

Forschungsbericht BWPLUS

**Optimierung und Quantifizierung der Extraktion von Ab-
Produkten aus dem Kelterprozess der Weinbereitung in
Hinblick auf den Einsatz in der Pharma- und
Kosmetikindustrie (PPCPs)**

von

Christian Zörb, Nikolaus Merkt

Universität Hohenheim
Institut für Kulturpflanzenwissenschaften 340e (Weinbau)

Förderkennzeichen: BW 17003

Die Arbeiten des Baden-Württemberg-Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre
Sicherung (BWPLUS) werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Juni 2018

Abschlussbericht

Inhaltsverzeichnis

1. Förderziel des Projektes	3
2. Fragestellung und Ideenhintergrund	3
3. Biochemie interessanter Verbindungen im Trester	4
3.1. Struktur der Flavonoide	4
3.2. Struktur der Anthocyanidine	5
3.3. Struktur der Flavanole	6
3.4. Struktur der Flavonole	7
3.5. Struktur der Stilbene	7
4. Methoden zur Extraktion von interessanten Inhaltsstoffen im Trester	8
4.1. Rohstoff und Vorbehandlung des Rohstoffs	8
4.2. Extraktionsverfahren für Schalen und Kerne	8
5. Ergebnisse Analytik von Tresterkomponenten	11
5.1 Anthocyangehalte in Schalentrestern	11
5.2 Flavanol.- Flavonol- Polyphenolsäure und Stilbengehalte in Schalen	11
5.3 Polyphenolische Verbindungen in Traubenkernen	12
5.4 Zusammenfassendes Ergebnis	12
6. Bioaktivitätsstudien,	14
6.1 Material und Methoden	15
6.1.1 Testsubstanzen und Extrakte	15
6.1.2 Zellkultur-Experimente	15
6.1.3. Zytotoxizitätstest	16
6.1.4. Anti-inflammatorische Effekte von Protocatechinsäure (PA) und Quercetin-3-O- β -D-glucuronid (Miquelianin = MQ) und Extrakten aus Schale, Kern und Stielgerüsten	16
6.1.5. Proteinextraktion und subzelluläre Fraktionierung	16
6.1.6. Western-Blot Analyse von NF- κ B und p-NF- κ B	17
7. Ergebnisse zu Bioaktivitätsstudien	18
7.1 Zytotoxizitätstest	18
7.2 NFK B und P-NFK B Expression	19
7.3 Zusammenfassendes Ergebnis, Bioaktivitätsstudien	19
8. Zusammenfassung	19
9. Ausblick	19
10. Literatur	21

1. Förderziel des Projekts

Im Weinbau, mit seiner in Deutschland 2000-jährigen Tradition, sind im Wesentlichen kleine und mittlere Betriebe und Genossenschaften aktiv, die regionale, hochwertige Weine erzeugen. Der deutsche Weinbau vereint im Spannungsfeld der Bioökonomie, mit seinen Komponenten Kulturlandschaft, Tradition, Tourismus, Traubenerzeugung, Kellereiwesen und Weinkultur, sozio-ökonomische und agrarwissenschaftliche Aspekte. Um den Weinbau zu stärken, sind bioökonomische Ansätze geeignet zusätzliche Wertschöpfung zu ermöglichen. Das Ziel dieses Projekts war es, hochwertige nachwachsende Rohstoffe aus Trestern, die im Prozess des Kelterns der Beeren anfallen, zu extrahieren und einer bio-ökonomischen Nutzung zuzuführen. Zu diesem Zweck wurden die Extraktion von Ab-Produkten aus dem Kelterprozess der Weinbereitung optimiert und eine Quantifizierung von interessanten Stoffen im Hinblick auf den Einsatz in der Pharma- und Kosmetikindustrie evaluiert.

2. Fragestellung und Ideenhintergrund des Projekts

Beim Keltern der Trauben fallen so genannte Ab-Produkte, wie die Pressrückstände der Trauben (Traubentrester, Traubentreber), bestehend aus Beerenschalen und Kernen, sowie Stiele und Stielgerüste an. Diese werden nach der Keltersaison meist in den Weinberg verbracht und zwischen den Rebreihen „entsorgt“. Das Material reicht in der Regel jedoch nicht für den kompletten Bestand und hat eine geringe Düngequalität und ist daher leicht durch besser geeignete Wirtschaftsdünger zu ersetzen. Eine andere Verwertung ist die Extraktion der Kerne aus diesen Pressrückständen zur Gewinnung von hochwertigen Traubenkernölen oder Traubenkernextrakten, die u.a. in der Nahrungsergänzung von Sportlern eingesetzt werden (z.B.: <http://www.bulkpowders.de/traubenkern-extrakt.html>). Die diesen Extrakten nachgesagte positive Wirkung ist auf ihren Gehalt an sekundären Pflanzenstoffe zurückzuführen. In den Kernen und Traubenschalen befinden sich u.a. Polyphenole [1], die bei starker Sonneneinstrahlung sowie der weinbaulich üblichen Entblätterung im Traubenbereich verstärkt gebildet werden. Eine interessante Substanz ist das in den letzten Jahren stark positiv bewertete Resveratrol. Die Substanz wird ebenfalls aus Trauben gewonnen werden und gilt als gesundheitsfördernd oder gar Tumor-präventiv. Das Spektrum der phenolischen Verbindungen variiert je nach Sorte sehr stark und kann neben dem genannten auch weitere interessante Substanzen wie Anthocyane und deren Derivate enthalten.

Die in Weinbeeren wichtigsten sekundären Pflanzenstoffe sind Polyphenole, eine Gruppe von Verbindungen mit aromatischem Ring und mehreren Hydroxygruppen. Grob unterteilt werden

können diese Polyphenole in Flavonoide, Phenolsäuren (Benzoessäure- und Zimtsäurederivate) und Stilbene. Polyphenole sind von hohem Interesse, da ihnen gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben werden.

3. Biochemie interessanter Verbindungen im Trester

Bei der Weinbereitung und im reifenden Wein entstehen durch Polymerisationen, Veresterungen und Oxidationen eine große Vielfalt an polyphenolischen Verbindungen. In der Weintraube liegen Polyphenole überwiegend in der Beerenschale und im Kern, im Mesokarp nur in geringerer Menge, vor (Abb. 1). Unterschiedliche Rebsorten und deren Trester haben unterschiedliche Polyphenol- und Anthocyanmuster, diese können genutzt werden, um unterschiedliche Extrakte zu erhalten.

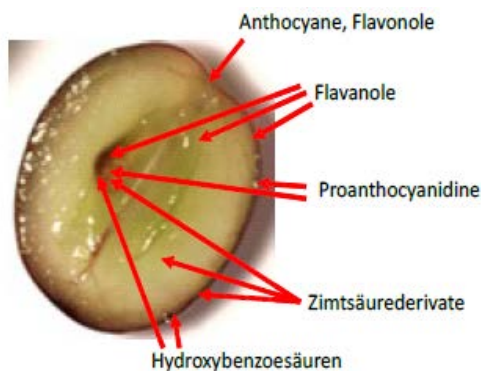


Abb. 1: Querschnitt durch die Weintraube und Lokalisierung der Phenole in Samen, Mesokarp, und Exokarp

3.1. Struktur der Flavonoide

Gemeinsames Grundgerüst der Flavonoide ist das Flavan ($C_6C_3C_6$ -Struktur, Abb. 2). Zwei aromatische Ringe sind über einen O-heterocyclischen Ring verbunden. Der B-Ring kann an C2 (Flavonoide) oder an C3 (Isoflavonoide) am C-Ring gebunden sein. Durch strukturelle Unterschiede am mittleren Ring (Hydroxy-Gruppe an C3, Ketogruppe an C4, Doppelbindung zwischen C2 und C3) wird unter anderem in die Untergruppen der Flavanole, Flavonole, Anthocyanidine, (Flavone, und Flavanone) unterteilt, wobei bei der Betrachtung von Weininhaltsstoffen nur die ersten drei genannten bedeutend sind.

