



Technische Universität Wien

# Diplomarbeit

Evaluierung der phenolischen Inhaltsstoffe und der  
antioxidativen Aktivität von Weintraubentrester

ausgeführt zum Zwecke der Erlangung des akademischen  
Grades eines Dipl.-Ing.

unter der Leitung von  
**Ao.Univ.Prof. Dipl.Ing. Dr. Gerhard Kroyer**

E 166 - Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und  
Technische Biowissenschaften

durch

**Bsc. Alexander Hühmayr**  
Adamsgasse 32/19  
1030 Wien

Wien, Oktober 2012

## **Danksagung**

Ich möchte mich besonders bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dip.Ing. Dr.-techn. Gerhard Kroyer für die hervorragende Betreuung und die anregenden Gespräche während der Durchführung dieser Diplomarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Verfahrenstechnik , Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei technischen Problemen.

Großer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern die mich während meiner Studienzeit immer wieder finanziell unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt auch meinen Freunden und Kollegen die mir während des Studiums immer wieder hilfreich zur Seite gestanden sind und mich moralisch unterstützt haben.

# Abstract

Phenolic components and antioxidant activity of different Austrian grape pomace varieties are measured and their possibilities for industrial utilization are evaluated. Samples were dried for 48 hours at 60°C before utilization, loss on drying was between 51,4 and 65,1%. Extraction was made at 60°C with Ethanol/Water (70/30) mixture and a yield between 19,1 and 27,1% was obtained related to dry weight. Total polyphenols were determined with the Folin-Ciocalteu method and a polyphenolic content between 10,6 to 13,8% was found in red wine grape pomace, for white wine a content between 5,0 and 7,5% was obtained. Analysis on the flavonoid content with the modified AlCl<sub>3</sub> method resulted in 1,9 to 3,2% flavonoid content for red wine grape pomace and 1,3 to 1,8% for white wine grape pomace. Catechin determination with the DAC method resulted in catechin contents between 1,1 and 2,4% for red wine grape pomace and 0,6 to 0,8% for white wine grape pomace. Proanthocyanidins were analysed using a modified Butanol-HCl method resulting in proanthocyanidin contents between 1,5 and 3,5% for red wine grape pomace and 0,5 to 0,8% for white wine grape pomace. Antioxidant activity was determined using the DPPH Method and resulted in antioxidant activity between 0,008 and 0,25 Trolox Equivalents for red wine grape pomace and 0,003 to 0,005 Trolox Equivalents for white wine grape pomace. Alternatively antioxidant activity was determined with the  $\beta$ -Carotene Bleaching method which resulted in values between 529 and 619 AAC (Antioxidant Activity Coefficient) for red wine grape pomace and values between 315 and 538 AAC for white wine grape pomace. Industrial utilization of grape pomace covers thermal combustion, spirits, grape seed oil, functional and cosmetics.

# Kurzfassung

Die Evaluierung der phenolischen Inhaltsstoffe und der antioxidativen Aktivität von österreichischem Weintraubentrester stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Des Weiteren wurden die industriellen Einsatzmöglichkeiten von Weintraubentrester evaluiert. Die aus dem Burgenland stammenden Proben wurden frisch angeliefert und sofort tiefgekühlt. Bevor die Proben für die chemische Analyse verwendet werden konnten wurden diese 48 Stunden bei 60°C im Trockenschrank getrocknet, wobei ein Trocknungsverlust zwischen 51,4 und 65,1% bestimmt werden konnte. Die fein vermahlenden Trester wurden anschließend bei 60°C mit einem Ethanol/Wasser Gemisch (70/30) im Schüttelbad extrahiert und im Rotavapor bis zur Trockene eingedampft. Die dabei erhaltenen Extraktionsausbeuten bewegten sich im Bereich zwischen 19,1 und 27,1% bezogen auf die Trockensubstanz. Die so erhaltenen Extrakte wurden für die chemischen Analysen verwendet. Die quantitative Bestimmung der Gesamtpolyphenole erfolgte anhand der Folin-Ciocalteu Methode. Dabei konnte bei Rotweintrester ein Gesamtpolyphenolgehalt zwischen 10,6 und 13,8%, bei Weißweintrester ein Gehalt von 5,0 bis 7,5% nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Flavonoide anhand der modifizierten AlCl<sub>3</sub> - Methode ergab bei Rotweintrester Werte zwischen 1,9 und 3,2%, bei Weißweintrester Werte zwischen 1,3 und 1,8%. Die Catechine wurden anhand der DAC Methode analysiert und brachten bei Rotweintrester Werte zwischen 1,1 und 2,4% hervor, bei Weißweintrester Werte zwischen 0,6 und 0,8%. Die Bestimmung der Proanthocyanidine anhand der modifizierten Butanol-HCl Methode brachte für Rotweintrester Werte zwischen 1,5 und 3,5% hervor, für Weißweintrester Werte zwischen 0,5 bis 0,8%. Die anti-oxidative Aktivität wurde anhand der DPPH Methode bestimmt und ergab für Rotweintrester Werte zwischen 0,08 und 0,25 Troloxäquivalent. Die antioxidative Aktivität der Weißweintrester betrug zwischen 0,03 und 0,05 Troloxäquivalente. Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels der  $\beta$ -Carotin Bleaching Methode ergab für Rotweintrester Werte zwischen 529 und 619 AAC, für Weissweintrester Werte zwischen 315 und 538 AAC. Die industrielle Nutzung von Weintraubentrester umfasst die thermische Verwertung als auch die Herstellung von Weinbrand, Traubenkernöl, Nahrungsergänzungsmittel und kosmetischen Produkten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel 1 Einleitung und Literaturübersicht .....</b>	<b>1</b>
1.1. Lipidperoxidation in Lebensmitteln [1, 2].....	1
1.2. Antioxidantien [2].....	7
1.3. Verwendung von Weintrester.....	12
1.4. Literaturübersicht .....	16
<b>Kapitel 2 Problemstellung .....</b>	<b>21</b>
<b>Kapitel 3 Material.....</b>	<b>22</b>
3.1. Weintraubentrester.....	22
3.2. Chemikalien.....	22
<b>Kapitel 4 Methodik .....</b>	<b>24</b>
4.1. Aufarbeitung des Probenmaterials .....	24
4.2. Analyse der Extrakte .....	25
<b>Kapitel 5 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
5.1. Statistik .....	30
5.2. Trocknungsverlust.....	30
5.3. Ausbeute .....	31
5.4. Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu .....	32
5.5. Proanthocyanidine.....	34
5.6. Catechine .....	36
5.7. Flavonoide.....	38
5.8. Antioxidative Aktivität mittels DPPH-Methode.....	40
5.9. Antioxidative Aktivität mittels $\beta$ -Carotin Bleaching.....	51

<b>Kapitel 6 Diskussion .....</b>	<b>53</b>
6.1. Trocknungsverlust.....	53
6.2. Extraktionsausbeute .....	54
6.3. Gesamtpolyphenole .....	54
6.4. Flavonoide .....	55
6.5. Proanthocyanidine.....	56
6.6. Catechine.....	57
6.7. Antioxidative Aktivität (DPPH-Methode).....	58
6.8. Antioxidative Aktivität ( $\beta$ -Carotin Bleaching).....	59
<b>Kapitel 7 Zusammenfassung.....</b>	<b>61</b>

# Kapitel 1

## Einleitung und Literaturübersicht

In diesem Kapitel werden die Grundlagen des oxidativen Zerfalls behandelt sowie Möglichkeiten aufgezeigt diesen zu verhindern. In weiterer Folge werden die gängigsten Antioxidantien und deren natürliche Herkunft erläutert. Wein und seine Inhaltsstoffe stellen ebenso einen wichtigen Abhandlungspunkt in diesem Kapitel dar. Abschließend werden in einer Literaturübersicht relevante Studien und Berichte erörtert.

### 1.1. Lipidperoxidation in Lebensmitteln [1, 2]

Bei der Lipidperoxidation handelt es sich um eine Oxidation von Acyllipiden (verseifbare Lipide) zu Hydroperoxiden, welche in weiterer Folge in eine Vielzahl von anderen Verbindungen umgewandelt werden. Grundsätzlich kann bei der Lipidperoxidation zwischen der Autooxidation und der Lipoxygenase-Katalyse unterschieden werden. Diese beiden Vorgänge führen häufig zu einer Qualitätsminderung der Lebensmittel, daher ist man bestrebt die Prozesse zu unterbinden bzw. zu bremsen.

#### 1.1.1 Lipide in Lebensmitteln

Lipide sind in so gut wie allen Lebensmitteln vorhanden, sei es als Bestandteil des Lebensmittels selbst oder als Teil der Rezeptur bei der Herstellung (z.B. Mayonnaise). Eine Eigenschaft dieser ist es dass sie bei normalen Lagerbedingungen nicht stabil sind. Den größten Teil der Lipide bilden dabei Triglyzeride, durch deren Oxidation flüchtige als auch nicht-flüchtige Substanzen entstehen können. Zu den Erstgenannten zählen auch sehr aktive Geruchsstoffe, wodurch eine Lipidperoxidation auch in Lebensmitteln festzustellen ist die nur einen geringen Anteil an Acyllipiden (verseifbare Lipide) aufweisen oder in denen nur ein geringer Anteil der Acyllipide oxidiert worden ist.

Diese Geruchsstoffe werden vom Konsumenten oft als unangenehm empfunden und können mit den Attributen ranzig, fischig oder ähnlichem beschrieben werden.

## 1.1.2 Autoxidation

Der Vorgang der Autoxidation ist sehr komplex, eine Untersuchung an Lebensmitteln selbst schwierig. Daher werden die Untersuchungen durch verschiedene Modelle ergänzt, in denen z.B. eine chemische Verbindung unter definierten Bedingungen oxidiert wird. Die Geschwindigkeit der Autoxidation ist abhängig von:

- der Fettsäurezusammensetzung
- der Konzentration bzw. Wirkung von Pro- und Antioxidantien
- dem Sauerstoff-Partialdruck
- der Oberfläche, die mit Sauerstoff in Berührung kommt
- den Lagerbedingungen (Temperatur, Licht, Wassergehalt) des Lebensmittels
- dem chemischen Aufbau des oxidierten Moleküls

Bei der Autoxidation handelt es sich um einen Radikalkettenmechanismus (siehe Formel 1.1-1.9) der in folgende Schritte eingeteilt werden kann, wobei  $R$  den Fettsäurerest und  $A$  das Antioxidans darstellt.:

- Startreaktion:



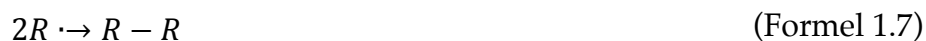
- Kettenwachstum:



- Kettenverzweigung:



- Kettenabbruch:



Die Peroxiradikale weisen eine sehr hohe Stabilität auf, daher ist die Geschwindigkeit des Kettenwachstums durch die Abstraktion eines H-Atoms aus dem Fettsäuremolekül bestimmt (Formel 1.3).



Die Peroxidation wird auch durch Schwermetallionen oder Häm(in)-verbindungen begünstigt.

Das Model der Kettenreaktion ist jedoch nur im Anfangsstadium der Autoxidation gültig, da im weiteren Verlauf die Reaktion durch Bildung von Sekundär- bzw. Tertiärprodukten immer unübersichtlicher wird.

Einen wesentlichen Schritt bei der Autoxidation stellt die Bildung von Radikalen dar, diese kann auf verschiedene Arten erfolgen:

### a) Fotooxygenierung

Bei der Fotooxygenierung spielt die Elektronenkonfiguration des Sauerstoffs eine wesentliche Rolle. Im Grundzustand befindet sich der Sauerstoff in einem Triplett-Zustand, bei dem gemäß der Hund'schen Regel die beiden Valenzelektronen parallel angeordnet sind. Es werden daher 1-Elektronen-Reaktionen bevorzugt. Die Reaktion eines Triplets mit einer Verbindung die sich im Singulett-Zustand befindetet, wie etwa die Fettsäuren, zu einem Singulett, wie etwa ein Hydroperoxid, ist durch die Spin-Barriere erschwert. Die Aktivierungsenergie der direkten Oxidation einer Fettsäure ist mit 146-273 kJ/mol dementsprechend hoch und findet deshalb nicht ohne weiteres statt.



Jedoch geht der Sauerstoff unter der Aufnahme von nur 92 kJ aus dem Grund- in den kurzlebigen 1. Singulett-Zustand über, wodurch er sich in seiner Bereitschaft zu 2-Elektronen-Reaktionen dem Ethylen ähnelt, mit dem Unterschied dass Sauerstoff elektrophiler ist.

Der 2. Singulett-Zustand spielt aufgrund seiner noch kürzeren Lebensdauer bei der Fettoxidation keine Rolle.

In Gegenwart von Licht kann eine Autoxidation der Lipide gestartet werden, wobei manche Substanzen sensibilisierend wirken. Dabei gibt es zwei Typen von Sensibilisatoren. Reagiert der durch das Licht aktivierte Sensibilisator mit dem Substrat unter Bildung von Radikalen, die dann eine Autoxidation starten, handelt es sich um Typ-1. Wird hingegen der Sauerstoff zum  ${}^1O_2$  aktiviert handelt es sich um Typ-2 (Formel 1.11, 1.12). Diese beiden Typen konkurrieren miteinander wobei strukturelle Eigenschaften des Sensibilisators als des Substrats entscheidend sind. Liegt eine hohe Sauerstoffkonzentration vor wird Typ-2 bevorzugt.

Untersuchungen haben gezeigt dass die in Lebensmitteln vorkommenden Sensibilisatoren Chlorophyll a und b, Phäophytine a und b sowie Riboflavin den Typ-2 bei der Oxidation von Öl- und Linolsäure stark bevorzugen.



Der dabei entstandene Singulett-Sauerstoff kann dann direkt mit ungesättigten Fettsäuren über eine Cyclo-Addition reagieren.

Dabei gehen aus jeder Fettsäure doppelt so viele Hydroperoxide hervor, wie isolierte Doppelbindungen im Molekül vorliegen. In weiterer Folge entstehen durch den Zerfall der Hydroperoxide jene flüchtigen Verbindungen, die sehr geruch- und geschmacksintensiv sind.

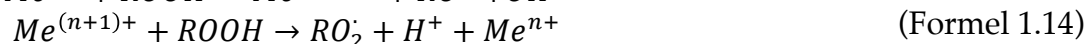
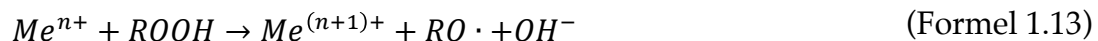
Die Bildung von  $^1\text{O}_2$  wird durch Carotinoide gehemmt, welche diesen sehr schnell zum  $^3\text{O}_2$  quenchen und auch den Energietransfer vom angeregten Sensibilisator zum  $^3\text{O}_2$  verhindern. Aus diesem Grund werden Carotinoide zum Schutz fetthaltiger Lebensmittel vor Typ-2 Fotooxygenierungen eingesetzt.

### b) Wirkung von Schwermetallen

Schwermetallionen sind in Fetten und fetthaltigen Lebensmitteln immer enthalten, sie können aus verschiedenen Quellen stammen:

- In geringen Konzentrationen als Bestandteile vieler Enzyme und Metallproteine in Lebensmitteln. Durch Fettgewinnung dissoziieren die Schwermetallionen vom Protein und werden als fettsaure Salze isoliert.
- Bei der Verarbeitung von Fetten können Säuren die Schwermetalle in den Apparaturen herauslösen. Diese sind in der Regel physiologisch inaktiv, jedoch pro oxidativ wirksam.
- Spuren von Schwermetallen können auch in den Verpackungsmaterialien wie etwa Folien oder Papieren vorhanden sein.

Unter Bildung von Radikalen aus bereits vorhandenen Hydroperoxiden können Schwermetalle die Autoxidation ungesättigter Acyllipide starten:

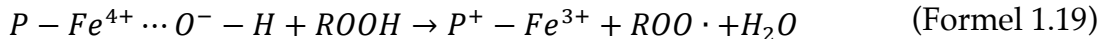
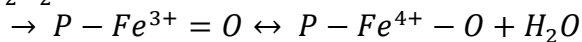
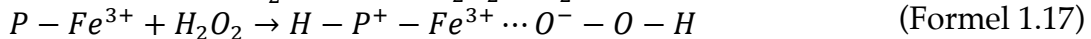
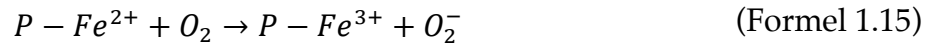


Die Zersetzungsgeschwindigkeit von in Wasser emulgierten Hydroperoxiden ist pH-abhängig und hat bei Eisen und Kupfer ein Maximum bei pH 5,5-6,0. Die Lagerstabilität eines Öles bezüglich der Konzentration des Schwermetalles beträgt bei Ölen mit hohem Linolsäuregehalt wie etwa Sonnenblumen- und Maiskeimöl weniger als 0,3 ppm Fe und 0,01 ppm Cu. Bei Fetten mit hohem Öl- bzw. Stearingehalten wie etwa Butter beträgt die Grenze etwa 2 ppm Fe und 0,2 ppm Cu.

### c) Häm(in)-Katalyse

In den meisten Lebensmitteln kommen Häm( $\text{Fe}^{2+}$ )- und Hämin( $\text{Fe}^{3+}$ )proteine vor. Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom C beschleunigen vor allem in tierischem Gewebe die Lipidoxidation. In pflanzlichen Lebensmitteln sind Peroxidase und Katalase die wichtigsten Häminproteine. Im Vergleich zu Fe-Ionen werden Hydroperoxide von Häm(in)verbindungen um einige Größenordnungen schneller abgebaut, daher sind sie wesentlich wirksamer

beim Start und bei der Beschleunigung der Lipidoxidation. Einen weiteren Einfluss auf die Intensität, mit der die Lipidoxidation beeinflusst wird stellt die Struktur der Proteine dar.



Die direkte Oxidation der Fettsäure durch ein Schwermetallion verläuft wahrscheinlich sehr langsam und scheint beim Start der Autoxidation keine wesentliche Rolle zu spielen:



#### d) Aktivierter Sauerstoff

Durch enzymatische Reduktion kann Sauerstoff bis zum Wasser reduziert werden. Bei dieser Reaktion bilden sich drei Intermediate unterschiedlicher Reaktivität, wobei durch Aufnahme eines Elektrons das Superperoxidradikalanion ( $O_2^-$ ) bildet, dessen chemische Eigenschaften pH-abhängig sind.

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Superperoxidradikalanion als Anion vor, der radikalische Charakter kommt aufgrund des  $pK_s$ -Wertes erst im sauren Milieu hervor. Dementsprechend wirkt es als Nucleophil und kann nicht direkt eine Lipidperoxidation einleiten.

Die Dismutation verläuft ebenfalls pH-Wert abhängig  
(pH 7:  $k = 5 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , pH 11:  $k = 10^2 \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Durch das Enzym Superoxiddismutase, das in zahlreichen tierischen und pflanzlichen Geweben vorkommt, wird diese Reaktion jedoch stark beschleunigt ( $k = 2 \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

$O_2^-$  wird vor allem durch Flavinenzyme freigesetzt, in weiterer Folge reagiert das Superoxidradikalanion mit Stickstoffoxid (NO) und sehr hoher Geschwindigkeit zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), welches ein vielseitiges Oxidans darstellt und zum Beispiel ungesättigte Fettsäuren, Ascorbinsäure, Tocopherole, Harnsäure und Aminosäuren oxidieren kann.

Wasserstoffhydroperoxid, das ein weiteres Intermediat der enzymatischen Reduktion von Sauerstoff darstellt ist bei Abwesenheit von Schwermetallen, energiereicher Strahlung und höherer Temperatur relativ reaktionsträge.

Jedoch ist das aus ihm hervorgehende Hydroxyradikal ( $\text{HO}\cdot$ ) sehr reaktiv und reagiert unselektiv mit sämtlichen organischen Lebensmittelbestandteilen. Aus diesem Grund kann es direkt eine Lipidperoxidation starten, wobei sich immer die Frage stellt ob es die Acyllipide erreicht oder ob es nicht schon vorher von anderen Lebensmittelbestandteilen abgefangen wird.

### **1.1.3 Lipoxygenase katalysierte Oxidation**

Die Lipoxygenase kommt bevorzugt in verschiedenen Pflanzen und auch in tierischen Geweben vor. Es handelt sich um ein Enzym das die Oxidation ungesättigter Fettsäuren zu Monohydroperoxiden katalysiert, wobei nur Fettsäuren oxidiert werden die ein 1-cis, 4-cis-Pentadiensystem enthalten, demnach stellen die Linol- und Linolensäuren für die Enzyme aus Pflanzen geeignete Substrate dar. Ein wesentlicher Unterschied zur Autoxidation besteht darin dass die Reaktion der Lipoxygenase den typischen Merkmalen der Enzymkatalyse unterworfen ist. Diese wären Substratspezifität, Selektivität, Auftreten eines pH-Optimums, Hitzeempfindlichkeit und die deutlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit im Temperaturbereich von 0-20°C. Die Produkte der durch die Lipoxygenase hervorgerufenen Oxidation sind ebenfalls flüchtige Verbindungen und gleichen denen der Autoxidation.

### **1.1.4 Sekundärprodukte**

Die aus der Autoxidation hervorgehenden Monohydroperoxide sind geruch- und geschmacklos. Die in weiterer Folge entstehenden sekundär flüchtigen Verbindungen machen sich jedoch bereits bei sehr geringen Konzentrationen bemerkbar, da zu ihnen eine Vielzahl an intensiven Aromastoffen gehört. Zu den flüchtigen Sekundärprodukten gehören die geruchsaktiven Carbonylverbindungen, Malondialdehyd und Alkane bzw. Alkene. Die Aromastoffe der Lipidperoxidation weisen meist folgende Geruchsqualitäten auf: metallisch, fettig, erdig, pilzartig, butterartig, ölig, ...

### **1.1.5 Hemmung der Lipidperoxidation**

Die Autoxidation von Acyllipiden in Lebensmitteln kann durch folgende Maßnahmen verhindert werden:

- Ausschluss von Sauerstoff durch Vakuumverpacken oder Glucoseoxidase
- Lagerung bei tiefen Temperaturen
- Dunkelheit setzt die Geschwindigkeit der Autoxidation herab
- Desaktivierung der Lipoxygenase bei Gemüse durch Blanchieren verhindert frühzeitigen Verderb
- Vermeidung der Kontamination durch Schwermetalle
- Zusatz von Antioxidantien

## 1.2. Antioxidantien [2]

Bei Antioxidantien handelt es sich um Stoffe, die die Lipidperoxidation verhindern bzw. verlangsamen. Aus diesem Grund werden sie Lebensmitteln hinzugefügt, daraus resultiert eine Verzögerung des Ranzigwerdens und der sensorischen Beeinträchtigung durch Fehlgerüche, die durch Oxidation entstehen. Mit der Ausnahme von Ethoxyquin spielen in Lebensmitteln nur Antioxidantien mit einer oder mehreren OH-Gruppen eine Rolle.

