

Einfluss des Röstprozesses auf gesundheitsrelevante Inhaltsstoffe und Wirkungen von Nüssen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Jena Institut für Ernährungswissenschaften Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie Prof. Dr. Michael Glei
Forschungsstelle II:	Universität Jena Institut für Ernährungswissenschaften Lehrbereich Biochemie der Ernährung Prof. Dr. Stefan Lorkowski/Dr. Wiebke Schlörmann
Industriegruppe(n):	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Bonn Verband der deutschen Getreideverarbeiter und Stärkehersteller e.V. (VDGS), Berlin Nucis e.V. Deutschland, Hamburg
	Projektkoordinator: Gabriele Kirchberg, Nucis e.V. Deutschland, Hamburg
Laufzeit:	2012 - 2015
Zuwendungssumme:	€ 336.900,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Nüsse sind eine wichtige Quelle für lebenswichtige Nährstoffe und können unter Berücksichtigung relevanter Verzehrsmengen (ca. 40 g/Tag) etwa 10 % der Tagesdosis (TD) an Thiamin, Niacin, Folat, Phosphor und Zink liefern. Nüsse sind zudem reich an Vitamin E (20 % der TD). Wegen ihres hohen Fettgehaltes werden Nüsse vom Verbraucher eher für ungesund gehalten. Laut aktueller Nationaler Verzehrstudie ist für Deutschland ein Pro-Kopf-Verzehr von nur 2 g pro Tag an reinen Nussprodukten zu verzeichnen. Der Verzehr liegt somit deutlich unter der empfohlenen Tagesmenge.

Nach neuen Erkenntnissen haben Nüsse vielfältige gesundheitsfördernde Effekte. Es gibt Hinweise, dass ein häufiger Nussverzehr protektiv gegenüber koronaren Herzerkrankungen (CHD) wirkt, mit einem reduzierten Risiko sowohl für tödliche Herzerkrankungen als auch für nicht-tödliche Herzinfarkte assoziiert ist und eine in-

verse Beziehung zwischen Nusskonsum und CHD-bedingter Gesamttodesrate besteht.

Nüsse sind auch eine gute Ballaststoffquelle. Mit einem Tagesverzehr von 40 g Nüssen können 5-12 % des empfohlenen Verzehrs an Ballaststoffen (30 g/Tag) aufgenommen werden. Ballaststoffe wirken sich positiv auf die Funktion des Verdauungstraktes aus. Wasser wird absorbiert, dieses verdünnt den Stuhl und beugt so Darmträgheit und Verstopfung vor. Einige der darmgesundheitsfördernden Effekte tragen zur Linderung der Symptome bei chronischen entzündlichen Darmerkrankungen bei und sind vermutlich an der Chemoprävention des Kolonkrebsses beteiligt. In Tierstudien reduzierten Mandeln histologisch veränderte Darmschleimhautbereiche (*aberrant crypt foci*) und die EPIC-Studie (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study*) wies für Frauen eine inverse Assoziation zwischen Nuss- und Samenkonsum und dem Risiko für Kolorektalkrebs nach.

Ungeklärt ist, wie verschiedene Nüsse zur Darmgesundheit beitragen und welchen Einfluss eine Röstung der Nüsse auf deren protektive Fähigkeiten hat. So ist kaum bekannt, wie Nüsse die Darmfermentation beeinflussen und welche Metabolite dabei gebildet werden. Es kann angenommen werden, dass Vitamin E und Vitamin-E-Metabolite sowie Polyphenole im Darm chemoprotektive und gesundheitsfördernde Wirkungen entfalten; diese Annahme bedarf aber noch einer Bestätigung. Auch wurde noch nicht untersucht, welche präbiotischen Eigenschaften Nüsse haben, obwohl dies für die Beurteilung der gesundheitsfördernden Wirkung von nuss-haltigen Lebensmitteln von großer Bedeutung ist.

Bisherige Studien zum Einfluss von Nüssen auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind vornehmlich epidemiologischer Natur und haben zum Teil kontroverse Ergebnisse geliefert. Vor allem fehlen systematische Studien an entsprechenden Modellsystemen, die den Beitrag einzelner Nusssorten, einzelner Nussinhaltsstoffe und daraus gebildeter Metabolite bzw. des Verarbeitungsprozesses auf die Funktion von Immunzellen aufzeigen, die einen wesentlichen Beitrag zur Erkrankung leisten. Daher sollten die Untersuchungen im Rahmen dieses IGF-Vorhabens helfen, die molekularen Wirkmechanismen der Inhaltsstoffe von Nüssen und den daraus gebildeten Metaboliten sowie den Einfluss des Röstprozesses darauf in Makrophagen aufzuklären.