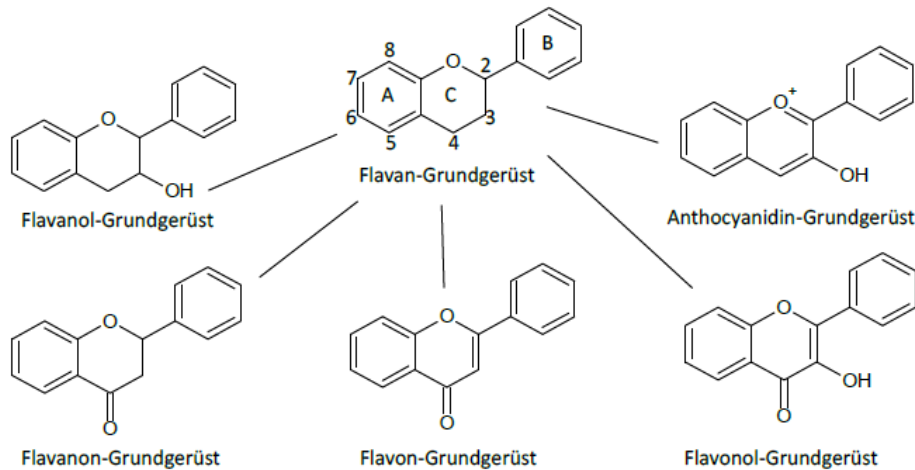


Abb. 2: Chemische Grundstrukturen des Flavans und seiner Flavonoid-Abkömmling

3.2. Struktur der Anthocyanidine

Anthocyanidine (aglykosidische Form) sind für rote, violette oder blaue bis blauschwarze Färbung in Früchten verantwortlichen Flavonoide. Fünf Grundformen wurden in Trauben und Wein gefunden: Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Paeonidin und Malvidin (Abb. 3) [

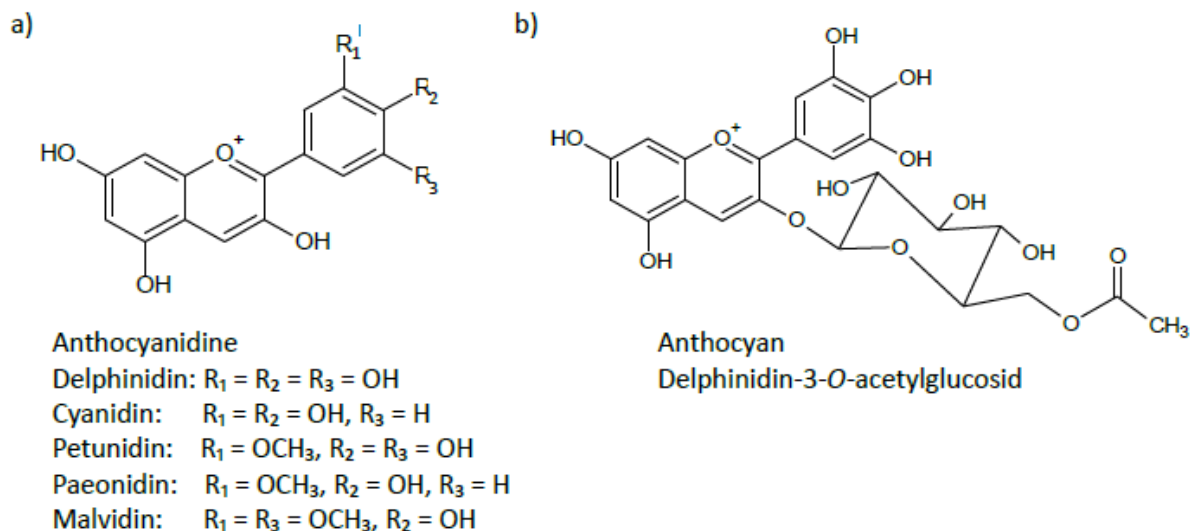


Abb. 3: Chemische Strukturen der a) Anthocyanidine und b) beispielhaft des Anthocyans mit kondensierter Säure

Im Pflanzengewebe liegen diese wegen der besseren Stabilität 3-O-glykosidisch an Zucker gebunden, als Anthocyane (engl.: *anthocyanin*), vor. Die 3-O-Monoglucoside von Cyanidin

und Malvidin werden auch als Kuromanin und Oenin bezeichnet. Zum Teil ist an den Zuckerrest, der häufig aus Glucose, Galaktose, Rhamnose oder Arabinose besteht, noch eine Säure (Essigsäure, Cumarsäure oder Kaffeesäure) kondensiert. Eine Besonderheit in pilzresistenten Hybridsorten von *Vitis vinifera* (sogenannte „PiWi“) ist das Vorkommen von 3,5-Diglucosiden wie Malvin, das aus Kreuzungen europäischer Rebsorten mit Amerikaner-Reben hervorging.

3.3. Struktur der Flavanole

Flavan-3-ole (Catechine) und Flavan-3,4-diole (Leukoanthocyanidine) sind farblose Verbindungen, die in der Natur in nicht-glykolysierter Form vorkommen und einen adstringierenden, bitteren Geschmack aufweisen. Die wichtigsten Vertreter der Flavan-3-ole sind die Isomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, (+)-Gallocatechin, (-)-Epigallocatechin und die an C3 mit Gallussaure veresterte Form (-)-Epigallocatechingallat (Abb. 4). Flavan-3,4-diole kommen in geringerer Menge in Trauben vor und werden durch Leukodelphinidin oder Leukocyanidin vertreten. Bei Erhitzen in saurem Milieu werden aus Leukoanthocyanidinen die roten Anthocyanidine gebildet. Weiterhin stellen Flavanole die Grundbausteine der kondensierten Tannine dar.

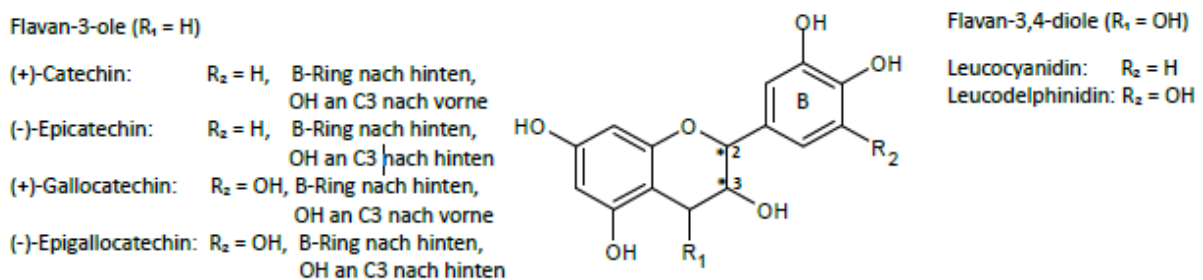


Abb. 4: Strukturen der Flavan-3-ole und Flavan-3,4-diole

3.4. Struktur der Flavonole

Flavonole sind gelbe Farbstoffe, zu deren bekanntesten Vertreter in Rotwein Quercetin, Kaempferol, Myricetin und Isorhamnetin zählen (Abb. 5). Diese liegen überwiegend 3-O-glykosidisch an Glucose (Isoquercitrin), Glucuronsäure, Galaktose (Hyperosid), Rhamnose, oder dem Disaccharid Rutinose (Rutin) gebunden vor. In einigen Rebsorten wie Pinot Noir

herrschen die Quercetin-Abkömmlinge vor, in anderen, wie Tempranillo, die von Myricetin. Weise Rebsorten unterscheiden sich zudem von roten durch das Fehlen von Myricetin-Derivaten [2-4].

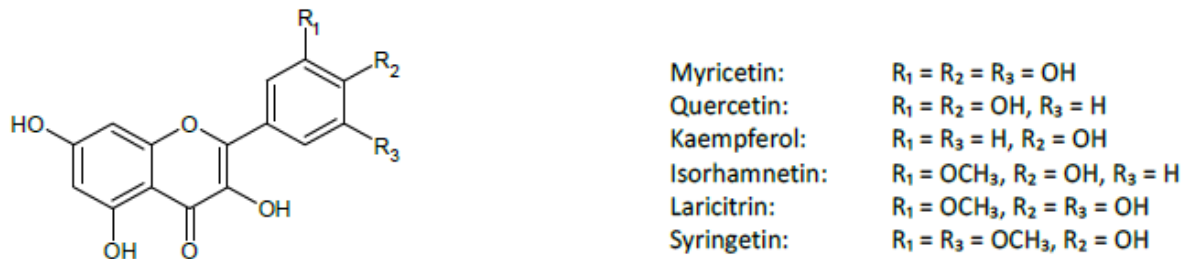


Abb. 5: Strukturen der Flavonole

3.5. Struktur der Stilbene

Stilbene werden in gesunden Trauben synthetisiert, bei abiotischem Stress kann die Produktion ansteigen. Leitsubstanz ist das Resveratrol, das in Trauben in seiner freien oder glucosylierten Form (Piceid/Polydatin) und als *trans*-Isomer vorliegt (Abb. 7). Lichteinfluss und die Prozessierung von Trauben führen zur Bildung der *cis*-Form. Durch Oxidation und Polymerisation von Stilbenen werden größere Oligomere gebildet, aus Resveratrol-Einheiten entsteht so die Gruppe der Viniferine.