Betrachtet man den Mechanismus durch den eine Oxidation verhindert werden kann so bietet sich eine Möglichkeit die Antioxidantien in zwei Gruppen einzuteilen: primäre und sekundäre Antioxidantien. Eine weitere Unterteilung ist durch die Herkunft möglich: natürliche und synthetische Antioxidantien.

### 1.2.1 Primäre Antioxidantien

Durch das Antioxidans AH werden die freien Radikale ( $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ) aufgefangen. Dadurch kann das Kettenwachstum unterbrochen werden wobei sich ein Antioxidansradikal  $A\cdot$  bildet.



Dieses Antioxidationsradikal  $A\cdot$  weist sowohl eine niedrige Reaktivität als auch Mesomeriestabilisierung auf sodass keine weitere Reaktion mit Lipiden stattfindet.



### 1.2.2 Sekundäre Antioxidantien

Die Gruppe der sekundären Antioxidantien wirkt nicht auf direkte Weise antioxidativ sondern weist vielmehr eine stabilisierende Wirkung durch folgende Mechanismen auf:

- Regeneration primärer Antioxidantien
- Abfangen von Sauerstoff
- Metallkomplexierung

### 1.2.3 Synergismus

Die antioxidative Wirksamkeit der beiden Inhibitoren kann durch deren Zusammenspiel gesteigert was als Synergismus bezeichnet wird.

Ein deutlicher Synergieeffekt kann beobachtet werden, wenn das primäre Antioxidans einen Kettenabbruch hervorruft und das sekundäre Antioxidans als Inhibitor (z.B. durch Metallkomplexierung) wirkt.

### 1.2.4 Antioxidantien in der Lebensmitteltechnologie [3]

Die in der Lebensmittelindustrie zugelassenen Antioxidationsmittel lassen sich in zwei Hauptgruppen, die synthetischen und natürlichen Antioxidationsmittel einteilen. Aufgrund des großen Umfangs an zugelassenen Substanzen soll im Folgenden nur auf die für diese Arbeit relevanten Substanzen eingegangen werden.

### 1.2.5 Synthetische Antioxidantien [4]

#### a) Ascorbylpalmitat

Ascorbylpalmitat (Abbildung 1.1), oder auch Palmitin-säureascorbylester genannt, ist der Fettsäureester der Palmitinsäure und zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Antioxidationsmittel wie etwa Ascorbinsäure durch seine Fettlöslichkeit aus. Oft wird dieser Zusatzstoff Lebensmitteln zugeführt um deren Vitamin-C-Gehalt zu erhöhen, in diesem Fall darf man Ascorbylpalmitat als Vitamin-C deklarieren. Das Antioxidationsmittel gilt als unbedenklich und wird vor allem in Fleisch- und Wurstwaren, Trockenmilcherzeugnissen, Kindernahrung, Speiseölen und Mayonnaisen verwendet.

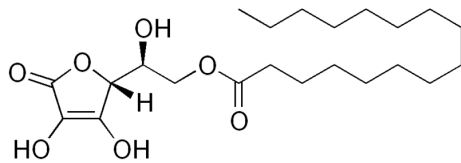


Abbildung 1.1 Ascorbylpalmitat

#### b) BHA

Als Butylhydroxyanisol (Abbildung 1.2), kurz BHA genannt, wird das Gemisch zweier Phenolether (2-tert-Butyl-4-hydroxyanisol und 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisol) bezeichnet. Es weist in hohen Dosen eine antimikrobielle Wirkung auf, ist hitzebeständig und gut fettlöslich. BHA wird vor allem Nüssen und Knabberartikel mit einer gesetzlich festgelegten Höchstmenge (200-400 mg/kg) zugesetzt. Momentan wird Butylhydroxyanisol aufgrund krebsfördernder als auch krebshemmender Wirkungen intensiv untersucht, des weiteren steht es im Verdacht bei entsprechend disponierten Personen Allergien hervorzurufen.

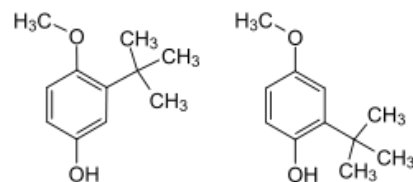


Abbildung 1.2 BHA

### c) BHT

Bei Butylhydroxytoluol (Abbildung 1.3), kurz BHT genannt, handelt es sich um ein in der Natur nicht vorkommendes Toluolderivat, welches in großen Mengen synthetisch hergestellt wird. Es besitzt im Gegensatz zu BHA keinerlei antimikrobielle Wirkung und wird aufgrund seiner hohen Hitzestabilität unter Einhaltung der gesetzlichen Höchstmengen (200-400 mg/kg) gerne Fritierfetten zugesetzt. BHT wird auch in Kunststoffverpackungen eingesetzt wodurch es zu Kontaminationen von Lebensmitteln kommen kann. Wie auch BHA steht BHT im Verdacht bei disponierten Personen Allergien hervorzurufen, es wird sehr häufig aufgrund seiner guten Fettlöslichkeit in Kosmetikprodukten verwendet.

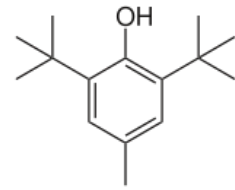


Abbildung 1.3 BHT

### d) Tocopherol (Stark Tocopherolhaltige Extrakte)

Bei Tocopherol (Abbildung 1.4) handelt es sich um ein Methylderivat des Tocols, eines 2-Methyl-2(4', 8', 12'-trimethyl-tridecyl)-chroman-6-ols.

Tocopherole werden hauptsächlich aus den Samen ölhaltiger Pflanzen wie etwa Weizen, Mais und Soja extrahiert. Sie gehören zu den wichtigsten Antioxidantien und gelten als unbedenklich. Oft wird Tocopherol verwendet um

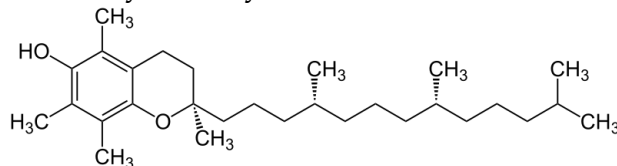


Abbildung 1.4 Tocopherol

den Vitamin-E-Gehalt zu erhöhen. Betrachtet man die anti-oxidative Wirksamkeit so kann man feststellen dass diese vom  $\alpha$  bis zum  $\delta$ -Tocopherol ansteigt.

### e) Trolox

Bei Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure, siehe Abbildung 1.5) handelt es sich um ein von der Firma Hoffmann-La Roche entwickeltes Vitamin-E-Derivat, das aufgrund seiner ausgeprägten antioxidativen Aktivität als Referenzsubstanz bei der Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Substanzen verwendet wird.

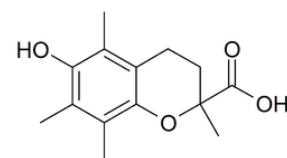


Abbildung 1.5 Trolox

## 1.2.6 Natürliche Antioxidantien [1, 2]

In pflanzlichen Geweben spielen vor allem die polyphenolischen Inhaltsstoffe eine wichtige Rolle als Antioxidantien, selten Verbindungen mit einer Aminogruppe (z.B. Carnosin und Harnsäure). Vor allem in Gewürzen und Kräutern wie z.B. Salbei oder Rosmarin, aber auch in Tee schützen phenolische Inhaltsstoffe vor Fettautoxidation. In Räucherwaren schützen die zu flüchtigen Phenolen geackten Polyphenole des Holzes wie z.B. Lignin für die Stabilität des Lebensmittels. In pflanzlichen Lebensmitteln können mehrere hundert Polyphenole identifiziert werden die antioxidativ wirksam sind wobei ihre Wirksamkeit von der Anzahl der OH-Gruppen und vom pH-Wert abhängig ist.

Zu den wichtigsten natürlichen Antioxidantien zählen Tocopherole, Flavonoide und deren chemischen Verwandte, Cumarin und Hydroxyzimtsäuren. Des weiteren kann man antioxidative Wirksamkeit bei Ascorbinsäure (ab höheren Konzentrationen), Carotinoiden und vielen anderen Inhaltsstoffen von Obst, Gemüse und Cerealien nachweisen, es soll im Rahmen dieser Arbeit aber nur auf die beiden relevanten Stoffgruppen eingegangen werden.

### a) Flavonoide [5, 6]

In den letzten Jahren wurden vermehrt Flavonoide hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität und den damit verbundenen positiven Einfluss auf chronische Herzerkrankungen untersucht. Neben Obst und Gemüse stellen schwarzer Tee und Rotwein die

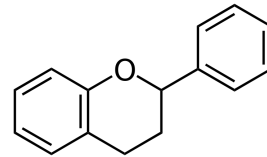


Abbildung 1.6 Flavan

Hauptlieferanten für Flavonole dar [7]. Das Grundgerüst der Flavonoide bildet dabei das Flavan (2-Phenyl-chroman, siehe Abbildung 1.6), dessen polyphenolische Struktur gewisse chemische Eigenschaften wie etwa Funktion als Reduktionsmittel, H-Donator und Komplexmierungsmittel aufweist. In der Natur kommen Flavonoide meist als Glykosid vor, weiters lassen sie sich in Untergruppen einteilen, wobei die jeweiligen Unterschiede in der Anzahl und Position der Hydroxylgruppen sowie den Glykolisierungs- und Alkylierungszustand liegen. Eine Einteilung aufgrund der verschiedenen Oxidationsstufen am heterozyklischen Ring lässt 6 Hauptgruppen zu:

1. Flavanone (z.B. Hesperetin)
2. Flavone (z.B. Apigenin)
3. Flavonole (z.B. Quercetin)
4. Flavanole (z.B. Catechin)
5. Anthocyanidine (z.B. Cyanidin)
6. Isoflavonone (z.B. Genistein)



### b) Proanthocyanidine [1, 8]

Bei Proanthocyanidinen (siehe Abbildung 1.7) handelt es sich um Polymerisationsprodukte der Catechine (Flavan-3-ole), wobei vorwiegend aus den Bausteinen (+)-Catechin und (-)-Epicatechin Dimere und Trimere gebildet werden. Sie kommen hauptsächlich in Traubenkernen, Traubenschalen, Nüssen, Samen, Früchten und Baumrinden vor wobei sie den Pflanzen Schutz vor UV-Strahlung und anderen negativen Umwelteinflüssen wie etwa Prädatoren bieten. Proanthocyanidine weisen neben der ausgeprägten antioxidativen Wirksamkeit antikarzinogene, antiallergische, antibakterielle, immunstärkende und antivirale Eigenschaften auf.

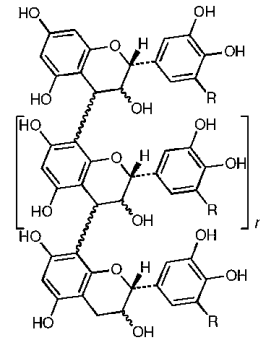


Abbildung 1.7  
Proanthocyanidin  
(Oligomer)

### c) Resveratrol [9-11]

Bei Resveratrol (trans-3,5,4'-Trihydroxystilben, siehe Abbildung 1.8) handelt es sich um ein antioxidativ wirksames Polyphenol das zur Gruppe der Phytoalexine gehört. Diese Stoffgruppe wird von Pflanzen produziert welche von Mikroorganismen (Bakterien oder Pilzen) infiziert wurden um deren Vermehrung und Ausbreitung zu verhindern. Erstmals 1963 im japanischen Staudenknöterich nachgewiesen findet sich Resveratrol in einer großen Anzahl von Pflanzen wie etwa Weintrauben, Himbeeren, Erdnüssen und vielen anderen. Bei Weintrauben findet sich Resveratrol hauptsächlich in den Schalen, wodurch in Rotwein ein erhöhter Resveratrolgehalt im Vergleich zu Weißwein nachgewiesen werden kann, da Rotwein mit den Schalen vergoren wird.

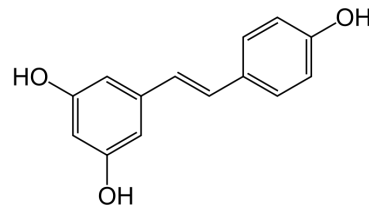


Abbildung 1.8 Resveratrol

## 1.3. Verwendung von Weintrester

### 1.3.1 Stoffflüsse bei der Weinherstellung und Verwendung von Abfallprodukten [12]

Bei der Weinherstellung fallen im Laufe des Herstellungsprozesses eine Vielzahl an Reststoffen an die auf verschiedenste Weise genutzt werden können. Der geschätzte Anteil an Reststoffen, beträgt in etwa 20-30% [13]. In Abbildung 1.9 sind die Stoffflüsse sowie Nebenprodukte der Weinherstellung dargestellt.



Abbildung 1.9 Stoffflüsse bei der Weinproduktion

In den meisten Weinbaugebieten wird der anfallende Traubentrester größtenteils landbaulich entsorgt, dies ist sehr aufwendig und mit hohen Kosten verbunden. Nicht außer Acht zu lassen sind die damit verbundenen Risiken wie Geruchsbelästigung, Entstehung von Mykotoxinen oder Schwarzfäule.

In Abbildung 1.10 sind die Nebenprodukte der Weinherstellung dargestellt.

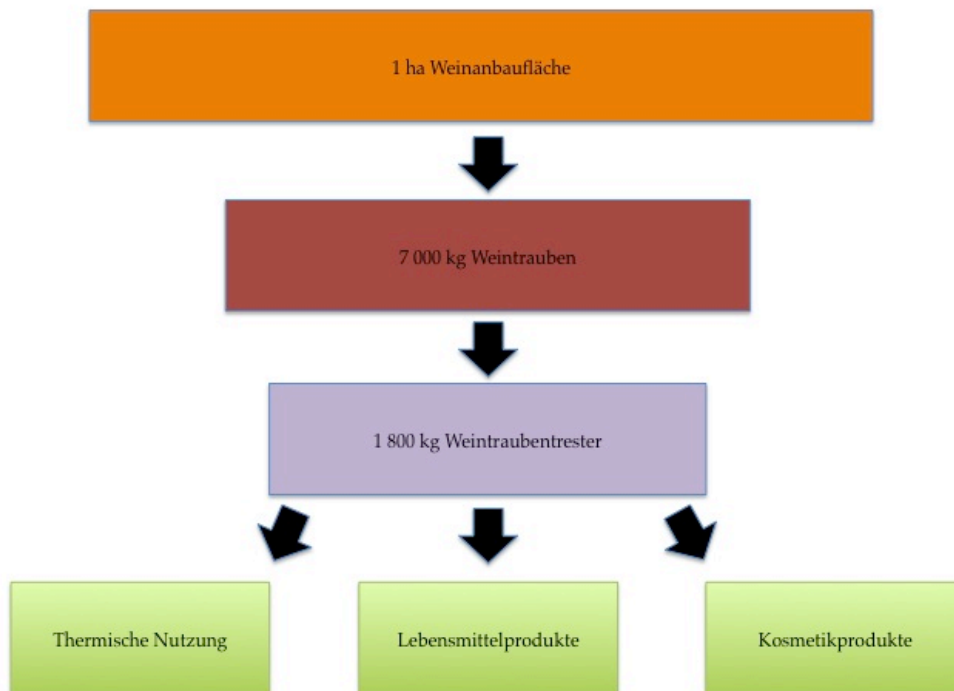


Abbildung 1.10 Nebenprodukte der Weinherstellung

Aus der Abbildung 1.10 werden die Stoffmengengerüche bei der Weinherstellung ersichtlich. Pro Hektar Weinanbaufläche fallen ca. 1800 kg Weintrester an, der verschiedenen Verwendungszwecken zugeführt werden kann. Hauptverwendungszwecke sind die Verwendung als Düngemittel und Heizpellets.

Die Weinanbaufläche in Österreich betrug im Jahre 2009 45 533ha, wobei die Weißweinfläche im Vergleich zu 1999 um 27,5% auf 29 820ha abgenommen hat. Im Vergleich dazu stieg die Rotweinfläche seit 1999 um 27,2% auf 15 713ha an.

Somit sind in Österreich 2009 rund 82 000t Weintrester angefallen (in Deutschland beträgt die Menge im Vergleich dazu rund 265 000t).

### 1.3.2 Thermische Nutzung von Traubentrester [14]

Durch den hohen Ligninanteil im Traubentrester ist neben der Entsorgung auch eine thermische Nutzung sinnvoll. Diese Verwertungsmethode soll nun etwas genauer erörtert werden. In Tabelle 1.1 sind die Verbrennungsparameter von Tresterpellets und Fichtenholz aufgelistet.

Parameter	Einheit	Tresterpellets	Fichtenholz
Rohdichte	kg/m <sup>3</sup>	1240	-
Schüttgewicht	kg/m <sup>3</sup>	675	-
Wassergehalt	Gew. %	12,9	15
Heizwert (pro kg TS)	MJ/kg	20,8	18,8
	kWh/kg	5,8	5,2
Brennwert	MJ/kg	21,8	19,6
	kWh/kg	6	5,4
Aschegehalt	Gew. %	3,47	0,6
Ascheschmelzpunkt	°C	-	-
Kohlenstoff	Gew. %	53,6	49,8
Wasserstoff	Gew. %	6,43	6,3
Sauerstoff	Gew. %	38	43,2
Stickstoff	Gew. %	1,89	0,13
Schwefel	Gew. %	0,12	0,015
Chlor	Gew. %	0,0038	0,005

Tabelle 1.1 Vergleich der Verbrennungsparameter von Tresterpellets und Fichtenholz

Durch den relativ hohen Wassergehalt von Weintrester ist eine sorgfältige Trocknung erforderlich, da sonst die feuchte Masse bei Lagerung sehr schnell zu faulen beginnt.

Betrachtet man die Auswirkungen auf die Verbrennungseigenschaften bezüglich den Forderungen der DIN Plus Norm kann von folgenden Eigenschaften ausgegangen werden:

- Der Wassergehalt überschreitet minimal die Anforderungen der Norm
- Der Aschegehalt wird deutlich überschritten, dies könnte in für Holzbrennstoffe ausgelegten Feuerungsanlagen zu Problemen führen
- Durch hohen Kohlenstoff- und niedrigen Sauerstoffgehalt ist der Heizwert sehr hoch
- Im Vergleich zu Holz ist mit höheren NO<sub>x</sub> und SO<sub>x</sub> Emissionen zu rechnen
- Der niedrige Chlorgehalt lässt keine Probleme bezüglich Kesselkorrosion, HCl- Emission oder Dioxinbildung erwarten
- Den Feinstaubgehalt im Rauchgas betreffend liegen keine näheren Erfahrungen vor.

### **1.3.3 Lebensmittelprodukte aus Traubentrester**

Eine weit verbreitete Nutzung von Traubentrester der Weinherstellung liegt in der Herstellung von Destillaten, dem sogenannten Tresterbrand. Je nach Herstellungsland werden diese Produkte unter verschiedenen Namen wie etwa Grappa aus Italien oder Marc aus Frankreich vertrieben.[15]

In den letzten Jahren ist das Interesse an funktionellen Lebensmitteln aus natürlichen Rohstoffen deutlich gestiegen wobei vor allem polyphenolische Substanzen aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkung im Vordergrund stehen. Durch ihre ausgeprägte antioxidative Wirksamkeit können Extrakte aus Weintraubentrester in verschiedenen Einsatzbereichen wie etwa in der Lebensmittel- oder Kosmetikindustrie verwendet werden. Als Nahrungsergänzungsmittel bieten Extrakte aus Weintraubenkernen und Weintraubentrestern eine interessante Alternative zur thermischen Nutzung von Traubentrester mit funktioneller ernährungsphysiologischer Bedeutung.[16]

In einer vom Land Steiermark 2001 in Auftrag gegebener Studie wurde die Wertstoffgenerierung aus dem Abfallprodukt Traubentrester vor allem hinsichtlich der Gewinnung von Traubenkernöl untersucht, welches durch seine ungesättigten Fettsäuren (vor allem Linolsäure) ernährungsphysiologisch besonders wertvoll ist. Nach anfänglicher Gewinnung von Traubenkernöl durch Kalt- oder Warmpressung wurde der verbliebene Trester einer weiteren Extraktion unterzogen in der die Proanthocyanidine extrahiert wurden. Die Ergebnisse der Studie zeigen dass eine kaskadische Nutzung des Abfallproduktes Traubentrester zur Gewinnung ernährungsphysiologisch funktioneller Lebensmittel durchaus ökonomisch als auch ökologisch sinnvoll ist.[17]

Da der anfallende Weintraubentrester reich an Anthocyanen ist, besteht die Möglichkeit diese mittels Lösungsmittel zu extrahieren und als natürlichen Farbstoff in der Lebensmittelindustrie einzusetzen.[13]

Eine weitere interessante Möglichkeit zur Verwertung von Traubentrester stellt die Aromastoffgewinnung mittels Feststoffextraktion dar. In den ausgepressten Beerenhülsen der Weintrauben befinden sich Riechstoffe im ppm-Bereich, vor allem Alkohole, Säuren und Aldehyde.[18]

### **1.3.4 Kosmetikprodukte aus Traubentrester**

Eine weitere Verwertungsmöglichkeit den anfallenden Weintrester zu bietet die Verwendung als antioxidativer Zusatzstoff bei Hautcremen. Es konnte gezeigt werden dass durch mehrmonatige Anwendung der mit natürlichen Polyphenolen angereicherten Creme eine Verbesserung von atrophischer Haut eintrat.[19]

## 1.4. Literaturübersicht

Im folgenden Abschnitt wird eine Übersicht der für diese Arbeit thematisch relevanten Literatur gegeben.

### 1.4.1 "Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts"[20]

Es wurden verschiedene landwirtschaftliche Nebenprodukte auf deren Gehalt an Polyphenolen und Flavonoiden untersucht. Dabei wurde ein etwas höherer Polyphenolgehalt bei rotem Traubentrester als bei weissem Traubenmaterial festgestellt. Bezüglich des Flavonoidgehaltes kam die Untersuchung zu dem gleichen Ergebnis.

