A szőlőlé fenolanyagai, tulajdonságai és meghatározási módja

PHINIOTIS ELIAS
Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet, Budapest
Érkezett: 1973. május 10.

I. A szőlőlé fenolanyagai és tulajdonságaik

A fenolanyagok előfordulása a növényvilágban, így a szőlőben is igen gyakori. A fehér szőlőfajtákban kisebb mennyiségű (200 – 300 mg/l) fenolanyagok vannak, mint a kék szőlőfajtákban (1400 – 1500 vagy több mg/l) [4, 7, 11].

Ezek a fenolanyag-mennyiségek elegendőek ahhoz, hogy jelentős szerepet játszanak a szőlőlé (vagy a belőle készített bor) kémiai és organoleptikai tulajdonságaiban [5, 6]. Komoly szerepet játszanak az anyag tisztaságában, sőt a termék színét is erősen befolyásolják, ami nem mindig előnyös [4, 12, 14]. Ha ezeknek a vegyületeknek vagy vegyület-csoportoknak a fizikai és kémiai tulajdonságait és viselkedését ismerjük, megfelelő beavatkozással kedvezően tudjuk befolyásolni vagy irányítani a termék minőségét.

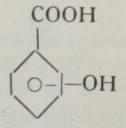
A fenolanyagok nagy jelentőségű vegyületek, a szőlőléipar, a borászat és más iparágak szempontjából is. Róluk való szélesebb körű ismereteink, amelyek a gyakorlatban is fontosak, az utóbbi időben jelentősen gyarapodtak.

Az alábbiakban megpróbálom röviden bemutatni ezeket a vegyületeket és néhány fontos tulajdonságukat. Ismertetem az általam használt mennyiségi és minőségi meghatározási módszert és annak ellenőrzését. Végül bemutatom mindazokat a tényezőket, amelyek zavarhatják a meghatározást, ezeknek kiküszöbölését vagy figyelembe vételét.

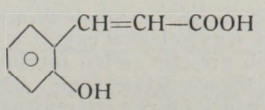
A szőlőlében előforduló fenolanyagokat szerkezetük és tulajdonságaik alapján három csoportra lehet osztani [1, 7, 11];

1. Nem Flavonoid Fenolanyagok (NFF)

Ebbe a csoportba tartoznak a hidroxibenzoésav, a hodroxifahéjsav és származékaik; pl. [I] képlet.



(hidroxibenzoésavak)

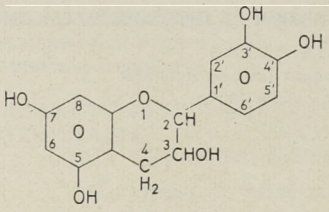


(o-hidroxifahéjsav)
kumarinsav

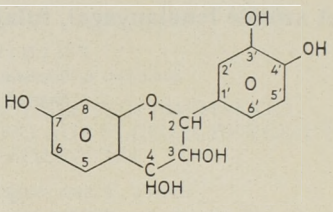
[I]

2. Nem Tannin Flavonoidok (NTF)

Ide tartoznak a flavan – 3 (catechinek) és flavan – 3,4-diolok (leucoanthocyanidinek) pl. [II] képlet.



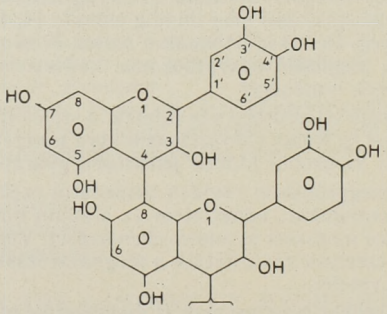
(3, 5, 7, 3', 4' – pentahidroxiflavan)
catechin



(3, 4, 7, 3', 4' – pentahidroxiflavan)
leucofisetinidin

[II]

3. Tannin Flavonoidok (TF)



[III]

Ide sorolhatók a flavan-3-olok és flavan-3,4-diolok polimerjei pl. [III] képlet.

A hidrolizálható tanninok csoportja (pentadigalloil-glükóz típusú) normális körülmények között csak a levelekben illetve fás növényrészekben fordul elő és nem a gyümölcslében [10], ezért ebben az esetben a szőlőlé szempontjából nincs jelentősége.