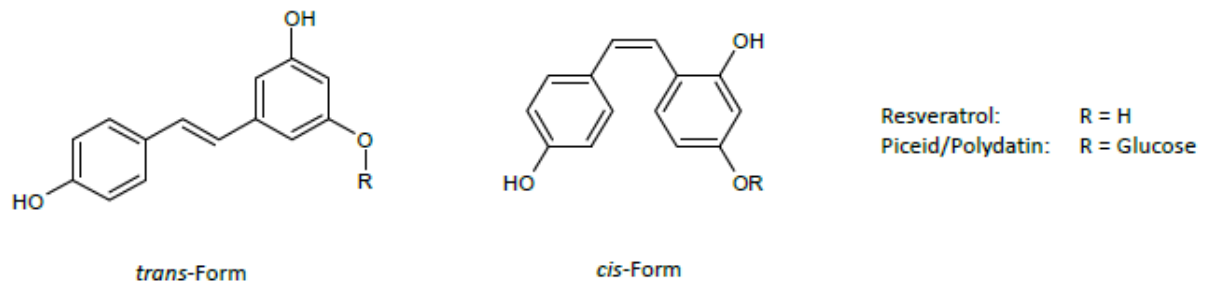


Abb. 7: Strukturen von Resveratrol und Polydatin

4. Methoden zur Extraktion von interessanten Inhaltsstoffen in Trester

4.1. Rohstoff und Vorbehandlung des Rohstoffs



Abb. 8: Gemahlene Beerenschalen aus der Schale von Rotweinbeeren (Schwarzriesling) von beiden Erhitzungsstufen während der Maischegärung.

Die Trester verschiedener Rebsorten (sortenrein) wurden zunächst gefriergetrocknet, dann wurden Beerenschalen und Kerne manuell separiert. Die Stielgerüste wurden ebenfalls gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Beerenschalen, Stielgerüste und Kerne gemahlen (Abb. 8). Die vermahlenden Proben konnten dann in geeignetem Lösungsmittel extrahiert werden (siehe unten).

Tab. 1 Die folgenden beiden Rebsorten (rot und weiss) und die folgenden Verfahren zur Vorbehandlung und zur Extraktion standen zur Verfügung:

Rebsorte	Vorbehandlung der Maische	Extraktion der Phenole aus Schalen	Extraktion der Phenole aus Kernen
Schwarzriesling (rot)	Thermisch Behandlung 65°C	ja	ja
Schwarzriesling (rot)	Thermisch Behandlung 85°C	ja	ja
Bacchus (weiss)	-	nein	ja

4.2. Extraktionsverfahren für Schalen und Kerne

Als Beispiel wird hier die Extraktion der a) Anthocyane sowie der b) Flavanole, Flavonole, Stilbene, Phenolcarbonsäuren beschrieben

a) Gerät und Methode zur Anthocyan-Bestimmung

- Gerät: Chromaster VWR Hitachi

- Säule: Agilent Eclipse Plus C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm, mit C18-, 5 µm-Vorsäulen-Kartusche
- Pumpe: 5610
- Autosampler: 5260
- Säulenofen: 5310
- Detektor: Diodenarray, 5430

Methode nach Kammerer et. al [24]

- Säulentemperatur: 25 °C
- Temperatur im Autosampler: 10 °C
- Durchflussrate: 0,8 mL/min
- aufgezeichnete Wellenlänge: 520 nm
- Stoppzeit: 48 min
- Eluent A: 60 mL Acetonitril auf 2 L mit Wasser, Ameisensäure (90 Volumenteile + 10 Volumenteile) aufgefüllt
- Eluent B: 1 L Acetonitril auf 2 L mit Wasser, Ameisensäure (40 Volumenteile + 10 Volumenteile) aufgefüllt
- Gradient: 0 min: 0 % B
- 10 min: 10 % B
- 15 min: 31 % B
- 20 min: 40 % B
- 30 min: 50 % B
- 40 min: 100 % B
- 45 min: 0 % B
- 48 min: 0 % B

b) Gerät und Methode zur Bestimmung der Flavanoole, Flavonole, Stilbene, Phenolcarbonsäuren

- Gerät: HPLC Merck Hitachi
- Säule: Phenomenex Kinetex, XB-C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm, mit C18-, 5 µm-Vorsäulen-Kartusche
- Pumpe: L-7100
- Entgaser: L-7612
- Autosampler: L-7200
- Säulenofen: Knauer Jet Stream 2
- Detektor: Diodenarray, L-7450A
- Methode nach Kammerer et. al [24], Gradient modifiziert
- Methode: Säulentemperatur: 25 °C
- Durchflussrate: 1,0 mL/min
- aufgezeichnete Wellenlängen: 280 nm, 320 nm, 360 nm
- Stoppzeit: 65 min
- Eluent A: 2 %ige Essigsäure
- Eluent B: 1 L Acetonitril auf 2 L mit 0,5 %iger Essigsäure aufgefüllt
- Gradient: 0 min: 18 %B
- 18 min: 18 % B
- 25 min: 25 % B
- 35 min: 30 % B
- 55 min: 35 % B
- 56 min: 100 % B
- 61 min: 100 % B

- 62 min: 18 % B
- 65 min: 18 % B

Triplequadrupol-Massenspektrometer (Firma AB Sciex, Darmstadt, Typ 3200 Q TRAP LC/MS/MS System)

- Software: Analyst Version 1.6.3 von AB Sciex
- Scan Modi: Product Ion (MS2) - Negativ
- Declustering Potential: 70 V
- Entrance Potential: -10 V
- Collision Energy: 10 (ohne Dimension)
- Curtain Gas: 10 (ohne Dimension)
- Ion Spray Voltage: 5500 V
- Temperatur API: 450 °C
- Ion Source gas: 13 (ohne Dimension)
- Collision Gas: medium

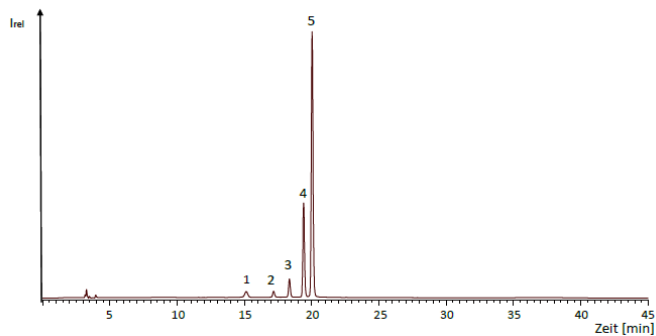


Abb. 9. Ausschnitt eines Chromatogramms des Beeren-schalenextraktes (520 nm (0-45 min) 1, Delphinidin-3*O*-glucosid; 2, Kuromanin; 3, Petunidin-3-*O*-glucosid; 4, Paeonidin-3-*O*-glucosid; 5, Oenin

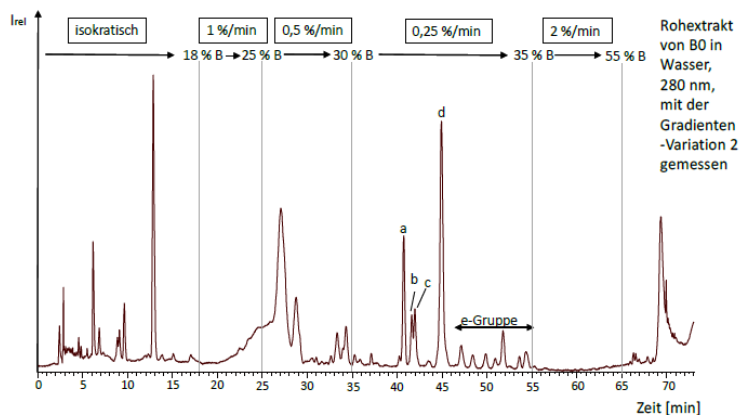


Abb. 10. Chromatogramm eines in saurem Wasser aufgenommenen Rohextraktes (mit einer in der Testphase verwendeten Gradienten Version 2) bei 289 nm gemessen, a-e Substanzpeaks, für die eine bessere Trennung erreicht wurde.

5. Ergebnisse Analytik von Tresterkomponenten

5.1. Anthocyangehalte in Schalentrestern

In den Beerenextrakten aus der Maischeerhitzung zeigte die Einwirkung der höheren Temperatur eine stärkere Extraktion der Schalen (Tabelle 2). Gemessen an den Hauptkomponenten Oenin und Paeonidinglucosid lag der Unterschied der Anthocyan-Gehalte in den Schalen zwischen den beiden eingesetzten Temperaturen bei 50 %.

Tabelle 2. Anthocyangehalte in den Beerenschalen (in mg/ 100 g Beerenschale) vor der Maischeerhitzung und nach Erhitzung auf 65°C. Startbedingungen: Kerne und Schalen vor der Erhitzung direkt nach dem Anpressen.

Anthocyan	Beerenschalen [mg/100 g]		
	Startbedingungen	nach Erhitzung auf 65 °C	nach Erhitzung auf 85 °C
Oenin	247,8	100,4	46,6
Paeonidinglucosid	88,5	35,0	17,2
Petunidinglucosid	30,1	12,8	7,6
Kuromanin	10,6	4,0	< 2,5
Delphinidinglucosid	33,0	14,6	10,9

Für die Hauptkomponente Oenin mit den höchsten Gehalten in der Beerenschale begünstigen die längeren Kontaktzeiten die Extraktion in den Wein stärker als das thermische Verfahren (Tab. 2). Das bedeutet, dass die Trester aus Maischeerhitzungsverfahren sehr wohl geeignet sind für eine spätere Weiterverwendung der Beerenschalen da hier noch genügend hohe Oenin-Gehalte in den Trestern verbleiben. Insgesamt verbleiben weniger der gemessenen Anthocyane in höher erhitzter Maische.