Ein Vergleich verschiedener Weinherstellungsnebenprodukte zeigte dass der höchste Polyphenol- und Flavonoidgehalt in den Traubenkernen zu finden ist.

Probe	GP [mg GAE/100g TG]	Fl [mg CTE/100g TG]
Weißer Traubentrester	4826	3522
Roter Traubentrester	5402	5289

Tabelle 1.2 Gesamtpolyphenol- (GP) und Flavonoidgehalt (Fl)

### 1.4.2 "Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines"[21]

In dieser Untersuchung wurde erneut verifiziert dass Rotweine einen höheren Gehalt an Polyphenolen und eine höhere antioxidative Aktivität aufweisen als Weiß- oder Roséweine, wobei zwischen verschiedenen Sorten ebenfalls ein Unterschied besteht.

Es wird vermutet, dass die antioxidative Aktivität in Zusammenhang mit dem Gesamtpolyphenolgehalt, Flavonoid- und Flavonolgehalt steht. Die Anthocyanidine spielen dabei eine untergeordnete Rolle.

Probe	GP [mg GAE/l]	Fl [mg CTE/l]
Weißwein	189-495	31-242
Rotwein	1402-3130	396-1596

Tabelle 1.3 Gesamtpolyphenol- (GP) und Flavonoidgehalt (Fl)

### 1.4.3 "Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa, and Wine"[22]

Die Literatur gibt einen Überblick über den Polyphenolgehalt in Tee, Kakao und Wein, wobei besonders die gesundheitlich positiven Effekte dieser drei Komponenten besprochen werden. Laut Studie sind diese vor allem auf die Flavonoide zurück zu führen.

#### 1.4.4 "A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines"[23]

In dieser Studie wurden 86 Weine aus der Slowakei und Österreich auf deren antioxidative Wirkung und Polyphenolgehalt untersucht. Dabei wurde sowohl eine 10fach höhere antioxidative Aktivität bei Rotweinen als bei Weißweinen festgestellt, als auch ein linearer Zusammenhang zwischen Antioxidationsaktivität und Phenolgehalt. Zwischen den slowakischen und österreichischen Weinen konnte kein großer Unterschied festgestellt werden.

Probe	GP [mg GAE/l]	TEAC [mmol/l]
Weißwein	≈270	≈0,86
Rotwein	≈2450	≈11,91

Tabelle 1.4 Gesamtpolyphenolgehalt (GP) und TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Coefficient) von Rot- und Weißwein

#### 1.4.5 "Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability"[24]

Die geschätzte französische Weinkonsumtion beträgt ca. 180ml pro Tag und pro Kopf. Es wurde untersucht welche Menge an Polyphenolen und dazugehörigen Substanzen von den Franzosen täglich eingenommen wird. Dazu wurden die typischen Landweinsorten des Languedoc (z.B. Merlot, Grenache, Syrah) herangezogen.

Im Vergleich zu Weißwein (Chardonnay mit 245 mg GAE l<sup>-1</sup>) weisen die Rotweinsorten einen erheblich höheren Gehalt an Polyphenolen auf (1847–2600 mg GAE/l).

#### 1.4.6 "The study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine"[25]

In dieser spanischen Studie wurden 5 kommerziell erhältliche Rotweine auf deren Gehalt an phenolischen Komponenten untersucht. Dabei wurde anhand der Folin- Ciocalteu Methode ein Polyphenolgehalt von 1800–2300 mg GAE/l festgestellt.

Es wird ein linearer Zusammenhang zwischen den Gesamtpolyphenolen und der antioxidativen Aktivität vermutet.

#### 1.4.7 "Toward the Fingerprinting of Wines: Cultivar-Related Patterns of Polyphenolic Constituents in Ontario Wines"[26]

Es wurden 15 verschiedene Polyphenole gaschromatographisch in kanadischem Wein bestimmt und untereinander verglichen. Dabei konnte festgestellt werden dass der Gehalt an manchen Polyphenolen (z.B. Kaffeesäure) bei Rot- und Weißwein gleich ist. Bei anderen Polyphenolen hingegen konnte ein Unterschied zwischen Rot- und Weißwein festgestellt werden.

Bei Weißwein wurde verglichen mit Rotwein ein extrem niedriger Gehalt an Quercetin festgestellt. Das ist auf die Vergärung ohne Traubenschale zurückzuführen, da sich darin der größte Anteil an Quercetin befindet.

#### 1.4.8 "Tocopherol contents of some Turkish wine by-products"[27]

Es wurde der Tocopherolgehalt von verschiedenen Nebenprodukten der Weinerzeugung anhand einer HPLC bestimmt. Dabei wurde festgestellt dass der Gesamttocopherolgehalt von der jeweiligen Extraktionsmethode (Heiß- bzw. Kaltextraktion) abhängig ist. Für die Isolierung von Tocopherolen aus den Kernen ist die Kaltextraktion besser geeignet, bei der Extraktion von Stängel und Haut liefert die Heißeextraktionsmethode eine höhere Ausbeute. Für die Extraktion von Trester sind beide Methoden gleich gut geeignet.

#### 1.4.9 "Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits"[28]

In dieser Studie wurde der Einfluss von täglichem Alkoholkonsum auf die Mortalität untersucht. Dazu wurde die Mortalität über einen Zeitraum von zehn Jahren dem Alkoholkonsum gegenübergestellt, wobei Menschen ohne Alkoholkonsum die relative Mortalitätsrate 1 zugeordnet wurde. Dabei stellte sich heraus dass der tägliche, moderate (1-5 Gläser pro Tag) Konsum von Wein die Mortalitätsrate um die Hälfte senken konnte. Der Genuss von Bier führte ebenso zu einer verminderten Mortalitätsrate, wobei hingegen der moderate Genuss von hochprozentigem Alkohol zu einer erhöhten Sterberate führte. Die gesundheitspositive Wirkung von Wein wurde dabei den Antioxidantien und Flavonoiden zugeordnet.

#### 1.4.10 "Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content"[29]

Anhand der Folin-Ciocalteu-Methode wurde der Gesamtpolyphenolgehalt von Trester verschiedener Weinsorten bestimmt, dieser wurde dann mit der jeweiligen antioxidativen Aktivität, bestimmt durch die ABTS-Methode verglichen. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen dem Gesamtpolyphenolgehalt und der antioxidativen Aktivität festgestellt werden, diese einer spezifischen Substanz zuzuordnen war nicht möglich.

Weinsorte	Polyphenolgehalt GAE/100 [mg/l]
Syrah	46
Tempranillo	40
Cabernet Sauvignon	18
Moscatel	20
Palomino Fino	19

Tabelle 1.5 Gesamtpolyphenole verschiedener Trestersorten



Weinsorte	TE[mM]
Syrah	50
Tempranillo	49
Cabernet Sauvignon	22
Moscatel	24
Palomino Fino	23

Tabelle 1.6 Troloxäquivalente verschiedener Trestersorten

#### 1.4.11 "Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts"[30]

Anhand der Folin-Ciocalteu-Methode wurden die Gesamtpolyphenole von Weintrester, Schalen und Kernen bestimmt und anschließend der antioxidativen Aktivität gegenübergestellt, welche anhand der  $\beta$ -Carotin Bleaching Methode bestimmt wurde. Bei der Analyse der Polyphenole wurde auch der Gehalt an Gesamtflavonoiden und Anthocyanen photometrisch bestimmt. Dabei wurde festgestellt dass die Kerne durch ihren hohen Proanthocyanidingehalt einen sehr großen Teil zur antioxidativen Aktivität beitragen.

Sorte	Gesamtphenole GAE [g/100g TM]	Flavonoide CE [g/100g TM]	Proantho- cyanidine CyE [g/100g TM]
Negro Amaro	4,19±0,04	3,94±0,08	1,29±0,16

Tab. 1.7 Gesamtpolyphenol-, Flavonoid- und Proanthocyanidingehalt von Negro Amaro

#### 1.4.12 "Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars"[31]

In dieser italienischen Studie wurden verschiedene sizilianische Rotweinsortentrester auf deren antioxidative Aktivität und chemische Inhaltsstoffe untersucht, wobei das Hauptaugenmerk bei den verschiedenen Polyphenolen lag. Bei allen Sorten konnte eine hohe antioxidative Aktivität festgestellt werden, wobei eine Korrelation zwischen dieser und dem Anthocyanin bzw. Flavonolgehalt nicht nachgewiesen werden konnte. Es dürften also auch noch andere polyphenolische Inhaltsstoffe für die antioxidative Aktivität verantwortlich sein.

Sorte	DPPH IC <sub>50</sub> [µg/ml]	TEAC [TE]
Nero d'Avola	38,93±0,24	1,58±0,01
Nerello Mascalese	14,45±0,13	2,24±0,05
Nerello Cappucio	23,99±1,8	1,66±0,03
Frappato	15,90±0,89	1,59±0,02
Cabernet Sauvignon	34,20±1,18	2,21±0,04

Tabelle 1.8 IC50 und Troloxäquivalente verschiedener Trestersorten

Sorte	Totalanthocyane [mg/g]	Totalflavonole [mg/g]	Totalpolyphenole [mg/g]
Nero d'Avola	28,7	4,64	33,33
Nerello Mascalese	9,10	3,26	12,36
Nerello Cappucio	45,27	4,06	49,33
Frappato	3,75	3,16	6,91
Cabernet Sauvignon	9,61	1,04	10,65

Tabelle 1.9 Gesamtanthocyane, -flavonole und -polyphenole verschiedener Trestersorten

# Kapitel 2

## Problemstellung

Bei der Weinproduktion fällt ein großer Teil an Nebenprodukten an, dessen weitere Wertschöpfung sich bisher auf wenige industrielle Prozesse wie etwa der thermischen Verwertung oder der Herstellung von Tresterbrand beschränkt. Der anfallende Weintrester (pro Hektar Weinanbaufläche fallen durchschnittlich 1800 Kilogramm Weintrester an) ist reich an antioxidativ wirksamen Polyphenolen und bietet dadurch alternative Verwertungsmethoden wie etwa die Herstellung von antioxidativ wirksamen Nahrungsergänzungsmitteln oder Kosmetikartikeln.

Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung der polyphenolischen Inhaltsstoffe und der Bestimmung der antioxidativen Aktivität verschiedener österreichischer Weintrester, sowohl von Rotwein- als auch von Weissweintrester. Bei den Bestimmungen der Inhaltsstoffe und der antioxidativen Aktivität handelte es sich um photometrische Analysen die anhand einer Kalibriergerade ausgewertet werden sollten. Für die Bestimmung der Gesamtpolyphenole wurde die in der Literatur weit verbreitete Methode nach Folin-Ciocalteu ausgewählt.

Außer den Gesamtpolyphenolen sollten noch die Proanthocyanidine, Catechine und Flavonoide bestimmt werden. Die Bestimmung der Proanthocyanidine erfolgte anhand einer modifizierten Butanol-HCl Methode, die Catechine wurden anhand der DAC Methode bestimmt, die Flavonoide konnten anhand der modifizierten  $\text{AlCl}_3$  - Methode quantifiziert werden.

Um besseren Einblick in den komplexen Mechanismus der antioxidativen Aktivität zu erhalten wurden für deren Bestimmung zwei gängige Analysen ausgewählt: einerseits die DPPH - Methode, welche die antioxidative Aktivität vor allem im Initiationsschritt anspricht, andererseits die  $\beta$ -Carotin Bleaching Methode, welche die antioxidative Aktivität bezüglich der Propagation der Autoxidation beschreibt. Weiters sollten die erhaltenen Werte der antioxidativen Aktivität mit handelsüblichen Antioxidationsmitteln verglichen und andere alternative Verwertungsmöglichkeiten recherchiert werden.

# Kapitel 3

## Material

In diesem Kapitel werden die Proben und Arbeitschemikalien aufgezählt.

### 3.1. Weintraubentrester

Die frischen Weintraubentrester wurden aus dem Burgenland bezogen, wobei die Trester der Sorte Uhdler aus dem südlichen Burgenland stammen, die Sorten Blaufränkisch, Chardonnay, Welschriesling und Zweigelt aus der Region Neusiedlersee.

<b>Rotweintrester</b>	<b>Weißweintrester</b>
Blaufränkisch 08	Chardonnay 08
Uhdler Rot 07	Uhdler Weiss 08
Uhdler Rot 08	Welschriesling 08
Zweigelt 08	

Tabelle 3.1 Für die Analyse erhaltene Tresterproben

### 3.2. Chemikalien

#### Lösungsmittel

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
Ethanol	Merck
Methanol	Merck

### Vergleichssubstanzen

Chemikalie	Firma
$\alpha$ -Tocopherol	Merck
Ascorbylpalmitat	Serva
Butylhydroxyanisol	Fluka
Butylhydroxytoluol	Fluka
Trolox	Sigma-Aldrich

### Gesamtpolyphenolbestimmung

Chemikalie	Firma
Folin-Ciocalteu	Merck
Gallussäure	Sigma-Aldrich
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck

### Catechinbestimmung

Chemikalie	Firma
p-Dimethylaminozimtaldehyd	Merck
Catechin	Sigma-Aldrich

### Flavonoidbestimmung

Chemikalie	Firma
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck
Quercetin	Merck
$\text{NaNO}_2$	Sigma-Aldrich
$\text{NaOH}$	Sigma-Aldrich

### Proanthocyanidine

Chemikalie	Firma
$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{HCl}$	Sigma-Aldrich
Cyanidinchlorid	Merck
n-Butanol	Sigma-Aldrich

### Antioxidative Aktivität mittels DPPH

Chemikalie	Firma
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck

### Antioxidative Aktivität mittels $\beta$ -Carotin Bleaching

Chemikalie	Firma
$\beta$ -Carotin	Sigma-Aldrich
Linolsäure	Merck
Tween 20/40	Merck

Tabelle 3.2 Für die Analysen verwendete Chemikalien

# Kapitel 4

## Methodik

Kapitel 3 beschäftigt sich mit den angewendeten Analysemethoden dieser wissenschaftlichen Arbeit.

### 4.1. Aufarbeitung des Probenmaterials

#### 4.1.1 Probenvorbereitung

Die verschiedenen Trester wurden in gefrorenem Zustand angeliefert und mussten vor der Weiterbehandlung zerkleinert und getrocknet werden, da selbst kleine Wassermengen die Analysenergebnisse beeinflussen können.

- Durchführung

Es wurden jeweils 200g der gefrorenen Trester in der Kaffeemühle so fein wie möglich zerkleinert und anschließend 2 Tage im Trockenschrank bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

#### 4.1.2 Extraktion

30g der trockenen Proben wurden in Erlenmeyerkolben überführt und bei 60°C mit der 10-fachen Menge an Extraktionsmittel (Ethanol/Wasser Gemisch (70/30)) im Schüttelbad über Nacht extrahiert. Nachdem am Rotavapor bis zur Trockene eingedampft wurde konnte der entstandene Rückstand in Methanol aufgenommen werden.

## 4.2. Analyse der Extrakte

### 4.2.1 Quantitative Bestimmung der Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu [32, 33]

Bei dieser Bestimmungsmethode werden die phenolischen Hydroxylgruppen im leicht alkalischen Milieu durch das Folin-Ciocalteu Reagenz (eine Mischung aus Phosphomolybdat und Phosphowolframat) unter Bildung eines blauen Farbkomplexes oxidiert. Durch Messung der Absorption bei 750nm und Erstellung einer Kalibrationskurve mit Gallussäure kann anschließend der Gehalt an Gesamtphenolen in % (w/w) Gallussäure (GAE, gallic acid equivalent) bestimmt werden.

Ein sehr wichtiger Punkt bei dieser Bestimmungsmethode ist die genaue Einhaltung der vorgegebenen Chemikalienmengen und der Reaktionszeiten, kleine Abweichungen davon können das Ergebnis erheblich beeinflussen.

- Durchführung

7ml destilliertes Wasser werden in einer graduierten 10ml Epruvette vorgelegt. Anschließend werden 0,5ml der Probe (methanolische Lösung) und 0,5ml Folin-Ciocalteu-Reagenz dazu pipettiert und vermischt. Nach 3 Minuten wird 1ml einer gesättigten  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  Lösung zugegeben und auf 10ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wird abermals vermischt. Die Extinktion bei 750nm wird gegen destilliertes Wasser nach genau 60 Minuten gemessen. Die Probenkonzentration ist so zu wählen, dass die gemessene Extinktion im Bereich 0,2-0,8 liegt.

### 4.2.2 Quantitative Bestimmung der Proanthocyanidine mit modifizierter Butanol-HCL Methode [34, 35]

Der Nachweis von Proanthocyanidinen beruht auf deren Hydrolyse zu Anthocyanidinen in *n*-BuOH/HCl (95:5 v/v), wobei gezeigt werden konnte dass es sich bei diesem Vorgang um eine Autoxidation handelt. Die Ausbeute an Anthocyanidinen ist maßgeblich durch Verunreinigungen mit Metallionen beeinflusst. Reproduzierbare Ergebnisse werden durch Beimischen von Eisen (III) Salzen zur Reaktionsmischung erhalten.

- Durchführung

0,25ml des methanolischen Extraktes werden in einer verschließbaren Epruvette zu 3ml einer 95%igen Lösung aus *n*-Butanol/HCl (95:5 v/v) hinzugefügt. Anschließend werden 0,1 ml einer Lösung aus  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  in 2 M HCl hinzugefügt.

Die Eprouvetten werden bei 95°C für 40 Minuten inkubiert, wobei sich die Proben rot verfärben. Anschließend wird die Extinktion bei 550nm gemessen und der Proanthocyanidingehalt anhand einer mit Cyanidinchlorid erstellten Regressionsgerade bestimmt. Der Proanthocyanidingehalt wird in mg Cyanidinchlorid/g Trockengewicht der Probe ausgedrückt.

#### **4.2.3 Quantitative Bestimmung der Catechine anhand der DAC Methode [36, 37]**

Catechine reagieren im stark sauren Milieu mit DAC (p-Dimethylaminozimtaldehyd) in einer Kondensationsreaktion zu einem roten Farbstoff, welcher photometrisch gemessen werden kann.

- Durchführung

0,5ml der methanolische Probelösung werden in einer Küvette vorgelegt, in diese werden anschließend 2,5ml DAC-Reagenz pipettiert. Nach 10 Minuten wird die Extinktion bei 640nm gemessen und der Catechingehalt anhand einer zuvor mit (+)-Catechin erstellten Regressionsgerade bestimmt.

#### **4.2.4 Quantitative Bestimmung der Flavonoide anhand der modifizierten AlCl<sub>3</sub> - Methode [38]**

Die Grundlage dieser Bestimmungsmethode liegt in einer Komplexbildungsreaktion der Flavonoide mit AlCl<sub>3</sub>, der gebildete Farbkomplex kann photometrisch bestimmt werden.

- Durchführung

In einer Eprouvette werden 1,5ml der methanolischen Probelösung mit 1,5ml 2%iger, methanolischer AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O-Lösung vermischt und die Absorbance bei 367,5nm nach 10Minuten gemessen. Die Berechnung des Flavonoidgehaltes erfolgt mit einer Regressionsgerade die mit Quercetin erstellt wird. Der Flavonoidgehalt wird in mg Quercetin/g Trockengewicht der Probe angegeben.

#### **4.2.5 Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH-Methode [33]**

Es existieren viele verschiedene Möglichkeiten die Lipidoxidation zu bestimmen, in den letzten Jahren jedoch hat sich die DPPH-Methode als universellste und gebräuchlichste Methode erwiesen. Sie beschreibt im Wesentlichen die Fähigkeit der Probe freie Radikale abzufangen. Als freies Radikal wird DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), eine sehr farbintensive Verbindung die bei 515nm ihr Absorptionsmaximum hat, in methanolischer Lösung vorgelegt und die Abnahme der Farbintensität im Laufe der Zeit photometrisch beobachtet.



Das freie Radikal verliert durch Reaktion mit einem Antioxidans seinen radikalischen Charakter, dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu niedrigerer Wellenlänge, daher nimmt die Absorption bei der ursprünglich gemessenen Wellenlänge ab.

Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit die Fähigkeit der Probe als Radikalfänger abzuschätzen, da hier in den Initiationschritt der Oxidation eingegriffen wird. Dadurch kann in weiterer Folge eine Kettenreaktion verhindert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Mesomerstabilisierung der entstandenen Probenradikale. Sind diese reaktionsträger als das freie DPPH-Radikal kann eine Rückreaktion ausgeschlossen werden und es kommt zur Abnahme von DPPH-Radikalen. Desto mehr DPPH-Radikale von der Probe abgefangen werden können, desto höher ist ihr antioxidatives Potential.



In Abbildung 4.1 ist die Farbabhängigkeit von DPPH bezogen auf die Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes dargestellt.

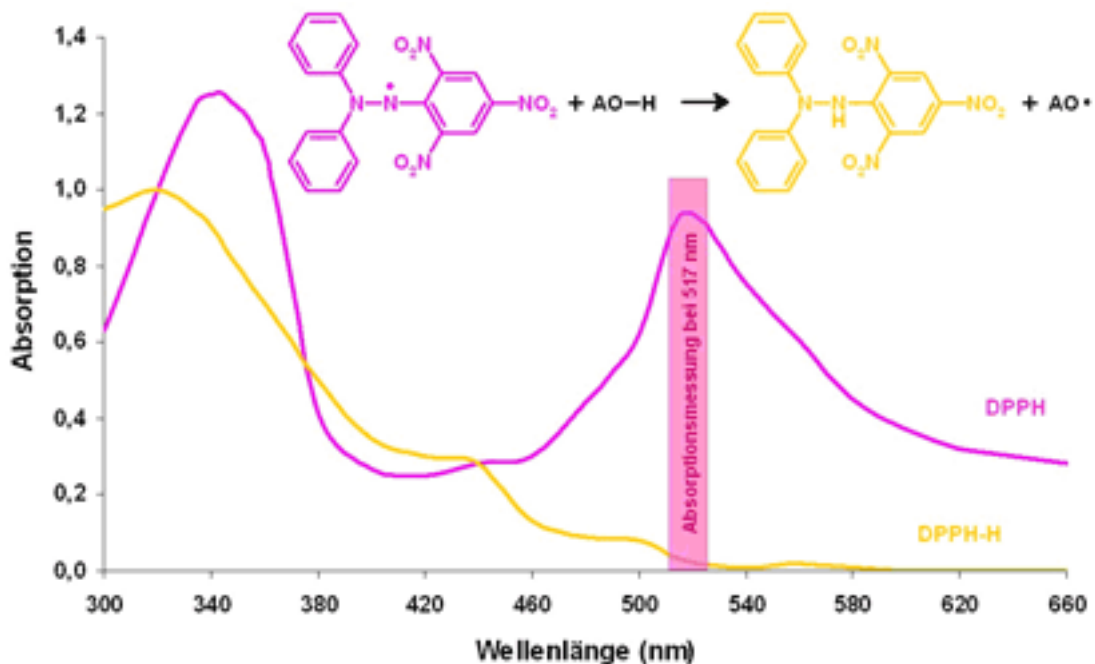


Abbildung 4.1 Farbabhängigkeit von DPPH bezogen auf die Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes

Weiters kann eine Unterscheidung von drei verschiedenen Antioxidationsklassen gemacht werden, je nach der Geschwindigkeit mit der das freie Radikal abgefangen wird.

