

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Zuwendungsempfänger:

TUM-Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie

Titel der Förderung:

Bioökonomie International 2017: VITALAB - Nutzbarmachung von Nebenströmen der Obst- und Milchverarbeitung für die Entwicklung innovativer Lebensmittel mit erhöhtem Vitamingehalt durch Milchsäurebakterien

Verantwortliche/r Autor/Autorin:

Michael Rychlik, Lisa Obermaier

Förderkennzeichen: 031B0875

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0875 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor und der Autorin.“

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger: TUM-Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie (LALC)
Förderkennzeichen: 031B0875
Vorhabenbezeichnung: Bioökonomie International 2017: VITALAB - Nutzbarmachung von Nebenströmen der Obst- und Milchverarbeitung für die Entwicklung innovativer Lebensmittel mit erhöhtem Vitamingehalt durch Milchsäurebakterien
Laufzeit des Vorhabens 01.02.2020 - 31.07.2023

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Verbraucher in Europa nehmen von den Vitaminen der Folatgruppe (Vitamin B9) deutlich weniger auf als die empfohlenen 300 µg pro Tag. Da eine Zwangsanreicherung mit der synthetischen Folsäure in Europa nicht durchgeführt wird, war es das Ziel dieses Vorhabens, Milchsäurebakterien zur natürlichen Anreicherung von innovativen Lebensmitteln mit Folaten einzusetzen. Die Obst- und Milchverarbeitung ist in Brasilien ein großer Industriezweig, bei dem große Mengen an Nebenströmen (z.B. Fruchtschalen, Fruchtkerne, Molke) bisher weitgehend ungenutzt anfallen. Zur Nutzung dieser Nebenströme sollten diese als Substrate für Milchsäurebakterien verwendet und die Folsäuresynthese im Fermentationsprozess optimiert werden, um innovative Lebensmittel systematisch mit Folaten natürlich anzureichern. Daneben sollte die Folatbioverfügbarkeit in den neuen Produkten ermittelt werden. Durch die Entwicklung derartiger Produkte könnte nicht nur die Versorgung mit diesem Mangelvitamin in Brasilien und Deutschland verbessert, sondern auch der Abfall bei der Lebensmittelherstellung und -verarbeitung reduziert werden.

2. Ablauf des Vorhabens

Für die Fermentationsoptimierung der Molke wurden folgende Parameter ausgewählt: drei verschiedene Bakterienstämme (Streptococcus TH-4, Lactobacillus LGG, Bifidobacterium BB-02), drei unterschiedliche Fruchtnebenprodukte (von Trauben, Pitaya und Passionsfrucht) und vier Molkekonzentrationen (30, 50, 70 und 100 %). Diese Versuche wurden von den Projektpartnern der Universität von Sao Paulo (USP) durchgeführt.

Die Kombination von Streptococcus und Bifidobacterium mit 70 % Molke und den Nebenprodukten der Traube ergab die höchsten Folatgehalte von knapp 250 µg/100 g im hergestellten Molkegetränk. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der Zusatz von Fruchtnebenprodukten und Molke einen wesentlichen Einfluss auf die Folatproduktion hatte. Synergistische Effekte durch die Kombination verschiedener Bakterienstämme und eine pH-kontrollierte Fermentation konnten die Folatmengen in dem Molkegetränk zusätzlich steigern.

Neben den reinen Folatgehalten von Lebensmitteln ist die Bestimmung der Bioverfügbarkeit essenziell, um das Potenzial für eine ausreichende Versorgung abschätzen zu können. Hierbei können Humanstudien zur Bewertung der Bioverfügbarkeit Abhilfe schaffen. Daher wurde im Projekt abschließend die Bioverfügbarkeit der Folate aus dem fermentierten Molkegetränk in einer Humanstudie bestimmt. Mit 241 µg/100 g war der Folatgehalt des im Technikumsmaßstab erzeugten Produktes leider geringer als wir uns von der Fermentationsoptimierung erhofft haben. Zudem wurde von den Projektpartnern zu wenig Probenmaterial zur Verfügung gestellt, weswegen jedem Probanden nur 80 g Molkepulver (rekonstituiert in 200 mL Milch) verabreicht werden konnte. Dadurch konnte den Probanden nur eine Gesamtfolatmenge von 193 µg und

davon nur circa 80 µg 5-Methyltetrahydrofolat (5-CH₃-H₄Folat) verabreicht werden, was weniger als einem Viertel der Referenzdosis von 400 µg entspricht.

Im Rahmen der Humanstudie wurde das Testlebensmittel (fermentiertes Molkegetränk), eine folatfreie Kontrolle (handelsübliches Molkepulver) sowie ein Folatsupplement (5-CH₃-H₄Folat, 400 µg/Tablette) als Referenzdosis drei freiwilligen Probanden zum Verzehr gegeben. Die Plasmakurve des Referenztages mit einer Dosis von 400 µg 5-CH₃-H₄Folat zeigte ein deutliches Maximum mit 73 nmol/L nach ca. einer Stunde. Der 5-CH₃-H₄Folat-Gehalt während des folatfreien Tages blieb mit einem Höchstwert von 35 nmol/L annähernd auf dem Niveau des Nullwertes von 32 nmol/L. Der Testtag mit dem fermentierten Molkegetränk zeigte leider nicht das erhoffte Ergebnis. Die Plasmakurve verhielt sich ähnlich wie die des folatfreien Tages, was bedeutet, dass die 80 µg 5-CH₃-H₄Folat aus dem fermentierten Molkegetränk offenbar nur unzureichend im Verdauungstrakt absorbiert wurden. Das teil-randomisierte Studiendesign ergab im Vergleich zum Folatsupplement eine durchschnittliche relative Bioverfügbarkeit von 17,1 %, wobei diese zwischen den Teilnehmern von 0 bis 39,8 % variierte.

3. Wesentliche Ergebnisse

Leider erwies sich das angereicherte Molkegetränk in seiner Bioverfügbarkeit mit maximal 40 % als relativ niedrig. Daneben war die Varianz zwischen den Probanden sehr hoch, so dass dieses Konzept der Biofortifikation generell in Frage zu stellen ist. Es wird vermutet, dass die niedrige Folatkonzentration im Molkegetränk von nur 82 µg 5-CH₃-H₄Folat im Gegensatz zu 400 µg im Folatsupplement einen limitierenden Faktor dargestellt haben könnte. Außerdem könnte die hohe Osmolarität des Getränks und verschiedene Faktoren wie Matrixeffekte, Folat-bindende Proteine (FBP) und die Folatvitamereverteilung die Folataufnahme beeinflusst haben. Daneben unterstreichen diese Ergebnisse den Einfluss der individuellen, biologischen Unterschiede bei der Folataufnahme und die Auswahl homogener Teilnehmergruppen auf die Aussagekraft einer Studie. Die Ergebnisse der Humanstudie wurden inzwischen bei der Zeitschrift „Molecular Nutrition and Food Research“ zur Publikation angenommen.

Teil II: Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten

Zuwendungsempfänger: TUM-Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie (LALC)
Förderkennzeichen: 031B0875
Vorhabenbezeichnung: Bioökonomie International 2017: VITALAB - Nutzbarmachung von Nebenströmen der Obst- und Milchverarbeitung für die Entwicklung innovativer Lebensmittel mit erhöhtem Vitamingehalt durch Milchsäurebakterien
Laufzeit des Vorhabens 01.02.2020 - 31.07.2023

1. Wissenschaftlicher und technischer Hintergrund des Projekts

Fruchtnebenprodukte, wie Samen, Schalen und Fruchtfleisch, die in der fruchtverarbeitenden Industrie anfallen, stellen ein Problem für die Umwelt dar, da diese oftmals einfach in der Umwelt entsorgt werden. Eine Strategie zur Minimierung dieser Umweltverschmutzung könnte die Verarbeitung genau dieser zu neuen, nachhaltigen Lebensmitteln sein [Albuquerque et al., 2016]. Dies ist der Hintergrund des Projekts VITALAB, das in einer Zusammenarbeit des Lehrstuhls für Analytische Lebensmittelchemie (LALC) der TUM München mit der Universität von Sao Paulo (USP) solche Fruchtnebenprodukte zur Herstellung innovativer Lebensmittel einsetzt. Diese Lebensmittel sollen insbesondere durch ihren Folatgehalt als vielversprechende Folatquellen dienen.

Neben der Supplementierung mit synthetischer Folsäure ist eine Anreicherung durch folatproduzierende Mikroorganismen (MOs) möglich. Diese biologische Form der Anreicherung stellt eine effizientere und sicherere Alternative zur Supplementierung mit Folsäure dar. Bei den Folaten, die durch MOs produziert werden, handelt es sich um „natürliche“ Vitamere, wie das 5-Methyltetrahydrofolat (5-CH₃-H₄folat). Diese können, im Gegensatz zu synthetischer Folsäure, einen B12-Mangel nicht maskieren, womit Bedenken gegenüber einer flächendeckenden Folatsupplementierung entkräftet würden. Zusätzlich steigert die Produktion durch ausgewählte Bakterienstämme und in geeigneten Lebensmittelmatrices (hier: Molke) sowohl die Stabilität als auch die Bioaktivität der Folate [Cuckick et al., 2020].

