

*На правах рукописи*

**СУЛТЫГОВА**  
**Захират Хасановна**

**НОВЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
ПРОЦЕССОВ, ПРОТЕКАЮЩИХ В РАСТВОРАХ  
ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ВИН**

02.00.04 -  
Физическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Москва - 2004

**Работа выполнена:** в Ингушском государственном Университете

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук,  
доцент **Борисов И.М.**

доктор химических наук,  
профессор **Ляпина Н.К.**

доктор химических наук,  
профессор **Ланин С.Н.**

**Ведущая организация:** Институт проблем химической физики РАН

Защита с о "17" сентября 2004 г. в 14 ч.а заседании  
Диссертационного совета Д 002.004.01 Института органической химии УНЦ  
РАН по адресу: Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, д.71

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ УНЦ РАН.

Автореферат разослан "12" ноября 2004 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета,  
доктор химических наук

Ф.А. Валеев

2005-4  
19195

908040

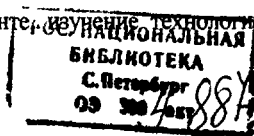
## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Физическая и аналитическая химия биополимеров такого сложного техногенного продукта, как вино, является единственным подходом к объективной инструментальной оценке его качества, что и определяет актуальность настоящей работы, как в теоретическом, так и в практическом плане. В последнее время в России и странах СНГ сократилось производство винограда, и, следовательно, натуральных виноградных вин. При отсутствии конкурентной среды и существующем дисбалансе спроса и предложения наблюдается неограниченный рост производства и потребления фальсифицированной винопродукции, как отечественного, так и импортного производства. Отсутствие инструментальных экспресс-методов оценки качества вин и виноматериалов способствует такому расширению производства некачественной не сертифицированной продукции и создает угрозу здоровью потребителей.

Практически до середины 80-х годов в отечественной винодельческой промышленности существовал жесткий контроль выпускаемой продукции и используемого сырья. Поэтому в научных исследованиях практически не стоял вопрос определения качества натуральности виноматериалов и вин. Основные исследования были посвящены изучению методов, позволяющих прогнозировать устойчивость вин к возникновению физико-химических помутнений, так как непродолжительная розливостойкость отечественной винодельческой продукции наиболее часто является причиной снижения ее конкурентоспособности на внутреннем и внешнем рынках.

Актуальной проблемой на современном этапе является упорядочение биохимических принципов работы винодельческих предприятий, повышение эффективности их производства и организация жесткого государственного контроля над качеством выпускаемой продукции на современном научно-техническом и технологическом уровне. Весьма важной в связи с этим является задача определения качества выделенных технических сортов плодов и ягод, обоснование их оптимальных пропорций в ассортименте, изучение технологических свойств и



сортовых особенностей виноматериалов, нормирование физико-химических показателей, а также разработка основных направлений комплексного использования плодов и ягод по характерным зонам регионов страны с учетом сроков их созревания, создание безотходной технологии переработки плодов и ягод. Устойчивость вин к помутнению обычно контролируют либо визуально (в лучшем случае спектрофотометрически), либо экспертно, путем определения количества образовавшихся в системе коллоидов определенного размера за контрольное время при заданных физико-химических воздействиях. В настоящее время не существует объективных количественных инструментальных методов определения натуральности соков, виноматериалов и вин и идентификации их эталонному образцу, соответствующему продукту, полученному из качественного сырья, с соблюдением всех параметров и особенностей технологического цикла, что определяет актуальность предложенных подходов и методов.

Сложившаяся ситуация объясняется крайней ограниченностью и достаточной сложностью работ, посвященных комплексной характеристике биополимерной фракции вин. Об этом свидетельствует анализ данных, известных в литературе. Объектом пристального внимания на протяжении последних нескольких десятилетий являются белки, в меньшей степени изучены полисахариды и практически не исследованы лигниноподобные полифенольные вещества натуральных соков, виноматериалов и вин. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению химических свойств и способов стабилизации вин против коллоидных помутнений, основанных на физическом, физико-химическом, ферментативном воздействии, до сих пор не выявлены наиболее практичные и информативные инструментальные методы определения качественных и количественных характеристик полимеров виноматериалов, а также способы контроля технологического процесса и его промежуточных полупродуктов. В настоящей работе впервые проведен комплексный систематический физико-химический анализ биополимеров плодово-ягодных соков и виноматериалов, позволяющий проводить их инструментальную идентификацию. Разработаны методы создания Идентификационных карт соответствия, для оценки

качества винодельческой продукции на соответствие лучшим эталонным образцам натуральных вин и соков, позволяющие проводить объективную идентификацию и сертификацию конечной продукции и сырья. Этим, в принципе, и определяется актуальность настоящей работы.

#### Дели и задачи исследования.

Целью настоящей работы является создание хромато - электрофоретического метода как надежного инструментального способа определения качественных и количественных характеристик высокомолекулярных компонентов плодово-ягодных соков, виноматериалов и вин, а также изучения и прогнозирования склонности вин к помутнению.

Для решения этой проблемы необходимо было выявить и оценить информативность различных физико-химических методов исследования качественных и количественных характеристик биополимеров в тонких сложных дисперсных системах, какими являются соки и вина. При этом было найдено, что оптимальным подходом является совместное использование методов гель-хроматографии и электрофореза. Следовательно, необходимо было разработать сопряжение этих методов для исследования электрофоретической подвижности отдельных хроматографических фракций биополимеров, разделенных на компоненты (белки, углеводы, полифенолы) различными биохимическими и аналитическими методами.

Необходимо было провести систематические исследования, направленные на выявление особенностей поведения высокомолекулярных соединений виноградного и плодово-ягодного сока, виноматериала и вина при варьировании технологических параметров их получения и переработки для установления общих закономерностей, механизма и путей обеспечения стабильности и качества конечного продукта. Существовала очевидная необходимость получить развернутые количественные характеристики химического состава полимерной фракции вин и ее изменений в зависимости от методов выделения высокомолекулярных соединений и способов стабилизации.

Важно, что на основе количественной характеристики высокомолекуляр-

ных соединений можно исследовать перспективы создания надежного способа диагностики помутнений вин, оценки их качества, а также организации специальных лабораторий по оценке соответствия предлагаемых виноматериалов натуральным винам и сокам для гарантии их качества и охраны здоровья потребителя.

#### Научная новизна.

При решении поставленных задач были впервые получены следующие новые научные результаты:

Впервые проведено комплексное систематическое исследование высокомолекулярных биополимеров, входящих в состав виноградного и плодово-ягодного сока, а также продуктов его технологической переработки на основе методов современного физико-химического анализа. Определены качественные и количественные характеристики различных высокомолекулярных составляющих виноградного сока, виноматериалов и вина (белки, углеводы, полифенолы и их комплексы). Проведено комплексное исследование высокомолекулярных составляющих виноградного сока, виноматериалов и вина.

Установлено, что, применение предварительной обработки плодово-ягодных соков синтетическими высокомолекулярными флокулянтами максимально удаляет окисленные компоненты и, в то же время, осветляет вино, максимально сохраняя антоциановый комплекс, полезные аминокислоты и витамины, что значительно способствует получению высококачественного вина.

Показано, что сульфитированные полифенольные компоненты, выделенные из виноматериала наиболее активно окисляются в щелочной среде, что способствует их естественной устойчивости при нейтральных и слабокислых значениях рН, соответствующих натуральным винам и сокам.

Показано существенное отличие физико-химических характеристик полифенольной составляющей виноматериалов (высоко-, средне- и низкомолекулярных фракций) разных типов виноградных и плодово-ягодных вин.

Обнаружено, что в полифенольной фракции виноматериалов одновременно присутствуют коллоиды углеводов-белковых полиэлектролитных комплек-

сов и ассоциатов, а также сополимеры полисахаридов и полифенолов, причем, если полисахариды в виноматериале встречаются в свободном виде, то полифенолы практически полностью ассоциированы с полисахаридами;

На основе применения разнообразных аналитических физико-химических методов исследований высокомолекулярных соединений виноматериалов разработан электрофоретический метод одновременного качественного и количественного дифференциального анализа белков и полисахаридов в винах и соках. Путем совмещения гель-хроматографии и электрофореза в интервале экспериментально определяемых граничных условий предложен хромато-электрофоретический метод изучения белков, полисахаридов, полифенолов и их комплексов.

Дальнейшее развитие исследований показало, что новые методы определения полисахаридов пригодны как для заряженных, так и электронеутральных составляющих. Впервые разработаны методики, позволяющие качественно и количественно оценить соотношение белков, полисахаридов, их комплексов в виноматериалах, а также дифференцировать их по прочности связей в ассоциатах между белковыми и полисахаридными составляющими. Предложены возможные варианты усовершенствования рецептурно-технологических процессов и корректировки технологических параметров. Продемонстрировано, что разработанный в работе метод планиметрической денситометрии дает значительно более полные и стабильные результаты, чем принятые до сих пор фотометрические методики.

На основе разработанных карт относительной электрофоретической подвижности белковых и полисахаридных компонентов впервые разработан объективный способ оценки качества вин и виноматериалов, а также способы выявления фальсификации винодельческой продукции. Предложены пути дальнейшего развития метода с целью получения технологических паспортов на каждый вид винодельческой продукции.

#### **Практическая значимость.**

Использование в практике виноделия хромато-электрофоретического ме-

- тогда позволит:
1. изучить химический состав сырья, полуфабрикатов и готовой продукции, их физико-химические, биологические и технологические возможности с целью создания оптимальных технологических процессов для переработки сырья с максимальной эффективностью и наилучшими производственными показателями для получения готовой продукции высокого качества;
  2. повысить надежность химико-аналитического контроля на предприятиях;
  3. обеспечить автоматизацию технологических процессов.

По существу, работа открывает новое направление в энохимии, которое рассматривает вино как единую систему, содержащую комплекс биомакромолекул и высокомолекулярных коллоидных структур, исследование которых, позволяет изучать закономерности физико-химических превращений компонентов виноградного сока и виноматериала в целом.

#### **Защищаемые положения.**

Разработан оригинальный электрофоретический метод одновременного количественного дифференциального анализа белков и полисахаридов в винах и соках, а также комбинированного метода гель-хроматографии и электрофореза (хромато-электрофоретический метод) позволяющего охарактеризовать состав белково-углеводно-полифенольных комплексов и определить качество и натуральность практически любого виноматериала и виноградного вина.

Определены принципы и созданы методы оценки физико-химических характеристик белков, полисахаридов, полифенолов и их комплексов, а также оценки эффективности реагентов, стабилизирующих вино в технологическом процессе.

Создана классификация комплексов белков и полисахаридов и способ определения натуральности виноградных соков и вин на основе предложенных карт относительной электрофоретической подвижности их компонентов, основанная на результатах анализа предлагаемого хромато-электрофоретического метода.

При сравнении предложенного метода с широко применяемым химико-аналитическим способом исследования виноматериала и его компонентов вы-



явлено значительное увеличение информативности, заключающееся в одновременном получении количественных и качественных характеристик для ряда компонентов; исключении субъективных ошибок; снижение трудоемкости и времени выполнения экспериментов при увеличении чувствительности по сравнению с любым аналогичным аналитическим методом.

#### **Апробация работы.**

Материалы диссертации докладывались на научно-технических конференциях республик Закавказья (Тбилиси, 1982-2000 гг.), Всесоюзной научно-технической конференции "Повышение эффективности применения полимерных материалов в отраслях промышленности, производящих продукты питания" (Углич, 1983), на научных конференциях Всесоюзного заочного института пищевой промышленности (Москва, 1981, 2000 гг.).

#### **Объем и структура работы.**

Диссертация изложена на 360 страницах, включает таблицы и рисунки. Диссертация состоит из введения, VI глав, выводов, заключения и списка литературы (243 наименований).

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Обладая полезными диетическими и лечебными свойствами, вино имеет высокое биоэнергетическое и эстетическое воздействие на человека. Однако этот ценный пищевой продукт легко поддается фальсификации, что, прежде всего, сказывается на его качестве и влиянии на здоровье потребителей.

Для выявления оптимальных физико-химических методов оценки качества различных вин и соков был проведен литературно-патентный поиск и, прежде всего, изучены современные представления о составе натурального сока, виноматериалов и вина из винограда и плодово-ягодных культур, а также возможные технологические схемы производства виноградных и плодово-ягодных вин и используемые в настоящее время способы фальсификации натуральных вин. Поскольку используемые ГОСТы и рекомендуемые к применению в винодельческой промышленности методы оценки качества виноградных вин не дают надежных критериев, в работе были рассмотрены физические и физико-

химические методы анализа пищевых продуктов. Особое внимание уделено методам определения качества вина по устойчивости к коллоидным и кристаллическим помутнениям. При выборе методов исследования отдельных компонентов виноматериалов и вина, установлено, что они подразделяются на химические способы исследования отдельных компонентов натуральных соков, виноматериалов и вин, электрофоретический метод и хроматографическое определение основных компонентов виноматериалов и вина.

Проведенный литературный обзор свидетельствует об актуальности исследований, направленных на раскрытие механизма коллоидных помутнений вин и, как следствие, четкое обоснование способов их диагностики и профилактики. Совершенно неясно, какую роль в обеспечении стабильности столовых и крепких вин и их помутнения играют высокомолекулярные соединения (белки, полисахариды, полифенолы). Обширные исследования этих веществ натолкнули нас на мысль, что, по крайней мере, часть из них присутствует в винах в виде прочных комплексов. Однако до сих пор не существует количественных методов оценки физико-химических свойств, качества и натуральности виноматериалов и вина, а также способов идентификации исследуемых образцов эталонным, т.е. продукции, изготовленной из качественного сырья и соответствующей всем технологическим и органолептическим параметрам.