Schnelle Radikalfänger erreichen innerhalb einer Minute das Reaktionsgleichgewicht. Im Vergleich dazu benötigen die mittelschnellen

Radikalfänger bis zu 30 Minuten und die langsamen Radikalfänger bis zu sechs Stunden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen gehören alle zur Klasse der langsamen Radikalfänger, daher wurde auch eine Reaktionszeit von einer Stunde gewählt. Diese Reaktionszeit hat sich in der Literatur bei verschiedensten Substanzen als geeignete Reaktionszeit erwiesen.

- Durchführung

Zuerst werden für die DPPH-Stammlösung 25,6mg (= 65 $\mu$ mol) DPPH in 100ml Methanol gelöst. Für die Bestimmungen werden die benötigten DPPH-Lösungen durch 1:10 Verdünnen (= 6,5 $\cdot 10^{-5}$  molar) stets frisch hergestellt, da sie nicht über einen längeren Zeitraum stabil sind.

Für die Bestimmung selbst werden je nach gewünschter Konzentration 50-300 $\mu$ l der Probe in einer Küvette vorgelegt und mit Methanol auf 300 $\mu$ l aufgefüllt. Zu dieser Lösung werden 2,7ml der DPPH Lösung gegeben (daraus ergibt sich eine DPPH-Anfangskonzentration von 5,85 $\cdot 10^{-5}$  mol/l) und vermischt. Nach der DPPH-Zugabe wird möglichst rasch die Extinktion bei 515nm gegen Methanol gemessen und die Lösung 1h stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird abermals gemessen. Aus den Ergebnissen dieser Messungen lässt sich der IC<sub>50</sub> Wert berechnen. Dies ist jene effektive Probenkonzentration in g/g DPPH, bei der 50% der ursprünglich vorhandenen DPPH Konzentration verbraucht worden sind.

#### **4.2.6 Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels $\beta$ -Carotin Bleaching [39-41]**

Im Gegensatz zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH-Test, bei der die Fähigkeit der Probe als Antioxidans in den Initiationsschritt der oxidativen Kettenreaktion einzugreifen untersucht wird, bietet die Methode des  $\beta$ -Carotin Bleachings eine Möglichkeit die Rolle der Probe als Antioxidans im Propagationsschritt der Kettenreaktion abzuschätzen.

Bei dieser Bestimmungsmethode wird Linolsäure und  $\beta$ -Carotin in einem oxygenierten wässrigem Milieu vorgelegt, in weiterer Folge entstehen Abbauprodukte der Linolsäure. Diese bauen das  $\beta$ -Carotin ab, wodurch eine Entfärbung stattfindet. Diese kann mittels Photometer beim Extinktionsmaximum von  $\beta$ -Carotin (468nm) aufgezeichnet und in weiterer Folge für die Berechnung der antioxidativen Aktivität herangezogen werden.

Damit die Reaktion schnell und vollständig ablaufen kann wird die Reaktion im Wasserbad bei 50°C durchgeführt.

Ein weiterer Punkt der die antioxidativen Eigenschaften der Probe beeinflusst ist deren lipophile Eigenschaft (Öl in Wasser Emulsion).

- Durchführung

Für die Herstellung des oxygenierten, destillierten Wassers wird 30 Minuten lang reiner Sauerstoff über eine Glasfritte in destilliertes Wasser eingeblasen. Das oxygenierte Wasser sollte wenn möglich sofort nach der Herstellung verwendet werden. Für die Herstellung der Emulsion wird zuerst etwas Chloroform in einem Rundkolben vorgelegt, anschließend werden 1mg b-Carotin, 200mg Linolsäure und 2g Tween 40 in den Rundkolben überführt und vermischt.

Das Lösungsmittel wird abgezogen und 500ml oxygeniertes, destilliertes Wasser werden hinzugefügt. Durch starkes Schütteln wird die Emulsion gebildet. Von dieser Emulsion werden 5ml zu 0,2ml Probelösung pipettiert, wobei die Probelösung aus 10mg Probe in 10ml destilliertem Wasser besteht. Somit ergibt sich eine Probenmenge für die Messung von 0,2mg.

Zur Kontrolle wird anstatt Probelösung 0,2ml destilliertes Wasser verwendet. Des Weiteren wird eine Emulsion ohne b-Carotin hergestellt, diese fungiert als Blindwert bei den Messungen. Die Extinktionsmessungen werden bei 470nm durchgeführt, wobei unmittelbar nach dem Mischen von Emulsion und Probelösung mit der Messung begonnen wird. Nach der ersten Messung werden die Proben bei 50°C aufbewahrt und nach 120 Minuten wird eine weitere Messung durchgeführt.

# Kapitel 5

## Ergebnisse

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der durchgeführten Analysen präsentiert und grafisch dargestellt.

### 5.1. Statistik

Bei den photometrischen Messungen wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung bestimmt, diese ist bei den jeweiligen Analysen angegeben.

### 5.2. Trocknungsverlust

Trocknungsverlust [%] = Trester trocken [g] / Trester feucht [g] x 100

In Tabelle 5.1 ist der Trocknungsverlust der Proben dargestellt.

Sorte	Trester feucht [g]	Trester trocken [g]	Trocknungsverlust [%]
Blaufränkisch	109	38	65
Chardonnay	104	38	63
Uhudler 07 rot	111	54	51
Uhudler 08 rot	193	69	64
Uhudler 08 weiss	180	75	58
Welschriesling	100	38	62
Zweigelt	122	49	60

Tabelle 5.1 Trocknungsverlust der Proben

In Abbildung 5.1 ist der Trocknungsverlust der Proben graphisch dargestellt.

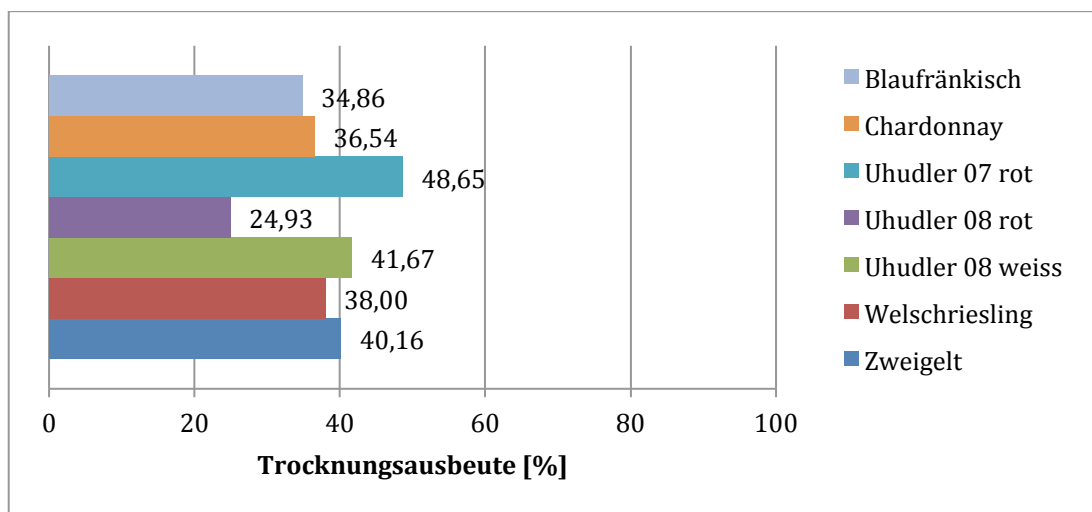


Abbildung 5.1 Trocknungsausbeute der Proben graphisch dargestellt

### 5.3. Ausbeute

$$\text{Ausbeute [\%]} = \frac{\text{Extrakt [g]}}{\text{Einsatzmenge [g]}} \times 100$$

In Tabelle 5.2 ist die Ausbeute der Proben dargestellt.

	Einsatz [g]	Extrakt [g]	Ausbeute [%]
Blaufränkisch	30,0	6,0	20,0
Chardonnay	30,0	6,4	21,4
Uhdler 07 rot	30,0	6,4	21,2
Uhdler 08 rot	30,0	7,5	24,9
Uhdler 08 weiss	30,0	8,1	27,1
Welschriesling	30,0	5,7	19,1
Zweigelt	30,0	7,3	24,3

Tabelle 5.2 Ausbeute der Proben

In Abbildung 5.2 ist die Ausbeute der Proben graphisch dargestellt.

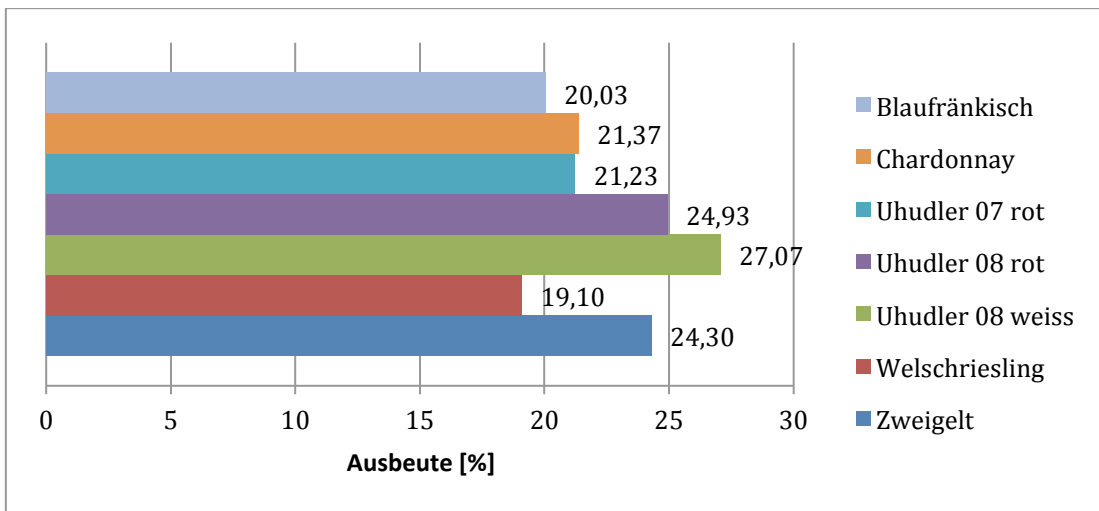


Abbildung 5.2 Ausbeute der Proben graphisch dargestellt

## 5.4. Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu

Aus der Kalibriergerade mit Gallussäure (Abbildung 5.3) ergibt sich folgende Geradengleichung die zur Berechnung der Gesamtpolyphenole herangezogen wurde:

$$y = 0,0047x - 0,0813$$

$$x = (y + 0,0813) / 0,0047$$

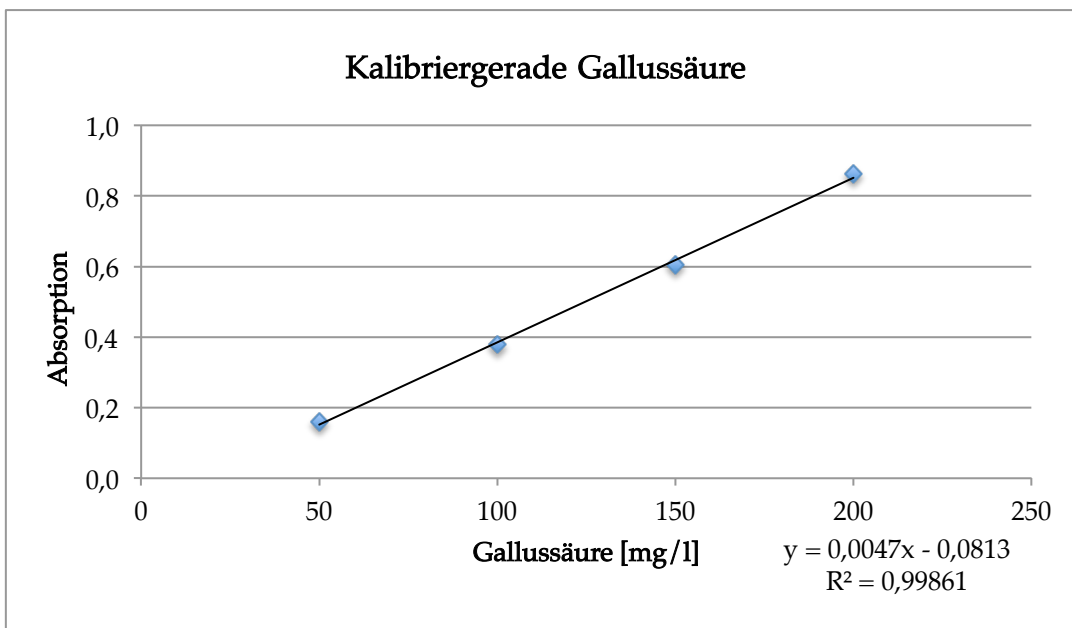


Abbildung 5.3 Kalibriergerade Gallussäure

In Tabelle 5.3 ist der Gesamtpolyphenolgehalt der Proben dargestellt.

	c [g/l]	MW Abs <sub>750nm</sub>	GS [mg/l]	GS [mg/g]	GAE [% w/w]
Blaifränkisch	1,22	0,488	142,25	116,60	<b>11,66 ± 0,59</b>
Chardonnay	1,18	0,220	75,13	63,67	<b>6,37 ± 0,20</b>
Uhudler 07 rot	1,27	0,557	159,50	125,20	<b>12,52 ± 0,10</b>
Uhudler 08 rot	1,46	0,541	155,50	106,22	<b>10,62 ± 0,29</b>
Uhudler 08 weiss	1,62	0,242	80,63	49,65	<b>4,96 ± 0,33</b>
Welschriesling	1,15	0,262	85,75	74,83	<b>7,48 ± 0,15</b>
Zweigelt	1,55	0,773	213,50	138,10	<b>13,81 ± 0,31</b>

Tabelle 5.3 Gesamtpolyphenolgehalt der Proben (c Konzentration, MW Mittelwert, GS Gallussäure, GAE Gallic Acid Equivalent)

In Abbildung 5.4 ist der Gesamtpolyphenolgehalt der Proben dargestellt.

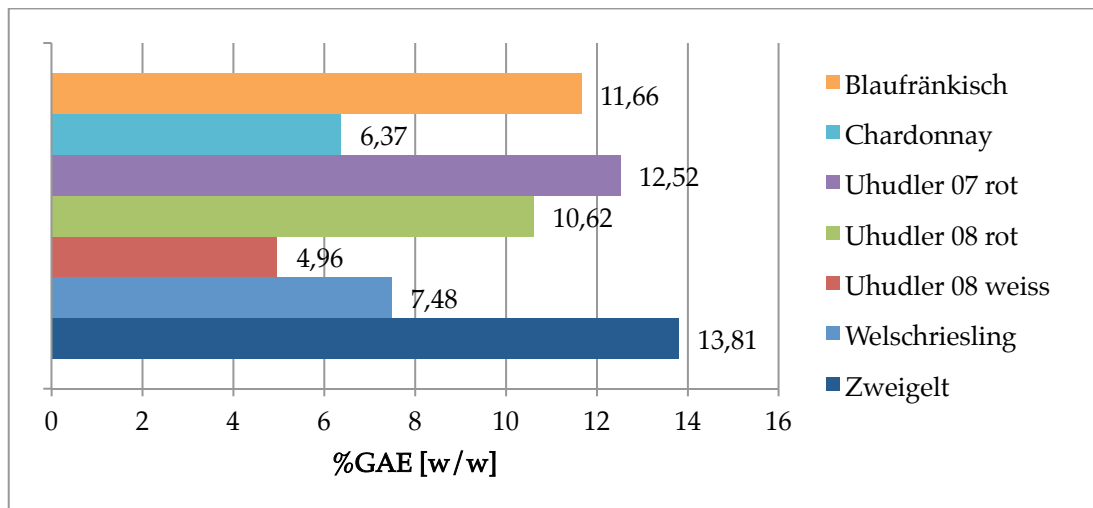


Abbildung 5.4 Gesamtpolyphenolgehalt der Proben graphisch dargestellt

## 5.5. Proanthocyanidine

Aus der Kalibriergerade mit Cyanidinchlorid (Abbildung 5.5) ergibt sich folgende Geradengleichung die zur Berechnung des Proanthocyanidingehaltes herangezogen wurde:

$$y = 0,0093x + 0,0217$$

$$x = (y - 0,0217) / 0,0093$$

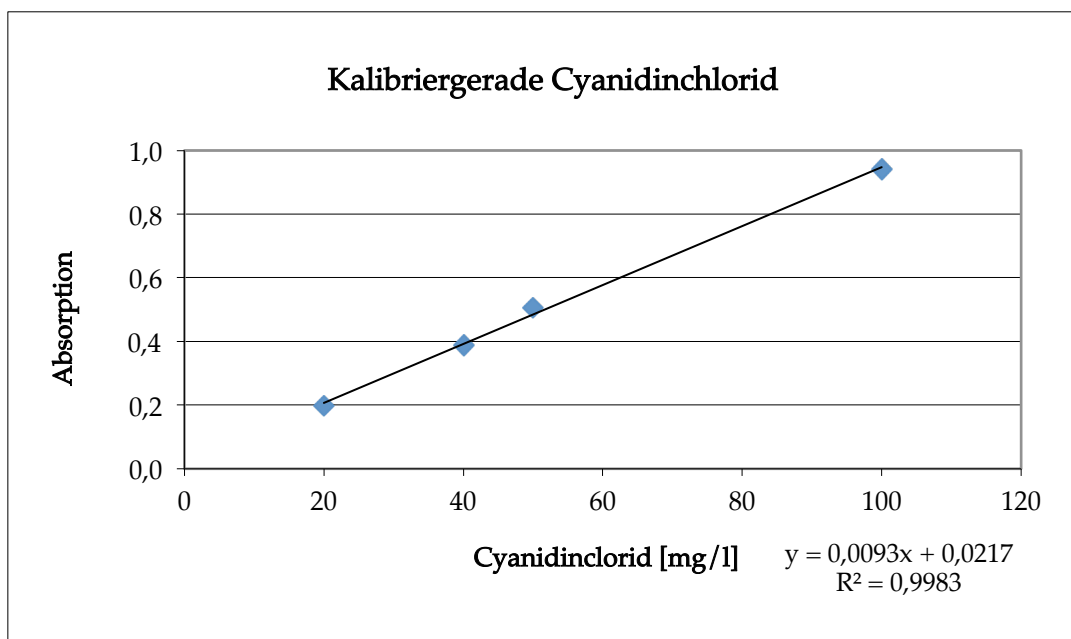


Abbildung 5.5 Kalibriergerade Cyanidinchlorid

In Tabelle 5.4 ist der Proanthocyanidingehalt der Proben dargestellt.

	c [g/l]	MW Abs <sub>550nm</sub>	CND [mg/l]	CND [mg/g]	% CND [w/w]
Blaufränkisch	2,44	0,556	59,39	24,34	2,43 ± 0,03
Chardonnay	4,72	0,214	21,39	4,53	0,45 ± 0,02
Uhudler 07 rot	2,55	0,534	56,94	22,35	2,23 ± 0,02
Uhudler 08 rot	2,93	0,406	42,78	14,61	1,46 ± 0,03
Uhudler 08 weiss	6,5	0,302	31,22	4,81	0,48 ± 0,02
Welschriesling	4,58	0,354	36,94	8,06	0,81 ± 0,03
Zweigelt	1,55	0,508	54,06	34,96	3,50 ± 0,05

Tabelle 5.4 Proanthocyanidingehalt der Proben (CND Cyanidin)



In Abbildung 5.6 ist der Proanthocyanidingehalt der Proben graphisch dargestellt.