Ezek a vegyületek vízoldhatóak, így a szőlő préselésekor belekerülnek a szőlőlébe, ahol más vegyületekkel együtt a szőlőlé jellegzetes ízét, zamatát és színét adják. Erősebb préselés esetén (présmustnál) a második és harmadik csoport (2. és 3.) fenolanyagai feldúsulnak a lében, míg az első csoport (1.) fenolanyagai állandóak maradnak (mint a színmustnál). Ez hasznos információt ad a szőlőlében lévő fenolanyagok származásáról. Az 1. csoport fenolanyagai a szőlőbogyó levéből származnak. A 2. és 3. csoport vegyületei pedig a héj, mag és a kocsánytól származnak.

Legfontosabb tulajdonságaik közé tartozik az összehúzó íz és a különböző körülmények között létrejövő színváltozásuk. Ez összefüggésben van a barnulással, amely a szőlőlénél, a bornál és más gyümölcsleveknél is igen fontos tényező.

A barnulás kérdése a szőlőleveknél nincsen még teljesen tisztázva. Ha figyelembe vesszük a szőlőlé kémiai összetételét és tulajdonságait, a következőket mondhatjuk.

A szőlőleveknél a barnulást nem a szénhidrátok és a fehérjék egymással való reakciójától származó barna pigmentek okozzák (Maillard reakció). Nem valószínű, hogy ilyen körülmények között a Maillard reakció végbemegy, mert ahhoz magas pH érték és a közegben kevés víz szükséges. Sokkal valószínűbbnek látszik az, hogy ebben az esetben a barnulást főleg a fenolanyagok kémiai vagy enzimes oxidációja (kinon jellegű vegyületek képződése) [12,15] és esetleg a szénhidrátokkal való reakciójuk okozza [2].

Mind a három fenolanyag-csoport vegyületei bizonyos körülmények között barna színű termékeket hoznak létre. Hogy ezek a vegyületek egyformán felelősek-e a szőlőlé (vagy más termék) barnulásáért, még pontosan nem tudjuk, pedig egy ilyen tapasztalat üzemi gyakorlatban is nagyon hasznos lenne.

Ahhoz, hogy megállapítsuk van e ilyen összefüggés, először külön-külön kell a fenolanyag-frakciókat és a barnulást (az oldat színintenzitásának ill. extinkciójának mérése 425 nm hullámhosszon) is meghatározni, majd a kettő között megpróbálni összefüggést találni. A zavaró tényezőket figyelembe kell venni: reduktonok jelenlétét, pl. SO_2, kísérleti körülmények azonosságát stb.

Disszertációs munkámban, amely még folyamatban van, többek között ezzel a kérdéssel is foglalkozom. Az eddig kiértékelt eredményeim alapján (1. táblázat) egyelőre nem tudtam egyértelmű összefüggést megállapítani a fenolanyag-frakciók és a barnulás között. A fenolanyag-frakciók elválasztása önmagában újszerű és értékes tapasztalat a szőlőlé és hasonló iparágak számára.

1. táblázat

Különböző szőlőlevek fenolanyagainak megoszlása és extinkciója 425 nm hullámhosszon

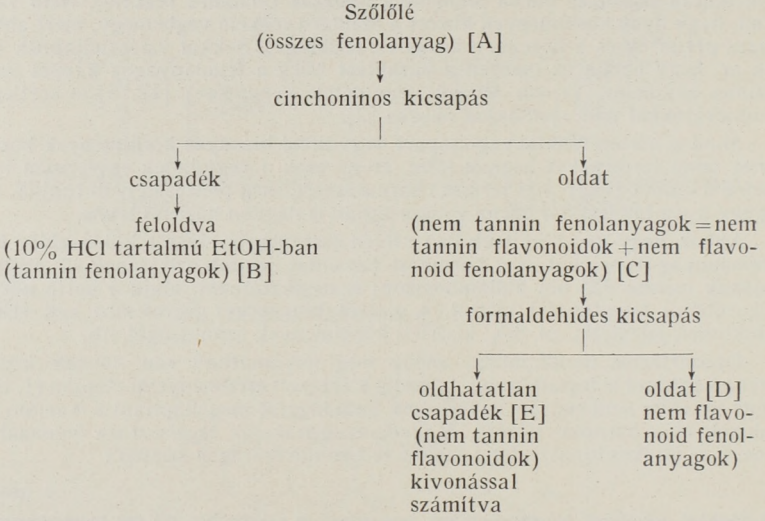
Sorsz.	Összes Fen. mg/l	Tannin Fl. mg/l	Nem T. Fl. mg/l	Nem Flav. Fen. mg/l	Extinkció 425 nm-en
1	238	24,61	96,5	98,0	0,978
2	224	15,50	98,6	94,5	0,419
3	222	11,28	98,6	100,0	0,472
4	250	21,20	108,5	103,0	0,215
5	204	16,90	89,0	80,5	0,334
6	223	23,90	109,0	89,0	0,237
7	217	23,30	12,7	193,0	0,975
8	213	7,75	19,8	176,0	0,362
9	227	19,00	8,5	194,0	0,426
10	213	24,70	0,0	176,0	0,321
11	227	24,00	0,0	200,0	0,224
12	129	3,00	20,0	100,0	0,274
13	212	5,00	38,0	168,0	0,790
14	194	12,00	30,0	152,0	0,380
15	226	3,00	37,0	170,0	0,246