Als potenzielle Quellen der Fruchtnebenprodukte hat die USP Pitaya (Drachenfrucht), Maracuja (Passionsfrucht) [Albuquerque et al., 2017] und Weintrauben ausgesucht. Daneben untersuchten die brasilianischen Partner verschiedene Bakterienstämme (Bifidobakterien und Laktobakterien) auf ihre Folatproduktion in Molke und versch. Fruchtnebenprodukten mit dem an der USP etablierten mikrobiologischen Assay.

Am LALC wurde kürzlich die bestehende Folatbestimmungsmethode für Molke, Fruchtnebenprodukte und Endprodukte optimiert, um den Gesamtfolatgehalt und die Vitamerenverteilung exakt zu ermitteln. Im Zuge dessen wurde die etablierte Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) um das Vitamer 10-Formylfolsäure erweitert, für die es bisher keinen entsprechenden isotopenmarkierten Standard gab [Obermaier et al., 2023] (Abb.1). Diese erweiterte Methode sollte im Rahmen von VITALAB zum Einsatz kommen.

Neben den reinen Folatgehalten von Lebensmitteln ist die Bestimmung der Bioverfügbarkeit essenziell, um das Potenzial für eine ausreichende Versorgung abschätzen zu können. Hierbei können Humanstudien zur Bewertung der Bioverfügbarkeit Abhilfe schaffen. Da am Lehrstuhl bereits Erfahrung mit der Plasmafolatanalytik sowie der Auswertung der Plasmakinetik am Beispiel von Erdbeeren bestand [Striegel et al., 2019] sollten diese Verfahren auch für die Beurteilung der Bioverfügbarkeit der fermentierten Molkeprodukte eingesetzt werden.

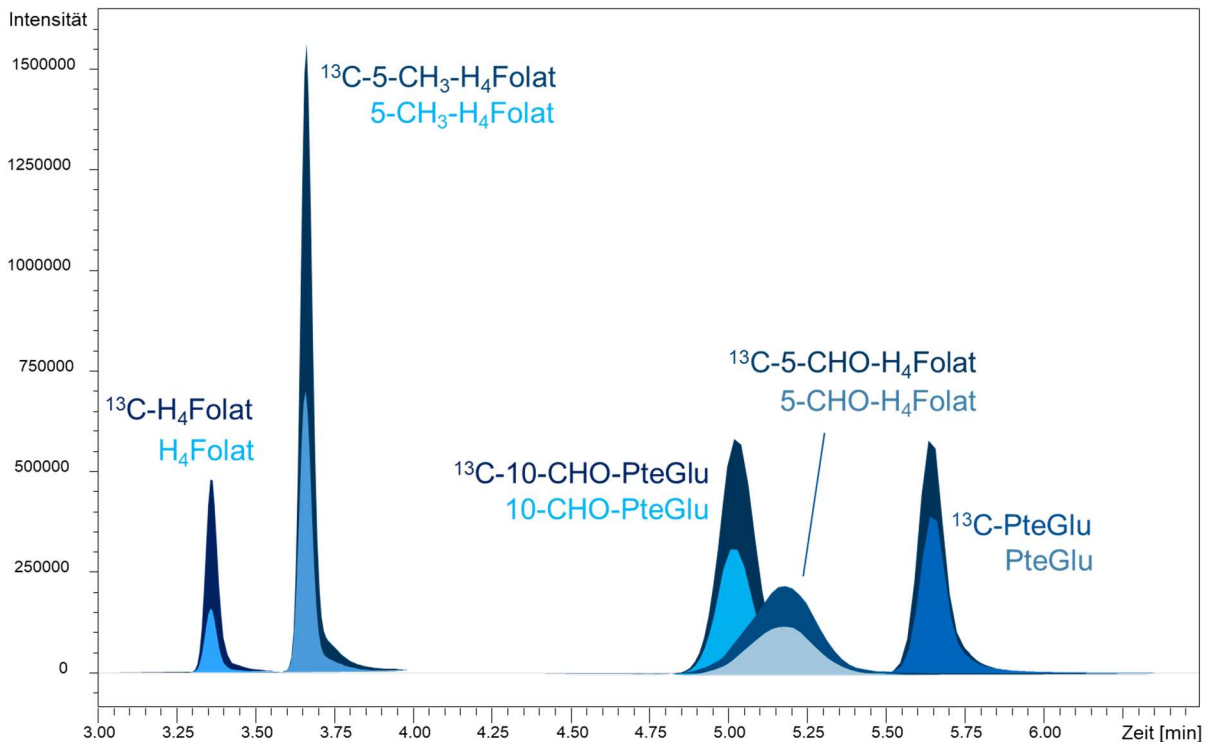


Abbildung 1: Chromatogramm einer LC-MS/MS-Messung mit den fünf Folatvitameren und den korrespondierenden internen Standards.

2. Darstellung der durchgeführten Arbeiten und Ergebnisse

2.1. Folatproduktion durch Fermentation von Molke

Die Fruchtnebenprodukte von Pitaya (Drachenfrucht), Maracuja (Passionsfrucht) [Albuquerque et al., 2017] und Weintrauben sowie drei verschiedene Bakterienstämme wurden von den brasilianischen Partnern auf ihre Folatproduktion in Molke mit Zusatz der genannten Fruchtnebenprodukte getestet. Die Fermentationen wurden mit unterschiedlichen Gehalten an Molkepulver (30, 50, 70 und 100%), drei unterschiedlichen Fruchtzusätzen (Pitaya-, Passionsfrucht- und Trauben-Nebenprodukte) und den Bakterienstämmen *Streptococcus thermophilus* (TH-4®), *Bifidobacterium longum subsp. animalis* (BB-02®) und *Lactocaseibacillus rhamnosus* (LGG) durchgeführt.

Im folgenden Absatz soll die Molke-Fermentation der brasilianischen Kollegen knapp erläutert werden. Die Molke eines brasilianischen Käseherstellers (Brivido™, Sao Paulo, Brasilien) wird zunächst 10 Minuten lang bei 72 °C in einem Thermomix pasteurisiert und gekühlt. Die Fruchtnebenerzeugnisse der Passionsfrucht, der Drachenfrucht (Pitaya) und den Weintrauben stammten aus der Obstindustrie im Staat Sao Paulo (Brasilien). Diese wurden gewaschen, mit destilliertem Wasser bei 100 °C (12 Minuten) und anschließend Eisbad blanchiert. Anschließend wurden die Fruchtnebenprodukte im Ofen bei 60 °C 24 Stunden lang im Luftstrom getrocknet, bis sie vollständig trocken waren. Danach wurde das trockene Material zu feinem Pulver zerkleinert und auf eine Partikelgröße von kleiner 42 µm vermahlen. Um lösliche Extrakte aus den drei Fruchtnebenprodukten zu gewinnen, wurde eine Heißwasserextraktion durchgeführt. Zunächst wurden die Pulver im Verhältnis (m/v) von 1:40 mit destilliertem Wasser gemischt. Die Mischung wurde 1 Stunde lang unter Rühren (150 U/min) gekocht (95-100 °C), zentrifugiert (10000g x 10 min), der Überstand aufgefangen und mit einer sterilen 0,22 µm-Membran filtriert. Die Mikroorganismenstämme wurden in den jeweiligen Medien LGG (MRS), TH-4 (LAPTg) und BB-02 (MRS mit 1 % Cystein) aktiviert und 24 Stunden lang bei

37°C aerob (LGG und TH-4) oder anaerob (BB-02) bebrütet. Zur Fermentation wurden 70% Molke mit pasteurisierter Milch (Molico™, Nestlé, Brasilien) gemischt und mit 10% der Wasserextrakte ergänzt. Es wurde ein Aliquot der Bakterien zentrifugiert (10 000 U/min x 10 min) und dreimal mit steriler Kochsalzlösung (0,85%) gewaschen. Die Mischung aus Molke und Milch mit 10% Fruchtwasserextrakt wurde mit 2% v/v des jeweiligen Stammes geimpft und diese 6 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Zum Transport der fermentierten Molke von Brasilien nach Deutschland wurde die fermentierte Molke-Milch-Mischung in Aliquote von 500 µl mit 500 µl Schutzpuffer (Natriumacetatlösung (0,82%) und Ascorbinsäure (1%)) gemischt. Anschließend werden sie 5 Minuten bei 100 °C in einem Trockenbad erhitzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Pulver wurde zur Quantifizierung an die TUM nach Freising geschickt.

2.2. Folatquantifizierung in den fermentierten Molkeprodukten

Diese fermentierte Molke bzw. das gefriergetrocknete Pulver wurden sowohl von den Kollegen der USP mit dem dort etablierten mikrobiologischen Assay als auch vom LALC mit der LC-MS/MS-Methode auf den Folatgehalt untersucht. Am LALC wurden die fermentierten Molkeprodukte mit der im Folgenden kurz erläuterten Methode auf ihren Folatgehalt und die Vitamereverteilung untersucht. Zunächst werden die Proben (ca. 20 mg) in Pyrexflaschen eingewogen, Extraktionspuffer hinzugefügt und die Mischung 15 Minuten lang gerührt. Den Proben werden interne Standards für die Quantifizierung durch die SIVA zugegeben, diese erneut 15 Minuten lang equilibriert und weitere 10 Minuten lang gekocht. Sobald die Proben abgekühlt sind, werden 900 µL Hühnerpankreas und 200 µL Rattenserum zugegeben und die Mischung über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert. Anschließend werden die Proben erneut 10 Minuten lang gekocht, abgekühlt, in Zentrifugenröhrchen mit Acetonitril überführt und für 20 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand mittels Festphasenextraktion (SPE) gereinigt. Das Eluat wird membranfiltriert und mittels LC-MS/MS gemessen [Obermaier et al., 2023].