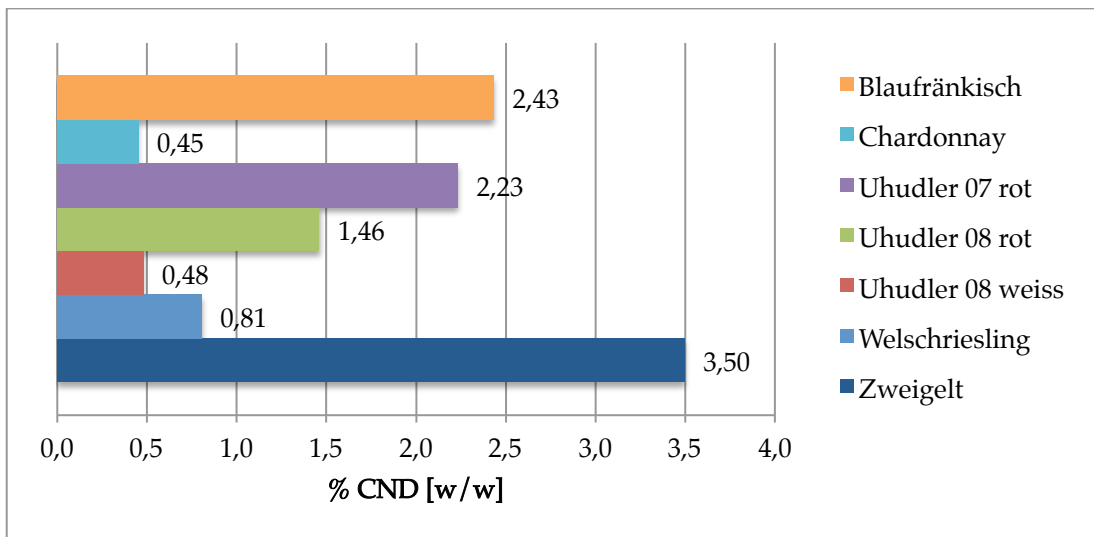


Abbildung 5.6 Proanthocyanidingehalt der Proben graphisch dargestellt

## 5.6. Catechine

Aus der Kalibriergerade mit Catechin (Abbildung 5.7) ergibt sich folgende Geradengleichung die zur Berechnung des Catechingehaltes herangezogen wurde:

$$y = 0,0514x + 0,036$$

$$x = (y - 0,036) / 0,0514$$

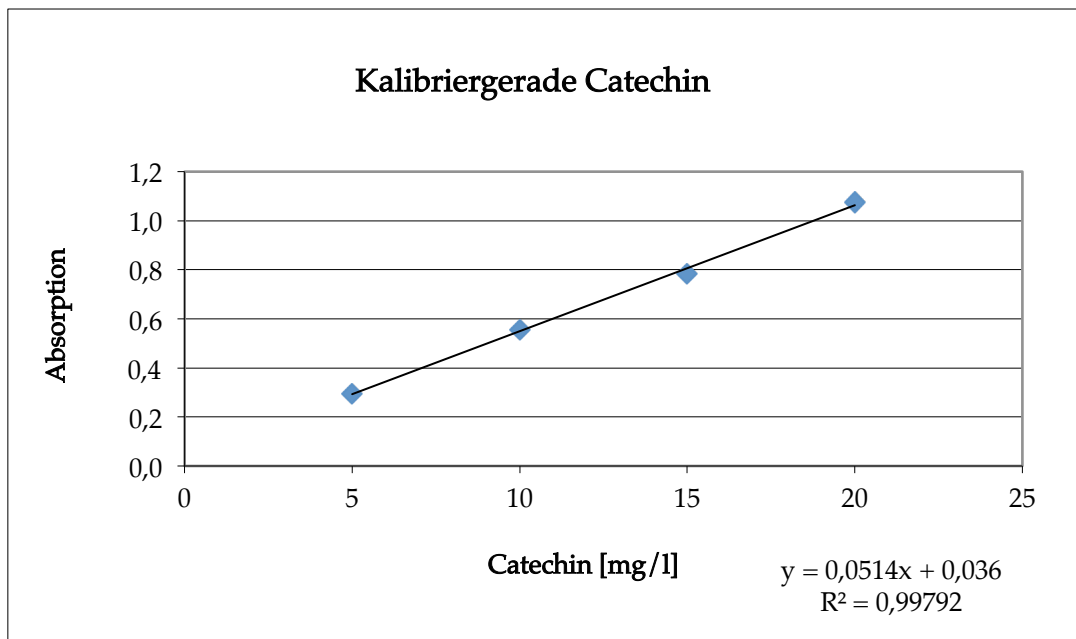


Abbildung 5.7 Kalibriergerade Catechin

In Tabelle 5.5 ist der Catechingehalt der Proben dargestellt.

	c [g/l]	MW Abs <sub>640n</sub> m	CAT [mg/l]	CAT [mg/g]	% CAT [w/w]
Blaufränkisch	0,61	0,643	11,89	19,50	<b>1,95 ± 0,03</b>
Chardonnay	2,36	0,742	13,84	5,87	<b>0,59 ± 0,02</b>
Uhudler 07 rot	0,64	0,457	8,25	12,94	<b>1,29 ± 0,02</b>
Uhudler 08 rot	0,73	0,455	8,21	11,21	<b>1,12 ± 0,03</b>
Uhudler 08 weiss	1,62	0,708	13,17	8,11	<b>0,81 ± 0,01</b>
Welschriesling	2,29	0,989	18,68	8,15	<b>0,81 ± 0,02</b>
Zweigelt	0,77	0,965	18,21	23,55	<b>2,36 ± 0,09</b>

Tabelle 5.5 Catechingehalt der Proben (CAT Catechin)

In Abbildung 5.8 ist der Catechingehalt der Proben graphisch dargestellt.

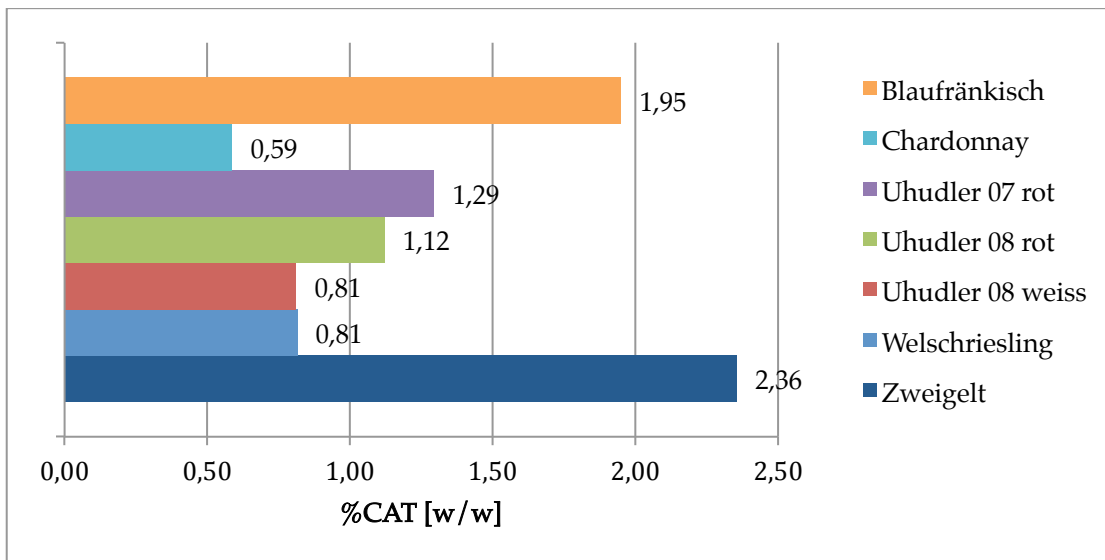


Abbildung 5.8 Catechingehalt der Proben graphisch dargestellt

## 5.7. Flavonoide

Aus der Kalibriergerade mit Quercetin (Abbildung 5.9) ergibt sich folgende Geradengleichung die zur Berechnung des Flavonoidgehaltes herangezogen wurde:

$$y = 0,0077x - 0,0334$$

$$x = (y + 0,0334) / 0,0077$$

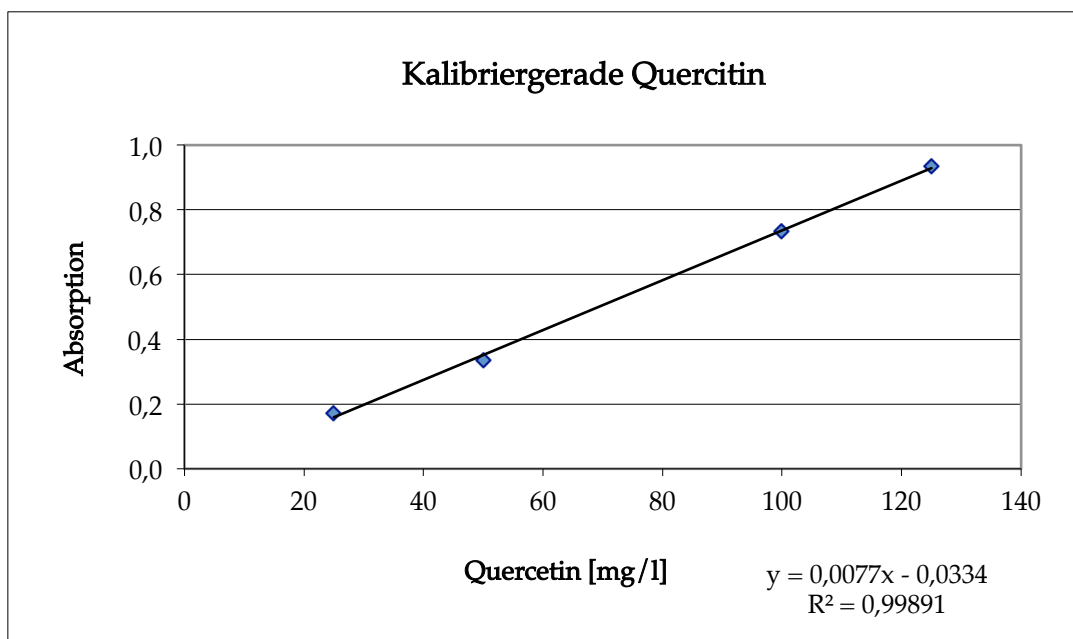


Abbildung 5.9 Kalibriergerade Catechin

In Tabelle 5.6 ist der Flavonoidgehalt der Proben dargestellt.

	c [g/l]	MW Abs <sub>367,5n</sub> m	QUE [mg/l]	QUE [mg/g]	% QUE [w/w]
Blaifränkisch	2,44	0,410	63,21	25,91	2,59 ± 0,01
Chardonnay	2,36	0,219	35,93	15,22	1,52 ± 0,02
Uhudler 07 rot	2,55	0,545	82,57	32,41	3,24 ± 0,07
Uhudler 08 rot	2,93	0,516	78,43	26,79	2,68 ± 0,03
Uhudler 08 weiss	6,50	0,553	83,71	12,89	1,29 ± 0,02
Welschriesling	2,29	0,251	40,57	17,70	1,77 ± 0,02
Zweigelt	3,09	0,373	57,93	18,73	1,87 ± 0,01

Tabelle 5.6 Flavonoidgehalt der Proben (QUE Quercetin)

In Abbildung 5.10 ist der Flavonoidgehalt der Proben graphisch dargestellt.

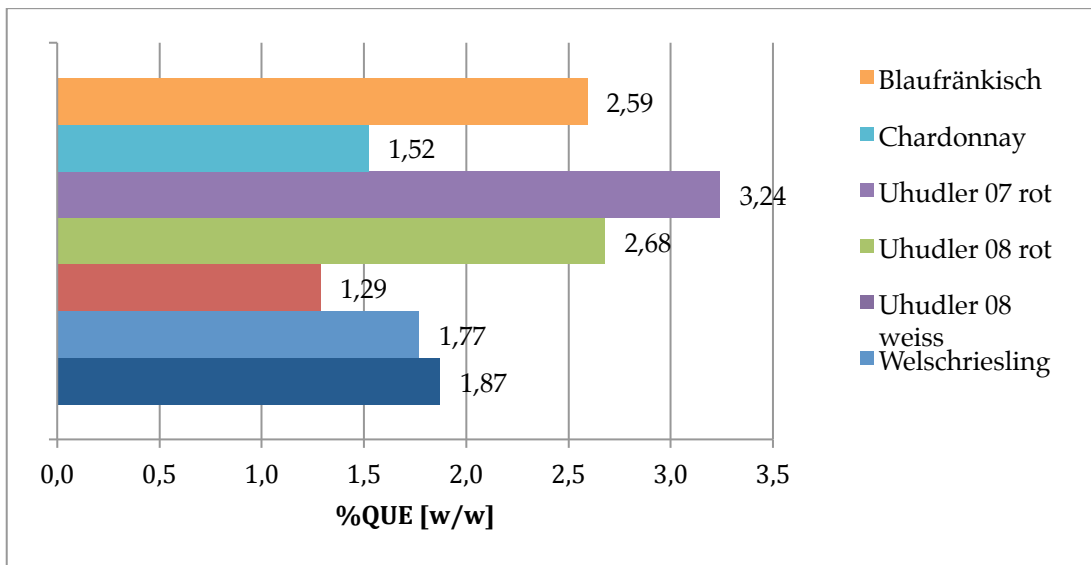


Abbildung 5.10 Flavonoidgehalt der Proben graphisch dargestellt

## 5.8. Antioxidative Aktivität mittels DPPH-Methode

Die Berechnung der antioxidativen Aktivität wurde nach Brand-Williams [33] durchgeführt. Da sie sich etwas komplexer gestaltet wird diese anhand eines Beispiels zur besseren Verständlichkeit erörtert:

- Berechnung der DPPH Konzentration in der Küvette

$$MG(DPPH) = 394,3 \text{ g/mol}$$

$$c(\text{Stammlösung DPPH}) = 0,256 \text{ g/l} = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$c(\text{Stammlösung DPPH 1:10}) = 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$$

$$c(\text{DPPH in Küvette nach Auffüllen mit 2,7ml}) = 5,85 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$$

- Berechnung der DPPH Konzentration aus der Extinktion

$$E_{515} = 12509 \times c_{DPPH} - 0,00258$$

$$c_{DPPH} (\text{mol/l}) = (E_{515} + 0,00258) / 12509$$

- Berechnung des umgesetzten DPPH nach Probenzugabe

$$E_{515}(\text{DPPH}) = 0,618$$

$$c(\text{DPPH}) = (0,618 + 0,00258) / 12509 * 394 * 1000 = 19,55 \text{ mg/l} = 100\%$$

Probe: Chardonnay

Ursprüngliche Konzentration der Probe: 1180 mg/l

Menge an Probe in Küvette: 300  $\mu$ l

Nach Auffüllen mit 2,7 ml DPPH-Lösung auf 3ml verringert sich die Probenkonzentration auf ein Zehntel = 118 mg/l

Somit kann die effektive Probenkonzentration in g Probe / g DPPH berechnet werden:

$$\text{Effektive Probenkonzentration (g/g DPPH)} = 118 / 19,55 = 6,14 \text{ mg/l}$$

$$E_{515}(\text{Probe, t=1h}) = 0,161$$

$$c(\text{DPPH mit Probe, t=1h}) = (0,161 + 0,00258) / 12509 * 394 * 1000 = 5,15 \text{ mg/l}$$

$$\text{Rest DPPH [\%]} = 5,15 / 19,55 * 100 = 26,79 \%$$

$$\text{Umgesetztes DPPH [\%]} = 100 - 26,79 = 73,21 \%$$

Durch Auftragung des umgesetzten DPPH über der effektiven Probenkonzentration erhält man eine Gerade aus der man den  $IC_{50}$  Wert durch lineare Approximation berechnen kann, wobei beachtet werden muss dass die Linearität in Grenzbereichen des DPPH Gehaltes nicht mehr gegeben ist.

In Abbildung 5.11 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration der Sorte Chardonnay aufgetragen.

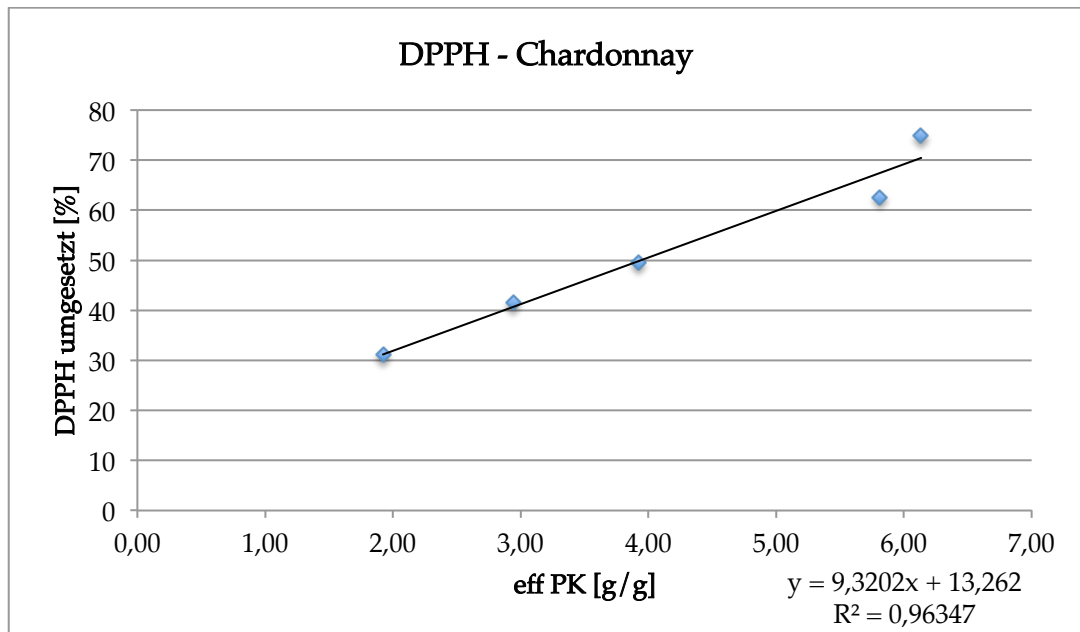


Abbildung 5.11 DPPH Konzentration der Probe Chardonnay

- **Berechnung des  $IC_{50}$**

$$x_{50} [\text{g/g}] = (50 - 13,262) / 9,3202 = 3,94$$

$$IC_{50} = 3,94 \text{ g Probe/g DPPH}$$

- **Berechnung des Troloxäquivalents TE**

$$TE (X) [\text{g/g}] = IC_{50 [\text{g/g}]} (\text{Trolox}) / IC_{50 [\text{g/g}]} (X)$$

$$TE (\text{Trolox}) = 1$$

$$IC_{50} (\text{Trolox}) = 0,15$$

$$TE = 0,15 / 3,94$$

$$TE = 0,04 \text{ g Trolox/g Probe}$$

## 5.8.1 Vergleichssubstanzen

In Tabelle 5.7 sind die Ergebnisse der antioxidativen Bestimmung der Vergleichssubstanzen dargestellt.

	IC <sub>50</sub> [g/g]	TE [g/g]
Ascorbylpalmitat	0,37	0,41
BHA	0,15	1,05
BHT	0,27	0,58
Tocopherol	0,28	0,55
Trolox	0,15	1,00

Tabelle 5.7 IC<sub>50</sub> und TE der Vergleichssubstanzen

In Abbildung 5.12 sind die IC<sub>50</sub> Werte der Vergleichssubstanzen graphisch dargestellt.

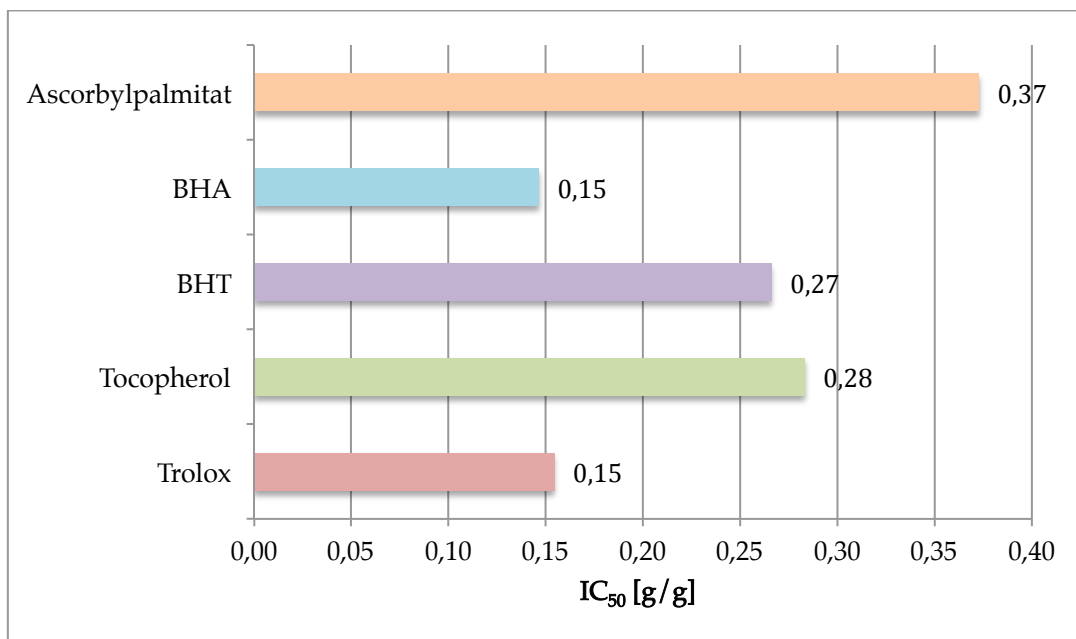


Abbildung 5.12 IC<sub>50</sub> der Vergleichssubstanzen graphisch dargestellt



In Abbildung 5.13 sind die Troloxäquivalente der Vergleichssubstanzen graphisch dargestellt.

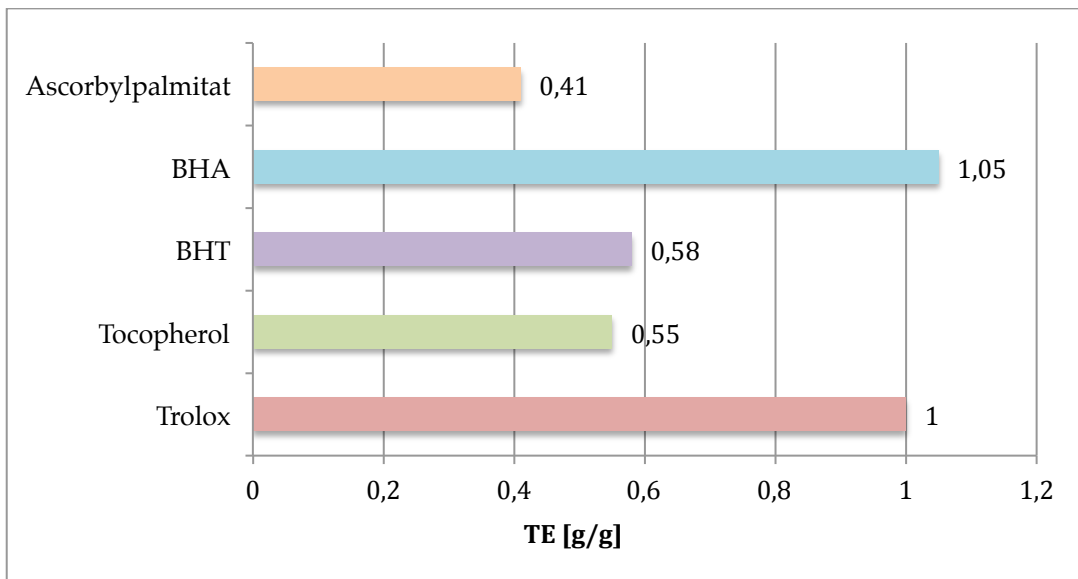


Abbildung 5.13 Troloxäquivalente der Vergleichssubstanzen graphisch dargestellt

In Abbildung 5.14 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von Ascorbylpalmitat aufgetragen.