В работе представлены объекты и методы исследования виноградного сока, виноматериалов и вин. Анализ любого пищевого продукта - сложная аналитическая задача и главной причиной затруднений является многокомпонентность и индивидуальность состава виноматериала. Это обуславливает необходимость приспособления даже несложных стандартных методов и методик к особенностям состава и физико-химической структуры каждого продукта, т.е. в каждом конкретном случае требуется проведение в той или иной мере аналитической исследовательской работы.

Объекты исследования систематизированы в соответствии с составом и классификацией вин. Производственные и опытные образцы виноматериалов и вин, произведены в различные сезоны виноделия по основным этапам техноло-

гии переработки винограда и плодово-ягодных культур на предприятиях Кабардино-Балкарской АССР, Грузии, Краснодарского края. Методики исследования расположены в соответствии с параграфами каждой главы. Широко известные методики экспериментальным путем адаптированы к исследуемым объектам. Наиболее оригинальные рассмотрены более подробно. Возможные перспективные методы исследования натуральных соков, виноматериалов и вин изложены непосредственно в диссертационной работе.

## **ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ СОКОВ И ВИН**

Для обоснования применения хроматоэлектрофоретического метода в виноделии и в сертификационных лабораториях алкогольной продукции было проведено сравнительное исследование технологических операций получения виноградных и плодово-ягодных вин.

В основе технологии плодово-ягодных вин лежат те же технологические приемы, что и при производстве виноградных вин. Натуральные соки, полученные из ягод и плодов путем прессования, содержат частицы ткани и мякоти, клетки дрожжей диких культур, балластные примеси и т. п. Таким образом, уже в самом способе получения плодово-ягодных соков и вин заложена возможность образования помутнений.

Выбор высокомолекулярных синтетических флокулянтов (ВСФ) для осветления плодово-ягодных соков и вин, а именно, полиакриламида (ПАА), ионообменных смол КФ-4 и КФ-6, полиэтиленоксида (ПЭО) обусловлен высокой молекулярной массой, высокой эффективностью ионогенных групп, способностью к флокуляции в зависимости от конкретных условий производства, отсутствии токсичности.

Эффективность и своеобразие механизма действия ПЭО на дисперсные фазы сока наглядно иллюстрируется данными, полученными нами в специальных опытах при обработке свежеежатого яблочного и ежевичного сока (табл. 1; табл. 2). Оказалось, что наиболее оптимально действует именно ПЭО,

который вызывает значительное понижение количества коллоидных фракций и удаляет белки, сохраняя вместе с тем основные резервы аминокислот, необходимых в дальнейших технологических процессах. Аскорбиновая кислота после обработки остается в неизменном количестве.

Таблица 1.

Содержание коллоидов (в г/л) в яблочном соке и виноматериале (РН-3,6) в зависимости от вида обработки

Вид обработки	Коллоиды			
	общие	обратимые	необратимые	пектин
Свежеотжатый сок				
Контроль	5,370	3,570	1,800	1,436
КФ-6(10мг/л)	3,150	1,720	1,430	0,340
Бн (1.0 г/л) + ПАА (10 мг/л)	3,011	2,198	0,813	0,731
ПЭО(10мг/л)	2,180	1,280	0,900	0,534
Сброженный сок				
Контроль	0,505	0,413	0,092	0,409
КФ-6(10мг/л)	0,272	0,175	0,053	0,156
ПЭО(10мг/л)	0,307	0,275	0,032	0,239
Бн (4 г/л)	0,355	0,280	0,075	0,271

Таблица 2.

Содержание коллоидов (в г/л) в ежевичном соке (РН 3,7) в зависимости от вида обработки

Вид обработки	Коллоиды			
	общие	обратимые	необратимые	пектин
Свежеотжатый сок				
Контроль	2,192	1,889	0,303	0,409
КФ-6 (20 мг/л)	1,360	1,300	0,060	0,037
ПАА (40 мг/л)	1,907	1,692	0,215	0,349
ПЭО(10мг/л)	1,535	1,296	0,239	0,257
Сброженный сок				
Контроль	0,664	0,370	0,294	0,237
КФ-6 (10 мг/л)	0,425	0,257	0,168	0,063
ПАА (25 мг/л)	0,596	0,475	0,121	0,178
ПЭО(10мг/л)	0,568	0,305	0,263	0,114

Согласно литературным данным результаты хроматографического, спектрофотометрического и качественного анализов показали наличие в виноградном соке большого разнообразия полифенолов (рис. 1), а именно производных дельфинидина, петунидина, мальвидина, пеларгонидина. Исследования показали, что при хроматографии ежевичного сока характерно наличие лишь пеларгонидина. В рябиновом соке был найден главным образом цианин, а также едва



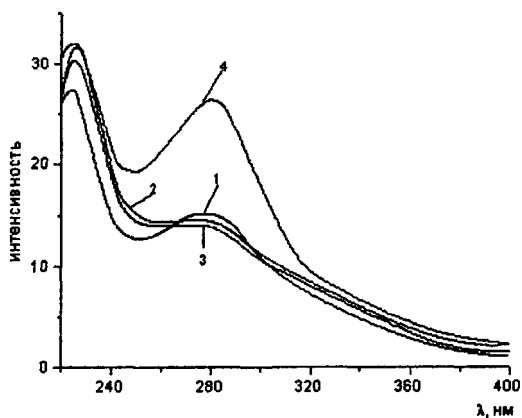
По-видимому, явление комплексообразования оказывает наиболее существенное влияние на видимый спектр водно-спиртовых растворов антоцианов, что следует при сопоставлении наших данных по составу антоцианов отдельных соков, приведенных ранее спектров их поглощения и представленных данных о качественном составе металлов антоцианов. Так, например, для вишневого сока следовало бы ожидать, по крайней мере, четыре полосы поглощения, исходя из состава антоцианового комплекса в вишне (мальвидин, дельфинидин, цианидин, пеларгонидин). На самом же деле регистрируется одна полоса поглощения при 520 нм, которая именно вследствие комплексообразования представляет собой огибающую многих не неразрешенных полос поглощения. Данные ИК-спектроскопии (несколько растянутая полоса  $3385\text{ см}^{-1}$ ) подтверждают наличие комплексной связи с металлом в антоцианах.

Для количественного определения связанных Сахаров в полученном пеларгонидине нами применен энзиматический высокочувствительный метод определения глюкозы с помощью глюкозооксидазы. На основании исследований можно заключить, что пеларгонидин в плодово-ягодных соках находится в форме диглюкозида, в отличие от виноградного сока, содержащего моноглюкозид, что весьма существенно для теоретического предсказания характера взаимодействия флокулянтов с красящими веществами, поскольку наличие сравнительно большого количества связанного сахара делает антоцианы малочувствительными к действию ионогенных флокулянтов.

Общий анализ на содержание полифенольных соединений и специальный анализ на количество антоцианов показали, что обработка ПЭО и катионными высокомолекулярными синтетическими флокулянтами не приводит к заметному снижению количества присущих сокам и винам красящих веществ в формах существования антоцианового комплекса и в содержании металлов в антоциановом комплексе, обуславливающих ценные потребительские качества. Наоборот, при этом извлекаются из соков и вин вредные окрашенные компоненты, которые не только вызывают нежелательное потемнение плодово-ягодных соков, но и маскируют их натуральный аромат.

Главной причиной непрозрачности плодоягодных виноматериалов являются дрожжи, особенно при содержании общего алкоголя до 5 - 8%. При титровании яблочного сусла обнаружено, что в процессе брожения виноматериал теряет до 22-23% от исходного количества титруемой кислоты. Представленные особенности обуславливают применение в технологическом процессе операции подсахаривания, в нашем случае введение фруктозы в сусло, содержащее 7,5% сахарозы, для повышения общего содержания сахара до 17,2%.

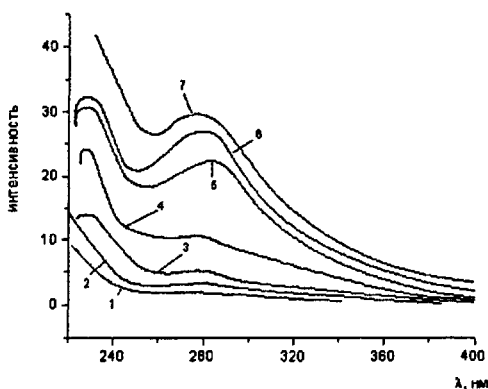
Спектрофотометрическое изучение вин (рис.2) на различных этапах их изготовления было проведено с целью установления степени влияния используемых технологических приемов на физико-химические превращения в процессе формирования виноматериала. Установлено было что, спектрофотометрическое изучение вин на различных этапах их изготовления может фиксировать эти превращения и служить критерием, характеризующим глубину их прохождения. При этом рост полосы оптического поглощения в диапазоне длин волн 250-310 нм выражает, в определенной мере, сложные превращения, в которых принимает участие большинство веществ, входящих в состав вина.



**Рис. 2.** Изменение ультрафиолетового спектра поглощения яблочного сусла (из вакуум-сусла) при брожении и тепловой обработке. 1 - сусло до брожения (17,2% сахара), 2 - бродающее сусло (10% сахара), 3 - крепленый виноматериал (18% об. спирта; 10% сахара), 4 - крепленый виноматериал, обработанный теплом при 60-70° в течение 5 суток.

Было показано значительное различие в спектрах поглощения в ультрафиолетовой области столовых сухих и крепленых вин как виноградных, так и плодово-ягодных. Это различие выражалось в самом характере спектра поглощения (рис.3). Установлено, что образцы одного типа вин, имеющие большую величину коэффициента экстинкции в максимуме кривой поглощения, как правило, отличались более высокими органолептическими свойствами. Исходя из этого сделано предположение, что подсахаривание плодово-ягодного суслу улучшает его свойства в процессе брожения.

Для осветления крепленые образцы обрабатывались: бентонитом; кизельгуром; альбумином крови; смесью используемых веществ; ионитами; теплом - кратковременной пастеризацией (20 мин при 70°C) и нагреванием в течение суток при температуре 65-70°C, а также гексациано-(П)-ферратом калия (ЖКС). Удовлетворительные результаты были получены при применении ионитов, в частности КФ-6 и ЖКС. Максимальное осветление достигается при нагревании виноматериала в течение суток. Пастеризация практических результатов не дает, и при этом изменения спектров поглощения при тепловой обработке сухих столовых виноматериалов менее ощутимы.



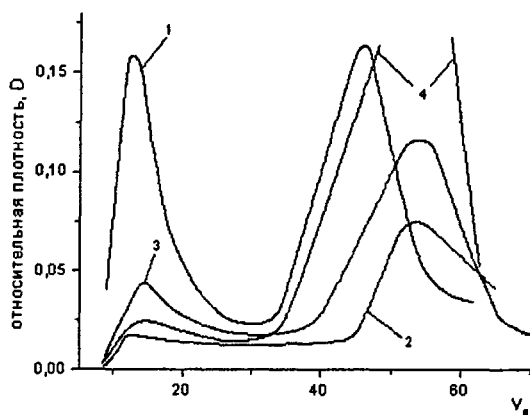
**Рис. 3.** Ультрафиолетовые спектры поглощения различных типов вин.  
 1-Столовое белое (Алиготе); 2-Херес сухой; 3-Плодово-ягодное натуральное (яблочное); 4-Рейнское столовое белое; 5-Токай Южнобережный; 6-Херес испанский; 7-Портувейн португальский



Для исследования характера изменений, происходящих при брожении яблочного сусле, получении сухого и крепленого виноматериалов, обработке последних теплом было использовано фракционирование испытуемых образцов методом гель-фильтрации. Полученные фракции исследовались на полярографе и подвергались спектрофотометрическому анализу в ультрафиолетовой части спектра.

Полярографический анализ фракций всех исследовавшихся образцов показал порядок распределения веществ в них, аналогичный полученному для фракций виноградного сусле и вина Мехузла (1966), а именно, белки, пектины, пептиды (сахароаминные соединения), сахара, фенолы и другие соединения. Характер изменения фракций исследованных образцов, а также величины их оптического поглощения в ультрафиолетовом спектре свидетельствуют о химических превращениях, особенно в образцах, обработанных теплом (*рис 4*).

Проведенные исследования на модельных растворах Сахаров, аминокислот, таннидов, органических кислот, в концентрациях их близких вину, при pH среды 3,0-3,5 показали изменения спектров поглощения модельных растворов указанных веществ после их нагревания, а также то что основным источником образования веществ, обладающих интенсивным поглощением света при 280 нм в рассматриваемых системах, является сахароза. Реакция танина с аминокислотами в водных растворах при нагревании также проходит весьма интенсивно с выделением летучих компонентов и ацетальдегида, при этом, добавление в раствор этилового спирта значительно ускоряет ее течение. Введение в исследуемые системы сернистого ангидрита, ацетальдегида в значительной степени меняет характер физико-химических превращений этих веществ.