Die Folatgehalte der einzelnen Fermentationen, die mittels LC-MS/MS-Messungen am LALC erhalten wurden, sind in Tab. 1 aufgelistet.

Die höchsten Gehalte mit 236 µg/100 g und 279 µg/100 g zeigten die Kombinationen von Streptococcus und 70% Molke mit Pitaya und Trauben-Wasserextrakten. Außerdem lieferte das Bifidobakterium mit Pitaya-Zusatz und 30% bzw. 70% Molke noch relativ hohe Folatwerte über 200 µg/100 g. Die Fermentationen, bei denen der Lactobacillus beteiligt war, ergaben die niedrigsten Werte, ebenso wie die Fermentationen, in denen 100% Molke benutzt wurde. Bei der Vitamereverteilung zeigte sich, wie erwartet, das 5-Methyltetrahydrofolat als Hauptvitamer. Jedoch waren in den meisten Proben auch hohe Gehalte an 5-Formyltetrahydrofolat zu beobachten.

Interessant ist der Folatgehalt der Ausgangsprodukte vor der Fermentation. So zeigte das verwendete Molkepulver einen Gesamtfolatgehalt von 18,65 µg/100 g. Die Fruchtnebenprodukte der Pitaya enthielten 152,49 µg/100 g Folat, die der Traube 91,89 µg/100 g und die Nebenprodukte der Passionsfrucht 66,05 µg/100 g Gesamtfolat. Zudem zeigten die Wasserextrakte der Pitaya den höchsten Gesamtfolatgehalt von 362 µg/100 g, wohingegen in den Extrakten der Traube und der Passionsfrucht nur 125 bzw. 154 µg/100 g gefunden wurde. Da die Molke als Ausgangsmaterial nur wenig Folate enthielt und der Anteil der Wasserextrakte der Traubenkerne nur 10 % betrug, kann gefolgert werden, dass die erhaltenen Folatgehalte durch die „Folatproduktion“ der Milchsäurebakterien während der Fermentation stammen.

Tabelle 1: Folatgehalt der Fermentationen, ermittelt mittels der LC-MS/MS-Methode.

Molkegehalt in der Mi- schung mit Milch	Bakterienstamm	Gesamtfolatgehalt LC-MS/MS [µg/100 g]		
		Pitaya- Wasserextrakt	Trauben- Wasserextrakt	Passionsfrucht- Wasserextrakt
30%	Streptococcus TH-4	171,59	182,55	197,23
50%		183,57	179,92	168,08
70%		236,44	278,88	129,17
100%		150,65	79,89	53,91
30%	Lactobacillus LGG	172,65	115,51	168,31
50%		72,35	67,65	126,42
70%		93,31	132,02	157,38
100%		90,32	46,26	32,37
30%	Bifidobacterium BB-02	214,41	176,53	159,86
50%		135,90	154,65	172,43
70%		201,27	186,40	130,97
100%		135,12	90,21	78,83

Die molekularen Ursachen dafür, dass die Traubenkernextrakte die Folatsynthese der Milchsäurebakterien stimulieren, wurden während eines sechsmonatigen Forschungsaufenthaltes der brasilianischen Kooperationspartnerin Ana Cucick in Freising in unseren Laboratorien untersucht. Dabei fand die Kollegin, dass nach einer Ultrafiltration des Traubenkernextraktes die hochmolekulare Fraktion (> 10 kDa) zu einem deutlich höheren Folatgehalt der fermentierten als die niedermolekulare Fraktion (< 10 kDa) und als der Gesamtextrakt führte. Es wird vermutet, dass lösliche Ballaststoffe die Ursache dafür sind. Aufgrund der zeitlichen Limitierung des Aufenthalts auf 6 Monate konnten diese Substanzen nicht weiter identifiziert werden.

2.3. Charakterisierung der Testlebensmittel für die Humanstudie

Da die Fermentation mit dem Wasserextrakt der Traube insgesamt die höchsten Folatgehalte zeigte, einigte man sich auf Traubenextrakt als einzusetzendes Fruchtnebenprodukt für die Herstellung des Testlebensmittels für die Humanstudie sowie eine Molkekonzentration von 70 % in Milch. Die Werte der Quantifizierung des Molkepulvers nach der Methode von Obermaier et al. [2023] für die Humanstudie mit den finalen Fermentationsbedingungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Dort sind die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung für den Gesamtfolatgehalt und die Vitamerverteilung des fermentierten Molkepulvers angegeben.

Tabelle 2: Gesamtfolatgehalt und Vitamerenverteilung des fermentierten Molkepulver, das für die Studie als Testlebensmittel benutzt wurde [berechnet als PteGlu, in µg/100g].

Folat(vitamer)gehalt	Fermentiertes Molkegetränk für Studie (Pulver) [µg/100g als PteGlu ± RSD[%]]
PteGlu	0,00 ± 0,00
H ₄ folat	30,66 ± 7,01
5-CH ₃ -H ₄ folat	99,44 ± 9,77
5-CHO- H ₄ folat	88,59 ± 7,00
10-CHO-PteGlu	22,60 ± 11,84
Gesamtfolatgehalt	241,29 ± 5,85

Mit 241 µg/100 g war der Folatgehalt leider geringer als wir uns von der Fermentationsoptimierung erhofft haben. Zudem konnten die Projektpartner nicht ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stellen, weswegen für jeden Probanden in der Humanstudie nur 80 g Molkepulver (rekonstituiert in 200 mL Milch) vorhanden war. Dadurch konnte den Probanden nur eine Gesamtfolatdosis von 201 µg und davon nur circa 80 µg 5-CH₃-H₄- H₄folat, was weniger als einem Viertel der Referenzdosis von 400 µg aus der Tablette entspricht, verabreicht werden. Ein weiteres Problem, das erst am Studientag bei Rekonstitution des Pulvers mit Milch auffiel, war, dass das Molkegetränk einen unangenehm salzigen Geschmackseindruck aufwies.

2.4. Durchführung der Humanstudie

Das Ziel der Humanstudie war es, Aufschluss über die Bioverfügbarkeit der Folate aus fermentierten Molkeprodukten zu erhalten. Dazu wurde das Testlebensmittel (fermentiertes Molkegetränk), eine folatfreie Kontrolle (handelsübliches Molkepulver) sowie ein Folatsupplement (5-CH₃-H₄folat, 400 µg/Tablette) als Referenzdosis sechs (ursprünglich: vier weibliche, zwei männliche) freiwilligen Probanden zum Verzehr gegeben. Nach mehreren definierten Zeitpunkten der Blutentnahmen während der Testtage wurde die Plasmafolatspiegelkinetik der Probanden bestimmt. Durch die vollständige Charakterisierung der Folatvitamere in der fermentierten Molke sollten Rückschlüsse auf die Bioverfügbarkeit sowie den Einfluss der Genotypen des MTHFR-Gens gezogen werden. Dieses Gen ist mitverantwortlich für die effektive Umwandlung der Folate in die aktive metabolische Form 5-CH₃-H₄folat. Zum Transport der fermentierten Molke von Brasilien nach Deutschland wurde die fermentierte Molke-Milch-Mischung gefriergetrocknet. Das Pulver wurde am Studientag mit 200 mL Milch rekonstituiert. Auch die folatfreie Kontrolle wurde aus handelsüblicher Molke und derselben Milch angerührt.

2.4.1. Planung und Probandenscreening

Der Ethikantrag wurde bei der Ethikkommission der TUM eingereicht und bewilligt. Einschlusskriterien dieser Studie waren: gesunde Probanden, Alter zwischen 18 und 30 Jahren, Männer und Frauen, Kaukasier, BMI < 30 kg/m², Nichtraucher, Schriftliche Einwilligungserklärung. Im Studienprotokoll wurden folgende Ausschlusskriterien definiert: aktuelle Teilnahme an Interventionsstudien, aktive Raucher, Alkoholabusus, Vitamin B12-Mangel/erhöhter Homocysteinspiegel/Hämoglobinmangel, chronische Erkrankung, Blutspende in den letzten 3 Monaten, Allergie/Unverträglichkeit gegenüber Milchprodukten, Veganer. Als Ausschlusskriterien während der Studie wurde die Einnahme von Antibiotika im Versuchszeitraum, akute Erkrankungen im Versuchszeitraum, der Widerruf der Zustimmung zur Teilnahme und Verletzung der Versuchsbedingungen benannt.

Vor Beginn der Studie wurde ein umfassendes Probandenscreening mit Fragebögen zu Ein- und Ausschlusskriterien und Blutuntersuchungen an 20 Testpersonen durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Folat- & Vitamin B12-Status sowie der Hämoglobin-Status bestimmt. Zudem fand eine genetische Untersuchung statt, um die Polymorphismen des Methyltetrahydrofolatreduktase-Gens (MTHFR-Gen) festzustellen. Dieses Gen spielt eine entscheidende Rolle im Folatmetabolismus, wodurch das Ergebnis der Bioverfügbarkeit in der Humanstudie beeinflusst werden könnte. Es wurden nur Probanden mit einer heterozygoten Punktmutation an der Stelle A1286 ausgewählt (c.665C>C, c.1286A>C), um die Daten im Nachhinein besser vergleichen zu können. Diese Genmutation führt zu einer verminderten Enzymaktivität der MTHFR von 60 % [Frosst et al., 1995].