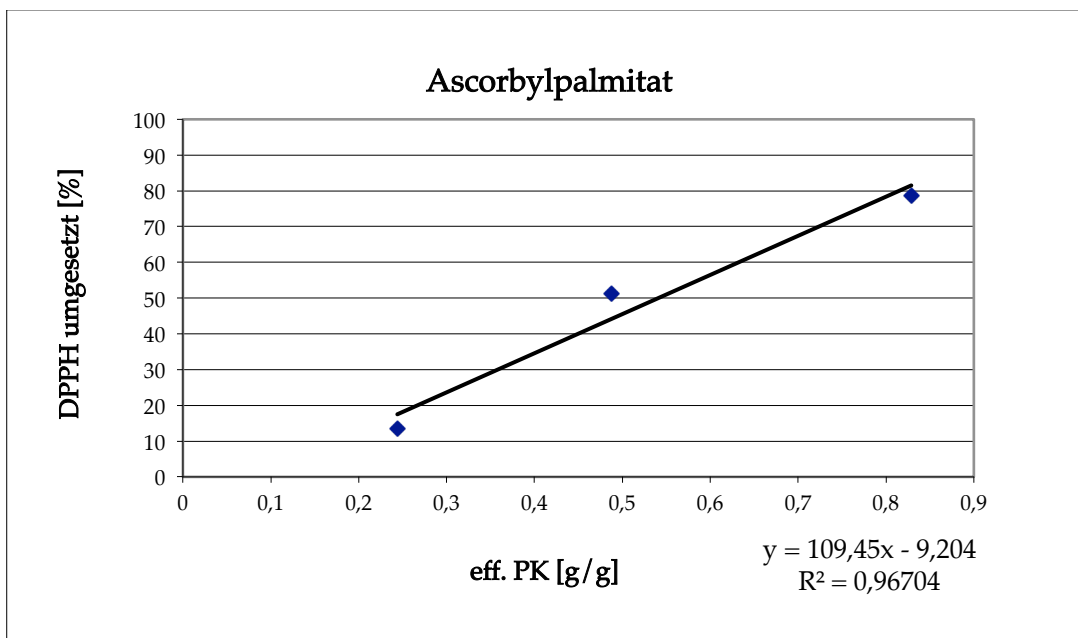


Abbildung 5.14 DPPH Konzentration der Vergleichssubstanz Ascorbylpalmitat

In Abbildung 5.15 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von Butylhydroxyanisol aufgetragen.

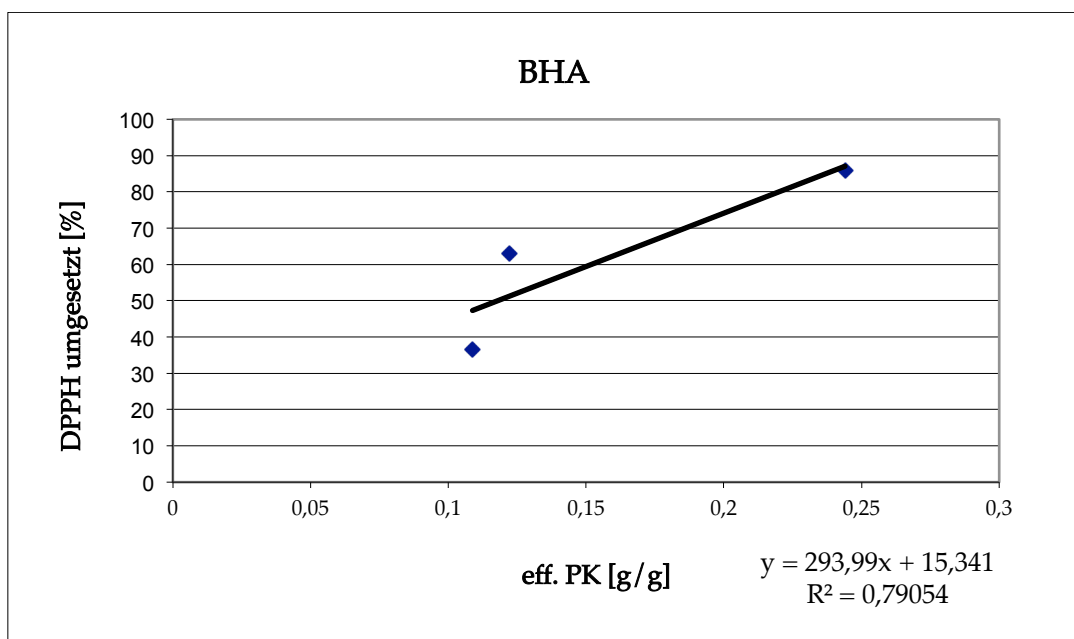


Abbildung 5.15 DPPH Konzentration der Vergleichssubstanz BHA

In Abbildung 5.16 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von Butylhydroxytoluol aufgetragen.

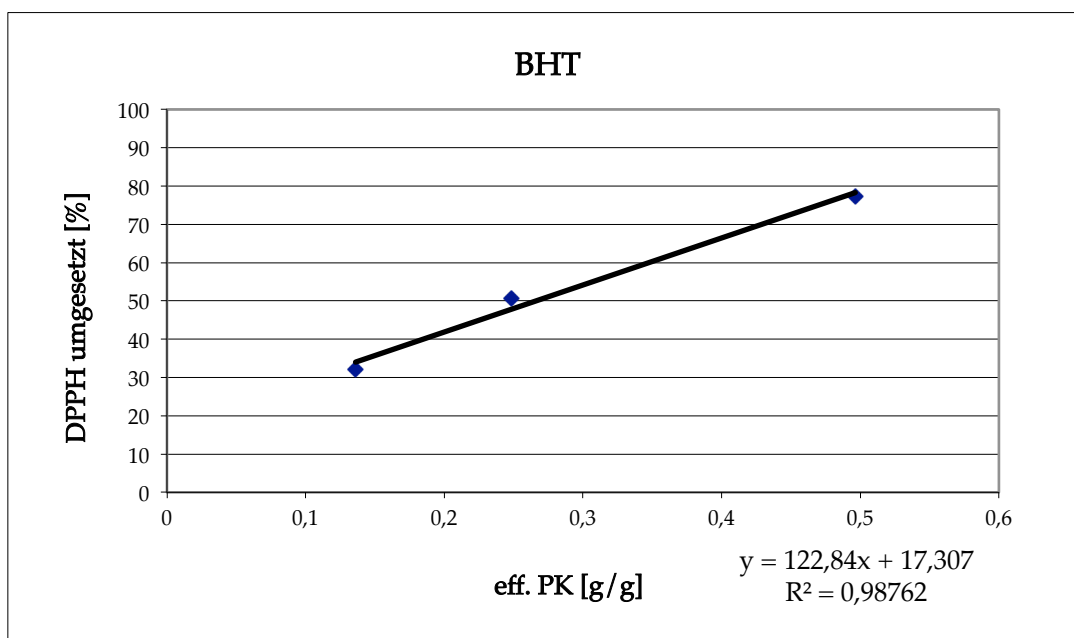


Abbildung 5.16 DPPH Konzentration der Vergleichssubstanz BHT

In Abbildung 5.17 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von Tocopherol aufgetragen.

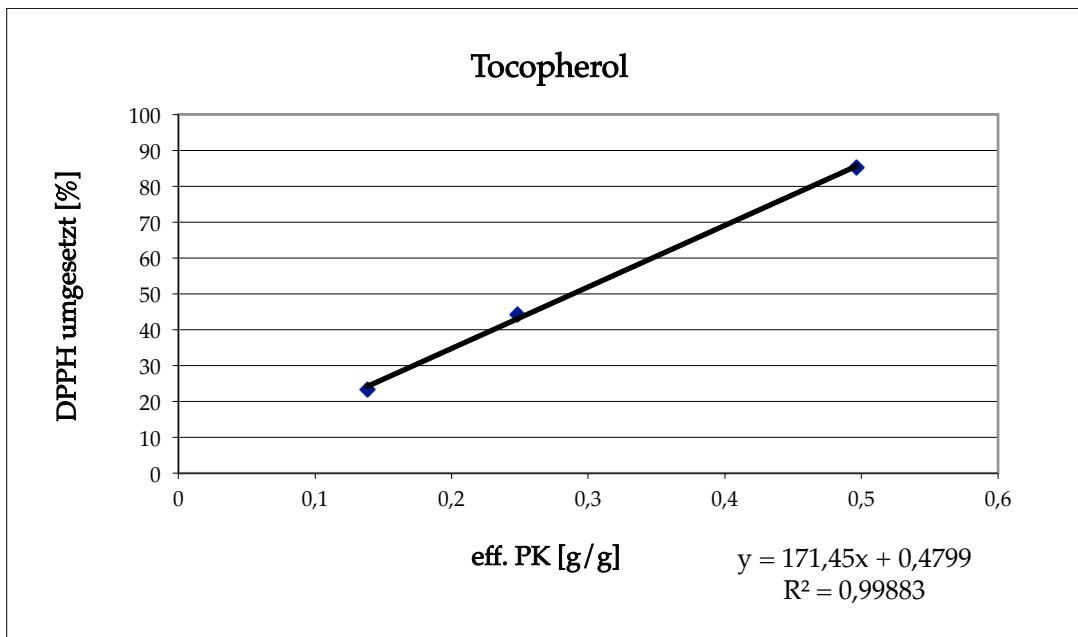


Abbildung 5.17 DPPH Konzentration der Vergleichssubstanz Tocopherol

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von Trolox aufgetragen.

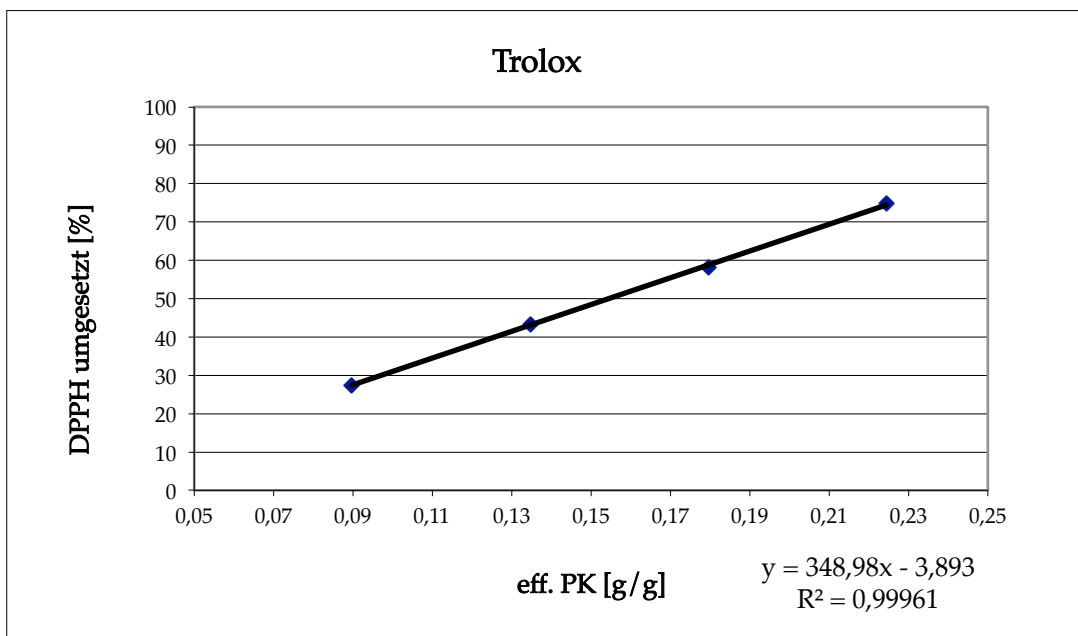


Abbildung 5.18 DPPH Konzentration der Vergleichssubstanz Trolox

### 5.8.1 Weintrester

In Tabelle 5.8 sind die Ergebnisse der antioxidativen Bestimmung der Proben dargestellt.

Sorte	IC <sub>50</sub> [g/g]	TE [g/g]
Blaufränkisch	0,79	0,2
Chardonnay	3,94	0,04
Uhudler 07 rot	1,11	0,14
Uhudler 08 rot	1,91	0,08
Uhudler 08 weiss	5,40	0,03
Welschriesling	2,92	0,05
Zweigelt	0,61	0,25

Tabelle 5.8 IC<sub>50</sub> und TE der Proben

In Abbildung 5.19 sind die IC<sub>50</sub> Werte der Proben graphisch dargestellt.

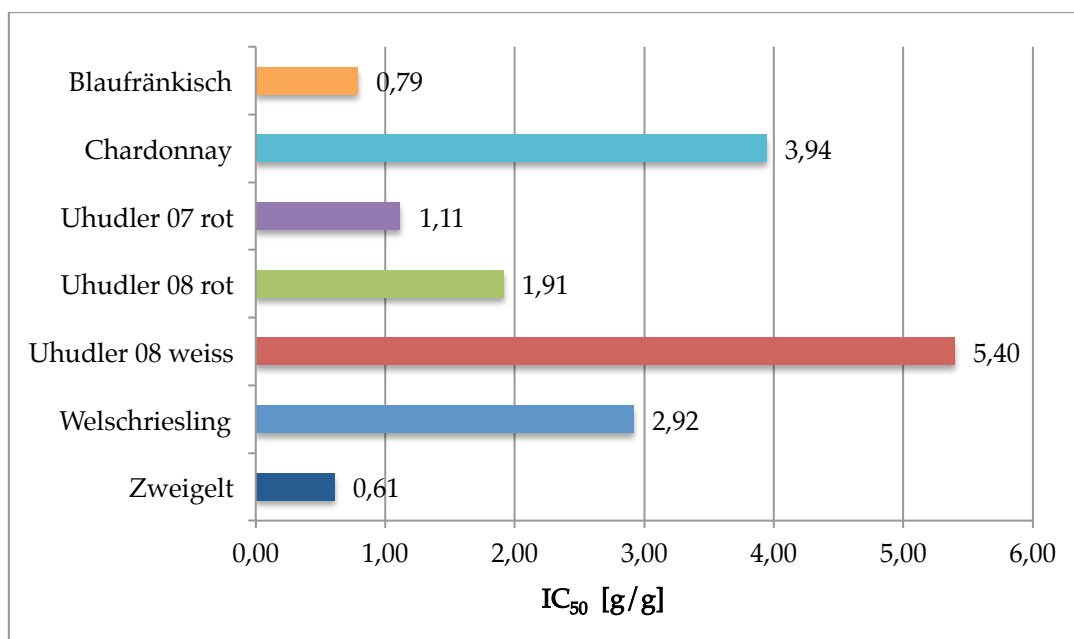


Abbildung 5.19 IC<sub>50</sub> der Proben graphisch dargestellt

In Abbildung 5.20 sind die Troloxäquivalente der Proben graphisch dargestellt.

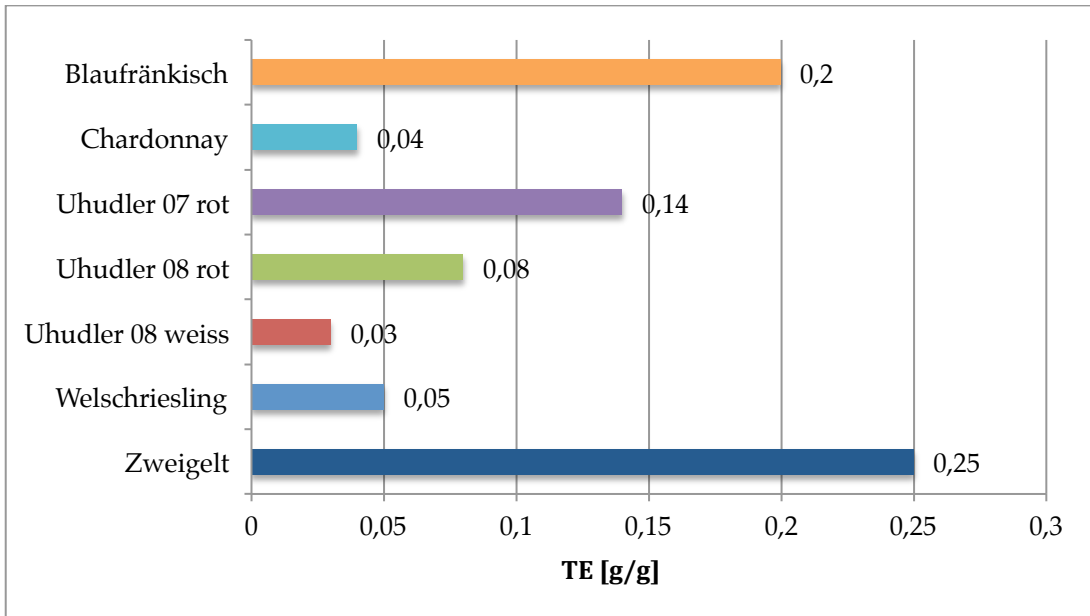


Abbildung 5.20 TE der Proben graphisch dargestellt

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von der Probe Blaufränkisch aufgetragen.

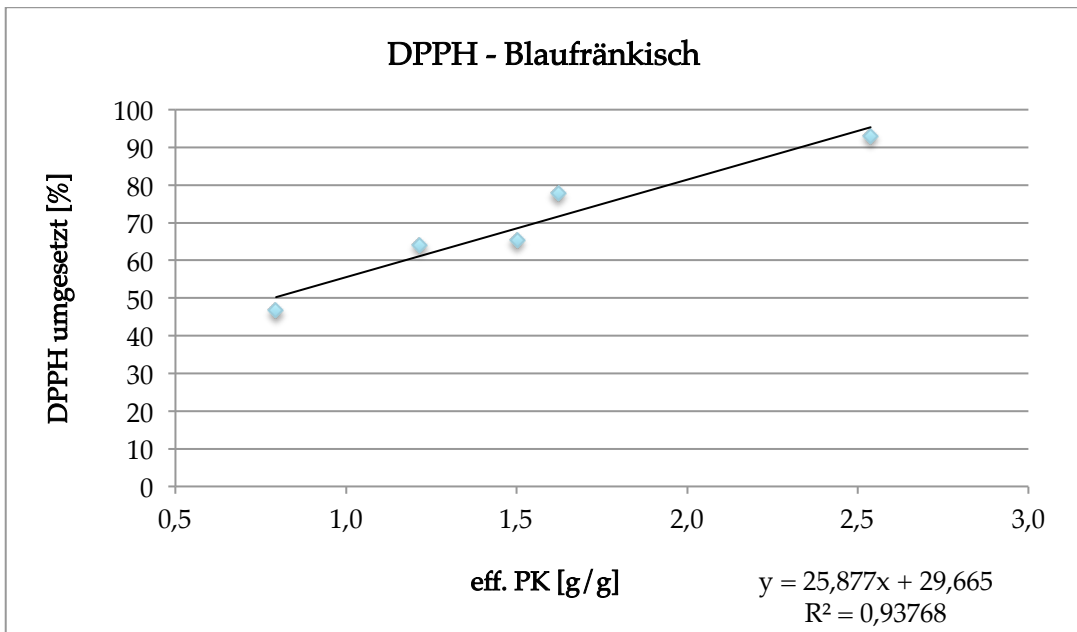


Abbildung 5.21 DPPH Konzentration der Probe Blaufränkisch

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von der Probe Chardonnay aufgetragen.

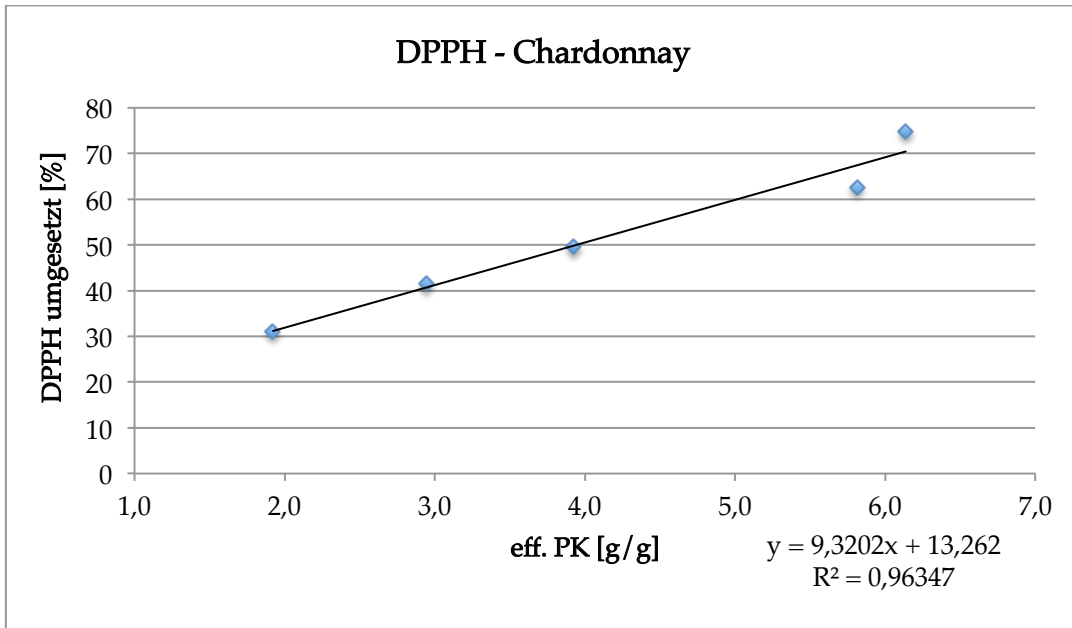


Abbildung 5.22 DPPH Konzentration der Probe Chardonnay

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von der Probe Uhudler 07 Rot aufgetragen.

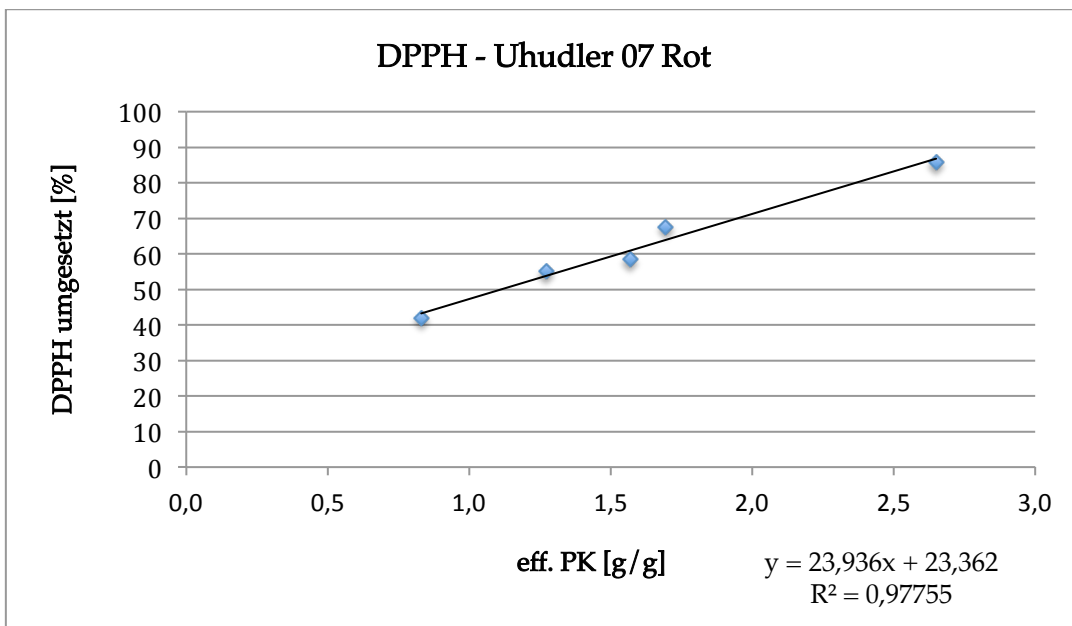


Abbildung 5.23 DPPH Konzentration der Probe Uhudler 07 Rot

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von der Probe Uhudler 08 Rot aufgetragen.

