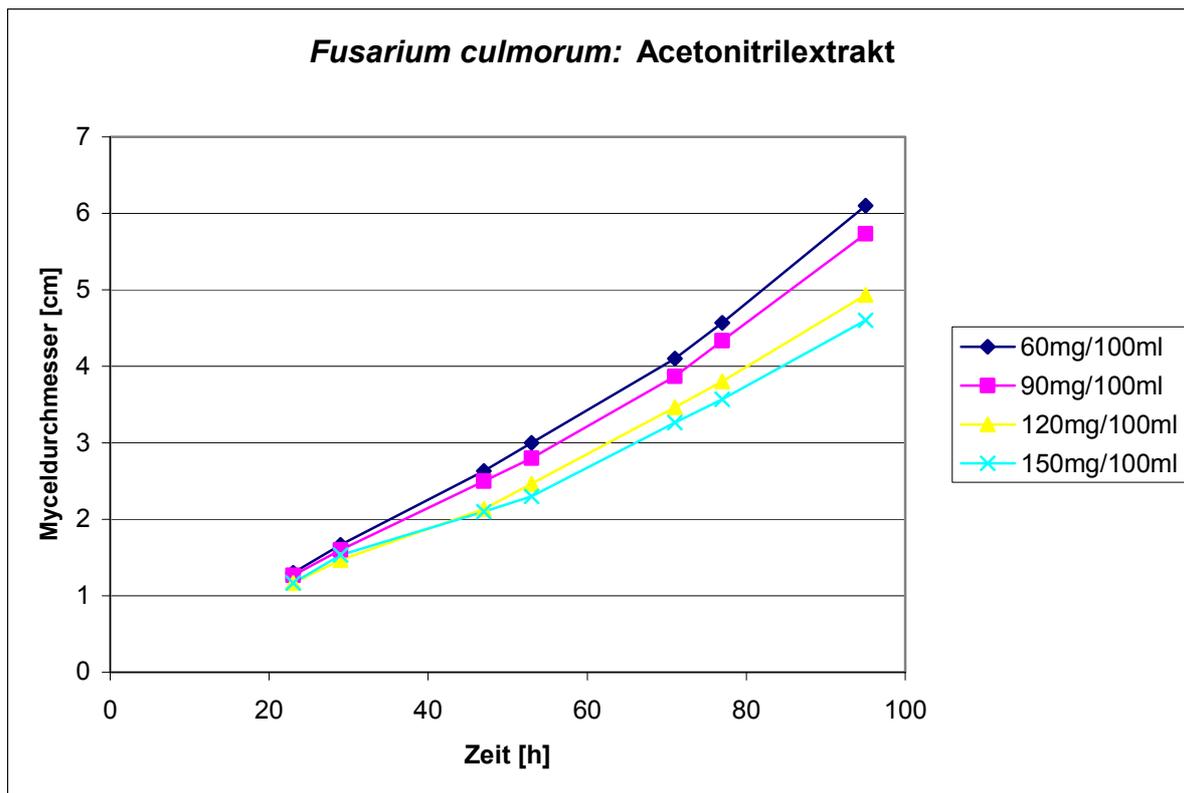


Abb. 49: Konzentrationsabhängige Hemmung von *F.culmorum* durch Acetonitrilextrakt

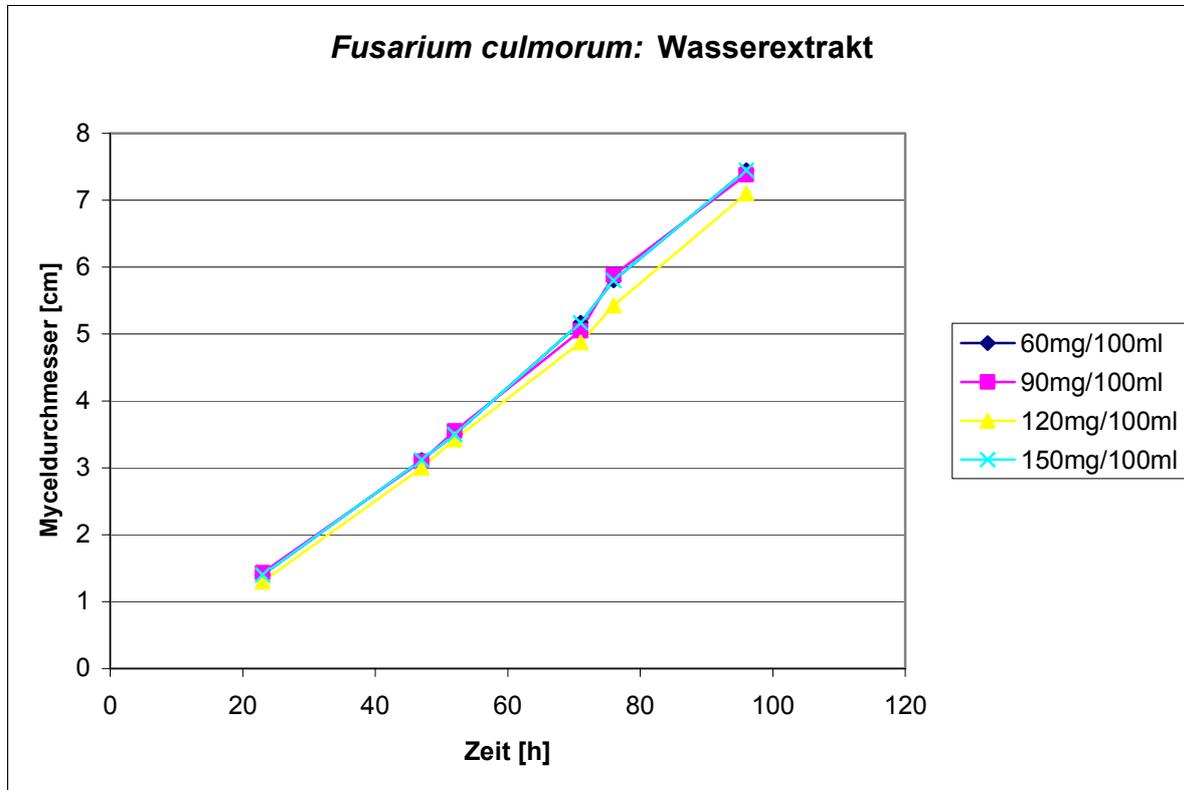
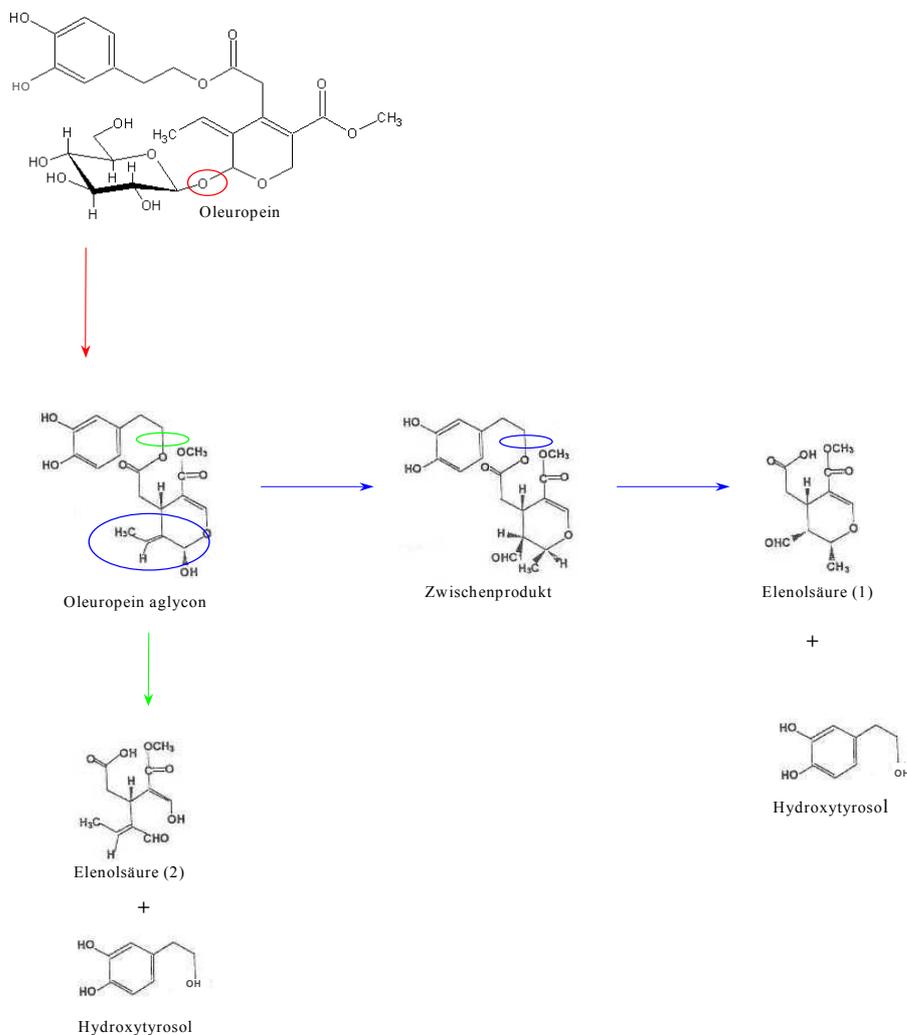


Abb. 50: Konzentrationsabhängige Hemmung von *F.culmorum* durch Wasserextrakt

Die Bewertung des Extraktionsmittels richtet sich nach der der Wirksamkeit und der Ausbeute. Anhand dieser Kriterien ist zum jetzigen Stand der Untersuchungen eindeutig die Extraktion mit einem Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1) bei dem pH-Wert von pH=9 vorzuziehen. Mit diesem Extraktionsmittel erzielt man sehr gute Polyphenolausbeuten und erhält ein Substanzspektrum, das eine gute fungizide Wirksamkeit aufweist. Im Hinblick auf Wirtschaftlichkeit, Sicherheit und Umweltverträglichkeit ist ein Wasser-Ethanol-Gemisch ebenfalls vertretbar.

3.4.2 Saure und alkalische Hydrolyse

Oleuropein, das mengenmäßig vorherrschende Olivenpolyphenol kann hydrolytisch gespalten werden. Den Spaltprodukten Hydroxytyrosol und Elenolsäure werden stärkere antimikrobielle und antioxidative Eigenschaften zugesprochen als dem Oleuropein selbst.



Es sollte untersucht werden, ob es gelingt, eine solche Spaltung herbeizuführen und ob hierdurch die Hemmwirkung auf die Pilze verstärkt werden kann.

Für diese Untersuchungen wurde käuflich zu erwerbender Olivenblätterextrakt benutzt, weil dieser einen sehr hohen, standardisierten Gehalt an Oleuropein aufweist. Vorversuche mit Olivenblätterextrakt zeigen, dass auch mit diesem eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung erzielt wird. Die nachfolgenden Diagramme zeigen beispielhaft die durchschnittliche Hemmung bzw. Wachstumsgeschwindigkeit bei *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani*.

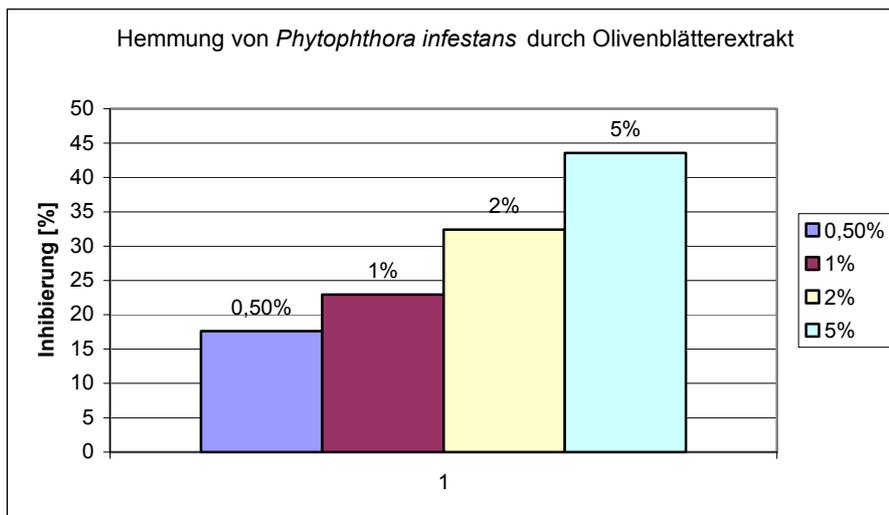


Abb. 51: Konzentrationsabhängige Hemmung von *P. infestans* durch Olivenblätterextrakt