Im Forschungsprojekt sollte an unterschiedlichen Nusssorten (Haselnuss, Macadamia, Walnuss, Pistazie und Mandel) untersucht werden, wie sich verschiedene Röstbedingungen auf die Entstehung von gesundheitsbedenklichen Substanzen, aber auch von gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen auswirken. Ziel des Forschungsvorhabens war es, den Einfluss des Röstprozesses auf die Entstehung von Acrylamid, wertgebenden Inhaltsstoffen und Metaboliten, sensorische Parameter sowie neue, potentiell gesundheitsfördernde Wirkungen verschiedener Nusssorten *in vitro* in humanen Zellen zu untersuchen. Hierbei sollten drei wesentliche Endpunkte berücksichtigt werden:

- Einfluss der Röstbedingungen auf den Gehalt physiologisch wertvoller und toxischer Inhaltsstoffe ausgewählter Nüsse sowie auf den Geschmack.
- Einfluss der Inhaltsstoffe optimiert gerösteter Nüsse auf gesundheitsrelevante Parameter im Darm unter besonderer Berücksichtigung an-

tioxidativer, antitoxischer sowie antigenotoxischer Mechanismen.

- Einfluss der Inhaltsstoffe optimiert gerösteter Nüsse auf atherogene Prozesse und atheroprotektive Wirkungen unter besonderer Berücksichtigung von Entzündungsprozessen, Lipideinlagerung und proteolytischer Aktivität.

Forschungsergebnis:

Bei mittleren Temperaturen geröstete Nüsse (140-160°C) wurden sensorisch am besten bewertet. In gerösteten Haselnüssen, Walnüssen und Macadamia konnte kein Acrylamid nachgewiesen werden. Die Acrylamidkonzentration stieg in Pistazien (14-88 µg/kg) und Mandeln (16-1.220 µg/kg) mit zunehmender Rösttemperatur an. Die Fettsäurezusammensetzung der Nüsse wurde durch den Röstprozess nicht beeinflusst. Die Gehalte an Tocopherolisomeren verminderten sich dagegen deutlich (α-T: 38 %, β-T: 40 %, γ-T: 70 %). Auch die hydrophile antioxidative Kapazität wurde in Haselnüssen (um 28,4 %), Macadamia (um 41,1 %) und Walnüssen (um 72,6 %) signifikant vermindert. Malondialdehydgehalte stiegen mit intensiveren Röstbedingungen vor allem in Walnüssen an (17-fach). Die gerösteten Nüsse wurden erfolgreich *in vitro* fermentiert und Fermentationsüberstände (FÜ) gewonnen. Im Vergleich zum FÜ der Leerkontrollen (40,27 ± 6,49 mmol/L) war die Konzentration an SCFA in den Nuss-FÜ (92,67 ± 15,49 mmol/L) erhöht. Die höchsten Ammonium-Konzentrationen wurden in FÜ von Mandeln gemessen (70,0 ± 1,3 mM), FÜ von Macadamia wiesen die geringsten Gehalte auf (34,8 ± 5,0 mM). In den FÜ der Nüsse waren die Gallensäuregehalte im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Nuss-FÜ zeigten keine genotoxischen, dafür aber teilweise antigenotoxische Effekte. Das Wachstum von LT97-Adenomzellen konnte durch die Nuss-FÜ gehemmt werden. Die Genexpression chemopräventiv wirksamer Enzyme (GSTP1, GSTT2, CAT, SOD2, COX2, GPX1) wurde durch Haselnuss- und Mandel-FÜ in LT97-Zellen teilweise signifikant induziert. Auch die Aktivität der GSTs wurde durch Mandel-FÜ teilweise signifikant erhöht. Haselnuss- und Mandel-FÜ waren in der Lage, über eine Aktivierung der Capsase-3 Apoptose in LT97-Zellen zu induzieren. Rückschlüsse auf das präbiotische Potential *in vitro* verdauter Haselnüsse und Mandeln konnten nicht eindeutig abgeleitet werden. Die FÜ von rohen Nüssen zeigten keinen Einfluss auf die Vitalität, Apoptose, Genexpres-

sion oder auf die Enzymaktivitäten in primären Kolonozyten. Ein eindeutiger Einfluss des Röstprozesses auf funktionelle Effekte in vitro fermentierter Nüsse bestand nicht. Die Viabilitätsuntersuchungen für die langkettigen Vitamin E-Metabolite α -13-COOH und α -13-OH ergaben EC_{50} -Werte von $7,4 \mu\text{M} \pm 1,5 \mu\text{M}$ bzw. $11,1 \mu\text{M} \pm 4,0 \mu\text{M}$.