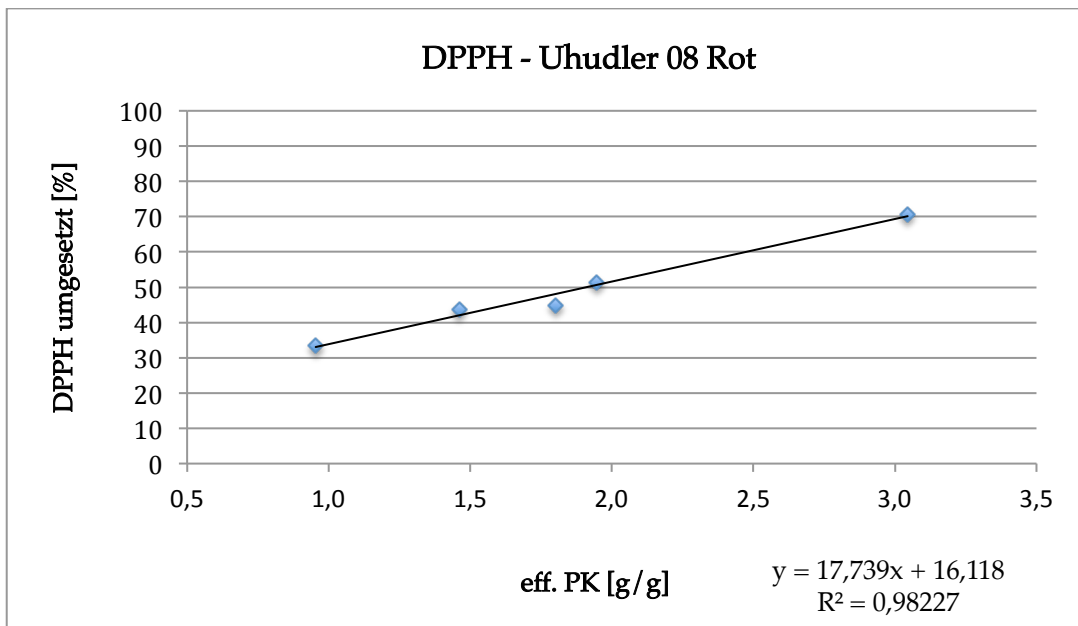


Abbildung 5.24 DPPH Konzentration der Probe Uhudler 08 Rot

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von der Probe Uhudler 08 Weiss aufgetragen.

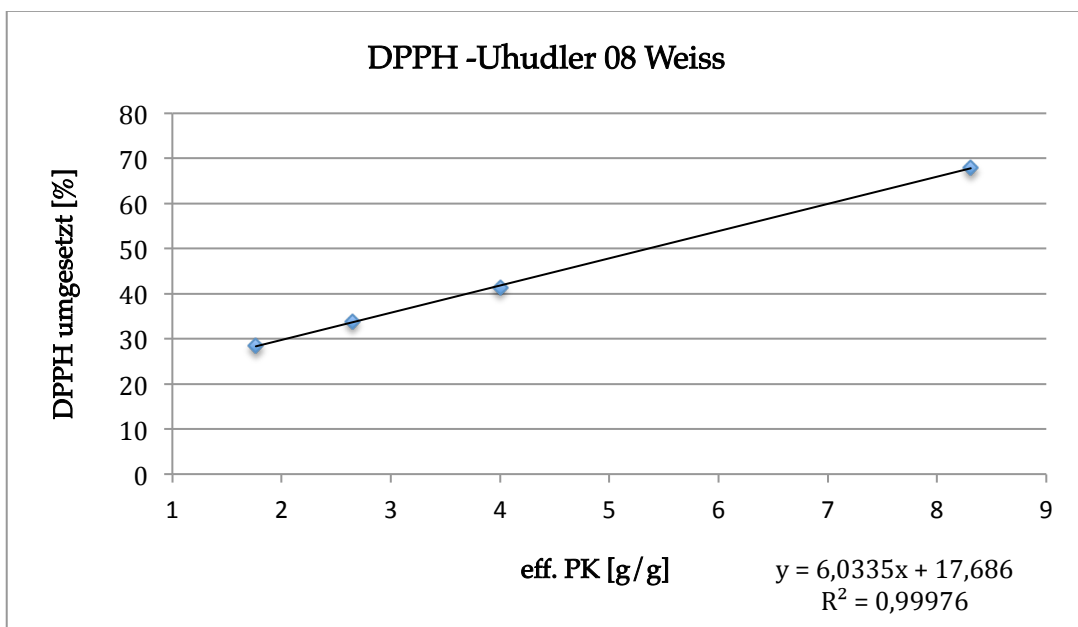


Abbildung 5.25 DPPH Konzentration der Probe Uhudler 08 Weiss

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von der Probe Welschriesling aufgetragen.

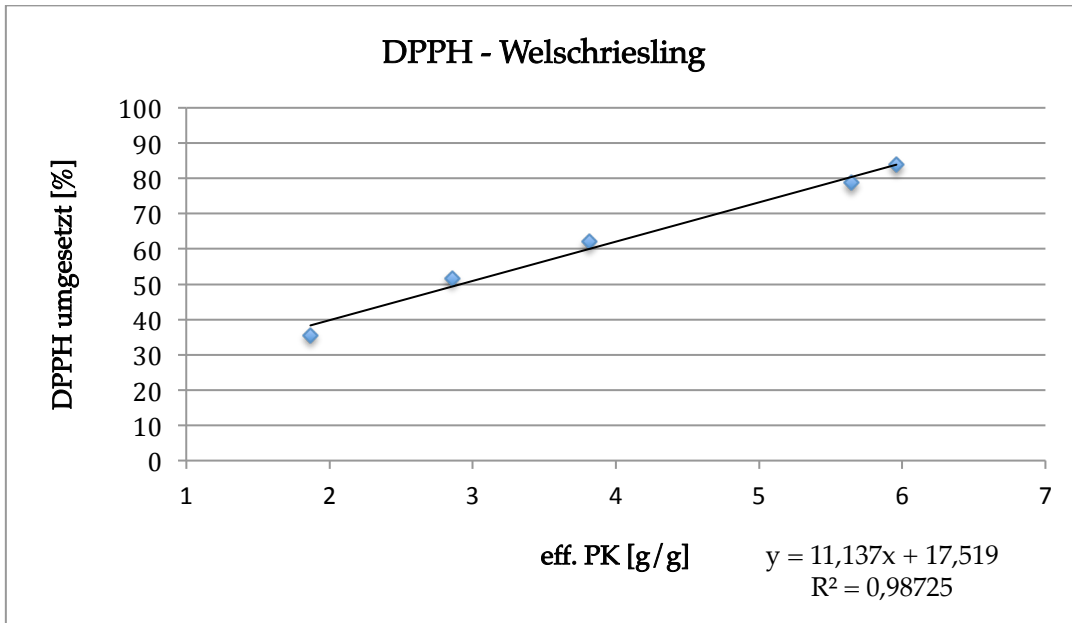


Abbildung 5.26 DPPH Konzentration der Probe Welschriesling

In Abbildung 5.18 ist das umgesetzte DPPH über der effektiven Probenkonzentration von der Probe Zweigelt aufgetragen.

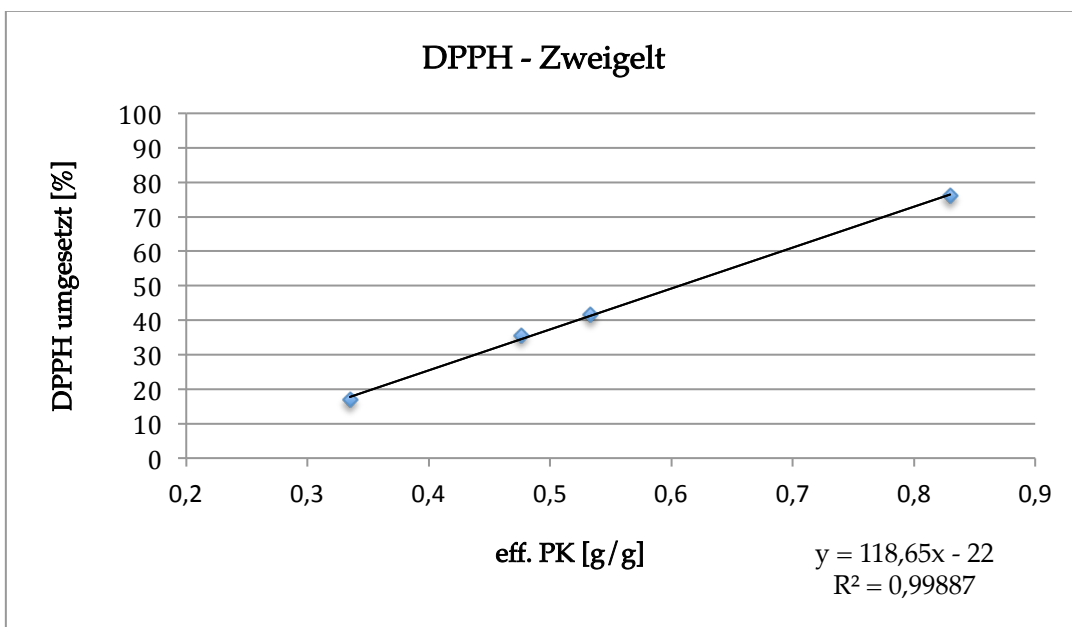


Abbildung 5.27 DPPH Konzentration der Probe Zweigelt



## 5.9. Antioxidative Aktivität mittels $\beta$ -Carotin Bleaching

Bei dieser Bestimmungsmethode wird die Berechnung des AAC-Wertes (Antioxidant Activity Coefficient) wie folgt vorgenommen:

$$AAC = 1000 \times [(A_{E120} - A_{C120}) / (A_{C0} - A_{C120})]$$

$A_{E120}$  = Extinktion der Probelösung nach 120 Minuten

$A_{C120}$  = Extinktion der Kontrolle nach 120 Minuten

$A_{C0}$  = Extinktion der Kontrolle nach 0 Minuten

### 5.9.1 Vergleichssubstanzen

In Tabelle 5.9 sind die AAC Werte der Vergleichssubstanzen dargestellt.

	AAC
Ascorbylpalmitat	375
BHA	996
BHT	989
Gallussäure	288
Tocopherol	949

Tabelle 5.9 AAC Werte der Vergleichssubstanzen

In Abbildung 5.28 sind die AAC Werte der Vergleichssubstanzen graphisch dargestellt.

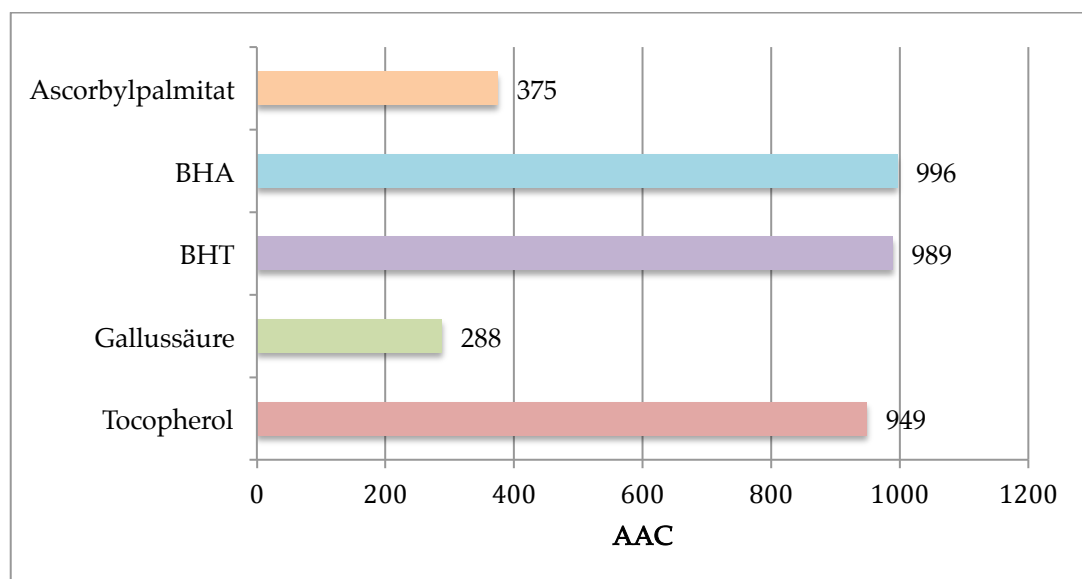


Abbildung 5.28 AAC Werte der Vergleichssubstanzen graphisch dargestellt

## 5.9.2 Weintrester

In der Tabelle 5.10 sind die AAC Werte der Proben dargestellt.

	AAC
Blaifränkisch	529
Chardonnay	315
Uhudler 07 rot	608
Uhudler 08 rot	563
Uhudler 08 weiss	464
Welschriesling	538
Zweigelt	619

Tabelle 5.10 AAC Werte der Proben

In der Tabelle 5.29 sind die AAC Werte der Proben graphisch dargestellt.

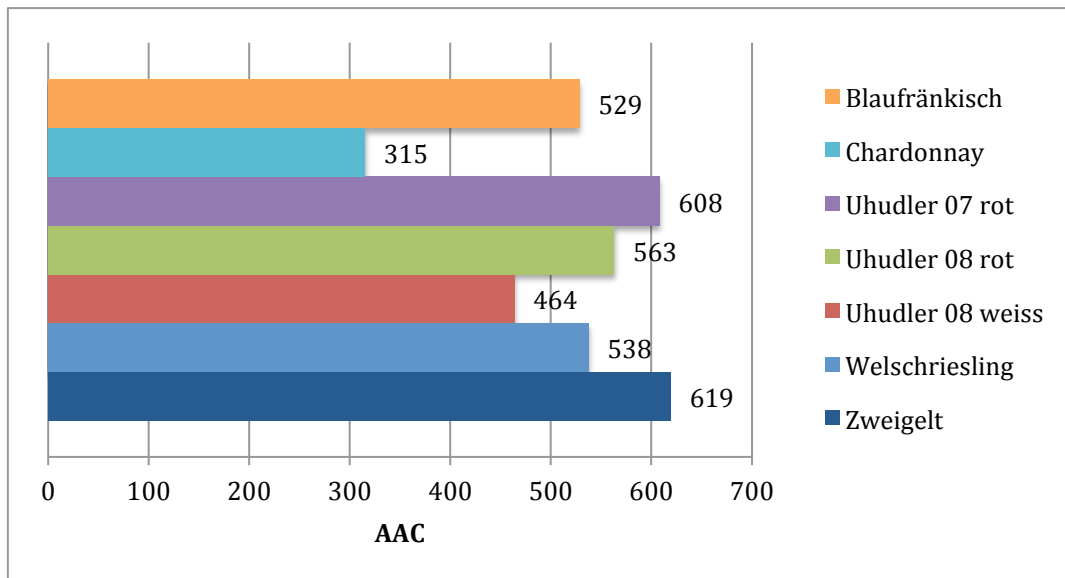


Tabelle 5.29 AAC Werte der Proben graphisch dargestellt

# Kapitel 6

## Diskussion

Dieses Kapitel befasst sich mit den Ergebnissen der Diplomarbeit und deren Interpretation. Vergleiche mit bereits vorhanden Daten werden erstellt.

### 6.1. Trocknungsverlust

Nach unzufriedenstellender Lyophilisation wurden die Proben für 48 Stunden bei 60°C getrocknet. Der Trocknungsverlust der Proben (siehe Tabelle 6.1) erstreckte sich zwischen 51,4 und 65,1%. Es konnte kein Unterschied zwischen Rot- und Weißweintrester gemacht werden. Der höchste Trocknungsverlust konnte bei der Sorte Blaufränkisch mit 65,1% und der Niedrigste bei der Sorte Uhdler Rot 07 mit 51,4% beobachtet werden. Grund für diesen niedrigen Trocknungsverlust dürfte die Tatsache sein, dass es sich um Trester handelte der bereits ein Jahr älter als die anderen Proben war und dadurch schon eine Vortrocknung erfolgte.

Weinsorte	Trocknungsverlust [%]
<b>Rotweintrester</b>	
Blaufränkisch	65,1
Uhdler 08 rot	64,3
Zweigelt	59,8
Uhdler 07 rot	51,4
<b>Weissweintrester</b>	
Chardonnay	63,5
Welschriesling	62,0
Uhdler 08 weiss	58,3

Tabelle 6.1 Trocknungsverlust der Proben im Vergleich

## 6.2. Extraktionsausbeute

Die getrockneten Proben wurden mit der 10-fachen Menge an Extraktionsmittel extrahiert (Ethanol/Wasser Gemisch (70/30)) und anschließend am Rotavapor bis zur Trockene eingedampft. Die durchschnittliche Ausbeute der Proben (siehe Tabelle 6.2) erstreckte sich zwischen 19,1 und 27,1%, wobei wie schon beim Trocknungsverlust kein signifikanter Unterschied zwischen Rot- und Weißweintrester festgestellt werden konnte. Die höchste Ausbeute konnte bei der Sorte Uhdler Weiss 08 mit 27,1% und die Niedrigste bei der Sorte Welschriesling mit 19,1% beobachtet werden.

Weinsorte	Extraktionsausbeute [%]
<b>Rotweintrester</b>	
Uhdler 08 rot	24,9
Zweigelt	24,3
Uhdler 07 rot	21,2
Blaufränkisch	20,0
<b>Weissweintrester</b>	
Uhdler 08 weiss	27,1
Chardonnay	21,4
Welschriesling	19,1

Tabelle 6.2 Extraktionsausbeute der Proben im Vergleich

## 6.3. Gesamtpolyphenole

Der durchschnittliche Gehalt an Gesamtpolyphenolen (siehe Tabelle 6.3) im untersuchten Rotweintrester betrug zwischen 10,6 und 13,8%, der von Weißweintrester zwischen 5,0 und 7,5%. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der allgemeingültigen Theorie dass Rotwein unter anderem aufgrund seines hohen Antho- und Proanthocyanidingehaltes reicher an Polyphenolen ist als Weißwein.

Betrachtet man die einzelnen Weinsorten genauer kann man feststellen dass die Sorte Zweigelt den höchsten Gehalt an Polyphenolen mit 13,8% aufweist, den geringsten die Sorte Uhdler Rot 08 mit einem Gehalt von 10,6%. Die Sorte Welschriesling kann mit einem Gehalt von 7,5% den höchsten, die Sorte Uhdler Weiss 08 mit 5% den niedrigsten Gehalt an Gesamtpolyphenolen aufweisen.

In der Studie von Ruberto et al. [31] wurden verschiedene sizilianische Rotwein-trester auf deren Gehalt an Polyphenolen untersucht. Dabei wurden Werte zwischen 6,9 und 33,3% ermittelt wobei bei dieser Studie die Anthocyanine und Flavonole mittels HPLC bestimmt wurden und der Gehalt an Poly-phenolen als Summe dieser beiden Stoffklassen angesehen wurde. In einer griechischen Studie [20] wurde der Polyphenolgehalt anhand der Folin-Ciocalteu Methode ermittelt.

Dabei konnte für Rotweintrester ein Gehalt von 5,5% und für Weißweintrester ein Gehalt von 4,8% ermittelt werden.

Verglichen mit diesen Werten liegen die österreichischen Sorten im Mittelfeld, was eventuell auch auf die klimatischen Bedingungen zurück zu führen ist.

Die Ergebnisse bestätigen somit die gesundheitspositive Wirkung von Weinprodukten, insbesondere der Polyphenolgehalt im Rotweintrester ist als potentielle Quelle von antioxidativ wirksamen Polyphenolen (besonders den Flavonoiden) zu erachten da diese Stoffklasse maßgeblich am Abfangen von freien Radikalen im Körper beteiligt ist [29].

Vergleicht man den Polyphenolgehalt in Weintrester mit dem Gehalt im Wein selbst, so kann man feststellen dass der Gehalt im Trester um ein vielfaches höher ist als der im Wein. In der Studie von Cooper et al. [42] wurde für Rotwein ein Gehalt von 2,6% und für Weißwein ein Polyphenolgehalt von 0,2% ermittelt.

Weinsorte	Gesamtpolyphenole GAE [% w / w]
<b>Rotweintrester</b>	
Zweigelt	13,8
Uhudler 07 rot	12,5
Blaufränkisch	11,7
Uhudler 08 rot	10,3
<b>Weissweintrester</b>	
Welschriesling	7,5
Chardonnay	6,4
Uhudler 08 weiss	5,0

Tabelle 6.3 Gesamtpolyphenole der Proben im Vergleich

## 6.4. Flavonoide

Die Bestimmung der Gesamtflavonoide (siehe Tabelle 6.4) erbrachte bei Rotweintrester einen Flavonoidgehalt zwischen 1,9 und 3,2%, bei Weißweintrester Werte zwischen 1,3 und 1,8%. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Theorie, dass Rotweintrrauben einen höheren Flavonoidgehalt als Weissweintrrauben aufweisen [10].

Im Vergleich zu dem Catechin- und Proanthocyanidingehalt sieht die Verteilung der einzelnen Sorten differenziert aus. Der höchste Gehalt an Flavonoiden konnte bei den beiden Uhudler Sorten mit jeweils 3,2% für den Uhudler Rot 07 und 2,7% für den Uhudler Rot 08 nachgewiesen werden. Den niedrigsten Flavonoidgehalt besaß die Probe Uhudler Weiss 08 mit 1,3%. Interessanterweise befand sich in der Sorte Zweigelt, die den deutlich höchsten Gesamtpolyphenolgehalt mit 1,9% aufwies der niedrigste Flavonoidgehalt der Rotweintrester. Makris et al. [20] konnte bei Rotweintrester einen Flavonoidgehalt von 5,3% und bei Weißweintrester 3,5% nachweisen. Ruberto et al. [31] kam bei den Flavonoidbestimmungen verschiedener sizilianischer Rotweintrester auf Werte zwischen 1,1 - 4,6%.

Somit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit durchaus mit den anderen Literaturstudien überein.