**Рис. 4.** Оптическое поглощение фракциями яблочного сусла и готовых виноматериалов при длине волны 280 нм. 1 - яблочное сусло (17,2% сах.), 2 - сухой виноматериал, 3 - крепленый виноматериал, 4 - крепленый виноматериал, обработанный теплом при 65-70°C в течение суток

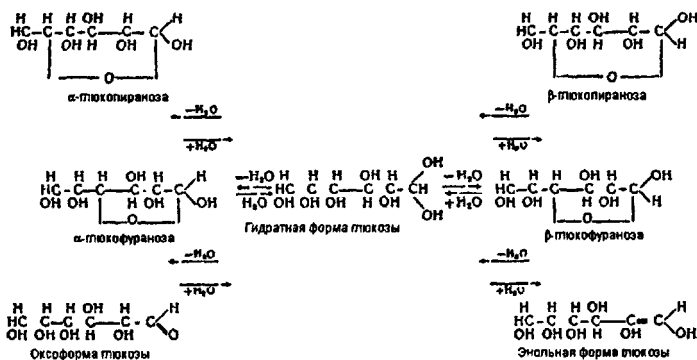
## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАРБОНИЛСОДЕРЖАЩИХ МОНОМЕРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВИНМАТЕРИАЛА С СОЕДИНЕНИЯМИ $SO_2$

Процесс сульфитации естественно предполагает взаимодействие диоксида серы с ионами металлов, присутствующих в сусле. Следовательно, в исследуемой системе наряду с сульфитированием моносахаридов возможно взаимодействие их с сульфитами и сульфатами металлов, образующимися в растворе. Поэтому необходимо было изучить особенности процесса сульфитирования низкомолекулярных компонентов сусла  $SO_2$ .

В качестве модельных систем нами выбраны соединения, содержащие карбонильные (альдегидные или кетонные) группы. Прежде всего, к ним относятся пять моносахаридов: манноза, галактоза, глюкоза, фруктоза и арабиноза; а также группа соединений, образующихся в результате распада Сахаров в процессе биохимической обработки: фурфурол, формальдегид и ацетальдегид.

В водных растворах моносахаридов существует равновесие их различных структурных форм (рис.5), причем открытая карбонильная группа

присутствует только в оксоформе, содержание которой для различных моносахаридов неодинаково. Показано, что равновесие в системе может быть смещено под влиянием определенных физических и химических воздействий. Так, содержание оксоформы возрастает уже при концентрировании раствора моносахаридов, причем это возрастание опережает пропорциональное увеличение аналитической концентрации сахара. Для карбонильных соединений характерна их способность вступать в реакцию с бисульфитом и образовывать карбонилбисульфитные соединения.



**Рис. 5.** Равновесия различных форм карбонильных групп на примере глюкозы

Поскольку бисульфитные соединения моносахаридов часто недоступны для биохимической обработки, была установлена способность к бисульфитации карбонильных групп Сахаров, а также влияние условий переработки и присутствия других органических компонентов на стойкость бисульфитных соединений моносахаридов.

Еще на самых ранних стадиях исследования было обнаружено, что по степени связывания с бисульфитом натрия сахара располагаются в следующий ряд: арабиноза > ксилроза > манноза > галактоза > глюкоза. Сравнение этого ряда с представленным выше расположением моносахаридов по содержанию в них ациклической формы показало, что существует определенная зависимость между степенью ациклизации Сахаров и их способностью образовывать бисульфитные соединения. Константа равновесия бисульфитного соеди-

нения моносахаридов (эта величина обратна константе диссоциации) определяется не только природой сахара, но и его концентрацией в растворе. При неизменной температуре 20° и применении бисульфита натрия при повышении концентрации Сахаров константа равновесия бисульфитного соединения моносахаридов увеличивается (рис. 6).

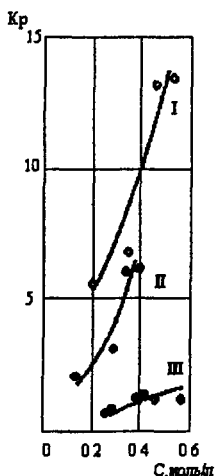
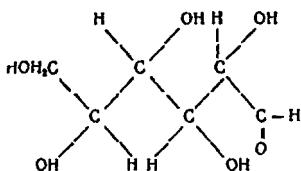


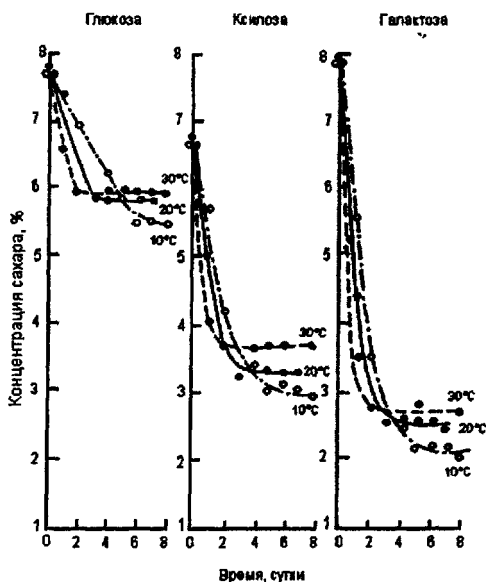
Рис. 6. Изменение константы равновесия сахаробисульфитных соединений при 20°: I – ксилоза; II – галактоза; III – фруктоза.

Влияние температуры на константу равновесия бисульфитных соединений моносахаридов (рис. 7), видимо, объясняется зигзагообразной конформацией ациклических форм простых Сахаров, приводящей к разветвленной цепи, имитирующей конформацию полисахаридов.



Исследование температурной зависимости показало, что независимо от природы сахара равновесное состояние системы устанавливается быст-

рее при повышении температуры бисульфитного раствора моносахаридов. (рис. 7).



**Рис. 7.** Влияние температуры на изменение степени связывания сахара с бисульфитом

Степень связывания моносахаридов с бисульфитом зависит также от природы катиона, входящего в бисульфит. Так, при эквимолекулярной концентрации различных оснований степень связывания ксилозы с бисульфитом выражается рядом:  $Mg > Ca > Na > NH_4$ .

Изучение смеси простых Сахаров бисульфитном растворе (например, глюкоза и ксилоза, глюкоза и галактоза, ксилоза и галактоза), показало что количество моносахаридов, вступивших в соединение с бисульфитом, определяется индивидуальными свойствами каждого моносахарида, входящего в состав смеси, и выражается рядом ксилоза + галактоза > ксилоза + глюкоза > галактоза + глюкоза. Оказывается, что при наличии в растворе смеси моносахаридов, бисульфитация их протекает не одновременно, а строго последовательно и из двух моносахаридов первый оказывается наиболее реакционноспособным (рис. 8-10).

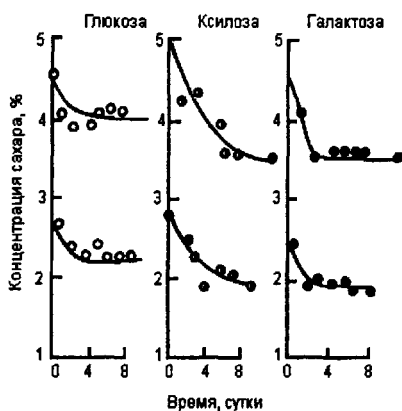


Рис. 8. Равновесное состояние системы сахар – сахаро-бисульфит

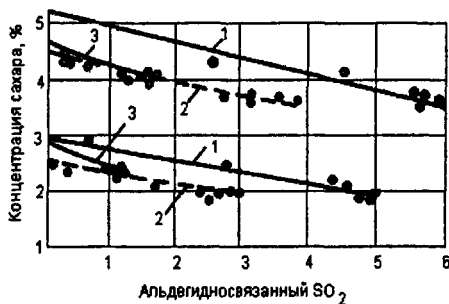


Рис. 9. Влияние концентрации сахаробисульфитных соединений на оптическую активность сахарных растворов: 1 – ксилоза; 2 – галактоза; 3- глюкоза

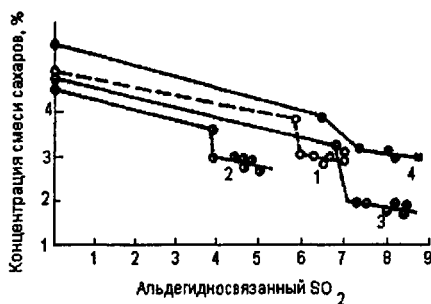
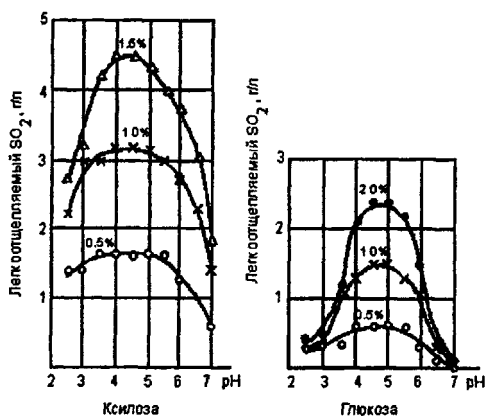


Рис.10. Связывание сахаров с бисульфитом при наличии в растворе смеси сахаров: 1 — глюкоза + ксилоза; 2 — глюкоза + галактоза; 3 — ксилоза + галактоза; 4 — глюкоза + ксилоза + галактоза



**Рис. 11.** Устойчивость сахаробисульфитного соединения при 20° в зависимости от pH раствора.

Для всех моносахаридов существуют зоны стабильности бисульфитных соединений, определяемые в первую очередь величиной pH раствора (рис. 11), которые определены для глюкозы и ксилозы в растворах, содержащих 5%  $\text{O}_2$ . Выявлено, что при изменении pH этих растворов зона наибольшей устойчивости сахаробисульфитных соединений охватывает широкую область значений pH, несколько сужающуюся с повышением концентрации моносахаридов. На рисунке отчетливо видно различное поведение ксилозы и глюкозы. Так, зона стабильности глюкозобисульфитного соединения при 20° охватывает область значений pH от 3,5 до 5,5, а ксилозобисульфитного соединения — от 3 до 6. При этом степень связывания ксилозы с бисульфитом превышает степень связывания глюкозы.

Уменьшение степени связывания простых Сахаров с бисульфитом при повышении значения pH раствора обусловлено переходом бисульфита в моносульфит. Особенность этой реакции в ее обратимости: при обратном подкислении сахаробисульфитных растворов, pH которых был доведен даже до 7,5, сахаробисульфитное соединение в значительной степени восстанавливается.

Равновесное состояние системы сахар — сахаробисульфит является динамическим. Установлено, что при pH раствора 4,65, когда сернистая кислота

более чем на 98% находится в виде ионов бисульфита, моносахариды сахаробисульфитных соединений делятся на две группы по скорости распада. В первую группу, имеющую (при 19°) константу распада карбонилбисульфитного соединения порядка  $K_i \cdot 10^{+4} = 6-9$ , входят моносахариды, гидроксильные группы которых у второго и третьего углеродных атомов находятся в цис-положении (например, манноза). Вторая группа объединяет моносахариды (глюкоза, галактоза, ксилоза), аналогичные гидроксильные группы которых находятся в транс-положении. Константа распада сахаробисульфитных соединений этой группы составляет  $K_i \cdot 10^{-3} = 1,4 - 1,7$ . При низких температурах 1%-ного водного раствора  $SO_2$  с эквимолекулярным содержанием в нем глюкозы за 25 суток связалось всего 2—3% от общего содержания глюкозы.

Большинство бисульфитных соединений летучих карбонильных веществ, не диссоциирует или диссоциирует очень слабо. Так, константа диссоциации бисульфитных соединений формальдегида и ацетальдегида при 18° составляет величины шестого и седьмого порядков ( $10^{-6} - 10^{-7}$ ), в то время как константа диссоциации бисульфитного соединения глюкозы и галактозы — величина первого порядка, а бисульфитного соединения маннозы, ксилозы, арабинозы — величина второго порядка. Фурфурол и формальдегид образуют в бисульфитном и водном растворе БОг наиболее прочные из всех известных соединений. Если фурфурол и формальдегид могут быть удалены из виноматериала, то удаление ацетальдегида, который образуется в качестве промежуточного продукта при биохимической обработке Сахаров или связывание его в побочных реакциях может приостановить нормальное течение биохимических процессов. Реакция присоединения бисульфита натрия к ацетальдегиду практически необратима и протекает мгновенно, т.е. ацетальдегид образует весьма прочное карбонилбисульфитное соединение. В 0,05-молярном растворе при 0° и 30°С степень связывания ацетальдегида с бисульфитом составляет 99,5%.

Показано, что гексозные сахара вступают в реакцию бисульфитации только после пентозных Сахаров и несакхарных карбонильных соединений, а



ацетальдегид бисульфитируется после формальдегида. Благодаря такой последовательности можно создать условия, при которых моносахариды, несмотря на достаточно высокую концентрацию соединений  $\text{SO}_2$ , будут находиться в несвязанной с бисульфитом форме.

Для того чтобы извлечь сахар из бисульфитносвязанной формы, не обязательно вводить в раствор только такой альдегид, который необратимо связывается с бисульфитом. Необходимо лишь, чтобы константа диссоциации бисульфитного соединения вводимого альдегида была меньше, чем константа диссоциации бисульфитного соединения моносахаридов. Например, если в бисульфитные растворы моносахаридов при  $20^\circ$  ввести ванилин, степень связывания которого с бисульфитом в этих условиях равна около 80%, оптическая активность моносахаридов восстанавливается в среднем на 80% (рис. 12).