Bei den sechs Studienteilnehmern wurde die Körpergröße sowie Gewicht und weitere anthropometrische Daten durch (strahlenfreie) Bio-Impedanz-Messungen (BIA) bestimmt. Bei den weiblichen Probandinnen wurde eine Schwangerschaft mit Hilfe eines herkömmlichen Schwangerschaftstestes (Urintest) vor Studienbeginn ausgeschlossen.

Die Probanden erhielten zum Auffüllen der Leber- und Erythrozyten-Folatspeicher vier Wochen vor dem ersten Studientag täglich ein Nahrungsergänzungsmittel in Tablettenform mit 400 µg Metafolin (5-CH₃-H₄folat). Zwischen den Studientagen wurde zur Aufrechterhaltung des Folatspiegels weiterhin täglich 400 µg des kommerziellen Folatsupplements eingenommen. Dieses Präparat wurde jeweils 2 Tage vor der jeweiligen Intervention abgesetzt, um die Plasmafolatspiegel zu depletieren und zu stabilisieren. Dieses Studiendesign ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Probanden verzehrten am Abend vor jedem Testtag, 2 Stunden vor Beginn sowie am Testtag selbst nur standardisierte, folatarme Nahrung und fertigten für diese Mahlzeiten ein Ernährungsprotokoll an. An den drei Testtagen wurde den Probanden vor der Einnahme des Lebensmittels (0 min) und anschließend zu 19 Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 420, 480, 540 und 600 min) Venenblut (je 4,9 mL, Gesamtmenge 98 mL/Testtag) durch eine Venenverweilkanüle abgenommen. Der Ablauf eines Studientages ist in Abbildung 3 dargestellt.

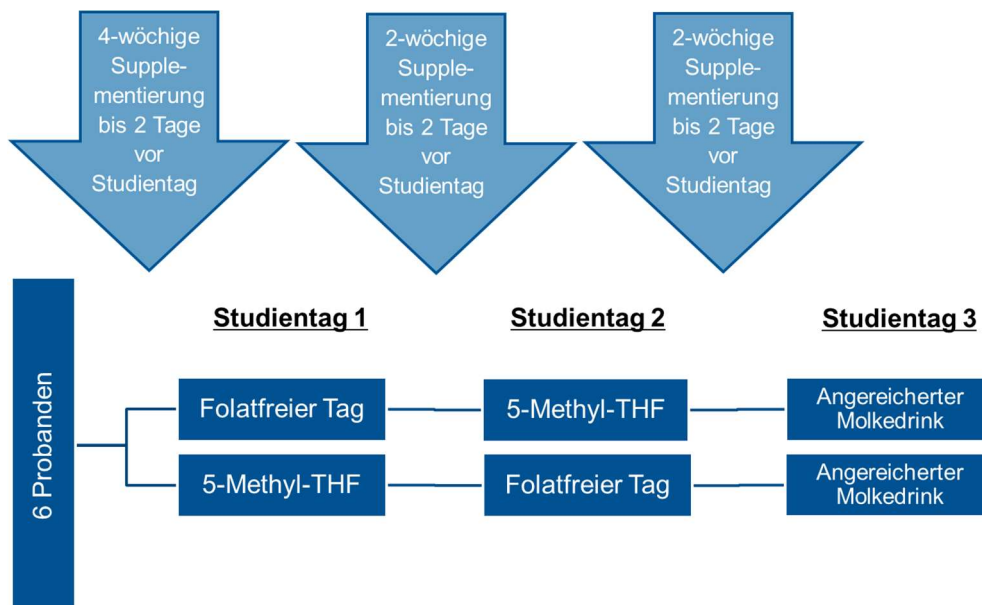


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Studiendesigns mit Randomisierungsschema.

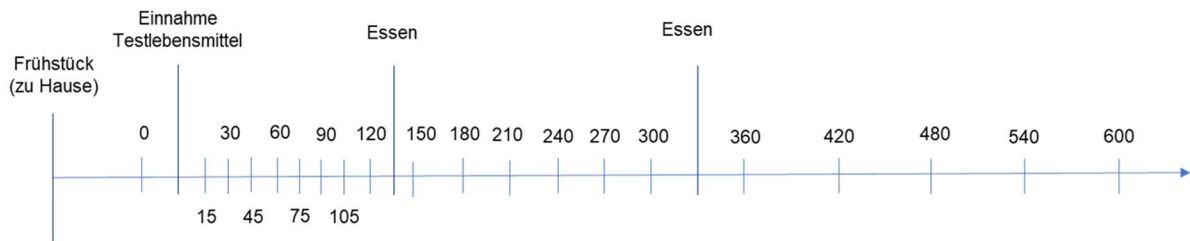


Abbildung 3: Ablauf des Studientages (Angabe der Blutnahmezeitpunkte in min).

Im Rahmen einer Vorstudie, bei der die Projektbearbeiterin selbst als Probandin fungierte, wurde getestet, ob sich die handelsübliche Molke (rekonstituiert mit Milch) als Präparat für den folatfreien Tag eignet und gleichzeitig die Probennahme und Aufarbeitung der Blutproben getestet. Da sich nach der Einnahme des folatarmen Molke Drinks ($< 5 \mu\text{g}$ Folat) kein Maximum gebildet hat, wurde gefolgert, dass dieses Lebensmittel gut für die Anwendung am folatfreien Kontrolltag geeignet ist.

Bei der Probennahme wurde das Venenblut direkt nach Abnahme 10 min bei 4°C zentrifugiert, das Plasma abgenommen und in ein Eppendorf Cup mit 20 mg Ascorbinsäure gegeben. Bis zur Aufarbeitung wurden die Plasmaproben im Dunkeln bei -20°C gelagert. Für die Bestimmung des Plasmafolatgehaltes wurde die Methode von Striegel et al. [2019] optimiert. Dabei wurden $60 \mu\text{L}$ Plasma mit je 1 mL Extraktionspuffer versetzt und die entsprechende Menge an internem Standard [$^{13}\text{C}_5$]-5- CH_3 - H_4 Folat zudosiert. Nach 30-minütigem Equilibrieren bei Raumtemperatur unter Rühren wurde bei 4°C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Festphasenaufreinigung (SPE) verwendet. Für die SPE-Aufreinigung wurden starke Anionentauscher-Kartuschen (1 mL, 100 mg) verwendet. Das Eluat wurde membranfiltriert und bis zur Messung am LC-MS/MS bei -20°C im Dunkeln gelagert. Das Resultat der Methodenoptimierung war zum einen ein Fällungsschritt mit Acetonitril, um die Proteine aus der Matrix zu lösen, zum anderen die Einführung eines Blanks, nur bestehend aus dem internen Standards, der wie die restlichen Blutseren aufgearbeitet wurde, um eine „Kontamination“ der Proben mit unmarkiertem Standard (d.h. Analyt) herausrechnen zu können.

2.4.2 Ablauf der Humanstudie

Von den anfänglichen sechs Probanden sind leider im Laufe der Studie mehrere Probanden ausgefallen. Eine Probandin ist am ersten Studientag nach Legen der Venenverweilkanüle kollabiert und musste daher von der Studienteilnahme ausgeschlossen werden. Zwei weitere Probandinnen konnten das fermentierte Molkegetränk am Testtag aufgrund des stark salzigen Geschmacks nicht zu sich nehmen. Daher können zur Bewertung der Bioverfügbarkeit des fermentierten Molkegetränkes nur die Daten der zwei männlichen Probanden und einer weiblichen Probandin verwendet werden, da nur diese drei Teilnehmenden alle drei Studientage absolviert haben.

In Abbildung 4 sieht man exemplarisch die Konzentrations-Zeit-Kurven des 5- CH_3 - H_4 Folatspiegeln im Plasma eines Probanden (hier: ZEY) an den drei verschiedenen Studientagen. Bei den in Abbildung 4 aufgetragenen Werten handelt es sich jeweils um Dreifach-Replikate eines Blutnahmezeitpunktes mit Doppelinjektionen der Proben am LC-MS/MS.