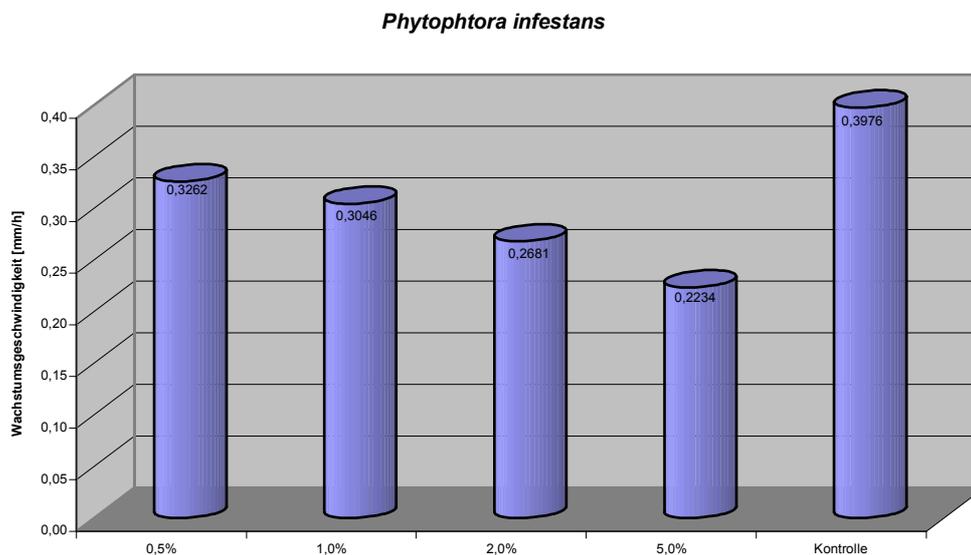


Abb. 52: Konzentrationsabhängige Wachstumsgeschwindigkeit bei *P. infestans*

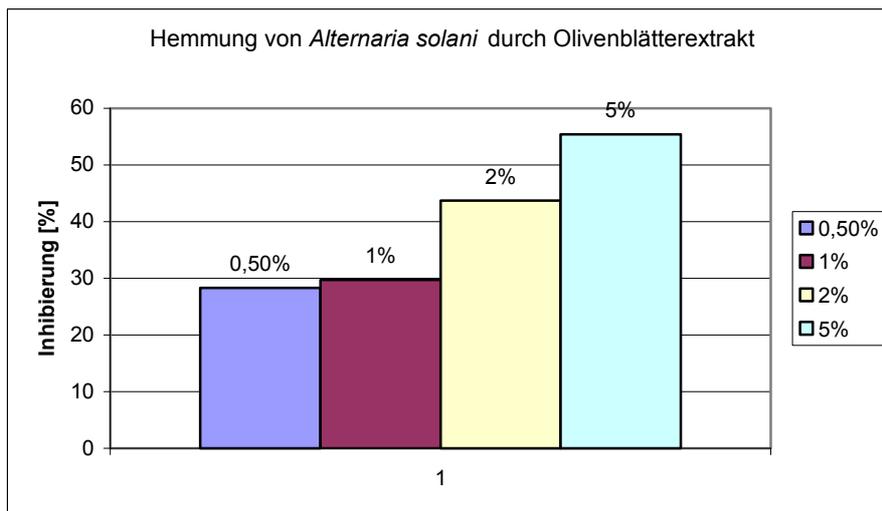


Abb. 53: Konzentrationsabhängige Hemmung von *A.solani* durch Olivenblätterextrakt

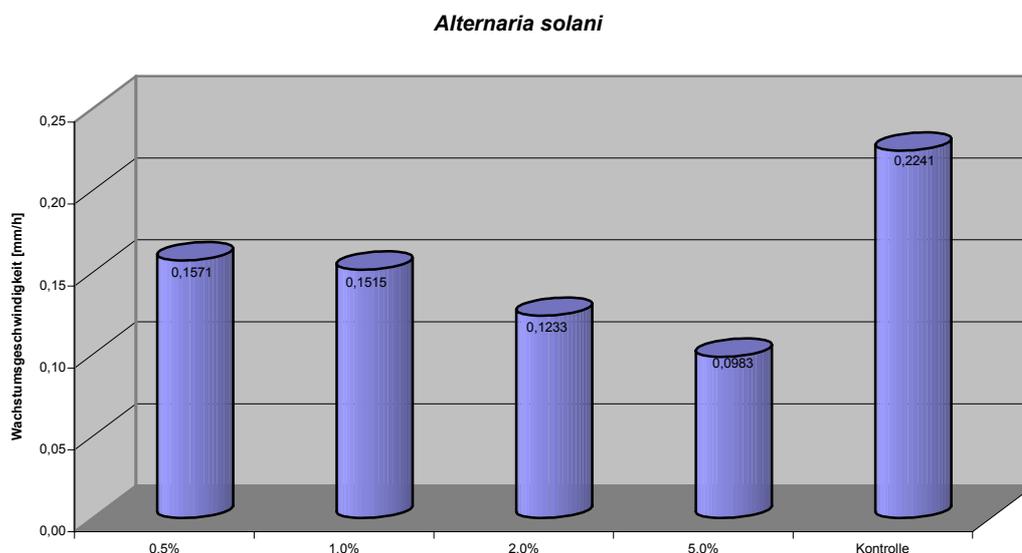


Abb. 54: Konzentrationsabhängige Wachstumsgeschwindigkeit bei *A.solani*

Aus diesen Ergebnissen ist eindeutig ersichtlich, dass der Einsatz von Olivenblätterextrakt eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung bewirkt. Allerdings ist auch ersichtlich, dass die notwendigen Konzentrationen deutlich höher liegen als bei Oliventresterextrakt. Der eigentliche Polyphenolgehalt des käuflich erworbenen, pulverförmigen Olivenblätterextraktes liegt bei 50%, wobei Oleuropein alleine ca. 42% des Pulvers ausmacht. Also liegen die eigentlichen Polyphenolkonzentrationen bei 0,25%, 0,5%, 1%, 2,5%. Dies sind aber immer noch deutlich höhere Konzentrationen als in den untersuchten Oliventresterextrakten.

Es wurde untersucht ob sich diese Hemmleistungen steigern lassen, wenn die Extrakte vor den mikrobiologischen Versuchen extremen Bedingungen hinsichtlich pH-Wert und Temperatur ausgesetzt werden. Diese Bedingungen können potentiell geeignet sein eine Spaltung des Oleuropein und somit eine Änderung der Wirksamkeit zu bewirken.

Extrakte der Konzentration 1% und 5% wurden auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt und zum einen 1 Stunde bei 100°C gerührt und zum anderen 24h bei 20°C gerührt, bevor sie neutralisiert und in den mikrobiologischen Versuchen eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse für *Fusarium culmorum* sind in den zwei folgenden Abbildungen dargestellt.

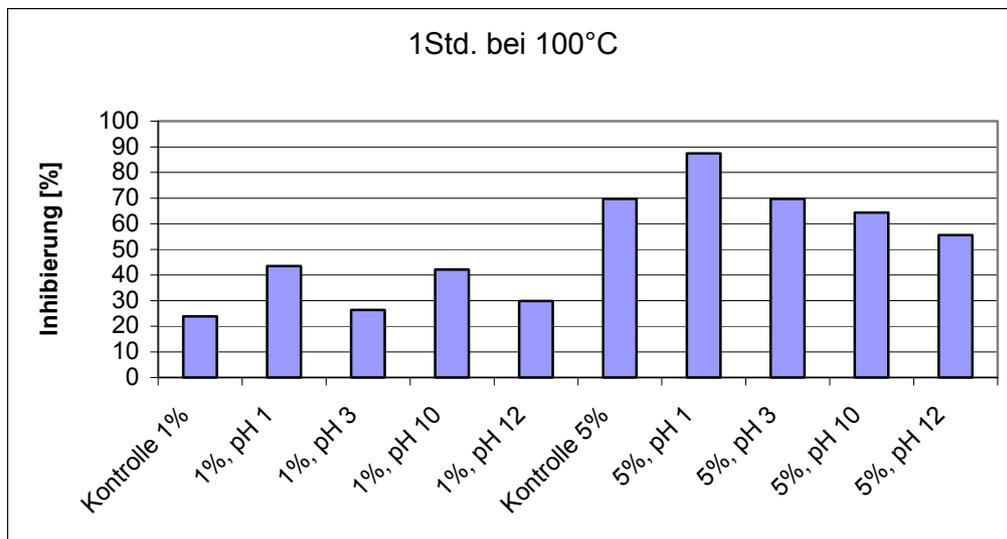


Abb. 55: Inhibierung von *F.culmorum* durch modifizierte Extrakte

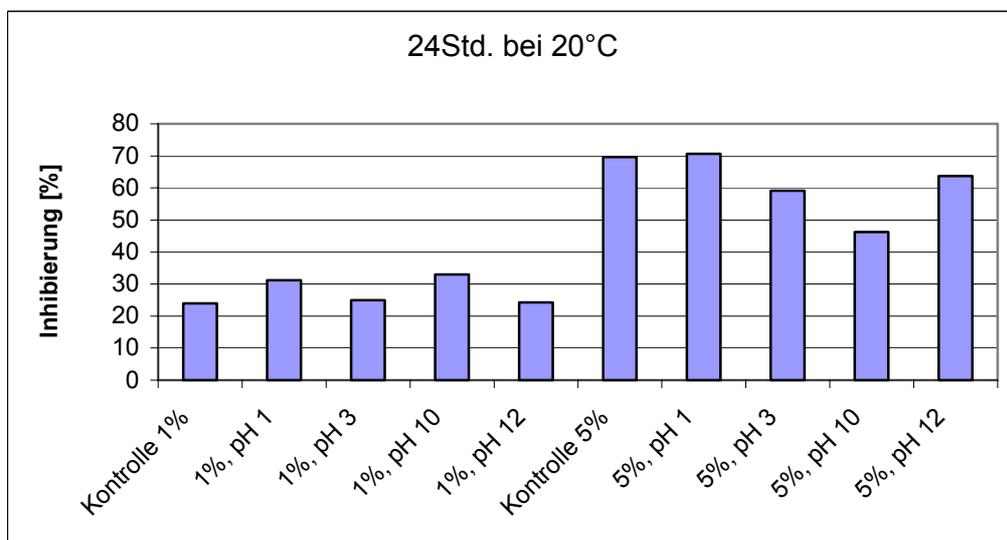


Abb. 56: Inhibierung von *F.culmorum* durch modifizierte Extrakte

Die nächsten beiden Abbildungen zeigen die Ergebnisse für *Ceratocystis fimbriata*.

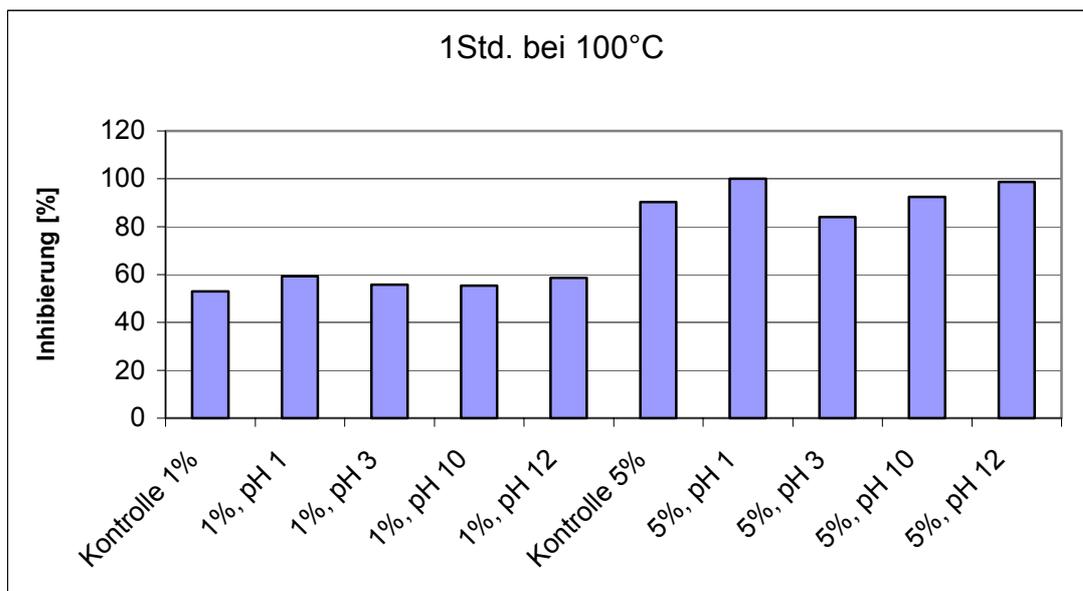


Abb. 57: Inhibierung von *C.fimbriata* durch modifizierte Extrakte

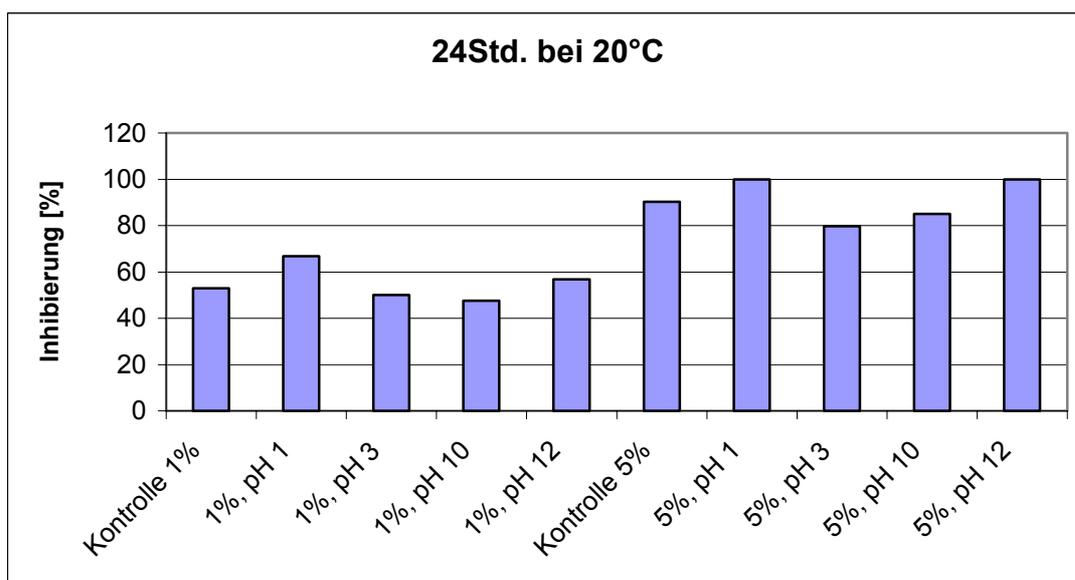


Abb. 58: Inhibierung von *C.fimbriata* durch modifizierte Extrakte

Die Ergebnisse zeigen, dass das Ansäuern auf den pH-Wert von pH=1 eine geeignete Maßnahme ist, um die Wirksamkeit zu erhöhen. Der Effekt ist stärker ausgeprägt, wenn die Säurezugabe mit Hitze kombiniert wird. Über die anderen untersuchten Bedingungen lässt sich keine eindeutige Aussage treffen.