5.2. Flavanol-, Flavonol-, Polyphenolsäure- und Stilbengehalte in Schalentrestern

Die Gehalte an Caftarinsäure, Hydroxybenzoesäure Cutarsäure und Epicatechin lagen etwa in ähnlichem Bereich zwischen 13,5 und 11,3 mg/100 g Schalen. Die Gehalte von Polydatin, Quercetinglucuronid und Isoquercitrin lagen etwas niedriger bei 6,6-3,4 mg/110 g Schalen (Tab. 3). Insgesamt verbleiben mehr der gemessenen polyphenolischen Substanzen in höher erhitzter Maische.

Tabelle 3. Gehalte der nicht zu den Anthocyanen gehörenden Polyphenolen in Beerenschalen vor der Maischeerhitzung und nach der Erhitzung auf 65°C und 85°C, U1 und U2: Substanzen nicht identifiziert. Startbedingungen: Kerne und Schalen vor der Erhitzung direkt nach dem Anpressen.

Polyphenol	Beerenschalen	[mg/100 g]	
	Startbedingungen	nach Erhitzung auf 65 °C	nach Erhitzung auf 85 °C
Caftarsäure	27,2	12,5	18,3
Hydroxybenzoesäure*	21,7	11,7	35,8
Cutarsäure	27,7	13,5	19,3
Epicatechin	11,2	11,3	41,6
Polydatin	11,2	3,4	5,6
Quercetinglucuronid	12,9	3,7	1,7
Isoquercitrin	12,5	6,6	6,1
U1	n. d.	n. d.	n.d.
U2	67,5	30,0	22,5

*Koelution

5.3. Polyphenolische Verbindungen in Traubenkernen

In Kernen wurden keine nennenswerten Gehalte an Anthocyanen festgestellt. Dafür wurden Polyphenole in höheren Konzentrationen gefunden. Gallussäure und Caftarsäure lagen in nennenswerten Konzentrationen zwischen 166 und 230 mg pro 100 g Kernmehl (Tab. 4) vor. Caftarsäure findet sich nur in den Kernen aus roten Schwarzriesling-Trauben, nicht aber in Kernen aus weissen Bacchus-Trauben. Procyanidine, Catechine und Epicatechine sind immerhin noch im Bereich von 1-3 mg pro 100 g Kernmehl zu finden.

Tabelle 5. Gehalte der nicht zu den Anthocyanen gehörenden Polyphenolen (mg) in Traubenkernen (100 g).

	Caftarsäure	Gallussäure	Procyanidin B1	Procyanidin B2	Catechin	Epicatechin	Epicatechingallat
Bacchus	-	166,72	1,36	1,13	1,95	2,46	0,51
Schwarzriesling	140,2	230,7	1,12	0,98	2,71	3,6	0,88

5.4. Zusammenfassendes Ergebnis: Extraktion und Konzentration der Substanzen in Trester

Anthocyane und Flavonole kommen ausschließlich in der Beerenschale vor. Aus Literaturstudien [3-8] sowie aus den eigenen Ergebnissen wird folgendes deutlich: Die Verteilung der Polyphenole in Weintrauben, insbesondere der Anthocyane, ist genetisch festgelegt und somit sortenabhängig. Unter den Flavonolen stellen je nach Sorte Quercetin- oder Myricetin-Derivate die Hauptkomponenten dar, wobei letztere in Weißweinsorten nicht synthetisiert werden. Weiterhin sind sie keine mit Amerikaner-Reben gekreuzten Sorten, was ein Vorkommen von diglykosidischen Anthocyanen ausschließt. Die Zusammensetzung von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen in Schalen und Kernen ist innerhalb einer Sorte weitgehend stabil, Proanthocyanidine tragen zum Flavanolgehalt mit >50% bei. Auch Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäurederivate stehen im Zusammenhang mit der Sorte. Die Gehalte an Zimtsäurederivaten überragen hierbei, mit Caftar säure als eine der häufig beschriebenen Hauptkomponenten. Eine Besonderheit in pilzresistenten Hybridsorten von *Vitis vinifera* ist das Vorkommen von 3,5-Diglucosiden wie Malvin, das aus Kreuzungen europäischer Rebsorten mit Amerikaner-Reben hervorging. Im Verhältnis übersteigen die Anthocyane oft die Gehalte der anderen Polyphenole in extrahierten Schalenproben von Trauben, sie stellten den Hauptanteil der Polyphenole dar (50-60 %), gefolgt von den Flavonolen (20-30 %) oder Flavanolen.

In *Schalen* befinden sich fünf interessante Anthocyane und acht weitere Polyphenole von denen leider eine Substanz nicht identifiziert werden konnte (Tab. 2, 3). Bei der Verwendung von Trestern aus der Maischegärung sollte darauf geachtet werden, dass insgesamt weniger Anthocyane in höher erhitzter Maische verbleiben dafür verbleiben aber mehr Polyphenole in der Schale.

In *Kernen* befinden sich einige interessante Polyphenole in höheren Konzentrationen (Tab. 4). Gallussäure und Caftar säure lagen in nennenswerten Konzentrationen zwischen 166 und 230 mg pro 100 g Kernmehl vor. Procyanidine, Catechine und Epicatechine sind immerhin noch im Bereich von 1-3 mg pro 100 g Kernmehl zu finden.

In *Stielgerüsten* konnten mit den in diesem Projekt verwendeten Extraktions- und Analysemethoden keine nennenswerten Gehalte an Anthocyanen oder Polyphenolen nachgewiesen werden (daher wurden auch keine Daten hierzu gezeigt).

Die identifizierten Substanzen aus Schale oder Kernen könnten als nachwachsende Alternative für die teure synthetische Produktion dieser Stoffe aus raffinierten Kohlenwasserstoffen z.B. in der Nahrungsergänzungsmittel-Industrie genutzt werden. Bei einer jährlichen Erntemenge von 1 Milliarde Liter Wein und einem mittleren Beerentresteranteil von 10%, stünden ca. 10 Millionen kg Extraktions-Rohmaterial pro Jahr zur Verfügung. Eine kleinere Menge wird ausreichend sein, um z. B. interessante Anthocyane wie Oenin oder Couromarin oder Phenole wie Catecin oder Epicatechin gewinnen zu können. In einer weiteren Phase nach diesem Screening würde nun ein Scale-up skizziert werden und dies in einer nächsten Phase dann weiterverfolgt werden können.

Extraktionsverfahren und Analysemethoden.

- HPLC; Details (Bio LC Dionex und Dionex CarboPac PA1, Vorsäule: 4 x 50 mm, Trennsäule: 4 x 250 mm; LC-MS/MS System, Massenspektrometer der Firma AB Sciex, Darmstadt, Typ 3200 Q TRAP)
- Laufmittel für Anthocyane: Eluent A: 90 Volumenteile Reinstwasser und 10 Volumenteile Ameisensäure (1827 mL Wasser + 210 mL Ameisensäure) wurden membranfiltriert. 60 mL Acetonitril wurden in einem 2 L-Messkolben vorgelegt und bis zur Marke mit der membranfiltrierten Lösung aus Wasser und Ameisensäure aufgefüllt. Eluent B: 40 Volumenteile Reinstwasser und 10 Volumenteile Ameisensäure (1600 mL Wasser + 400 mL Ameisensäure) wurden membranfiltriert. 1 L Acetonitril wurde in einem 2 L-Messkolben vorgelegt und zeitnah bis zur Marke mit der membranfiltrierten Lösung aus Wasser und Ameisensäure aufgefüllt.
- Laufmittel für Flavanole, Flavonole, Phenolcarbonsäuren und Stilbene Eluent A: 2 %ige Essigsäure 40 mL Eisessig wurden in einem 2 L-Messkolben mit vorgelegtem Reinstwasser mit solchem bis zur Marke befüllt und membranfiltriert.

6. Bioaktivitäts-Studien.

Die Idee ist es mit den aus den Treestern gewonnenen Extrakten und Substanzen einen wertvollen Rohstoff zu erzeugen, der dann z. B. für die Herstellung hochwertiger Nahrungsergänzungsmittel zur Verfügung steht. Dies wurde in ersten Studien mittels Zellkulturen getestet. Zu diesem Zweck wurden zwei Rein-Substanzen und die ethanolischen Extrakten aus Schale, Kern und Stielgerüst zu Leberzellen (HepG2) hinzudosiert und das Wachstum der Zellen gemessen. Weiterhin wurden Marker für Entzündungs- oder inflammatorische Prozesse (NF- κ B sowie deren phosphorylierte Form, pNF- κ B) in diesen Zellen gemessen. Die Stärke der Entzündungsmarker lässt dann gewisse Rückschlüsse auf die Hemmung von Entzündungsprozessen durch die Einzelsubstanzen oder der Trester-Extrakte zu. Diese Arbeiten wurden im Fachgebiet von Herrn Prof. Dr. Jan Frank (Fachgebiet Biofunktionalität der Lebensmittel Universität Hohenheim) erarbeitet.