Weinsorte	Flavonoide QUE [% w / w]
<b>Rotweintrester</b>	
Uhudler 07 rot	3,2
Uhudler 08 rot	2,7
Blaufränkisch	2,6
Zweigelt	1,9
<b>Weissweintrester</b>	
Welschriesling	1,8
Chardonnay	1,5
Uhudler 08 weiss	1,3

Tabelle 6.4 Flavonoidgehalt der Proben im Vergleich

## 6.5. Proanthocyanidine

Da vor allem Rotweine reich an Proanthocyanidinen sind konnte bei Rotweintrester ein deutlich höherer Gehalt nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6.5). Der durchschnittliche Gehalt an Proanthocyanidinen betrug bei Rotweintrester zwischen 1,5 und 3,5%, der von Weißweintrester hingegen nur 0,5 bis 0,8%.

Dieses Ergebnis deckt sich mit diversen Studien die den Rotweinen erhöhte Proanthocyanidingehälter zuschreiben. Diese sind in Verbindung mit anderen Anthocyanen verantwortlich für die Rotfärbung des Weines und besitzen mit großer Wahrscheinlichkeit gesundheitspositive Wirkung bezüglich Herzerkrankungen und Krebs [42].

Vor allem im Zweigeltrester konnte ein sehr hoher Proanthocyanidingehalt mit 3,5% nachgewiesen werden. Die Sorten Blaufränkisch (2,4%) und Uhudler Rot 07 (2,2%) wiesen ebenfalls deutlich höhere Werte auf als der Weißweintrester. Bezüglich der Weißweintrester konnte in der Sorte Welschriesling der höchste Gehalt mit 0,81% nachgewiesen werden, gefolgt von den Sorten Uhudler Weiss 08 mit 0,8% und Chardonnay mit 0,5%. Der Vergleich mit vorhandenen Studien zeigt, dass die erhaltenen Daten vergleichbar mit Literaturwerten sind (z.B. konnte Negro et al. [30] bei der Sorte Negro Amado einen Gehalt von 1,3% nachweisen).

Weinsorte	Proanthocyanidine CND [% w / w]
<b>Rotweintrester</b>	
Zweigelt	3,5
Blaifränkisch	2,4
Uhudler 07 rot	2,2
Uhudler 08 rot	1,5
<b>Weissweintrester</b>	
Welschriesling	0,8
Chardonnay	0,5
Uhudler 08 weiss	0,5

Tabelle 6.5 Proanthocyanidingehalt der Proben im Vergleich

## 6.6. Catechine

Betrachtet man die Ergebnisse der Catechinbestimmung (siehe Tabelle 6.6), kann ebenfalls ein erhöhter Gehalt in Rotweintrester festgestellt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Catechine (hydrierte Flavone) die monomeren Bausteine der kondensierten Proanthocyanidine sind.

Der durchschnittliche Gehalt an Catechinen betrug bei Rotweintrester zwischen 1,1 und 2,4%, der von Weißweintrester zwischen 0,6 und 0,8%. Auch die Rangliste der Weinsorten zeigt ein ähnliches Bild wie bereits bei den Proanthocyanidinen. Der höchste Gehalt konnte bei der Sorte Zweigelt (2,4%) nachgewiesen werden, gefolgt von der Sorte Blaifränkisch mit 2%. Die beiden Sorten Uhudler 08 Weiss und Welschriesling wiesen einen Catechingehalt von jeweils 0,8% auf. In der Sorte Chardonnay wurde der niedrigste Gehalt festgestellt, er betrug 0,6%.

Die erhaltenen Werte stehen im Einklang mit bereits vorhandenen Literaturwerten. Di Majo et al. [43] erhielt in seiner Studie Werte zwischen 0,5 - 6% .

Weinsorte	Catechine CAT [% w / w]
<b>Rotweintrester</b>	
Zweigelt	2,4
Blaifränkisch	2,0
Uhudler 07 rot	1,3
Uhudler 08 rot	1,1
<b>Weissweintrester</b>	
Uhudler 08 weiss	0,8
Welschriesling	0,8
Chardonnay	0,6

Tabelle 6.6 Catechingehalt der Proben im Vergleich

## 6.7. Antioxidative Aktivität (DPPH-Methode)

Auf dem Gebiet der Bestimmung der antioxidativen Aktivität hat sich bis zum jetzigen Zeitpunkt leider noch keine standardisierte Methode durchgesetzt, wodurch es schwierig ist bereits vorhandene Ergebnisse aus der Literatur als Vergleich heran zu ziehen. Insbesondere die Verwendung einer gemeinsamen definierten Einheit ( $IC_{50}$  oder Troloxäquivalent) ist noch nicht absehbar.

Aus diesem Grunde wurde bei der durchgeführten Arbeit sowohl der  $IC_{50}$ -Wert als auch das Troloxäquivalent bestimmt. Das Troloxäquivalent der gewünschten Substanz erhält man durch Division des  $IC_{50}$ -Wertes durch den  $IC_{50}$ -Wert der gewünschten Substanz. Der  $IC_{50}$ -Wert gibt die Substanzmenge an die notwendig ist die DPPH-Radikale auf die Hälfte zu reduzieren. Desto höher die Substanzmenge desto schlechter ist dessen antioxidative Wirksamkeit. Bei der Einheit Troloxäquivalent verhält es sich anders: hier wird die antioxidative Wirksamkeit auf das Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol bezogen, dessen  $IC_{50}$ -Wert 1 beträgt. Ein höherer Troloxäquivalentwert bedeutet höhere antioxidative Wirksamkeit.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Gesamtpolyphenolbestimmung konnte bei Rotweintrester eine deutlich erhöhte antioxidative Aktivität ermittelt werden (siehe Tabelle 6.7). Der durchschnittliche  $IC_{50}$ -Wert bei den untersuchten Rotweintresterproben betrug 1,1g/g TS, der von Weißweintrester 4,1 g/g TS. Umgerechnet in Troloxäquivalent ergibt sich ein Wert von 0,17 TE für Rotweintrester sowie ein Wert von 0,04 TE für Weißweintrester. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den bisher diskutierten Ergebnissen. Ein direkter linearer Zusammenhang zwischen antioxidativer Aktivität und Gesamtpolyphenolgehalt konnte in der Studie von Alonso et al. nicht nachgewiesen werden [29].

Bei der durchgeführten Arbeit konnte im Gegensatz dazu ein bis auf kleine Abweichungen linearer Zusammenhang zwischen dem Gesamtpolyphenolgehalt und der antioxidativen Aktivität gefunden werden. Die größte antioxidative Aktivität konnte bei der Sorte Zweigelt mit 0,25 TE nachgewiesen werden. Die beiden Uhudler Sorten wiesen bei den Rotweintrestern die niedrigste Aktivität mit 0,14 TE für den Uhudler Rot 07 bzw. mit 0,08 TE für den Uhudler Rot 08 auf. Die Aktivität der Weißweintrester liegt in einem sehr engen Bereich wobei die Sorte Welschriesling mit einer antioxidativen Aktivität von 0,05 TE am besten abschnitt. Verglichen mit synthetisch hergestellten Antioxidantien, deren Aktivität sich ca. zwischen 0,4 und 1 TE bewegt (siehe Tabelle 6.8), kann festgestellt werden dass die Weintrester eine natürliche Alternative bieten können. Des Weiteren konnte durch die Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH-Methode gezeigt werden dass die aus den Weintrestern gewonnen Extrakte durchaus in den Initiationsschritt des oxidativen Kettenmechanismus eingreifen können.



Sorte	IC <sub>50</sub> [g/g]	TE [g/g]
<b>Rotweintrester</b>		
Zweigelt	0,61	0,25
Blaifränkisch	0,79	0,2
Uhudler 07 rot	1,11	0,14
Uhudler 08 rot	1,91	0,08
<b>Weißweintrester</b>		
Welschriesling	2,92	0,05
Chardonnay	3,94	0,04
Uhudler 08 weiss	5,40	0,03

Tabelle 6.7 IC<sub>50</sub> Werte und TE der Proben im Vergleich

Vergleichssubstanz	IC <sub>50</sub> [g/g]	TE [g/g]
BHA	0,15	1,05
Trolox	0,15	1,00
BHT	0,27	0,58
Tocopherol	0,28	0,55
Ascorbylpalmitat	0,37	0,41

Tabelle 6.8 IC<sub>50</sub> Werte und TE der Vergleichssubstanzen im Vergleich

## 6.8. Antioxidative Aktivität (β-Carotin Bleaching)

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels der β-Carotin Bleaching Methode ermöglicht es, eine Aussage bezüglich der Fähigkeit der Probe in den Propagationsschritt des oxidativen Kettenmechanismus einzugreifen zu treffen.

Die durchschnittliche antioxidative Aktivität der Rotweintrester betrug zwischen 529 und 619 AAC, die der Weißweintrester zwischen 315 und 538 AAC (siehe Tabelle 6.9). Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich dass der Unterschied zwischen Rot- und Weißweintrester nicht mehr so deutlich ist wie dies bei der Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH-Methode der Fall war. Die Sorte Zweigelt weist zwar mit 619 AAC wie schon bei der DPPH-Methode die höchste antioxidative Aktivität auf, jedoch ist der Weißweintrester der Sorte Welschriesling mit 538 AAC in seiner Aktivität höher als der Rotweintrester der Sorte Blaifränkisch mit 529 AAC. Die niedrigste antioxidative Aktivität weist wiederum die Sorte Chardonnay mit 315 AAC auf.

Betrachtet man die antioxidative Aktivität der konventionellen Vergleichssubstanzen (siehe Tabelle 6.10), kann festgestellt werden, dass sowohl Ascorbylpalmitat als auch Gallussäure eine deutlich niedrigere Aktivität aufweisen als die übrigen Antioxidationsmittel. Auch ist der quantitative Unterschied zwischen den Vergleichssubstanzen und den untersuchten Proben nicht mehr so groß wie bei der Bestimmung mittels DPPH-Methode. Die Ergebnisse lassen weiters die Aussage zu dass kein

direkter Zusammenhang zwischen der antioxidativen Wirksamkeit im Propagationsschritt und dem Gesamtpolyphenolgehalt besteht. Welche Substanzen hierfür verantwortlich sind wäre Ziel weiterer Untersuchungen.

Sorte	AAC
<b>Rotweintrester</b>	
Zweigelt	619
Uhudler 07 rot	608
Uhudler 08 rot	563
Blaufränkisch	529
<b>Weissweintrester</b>	
Welschriesling	538
Uhudler 08 weiss	464
Chardonnay	315

Tabelle 6.9 AAC Werte der Proben im Vergleich

Vergleichssubstanz	AAC
BHA	996
BHT	989
Tocopherol	949
Ascorbylpalmitat	375
Gallussäure	288

Tabelle 6.10 AAC Werte der Vergleichssubstanzen mit Vergleich

## 6.9. Conclusio

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben verschiedener Weintrester aus Österreich wiesen durchaus ein interessantes antioxidatives Potential auf, welches in weiterer Folge auch für die kommerzielle Nutzung eine Alternative zu den bereits vorhandenen synthetischen Antioxidationsmitteln bietet.

Ein linearer Zusammenhang zwischen dem Gesamtpolyphenolgehalt und der antioxidativen Aktivität konnte ebenfalls erkannt werden und sollte genauer untersucht werden.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung

In Zeiten zunehmender Rohstoffknappheit weltweit wird es immer wichtiger Nebenstoffströme, die bei der Lebensmittelproduktion anfallen, zu analysieren. Dadurch kann noch nicht genutztes Potential erkannt werden um zukünftigen Engpässen bei der Versorgung entgegenzuwirken. Bei der Weinherstellung fallen ca. 20-30% an Reststoffen an, die zur Zeit noch sehr selten im Lebensmittelbsektor weiterverwertet werden. Ein ernährungsphysiologisch gesehen interessantes Hauptabfallprodukt bei der Weinerzeugung stellen die Preßrückstände dar, auch Trester genannt. Die ausgepressten Weintrauben und Stängel enthalten eine Vielzahl an polyphenolischen Inhaltsstoffen welche antioxidativ wirksam sind und dadurch die Fähigkeit besitzen, freie Radikale abzufangen und unwirksam zu machen. Freie Radikale entstehen im Körper durch negative Umwelteinflüsse wie etwa Stress und sind unter anderem für den Abbau von gesundem Zellmaterial verantwortlich, welcher durch die Einnahme von Antioxidantien über die Nahrung vermindert werden kann. Aus diesem Grund bieten sich Tresterextrakte sehr gut als Nahrungsergänzungsmittel an, welche die Regenerationsfähigkeit des Körpers unterstützen.

Die wichtigsten antioxidativ wirksamen Polyphenole im Weintraubentrester bilden die Catechine, Flavonoide und Proanthocyanidine. Diese wurden aus wässrigen ethanolischen Tresterextrakten quantitativ bestimmt. Bei der Bestimmung der Gesamtpolyphenole mittels der Folin-Ciocalteu Methode als GAE (gallic acid equivalents, w/w%) konnte in Rotweintrester ein deutlich höherer Gehalt (10,3-13,8%) als in Weißweintrester (5,0-7,5%) festgestellt werden. Die Bestimmung der Flavonoide mittels der modifizierten  $\text{AlCl}_3$ -Methode ergab für Rotweintrester einen Gehalt zwischen 1,9 und 3,2%, welcher deutlich über dem von Weißweintrester mit 1,3 bis 1,8% liegt. Die Proanthocyanidine wurden anhand einer modifizierten Butanol-HCl Methode quantifiziert und ergaben für Rotweintrester Werte zwischen 1,5 und 3,5%, für Weißweintrester Werte zwischen 0,5 und 0,8%. Der Gehalt an Catechinen anhand der DAC Methode quantifiziert betrug in Rotweintrester zwischen 1,1 und 2,4%, die in Weißweintrester 0,6 bis 0,8%.

Die Ergebnisse zeigen dass Rotweintrester reicher an polyphenolischen Inhaltsstoffen sind als Weißweintrester.

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität erfolgte zum einen anhand der DPPH Methode, zum anderen anhand der  $\beta$ -Carotin Bleaching Methode. Bei der DPPH Methode wird ein freies Radikal (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) vorgelegt und dessen Abnahme nach Zugabe der Probe beobachtet. Dadurch kann eine Aussage getroffen werden inwiefern die Probe in den Initiationsschritt der Oxidation einschreiten kann und als Antioxidans agiert. Die Ergebnisse werden dabei in Verhältnis zu einer Bezugssubstanz (Trolox) gestellt und als Troloxäquivalent angeführt.

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH Methode ergab bei Rotweintrester eine höhere Aktivität (0,08-0,25 TE) als bei Weißweintrester (0,03-0,05 TE).

Anhand des  $\beta$ -Carotin Bleachings kann die antioxidative Wirksamkeit einer Probe in einer angereicherten O/W-Emulsion abgeschätzt werden, wodurch man eine Aussage über die Fähigkeit der Probe in den Propagationsschritt der Oxidation einzugreifen erhält. Die Berechnung des AAC (Antioxidant Activity Coefficient) -Wertes ergab für Rotwein eine antioxidative Aktivität zwischen 529 und 619 AAC, für Weißwein Werte zwischen 315 und 538 AAC. Somit kann in Rotweintrester eine höhere antioxidative Aktivität als in Weißweintrester festgestellt werden. Vergleicht man den Gehalt an polyphenolischen Inhaltsstoffen mit der antioxidativen Aktivität, kann ein grundlegender Zusammenhang erkannt werden und grundsätzlich die Aussage getroffen werden, dass ein hoher Gehalt an Polyphenolen auch eine hohe antioxidative Aktivität ermöglicht. Die antioxidative Aktivität jedoch rein auf die Polyphenole zurück zu führen ist nicht möglich, da noch eine Reihe anderer Substanzen durch Synergieeffekte zu einer hohen antioxidativen Aktivität beitragen können.

Die Untersuchungen haben aufgezeigt dass die Gewinnung und Nutzung der in Weintrester vorhandenen Polyphenole, insbesondere jene in Rotweintrester, eine sinnvolle Alternative zur bisherigen Verwertung dieses Reststoffes bietet. Die Beimengung von Tresterextrakten zu Erfrischungsgetränken zum Beispiel würde dem momentanen Trend sich bewusst und gesund zu ernähren durchaus gerecht werden und eine weitere interessante Alternative zu den bisherigen Nutzungsmethoden wie etwa der Verwendung als Heizpellets oder Düngemittel anbieten.

# Literaturverzeichnis

1. Belitz H.-D.; Grosch, W.S.P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer-Verlag.
2. Pokorny J.; Yanishlieva, N.G.M., *Antioxidants in food* 2001: Woodhead Publishing Limited.
3. University, W. *Food-Info*.
4. Peter Kuhnert, B.M., Uwe-Jens Salzer, *Handbuch Lebensmittelzusatzstoffe* 2007: Behr's Verlag.
5. Margalit, Y., *Concepts in Wine Chemistry*. The Wine Appreciation Guild, 1997.
6. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996. **20**(7): p. 933-956.
7. Böhm H.; Boeing, H.H.J.R.B.K.A., *Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen*. *Z Ernährungswiss*, 1998. **37**: p. 147--163.
8. Bagchi, D., et al., *Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention*. *Toxicology*, 2000. **148**: p. 187-197.
9. Ribeiro de Lima, M.T., et al., *Determination of Stilbenes (trans-Astringin, cis- and trans-Piceid, and cis- and trans-Resveratrol) in Portuguese Wines*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(7): p. 2666-2670.
10. Dourtoglou, V.G., et al., *Trans -Resveratrol Concentration in Wines Produced in Greece*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1999. **12**(3): p. 227-233.
11. Sotheeswaran, S. and V. Pasupathy, *Distribution of resveratrol oligomers in plants*. *Phytochemistry*, 1993. **32**(5): p. 1083-1092.
12. *Der Weinbau in Österreich 2009, 2011*, Statistik Austria.
13. Klöck, G. and A. Noke, *Veredlungsprodukte aus ungenutzten Stoffströmen der Lebensmittelverarbeitung*, *Industrial Ecology*, A. Gleich and S. Gößling-Reisemann, Editors. 2008, Vieweg+Teubner. p. 88-96.
14. Schreiner, M. *Wärme- und Heiztechnik (Grundlagen)*. 2011 <http://energieberatung.ibs-hlk.de/>.
15. Bauer-Christoph, C., *Spirituosen und spirituosenhaltige Getränke, Handbuch für Lebensmittelchemiker*, W. Frede, Editor 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 719-735.
16. Kroyer, G., *Gesundheitsförderliche Inhaltsstoffe von Produkten aus der Weinverarbeitung*, *Poster Lebensmittelchemikertage Graz*, 2010
17. Böchzelt, H., *Wertstoffgenerierung aus dem „Abfallprodukt“ Traubentrester*
18. Seidel, O. and R. Steiner, *Erprobung einer Verfahrenskombination aus Hochdruck-Feststoffextraktion mit CO<sub>2</sub> und Hochdruck-Absorption*

- am Beispiel der Aromengewinnung aus Weintrester und Orangenschalen. *Chemie Ingenieur Technik*, 2002. **74**(5): p. 602-602.
19. Puntigam, B., *Entwicklung einer hautstraffenden Creme mit Zusatz von phenolreichen Extrakten aus Produkten der Rebsorte 'Blauer Wildbacher'*. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 2006. **56**: p. 179-190.
  20. Makris D. P.; Boskou, G.A.N.K., *Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007. **20**: p. 125--132.
  21. Li, H., et al., *Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines*. *Food Chemistry*, 2009. **112**(2): p. 454-460.
  22. Dreosti, I.E., *Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa, and Wine*. *Nutrition*, 2000. **16**(7/8): p. 649--692.
  23. Stasko A.; *A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines*. *LWT - Food Science and Technology*, 2008. **41**: p. 2126--2135.
  24. Teissedre P.-L.; Landrault, N., *Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability*. *Food Research International*, 2000. **33**: p. 461--467.
  25. M. López-Véleza, F.M.-M.C.D.V.-R., *The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003. **43**(3): p. 233--244.
  26. Soleas G. J.; Dam, J.C.M.G.D.M., *Toward the Fingerprinting of Wines: Cultivar-Related Patterns of Polyphenolic Constituents in Ontario Wines*. *J. Agric. Food Chem.*, 1997. **45**: p. 3871--3880.
  27. Baydar N. G.; \ "Ozkan, G., *Tocopherol contents of some Turkish wine by-products*. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006. **223**: p. 290--293.
  28. Gronbaek, M., et al., *Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits*. *BMJ*, 1995. **310**(6988): p. 1165-1169.
  29. Alonso, Å.M., et al., *Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**(21): p. 5832-5836.
  30. Negro, C., L. Tommasi, and A. Miceli, *Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts*. *Bioresource Technology*, 2003. **87**(1): p. 41-44.
  31. Ruberto, G., et al., *Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars*. *Food Chemistry*, 2007. **100**(1): p. 203-210.
  32. Möbius Chr. H.; Görtges, S., *Polyphenolbestimmung für die Praxis*. *Die Weinwissenschaft*, 1974. **29**(5): p. 241--253.
  33. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. *LWT - Food Science and Technology*, 1995. **28**(1): p. 25-30.
  34. Luximon-Ramma A.; Bahorun, T.S.M.A.O., *Antioxidant Activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in Extracts of Cassia Fistula*. *J. Agric. Food Chem.*, 2002. **50**: p. 5042--5047.

35. Porter, L.J., L.N. Hrstich, and B.G. Chan, *The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin*. *Phytochemistry*, 1985. **25**(1): p. 223-230.
36. Thies M.; Fischer, R., *Über eine neue Farbreaktion zum mikrochemischen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Catechinen*. *Mikrochimica Acta* (Wien), 1971: p. 9--13.
37. Zironi R.; Buiatti, S.C.E., *Evaluation of a new colourimetric method for the determination of catechins in musts and wine*. *Vitic. Enol. Sci.*, 1992. **47**: p. 1--7.
38. Zhishen, J., T. Mengcheng, and W. Jianming, *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. *Food Chemistry*, 1999. **64**(4): p. 555-559.
39. Marco, G., *A rapid method for evaluation of antioxidants*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1968. **45**(9): p. 594-598.
40. von Gadow, A., E. Joubert, and C.F. Hansmann, *Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (Aspalathus linearis),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. **45**(3): p. 632-638.
41. Hammerschmidt, P.A. and D.E. Pratt, *Phenolic antioxidants of dried soybeans*. *Journal of Food Science*, 1978. **43**(2): p. 556-559.
42. Cooper, K.A., M. Chopra, and D.I. Thurnham, *Wine polyphenols and promotion of cardiac health*. *Nutr Res Rev*, 2004. **17**(1): p. 111-30.
43. Di Majo, D., et al., *The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents*. *Food Chemistry*, 2008. **111**(1): p. 45-49.