Die 1%igen Lösungen wurden mittels HPLC auf ihren Oleuropeingehalt hin untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Behandlung	area
Kontrolle	1 Std. 100°C	23 655
pH 1	1 Std. 100°C	–
pH 3	1 Std. 100°C	17 478
pH 10	1 Std. 100°C	12 903
pH 12	1 Std. 100°C	–
pH 1	24 Std. 20°C	9 596
pH 3	24 Std. 20°C	18 743
pH 10	24 Std. 20°C	–
pH 12	24 Std. 20°C	–
Kontrolle 0,4% Oleuropein	unbehandelt	27 172

Diese HPLC Ergebnisse zeigen, dass auch bei den stark alkalisierten Proben kein Oleuropein mehr nachweisbar ist. Bei diesen Proben hat diese Veränderung allerdings nicht zu einer erhöhten Fungizität geführt. Es konnte analytisch nicht nachvollzogen werden, was die Reaktionsprodukte dieser Behandlungen sind. Ohne weiterführende Untersuchungen lässt sich keine nähere Aussage/Interpretation machen.

Weiterhin ist aus den Ergebnissen ersichtlich, dass die bloße thermische Behandlung nur zu einer geringen Abnahme des Oleuropeingehaltes führt. Oleuropein ist demnach relativ temperaturstabil.

Zusätzlich zu dem Olivenblätterextrakt wurde reine, 2%ige Oleuropeinlösung den gleichen Behandlungen unterworfen und anschließend mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Probe	Behandlung	area
Kontrolle	1 Std. 100°C	31 089
pH 1	1 Std. 100°C	–
pH 3	1 Std. 100°C	6 307
pH 10	1 Std. 100°C	37 830
pH 12	1 Std. 100°C	6 234
pH 1	24 Std. 20°C	–
pH 3	24 Std. 20°C	63 486
pH 10	24 Std. 20°C	49 720
pH 12	24 Std. 20°C	3 059
Kontrolle	24 Std. 20°C	81 229
Kontrolle	unbehandelt	124 133

In diesen Versuchen wurde nur in den Proben mit dem pH-Wert 1 das gesamte Oleuropein gespalten. Starkes Alkalisieren hat aber auch zu einer sehr deutlichen Konzentrationsabnahme geführt. In diesem Reinstoffversuch wurde das Oleuropein durch die ausschließlich thermische Behandlung auf ein Viertel der Anfangskonzentration reduziert. Hier erscheint das Oleuropein weniger temperaturstabil als in den Versuchen mit Olivenblätterextrakt.

Das starke Ansäuern in Kombination mit Hitze einwirkung ist eine gute Möglichkeit der Spaltung des Oleuropein. Mit dieser Änderung geht eine verbesserte Wirksamkeit einher. Die Versuche wurden mit Olivenblätterextrakt durchgeführt. Dieser hat eine sehr hohe Konzentration an Oleuropein. Es ist davon auszugehen, dass der Oleuropeinanteil in der Polyphenolfraktion des Oliventresters bei weitem nicht so hoch ist. Folglich dürfte hier die

Steigerung der Wirksamkeit weniger stark ausgeprägt sein. Dies muss noch in weiteren Versuchen untersucht werden. Bei einer erfolgreichen Anwendung dieses Prozesses wäre dies eine einfache und billige Methode, die Effizienz des Fungizids zu steigern und somit Anwendungskonzentrationen zu senken.

3.4.3 Enzymatische Modifikation

β -Glukosidase

Das Enzym β -Glukosidase ist geeignet, den glykosidisch gebundenen Glukoserest des Oleuropeins abzuspalten. Somit lässt sich untersuchen, ob das resultierende Oleuropein-Aglycon antimikrobiell wirksamer ist.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Einfluss dieser enzymatischen Modifikation auf das Hemmergebnis.

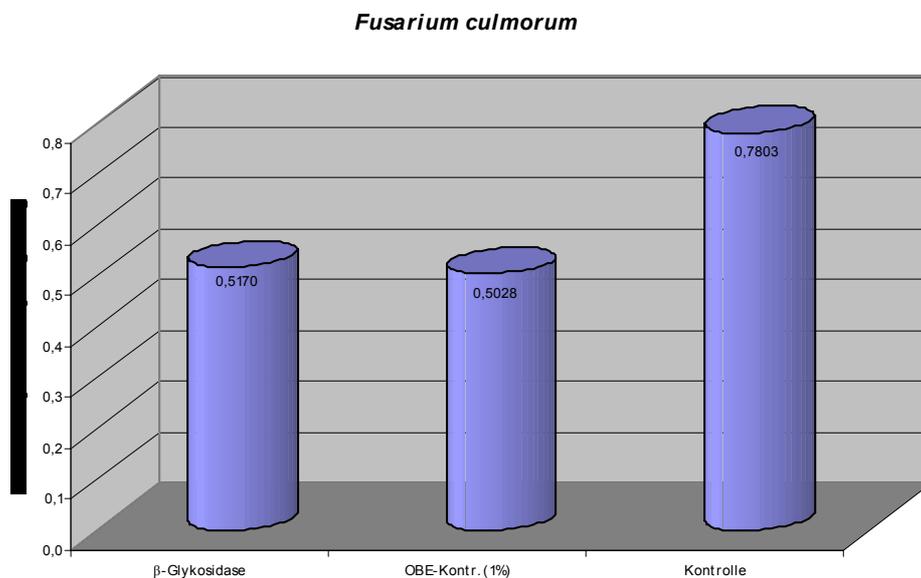


Abb. 59: Einfluss der enzymatischen Behandlung auf das Wachstum von *F.culmorum*

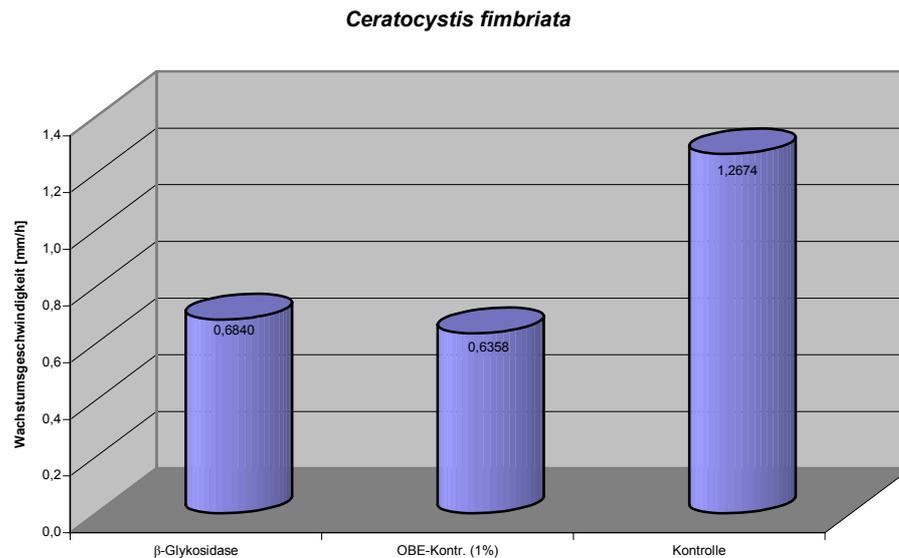


Abb. 60: Einfluss der enzymatischen Behandlung auf das Wachstum von *C.fimbriata*

Die Ergebnisse zeigen sehr eindeutig, dass diese Maßnahme keinen Einfluss auf die Fungizität des Extraktes hat.

Laccase

Das Enzym Laccase ist eine Phenoloxidase. Es wäre sehr aufwendig zu untersuchen, welche Olivenpolyphenole durch dieses Enzym oxidiert werden, und welche Oxidationsprodukte genau entstehen. Deshalb wurde lediglich untersucht, in wie weit sich die Modifikationen, die durch dieses Enzym katalysiert werden auf das Hemmergebnis auswirken.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt.

<i>Fusarium culmorum</i>	
	Durchschnittliche Hemmung [%]
1%, Laccase-behandelt	13,1
1% Kontrolle	29,9

<i>Ceratocystis fimbriata</i>	
	Durchschnittliche Hemmung [%]
1%, Laccase-behandelt	28,5
1% Kontrolle	40,9

Die Laccasebehandlung führt zu einer eindeutigen Reduktion der Fungizität. Diese Maßnahme ist demnach im Sinne der Zielsetzung als völlig ungeeignet zu bewerten.

3.4.4 Ultraschall-Behandlung

Schallwellen oberhalb des menschlichen Hörvermögens im Frequenzbereich zwischen 20 kHz und 10 MHz werden als Ultraschall bezeichnet. Diese Schallwellen bewirken in Wasser das Phänomen der Kavitation. Durch die periodischen Zyklen von Kompression und Expansion entstehen in der Flüssigkeit während der Expansionsphase sogenannte Kavitationsblasen. Diese wachsen im Verlauf mehrerer Zyklen an, bis sie eine kritische Größe erreichen, bei der sie die Ultraschallenergie besonders gut absorbieren. An diesem Punkt implodieren die Blasen schlagartig und es entstehen sogenannte „Hot Spots“. Das bedeutet, dass während des Kollabierens der Blase auf kleinstem Raum extreme Bedingungen herrschen. In den Blasen werden Temperaturen um ca. 5500°C und Drücke von ca. 500 atm geschätzt. Diese Bedingungen führen zur Bildung von OH-Radikalen durch sonolytische Spaltung des Wassers. Aufgrund dieser Vorgänge bewirkt Ultraschall die sogenannte Aquasonolyse, d.h. die Spaltung/Abbau von Substanzen im Wasser [102].

Es wurde untersucht, ob Ultraschall geeignet ist, die Olivenpolyphenole zu modifizieren und in ihrer antimikrobiellen Wirkung zu beeinflussen.

<i>Fusarium culmorum</i>	
	Durchschnittliche Hemmung [%]
1%, Ultraschall-behandelt	26,3
1% Kontrolle	29,9

<i>Ceratocystis fimbriata</i>	
	Durchschnittliche Hemmung [%]
1%, Ultraschall-behandelt	37,0
1% Kontrolle	40,9

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Ultraschallbehandlung unter den gewählten Bedingungen (Frequenz, Leistung, Behandlungsdauer, Temperatur) keinen Einfluss auf die Hemmleistung der Extrakte hat.

3.5 Hemmwirkung auf Bakterien

Die Wirkung von Olivenblätterextrakt auf die Bakterienspezies

- *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae, gram -)
- *Klebsiella terrigena* (Enterobacteriaceae, gram -)
- *Pseudomonas putida* (Pseudomonadaceae, gram -)
- *Bacillus subtilis* (Bacillaceae, gram +)
- *Enterococcus durans* (Streptococcaceae, gram +)
- *Lactobacillus curvatus* (Lactobacteriaceae, gram +)

wurde im Antibiotikablättchentest ermittelt.