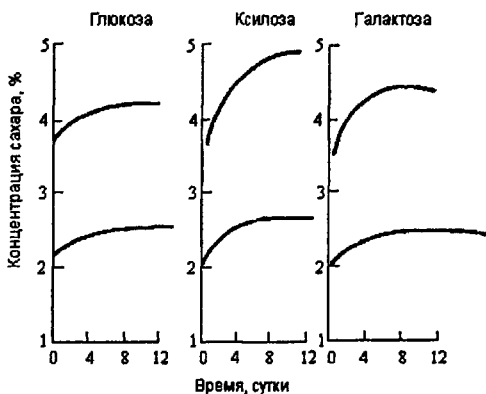
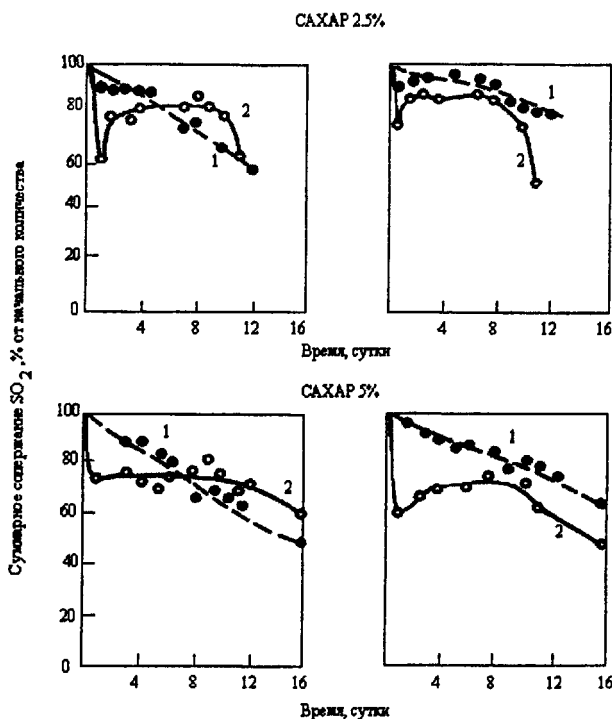


Рис. 12. Восстановление оптической активности сахарных растворов в присутствии несахарных альдегидов



**Рис. 13.** Изменение содержания  $\text{SO}_2$  при восстановлении оптической активности сахарных растворов: 1 - контрольный сахаробисульфитный раствор; 2 - сахаробисульфитный раствор с ванилином (0,2% от содержания сахара)

Следует обратить внимание, что если одновременно с поляризметрическими наблюдениями (при  $20^\circ$ ) за восстановлением оптической активности моносахаридов определять содержание соединений  $\text{SO}_2$  (моносulfит и легко отщепляемый  $\text{SO}_2$ ), то получаются кривые необычной формы (рис.13). В контрольных растворах, содержащих только бисульфитные соединения моносахаридов, суммарная концентрация соединений  $\text{SO}_2$  снижается прямо пропорционально времени. В растворах, содержащих, помимо сахаробисульфита, также и альдегид, в самом начале восстановления оптической активности наблюдается минимум суммарного содержания  $\text{SO}_2$ . При этом с повышением концентрации моносахаридов этот минимум проявляется более четко.

Создается кажущийся эффект, что при восстановлении оптической актив-

ности моносахаридов соединения  $8\text{Og}$  частично временно как бы исчезают из раствора. Однако баланс соединений серы в растворе в этот период восстановления оптической активности Сахаров показал, что общее содержание всех соединений серы не меняется. Переход иона бисульфита от моносахаридов к альдегиду осуществляется, видимо, через некое промежуточное соединение, не открываемое йодом. В частности, это может быть полиэлектролитный комплекс, образованный разветвленными молекулами карбонилбисульфитов за счет образования водородных и Ван - дер - Ваальсовых связей с молекулами  $\text{SO}_2$

Анализ представленных данных показывает, что свойства сульфитированных моносахаридов зависят от тех же параметров, что и полисахаридов. Сахаробисульфитные соединения, обладающие зигзагообразной конформацией, образуют разветвленные цепи, что позволяет по полученным зависимостям с известной степенью точности судить о поведении полисахаридов при сульфитировании. Полученные результаты исследования устойчивости сахаробисульфитных соединений моносахаридов при различных температурах в зависимости от pH раствора, а также образование промежуточного соединения при введении в бисульфитный раствор альдегидов моносахаридов показали, что в нейтральной среде моносахариды виноматериала могут проявлять свойства полиэлектролитов, образуя физико-химическую сетку молекулярных зацеплений. Причем, повышение температуры способствует ее образованию. А взаимодействие сахаробисульфитных соединений моносахаридов с карбонильными соединениями несахарной природы вновь приводит к увеличению количества моносахаров. Таким образом, на стабильность виноматериалов оказывают влияние надмолекулярные структуры, формируемые в системе при взаимодействии моносахаров друг с другом, сульфитирующими компонентами, ионами металлов, а также при изменении технологических параметров (pH, температуры и т. п.).

Смеси карбонильных соединений по-разному относятся к бисульфитации и поэтому были изучены особенности взаимодействия сульфитированных кар-

бонилсодержащих компонентов, выделенных непосредственно из виноматериала с веществами, используемыми при проведении различных технологических операций. При исследовании процесса осветления виноградного сула с применением флокулянтов ПАА и ПЭО были получены полиэлектролитные комплексы (ПЭК) и установлен ряд результатов.

ПЭК получали смешиванием водных растворов сульфитированных полисахаридов, выделенных из виноматериала марки Ркацители и ПАА при соотношении 1: 1 в расчете на эквивалентные массы  $\text{SO}_3^-$  групп полисахаридов и  $\text{N}^+$  групп ПАА. Концентрация полиэлектролита в растворе составляла 0,4 г/л и ПЭК такого рода являются продуктами незавершенных реакций, их растворимость в значительной степени зависит от молекулярной массы полисахаридов. По данным седиментационного анализа, частицы комплекса, образующиеся в результате смешения полиэлектролита ПАА с ПС высокой и средней ММ, содержат весь введенный в реакцию ПАА и различное количество полисахаридов. Причем, с увеличением молекулярной массы ПС их количество, включенное в частицу ПЭК возрастает. Растворимость в воде, одно из необходимых свойств полиэлектролитных комплексов, в присутствии растворов щелочных металлов уменьшается. Следует отметить, что растворимость полиэлектролитных комплексов значительно отличается от растворимости индивидуальных полиэлектролитов. В целом макромолекулы полиэлектролитного комплекса ведут себя как индивидуальное макромолекулярное соединение, способное изменять свою конформацию. Показано, что растворимость ПЭК возрастает в лиотропном ряду катионов  $\text{Li} > \text{Na} > \text{K}$ , что соответствует порядку связывания этих катионов с сульфогруппами полисульфокатионитов.

Введение в исследуемый комплекс раствора ПЭО может приводить к агрегированию сформированных полиэлектролитных комплексов ПАА - ПС и образованию структуры подобной войлоку, что и влечет за собой удаление последней из раствора. При последовательном введении флокулянтов с увеличением молекулярной массы вязкость монотонно, хоть и незначительно возрастает. При совместном введении она величине значительно ниже и проходит через

максимум. Очевидно, что совместное введение флокулянтов предпочтительнее.

Добавление полиэтиленоксида в систему, предварительно стабилизированную ПАА, приводит к переходу последней из устойчивой системы в неустойчивую, т.е. к выпадению в осадок агрегированных частиц с максимальным содержанием ПЭО. После чего исследуемая система естественно вновь становится устойчивой. Совместное введение флокулянтов в исследуемую систему характеризуется совмещением процессов стабилизации и флокуляции макромолекулярных частиц, что создает изначально устойчивую систему и препятствует плавному переходу ее в неустойчивую. Поэтому, для того, чтобы стабилизация могла предшествовать флокуляции количество ПЭО должно быть минимальным или содержание ПАА и ПЭО должно быть одинаковым.

Таким образом, исследован механизм осветления вин. Показано, что несоблюдение технологических режимов в процессе осветления приводит к нарушению химического равновесия высокомолекулярная - низкомолекулярная фаза. Как следствие, образуются дополнительные высокомолекулярные образования путем присоединения низкомолекулярных веществ к полимерным с последующей агрегацией частиц, и, следовательно, к помутнению вина на следующих стадиях переработки.

Образование фрагментов частиц полиэлектролитных комплексов с полисахаридами, выделенными из виноградного виноматериала, с низкой, средней и высокой молекулярной массами объясняется тем, что ПАА стабилизирует в водном растворе макромолекулы со средней и высокой ММ. Макромолекулы с низкой молекулярной массой, напротив, агрегируются. А введение ПЭО в свежесжатый сок плодовых культур приводит к флокуляции Сахаров со средней и низкой ММ, поскольку полисахаридов в такого рода системах содержится мало. Следует сделать вывод: результаты исследований взаимодействия полисахаридов из плодовых культур и виноградного виноматериала с высокомолекулярными синтетическими флокулянтами совпадают.

В основе процесса выдержки и созревания вина лежат окислительно-восстановительные реакции. В виноматериалах растворенный кислород окис-

ляет в первую очередь дубильные и красящие вещества вина, при этом образуются промежуточные продукты типа хинонов, которые затем окисляют другие компоненты, например аминокислоты и этиловый спирт.

Нами исследовано изменение интенсивности хемилюминесценции полифенолов, выделенных из винограда сорта Каберне при окислении, пероксидом водорода в зависимости от pH раствора. Хемилюминесценция, сопровождающая окисление полифенолов в условиях обработки пероксидом водорода однозначно свидетельствует о том, что генерация возбужденных состояний в полифенолах осуществляется не только при фотовозбуждении, но и под действием химических реагентов.

Проведенные исследования показали, что сульфитация сока или виноматериала способствует стабилизации системы и упорядочению межмолекулярной структуры моно- и полисахаридов. Влияние ее на фенольные соединения в натуральных соках и виноматериалах неоднозначно, вследствие недостаточности фактических данных о соотношении низко- и высокомолекулярных компонентов и их структурных особенностях.

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕНОЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВИНМАТЕРИАЛОВ, ВИНА И НАТУРАЛЬНЫХ СОКОВ**

Совершенствование технологии и повышение качества столовых вин базируется на изучении состава полифенолов и их превращений при переработке винограда, плодоваягодных культур и обработке виноматериалов. Наименее изученными из полифенолов вин являются их высокомолекулярные соединения (ВМС). Из-за большого многообразия, сложности химического строения ВМС и их относительно низкой концентрации, состав, структура и свойства этих веществ еще полностью не выяснены.

Выделение полифенольной компоненты из виноградных и плодоваягодных материалов проводили при одинаковых условиях. Была разработана методика выделения высокомолекулярных полифенолов гель-фильтрацией на сефадексе LH-20, а, после концентрирования и определения молекулярной массы,

последующим использованием высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) для разделения полученных фракций по степени их гидрофобности.

Результаты, полученные методами ЯМР( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ), ИК-спектроскопии, поглощения в УФ-области и элементорганического анализа свидетельствуют о том, что в яблочном Белом крепком вине содержится 60—110 индивидуальных ВМС, которые составляют три большие группы.

К первой группе, составляющей 13% от общего количества, относятся соединения с ММ около 4000: танины, полисахариды и их комплексы, не имеющие четкого максимума поглощения, желтоватой окраски. Вторая группа (46%) с ориентировочной ММ 2000 представлена полимеризованными антоцианами и сополимерами антоцианов и танинов, имеет красную окраску и обладает максимумом поглощения при 510—530 нм. Третья группа (41%), ММ до 800 состоит из полифенолов, углеводов и алифатических соединений с максимумом поглощения при 460 нм. Полученные результаты исследований могут быть использованы при разработке способов обеспечения стабильности окраски, повышения гарантийных сроков хранения, регулирования превращения состава полифенолов при созревании вина для улучшения качества столовых и крепленых вин.

Показано, что если полисахариды и моносахариды удастся выделить из виноматериалов практически чистыми, то в фенольных компонентах всегда содержатся углеводы.

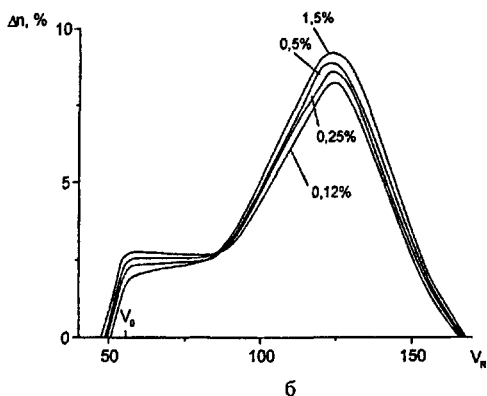
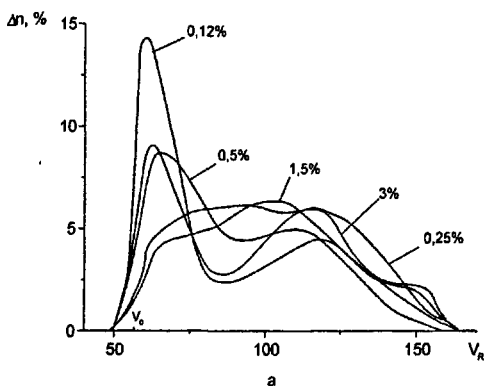
Методом электродиализа полифенольная фракция также была разделена на три группы: первая - неподвержена электродиализу, вторая - непосредственно диализируемая фракция и третья - низкомолекулярная фракция фенольной компоненты вина. Ультрамикроскопические исследования показали, что нагревание и увеличение кислотности приводит к изменению количества видимых частиц и изменению окраски конуса наблюдаемого в оптический микроскоп, образуемого частицами с высокой степенью дисперсности.