Im Kontext der Untersuchungen zu atherogenen Prozessen konnte festgestellt werden, dass die langkettigen Metabolite α -13'-OH und α -13'-COOH die CD36-Expression signifikant erhöhten, während α -Tocopherol die Expression signifikant senkte. Die langkettigen Vitamin-E-Metabolite führten außerdem zu einer zusätzlichen Steigerung der durch oxidiertes LDL induzierten CD36-Expression. Die Aufnahme von oxidiertem LDL in humanen Makrophagen wurde jedoch durch α -13'-OH und α -13'-COOH gesenkt. Es zeigte sich, dass dies durch eine Verminderung der Phagozytoseaktivität der Makrophagen durch α -13'-OH und α -13'-COOH verursacht wird. Bei den anschließenden Experimenten zur Untersuchung von relevanten Entzündungsparametern konnte gezeigt werden, dass die durch LPS hervorgerufene Induktion der RNA- und Proteinmenge von iNos und Cox2 durch α -13'-OH und α -13'-COOH in RAW264.7 blockiert wird. Die Vitamin-E-Metabolite α -13'-OH und α -13'-COOH verhinderten auch die durch LPS induzierte Produktion von NO und Prostaglandin E₂. Die entzündungshemmende Wirkung von α -13'-COOH beruht jedoch nicht auf einer Regulation des Transkriptionsfaktors NF κ B. Außerdem wirkte α -13'-COOH konzentrations- und zeitabhängig leicht genotoxisch, was besonders hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf eine potentielle adaptive Stressantwort interessant ist. Weiterführende Versuche sind hierzu jedoch noch notwendig.

Für die funktionellen Untersuchungen der Nussproben wurden diese zunächst in vitro fermentiert. Nach dem In-vitro-Verdau und der Extraktion der fettlöslichen Substanzen wurden die gewonnenen Nussproben einer zusätzlichen chemischen Verseifung bei 37°C mit 2 M ethanolischer KOH für 30 Minuten unterzogen, um eine vollständige Spaltung der Triacylglyceride zu erreichen. Es erfolgten im nächsten Schritt ähnlich zu den unverdauten Nussproben analytische Erhebungen zum Vitamin-E-Gehalt und zur Fettsäureverteilung. Außerdem wurde zusätzlich eine absolute Quantifizierung der fünf Hauptfettsäuren (Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure, Linolsäure, α -Linolensäure) in den extrahierten

und verseiften Nussproben durchgeführt, um die genauen Konzentrationen der verschiedenen Fettsäuren zu ermitteln. Basierend auf den ermittelten Fettsäurekonzentrationen wurden dann mittels MTT-Assay die aus den verschiedenen Nussproben extrahierten Lipide hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht. Die getesteten Konzentrationen (0-200 μM Fettsäuren gesamt) hatten keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, so dass In-vitro-Versuche mit physiologischen Fettsäurekonzentrationen ohne Beeinträchtigung der Zellvitalität möglich waren. Die gewonnenen Lipidextrakte zeigten unabhängig von der Rösttemperatur antiinflammatorische Eigenschaften. So waren die Extrakte unabhängig von der ursprünglich eingesetzten Rösttemperatur in der Lage, die durch eine Inkubation mit LPS hervorgerufene Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNos) und der Cyclooxygenase 2 zu hemmen. Diesem Hemmeffekt auf Proteinebene folgend, wurde auch die durch LPS induzierte Freisetzung von NO und Prostaglandin E₂ durch die Nussextrakte in RAW264.7-Makrophagen signifikant gesenkt. Hierbei zeigten die Nussextrakte vergleichbare Effekte wie die von Mischungen der am häufigsten in den jeweiligen Nussölen vorkommenden Fettsäuren, die eine ähnliche Zusammensetzung wie das jeweilige Nussöl aufwiesen. Es ist daher anzunehmen, dass die beobachteten Effekte in erster Linie von der Fettsäurezusammensetzung des jeweiligen Nussöls abhängig sind.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Forschungsprojektes haben eindeutig nachweisen können,