Bei Extraktkonzentrationen bis zu 10% wurden die Bakterien *Enterococcus durans*, *Pseudomonas putida* und *Klebsiella terrigena* überhaupt nicht gehemmt. Die Hemmergebnisse bei den übrigen drei Spezies ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

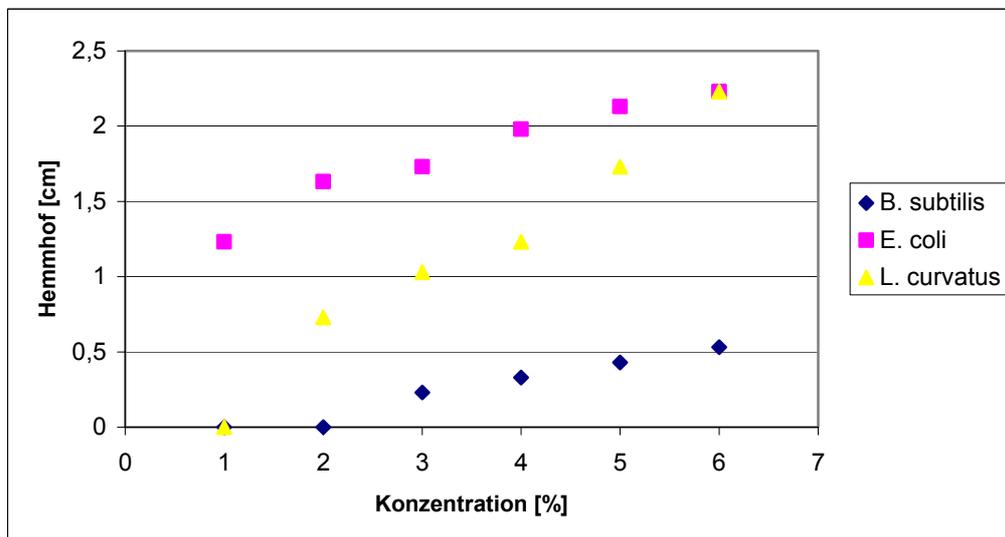


Abb. 61: Hemmwirkung von Olivenblätterextrakt auf *B.subtilis*, *E.coli*, *L.curvatus*

Unterschiedliche Bakterien reagieren sehr verschieden auf Olivenpolyphenole. Die meisten untersuchten Organismen sind auch hohen Konzentrationen gegenüber unempfindlich. Das eindeutig beste Hemmresultat konnte bei *E.coli* erzielt werden. Die zugrundeliegenden Hemmmechanismen sind nicht bekannt und aus den Ergebnissen lassen sich auch keine Schlüsse hierüber ziehen. Beispielsweise gehören sowohl *E.coli* als auch *K.terrigena* zu der Gruppe der gram-negativen Enterobacteriaceae; *E.coli* wird jedoch eindeutig gehemmt, während *K.terrigena* auch hohen Konzentrationen gegenüber völlig unempfindlich ist. Generell scheint der Einfluss auf Bakterien demnach relativ klein zu sein. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei einem Einsatz als Pflanzenschutzmittel die Bakterienflora auf der Pflanze und im Boden nicht stark beeinflusst wird.

3.6 Pflanzenversuche

3.6.1 Chlorophyllfluoreszenz-Test

Mit Hilfe des Chlorophyllfluoreszenz-Tests können Aussagen über eine mögliche Phytotoxizität der Extrakte getroffen werden. Die Ergebnisse des Tests sind in der folgenden Abbildung und Tabelle dargestellt.

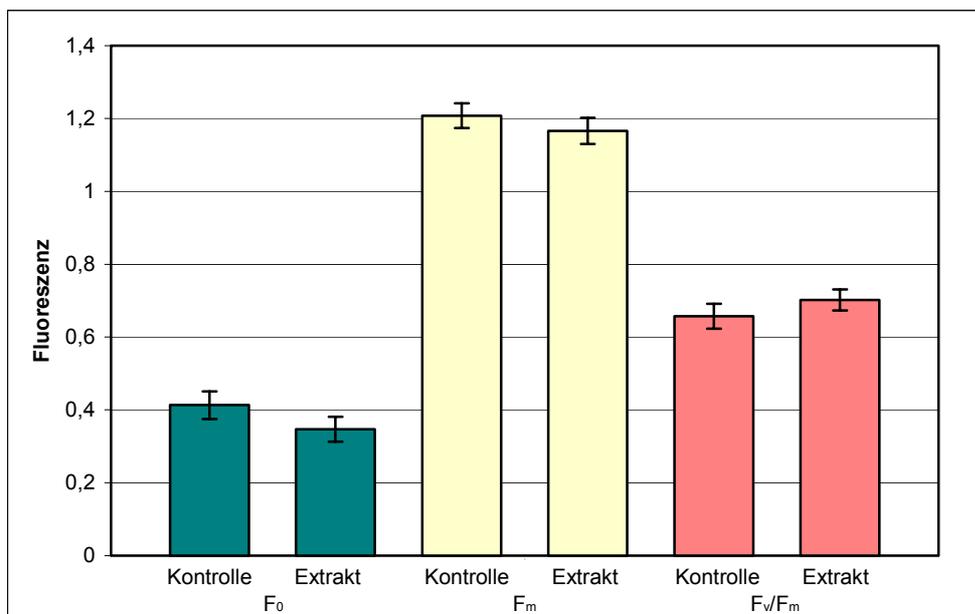


Abb. 62: Chlorophyllfluoreszenz-Test

	min. Fluoreszenz F_0	max. Fluoreszenz F_m	rel. Fluoreszenz F_v/F_m
mit Extrakt behandelt	0,347	1,166	0,702
Standardabweichung	0,034	0,036	0,029
unbehandelt	0,413	1,208	0,657
Standardabweichung	0,038	0,034	0,034

Die Messwerte der behandelten Pflanzen unterscheiden sich nur in sehr geringem Maße von denen der unbehandelten Kontrollpflanzen. Somit hat die Applikation von Oliventresterextrakt mit einer Polyphenolkonzentration von 300mg/100ml keine negativen Auswirkungen auf die Photosyntheseleistung der Pflanzen. Weiterhin konnten keine Nekrosen auf den behandelten Blattstellen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse indizieren, dass sich Oliventresterextrakt in der genannten Konzentration nicht phytotoxisch verhält.

3.6.2 Protektive Wirkung gegenüber *Botrytis cinerea* – Befall

Der *Botrytis cinerea* – Befall bei jungen Apfel- und Tomatenpflanzen wurde 7 Tage nach der Inokulation mit Hilfe des folgenden Boniturschemas ermittelt.

- 0 = kein Befall
- 1 = leichter Befall
- 2 = mittlerer Befall
- 3 = starker Befall

Die Spritzapplikation des Oliventresterextraktes (300mg/100ml) erfolgte protektiv 24 Stunden vor der Inokulation mit Sporensuspension.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	Befall bei Apfelpflanze		Befall bei Tomatenpflanze	
	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt
Pflanze 1	0	3	0	2
Pflanze 2	0	3	0	2
Pflanze 3	0	3	0	2
Pflanze 4	0	3	0	2
Pflanze 5	0	3	0	1
Pflanze 6	0	3	0	1
Pflanze 7	0	3	0	1
Pflanze 8	0	3	1	1
Pflanze 9	0	2	1	1
Pflanze 10	1	2	1	0
Mittelwert	0,1	2,8	0,3	1,3

Die Behandlung mit Oliventrester-extrakt hat die Pflanzen sehr gut vor einer *Botrytis cinerea* – Infektion geschützt. Bei den Apfelpflanzen ist das Ergebnis besonders beeindruckend, weil die behandelten Pflanzen nach 7 Tagen fast vollständig symptomfrei waren, während fast alle unbehandelten Kontrollen massiv erkrankt waren.

Der Extrakt wurde in den Versuchen ohne Formulierungshilfsstoffe appliziert. So war beispielsweise die Benetzung der Blattflächen bei der Spritzapplikation noch stark verbesserungsbedürftig. Durch den Einsatz von Formulierungshilfsstoffen können nicht nur Parameter wie die Blattbenetzung verbessert, sondern auch die biologische Wirksamkeit der aktiven Substanzen verstärkt werden. Somit kann erwartet werden, dass es durch weitere Optimierungsarbeiten möglich sein wird, ein effektives Fungizid zu entwickeln.

3.7 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Diese Studie beschäftigt sich mit der Entwicklung eines natürlichen Fungizids mit potentieller kurativer Wirkung. Durch die Verwendung des Rohstoffs Oliventrester aus ökologischem Landbau ist dieser Wirkstoff besonders für den ökologischen Landbau geeignet.

Das entwickelte Präparat aus Oliventrestern ist dazu bestimmt Pflanzen vor Schadorganismen zu schützen und kann somit nach §2 des Pflanzenschutzgesetzes den Pflanzenschutzmitteln zugeordnet werden. Für eine Zulassung muss gemäß der Richtlinien der Biologischen Bundesanstalt BBA nachgewiesen werden, dass

- das Mittel hinreichend wirksam ist, und
- das Mittel bei bestimmungsgemäßer und sachgerechter Anwendung oder als Folge einer solchen Anwendung
 - keine schädlichen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier und auf das Grundwasser hat
 - keine sonstigen Auswirkungen, insbesondere auf den Naturhaushalt, hat, die nach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse nicht vertretbar sind.

In Absprache mit der BBA wurde der Versuchsaufbau der Studie so modifiziert, dass er den Anforderungen an wissenschaftliche Untersuchungen im Vorfeld zur Zulassungsbeantragung entspricht. Es wurden Leitsubstanzen ausgewählt, für diese wurden Dosis-Wirk-Beziehungen ermittelt. Die Wirksamkeit des Präparats wurde anhand von Laborversuchen an ausgewählten pilzartigen Schadorganismen nachgewiesen. Daran anschließend wurden erste Versuche an Pflanzen durchgeführt.

Die in dieser Studie hergestellten Wirkstofflösungen sind für eine Zulassungsbeantragung als Pflanzenschutzmittel geeignet. Dazu notwendige weiterführende Untersuchungen, vor allem was die Entwicklung stabiler Trägermaterialien, die Auswirkungen auf den Naturhaushalt, die im Boden verbleibenden Rückstandsmengen und die Langzeitauswirkungen angeht, können nur in Zusammenarbeit mit einer in diesem Bereich tätigen Firma durchgeführt werden. Das ist besonders in Anbetracht einer möglichen Patentierung des Wirkstoffes sinnvoll. Seitens der Industrie besteht dazu ein großes Interesse.

3.8 Möglichkeiten der Anwendung der Ergebnisse für eine Ausdehnung des ökologischen Landbaus

Im ökologischen Landbau stellt der Bereich des Pflanzenschutzes ein auch weiterhin starkes Hemmnis dar. Insbesondere die Pilzkrankungen sind aufgrund fehlender Mittel zur ihrer Bekämpfung ein großes Problem. Zudem entwickeln speziell im Getreide- und Weinbau bestimmte Pilzstämme gegenüber den wenigen universell eingesetzten Mitteln Resistenzen. Strategien wie häufiger Wechsel des Wirkstoffes, Verwendung von Gemischen unterschiedlicher Fungizide, und vor allem die Entwicklung neuer Wirkstoffe können das Problem bedingt lösen. Die hier vorgestellte Wirkstoffkombination, als natürliches Gemisch der Olive gegenüber pflanzenpathogenen Schimmelpilzen, geht über diese Strategien noch hinaus.

Das vorgestellte Projekt verfolgt ein holistisches Konzept der Produktion von Gütern, d.h. die entstehenden Wirkstoffe werden in ihrer ökologischen Verträglichkeit vom Rohstoff bis zum fertigen Produkt betrachtet (Produktlinienkonzept). Als Rohstoff dient Oliventrester, ein

bisheriges Abfallprodukt der Ölindustrie. Die Wertschöpfung dieses Produktionsstromes wird durch Einbringung in einen neuen Produktionskreislauf gesteigert.

Dabei werden die wertgebenden Inhaltsstoffe wie Oleuropein/ Flavonoide technologisch bearbeitet ohne die zusätzliche Einbringung naturfremder Betriebsstoffe. Das Projekt verzichtet auf

- komplizierte chemische Synthesen mit ökotoxischen Spalt- und Endprodukten,
- neue Hochleistungstechnologie,
- und kostenintensive Bearbeitung.

Das vorgestellte Bearbeitungskonzept ist

- einfach und nachvollziehbar,
- modular,
- baut ausschließlich auf vorhandener Technologie auf,
- und kostengünstig, d.h. kann in jedem ökologischen Betrieb angewendet werden.

Der Kreislauf natürlicher Ressourcen ist gewahrt. Es werden vorhandene Rohstoffe bearbeitet und für neue Anwendungen erschlossen. Das natürliche Gleichgewicht der Bodenmikroflora wird geschützt, die Wirkstofflösungen regulieren zu Gunsten der "Nützlinge".

Das Prinzip des ökologischen Landbaus ist vollständig gewahrt.

Die Ergebnisse der Studie sind vielversprechend und lassen eine Anwendung im ökologischen Pflanzenbau realistisch erscheinen. Unter der Voraussetzung, dass geeignete Trägermaterialien entwickelt werden und weitere Pflanzenversuche im Gewächshaus und Freilandanbau sich anschliessen, ist eine Beantragung als Pflanzenschutzmittel sehr zu empfehlen.

4 Bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie wurden in Form von mehreren Presseberichten einem nationalen als auch internationalen Publikum zugänglich gemacht. Des Weiteren sind Veröffentlichungen auf entsprechenden Kongressen (sowohl in Richtung Reststoffverwertung, gezielte Nutzung von Inhaltsstoffen der Olive, als auch Pflanzenschutz und Synergismen) und Fachtagungen (grüne Woche, Biotechnika, Biofach) geplant. Zwei Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften sind in der Vorbereitung.

Die Internetdarstellung des Instituts wurde um eine entsprechende Leitseite erweitert. Dies erfolgte schon zu Beginn des Projektes, um in grösseren Abständen den Fortgang der Studie verfolgen zu können.

Im Rahmen des Studienganges Lebensmitteltechnologie wurden die Veranstaltung „spezielle Fragestellungen der biotechnologischen Forschung“ (2SWS) mit speziellen Lehrmodulen zur Thematik ausgestattet.