Введение в исследуемую систему дополнительного низкомолекулярного

электролита сдвигает равновесие низко- и высокомолекулярной полифенольной фракции в сторону увеличения истинных коллоидов. Анализ данных полученных ультрамикроскопически и методом электродиализа показал, что только часть полифенольной фракции представляет собой коллоиды, которые заряжены отрицательно, вследствие сульфитирования фенольных веществ отрицательно заряженными сульфоксильными группами. При введении в полифенольную фракцию бисульфита обнаружилась определенная зависимость между образованием карбонильносвязанного SCb и величиной pH раствора и показано, что зона максимального связывания полифенолов с бисульфитом лежит в области pH 1-3. При более высоких значениях стабильность этого соединения резко падает. Взаимодействие полифенольной фракции виноматериала с адсорбентами осветлителями, например с кизельгуром, приводит к поглощению легко отщепляемого SO<sub>2</sub>, что и вызывает потемнение растворов после адсорбции, т.е. разложение полифенольных комплексов на более низкомолекулярные фракции.

Известно, что полисахариды практически нерастворимы в диметилформамиде и диметилсульфоксиде. Поэтому представляло интерес подробно рассмотреть элюионное поведение полифенольных фракций виноматериала с различной молекулярной массой при гель-проникающей хроматографии в чистом М,№-диметилформамиде. Основным экспериментальным доказательством существования полиэлектролитных эффектов и их влияния на элюионное поведение исследуемого полимера при гель-проникающей хроматографии является установление четко выраженных зависимостей удерживаемого объема  $V_R$  и формы хроматограмм от концентрации образца в пробе, а также уменьшение  $V_R$  фракции образца, отобранной из элюата и повторно пропущенной через колонку. Нормированные по площади совмещенные хроматограммы полифенольной фракции виноматериала различной молекулярной массы (рис. 14), полученные при различной концентрации образца во вводимой пробе, бимодальны.





**Рис. 14.** Совмещенные нормированные хроматограммы полифенольной фракции ММ 4 000(а) и ММ 2 000(б), полученные при различной концентрации (%) образца во вводимой пробе

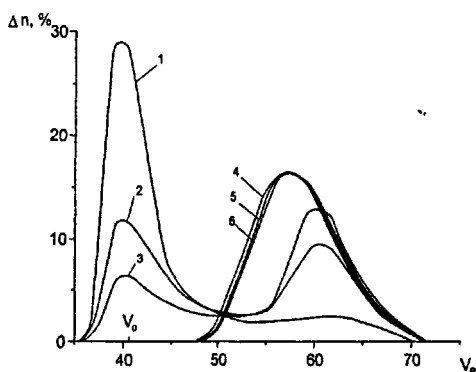
При уменьшении концентрации образца в пробе первый пик как фракции с молекулярной массой 4 000, так и 2 000 увеличивается, причем для более высокомолекулярной фракции этот эффект выражен значительно сильнее. Для обоих образцов удерживаемый объем, соответствующий первым пикам, меньше свободного объема колонки, определенного с помощью полистирольного стандарта с  $M_w = 2145000$  а. е. м., т.е. полифенольные фракции в диметилформамиде ведут себя, как полиэлектролиты, что до настоящего времени никем не учитывалось.

Элюиционное поведение полиэлектролитов, как отмечалось, определяется суммой полиэлектролитных эффектов. Поскольку VR, соответствующий первому пику, меньше свободного объема колонки, можно считать, что основным полиэлектролитным эффектом, контролирующим элюиционное поведение исследуемых фракций на используемой хроматографической системе, является ионная эксклюзия. Вклад других эффектов оценить труднее.

Зависимость приведенной вязкости полифенолов различных молекулярных масс от концентрации имеет характерный для полиэлектролитов четкий минимум, что является прямым указанием на полиэлектролитное набухание макромолекул. Не вызывает сомнения тот факт, что проявление полиэлектролитных эффектов при гель-проникающей хроматографии зависит от числа и степени диссоциации ионогенных групп макромолекул.

Совмещенные хроматограммы исходной, дезацетилированной и ацетилированной фракции полифенолов с молекулярной массой 4 000 имеют бимодальную форму (*рис. 15*), причем для дезацетилированной фракции основным является первый пик, а для ацетилированной — второй пик. Хроматограммы этих же образцов, полученные при гель-проникающей хроматографии с подавлением полиэлектролитных эффектов, т. е. при введении в раствор 0,1 Н NaCl, одномодальны и практически идентичны, что указывает на близость их молекулярно-массового состава.

Полученные результаты неопровержимо доказывают важную роль полиэлектролитных эффектов в формировании хроматограмм полифенолов. Кроме того, из сопоставления совмещенных хроматограмм (*рис. 15*), видно, что ацетилирование и дезацетилирование не идет до конца и в полифенольной фракции всегда присутствуют как электронейтральные, так и заряженные макромолекулы.



**Рис. 15.** Совмещенные нормированные хроматограммы полифенольной фракции ММ 4 000 в чистом диметилформамиде (1 — дезацелированный, 2 — исходный, 3 — ацелированный) и в условиях подавления полиэлектролитных эффектов (4 — дезацелированный, 5 — исходный, 6 — ацелированный)

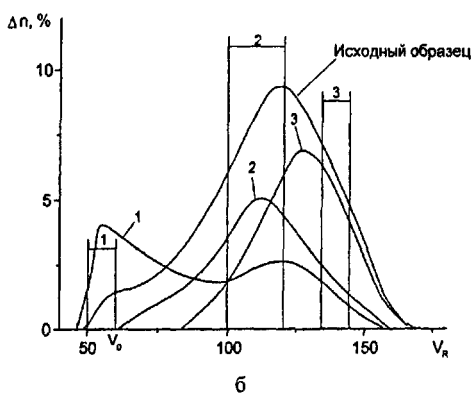
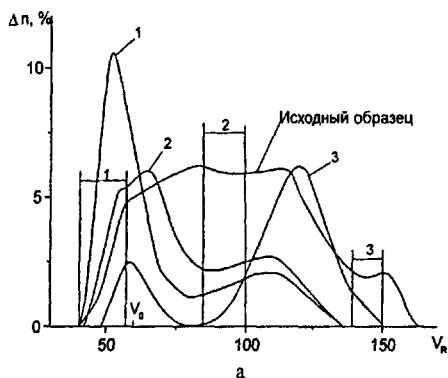
С другой стороны, наличие двух (и более) максимумов на хроматограммах исследуемых полифенольных фракций (см. *рис.14*) позволяет предположить, что способные к диссоциации функциональные группы распределены между макромолекулами неравномерно. Подобная неоднородность, по-видимому, обусловлена тем, что полифенольные фракции содержат в своем составе целый набор слабо и более сильно (в зависимости от типа и числа входящих в них групп) диссоциированных макроионов. Это означает, что хроматограммы отражают не молекулярно-массовое распределение, а характеризуют распределение макромолекул в образце по степеням диссоциации, т.е. по числу и способности к диссоциации функциональных групп, приходящихся на макромолекулу.

С целью выяснения особенностей элюионного поведения полифенолов, обусловленных функциональной неоднородностью их макромолекул, сравнивалось элюионное поведение фракций, отобранных в одних и тех же диапазонах удерживаемых объемов, при фракционировании растворов полифенолов с молекулярной массой 2 000 и 4 000 различной концентрации. Установлено, что все фракции независимо от места отбора при рефракционировании выходят с

меньшими удерживаемыми объемами  $V_R$ , нежели  $V_R$ , при которых они были отобраны и хроматограммы их имеют опять же бимодальную форму (рис. 16).

Наличие двух и более пиков на хроматограммах исходных образцов и их растворов объясняется не только влиянием концентрационных эффектов как отмечено для простых полиэлектролитов, но и способностью гелепроникающей хроматографии разделять макроионы по степеням диссоциации. Подобная композиционная неоднородность полифенольных фракций может способствовать ассоциации макроионов друг с другом и с электронейтральными макромолекулами чему обычно способствует повышение их концентрации. Бимодальность хроматограмм первого раствора полифенольных фракций, отобранных с меньшим удерживаемым объемом, чем свободный объем колонки, можно объяснить только разрушением ассоциатов, образованных электронейтральными и диссоциированными макромолекулами, при уменьшении концентрации образца.

Элюционное поведение полифенольных фракций (рис.16), проявляющих один пик на гель-хроматографической кривой объясняется иначе. При прохождении исходного образца через колонку часть макроионов со слабо диссоциирующими ионогенными группами не проявляет полиэлектролитных свойств и ведет себя подобно электронейтральным полимерам (диссоциация ионогенных групп подавляется вследствие значительной концентрации в растворе одноименно заряженных макроионов).



**Рис. 16.** Совмещенные хроматограммы полифенольной фракции ММ 4 000(а) и ММ 2 000(б) и их проб(1, 2, 3), отобранных из элюата. Концентрация исходного образца 3%.

При последующей хроматографии выделенных фракций вследствие их размывания в колонке происходит уменьшение концентрации одноименно заряженных макроионов в растворе, что вызывает появление заряда на макромолекулах со слабо диссоциирующими функциональными группами. Это приводит к отделению последних от электронейтральных макромолекул в процессе хроматографии, что и подтверждается бимодальностью хроматограмм.

Что касается полифенольной фракции, отобранной при максимальной исходной концентрации образцов, то бимодальность ее хроматограммы объясня-

ется концентрационными эффектами (рис. 16). Уменьшение  $V_R$  при повторной гель-хроматографии позволяет предположить, что в этом процессе наличие двух и более пиков на хроматограммах исходных образцов и их растворов объясняется не только влиянием концентрационных эффектов, как отмечено для простых полиэлектролитов, но и способностью гель-проникающей хроматографии разделять макроионы по степеням диссоциации, в частности, разрушать ассоциаты, образованные электронейтральными и диссоциированными макромолекулами и, следовательно, изменять межмолекулярную структуру полифенольной составляющей натуральных соков, виноматериалов и вин.

Результаты исследования изменений полифенольной фракции с ММ 4 000, и 2000 протекающих при мягком кислотном, щелочном и ферментативном гидролизе с использованием метода гель-хроматографии показали, что наиболее сильное деструктурирующее влияние на исследованные фракции оказывает ферментативный гидролиз. Однако после всех видов гидролитического воздействия остается часть препарата со сравнительно высокой молекулярной массой. Это свидетельствует о том, что полученные нами препараты, хотя и гомогенны по молекулярной массе, но неоднородны по структуре. Одна часть макромолекул препарата легко разрушается, другая не подвержена влиянию фермента реагентов. Это, в основном, полифенольная компонента. Оставшиеся углеводы свидетельствуют об устойчивости связи углеводов с полифенолами. По-видимому, в принятых нами условиях кислотного и ферментативного гидролиза разрушаются внутриуглеводные связи, что и приводит к фрагментации макромолекулы. В условиях щелочного гидролиза разрушаются также связи в полифенолах. Можно говорить о том, что макроструктура растворимой в ДМСО и воде полифенольной фракции различна. Если в первом случае к углеводной матрице в различных местах пришиты полифенольные фрагменты с относительно низкой молекулярной массой, то во втором, наоборот, к полифенольной матрице в одном или нескольких местах присоединены углеводные фрагменты. Вероятнее всего, что фенольные и полисахаридные составляющие виноматериала образуют не только полиэлектролитные комплексы легко растворимые в

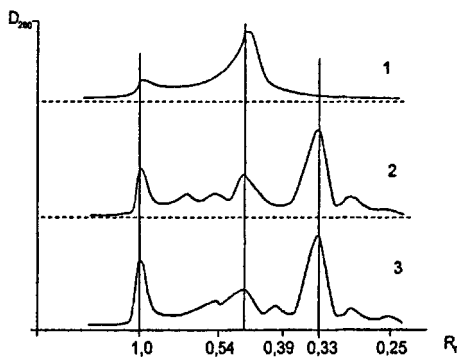
воде, но и химически связанные сополимеры, которые присутствуют в растворах в виде коллоидных частиц.

Метод электрофореза нами был применен для получения качественной и количественной характеристик образцов полифенолов виноматериалов в зависимости от их молекулярной массы. Электрофоретические исследования полифенольной фракции проводились на модифицированном нами приборе ЭФПБ-1 для препаративного электрофореза на бумаге. Результаты исследования полифенолов показывают, что независимо от молекулярной массы все образцы имеют практически однотипный характер фракционирования, т.е., во-первых, почти на всем протяжении фракционирования кривые углеводов сопровождают кривые полифенолов подобного очертания и, во-вторых, образцы фракционируются на две четкие части, характеризующиеся различным содержанием полифенолов и углеводов. Соотношение обеих частей полифенолов приблизительно 1:1. Первые части содержат больше углеводов (содержание полифенолов от 6,4 до 20%), вторые части, наоборот, содержат значительные количества полифенолов (от 35 до 49%). Первые и вторые части всех образцов дают при гидролизе одни и те же моносахариды, а именно: ксилозу, арабинозу, маннозу, глюкозу и галактозу.

Выделенные электрофорезом на бумаге полифенольные фракции не разделялись методом диск электрофореза при высоких pH буферного раствора и неожиданным результатом оказалось, что фракции биополимеров с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) 0,7, 0,54 и 0,47 проявляют визуально полосы с близкой между собой ОЭП и к значению 0,74. Между тем фракции с ОЭП 0,33; 0,29 и 0,25 характеризуются визуально контролируемой полосой с ОЭП близкой к 0,98. В итоге исследуемая система и после разделения характеризуется наличием двух фракций с относительной электрофоретической подвижностью 0,98 и 0,74.