6.1. Material und Methoden zu Bioaktivitäts-Studie

6.1.1 Testsubstanzen und Extrakte

Einige Substanzen wie Protocatechinsäure (PA) und Quercetin-3-O- β -D-glucuronid (Miquelianin = MQ) wurden von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) in einer Reinheit von $\geq 97\%$ erworben. Zudem wurden 9 verschiedene Extrakte getestet: drei verschiedene Weinsorten; Bacchus (weiss), Merzling (weiss) und Regent (rot), jeweils getrennt in Schale, Kerne und Stängelgerüst. Aus diesen Proben wurden folgendermaßen Extrakte hergestellt: ca. 500 mg der gefriergetrockneten und gemahlten Proben (Schale, Kern, Stielgerüst) wurden in 10 mL reinem Ethanol gelöst, für 1 Stunde auf einem Rotator gemischt und für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Extrakte wurden vor dem Verdampfen mit einer 0,45 μ m Membran filtriert, um Partikel zu trennen. Anschließend wurden Endkonzentration von 100 mg / ml in Ethanol eingestellt.

6.1.2 Zellkultur-Experimente

HepG2-Leberzellen wurden in Medium (Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium, DMEM, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) angezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter folgenden (Zusatz-)Bedingungen: 10% fötalem Kälberserum (FCS); 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (FCS und P/S von Gibco, Carlsbad, Kalifornien, in einer

Atmosphäre von 5% CO₂ und 37°C). Die Reinsubstanzen wurden zu den Medien in Konzentrationen von 10-10000 µM für PA und 1-50 µM für MQ zugegeben. Ethanolische Extrakte von Schalen, Kernen und Stielgerüsten wurden in einer Konzentration von 100 ppm verwendet, mit Ausnahme der Bacchus-Kerne -Typ, diese zeigten Zytotoxizitäts-Effekte und wurden daher in einer niedrigeren Konzentration von 50 ppm verwendet.

6.1.3. Zytotoxizitätstest

Zur Bewertung der maximalen Konzentration, die für Bioaktivitätsassays verwendet werden können, wurde ein Zytotoxizitätstest (MTT-Test) durchgeführt [8]. Dazu wurden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und mit der jeweiligen Probe 24 h bis zu 72 h inkubiert. Die Zytotoxizität für alle Testsubstanzen und Kontrollen (negative Kontrolle (NC) = reines Medium, positive Kontrolle (PC) = 0,1% TritonX und Lösungsmittelkontrolle (SC) 0,1% Ethanol) wurde dreifach in drei verschiedenen Zellpassagen bestimmt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit (24-72 h) wurde das alte Medium verworfen und frisches Medium, das 175 µg MTT-Reagenz/ml enthielt, zugegeben und für 2 h bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. MTT-haltige Medien wurden verworfen und 350 µl DMSO wurden zu jeder Probe zugegeben. Die Extinktion wurde bei 580 nm gegen den Hintergrund (660 nm) gemessen und die mittlere Lebensfähigkeit der Triplikate wurde als Prozentsatz des Mittelwerts der Negativkontrolle berechnet.

6.1.4. Anti-inflammatorische Effekte von Protocatechinsäure (PA) und Quercetin-3-O-β-D-glucuronid (Miquelianin = MQ) und Extrakten aus Schale, Kern und Stielgerüsten

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ ($1 \cdot 10^6$ Zellen bei 72 h) Zellen pro 10 cm Petrischale geimpft, diese konnten zunächst für 24 Stunden anwachsen. Medien, die die jeweilige Fraktion aus Schalen, Kernen oder Stielen enthielten, wurden frisch vor der Inkubationszeit hergestellt und den Zellen für 24 Stunden, 48 Stunden oder 72 Stunden zugesetzt. Die Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol) und Medienkontrolle (reine Medien) wurden gleichbehandelt. Die Experimente wurden in Duplikaten in drei verschiedenen Zellpassagen durchgeführt.

6.1.5. Proteinextraktion und subzelluläre Fraktionierung

Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurde das Medium abgetrennt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und von der Petrischale abgelöst. Abgelöste Zellen wurden in PBS-resuspendiert und über einen CASY-Zellenzähler gezählt. $2-5 \cdot 10^6$ Zellen wurden aliquotiert und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Kern- und zytosolische Proteinfractionen wurden

mit einem Protein-Isolation-Kit (ab113474; Abcam, Cambridge, UK) gemäß des Herstellerprotokolls isoliert. Das Zellpellet wurde in einem Vorextraktionspuffer (DTT, Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC)) resuspendiert, für 10 min auf Eis lysiert, gemischt und für 1 min bei 12.000 U/min zentrifugiert. Der die zytosolische Fraktion enthaltende Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt, aliquotiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in zwei Volumina Extraktionspuffer (DTT, PIC) resuspendiert, auf Eis für 15 min lysiert, mit Mischschritten alle 3 Minuten und dreimal für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Das Zelllysate wurde 10 min bei 14.000 U/min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die Kernfraktion enthielt, wurde in ein frisches Röhrchen überführt, aliquotiert und bei -80°C bis zu den nächsten Schritten gelagert. Der Proteinkonzentration in der Zellkern- und Zytosolfraction wurde mit dem Bradford-Assay gemessen [2].

6.1.6. Western-Blot Analyse von NF- κ B und p-NF- κ B

Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurden 10 μ g Gesamtprotein auf 10% Polyacrylamid-SDS-Gele aufgetragen und die Trennung wurde durch Elektrophorese unter denaturierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proteine wurden auf eine PDVF-Membran übertragen, mit 5% BSA in TBST bei Raumtemperatur für 1 h blockiert und mit dem primären Antikörper, der in 5% BSA in TBST verdünnt war, entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert (β -Actin 1:2000; PARP 1:1000; NF- κ B 1:2000; p-NF- κ B 1:2000 [alle gekauft bei Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA]). Nach dem Waschen mit TBST wurden die Blots für 1 h mit dem jeweiligen sekundären Antikörper inkubiert (Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase konjugiert, 1:10.000 [Millipore, Schwalbach, Deutschland]). Chemilumineszenzsubstrat Ace Glow von Peqlab wurde zur Visualisierung von Proteinen mit dem Fusion-FX7 Advance™ (Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet. Die Bandenintensität wurde mit dem Programm FusionCapt Advance (Peqlab, Erlangen, Deutschland) aufgezeichnet und quantifiziert. Die relativen Konzentrationen der Proteine wurden als Verhältnis zwischen der Menge an Zielprotein und den Haushaltsproteinen β -Actin (zytosolische Fraktion) oder PARP (nukleäre Fraktion) quantifiziert. Aufgrund der gleichen Proteingröße von NF- κ B und p-NF- κ B wurden zwei Blots pro Probe durchgeführt.

7. Ergebnisse der Bioaktivitätsstudien

7.1. Zytotoxizität

Die Zytotoxizität in der Zellkultur wurde für zwei Testsubstanzen, Protocatechinsäure (PA) und Miquelianin (MQ), die in hoher Konzentration auch in den Schalen und Kernen vorkommen getestet. Zusätzlich wurden Extrakte aus Schale, Kern und Stiel und zwar alle von drei verschiedenen Traubenfamilien (Bacchus, Merzling und Regent) bestimmt. Alle getesteten Substanzen und Weinextrakte zeigten in den höchsten Konzentrationen keine zytotoxische Wirkung (Abbildung 10 und Tabelle 5), mit Ausnahme der Kerne von Bacchus, die daher in einer niedrigeren Konzentration von 50 ppm untersucht wurden (Abbildung 10). Es wurden keine Effekte aus dem verwendeten Lösungsmittel festgestellt. PA und MQ zeigten, mit Ausnahme von PA bei 1000 μM für 72 h, eine wenn auch geringe, positive Wirkung auf die Lebensfähigkeit der Zellen nach 48 h und 72 h im Vergleich zur Medienkontrolle mit einem Anstieg von etwa 20% (Tabelle 5).

7.2. NF- κ B und p-NF- κ B Expression

Die Lösungsmittelkontrolle zeigte meist ein ähnliches Verhalten wie die Mediumkontrolle. In Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zeigte die Substanz PA für alle Zeitpunkte und Fraktionen eine Abnahme der Expression von NF- κ B- und seiner aktivierten phosphorylierten Form p-NF- κ B (Abb. 11 a und b), abgesehen von dem p-NF- κ B in der zytosolisch Fraktion nach 24 h (Tabelle 5). PA verursachte eine Abnahme von NF- κ B in der zytosolisch Fraktion mit 5-63%, die aber zwischen den Zeitpunkten variierten. Für die Expression von p-NF- κ B in der Kernfraktion (Abb. 11 b) wurde eine Abnahme nach 24 bis 72 h nachgewiesen (Tabelle 2). Miquelianin zeigte ebenfalls eine Abnahme, diese war aber weniger ausgeprägt als bei PA (Tabelle 2). Es konnte jedoch eine Tendenz zu einer inhibierenden Wirkung der NF- κ B - Expression belegt werden.