- dass marktrelevante Nussorten chemopräventive Eigenschaften aufweisen,
- dass der Verzehr von Nüssen grundsätzlich einen Beitrag zur Verminderung des Risikos einer Erkrankung an Dickdarmkrebs leisten kann und
- dass der Röstprozess keinen Einfluss auf die chemopräventiven Eigenschaften der Nüsse hat,
- dass der Röstprozess einen Einfluss auf wertgebende Inhaltsstoffe, wie Vitamin E, sowie auf die Bildung von potentiell gesundheitsbedenklichen Inhaltsstoffen, wie Acrylamid (in Mandeln) oder Lipidperoxydationsprodukten (in Walnüssen), hat,
- dass langkettige Vitamin-E-Metabolite antiinflammatorische Potenzial haben, aber auch leicht genotoxische Wirkungen zeigen,

- und dass auch die untersuchten Nussextrakte antiinflammatorische Wirkungen besitzen, die jedoch durch den Röstprozess nicht beeinträchtigt werden.

Die Ergebnisse des Vorhabens können im Rahmen des Produktmarketings und der Verbraucherinformation eingesetzt werden, um die positiven gesundheitlichen Effekte eines regelmäßigen Nussverzehrs zu unterstreichen und damit neue Kundenzielgruppen für die Lebensmittelindustrie zu erschließen und um die Wettbewerbsfähigkeit von Nussprodukten zu erhöhen.

Der im Rahmen des Vorhabens erarbeitete Überblick über die Zusammenhänge zwischen Röstung, wertgebenden Inhaltsstoffen und den In-vitro-Effekten von Nüssen gibt Unternehmen Handwerkszeuge zur Optimierung des Röstverfahrens sowie zur Entwicklung optimierter nusshaltiger Lebensmittel an die Hand.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht (2015).
2. Cifollilli, S., Wallert, M., Bartolini, D., Krauth, V., Werz, O., Piroddi, M., Sebastiani, B., Torquato, P., Lorkowski, S., Birringer, M. und Galli, F.: Human serum determination and in vitro anti-inflammatory activity of the vitamin E metabolite alpha-(13'-hydroxy)-6-hydroxychroman. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 952-962 (2015).
3. Schlörmann, W., Birringer, M., Bohm, V., Löber, K., Jahreis, G., Lorkowski, S., Müller, A.K., Schöne, F. und Gleib, M.: Influence of roasting conditions on health-related compounds in different nuts. *Food Chem.* 180, 77-85 (2015).
4. Schlörmann, W., Birringer, M., Lochner, A., Lorkowski, S., Richter, I., Rohrer, C. und Gleib, M.: In vitro fermentation of nuts results in the formation of butyrate and c9,t11 conjugated linoleic acid as chemopreventive metabolites. *Eur. J. Nutr.* DOI 10.1007/s00394-015-1020-0 (2015).

5. Wallert M., Mosig S., Rennert K., Funke, H., Ristow M., Pellegrino R.M., Cruciani G., Galli F., Lorkowski, S. und Birringer, M.: Long-chain metabolites of alpha-tocopherol occur in human serum and inhibit macrophage foam cell formation in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 68, 43-51 (2014).
6. Wallert, M., Schmözl, L., Koeberle, A., Krauth, V., Gleib, M., Galli, F., Werz, O., Birringer, M. und Lorkowski, S.: alpha-Tocopherol long-chain metabolite alpha-13'-COOH affects the inflammatory response of lipopolysaccharide-activated murine RAW264.7 macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 1524-1534 (2015).
7. Wallert, M., Schmözl, L., Galli, F., Birringer, M. und Lorkowski, S.: Regulatory metabolites of vitamin E and their putative relevance for atherogenesis. *Redox. Biol.* 2, 495-503 (2014).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Jena
 Institut für Ernährungswissenschaften
 Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie
 Dornburger Str. 24, 07743 Jena
 Tel.: +49 3641 949-670
 Fax: +49 3641 949-672
 E-Mail: michael.gleib@uni-jena.de

Universität Jena
 Institut für Ernährungswissenschaften
 Lehrbereich Biochemie der Ernährung
 Dornburger Straße 25, 07743 Jena
 Tel.: +49 3641 9497-10
 Fax: +49 3641 9497-12
 E-Mail: stefan.lorkowski@uni-jena.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
 Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
 Tel.: +49 228 3079699-0
 Fax: +49 228 9079699-9
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

Gefördert durch:



Bundesministerium
 für Wirtschaft
 und Energie

aufgrund eines Beschlusses
 des Deutschen Bundestages

Das IGF-Vorhaben AiF 16642 BR der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.