После концентрирования фенольной фракции яблочного сока электрофорез проводили в буферном растворе. Вместо обычно применяемого крупнопористого концентрирующего геля ПАА на поверхность разделяющего геля нано-

сили сухой сефадекс G-25 (pH 3,45) элюент глицин-HCL; LH-20 (pH-6,5) элюент 40% спиртовой раствор; LH-20 (pH-3,45) элюент 0,1 М глицин-HCL и 40% спиртовой раствор, На характер распределения фенольной фракции по ОЭП в значительной степени влияют размеры пор сефадекса и pH раствора, а также химическая природа элюента (рис.17).



**Рис. 17.** Денситограммы полифенольной фракции яблочного сока на G-25 и pH-3,45 элюенте глицин-HCl(1); LH-20 и pH-6,5 элюенте 40% спиртовой раствор(2); LH-20 и pH-3,45 элюенте 0,1 М глицин-HCl и 40% спиртовой раствор(3)

Обнаружено, что в исследуемых системах сохраняется общая закономерность, которая характеризуется обязательным присутствием фракций с ОЭП 0,98 и 0,47. Фракция с ОЭП 0,74 определяется только при элюции спиртовым раствором. Введение аминокислот, характерных компонентов в виноматериалах, приводит к исчезновению фракции с ОЭП 0,74 и проявлению фракции с ОЭП 0,39 и некоторому перераспределению площади, соответствующей каждой фракции.

Таким образом, предварительно показано, что исчерпывающую качественную и количественную информацию о свойствах высокомолекулярных компонентов виноматериала можно получить, последовательно применяя методы гель-хроматографии и электрофоретические исследования.



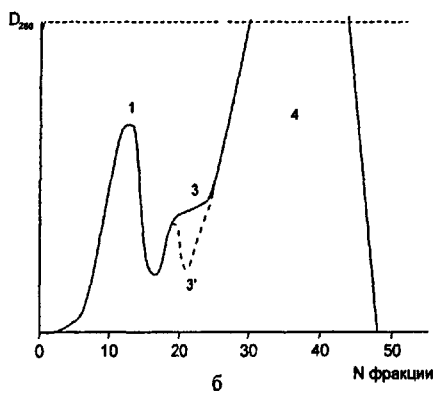
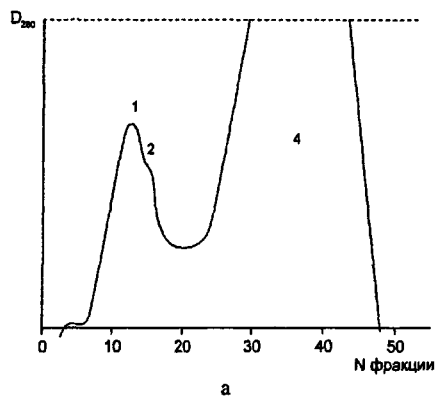
## **ХРОМАТОФОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА БЕЛКОВ, ПОЛИСАХАРИДОВ И БЕЛКОВО-ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ВИНАХ И СОКАХ**

Наиболее изученными в виноматериалах с точки зрения структурных превращений, являются белки и необходимость минимизации их содержания в виноматериале для исключения процесса помутнения весьма актуальна, поскольку значительно сокращает количество возможных надмолекулярных структур формируемых в виноматериале. Отметим, что, именно белки, в наибольшей степени определяют выпадение осадка как полисахарид-белкового, так и танатно (полифенольно) - белкового комплекса, а возможно и металлического катеса, наиболее характерного для плодово-ягодных виноматериалов, что определяет качество натуральных вин и соков.

В исследовании биополимеров вин проблемы разделения и выделения компонентов имеют особое значение. Относительно высокие молекулярные массы макромолекул, их реакционная способность, необходимость сохранения нативной структуры и свойств, низкое количественное содержание приобретают решающее значение, предопределяя адекватность анализа. При механическом переносе метода гель-проникающей хроматографии (ГПХ) в анализ вин специфические особенности анализируемых объектов могут приводить к неадекватности результатов. Поэтому на начальном этапе исследования было принято, что оптимальной хроматографической твердой фазой колонки при исследовании натуральных соков, виноматериалов, вин и их компонентов - белков, полифенолов и полисахаридов является сефадекс марки G-200 и G-75, а для разделения компонентов G-25.

Совмещением методов гель-хроматографии и полярографии для исследования виноградного и яблочного соков и полученных из них виноматериалов установили, что первой выделенной фракцией являются высокомолекулярные белки. Затем пектины, пептиды и сахароаминные соединения, по существу, представляющие собой пептидный комплекс виноматериала и последними, естественно, выходят низкомолекулярные соединения. Проведенные исследова-

дования показали, что гель-хроматография многокомпонентных веществ приводит как к разделению по молекулярной массе, так и по функциональным группам одновременно (рис. 18).



**Рис. 18.** Гель – хроматографические кривые распределения компонентов виноградного сула (верх.) и вина по фракциям. 1-белки; 2-пектины; 3-сахароаминные компоненты (3' фракция ВМС); 4- сахара, фенолы и т.п.

Впервые предложенный автором хромото-электрофоретический метод отличается от других тем, что вместо обычно применяемого в методе диск-электрофореза крупнопористого концентрирующего ПАА геля на поверхность разделяющего геля наносили сухой сефадекс G-75 и применяли анионо-

активный буфер с вариацией рН от 8,3 до 8,9.

Анализ полученных диск-электрофорезом данных позволил выделить зоны относительной электрофоретической подвижности, не изменяющиеся при технологических воздействиях и присутствующие во всех видах конкретного типа виноматериала:

белки виноградного виноматериала характеризуются интервалом с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) 0,55 - 0,45 и 0,35 - 0,25;

белки яблочного виноматериала - ОЭП 0,65 - 0,55 и 0,45 - 0,35;

полисахариды, независимо от типа виноматериала - ОЭП 1,0 - 0,85, 0,65 - 0,55, 0,55 - 0,45 и 0,35 - 0,25;

пектины - ОЭП 1,0 - 0,75, 0,45 - 0,35 и 0,05 - 0,00;

камеди - ОЭП 0,15 - 0,05 и 0,05 - 0,00;

пептидный комплекс - ОЭП - 0,55 - 0,45 и 0,15 - 0,05.

Наиболее четкие зоны определения имеет полисахаридная фракция ОЭП - 1,0 - 0,75 и 0,65 - 0,55, остальные компоненты, в том числе и полисахариды, образуют между собой комплексные соединения, физико-химическая природа которых практически неизвестна.

При исследовании комплексов полисахаридов и белков, как соединений, наиболее значимых в виноматериале, применяли специально разработанную методику, которая заключалась в том, что после гель-хроматографического выделения высокомолекулярных компонентов на сефадексе G-25 их дифференцировали по молекулярным массам на G-200 и каждую молекулярно-массовую фракцию подвергали электрофоретическому анализу на полисахариды и белки разработанными и описанными нами выше методиками. Виноматериал концентрировали на роторном испарителе в 5-6 раз, затем полимерный концентрат пропускали через колонку с сефадексом G-25 для отделения низкомолекулярных фракций. Высокомолекулярные фракции снова концентрировали и далее проводили гель-фильтрацию на колонке с G-200. Каждую из получаемых фракций подвергали электрофоретическому разделению, прокрашивали на полисахариды и белки и денситометрировали прокрашенные гели. Результаты пред-

ставлены денситограммами и таблицами.

Было установлено, что около 90% полисахаридов и белков в виноматериалах находятся в виде комплексов, которые можно разделить на две группы: белково-полисахаридные комплексы - с преобладанием белков, и полисахаридно-белковые с преобладанием полисахаридов. Для оценки возможности осуществления между компонентами неспецифических межмолекулярных связей или химических связей ковалентного или ионного характера, предсказания и обоснования относительно простого метода разрушения потенциально нежелательных комплексов с целью удаления вредных в технологическом или потребительском отношении компонентов была разработана методика дифференцированного определения прочных и непрочных комплексов. При этом в ходе общего электрофоретического и молекулярно-массового хромато - электрофоретического анализа полисахаридов и белков мы соответствующих этапах анализа осуществляли предварительное химическое разделение составляющих. Вначале действием хлорной кислоты выделяли белки из образца (или гель-хроматографической изолированной фракции), затем в центрифугате от отделенного белка действием вольфрамфосфорной кислоты осаждали полисахариды. Осадки растворяли и подвергали электрофорезу. В каждой белковой и полисахаридной зоне определяли количество этих компонентов денситометрированием столбиков.

В конечном итоге мы получили полный электрофоретический спектр полисахаридов и белков данного сула или виноматериала, который одновременно дает информацию о молекулярно-массовом распределении полимеров в анализируемом материале и о формах нахождения этих полимеров в виде свободных белков и полисахаридов, полисахаридно-белковых и белково-полисахаридных комплексов. Количественный обсчет электрофореграмм дает возможность дать точную качественную и количественную характеристику всех полимерных фракций исследуемого образца.

Целью применения комплексного хромато-электрофоретического метода анализа является получение полного электрофоретического спектра полимеров

сусла и вина. Для менее детального, но также весьма информативного определения полисахаридных и белковых соединений и комплексов пригоден ускоренный вариант метода, не дающий сведений лишь о молекулярно-массовом распределении полимеров. Этот ускоренный вариант может рассматриваться как анализ части полимеров сусла или вина. Сочетание фундаментальных исследований биополимеров, их комплексов и коллоидных агрегатов в вино материале с возможностью практического использования предложенного метода может служить перспективой дальнейших научных исследований в этой области знаний.

В *табл.3* представлены качественные и количественные характеристики полимерного комплекса этого вино материала, рассчитанные на основе электрофореграмм. В литературе по анализу полимеров в соках и винах подобные данные получены впервые.

Таблица 3.

Количественное распределение белков, полисахаридов и их комплексов по электрофоретическим фракциям и молекулярным массам виноматериала, мг/л

ОЭП	Биополимеры	Молекулярная масса фракции								№ комплекса	Характер состояния биополимеров
		17000	28000	50000	78000	120000	170000	200000	267000		
		0		0							
1-0,93 0,90	Белки	0,40	1,28	2,49	0,45	-	0,49	0,55	1,38	I	Белково-полисахаридный комплекс
0,96 0,93-089	Полисахариды	0,24	1,44	-	0,48	-	-	-	1,36		
0,87	Полисахариды	-	-	-	-	0,5	0,65	0,39	-	II	Свободные
0,85- 0,80	Белки	-	0,33	-	5,95	1,93	2,4	-	-		Полисахаридно-белковый комплекс
0,73 0,84- 0,87	Полисахариды	-	-	3,38	5,95	1,93	2,4	-	-		
0,69	Белки	-	0,55	-	-	-	-	-	0,75		Свободные
0,60- 0,58	Белки	-	-	0,21	0,40	0,89	-	-	-	III	Полисахаридно-белковый комплекс
0,65*0,5 8 0,48- 0,44	Полисахариды	-	-	0,38	1,39	3,24	0,39	1,05	-		
0,36	Белки	-	-	0,8	-	-	0,39	-	-	IV	Белково-полисахаридный комплекс
0,36	Полисахариды	-	-	0,52	-	-	-	-	-		

0,30	Белки	0,96	2,49	-	-	-	-	-	-	V	Белково-полисахаридный комплекс
0,31-0,26	Полисахариды	0,84	1,22	-	0,28	-	-	-	-		
0,24	Белки	-	0,79	-	-	-	-	-	-		Свободные
0,22-0,21	Белки	-	-	-	-	-	-	-	0,29	VI	Белково-полисахаридный комплекс
0,22	Полисахариды	-	-	-	Следы	-	-	-	-		
0,088	Белки	-	1,04	-	-	-	-	-	-	VII	Белково-полисахаридный комплекс
0,90	Белки	-	0,60	-	-	-	-	-	-		
0,065-0	Белки	0,85	-	0,29	0,21	0,25	0,98	0,41	-	VIII	Полисахаридно-белковый комплекс
0,056-0,011	Полисахариды	2,0	1,68	-	-	-	1,98	0,99	-		

Статистическая обработка экспериментальных данных по белкам и полисахаридам показала, что электрофоретический метод, в пределах исследованных интервальных значений, дает более высокие результаты, чем химические, что объясняется меньшими потерями определяемых компонентов в электрофоретическом методе с прямым денситометрическим окончанием, с одной стороны, и довольно низкой воспроизводимостью обычных химических методов (табл. 4,5).

Таблица 4

Сравнение методов исследования белков и полисахаридов

Материал, вид обработки	Белки, мг/л		Полисахариды, мг/л	
	Метод Лоури	Хроматофоретический метод	Фенольный метод	Хроматофоретический метод
Виноматериал сухой сброженный, необработанный	20,5	24,4	26,2	32,4
Он же, обработанный бентонитом	15,1	17,7	17,8	21,3
Он же, обработанный флокулянт	18,1	21,3	22,1	25,6
Сок виноградный необработанный	50,8	58,8	35,6	44,1
Он же, обработанный бентонитом	20,0	25,3	15,1	19,8
Он же, обработанный флокулянт	30,5	34,1	30,0	38,1

Таблица 5.