Die Extrakte aus Schale, Kern und Stiel zeigten unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Expression der Entzündungsmarker (Abbildung 5 und 6). In der zytosolischen Fraktion war die Expression von NF- κ B niedriger als die Kontrolle für alle Extrakte, mit den niedrigsten Werten für 48 h Inkubationszeit. Für p-NF- κ B in der zytosolischen Fraktion war dieser Effekt auch für 24 h und 48 h sichtbar, jedoch nicht für 72 h. Die Extrakte aus Bacchus und Regent zeigten insgesamt die höchste inhibierende Wirkung auf die NF- κ B - und p-NF- κ B-Expression,

gemessen in den zytosolischen Fraktionen und für beide Extrakte am effizientesten aus den Schalen beider Rebsorten. In der Kernfraktion war die Abnahme der Expression von NF- κ B nur nach 24 Stunden und in geringerem Maße dann nach 48 Stunden sichtbar. Für 72 h wurden gegenläufige Ergebnisse festgestellt, es zeigte sich eine Erhöhung der Expression von NF- κ B. In der Kernfraktion nach 24 h Inkubation wurde ein hoher Anstieg des aktivierten p-NF- κ B gemessen. Die Extrakte aus Bacchus-Trestern, (aber nicht die beiden anderen getesteten Extrakte) zeigten, dass ein induzierender Effekt der NF- κ B-Expression auch in der Zellkernfraktion nach 24 Stunden gemessen wurde (Tabelle 6).

8. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich also zeigen, dass sowohl Einzelsubstanzen als auch Extrakte aus Schalen, Kernen und Stielen einen Einfluss auf die Entzündungsmarker wie NF- κ B oder pNF- κ B haben. Die Wirkungshöhe ist spezifisch und unterschiedlich für Einzelsubstanzen und Extrakte. Diese Ergebnisse sind vielversprechend in Bezug auf eine mögliche positive Wirkung gegen inflammatorische Prozesse wie sie z. B. im Alterungsprozess von Zellen oder Organismen auftreten.

9. Ausblick

In allen Teilen (Traubengerüst, Samen, Beerenschalen) konnten Polyphenole nachgewiesen werden. In den Samen sind dies vorwiegend Gallussäure, Caftarinsäure, Catechine und Epicatechine. In den Beerenschalen sind bei weißen Keltertraubensorten die Konzentrationen geringer im Vergleich zu den roten Keltertraubensorten, neben Anthocyanen, acht weitere Polyphenole nachgewiesen werden.

Die Studien zur Bioaktivität zeigen den Einfluss aller Fraktionen (Traubengerüst, Beerenschale, Samen) auf die inflammatorischen Prozesse.

Die Ab-Produkte aus der Weinproduktion eignen sich hiermit sehr gut als nachwachsende Alternative für Nahrungsergänzungsmittel.

Forschungsbedarf besteht hinsichtlich dem Einfluss der Verarbeitung des Traubenmaterials und des Vinifizierungsverfahrens, sowie der Sorteneinfluss auf die extrahierten Polyphenole. Gleichzeitig sollten differenziert die Wirkung der einzelnen Polyphenole auf die inflammatorischen Prozesse untersucht werden.

Der Zusammenhang zur Landesstrategie Bioökonomie besteht darin, verschiedene Substanzen aus Schale und Kernen aus den Trestern als nachwachsende Alternative für Nahrungsergänzungsmittel zu nutzen. Dies ist z.B. für die Substanz Resveratrol bereits erfolgt, diese Substanz ist bereits seit einigen Jahren im Markt eingeführt. Es ist zu erwarten, dass eine positive Wirkung gegen inflammatorische Prozesse einiger weiterer hier dargestellter Substanzen in Trestern ausgeht. Diese sollten weiter erforscht werden.

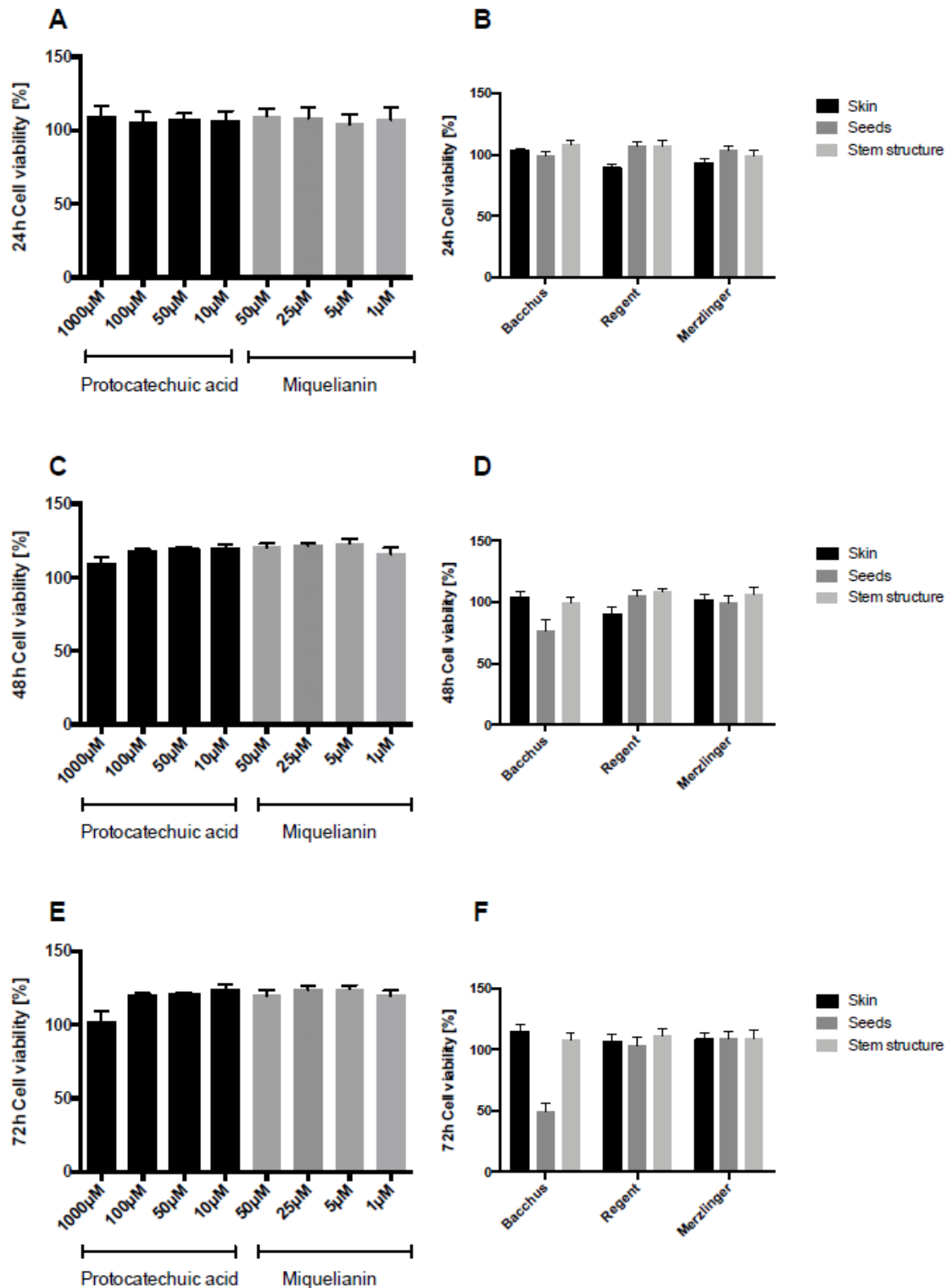
10. Literatur

- [1] Biagi M. & Bertelli A. A. (2015) Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox? *Life Science* 131.19-22.
- [2] Mult Aut; (2002) Phenolzusammensetzung und antioxidative Kapazität von Trauben und Weinen, R. Eder, S. Wendelin, Höhere Bundesanstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau, Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten, Klosterneuburg, S. 293-296.
- [3] Ivanova-Petropulos V. Durakova S. Ricci A. Parpinello G. P. Versari A. (2016) Extraction and evaluation of natural occurring bioactive compounds and change in antioxidant activity during red wine making, *Journal of Food Science and Technology*, 53 (6), S. 2634-2643.
- [4] Otteneder H., Marx R., Zimmer M. (2004) Analysis of the anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Portugieser wines provides an objective assessment of the grape varieties, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, S. 3-7.
- [5] Scholten G. (1995) *Der Wein*, L. Jakob, J. Hamatschek, Ulmer, 10. Auflage, , S. 14-18, S. 32-44, S. 79-82, S. 196-197, S. 206-215.
- [24] Kammerer D., Claus A., Carle R., Schieber A. (2004) Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DADMS/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, , 4360-4367.
- [6] Erhardt C., Arapitsas P., Stefanini M., Flick G., Mattivi F. (2014) Analysis of the phenolic composition of fungus-resistant grape varieties cultivated in Italy and Germany using UHPLC-MS/MS, *Journal of Mass Spectrometry*, 49, 860-869.
- [7] Hernâni Gerós M.,, Delrot C. S. (2012) *The Biochemistry of Grape Berries*, Bentham Science Publishers, e-Book S. 89-93.
- [8] Cantos E., Espin J. C., Tomás-Barberán F. A. (2002) Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, S. 5691-5696.
- [9] Lim S.W., H.S. Loh, K.N. Ting, T.D. Bradshaw, Z.N. Allaudin (2015) Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells, *Trop. Life Sci. Res.* 26 111–120.
- [10] Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.* 72 248–254.