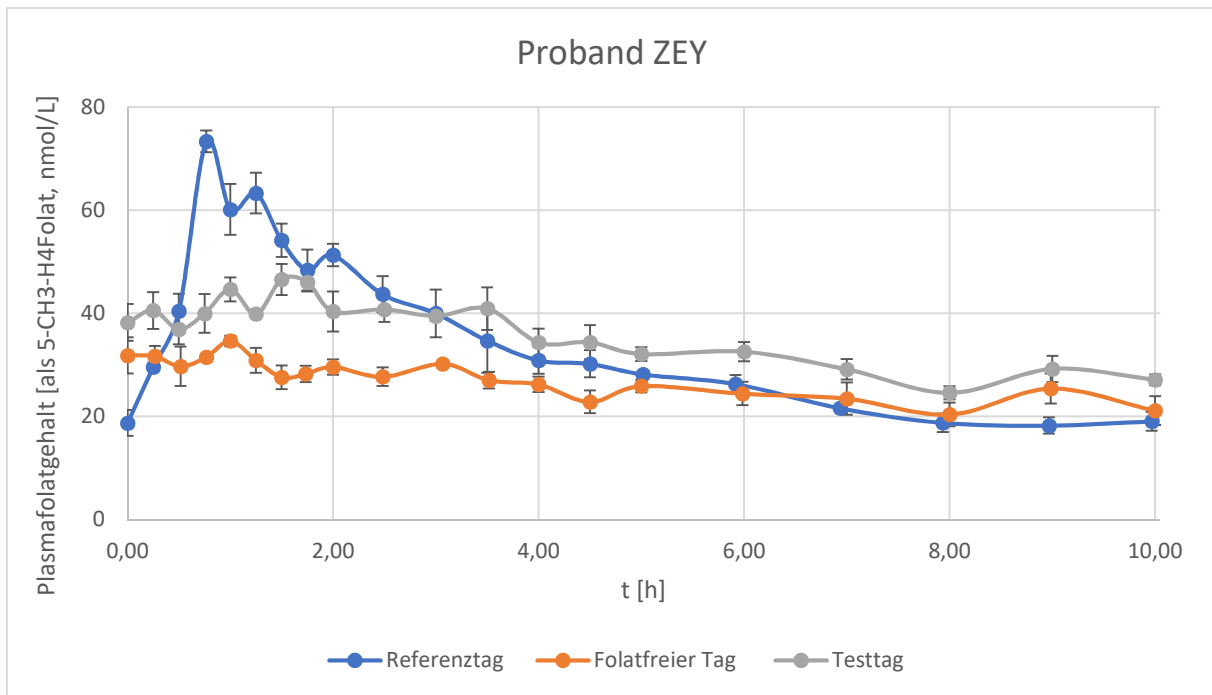


Abbildung 4: Konzentrations-Zeit-Kurven des 5-CH₃-H₄Folates im Plasma eines Probanden an drei verschiedenen Studientagen, berechnet als 5-CH₃-H₄Folat in nmol/L. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung mit Doppelinjektion in nmol/L dar. Testtag: Verabreichung des fermentierten Molkeprodukts.

Die Plasmakurve des Referenztages, bei dem eine Tablette mit 400 µg 5-CH₃-H₄Folat verabreicht wurde, zeigt ein deutliches Maximum mit 73,3 nmol/L nach ca. einer Stunde (0,77 h) (Abbildung 3, blaue Kurve). Der 5-CH₃-H₄Folat-Gehalt während des folatfreien Tages (Abbildung 3, orangene Kurve) bleibt mit einem Höchstwert von 34,6 nmol/L annähernd auf dem Niveau des Nullwertes von 31,8 nmol/L. Es sind keine großen Schwankungen und Maxima zu erkennen. Der Testtag mit dem fermentierten Molkegetränk (Abbildung 3, graue Kurve) zeigte leider nicht das erhoffte Ergebnis. Die Plasmakurve verhält sich ähnlich wie die des folatfreien Tages, was bedeutet, dass die 80 µg 5-CH₃-H₄Folat aus dem fermentierten Molkegetränk offenbar nur unzureichend im Verdauungstrakt absorbiert wurden. Die möglichen Gründe hierfür werden im Abschnitt 2.4.4 ausführlich diskutiert. Unsere erste Vermutung war jedoch, dass die Kombination aus dem geringen Vitamingehalt von nur 80 µg 5-CH₃-H₄Folat (statt 400 µg 5-CH₃-H₄Folat am Referenztag) und dem hohen Salzgehalt zu einem negativen Effekt auf die Bioverfügbarkeit des Produktes geführt haben könnte. Um den ersten Teil der Hypothese bezüglich des zu niedrigen Folatgehaltes zu überprüfen, wurde erneut ein Selbststudientag mit der Projektbearbeiterin als Probandin durchgeführt, bei dem nur 80 µg 5-CH₃-H₄Folat (gleiches Präparat wie 400 µg Tablette am Referenztag) verabreicht wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

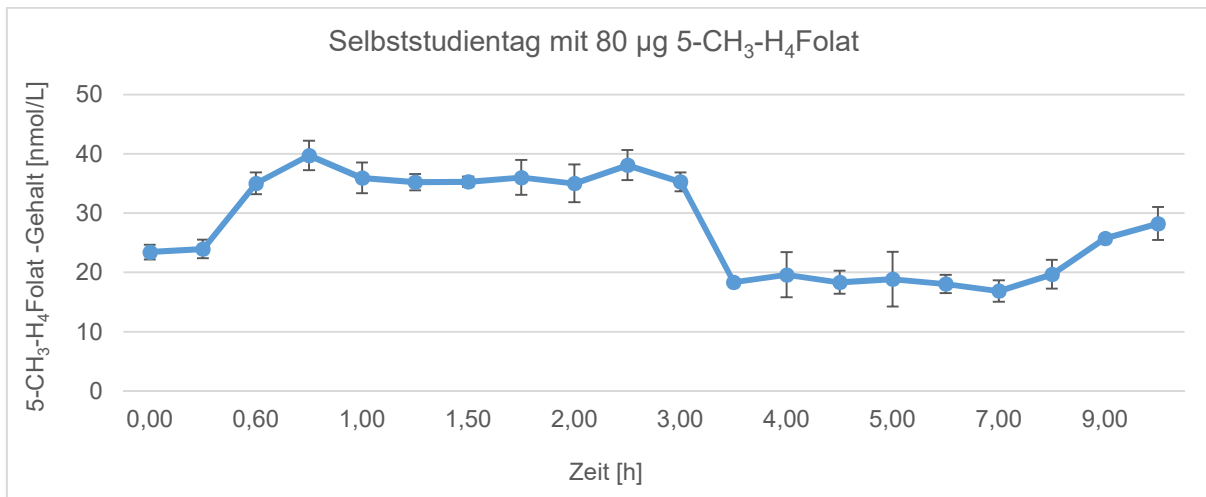


Abbildung 5: Konzentrations-Zeit-Kurven des 5-CH₃-H₄Folates im Plasma für den Selbststudientag mit 80 µg 5-CH₃-H₄Folat, berechnet als 5-CH₃-H₄Folat in nmol/L. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung in nmol/L einer Dreifachbestimmung mit Doppelinjektion dar.

Die Auswertung der Ergebnisse der Selbststudie zeigte ein deutliches Maximum sowie ein ausgedehntes Plateau von circa 0,6 bis 3 h. Nach 0,3 h konnte ein deutlicher Konzentrationsanstieg beobachtet werden. Der höchste gemessene Wert von 39,7 nmol/L wurde nach 0,8 h erreicht. Die Zeitspanne für das Verzeichnen des ersten Anstiegs und Erreichen des Maximums sind vergleichbar mit den Kurven der Testpersonen während des Interventionstages mit 400 µg 5-CH₃-H₄Folat. Die Höhe des Ausschlags von 23,4 nmol/L auf c_{max} von 39,7 nmol/L und die Summe der AUC-Werte von 243,2 nmol/L*h sind schwer zu vergleichen, da es sich um individuell spezifische Plasmakonzentrationen handelt. Außerdem wurden der folatfreie Referenztag und der Interventionstag mit dem 400 µg 5-CH₃-H₄Folat-Supplement, die zum Vergleich und der Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit notwendig sind, nicht durchgeführt. Diese Selbststudie war primär darauf ausgerichtet festzustellen, ob eine Einnahme von 80 µg 5-CH₃-H₄Folat im Blutplasma detektierbar ist, oder die Konzentrationen generell zu gering sind, um sie zu detektieren. Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass auch niedrige Konzentrationen von 80 µg durch unsere Methode nachgewiesen werden können. Die Bioverfügbarkeit des Molkegetränkes bzw. die genaue Analyse dieser sollte durch die geringe Folatkonzentration also nicht beeinträchtigt worden sein.

2.4.3 Auswertung der Humanstudie

Generell sollten für die biokinetische Auswertung folgende Parameter sinnvoll berechnet werden können: c_{max} (maximale Plasmakonzentration), t_{max} (Zeitpunkt von c_{max}) und die Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve, AUC), welcher durch die lineare Trapezregel über das Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve bestimmt wird. Ein Problem, das während diesen Berechnungen auffiel, sind die unterschiedlichen Nullwerte der Probanden an den drei unterschiedlichen Studientagen. Bei Proband ZEY zum Beispiel fängt der Referenztag an mit 18,73 nmol/L, der folatfreie Tag mit 31,84 nmol/L und der Testtag mit 38,22 nmol/L 5-CH₃-H₄Folat-Gehalt. Trotz Randomisierung der einzelnen Studientage, d.h. der Referenztag mit der 400 µg 5-CH₃-H₄Folat-Tablette war nicht bei allen Probanden der gleiche Studientag, zeigten die Referenztage bei allen Probanden durchweg den niedrigsten Nullwert und die Testtage die höchsten Startwerte. Auch hier können wir nicht erklären, warum es zu diesen Effekten kommt. Eine Bestimmung der AUCs ab dem Wert 0 nmol/L (x-Achse als eine Seite des Trapezes in der AUC-Rechnung) macht unter diesen Umständen jedoch keinen Sinn, da die AUCs der Testtage durch die erhöhten Startwerte automatisch entsprechend hoch sind, was jedoch keine Folge der Folataufnahme am Testtag ist. Daher haben wir nach Absprache mit dem

Studienarzt beschlossen, die AUC-Werte jeweils auf den Basalwert (Null- oder Startwert) des jeweiligen Studientages zu normieren und die Auswertung mit teilweise negativen AUCs durchzuführen.