Определение полисахаридов в одинаковых по ОЭП фракциях

ОЭП	Полисахариды в мкг	
	без выделения	с выделением
0060	140,8	139,3
0088	17,25	14,6
020020	69,5	57,0

Вторым способом проверки объективной значимости получаемых по электрофоретическому методу результатов мы считали сравнение данных, получаемых при прямом определении полисахаридов и белков денситометрированием электрофоретических зон из проб первоначального концентрата высоко-



комолекулярных соединений и при выделении и ресолюбилизации белков и полисахаридов. Поскольку белки в любом случае можно определять из всего концентрата, не проводя их предварительного выделения, а полисахариды при анализе отдельных молекулярно-массовых фракций надежнее определять после ресолюбилизации, то сравнение проводилось именно по полисахаридам. После выделения белков положение электрофоретических зон полисахаридов из комплексов несколько смещается, поэтому для контроля взяты зоны с практически не изменяющейся относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП). Получена удовлетворительная сходимости результатов; она доказывает, что в ускоренном электрофоретическом методе мы получаем реальные данные (табл. б).

**Таблица 6.**

**Сравнительная характеристика количественного распределения белков по электрофоретическим фракциям виноматериала «Ркацителл»**

№ фракции	Полиакриламидный гель				Ацетатцеллюлоза		
	Не обработан		Обработан флокулянтами ПАА+ПОЭпо 15мг/л		Не обработан		Обработан. флокулянтами ПАА+ПОЭпо
	ОЭП	Кол-во мкг	ОЭП	Кол-во мкг	№ электрофоретической фракции	Кол-во мкг	Кол-во мкг
1	0,98-0,87	126	0,98-0,87	105	1	350	227
2	0,83-0,81	79	0,83-0,81	69	2	59	26
3	0,70-0,67	87	0,69	82			
4	0,59	32			3	41	
5	0,36	49			4	56	32
6	0,32-0,26	66	0,32	51			
7	0,22	15					
8	0,090	37					
9	0,65-0,011	36	0,067-0,011	33			

Определенным доказательством правильности и объективной значимости, получаемых по нашему методу результатов, является и сопоставление электрофореграмм на полиакриламидном геле с электрофореграммами на аце-

тате целлюлозы. Метод электрофореза на ацетате целлюлозы менее чувствителен. Ряд фракций в этом методе не разрешается, и выходят одним пиком, но, тем не менее, распределение проявляемых этим методом фракций аналогично тому, которое наблюдается при электрофорезе в полиакриламидном геле. Близки и результаты по количественному содержанию полимеров, получаемые двумя независимыми (так как количественная градуировка их проводится независимо) электрофоретическими методами. Таким образом, совокупность вышеописанных экспериментов свидетельствует, во-первых, о правильности получаемых аналитических данных, и, во-вторых, об удовлетворительной воспроизводимости результатов, как по полисахаридам, так и по белку (относительная ошибка в пределах 2%).

Предложенный в данной работе хромато-электрофоретический метод из-за его длительности и сложности исполнения нельзя рекомендовать в качестве рядового аналитического метода. Однако этот метод целесообразно применять в качестве контрольного метода в специальных исследовательских работах. Совмещение гель-проникающей хроматографии и электрофореза при изучении белков, полисахаридов и их комплексов в соках и виноматериалах позволит не только качественно и количественно оценить соотношение исследуемых компонентов в виноматериалах, но и предложить возможные варианты усовершенствования технологических процессов и корректировки технологических параметров.

Применение метода гель-хроматографии позволяет уже по виду получаемых кривых судить о качестве виноматериала. Применение классического метода электрофореза не позволяет сделать вывод о характере взаимодействия виноматериала с осветлителями. Хромато-электрофоретическим методом установлено, что при введении любых осветлителей в виноградный виноматериал легко удаляются фракции с ОЭП 0,42, 0,49 и 0,73. Тепловой обработкой и холодом выводятся из системы фракции с относительно низкой или высокой электрофоретической подвижностью. Обработкой высокомолекулярными синтети-

ческими флокулянтами хорошо удаляются фракции с высокой электрофоретической подвижностью (рис. 19, табл. 7)

Таблица 7.

Изменение белков сорта «Ркацители» в результате технологических обработок

№ п/п	БЕЛКИ					
	Контроль необработанный		Обработанный ПАА + ПОЭ 15 x 15 мг/л		Обработанный бентонитом 0,22/л	
	ОЭП	Количество мкг	ОЭП	Количество мкг	ОЭП	Количество мкг
1	0,98	126	0,98	104	0,89	82
2	0,82	79	0,82	38	-	
3	0,69-0,66	87	0,69	71	0,69-0,65	53
4	0,58	32	-		-	
3	0,36	50	-		-	
3	0,31-0,26	70	0,32	51	0,26	16
7	0,21	15	-			
8	0,08	37	-		0,088	14
9	0,060-0,011	36	0,067-0,011	33	0,011	25

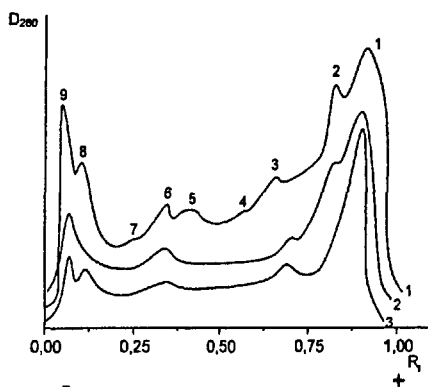
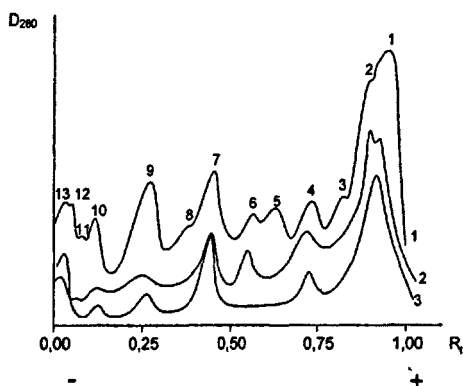


Рис.19. Денситограммы белков сула: 1 - контроль, необработан. 2 - обработан флокулянтами. 3 - обработан, бентонитом

Для выяснения роли фракций полисахаридов, белков и их комплексов, извлекаемых из виноматериалов, при обработках бентонитом и флокулянтами методом хромато-электрофореза провели исследования сула и виноматериала Ркацители. Показано, что флокулянты и бентонит удаляют фракции со средними значениями ОЭП. Компоненты зоны ОЭП 0,75 - 0,65 не определяются ис-

пользуемыми в работе химическими методами, что дает возможность предположить образование комплекса с другими составляющими виноматериала (напр, с фенолами или липидами). Для полисахаридов, неустойчивых по величине и характеру распределения (моно- и мультидисперсные) характерными являются зоны с ОЭП 0,65-0,35 и 0,25-0,00. Технологическая обработка с целью осветления приводит к неустойчивости показателей в зоне с ОЭП 0,55 - 0,45, определяемой как интервал свободных, точнее неразделяемых с другими компонентами, белков или пептидного комплекса, а также с ОЭП 0,95 - 0,85, интервалу соответствующей пектиновой фракции полисахаридов (рис.20).



**Рис.20.** Денситограммы полисахаридов сусла, выделенные после химического разделения (1 - контроль, необработанный, 2 - обработанный флокулянтами, 3 - обработанный бентонитом.)

Во всех полимерных фракциях, дифференцированных как по молекулярной массе, так и по ОЭП, в основном имеются гетерополимерные комплексы, различающиеся по прочности, и ряд "свободных" фракций полисахаридов и белков. Бентонит и флокулянты аналогично удаляют полностью фракции со средними значениями ОЭП. Флокулянты убирают белково-полисахаридные комплексы, бентонит - полисахаридбелковые. Однако следует сказать, что оба эти реагента стабилизируют вина, но в конкретных случаях более эффективным

оказывается тот или другой из этих реагентов. Бентонит и другие высокодисперсные глины применяют в основном для виноматериалов, полученных из винограда. Высокомолекулярные синтетические флокулянты (ВСФ) являются универсальными, поскольку в виноградных и плодово-ягодных виноматериалах удаляют наиболее гидрофобные фракции. Они представляют собой более гибкое технологическое средство, так как, меняя соотношения в комбинациях с другими осветлителями можно добиваться избирательного удаления нужных компонентов (табл. 8). Причем, наряду с другими техникоэкономическими преимуществами, обеспечивают длительную стабильность вина, не обедняя его рядом нужных компонентов, как это делает почти универсальный адсорбент бентонит.

С этой точки зрения имеет значение не только качественный, но и количественный анализ процесса осветления и стабилизации виноматериала рассматриваемыми компонентами. Применяя разработанные методики, было найдено, что (ВСФ) удаляют 12 - 24% полисахаридов из фракций с относительной низкой электрофоретической подвижностью, 31 - 47 % из фракций имеющую среднюю ОЭП, 8 - 24% из фракций с высокой ОЭП. Аналогично для белков: 12 - 18%, 21 - 43% и 6 - 26%.

Трудно распознаваемыми способами фальсификации качества вин на стадии их производства являются замена высококачественных самотечных фракций на менее ценные (прессовые) и настаивание сахарного сиропа на мезге, оставшейся после отделения виноградного сока. Так как вино сохраняет сортовые особенности винограда и готовится без добавления чужеродных компонентов, которые могут быть идентифицированы на основе химического анализа, а по вкусо-ароматическим свойствам и по показателям ГОСТ, вина практически не отличаются от настоящих.

На основании проведенных хромато-электрофоретическим методом исследований нами составлены таблицы, позволяющие проводить сопоставительный анализ ОЭП различных соков, сусел и виноматериалов, анализ которых по-

зволит весь спектр ОЭП образцов можно разделить на 9 интервалов и характеризовать изучаемую систему по ОЭП белков и полисахаридов (*табл. 9*).

Виноматериалы из суслу самотека определяются наличием всех интервалов. Фракции с ОЭП 0,97-0,865, 0,83-0,81,0,59-0,50 являются показателями высокого качества. Виноматериал из прессового суслу характеризуется отсутствием ОЭП 0,97-0,865 и 0,85-0,785 и наличием ОЭП 0,62 и 0,45, а также совмещением 7 и 8 интервалов - 0,29 - 0,06. Белковые фракции с ОЭП 0,15, 0,09 и 0,065-0,011 имеют большую молекулярную массу и определяют натуральность виноматериалов. По характеру распределения ОЭП яблочный виноматериал приближается к прессовому из виноградного сока. Однако, ОЭП фракций характеризуется значительным разбросом единичных значений ОЭП 0,63, 0,56, 0,525,0,49, ОЭП 0,27,0,23,0,21 и ОЭП 0,15,0,12,0,09.

При обработке виноматериалов флокулянтами и бентонитом легко отличить прессовую фракцию по незначительному осветлению, а также определить наличие характерных для яблочного виноматериала ОЭП: 0,75,0,61,0,435,0,27 и 0,21.

Таким образом, относительная электрофоретическая подвижность белков и полисахаридов виноградных и плодово-ягодных вин является весьма характерным показателем и, следовательно, на ее основе можно производить идентификацию виноматериалов по виду сырья.

Некоторые технологические параметры и физико-химические характеристики виноматериалов и вин существенно отличаются в зависимости от климатических и территориальных условий.

Таблица 8.

## Качественный анализ процессов осветления виноградного сока бентонитом и флокулянтами

№ фракции	СХЕМА ОБРАБОТКИ ВИНОГРАДНОГО СОКА								Характер состояния
	Обработка отсутствующим		обработка флокулянтам ПАА+ПЭО, 15х 15 мг/л		обработка бентонитом 0,2 г/л (контроль)		Молекулярная масса тыс.		
	ОЭП		ОЭП		ОЭП		полисахариды	белки	
	полисахариды	белки	полисахариды	белки	полисахариды	белки			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,91	-	0,92	-	0,93		2,5	14	Белково-полисахаридный стойкий
2	0,90	0,98-0,87	0,90	0,98-0,88	-	0,91-0,89	200	120;	
3	0,88	-	-	-	-	-	260;	200; 260	
4	-	0,83-0,81	-	0,83-0,81	-	-		72; 120;	Свободные
5	0,77	-	0,77	-	0,78	-	50; 120	200	Полисахариднобелковый комплекс нестойкий
6	0,69	0,70-0,67	-	0,70	-	0,69-0,65	260		
7	0,65-0,57	0,59	0,65	-	-	-	50; 120	50, 72; 120	То же
8	0,43	-	0,44-0,41	-	0,43	-	120		Свободные
9	0,40-0,36	0,36	-	-	-	-	72	25; 120	Белково-полисахаридный комплекс, стойкий

10	0,27	0,32-0,36	0,28	0,32	0,28	0,26	14; 50; 72	25; 50;120	То же
11	-	0,22	-		-	-		25	Свободные
12	0,10	0,090	0,11	-	0,01	0,088	14; 50	25	Белково- полисахаридный комплекс, стойкий
13	0,60	.	0,068	-	-	-	14; 25	14; 72	То же
14	0,035	0,065- 0,011	0,035	0,068- 0,011	0,011-0	0,011	120	25; 50	То же
15	0,023	-	-	-	-	-	50	120	



Таблица 9.