Abbildung10

(a) Zell-Überlebensrate (cell viability), angegeben als Prozentsatz der Medienkontrolle für PA und MQ (A, C, E) und Trester-Extrakte (B, D, F) nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit. **b)** Zell-Überlebensrate (cell viability), angegeben als Prozentsatz der Medienkontrolle für Bacchus Kern Extrakte in Konzentrationen von 50 ppm nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit. Balken mit Mittelwerten und Standardfehler (\pm SEM); (n=3).

(a)



(b)

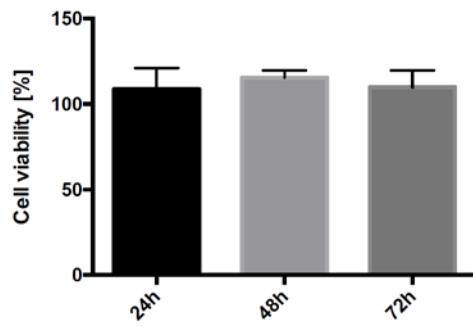
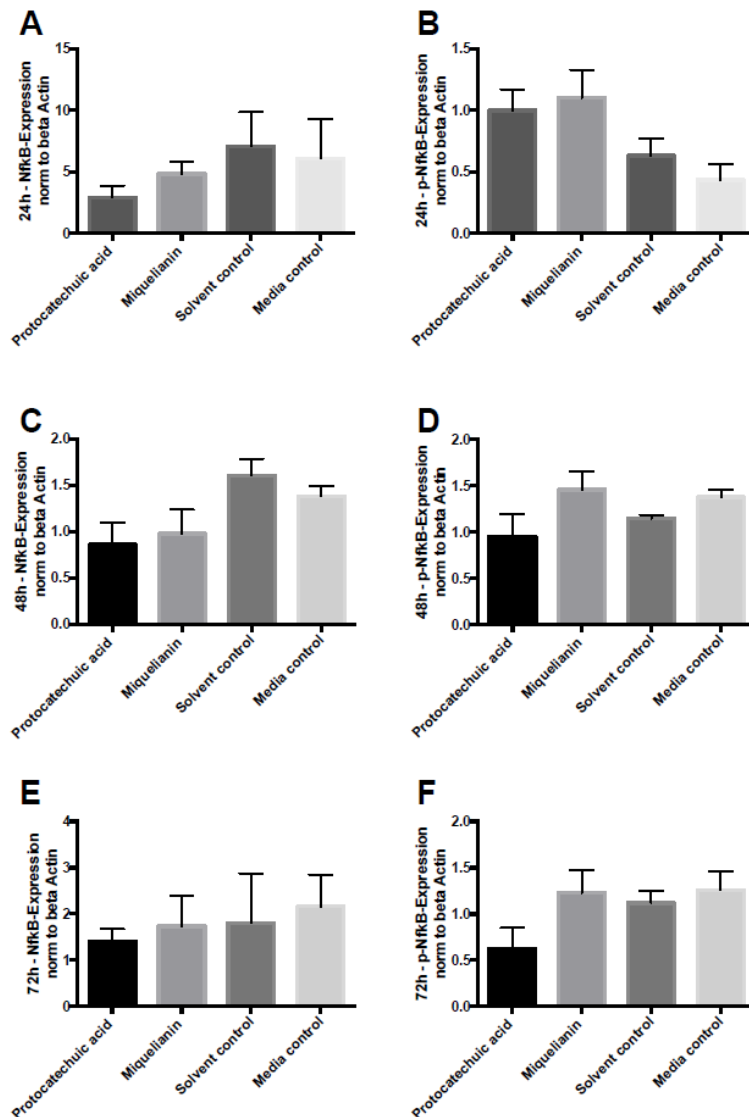


Abbildung 11

NF- κ B and p- NF- κ B Expression in der (a) zytosolisch Fraction (b) Zellkernfraktion der Zellen nach Inkubationszeit für 24 h (A, B), 48 h (C, D) und 72 h (E, F) mit entweder 1000 μ M PA (Protocatechinsäure) oder 50 μ M Miquelianin (MA) gelöst in DMEM Medium (siehe Methodenteil, 10%FCS und 1% P/S). Balken mit Mittelwerten und Standardfehler (\pm SEM); (n=3).

(a)



(b)

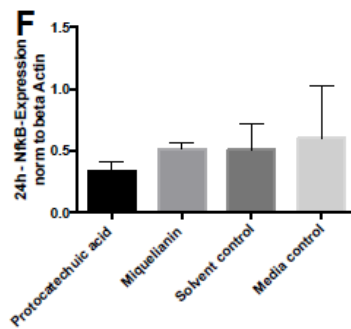
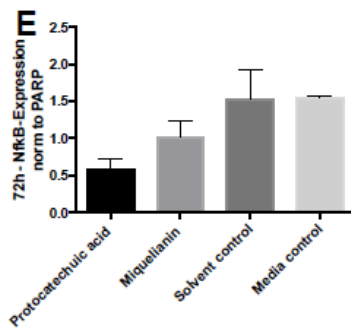
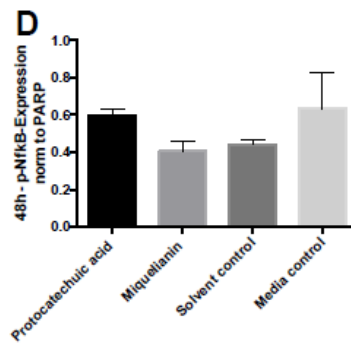
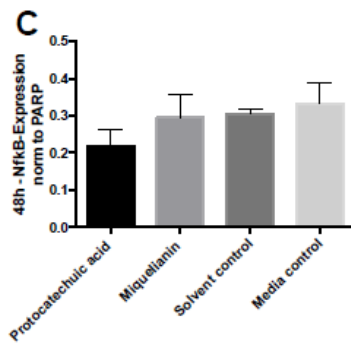
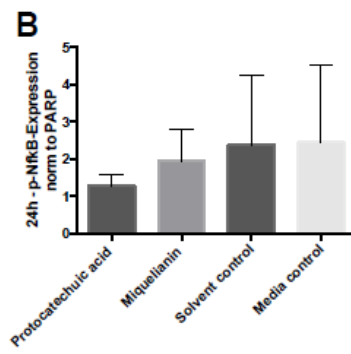
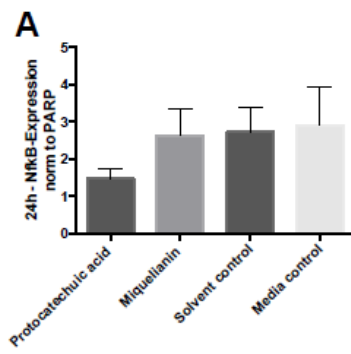
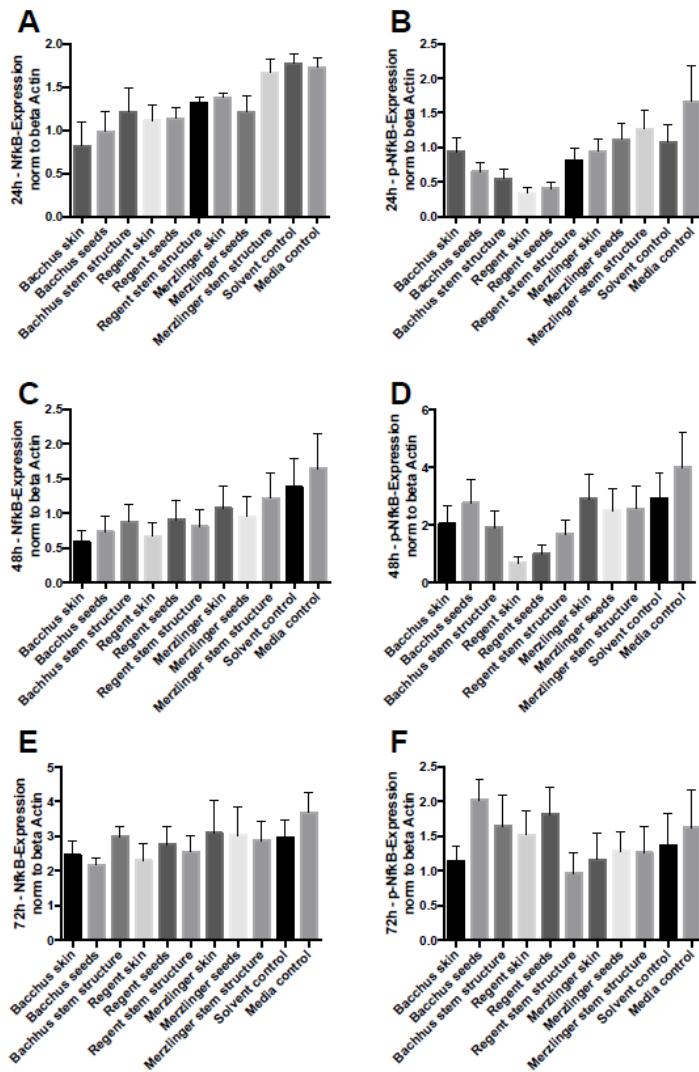


Abbildung 12

NF- κ B and p- NF- κ B expression in the (a) cytosolic fraction und der (b) Zellkernfraktion der Zellen nach Inkubationszeit für 24 h (A, B), 48 h (C, D) und 72 h (E, F) mit entweder 100 ppm des jeweiligen Tresterextrakts. Nur Bacchus Kernextrakt wurde in niedrigerer Konzentration (50 ppm) appliziert (siehe Methodenteil, 10%FCS und 1% P/S). Balken mit Mittelwerten und Standardfehler (\pm SEM); (n=3).