Angefangen beim folatfreien Tag wiesen die normalisierten AUC-Werte mit 0,03 nmol*h (SSV), 1,5 nmol/L*h (ZEY) und 3,1 nmol/L*h (BOI) darauf hin, dass so gut wie kein Folat während des 10 h Studientags aufgenommen wurde, da die Plasmaspiegel und die entsprechenden AUCs innerhalb des analytischen „Unsicherheit“-Bereichs der Plasmaanalysen lagen. Der Referenztag mit der Einnahme des 400 µg 5-CH₃-H₄Folat-Präparats zeigte, wie schon erwähnt, nicht nur eine deutliche Konzentrationssteigerung, sondern bei allen drei Teilnehmern je zwei Konzentrationsmaxima. Das erste Maximum trat bei allen ProbandInnen 0,5 bis 0,8 h nach Einnahme des Folatsupplements auf. ZEY erreichte nach 0,8 h das erste und höchste Maximum von 73,3 nmol/L (c_{max1}) und nach 1,3 h ein c_{max2} von 63,3 nmol/L (vgl. Abb. 4). Die Plasmafolatkonzentration bei Teilnehmer BOI stieg fast zur gleichen Zeit wie bei ZEY nach 0,8 h auf ein ähnliches c_{max1} von 76,8 nmol/L. Das zweite Maximum nach 1,5 h zeigte eine Plasmakonzentration von 69,5 nmol/L. Die postresorptive Plasmakurve von Subjekt SSV folgte mit zwei erkennbaren Maxima einem ähnlichen Trend. Im Gegensatz zu BOI und ZEY war der erste Anstieg auf 66,3 nmol/L nach 0,5 h jedoch der kleinere der beiden Maxima, und die höchste Folatkonzentration von 111,0 nmol/L wurde beim c_{max2} nach 1,8 h gemessen. Dieses Muster gleicht den Ergebnissen von Striegel et al. [2019], die ebenfalls 5-CH₃-H₄Folat als Referenz verwendeten, dieses allerdings zusammen mit einer Wasser-Pektin-Zucker-Mischung verabreichten. Die schnellere Absorption in der hier durchgeführten Studie kann daher damit erklärt werden, dass die Testpersonen das Referenzpräparat ohne zusätzliche „Matrix“ und nur mit Wasser eingenommen haben. Auch das Auftreten zweier Konzentrationsmaxima stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Striegel et al. [2019] überein. Diese vermuteten als Grund für das Vorkommen zweier Maxima, dass das aufgenommene 5-CH₃-H₄Folat erst im Darm resorbiert und in die Galle transportiert, und von dort aus wieder in verschiedene Kompartimente und der Leber verteilt wird und daher zweimal in den Blutkreislauf eingeschleust wird. Außerdem konnten in beiden Studien ein rascher Anstieg der Plasmakonzentrationen am Tag der Folatsupplementierung, gefolgt von einem allmählichen Abfall beobachtet werden. Die Ausgangswerte am Referenztag waren unter den drei Testpersonen auf einem ähnlich niedrigen Niveau von 18,7 nmol/L für ZEY, 20,8 nmol/L für BOI bzw. 20,5 nmol/L bei SSV. Damit ergaben sich für den Referenztag AUC-Werte für ZEY von 257,0 nmol/L*h, gefolgt von BOI mit 374,4 nmol/L*h. SSV wies nach dem höchsten Maximum auch den höchsten AUC von 476,3 nmol/L*h auf.

Unerwarteterweise konnte in den postresorptiven Plasmakurven der Molke-Testtage aller drei Teilnehmer kein "echtes", ausgeprägtes Maximum beobachtet werden. Die normalisierten AUC-Werte von 22,5 nmol/L*h (ZEY), 2,3 nmol/L*h (BOI) und 11,3 nmol/L*h (SSV) unterstrichen diese Beobachtung, da sie eher mit den AUC-Werten der folatfreien Tage vergleichbar waren als mit den Werten der Referenztage, die durchweg deutlich höhere AUCs zeigten. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Folataufnahme aus dem fermentierten Molkegetränk unterschiedlich zu der des Supplements mit 400 µg 5-CH₃-H₄Folat war. Da im Vergleich zum folatfreien Tag zum Teil jedoch höhere AUC-Werte ermittelt wurden, wurden die relative Bioverfügbarkeiten ermittelt, indem die normalisierten AUC-Werte des folatfreien Kontrolltags von den berechneten AUC-Werten des Referenz- und des Testtags subtrahiert wurden. Die relative Bioverfügbarkeit des Molkegetränks im Vergleich zum Folatpräparat wurde schließlich mit 39,8 % für Teilnehmer ZEY und 11,4 % für Teilnehmerin SSV berechnet. Eine Ausnahme stellten die Ergebnisse des Teilnehmers BOI dar. Die Analyse der Folat-Plasmakurve des Teilnehmers BOI ergab eine AUC für den folatfreien Tag (3,1 nmol/L*h) im Vergleich zum Tag mit dem fermentierten Molkegetränk (2,3 nmol/L*h). Durch die Subtraktion dieser AUC-

Werte entstanden daher negative Ergebnisse. Diese errechneten AUCs fallen jedoch innerhalb des Schwankungsbereichs der analytischen Bestimmung von durchschnittlich 3,4 nmol/L und können somit nicht signifikant von "0" unterschieden werden. Insgesamt war die Folataufnahme des Probanden BOI am Testtag mit dem fermentierten Molkegetränk annähernd vergleichbar mit der des folatfreien Tages, was bedeutet, dass keine messbare Bioverfügbarkeit festgestellt wurde. Im Endergebnis betrug die durchschnittliche Folat-Bioverfügbarkeit des fermentierten Molkegetränkes aller drei Teilnehmer 17,1 %.

2.4.4 Ergebnis der Humanstudie und Diskussion

Neben dem verminderten Folatgehalt, der wie zuvor besprochen, keine Auswirkung auf die Folatabsorption gehabt haben sollte, zeigten sich die hohen Schwankungen in den inter-day und individuenübergreifenden Startkonzentrationen als weiteres Hindernis bei der Auswertung der Studiendaten. Neben Unterschieden am folatfreien Tag mit durchschnittlichen Konzentrationen von 28,1 nmol/L (Subjekt ZEY), 35,9 nmol/L (Subjekt BOI) und 44,7 nmol/L (Subjekt SSV), wurden zusätzlich auch größere Schwankungen in den Anfangskonzentrationen der drei Studientagen derselben Testperson nachgewiesen. Vor allem die variierenden Ausgangswerte c_0 am folatfreien Tag von 31,8 nmol/L (Subjekt ZEY), 41,7 nmol/L (Subjekt BOI) und 52,3 nmol/L (Subjekt SSV) stellten ein Problem, auch für die Vergleichbarkeit der Testpersonen untereinander dar. Durch die Normalisierung und Anpassung der AUC-Werte an die Ausgangswerte konnte ein gewisser „Bias“ herausgerechnet werden. Allerdings wurde die größte Diskrepanz wahrscheinlich dadurch verursacht, dass an den Referenztagen aller Teilnehmer die niedrigsten Ausgangskonzentrationen gemessen wurden, während am Tag der Intervention mit dem Molkegetränk sowohl die Ausgangskonzentration als auch die Plasmakonzentration am Ende höher waren als an allen anderen Studientagen. Diese Beobachtung war unerwartet und kann nicht erklärt oder begründet werden, da es einerseits eine vierwöchige Aufüllphase vor Studienbeginn und eine zweiwöchige Phase zwischen den Interventionszeiträumen gab und andererseits eine Randomisierung der Studientage durchgeführt wurde, die den Verzehr des Supplements und des folatfreien Molkepulvers betrafen.

Verschiedene Folgerungen können aus den Ergebnissen der Studie abgeleitet werden. Die Limitierungen durch die geringe Folatdosis in dem Testlebensmittel wurden schon oben erwähnt. Die Analyse und Auswertbarkeit dieser Studie hätte zudem vereinfacht werden können, wenn die Folate in dem fermentierten Molkegetränk isotope markiert vorgelegt hätten. Die Startkonzentration des analysierten, isotope markierten Folates hätte in dem Fall konstant für jeden Teilnehmenden und jeden Studientag bei 0 gelegen. Dennoch deuten die Kurven und Höchstwerte c_{max} darauf hin, dass die Absorption natürlicher Folate aus dem fermentierten Molkegetränk mehr Zeit in Anspruch nimmt. Ähnliche Trends wurden bei der Aufnahme von Folat aus Erdbeeren von Striegel et al. [2019] beobachtet. Die verzögerte Absorption ist vermutlich der Dekonjugation der Polyglutamaten, die vor Aufnahme in den Darm erfolgen muss, und der komplexeren Matrix im Vergleich zu dem Folat in Kapselform geschuldet. Um weitere Einblicke in den potenziellen Einfluss der Folatpolyglutamate in dem Molkegetränk zu erhalten, wurde die Polyglutamat-Zusammensetzung im fermentierten Molkegetränk bestimmt. Die Analyse ergab, dass der Großteil von 5-CH₃-H₄Folat bereits als Monoglutamat vorlag. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Hemmung der Konjugase-Aktivität im Darm, die für die Dekonjugation der Polyglutamate verantwortlich ist, im Wesentlichen nicht ausschlaggebend für die verminderte Bioverfügbarkeit sein kann. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die allgemeine Bioverfügbarkeit von Polyglutamaten in der Regel auch auf etwa 70 % geschätzt und damit nicht allzu schlecht bewertet wird [Melse-Boonstra, et al. 2004]. Die Analyse des osmotischen Potenzials und des pH-Werts des Molkegetränkes konnte die verringerte Bioverfügbarkeit ebenfalls nicht erklären. Der pH-Wert des Molkegetränkes war mit 5,8 nicht so stark vom pH-Optimum der Konjugase abweichend, um eine Hemmung der Enzymaktivität erklären zu können