Ein Lehrmodul des Leonardoprojektes "Vocational training in Production of healthy sound bioproducts" wurde ebenso mit den Projektergebnissen ausgestattet.

Das ILT verfügt über langjährige Projekterfahrungen im Bereich der wirtschaftlich und ökologisch sinnvollen Reststoffverwertung. Darüber hinaus bestehen zahlreiche Kontakte zu potentiellen Abnehmern der neuen Technologie und darauf aufbauenden Produktentwicklungen, welche im Rahmen dieses Projektes entstanden. Dies stellt optimale Voraussetzungen für die erfolgreiche Vermarktung des Projektes dar.

Berichterstattungen:

Fernsehreportage:

- 3SAT „Nano“ (Sept. 2003)
- Hessen Fernsehen hr „Abenteuer Erde“ (Oktober 2003)

Zeitschriften-Artikel:

- Geo (Mai 2003)
- Forsch (April 2003)
- Spektrum der Wissenschaft (Mai 2003)
- CIT (Juni 2003)
- CET (Juni 2003)
- Chemische Rundschau (Juni 2003)
- eve - Ernährung, Vitalität, Erleben (Juni 2003)
- Imbottigliamento (November 2003)

Radioberichte:

- WDR 5 „Leonardo“
- Hessischer Rundfunk 1 „Meridian“
- Deutschlandfunk

Internet-Artikel:

- Informationsdienst Wissenschaft
http://idw-online.de/public/zeige_pm.html?pmid=60691
- Netzeitung
<http://www.netzeitung.de/servlets/page?section=568&item=231315>
- Vista Verde
http://www.vistaverde.de/news/Wissenschaft/0303/18_olive.htm
- Pressemitteilung der Uni Bonn
www.uni-bonn.de/Aktuelles/Presseinformationen/2003/088.html
- Science News Online
<http://www.sciencenews.org/20030524/food.asp>
- Chemie Online
http://www.chemie-online.com/news_archiv.php?id=6994
- Gallileus
<http://www.gallileus.info/gallileus/toptopics/Oliven/>
- Dialog online
http://www.dialog.inwent.org/en/rub_20031707121037/artikel_20030807125847.html
- edie
<http://www.edie.net/news/Archive/6953.cfm>
- Wissenschaft.de
<http://www.wissenschaft.de/sixcms/detail.php?id=204033>
- Österreich Journal
<http://www.oe-journal.at/Aktuelles/0303/W3/41903alphagalileo.htm>
- Global Potato News
http://www.potatonews.com/news/news_detail.asp?id=2689&year=2003

- Wissenschaft online
http://www.wissenschaft-online.de/page/fe_druck?article_id=618240

Zeitungs-Artikel:

- Generalanzeiger Bonn
- Berliner Zeitung
- Rhein-Sieg-Anzeiger
- Rheinzeitung Koblenz
- Wirtschaftswoche
- Die Welt
- WAZ
- Rheinische Post
- Westfälische Rundschau
- Bremer Nachrichten
- Ostfriesische Nachrichten
- Neues Deutschland
- Kölner Stadt-Anzeiger
- Anzeiger für Harlingerland
- Badische Neueste Nachrichten
- Bocholter Borkener Volksblatt
- Darmstädter Echo
- Pfälzischer Merkur
- Saarbrücker Zeitung
- Niederelbe-Zeitung

5 Zusammenfassung

Die Regulierung von Pilzkrankheiten stellt im ökologischen Landbau ein immenses Problem dar. Es besteht ein großer Bedarf an Alternativen zu ökologisch bedenklichen kupfer- und schwefelhaltigen Fungiziden.

Oliventrester, ein Abfallprodukt der Olivenölproduktion, enthält Polyphenole, die sich einerseits durch antimikrobielle Eigenschaften auszeichnen und die zum anderen für die antikanzerogene und kardioprotektive Wirkung von Oliven(öl)-reicher Ernährung verantwortlich sind.

Ziel des Projektes war es, diese Substanzen zu gewinnen und einen potentiellen Einsatz als natürliches fungizides Pflanzenschutzmittel zu evaluieren.

In der ersten Phase des Projektes wurden umfassend die chemischen und physikalischen Rohmaterialeigenschaften des Tresters ermittelt. Der anfallende Oliventrester zeichnet sich durch einen hohen Anteil an unlöslichen Ballaststoffen aus, was ihm eine zähe, stabile Zellstruktur verleiht. Mit einem Anteil von über 50% liegt der Wassergehalt des Tresters relativ hoch. Eine frühzeitige Trocknung bietet sich aus mehreren Gründen an:

- Die chemische und mikrobiologische Stabilität wird verbessert.
- Der Transport wird durch die starke Gewichtsreduktion ökonomischer und ökologischer.
- Die Extraktionsausbeute wird um ca. 25% erhöht.
- Die Trocknung ist notwendig für die nachfolgenden Prozesse Vermahlung und Entölung.

Polyphenole stellen eine reaktive Substanzgruppe dar. Deshalb sollte ein möglichst schonender Trocknungsprozess gewählt werden, um ungewollte Reaktionen zu vermeiden.

Oliventrester weist mit 44% eine relativ hohe Porosität auf, was das Eindringen des Lösungsmittels in das Extraktionsgut erleichtert und damit eine gute Voraussetzung für die Extraktion darstellt. Die spezifische Oberfläche, an der der Stoffübergang bei der Fest-Flüssig-Extraktion erfolgt, fällt jedoch klein aus. Es wird somit eine Vermahlung des Tresters empfohlen, um die Oberfläche zu vergrößern, die Diffusionswege zu verkürzen und um die Zellen aufzuschließen. Es sollte jedoch keine zu kleine Partikelgröße angestrebt werden, weil mit sinkender Partikelgröße die Schwellungs- und Wasserbindungskapazität zunimmt. Dies erschwert und verschlechtert die Fest-Flüssig-Trennung und führt so zu Verlust an Extraktstoffen und höherem Energiebedarf. Außerdem erschwert eine zu kleine Partikelgröße die gesamte Handhabung und Prozessführung. Es hat sich gezeigt, dass eine Nassvermahlung des Tresters aufgrund der zäh-elastischen Zellstruktur nur schlecht möglich ist. Getrockneter Trester wird jedoch spröde und lässt sich gut z.B. mit einer Zentrifugalmühle vermahlen.

Es konnten umfangreiche Erkenntnisse gesammelt werden, wie sich die Extraktionsausbeute erhöhen lässt. Dies stellt einen wichtigen Aspekt dar, weil die Polyphenole mit einem Anteil von ca. 1,2% (i. Tr., berechnet als Tannin) Minorkomponenten in dem Trester sind. Die Ausbeute entscheidet somit stark über die Rentabilität des Vorhabens. Eine Maßnahme sowohl zur Erhöhung der Ausbeute als auch zur drastischen Verkürzung der Extraktionszeit ist die Extraktion unter erhöhten Temperaturen. Allerdings müssen hier Auswirkungen auf die Selektivität und ein eventuelles Auftreten von unerwünschten Reaktionen berücksichtigt werden. Die Vermahlung des Tresters bringt die gleichen Vorteile mit sich wie die Extraktion unter erhöhten Temperaturen. Hierbei sind jedoch die oben genannten Aspekte zu beachten. Als sehr effektive und ökonomische Methode zur Optimierung der Ausbeute hat sich die Extraktion im alkalischen Milieu erwiesen. Die Zellwände des Tresters werden hierdurch aufgelöst und die Wirkstoffe effizient freigesetzt. Völlig erfolglos hingegen blieben sowohl

die Versuche, die Wirksubstanzen enzymatisch freizusetzen als auch der Einsatz der Ultraschallextraktion.

Die Wahl des Extraktionsmittels ist der wichtigste Parameter einer Extraktion. Hierdurch wird das Spektrum an Substanzen bestimmt, das aus den Feststoffen herausgelöst wird. Weiterhin werden durch die Wahl des Extraktionsmittels Parameter wie Selektivität, Ausbeute, Aufnahmekapazität für die Extraktstoffe, aber auch Aspekte wie Wirtschaftlichkeit, Toxizität und Betriebssicherheit festgelegt. Es wurde untersucht, welches Lösungsmittel dasjenige Spektrum an Substanzen aus dem Oliventrester extrahiert, welches die höchste fungizide Wirksamkeit aufweist. Die Extraktion mit einem Wasser-Ethanol (1:1) Gemisch bei dem pH-Wert pH=9 ergibt die wirksamsten Extrakte. Auch Ethylacetat extrahiert ein sehr wirksames Wirkungsspektrum; allerdings ist die Polyphenolausbeute hier ca. 20 mal geringer als bei den Wasser-Ethanol-Extrakten. Die Verwendung von Wasser als Extraktionsmittel wäre die ökonomischste, umweltfreundlichste und sicherste Methode. Die wässrigen Extrakte haben sich in den Untersuchungen jedoch als die unwirksamsten erwiesen.

Vor der eigentlichen Polyphenolextraktion wird eine lipophile Extraktion mit Hexan durchgeführt. Das vorzeitige Entfernen des Ölanteils ist notwendig, weil ansonsten neben den Polyphenolen auch Öl aus dem Trester gelöst werden würde, welches dann einen Großteil des Gesamtextraktstoffs ausmachen würde. Das anfallende Olivenöl kann als Tresteröl zum menschlichen Verzehr verwendet werden. Allerdings muss es zuvor raffiniert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass pflanzenpathogene Schimmelpilze wie *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* durch polyphenolhaltige Tresterextrakte in in-vitro-Versuchen gehemmt werden. Der Inhibierungseffekt auf untersuchte Bakterien ist im Vergleich hierzu deutlich schwächer ausgeprägt.

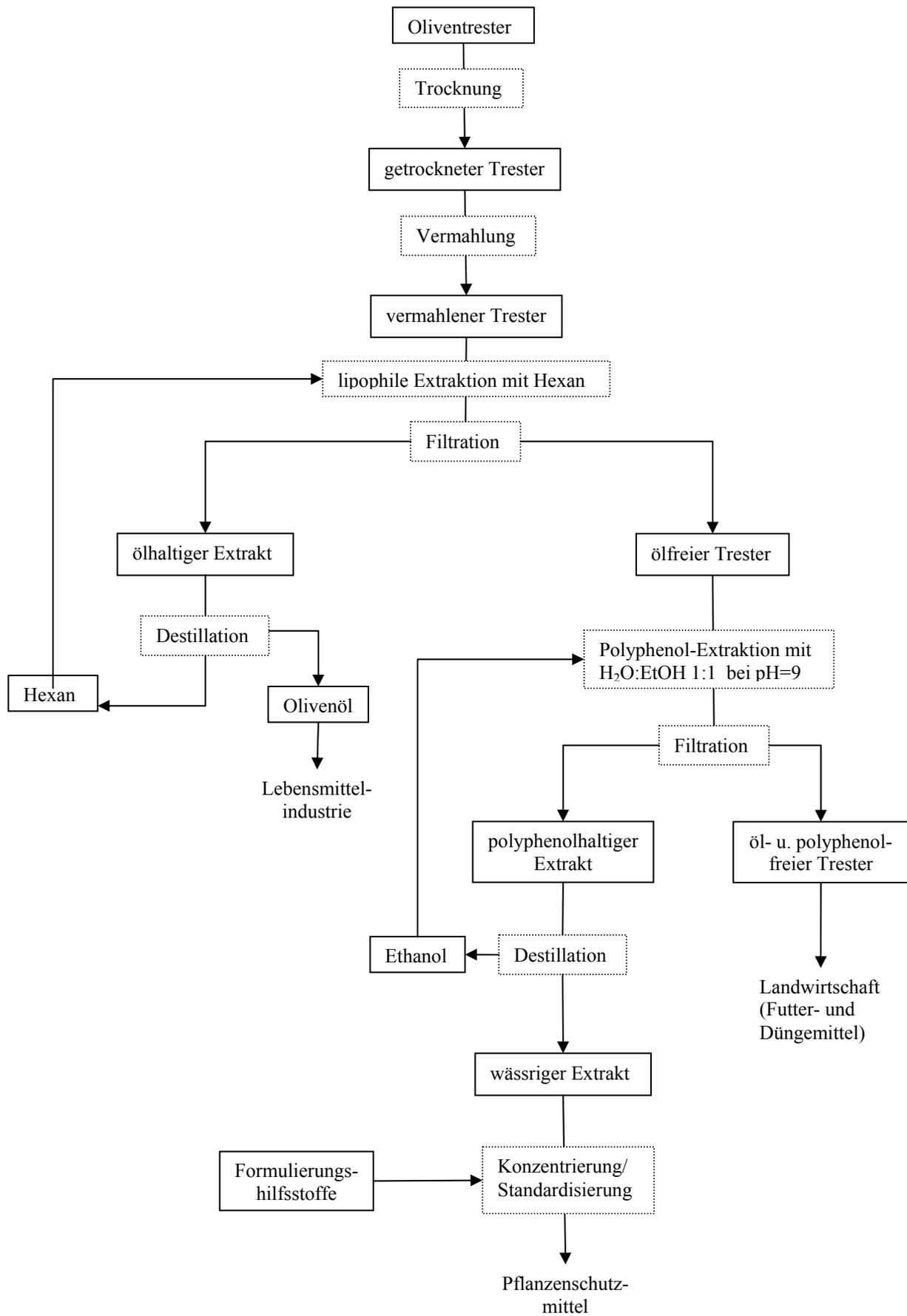
In Untersuchungen mit käuflich erworbenem Olivenblätterextrakt wurde herausgefunden, dass durch die gleichzeitige Anwendung von hoher Temperatur und starker Säure die fungizide Wirksamkeit erhöht werden kann. Die HPLC-Analytik hat aufgezeigt, dass unter diesen Bedingungen das Hauptpolyphenol Oleuropein in stärker antimikrobiell wirksame Reaktionsprodukte gespalten wird. Ob sich dieser Effekt auch auf die Tresterextrakte übertragen lässt, muss noch überprüft werden. Bemühungen, das Wirkungsspektrum und somit die fungizide Aktivität enzymatisch zu modifizieren, blieben erfolglos.