(a)



(b)

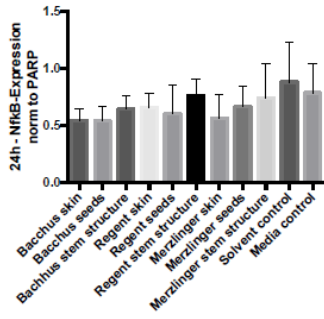
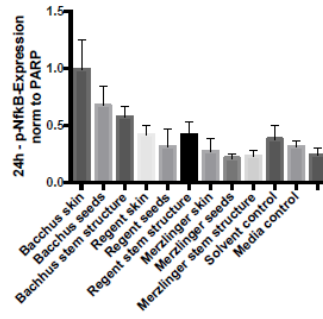
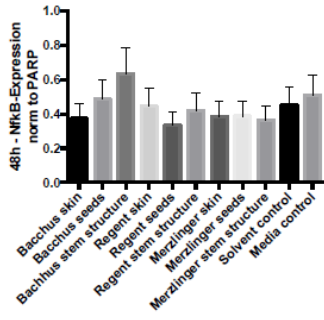
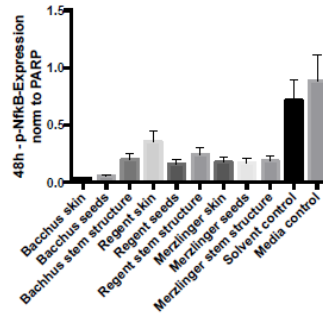
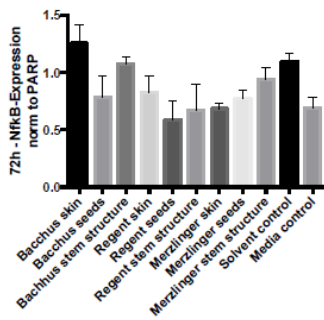
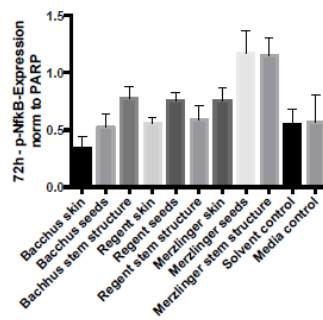
A**B****C****D****E****F**

Tabelle 5: Zell-Überlebensrate (cell viability), nach Inkubation mit Testverbindungen und Trester Extrakten nach 24 bis 72 h, berechnet als Prozentsatz im Verhältnis zur reinen Medienkontrolle. Der Zytotoxizitätstest wurde dreifach in drei verschiedenen Passagen durchgeführt. Skin, Schale; Pomace extracts, Trester Extrakte; Seeds, Kerne, Stem Structure, Stielgerüste der Trauben.

	Viability [%]		
	24 h	48 h	72 h
<i>Substances</i>			
<i>Protocatechuic acid (PA)</i>			
1000 μ M	110 \pm 19	110 \pm 10	102 \pm 20
100 μ M	106 \pm 19	118 \pm 4	119 \pm 3
50 μ M	106 \pm 15	119 \pm 5	120 \pm 5
10 μ M	107 \pm 18	120 \pm 7	124 \pm 8
<i>Miquelianin (MA)</i>			
50 μ M	110 \pm 16	121 \pm 7	119 \pm 10
10 μ M	108 \pm 22	122 \pm 3	123 \pm 7
5 μ M	104 \pm 19	123 \pm 9	124 \pm 6
1 μ M	114 \pm 18	116 \pm 12	118 \pm 8
<i>Pomace extracts</i>			
<i>Bacchus 100 ppm</i>			
Skin	103 \pm 6	104 \pm 16	114 \pm 14
Seeds	99 \pm 12	72 \pm 21	50 \pm 8
Seeds (50 ppm)	109 \pm 13	116 \pm 4	111 \pm 10
Stem structure	108 \pm 13	99 \pm 13	108 \pm 15
<i>Regent 100 ppm</i>			
Skin	89 \pm 9	93 \pm 17	107 \pm 16
Seeds	108 \pm 10	105 \pm 7	103 \pm 17
Stem structure	107 \pm 15	109 \pm 7	111 \pm 15
<i>Merzling 100 ppm</i>			
Skin	93 \pm 11	101 \pm 15	108 \pm 17
Seeds	104 \pm 11	100 \pm 17	109 \pm 15
Stem structure	99 \pm 11	107 \pm 14	109 \pm 18

Tabelle 6: Zusammenfassung der Unterschiede in der NF- κ B and p- NF- κ B-Expression in zytosolisch und nukleären Zellfraktionen, berechnet als Prozentsatz der Expression im Verhältnis zur reinen Medienkontrolle für 24, 48 und 72 Stunden. Die Experimente wurden in Duplikaten in drei verschiedenen Passagen durchgeführt.

	Decrease (-) or Increase (+) of expression relative to media control [%]		
	24 h	48 h	72 h
Substances			
<i>Protocatechuic acid</i>			
NF- κ B cytosolic fraction	-52	-37	-35
NF- κ B nuclear fraction	-49	-34	-63
p-NF- κ B cytosolic fraction	+30	-30	-50
p-NF- κ B nuclear fraction	-48	-5	-44
<i>Miquelianin</i>			
NF- κ B cytosolic fraction	-20	-29	-19
NF- κ B nuclear fraction	-9	-11	-34
p-NF- κ B cytosolic fraction	+53	+6	-3
p-NF- κ B nuclear fraction	-20	-35	-15
<i>Pomace extracts</i>			
<i>Bacchus 100ppm</i>			
<i>Skin</i>			
NF- κ B cytosolic fraction	-53	-64	-34
NF- κ B nuclear fraction	-59	-27	+82
p-NF- κ B cytosolic fraction	-44	-49	-30
p-NF- κ B nuclear fraction	+222	-96	-56
<i>Seeds (50 ppm)</i>			
NF- κ B cytosolic fraction	-43	-55	-34
NF- κ B nuclear fraction	-59	-5	+12
p-NF- κ B cytosolic fraction	-61	-31	+25
p-NF- κ B nuclear fraction	+118	-94	-36
<i>Stem structure</i>			
NF- κ B cytosolic fraction	-30	-47	-41
NF- κ B nuclear fraction	-51	+25	+55
p-NF- κ B cytosolic fraction	-67	-52	+1

p-NF- κ B nuclear fraction	+86	-77	+6
-----------------------------------	-----	-----	----

Regent 100 ppm*Skin*

NF- κ B cytosolic fraction	-36	-59	-19
NF- κ B nuclear fraction	-50	-12	+19
p-NF- κ B cytosolic fraction	-79	-82	-6
p-NF- κ B nuclear fraction	+36	-59	-15

Seeds

NF- κ B cytosolic fraction	-34	-45	-38
NF- κ B nuclear fraction	-54	-34	-15
p-NF- κ B cytosolic fraction	-76	-75	+11
p-NF- κ B nuclear fraction	+2	-82	+15

Stem structure

NF- κ B cytosolic fraction	-24	-51	-25
NF- κ B nuclear fraction	-42	-17	-3
p-NF- κ B cytosolic fraction	-51	-58	-41
p-NF- κ B nuclear fraction	+35	-72	-3

Merzling 100ppm*Skin*

NF- κ B cytosolic fraction	-20	-35	-16
NF- κ B nuclear fraction	-57	-24	-1
p-NF- κ B cytosolic fraction	-43	-27	-28
p-NF- κ B nuclear fraction	-13	-80	+27

Seeds

NF- κ B cytosolic fraction	-30	-42	-18
NF- κ B nuclear fraction	-49	-24	+12
p-NF- κ B cytosolic fraction	-33	-37	-21
p-NF- κ B nuclear fraction	-31	-81	+66

Stem structure

NF- κ B cytosolic fraction	-4	-26	-22
-----------------------------------	----	-----	-----

NF- κ B nuclear fraction	-43	-28	+36
p-NF- κ B cytosolic fraction	-24	-36	-22
p-NF- κ B nuclear fraction	-27	-79	+65