**Сопоставительный анализ ОЭП натуральных соков, сусла и виноматериалов  
полисахариды (ПС), белки (Б)**

N фракции и интервал ОЭП	Виноматериал Ркацителы прес-совый		Виноматериал Ркацителы		Сусло Ркацителы		Виноградный сок Ркацителы		Яблочный сок		Яблочный сок сброженный спиртованный	
	ПС	Б	ПС	Б	ПС	Б	ПС	Б	ПС	Б	ПС	Б
(I)0,97-0,875			0,98-0,92	0,97-0,93	0,93; 0,90	0,90-0,88	0,91; 0,9;0,88	0,9-0,87	0,90-0,88	0,93; 0,865	0,93-0,89	0,93
(II)0,87-0,758	0,80		0,87;0,79	0,85; 0,83	0,86	0,83	0,77	0,83-0,81	0,8	0,8	0,87	0,83; 0,785
(III)0,75-0,655	0,69	0,67	0,66	0,68	0,77; 0,69	0,70-0,68	0,69	0,7-0,67	0,74-0,67	0,75; 0,69	0,77; 0,69	0,75; 0,72
(IV)0,65-0,455	0,6-0,47	0,62; 0,60-0,53; 0,50	0,47	0,51	0,6	0,58	0,65-0,57	0,59	0,62-0,54	0,63; 0,56; 0,525	0,50	0,61; 0,57; 0,525; 0,49
(V)0,45-0,355	0,40-0,38	0,45; 0,41-0,37	0,34	0,37	0,42-0,38	0,36	0,43; 0,4-0,36	0,36	0,43; 0,39-0,37	0,44; 0,41	0,36	0,435; 0,42; 0,39
(VI)0,35-0,255	0,28	0,35-0,31  0,29-0,06	0,29	0,30	0,27		0,27	0,32-0,36	0,32	0,325	0,34	0,34 0,27;
(VII)0,25-0,155				0,22		0,23		0,22		0,21		0,23; 0,21
(VIII)0,15-0,055	0,08		0,12 0,08	0,09 0,06	0,1	0,09	0,1 0,06;	0,09 0,065-0,011	0,09	0,155; 0,085	0,13 0,06	0,15; 0,12; 0,09
(IX)0,05-0,00	0,04	0,04	0,04; 0,023	0,035	0,06	0,04	0,035		0,04	0,04	0,04	0,07

Поэтому, для каждой конкретной лаборатории, принявшей хромато-электрофоретический метод для определения качества и сертификации вино-материалов и вин необходимо составить карты ОЭП.

Предпринятые попытки применения данного способа для выявления некоторых способов фальсификации являются лишь началом огромной работы по установлению показателей качества, контроль которых исключит возможность попадания на рынок недоброкачественной продукции. А выработка строгих критериев и норм по каждому виду и сорту винодельческой продукции, ее происхождению (территориальным особенностям формирования качества), создаст условия для широкого применения предложенного метода в практике контроля качества вин.

## ВЫВОДЫ

1. В сравнении с субъективными органолептическими и дегустационными, а также фотометрическими методами разработан новый хромато-электрофоретический метод, предназначенный для контроля качества и оптимизации технологических процессов стабилизации натуральных вин и соков. Он впервые позволяет инструментально определить количественное соотношение основных биополимерных компонентов вин (белков, полисахаридов и полифенолов), а также содержание в вине комплексов этих соединений и их устойчивость, исключить субъективные ошибки, снизить трудоемкость и время выполнения анализов при определении качества вин и вино-материалов.

2. Работа открывает новое направление в физико-химической энохимии, которое рассматривает натуральные соки, вино-материалы и вина как единый комплекс, представляющий собой сложную многокомпонентную систему, состоящую из низко- и высоко- и надмолекулярных образований биополимерных компонентов, анализ которых определяет качественные характеристики вино-продуктов.

3. Анализ полученных хромато-электрофоретическим методом данных

позволил выделить зоны относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) белков, полисахаридов, пептидов, полифенолов, не изменяющиеся при технологических воздействиях и присутствующие во всех видах конкретного типа виноматериала. Установлено, что, исключая полисахариды с высоким показателем ОЭП, остальные компоненты характеризуются одинаковыми показателями ОЭП и находятся в исследуемых системах в виде комплексов различной прочности, фракционированных по молекулярным массам. Применение специально разработанной методики позволило не только идентифицировать и определить количественное содержание комплексных и свободных белково-углеводных компонентов, но и дифференцировать их по прочности связей в ассоциатах между белковыми и полисахаридными составляющими. При варьировании технологических параметров и введении в исследуемые системы специальных добавок изучены общие закономерности физико-химических превращений компонентов виноматериала. Показано, что плодово-ягодные высококачественные вина можно получить при введении в технологический процесс ряда операций (обработка соков флокулянтами, подсахаривание, термообработка и т.п.), приближающих физико-химические свойства (и технологические качества) этих натуральных соков, виноматериалов и вин к виноградным винам и сокам.

4. Продемонстрировано, что сульфитирование исходного сырья и виноматериалов виноградных и плодово-ягодных вин определяет не только микробиологическую устойчивость, но и характер протекания дальнейших биохимических и технологических процессов (окисление, стабилизация, выдержка и др.), обуславливающих качество готовой продукции.

5. На основе систематического исследования различными физико-химическими методами виноградных и плодово-ягодных соков, виноматериалов и вин, а также выделенных из них полифенольных, полисахаридных и белковых фракций установлено, что совмещение методов гель-хроматографии и электрофореза является наиболее информативным при получении количествен-

ных результатов и качественных характеристик.

б. Вкусовые и технологические параметры качества определяет равновесное состояние компонентов натуральных соков, виноматериалов и вин, которое, в основном обуславливается оптимальным для каждого вида продукции количественным соотношением и пространственным распределением (вне- и внутри - растительной клетки) макромолекул полиэлектролитных комплексов полисахаридов, белков, полифенолов и химически связанных сополимеров этих соединений.

7. Установлен механизм образования помутнений вин. Из-за несоблюдения технологических режимов в процессе производства, розлива или транспортировки и хранения нарушается химическое равновесие высокомолекулярная - низкомолекулярная фаза биополимеров. При присоединении низкомолекулярных веществ к высокомолекулярным и разрушении первоначальной структуры полимерных компонентов происходит агрегация частиц, что приводит к помутнению вина.

8. Высокомолекулярные синтетические флокулянты (КФ-6, полиэтиленоксид и др.), в отличие от дисперсных глин, являются универсальным средством для подготовки любого плодово-ягодного сока к производству виноматериалов и вин, а также для стабилизации виноматериалов с сохранением максимального количества полезных компонентов и удаления практически всех фракций, способных вызвать помутнение.

9. При изучении высокосортных белых виноградных и плодово-ягодных вин по составу и технологическим характеристикам разработаны идентификационные карты соответствия относительной электрофоретической подвижности и количественного содержания белков и полисахаридов, которые целесообразно применять для оценки качества винодельческой продукции на соответствие лучшим эталонным образцам натуральных вин.

## ОСНОВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

1. Каменская Э.В., Захарова Е.В., Буков В.В., Султыгова З.Х. Изучение белкового комплекса в суслах и винах, обработанных флокулянтами // Материалы научной конференции ВЗИПП, Секция технологии вина - М., 1974, - С.5-6.

2. Захарова Е.В., Султыгова З.Х., Каменская Э.В. Электрофоретические исследования полисахаридов сусел и вин // ЦНИИТЭИпищепром, Научно-технический реферат, Сб. Винодельческая промышленность. - М., 1981. - вып. 3 - С.5-7.

3. Чупка Э.И., Черный С.В., Султыгова З.Х. Хемилюминесценция: осцилляционные эффекты при нагревании полифенольных соединений в щелочных растворах // Изд. СибНИИ целлюлозы и древесины. - 1981. - Т.6, №1, - С.28-34.

4. Султыгова З.Х., Каменская Э.В. Новый метод анализа полисахаридов в соках и винах с помощью электрофореза // Информационный листок ЦБТЭИ Центросоюза, М., 1982, С.2.

5. Каменская Э.В., Султыгова З.Х. Влияние технологической обработки на полисахаридный комплекс белых столовых вин // Информационный листок ЦБТЭИ Центросоюза, - М., 1982, - С.4.

6. Каменская Э.В., Захарова Е.В., Бутков В.В. Исследование полисахаридного комплекса белых столовых вин методом электрофореза. // Тез. докл. Республиканской конференции молодых ученых республик Закавказья по актуальным проблемам Продовольственной программы, посвященной 60-летию образования СССР, Тбилиси, 1982. - ГрузНИИПП, 1982. - С.277-279.

7. Каменская Э.В., Султыгова З.Х., Сенькевич СИ. Изменение биополимерного комплекса сусел и вин, обработанных легированными флокулянтами. // Тез. докл. Всесоюзной научно-технической конференции "Повышение эффективности применения полимерных материалов в отраслях промышленности, производящих продукты питания, Углич, 21-23 марта 1983 г. - С. 122.

8. Султыгова З.Х., Митрофанов С.Г., Федорев Д.О. Взаимодействие диоксида серы и модельных систем полисахаридов виноматериалов марок Донское Белое и Кокур // Изд. Уральского Гос. Университета. - 1983. - Вып. 18., № 2. - С 36-47.

9. Каменская Э.В., М.З. Перадзе, Султыгова З.Х., Казначеева О.А. Водорастворимые флокулянты в технологии осветления и стабилизации крепленых и столовых вин // ЦНИИТЭИпищепром - М., 1983. - С 25.

Ю.Султыгова З.Х. Обобщенная характеристика температурно-концентрационных границ фазовой устойчивости полимеров виноматериалов // Высокомолекулярные соединения. Серия А, -1985. - Т. 27, №6. - С. 502-509.

11.Султыгова З.Х., Клячко Ю.А. Хромато-электрофоретические исследования белков, полисахаридов и их комплексов в соках, винах и виноматериалах

// В сб.: Новые методы химических анализов исследования пищевых продуктов. - Высшая школа, М., 1985. - С. 126-129.

12. Чупка Э.И., Султыгова З.Х., Юшенков А.И. Возможные направления внутримолекулярных процессов переноса заряда и энергии в полифенольных соединениях // Изд. СибНИИ целлюлозы и древесины. - 1985. - Т. 19, № 4. - С. 94-100.

13. Султыгова З.Х. Взаимодействие моносахаридов виноматериала с соединениями SO<sub>2</sub>-М., «Инкоцентр», 1998. - 39 с.

14. Султыгова З.Х., Клячко Ю.А. Методические разработки: аналитическая химия. Министерство образования РФ. ИнГГУ. // Методические указания по спец. «Химия и биология».- 1995. - 6 с.

15. Султыгова З.Х., Клячко Ю.А. Методические разработки: физическая и коллоидная химия. Министерство образования РФ. ИнГГУ. // Учеб. пособие. - 1995. - 16 с.

16. Султыгова З.Х., Клячко Ю.А. Лабораторный практикум по аналитической химии // Министерство образования РФ, ИнГГУ.-1995. - 25 с.

П. Султыгова З.Х., Клячко Ю.А. Методические разработки: органическая химия. Министерство образования РФ. ИнГГУ. // Лабораторный практикум для студентов специальностей «химия и биология» - 1995. - 27 с.

18. Султыгова З.Х. Современные представления о процессе очистки вин и натуральных соков. - М., ФПУ, 1998 - 68с.

19. Султыгова З.Х. Физико-химические свойства полифенольной фракции сула. - М., ФПУ, 1999. - 35 с.

20. Султыгова З.Х., Гвоздев А.В., Путина И.Е. Роль кислотно-основного катализа при окислении полифенольных соединений виноматериала марки Каберне Совиньон пероксидом водорода. // Тез. докл. международной конференции молодых ученых Закавказья, Тбилиси, 2000. - Т. 1. - С. 29-32.

21. Султыгова З.Х. Физико-химические превращение высокомолекулярных соединений в процессе приготовления вина. - М., ФПУ, 2000 г. - 40 с.

22. Султыгова З.Х. Применение методов гель-хроматографии и электрофореза для исследования структуры и свойств полифенольной фракции вино-материалов. - Изд.: МГУЛ, 2000 г. - 6с.

23. Султыгова З.Х. О некоторых физико-химических свойствах вина // Виноградарство и вина России. - 2000. - №7. - С. 24-26.

24. Султыгова З.Х. Физико-химические основы взаимодействия компонентов виноматериала с адсорбентами и флокулянтами - М., «Инкоцентр», 2001.- 36с.

25. Султыгова З.Х., Калужная Р.И., Рейнер Ф.В., Шандыбин Л.Н. Полиэлектrolитные комплексы на основе полисахаридов виноматериала марки Ркацител и их взаимодействия с флокулянтами // Известия вузов. Химия и химическая технология. - 2001. - Т XX, Вып. 27, №8. - С.49-51.

26. Султыгова З.Х. Исследование полисахаридов, лигноподобных поли-

фенальных веществ и их комплексов в натуральных соках. // Сб. научных трудов Ингушского государственного Университета. - Нальчик, 2002 г. - С. 477-486.

27.Султыгова З.Х. Разработка методов создания идентификационных карт для оценки качества вин. // Сб. научных трудов Ингушского государственного Университета. - Нальчик, 2003. -Т.1. - С. 187-192.

28.Султыгова З.Х. Особенности применения хроматоэлектрофоретического метода для определения качества винодельческой продукции и соков // Сб. научных трудов Ингушского государственного Университета. - Нальчик, 2004. -Т.2. -С. 252-260.

29.Султыгова З.Х. Хроматофоретический метод анализа высокомолекулярных соединений в винах и соках. // Сб. научных трудов Ингушского государственного Университета. - Нальчик, 2004. - Т.2. - С. 204-207.









Подписано в печать 10.11.2004 г.  
Зак. 174 тир. 100 экз. объем 3,5 п.л.  
Участок оперативной печати ИЭ РАН

122155

РНБ Русский фонд

2005-4

19195