Der Aufbau der Polyphenolanalytik hat sich als sehr problembehaftet herausgestellt. Zwar kann der Gesamtphenolgehalt photometrisch ermittelt werden, jedoch ist die Identifizierung und Quantifizierung von Einzelsubstanzen trotz intensiver Arbeiten mit DC, HPLC, LC, SPE nicht hinreichend zufriedenstellend gelungen. Somit konnte bisher das Wirksubstanzenpektrum nicht charakterisiert und keine Leitsubstanzen festgesetzt werden.

Erste Pflanzenversuche haben gezeigt, dass Oliventresterextrakte Apfel- und Tomatenpflanzen vor dem Befall durch *Botrytis cinerea* (Grauschimmel) schützen. Chlorophyllfluoreszenz-Messungen indizieren, dass sich die Extrakte in bereits wirksamen Anwendungskonzentrationen nicht phytotoxisch verhalten.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass nach den bisherigen Untersuchungen die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels realistisch erscheint. Die Wirkstoffe des Tresters können durch praktikable Prozesse effizient freigesetzt und gewonnen werden. Alle untersuchten Fungi lassen sich in in-vitro-Versuchen durch diese Wirkstoffe hemmen, wobei fortführende Optimierungsarbeiten an dem Wirkungsspektrum noch weiteres Potential zur Maximierung der antimikrobiellen Wirksamkeit bieten. Die ersten Pflanzenversuche zeigen eine gute Schutzwirkung der Extrakte bei zwei Pflanze-Pathogen-Systemen ohne phytotoxische Effekte zu bewirken. Somit sind die Ergebnisse zum jetzigen Stand des Projektes als sehr vielversprechend zu bewerten.

Der Prozessablauf, wie er nach bisherigen Untersuchungsergebnissen vorgeschlagen wird, ist in dem nachfolgenden Flussdiagramm dargestellt.



6 Geplante und erreichte Ziele, weiterführende Fragestellungen

Während der Laufzeit des Projektes konnten viele Ergebnisse gesammelt werden und die geplanten Ziele wurden zufriedenstellend erreicht. In einigen Projektteilen übertrafen die durchgeführten Untersuchungen die Vorgaben des ursprünglichen Arbeitsplanes. So wurden detaillierte Rohmaterialeigenschaften ermittelt, wobei die Analyse der chemischen Zusammensetzung ergänzt wurde durch die Ermittlung relevanter physikalischer Eigenschaften. Für die mikrobiologische Bearbeitung des Projektes wurde, wie vorgesehen, eine Stammsammlung relevanter Mikroorganismen aufgebaut. Es konnte ein mikrobiologisches Bearbeitungskonzept entwickelt werden, das geeignet ist, die inhibierende Wirkung der Extrakte zu quantifizieren. Die geplanten Versuche zur mechanischen, thermischen und biochemischen Freisetzung der Wirkstoffe wurden abgearbeitet. Aus diesen Untersuchungen konnten eindeutige Erkenntnisse über eine effiziente Freisetzung der Polyphenole gewonnen werden. Die im Arbeitsplan vorgesehenen Untersuchungen zur Extraktion wurden in ihrem geplanten Ausmaß übertroffen. Die Optimierung der Extraktionsparameter, insbesondere die Wahl des Extraktionsmittels, ist eine komplexe und wichtige Aufgabe. So haben diese Parameter einen direkten Einfluss auf die Wirksamkeit, die Ausbeute, die Gestaltung der nachgeschalteten Prozesse, die Wirtschaftlichkeit und Umweltverträglichkeit des Projektes. Dementsprechend bietet dieser Projektteil noch weiterführende Bearbeitungsmöglichkeiten.

Eine Abweichung von dem Arbeitsplan ergibt sich durch Schwierigkeiten bei dem Aufbau der Polyphenolanalytik. Zwar konnte eine photometrische Methode zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes erfolgreich implementiert werden. Es gelang jedoch trotz intensiver Bemühungen nicht, eine zufriedenstellende Einzelsubstanzanalytik aufzubauen. Somit konnten Wirkstoffspektren bislang nicht näher aufgeschlüsselt und charakterisiert werden. Auch Modifikationen an den Substanzen wie zum Beispiel die hydrolytische Spaltung des Oleuropeins konnten demnach analytisch nicht zufriedenstellend nachvollzogen werden.

Die praktischen Untersuchungen zur Formulierungsentwicklung wurden bis auf einige Vorversuche noch nicht gestartet. Daher konnten in diesem Bericht noch keine Ergebnisse zu diesem Projektteil präsentiert werden. Die zeitliche Verzögerung liegt darin begründet, dass zunächst noch vermehrt an einer Optimierung der Extraktion und des Wirkstoffspektrums gearbeitet wird. So lange nicht festgelegt wurde, welche Extrakte als Ausgangspunkt für die Formulierungsentwicklung genutzt werden, machen detaillierte Untersuchungen hierzu noch keinen Sinn. Außerdem sollten Arbeiten zur Konzentrierung und Standardisierung der Extrakte der Formulierungsentwicklung vorangehen.

Die Versuche mit Pflanzenmaterial waren bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sehr umfangreich. Es konnten trotzdem schon wichtige und im Sinne des Projektes sehr positive Schlüsse gezogen werden, die eine optimistische Einschätzung des Vorhabens rechtfertigen.

Das Projekt befindet sich demnach an einem Punkt, der zwar noch weit von entfernt ist von der Fertigstellung eines marktreifen Pflanzenschutzmittels, aber die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das angedachte Endziel realistisch ist.

Die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels ist eine komplexe, umfangreiche Aufgabe. Aufgrund der Kürze der bisherigen Projektlaufzeit bleiben noch viele Fragestellungen offen und es stehen noch viele weiterführende Untersuchungen aus. Die fortzuführenden Arbeitsgebiete sind:

- Optimierung der Extraktion und des Wirkstoffspektrums
 - Optimierung der Wirksamkeit
 - Optimierung der Ausbeute
 - Optimierung der Selektivität

- Polyphenolanalytik
 - Bestimmung des Wirkstoffspektrums
 - Bestimmung des Wirkstoffanteils
 - Identifikation und Quantifizierung von Leitsubstanzen

- Rohextraktaufbereitung
 - Aufreinigung
 - Konzentrierung
 - Standardisierung

- Entwicklung der Pflanzenschutzmittelformulierung
 - adäquate Benetzungs-, Filmbildungs-, Hafteigenschaften
 - Unterstützung der Wirksamkeit
 - Lagerstabilität
 - ökologische Unbedenklichkeit

- Pflanzenversuche
 - pflanzenphysiologische Untersuchungen
 - Untersuchungen zu unterschiedlichen Wirt-Pathogen-Systemen
 - Anwendungskonzentrationen und –zeitpunkte
 - Freilandversuche

7 Literaturverzeichnis

- [1] Akasbi, M., D.W. Shoeman, A. Saari Csallany. „High-Performance Liquid Chromatography of Selected Phenolic Compounds in Olive Oils”. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 70 (4) (1993): 367-370
- [2] Alcaide, E.M., Nefzaoui, A. (1996) Recycling of olive oil by-products: Possibilities of the utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38, 227-235
- [3] Ames, B.N., M. Profet, L.S. Gold. 1990. „Dietary Pesticides (99.99% All Natural)“. *Proc Natl Acad Sci. USA* 87: S. 7777-7781. (Zit.in. Watzl, Leitzmann 1999, 15)
- [4] Amiot, M.-J., A. Fleuriet, J.-J. Macheix. „Importance and Evolution of Phenolic Compounds in Olive during Growth and Maturation”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34 (1986): 823-826
- [5] Amiot, M.-J., A. Fleuriet, J.-J. Macheix. „Accumulation of Oleuropein Derivatives during Olive Maturation”. *Phytochemistry* 28 (1) (1989): 67-69
- [6] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG. (1997) Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung der Ballaststoffe in Lebensmitteln
- [7] Assmann, G., G. de Backer, S. Bagnara, [et al.]. 1997. „International Consensus Statement on Olive Oil and the Mediterranean Diet: Implications for Health in Europe“. *Eur J Cancer Prevent.* 6: S. 418-421.
- [8] Atkins, Peter W. *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1996
- [9] Auffret, A., Ralet, M.-C., Guillon, F., et al. (1994) Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibres. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 27, 166-172
- [10] Aziz, N.H., S.E. Farag, L.A.A. Mousa, [et al.]. „Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds”. *Microbioscience* 93 (1998): 43-54
- [11] Baldioli, M., M. Servili, G. Perretti. „Antioxidant Activity of Tocopherols and Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil”. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 73 (11) (1996): 1589-1593
- [12] Baltes, Werner. *Lebensmittelchemie.* 4. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, u.a.: Springer-Verlag, 1995
- [13] Bast, Eckhard: *Mikrobiologische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag 2001
- [14] Bauer, Kurt H., Karl-Heinz Frömming, Claus Führer. *Pharmazeutische Technologie.* 2., durchgesehene Auflage. Stuttgart: Thieme, 1989

- [15] Belitz, Hans-Dieter, Werner Grosch. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 4., überarbeitete Auflage, korrigierter Nachdruck. Berlin, Heidelberg, New York, u.a.: Springer-Verlag, 1992
- [16] Benavente-García, O., J. Castillo, J. Lorente, [et al.]. „Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves”. *Food Chemistry* 68 (2000): 457-462
- [17] Bennink, R., (1990) *Fiber Analysis*. New York: Dekker Inc
- [18] Bisignano, G., A. Tomaino, R. Lo Cascio, [et al.]. „On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol”. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51 (1999): 971-974
- [19] Bianco, Armandodoriano, Roberto Lo Scalzo und Maria Luisa Scarpati. 1993. „Isolation of Cornoside from *Olea europaea* and its Transformation into Halleridone“. *Phytochemistry*. 32: S. 455-457.
- [20] Biesalski, Konrad und Peter Grimm. 2002. *Taschenatlas der Ernährung*. 2. Auflage. Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag.
- [21] Bläser, Peter: Diss. *Isolierung und Charakterisierung von Pflanzenwirkstoffen mit fungizider Wirkung*, Shaker Verlag, Bonn 1999
- [22] BLC, Bundesverband der Lebensmittelchemiker/-innen im öffentlichen Dienst e.V., Hg. *Olivenöl – Speiseöl seit Jahrtausenden*. <http://www.lebensmittel.org/lebensm/olivenol/sensolir.htm>. Stand 20.08.2002
- [23] Bock, W., Ohm, G. (1983) Einfluß der gewachsenen biologischen Struktur auf die Wasserbindungskapazität ausgewählter Obst- und Gemüsepräparate. *Die Nahrung* 27(2), 205-210
- [24] Börner, Horst: *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* (7. Auflage), Ulmer Verlag, Stuttgart 1997
- [25] Boskou, D. 2000. „Olive Oil“. *Mediterranean diets*. Hg: A. Simopolous und F. Visioli., *Wld Rev Nutr Diet*. 87. Basel: Karger Press. S. 56-77.
- [26] Bravo, L. 1999. „Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance“. *Nutr Rev*. 56: S. 317-333. (Zit.in. VISIOLI 2002)
- [27] Brenes-Balbuena, M., P. Garcia-Garcia, A. Garrido-Fernandez. „Phenolic Compounds Related to the Black Colour Formed during the Processing of Ripe Olives”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (1992): 1192-1196
- [28] Brenes, M., P. Garcia, M.C. Duran, [et al.]. „Concentration of Phenolic Compounds Change in Storage Brines of Ripe Olives”. *Journal of Food Science* 58 (2) (1992): 347-350