[Orsomando, et al. 2005] . Die ermittelte Osmolarität von 709 mosmol/L für das Molkegetränk, ist als hoch zu bewerten. Auch in Softdrinks, Säften oder Energydrinks sind meist hohe Osmolaritäten zu messen, welche im Allgemeinen auf den hohen Zuckergehalt zurückzuführen sind. Der Kohlenhydratgehalt von 5,5 % in unserem Produkt ist nicht als übermäßig hoch einzustufen und kann die hohe Osmolarität nicht erklären. Unabhängig davon liegt der optimale osmotische Druck von Getränken, in Bezug auf die Flüssigkeitsaufnahme im menschlichen Körper, bei etwa 300 mosmol/L. Eine Hyperosmolarität von Getränken, also eine deutlich höhere Osmolarität wie sie auch bei dem Molkegetränk zu sehen ist, kann den osmotischen Druck im Körper beeinflussen und die normale Darmfunktion stören. Beim Konsum eines Getränkes mit hoher Osmolarität muss der Körper mehr Wasser in den Darm ziehen, um diesen Konzentrationsunterschied auszugleichen. Dies kann zu Verdauungsstörungen, Durchfall oder einer ungünstigen Verteilung von Flüssigkeiten im Körper führen. Zusätzlich kann eine hohe Osmolarität die Aufnahme von Nährstoffen und Elektrolyten beeinträchtigen, da der Darm weniger effizient arbeiten kann, wenn er durch die osmotische Dysbalance überlastet ist [Markt 2008]. Dieser Umstand könnte eine möglichere Erklärung für die verringerte Bioverfügbarkeit des Molkegetränks liefern.

Da die hohe Osmolarität nicht mit einem hohen Zuckergehalt erklärt werden kann, wurden im nächsten Schritt noch gängige Anionen quantifiziert. Jedoch zeigten sich hier keine erhöhten Werte für Phosphat, Sulfat oder Milchsäure im Vergleich zu anderen Lebensmitteln. Diese können also nicht die hohen Osmolaritätswerte erklären. Des Weiteren gibt es keine Hinweise darauf, dass die ermittelten Anionenkonzentrationen die Folatabsorption gehemmt oder die Effizienz der intestinalen Konjugase beeinflusst haben könnten.

Neben der Osmolarität des Molkegetränkes, können auch andere Faktoren Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit haben. Vor allem spielen die Folatvitamerenverteilung und die Matrix eines Lebensmittels eine bedeutende Rolle für die „Zugänglichkeit“ der Folate zur Absorption im Körper. Zahlreiche Studien haben sich mit der Bioverfügbarkeit einzelner Folatvitamere beschäftigt und unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht. Tamura und Stokstad [1973] fanden beispielsweise keinen Unterschied in der Bioverfügbarkeit zwischen H_4 Folat, 5-CHO- H_4 Folat und 5-CH₃- H_4 Folat. Auch Houghton et al. [2006] und Venn et al. [2002] zeigten, dass 5-CH₃- H_4 Folat ebenso wirksam wie PteGlu zu sein scheint, um die Folatkonzentration im Blutplasma zu steigern. Erstere fanden schon Anzeichen für eine bessere Bioverfügbarkeit von 5-CH₃- H_4 Folat und Ohrvik et al. [2010] beobachteten einen schnelleren und höheren Anstieg des Plasmafolatspiegels nach dem Verzehr von mit 5-CH₃- H_4 Folat angereichertem Vollkornbrot im Vergleich mit PteGlu. Auch Wright et al. [2005] fanden in einer Studie mit markierten [¹³C₆]-PteGlu und -5-CHO- H_4 Folat und [¹⁵N]-markiertem Spinat eine verminderte Aufnahme von PteGlu im Vergleich zu den reduzierten Vitaminen. Daher ist ein entscheidender Aspekt bei Humanstudien die Auswahl der geeigneten Referenzsubstanz, gegen die die Bioverfügbarkeit bestimmt wird und welche meist als 100 % bioverfügbar angenommen wird. Die Ergebnisse einer Studie von Wright et al. deuten auf mögliche Schwierigkeiten bei der Interpretation von Absorptionsstudien hin, wenn die biokinetischen Parameter und die AUCs im Vergleich zu einer Referenzdosis von PteGlu herangezogen werden. Das gilt insbesondere, wenn die Bioverfügbarkeit von reduzierten Folaten, wie sie hauptsächlich in Lebensmitteln vorkommen, ermittelt werden soll [Wright, et al. 2003]. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie 5-CH₃- H_4 Folat als Referenzsubstanz verwendet, um die unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten zu berücksichtigen und das Ergebnis der Studie nicht zu beeinflussen. Es ist jedoch erwähnenswert, dass auch der 5-CHO- H_4 Folat-Gehalt in der verabreichten Menge Molkepulver 73 µg entsprach, und ebenfalls eine Bioverfügbarkeit aufweisen kann [Gregory 2001]. Außerdem kann bei dem geringen Folatgehalt davon ausgegangen werden, dass auch die Folsäure komplett in 5-CH₃- H_4 Folat umgewandelt und damit bioaktiv ist. Damit wäre der Gesamtfolatgehalt nur

um etwa 50 % reduziert gewesen und hätte 200,9 µg Folat in den verabreichten 82 g Molkepulver erreicht, was die errechnete prozentuale Bioverfügbarkeit der Folate aus dem fermentierten Molkegetränk jedoch nochmal vermindern würde. Die Bioverfügbarkeit würde damit für den Probanden ZEY auf 16,4 % und für die Probandin SSV auf 4,7 % sinken. Die Bioverfügbarkeit bzw. die nicht nachweisbare Folataufnahme von Proband BOI ändert sich logischerweise nicht und bleibt bei 0 %. Durch die Referenzierung auf den Gesamtfolatgehalt würde sich die Bioverfügbarkeit des Molkegetränkes auf durchschnittlich nur 7,0 % reduzieren.

Eine weitere Erklärung für die verminderte Folataufnahme aus dem Molkegetränk könnte in den bekannten Matrixeffekten und den vorhandenen Folat-bindenden Proteinen (FBP) in der Milch liegen, da bekannt ist, dass 5-CH₃-H₄Folat in unbehandelter Milch normalerweise an FBP gebunden vorliegt [Nygren-Babol und Jägerstad, 2012]. Mehrere Studien haben sich mit dem Einfluss von FBP auf die Bioverfügbarkeit beschäftigt. Einerseits fanden Mason und Selhub heraus, dass Folate noch für die Aufnahme im Darm zugänglich sind, auch wenn sie an FBP gebunden sind und die Aufnahme folglich nicht einer vorherigen Trennung des Vitamin-Protein-Komplexes bedarf [Mason und Selhub 1988]. Auch Jones und Nixon [2002] sehen fermentierte Milch als eine geeignete Basis zur Anreicherung mit Folaten und begründen dies mit einer gesteigerten Stabilität der Folate durch die FBPs in Milch und sogar einer höheren Bioverfügbarkeit von 5-CH₃-H₄Folat. Im Gegensatz dazu wiesen Witthöft et al. (2006) nach, dass die Zugabe von FBP die Folatabsorption aus Milchprodukten deutlich reduzierte. Letztere Forschungsgruppe konnte zusätzlich belegen, dass die Proteinkomplexe nach einer Ultra-Hochtemperaturbehandlung (UHT) teilweise denaturiert vorlagen, was die Bioverfügbarkeit ihrer Meinung nach verbessern könnte. In pasteurisierter Milch, wie sie bei der Fermentation für diese Studie verwendet wurde, führte der Erhitzungsprozess lediglich zu einer partiellen Denaturierung von FBP, wodurch der Großteil der Folate weiterhin an FBP gebunden vorlag [De Jong, et al. 2005]. Eine weitere Studie zu folatbindenden Proteinen von Forssen et al. [2000] zeigte ebenfalls höhere Gehalte in unbehandelter, pasteurisierter Milch, sprühgetrocknetem Magermilchpulver und Molke als in UHT-Milch, fermentierter Milch und den meisten Käsesorten. Basierend auf den bisherigen Studien lassen sich keine eindeutigen Erkenntnisse über die Funktionalität oder potenziellen Nachteile von FBPs, speziell in Bezug auf die Bioverfügbarkeit, ableiten.

Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse mehrerer Studien ist es auch schwierig, die allgemeine Folatbioverfügbarkeit aus Milch und Milchprodukten zu bewerten [Mönch, et al. 2006]. In der Humanstudie zur Bioverfügbarkeit von Camembert von Mönch et al. [2016] ergaben sich eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit von über 64 % für den fettarmen Camembert im Vergleich zu einer anderen Marke mit nur 8,8 % Bioverfügbarkeit. Diese Unterschiede erklärten die Autoren mit der unterschiedlichen Verteilung von Folat zwischen dem weichen inneren Teil und der festen Rinde sowie Unterschieden in den Anteilen einzelner Folatvitamere [Mönch et al. 2016]. Auch diese Ergebnisse betonen die Bedeutung der Lebensmittelmatrix, selbst innerhalb derselben Lebensmittelkategorie. Angesichts der Wirkung von FBP und anderer Matrixeffekte könnte es sinnvoll sein, die Stoffwechselwege im menschlichen Organismus weiter zu untersuchen, indem beispielsweise auch der Stuhlgang der Teilnehmer an den Interventionstagen untersucht wird.

3. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Erzeugung hochpreisiger funktioneller und sensorisch ansprechender Lebensmittel aus Nebenströmen der Frucht- und Milchverarbeitung bleibt weiterhin ein Forschungsziel am

LALC. Mit den Ergebnissen des vorliegenden Projekts, insbesondere der Stimulation der Folatproduktion durch Traubenkerninhaltsstoffe, ergeben sich weitere Ansätze für die Biofortifikation von Milchprodukten.

Daneben sind mit den Projektergebnissen weitere Antragstellungen beim BMEL, BMBF, AIF/FEI, und EU „Horizon Europe“ mit Partnern aus dem ESFRI-Projekt METROFOOD-RI vorgesehen. Eine solche Antragstellung mit genannten Partnern hat inzwischen zur erfolgreichen Einwerbung des Folgeprojekts HORIZON-INFRA-2023-DEV-01/Project no. 101130162, Titel: METROFOOD-RI Early Phase Implementation (METROFOOD-EPI) geführt.

4. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Nachdem es nur wenige Forschungsgruppen weltweit gibt, die eine derart detaillierte Folatanalytik und entsprechende Humanstudien durchführen, waren keine relevanten Erkenntnisse von dritter Seite im Berichtszeitraum zu verzeichnen.

5. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Ein Manuskript in der internationalen Zeitschrift mit Peer Review „Molecular Nutrition and Food Research“, Titel: "Assessing a fermented whey beverage biofortified with folate as a potential folate source for humans" (Manuscript # mnfr.202300888) wurde eingereicht am 13.12.2023 und ist inzwischen zur Publikation angenommen.

Ein weiteres Manuskript wurde in der internationalen Zeitschrift mit Peer Review „Food Research International“, Titel: "Integrating fruit by-products and whey for the design of innovative fermented beverages, folate-enriched and safe for human consumption" (Manuscript FOODRES-D-24-03205) am 31.03.2024 eingereicht.

Das Poster von Ana Cucick bei der 9th Beneficial Microbes Conference vom 14.-16. November 2022 in Amsterdam: „Food By-products as substrates for growth and folate production by commercial prebiotic strains wurde veröffentlicht im Book of Abstracts „Pre- and Probiotics for Life-long Human and Animal Health“, Amsterdam.

Literatur

- Albuquerque, M.A.C., Bedani, R., Vieira, A.D.S., Leblanc, J.G. und Saad, S.M.I., 2016. Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 236, pp. 26-32.
- Albuquerque, M.A.C., Bedani, R., Leblanc, J.G. und Saad, S.M.I., 2017. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. *International Journal of Food Microbiology*, 261, pp. 35-41.
- Cucick, A.C.C., Gianni, K., Todorov, S.D., De Leblanc, A.D.M., Leblanc, J. und Franco, B.D.G.M., 2020. Evaluation of the bioavailability and intestinal effects of milk fermented by folate producing lactic acid bacteria in a depletion/repletion mice model. *Journal of Functional Foods*, 66, pp. 103785.
- De Jong, R. J.; Verwei, M.; West, C. E.; Van Vliet, T.; Siebelink, E.; Van Den Berg, H.; Castenmiller, J. J. M. Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 2005, 59 (8), 906-913. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602159.
- Forssén, K. M.; Jägerstad, M. I.; Wigertz, K.; Witthöft, C. M. Foliates and Dairy Products: A Critical Update. *Journal of the American College of Nutrition* 2000, 19, 100S–110S. DOI: 10.1080/07315724.2000.10718071 CrossRef.

- Frosst, P.; Blom, H. J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C. A.; Matthews, R. G.; Boers, G. J.; den Heijer, M.; Kluijtmans, L. A.; van den Heuvel, L. P. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995, 10 (1), 111–113. DOI: 10.1038/ng0595-111 PubMed
- Gregory, J. F., 3rd. Case study: folate bioavailability. *The Journal of Nutrition* 2001, 131 (4 Suppl), 1376S-1382S. DOI: 10.1093/jn/131.4.1376S.
- Houghton, L. A.; Sherwood, K. L.; Pawlosky, R.; Ito, S.; O'Connor, D. L. [6S]-5-Methyltetrahydrofolate is at least as effective as folic acid in preventing a decline in blood folate concentrations during lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006, 83 (4), 842-850. DOI: 10.1093/ajcn/83.4.842.
- Jones, M. L.; Nixon, P. F. Tetrahydrofolates Are Greatly Stabilized by Binding to Bovine Milk Folate-Binding Protein. *The Journal of Nutrition* 2002, 132 (9), 2690-2694. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2690>.
- Marktl, W. Osmolarität von Getränken. *Journal für Ernährungsmedizin* 2008, 10 (2), 20-22.
- Mason, J. B.; Selhub, J. Folate-binding protein and the absorption of folic acid in the small intestine of the suckling rat. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1988, 48 (3), 620-625. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/48.3.620>.
- Melse-Boonstra, A.; Verhoef, P.; West, C. E.; van Rhijn, J. A.; van Breemen, R. B.; Lasaroms, J. J. P.; Garbis, S. D.; Katan, M. B.; Kok, F. J. A dual-isotope-labeling method of studying the bioavailability of hexaglutamyl folic acid relative to that of monoglutamyl folic acid in humans by using multiple orally administered low doses. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006, 84 (5), 1128-1133. DOI: 10.1093/ajcn/84.5.1128.
- Mönch, S.; Netzel, M.; Netzel, G.; Ott, U.; Frank, T.; Rychlik, M. Pilot Study on Folate Bioavailability from a Camembert Cheese Reveals Contradictory Findings to Recent Results from a Human Short-term Study. *Frontiers in Nutrition* 2016, 3, 1–5. DOI: 10.3389/fnut.2016.00009 journal.frontiersin.org.
- Nygren-Babol, L.; Jägerstad, M. Folate-Binding Protein in Milk: A Review of Biochemistry, Physiology, and Analytical Methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2012, 52, 410-425. DOI: 10.1080/10408398.2010.500499.
- Obermaier L, da Mata BPM, Perego CH, Sivieri K, Salgaço MK, dos Santos AG, Boehni R, Groehn V, Knapp JP, Rychlik M (2023) An improved folate stable isotope dilution assay of unexploited food sources from Brazil, *Front. Nutr.* 10:1252497. doi: 10.3389/fnut.2023.1252497
- Ohrvik, V. E.; Buttner, B. E.; Rychlik, M.; Lundin, E.; Witthoft, C. M. Folate bioavailability from breads and a meal assessed with a human stable-isotope area under the curve and ileostomy model. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2010, 92 (3), 532–538. DOI: 10.3945/ajcn.2009.29031 PubMed.
- Orsomando, G.; Garza, R. D. d. I.; Green, B. J.; Peng, M.; Rea, P. A.; Ryan, T. J.; Gregory, J. F.; Hanson, A. D. Plant γ -Glutamyl Hydrolases and Folate Polyglutamates: compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280 (32), 28877–28884. DOI: 10.1074/jbc.M504306200 www.jbc.org.
- Striegel L, Weber N, Dumler C, Chebib S, Netzel M, Sultanbawa Y, Rychlik M (2019) Promising Tropical Fruits High in Foliates, *Foods*, 8(9): 363, <https://doi.org/10.3390/foods8090363>
- Tamura T, Stokstad EL. Availability of food folate in man. *Br J Haematol*, 25 (1973)
- Venn, B. J.; Green, T. J.; Moser, R.; McKenzie, J. E.; Skeaff, C. M.; Mann, J. Increases in blood folate indices are similar in women of childbearing age supplemented with [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid. *The Journal of Nutrition* 2002, 132 (11), 3353-3355. DOI: 10.1093/jn/132.11.3353.
- Witthöft, C. M.; Arkbåge, K.; Johansson, M.; Lundin, E.; Berglund, G.; Zhang, J.-X.; Lennernäs, H.; Dainty, J. R. Folate absorption from folate-fortified and processed foods using a human ileostomy model. *British Journal of Nutrition* 2006, 95 (1), 181-187. DOI: 10.1079/bjn20051620.
- Wright, A. J.; Finglas, P. M.; Dainty, Hart, D. J.; Wolfe, C. A.; Southon, S.; Gregory, J. F. Single oral doses of ^{13}C forms of pteroylmonoglutamic acid and 5-formyltetrahydrofolic acid elicit differences

in short-term kinetics of labelled and unlabelled folates in plasma: potential problems in interpretation of folate bioavailability studies. *British Journal of Nutrition* 2003, *90* (2), 363–371. PubMed
Wright, A. J. A.; Finglas, P. M.; Dainty, J. R.; Wolfe, C. A.; Hart, D. J.; Wright, D. M.; Gregory, J. F. Differential Kinetic Behavior and Distribution for Pteroylglutamic Acid and Reduced Folates: a Revised Hypothesis of the Primary Site of PteGlu Metabolism in Humans. *The Journal of Nutrition* 2005, *135* (3), 619-623. DOI: 10.1093/jn/135.3.619.