- [29] Brenes, M., L. Rejano, P. García, [et al.]. „Biochemical Changes in Phenolic Compounds during Spanish-Style Green Olive Processing”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (1995): 2702-2706
- [30] Brenes, M., A. García, P. García, [et al.]. „Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999): 3535-3540
- [31] Brenes, M., A. García, P. García, [et al.]. „Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Colourmetric Electrode Array System”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000): 5178-5183
- [32] Briante, R., F. La Cara, F. Febbraio, [et al.]. „Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts”. *Journal of Biotechnology* 93 (2002): 109-119
- [33] Brunauer, S., Emmet, P.H., Teller, E. “Adsorption of gases in multimolecular layers”. *Journal of the American Chemical Society* 60(1938), 309-319
- [34] Bunke, Markus, Katrin Hoenicke. *Photometrische Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes von Getränken mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz*. Praktikumsmethodensammlung, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie (1999). <http://www.chemie.uni-hamburg.de/lc/Sop/1999/9914SOP.pdf>
- [35] Cacace, J.E., G. Mazza. „Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol”. *Journal of Food Science* 68 (1) (2003): 240-248
- [36] Capasso, Renato, Antonio Evidente und Francesco Scognamiglio. 1992. „A Simple Thin Layer Chromatographic Method to Detect the Main Polyphenols Occurring in Olive Oil Vegetation Waters“. *Phytochemicals Analysis*. 3: S. 270-275.
- [37] Capasso, R., A. Evidente, L. Schivo, G. Orru, M.A. Marcialis und G. Christinzio. 1995. „Antibacterial Polyphenols from Olive Oil and Waste Waters“. *Journal of Applied Bacteriology*. 79: S. 393-398.
- [38] Capasso, R., A. Evidente, C. Visca, [et al.]. “Production of Glucose and Bioactive Aglycone by Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Purified Oleuropein from *Olea Europea*”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (61) (1996): 365-377
- [39] Chen, J.Y., Piva, M., Labuza, T.P. (1984) Evaluation of Water binding (WBC) of food fibre sources. *Journal of Food Science* 49, 59-63
- [40] Chmiel, Horst, Hg. *Bioprozesstechnik 1*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1991
- [41] Chmiel, Horst, Hg. *Bioprozesstechnik 2*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1991
- [42] Cimato, A., A. Mattei, M. Osti. „Variation of Polyphenol Composition with Harvesting Period”. *Acta Horticulturae* 286 (1990): 453-456

- [43] Cinquanta, L., M. Esti, E. La Notte. „Evolution of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil During Storage”. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 74 (1997): 1259-1264
- [44] Clemente, A., R. Sánchez-Vioque, J. Vioque, [et al.]. „Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases”. *Food Biotechnology* 11 (3) (1997): 273-291
- [45] Damtoft, Søren, Henrik Franzky und Søren Rosendal Jensen. 1993. „Biosynthesis of Secoiridoid Glucosides in *Oleaceae*“. *Phytochemistry*. 34. S. 1291-1299.
- [46] Deckwer, Wolf-Dieter, Alfred Pühler, Rolf D. Schmidt, Hg. *Römpp Lexikon Biotechnologie und Gentechnik*. 2., völlig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999
- [47] De Laurentis, N., G. Crescenzo, O.R. Lai und M.A. Milillo. 1997. „Investigation on the Extraction and Concentration of Oleuropein and Flavonoids in *Olea europaea* L. Based Products“. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 7 (1): S. 27-30.
- [48] Di Giovacchino, L., M. Solinas und M. Miccoli. 1994. „Effect of Extraction Systems on the Quality of Virgin Olive Oil“. *J Am Oil Chem Soc*. 71: S. 1189-1194.
- [49] Engelhardt, U. und R. Galensa. 1997. *Analytiker Taschenbuch 15: Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln*. Hg. Günzler et al. Berlin/ Heidelberg: Springer Verlag.
- [50] Esti, M., L. Cinquanta, E. La Notte. „Phenolic compounds in Different Olive Varieties”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998): 32-35
- [51] Etchells, J.T., A.F. Borg, I.D. Kittel, [et al.]. „Pure Culture Fermentation of Green Olives”. *Applied Microbiology* 14 (6) (1966): 1027-1041
- [52] EU, European Union, Hg. *Improvement of olive oil quality by biotechnological means*. Final Technical Report. Project AIR3-CT93-1355. Brussels, Belgium: European Union, 2000. Zit. in Rodis, P.S., V.T. Karathanos, A. Mantzavinou. „Partitioning of Olive Oil Antioxidants between Oil and Water Phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002): 596-601
- [53] EUROCHEM Feinchemie GmbH, Hg. Spezifikation Olivenblätterextrakt, 40 %. Analysenzertifikat für Charge Nr. 02E002
- [54] Favati, F., G. Caporale, M. Bertuccioli. „Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil”. *Grasas y Aceites* 45 (1994): 68-70
- [55] Fayed, M.E., Otten, L. (1997) *Handbook of powder Science & Technology*. 2nd edition. New York: International Thomson Publishing
- [56] Federici, Federico und Guido Bongi. 1983. „Improved Method for Isolation of Bacterial Inhibitors from Oleuropein Hydrolysis“. *Applied and Environmental Microbiology*. 46 (3): S. 509-510.

- [57] Felizón, B., J. Fernández-Bolaños, A. Heredia, [et al.]. „Steam–Explosion Pretreatment of Olive Cake”. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 77 (1) (2000): 15-22
- [58] Fernández, M.J., R. Castro, A. Garrido, [et al.]. *Biotechnología de la Aceituna de Mesa*. Sevilla, Spain: Instituto de la Grasa y sus Derivados, 1985. Zit. in Brenes, M., P. Garcia, M.C. Duran, [et al.]. „Concentration of Phenolic Compounds Change in Storage Brines of Ripe Olives”. *Journal of Food Science* 58 (2) (1992): 347-350
- [59] Fennema, O. R. *Food chemistry*. 3rd edition. New York: Dekker Inc, 1996
- [60] Ficarra, Paola, Rita Ficarra, Anna De Pasquale, Maria Teresa Monforte und Maria Luisa Calabrò. 1991. „HPLC Analysis of Oleuropein and some Flavonoids in Leaf and Bud of *Olea europaea* L“. *Il farmaco*. 46 (6): S. 803-815.
- [61] Fleming, H.P., J.L. Etchells. „Occurrence of an Inhibitor of Lactic Acid Bacteria in Green Olives”. *Applied Microbiology* 15 (5) (1967): 1178-1184
- [62] Fleming, H.P., W.M. Walter, J.L. Etchells. „Isolation of a Bacterial Inhibitor from Green Olives”. *Applied Microbiology* 18 (5) (1969): 856-860
- [63] Fleming, H.P., W.M. Walter, J.L. Etchells. „Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives”. *Applied Microbiology* 26 (5) (1973): 777-782
- [64] Franke, Wolfgang. *Nutzpflanzenkunde*. 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York:1992
- [65] Franke, Günther: *Nutzpflanzen der Tropen und Suptropen* (2. Auflage), Ulmer Verlag, Stuttgart 1994
- [66] Garcia, A., Brenes, M., Moyano, J., [et al.]. “Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation.” *Journal of Food Engineering* 48(2001): 189-194
- [67] Gariboldi, P., G. Jommi und L. Verotta. 1986. „Secoiridoids from *Olea europaea*“. *Phytochemistry*. 25 (4): S. 865-869.
- [68] Goupy, Pascale, Annie Fleuriet, Marie-Josèphe Amiot und Jean-Jacques Macheix. 1991. „Enzymatic Browning, Oleuropein Content and Diphenol Oxidase Activity in Olive Cultivars (*Olea europaea* L.)“. *J Agric Food Chem*. 39: S. 92-95.
- [69] Gourama, H., B. Letutour, A. Tantaoui-Elaraki, [et al.]. „Effects of Oleuropein, Tyrosol and Caffeic Acid on the Growth of Mold Isolated from Olives”. *Journal of Food Protection* 52 (4) (1989): 264-266
- [70] Gritter, R.J., J.M. Bobbitt und A.E. Schwarting. 1987. *Einführung in die Chromatographie*. Berlin/ Heidelberg: Springer Verlag.
- [71] Gutiérrez Rosales, F., S. Perdiguero, R. Gutiérrez und J. M. Olías. 1992. „Evaluation of the Bitter Taste in Virgin Olive Oil“. *JAOCs*. 69 (4): S. 394-395.

- [72] Gutiérrez, F., B. Jiménez, A. Ruíz, [et al.]. „Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive Oil Extracted from the Varieties Picual and Hojiblanca and on the Different Components Involved”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999): 121-127
- [73] Haddadin, M.S, Abdulrahim, S.M., Al-Kawaldeh, G.Y., et al. (1999) “Solid state fermentation of waste pomace from olive processing.” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74, 613-618
- [74] Haddadin, M.S., Abu-Reesh, I., Al-Oaissiah, O.A. (1995) “The Olive (*Olea europaea*) – benefits and problems of commercial production in the middle east.” *Agriculture and Engineering International* 49(2), 76-78
- [75] Henke, Hans. 1994. *Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- [76] Henn, Th., B. Kunz. „Zum Wegwerfen zu schade (Teil 1) Multifunctional Ingredients from Low-Residue Food Production“. *Zeitschrift für Lebensmitteltechnologie* 47 (1/2) (1996): 21-23
- [77] Hertog, M.G., E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan und D. Kromhout. 1993. „Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study“. *Lancet*. 342 (8878): S. 1007-1011.
- [78] Hoffmann, M., Schmutterer, H.: *Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen* (2. Auflage), Ulmer Verlag, Stuttgart 1999
- [79] Hollomon, D.W., K.J. Brent. „Fungicide resistance – can we cope with it?”. *Chemistry and Industry* (1989): 177-182
- [80] Hung, C.-Y., G.-C. Yen. „Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Isolated from *Mesona procumbens* Hemsl“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002): 2993-2997
- [81] James, C.S. “Analytical Chemistry of Foods” Chapman & Hall, Maryland, 1999
- [82] Jiménez, A., Guillén, A., Fernández-Bolanos, J., et al. (1994) “Cell wall composition of olives.” *Journal of Food Science* 59(6), 1192-1196
- [83] Jiménez, A., Guillén, A., Fernández-Bolanos, J., Heredia, A. (1995) “Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during “Spanish green olive” processing.” *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43, 2240-2246
- [84] Juven, B., Z. Samish, Y. Henis. „Identification of Oleuropein as a Natural Inhibitor of Lactic Fermentation of Green Olives”. *Israel Journal of Agricultural Research* 18 (1968): 137-138
- [85] Juven, B., Z. Samish, Y. Henis, [et al.]. „Mechanism of Enhancement of Lactic Acid Fermentation of Green Olives by Alkali and Heat Treatments”. *Journal of Applied Bacteriology* 31 (1968): 200-207

- [86] Juven, B., Y. Henis. „Studies on the Antimicrobial Activity of Olive Phenolic Compounds”. *Journal of Applied Bacteriology* 33 (1970): 721-732
- [87] Juven, B., Y. Henis, B. Jakoby. „Studies on the Mechanism of the Antimicrobial Action of Oleuropein”. *Journal of Applied Bacteriology* 35 (1972): 559-567
- [88] Kaur, C., H.C. Kapur. „Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables”. *International Journal of Food Science and Technology* 37 (2002): 153-161
- [89] Kessler, Heinz-Gerhard. *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie*. 4., erweiterte und überarbeitete Auflage. Freising-Weihenstephan: Verlag A. Kessler, 1996
- [90] Keys A. 1995. „Mediterranean Diet and Public Health: Personal Reflections“. *Am J Clin Nutr.* 61: S. 1321S-1323S.
- [91] Kiritsakis, Apostolos K. *OLIVE OIL - From the tree to the table - second edition*. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press, Inc., 1998
- [92] Kreisel, H., Schauer, F.: *Methoden des mykologischen Laboratoriums*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New York 1987
- [93] Kubo, I., A. Matsumoto, I. Takase. „A Multichemical Defense Mechanism of Bitter Olive *Olea europaea* (OLEACEAE). Is Oleuropein a Phytoalexin Precursor?”. *Journal of Chemical Ecology* 11 (2) (1985): 251-263
- [94] Kunz, Benno. *Lexikon der Lebensmitteltechnologie*. Berlin, Heidelberg, New York, u.a.: Springer-Verlag, 1993
- [95] Kunz, Benno. *Biotechnology*. Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Bonn, 1997
- [96] Kunz, Benno: *Grundriss der Lebensmittel-Mikrobiologie*, Behr 1994
- [97] Kunz, Benno. *Grundlagen der Verfahrenstechnik II. Mechanische Verfahrenstechnik*. Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Bonn, 1999
- [98] Kuwajima, Hiroshi, Takeshi Uemura, Kiyokazu Takaishi, Kenichiro Inoue und Hiroyuki Inouye. 1988. „A Secoiridoid Glucoside from *Olea europaea*“. *Phytochemistry*. 27 (6): S. 1757-1759.
- [99] Laufenberg, G., B. Kunz, M. Nystroem. „Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations”. *Bioresource Technology* 87 (2003), 167-198
- [100] Lee, Hyoungh S. „HPLC Analysis of Phenolic Compounds”. *Food Analysis by HPLC, Second Edition*, Hg. Leo M.L. Nollet. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000, 775 ff.

- [101] Le Tutour, Bernard und Didier Guedon. 1992. „Antioxidative Activities of *Olea europaea* Leaves and Related Phenolic Compounds“. *Phytochemistry*. 31: S. 1173-1178.
- [102] Lifka, J., Ondruschka, B., Hofmann, J.: „Einsatz von Ultraschall zum Schadstoffabbau in Wasser: Aquasonolyse – Eine Übersicht“. *Chemie Ingenieur Technik*. (74) 412002: 403-413
- [103] Litridou, M., J. Linssen, H. Schols, [et al.]. „Phenolic Compounds in Virgin Olive Oils: Fractionation by Solid Phase Extraction and Antioxidant Activity Assessment“. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74 (1997): 169-174
- [104] Loncin, Marcel. *Die Grundlagen der Verfahrenstechnik in der Lebensmittelindustrie*. Frankfurt/Main: Verlag Sauerländer, 1969
- [105] Macheix, Jean-Jacques, Annie Fleuriet, Jean Billot. *Fruit Phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1990
- [106] Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G. *Lebensmittelanalytik*. 2. Auflage. Hamburg: Springer-Verlag, 1992
- [107] Meyer, Veronika R. 1992. *Praxis der Hochleistungschromatographie*. 7. Auflage. Frankfurt: Salle und Sauerländer.
- [108] Micromeritics (2003) The Science and Technology of Small Particles
http://www.micromeritics.com/products/gemini_technique_overview.aspx
- [109] Montedoro, G., M. Servili, M. Baldioli, [et al.]. „Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (1992): 1571-1576
- [110] Montedoro, G., M. Servili, M. Baldioli, [et al.]. „Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Initial Characterization of the Hydrolyzable Fraction“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (1992): 1577-1580
- [111] Montedoro, G., M. Servili, M. Baldioli, [et al.]. „Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (1993): 2228-2234
- [112] Mothes, K. 1980. „Historical Introduction“. *Encyclopedia of Plant Physiology 8: Secondary Plant Products*. Hg. E.A. Bell, und B.V. Charlwood. Berlin/ Heidelberg/ New York: Springer Verlag, S. 1-10.
- [113] Nergiz, C., K. Ünal. „Effect of Method of Extraction on the Total Polyphenol, 1,2-Diphenol Content and Stability of Virgin Olive Oil“. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 56 (1991): 79-84
- [114] Niebelschütz, H. „Olivenölproduktion ..und die Umwelt?“. *Bio World* 4 (2002): 16-19

- [115] Nychas, G.J.E., S.C. Tassou, R.G. Board. „Phenolic extract from olives: inhibition of *Staphylococcus aureus*”. *Letters in Applied Microbiology* 10 (1990): 217-220
- [116] Nychas, G.J.E. „Natural antimicrobials from plants”. *New methods of food preservation*. Hg. G.W. Gould. London: Blackie Academic & Professional, 1995, 58-89
- [117] Owen, R.W., W. Mier, A. Giacosa, [et al.]. „Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene”. *Food and Chemical Toxicology* 38 (2000): 647-659
- [118] Palma, S. *Análise de Produtos Alimentares II*, Excola Superior Agrária de Beja, Beja, 1999
- [119] Petkov, V., P. Manolov. „Pharmacological Analysis of the Iridoid Oleuropein”. *Arzneimittel-Forschung* 22 (1972): 1476-1486
- [120] Pirisi, F.M., A. Angioni, P. Cabras, [et al.]. „Phenolic compounds in virgin olive oils. 1. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution”. *Journal of Chromatography A* 768 (1997): 207-213
- [121] Pirisi, F.M., P. Cabras, C.F. Cao, [et al.]. „Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000): 1191-1196
- [122] Präve, Paul, Uwe Faust, Wolfgang Sittig, [et al.], Hg. *Handbuch der Biotechnologie*. 3., neu bearbeitete Auflage. München: R. Oldenbourg Verlag, 1987
- [123] Ramos-Cormenzana, A., B. Juárez-Jiménez, M.P. Garcia-Pareja. „Antimicrobial Activity of Olive Mill Wastewaters (Alpechin) and Biotransformed Olive Oil Mill Wastewater”. *International Biodeterioration & Biodegradation* (1996): 283-290
- [124] Ranalli, A., F. Angerosa. „Integral Centrifuges for Olive Oil Extraction. The Qualitative Characteristics of Products”. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73 (1996): 417-422
- [125] Rechner, Andreas. 2000. „Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften“. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- [126] Richard, T. *The Effect of Lignin on Biodegradability*. <http://www.cfe.cornell.edu/compost/calc/lignin.html>. Stand 19.08.2002
- [127] Ritter, Guido. „Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben“. Diss. Gießen, 1994
- [128] Rodis, P.S., V.T. Karathanos, A. Mantzavinou. „Partitioning of Olive Oil Antioxidants between Oil and Water Phases”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002): 596-601

- [129] Rodríguez-Kábana, R., V. Estaún, J. Pinochet, [et al.]. „Mixtures of Olive Pomace with Different Nitrogen Sources for the Control of *Meloidogyne* spp. on Tomato“. *Journal of Nematology* 27 (1995): 575-584
- [130] Romani, Annalisa, Nadia Molinacci, Patrizia Pinelli, Franco F. Vincieri und Antonio Cimato. 1999. „Polyphenolic Content in Five Tuscani Cultivars of *Olea europaea* L.“. *J Agric Food Chem.* 47: S. 964-967.
- [131] Römpp Chemie Lexikon (CD)-Version 1.0. Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag, 1995
- [132] Rosato, Pietro. „The upgrading concept and its application on the bioconversion of oil press cake into natural decalactones“. Diplomarbeit Bonn, 2001
- [133] Ruiz-Barba, J.L., A. Garrido-Fernandez, R. Jimenez-Diaz. „Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against *Lactobacillus plantarum*“. *Letters in Applied Microbiology* 12 (1991): 65-68
- [134] Savournin, Cyril, Béatrice Baghdikan, Riad Elias, Frida Darghout-Kesraoui, Kamel Boukef und Guy Balansard. 2001. „Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves“. *J Agric Food Chem.* 49 (2): S. 618-621.
- [135] Schieber, A., F.C. Stintzing, R. Carle. „By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments“. *Trends in Food Science and Technology* 12 (2001): 401-413
- [136] Schlegel, H., Zaborosch, C.: Allgemeine Mikrobiologie, Thiemen Verlag, Stuttgart 1992
- [137] Schlünder, Ernst-Ulrich, Franz Thurner. *Destillation, Absorption, Extraktion*. Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg Lehrbuch Chemie + Technik, 1995
- [138] Schmandke, Horst. 2001. „Phenolische Inhaltstoffe der Olive mit antioxidativen Eigenschaften“. *Ernährungs-Umschau.* 48 (12): S. 490-492.
- [139] Scholten, G., M. Kacprowski. „Zur Analytik von Polyphenolen in Wein“. *American Journal of Enology and Viticulture* 48 (1992): 33-38
- [140] Schubert, Heinrich, Hg. *Handbuch der Mechanischen Verfahrenstechnik Band 2*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003
- [141] Schwister, Karl, Hg. *Taschenbuch der Verfahrenstechnik*. Leipzig: Carl Hanser Verlag, 2000
- [142] Servili, M., M. Baldioldi, F. Mariotti, [et al.]. „Phenolic Composition of Olive Fruit and Virgin Olive Oil: Distribution in the Constitutive Parts of the Fruit and Evolution during the Oil Mechanical Extraction Process“. *Acta Horticulturae* 474 (1999): 609-613

- [143] Servili, M., M. Baldioli, R. Selvaggini, [et al.]. „Phenolic Compounds of Olive Fruit: One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Nüzhenide and Its Distribution in the Constitutive Parts of Fruit”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999): 12-18
- [144] Servili, M., M. Baldioli, R. Selvaggini, [et al.]. „High-Performance Liquid Chromatography Evaluation of Phenols in Olive Fruit, Virgin Olive Oil, Vegetation Waters, and Pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance Characterization”. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 76 (7) (1999): 873-882
- [145] Shahidi, Fereidoon, Marian Naczk. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1995
- [146] Sheabar, F., I. Neeman. „Separation and Concentration of Natural Antioxidants From the Rape of Olives”. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 65 (6) (1988): 990-993
- [147] Siemens, Wolfgang, Rüdiger Worthoff. *Grundbegriffe der Verfahrenstechnik*. 2., völlig überarbeitete Auflage. Heidelberg: Hüthig Buch Verlag, 1991
- [148] Sinclair, W. A., Lyon, H. H., Johnson, W. T.: *Diseases of Trees and Shrubs* (3. Auflage), Comstock Publishing Associates, London 1993
- [149] Singleton, V.L., J.A. Rossi. “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”. *American Journal of Enology Viticulture* 16 (1965): 144-158
- [150] Skoog, Douglas A. und James J. Leary. 1996. *Instrumentelle Analytik: Grundlagen – Geräte – Anwendungen*. Springer-Lehrbuch. Berlin/ Heidelberg/ New York: Springer Verlag.
- [151] Soler-Rivas, Christina, Juan Carlos Espín und Harry J Wichers. 2000. „Oleuropein and Related Compounds“. *J Sci of Food Agric*. 80: S. 1013-1023.
- [152] Solovchenko, A., Schmitz-Eiberger, M. “Significance of flavonoids for UV-B protection during adaptation of apple fruits to strong sunlight.” *Journal of Experimental Botany* (2003) 54, (389), 1-8.
- [153] Sommer, K. (2000) „40 Jahre Darstellung von Partikelgrößenverteilungen – und immer noch falsch?“. *Chemie Ingenieur Technik* 72(8), 809-812
- [154] Spugnoli, P., A. Parenti, D. Cardini. „Process parameters control to improve olive-oil transformation quality”. *Acta Horticulturae* 474 (1999): 615-619
- [155] Sun, R., Hughes, S. “Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp.” *Carbohydrate Polymers* 36 (1998), 293-299
- [156] Tassou, C.C. und G.J.E. Nychas. 1995. „Inhibition of *Salmonella enteritidis* by Oleuropein in Broth and in a Model Food System“. *Letters in Applied Microbiology*. 20: S. 120-124.

- [157] Täufel, Alfred, Waldemar Ternes, Liselotte Tunger, [et al.], Hg. *Lebensmittel-Lexikon. Bd. 1. A-K.* 3., neubearbeitete und aktualisierte Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 1993
- [158] Täufel, Alfred, Waldemar Ternes, Liselotte Tunger, [et al.], Hg. *Lebensmittel-Lexikon. Bd. 2. L-Z.* 3., neubearbeitete und aktualisierte Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 1993
- [159] Tanner, Hans, Rudolf Brunner. *Getränke-Analytik.* 2., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Schwäbisch Hall: Verlag Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft mbH, 1987
- [160] Tassou, C.C., G.J.E. Nychas, R.G. Board. „Effect of Phenolic Compounds and Oleuropein on the Germination of *Bacillus cereus* T Spores”. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 13 (1991): 231-237
- [161] Ternes, Waldemar. *Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung.* 2., neubearbeitete und aktualisierte Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 1994
- [162] Tscheuschner, Horst-Dieter, Hg. *Grundzüge der Lebensmitteltechnik.* 2., überarbeitete Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 1996
- [163] Tsimidou, M., G. Papadopoulos, D. Boskou. „Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection”. *Food Chemistry* 44 (1992): 53-60
- [164] Tsimidou, M. „Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect“. *Italian Journal of Food Science* 10 (2) (1998): 99-116
- [165] Valiente, C., E. Arrigoni, R.M. Esteban, [et al.]. „Chemical Composition of Olive By-Product and Modifications through Enzymatic Treatments”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69 (1995): 27-32
- [166] Vauck, Wilhelm R.A., Herrmann A. Müller. *Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik*, 10., durchgesehene Auflage. Leipzig, Stuttgart: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1994
- [167] Vierhuis, E., M. Servili, M. Baldioli, [et al.]. „Effect of Enzyme Treatment during Mechanical Extraction of Olive Oil on Phenolic Compounds and Polysaccharides”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001): 1218-1223
- [168] Visioli, F., A. Poli, C. Galli. „Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil”. *Medicinal Research Reviews* 22 (2002): 65-75
- [169] Visioli, F., A. Romani, N. Mulinacci, S. Zarini, D. Conte, F.F. Vincieri und C. Galli. 1999. „Antioxidant and Other Biological Activities of Olive Mill Waste Waters“. *J Agric Food Chem.* 47: S. 3397-3401.

- [170] Visioli, F. und C. Galli . „Natural Antioxidants and Prevention of Coronary Heart Disease: The Potential Role of Olive Oil and its Minor Constituents“. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 5(1995): S. 306-314
- [171] Visioli, F., F.F. Vinceri und C. Galli. „Waste Waters from Olive Oil Production are Rich in Natural Antioxidants“. *Experientia.* 51(1995): S. 32-34.
- [172] Vitolo, S., L. Petarca, B. Bresci. „Treatment of olive oil industry wastes“. *Bioresource Technology* 67 (1999): 129-137
- [173] Vlyssides, A.G., Loizidou, M., Zorpas, A.A. “Characteristics of solid residues from olive oil processing as bulking material for co-composting with industrial wastewaters”. *Journal of Environment, Science and Health* 34(3) (1999), 737-748
- [174] Walter, W.M., H.P. Fleming, J.L. Etchells. „Preparation of Antimicrobial Compounds by Hydrolysis of Oleuropein from Green Olives“. *Applied Microbiology* 26 (5) (1973): 773-776
- [175] Web Progetto. *Natural Antioxidants from Olive Oil Processing Wastewater.* Project EU n.CT973039. <http://www.tecnoalimenti.com/ProjectEUPL963039/index.htm>. Stand 17.09.2002
- [176] Weber J.L. *The water binding capacity of fruit and vegetable fibres*, Dissertation, University Minnesota, 1987
- [177] Weidenbörner, Martin: *Lebensmittel-Mykologie*, Behr Verlag 1998
- [178] Wünschiers, R. „Der Niembaum in Pflanzenschutz und Medizin - Ein Baum hilft heilen“. *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 2 (2002): 55-58