II. A szőlőlé fenolanyagainak elválasztási és meghatározási módszere

A legújabb összes fenolanyag kolorimetrikus meghatározási módszerét *Singleton* és *Rossi* dolgozta ki [13]. Ezt a módszert kombinálva a *Peri* és *Pompei* által javasolt fenolanyagok frakcionálási módszerével [9], egyszerre nyerhetünk adato-

kat a szőlőlé (vagy bor) összes fenolanyag-tartalmáról ill. arról, hogy milyen eloszlásban vannak jelen a különböző frakciók. (1. Nem Flavonoid Fenolanyagok, 2. Nem Tannin Flavonoidok, 3. Tannin Flavonoidok.) Ehhez először részleges elválasztást kell végrehajtani, hogy a frakciók külön-külön legyenek és utána ugyanazzal a módszerrel meghatározni a frakciókat és az összes fenolanyagtartalmat is.

Az elválasztás az alábbi séma szerint valósítható meg:



Kicsapás cinchonin-szulfáttal

A chichonin szelektív módon kicsapja az oldatból a tannin polimereket cinchonin-tannát formában [1].

Kivitelezés: 100 ml-es centrifugacsőbe bemérünk 50 ml szőlőlevet, NaOH oldattal 7,0 pH-ra semlegesítjük. Hozzáadunk 25 ml 7,9 pH-jú foszfát-puffert (1,36 g KH_2PO_4, 8,35 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 12,50 g $NaHCO_3$ deszt. vízzel 500 ml-re töltjük fel) és 12,5 ml cinchonin-szulfát oldatot (1,5 g cinchonin-bázis, 2 ml 1:3 higítású H_2SO_4, deszt. vízzel 100 ml-re töltjük fel). Összerázás után szobahőfokon 20 percig állni hagyjuk, majd centrifugálással a cinchonin-tannát csapadékot elválasztjuk. A csapadékot kétszer 10 ml 10%-os vizes Na_2SO_4 oldattal mossuk. Az oldatot a mosófolyadékkal együtt 200 ml-es mérőlombikba gyűjtjük, pH-ját HCl-val 3,5-re állítjuk be. A lombikot deszt. vízzel feltöltjük, ezt használjuk fel a Nem Tannin Fenolanyagok [C] meghatározásához.

A csapadékot kevés 10%-os HCl-at tartalmazó etanolban oldjuk, 50 ml-es mérőlombikba öntjük, majd a lombikot oldószerrel feltöltjük. Ezt használjuk fel a Tannin Fenolanyagok [B] meghatározásához.

Kicsapás formaldehid oldattal

A formaldehid speciális körülmények között (alacsony pH, szobahőmérsékleten) [14], csak a catechinek floroglucin-gyűrűje 6-os ill. 8-as szénatomját támadja meg (elektrofil reagensekre aktivált centrumok). Ebben a reakcióban

gyanta jellegű polimerek képződnek, amelyeket megfelelő pórusméretű szűrővel el lehet távolítani az oldatból. Így elválaszthatjuk a Flavonoid és a Nem Flavonoid jellegű Fenolanyagokat.

A formaldehides kicsapást végezhetjük akár eredeti szőlőlémintából, akár olyan oldatból is, amelyen előzőleg cinchoninos kicsapást végeztünk (az eredmény ugyanaz). A fehér-szőlőleveknél a fenolanyag-koncentrációk miatt, mindig az első megoldást választottam.

Kivitelezés: 30 – 40 ml-es csiszolatos kémcsőbe bemérünk 10 ml mintát. Hozzáadunk 10 ml 1:4 hígítású HCl-at és 5 ml standard (2mg/ml) formaldehid oldatot (2,08 ml 36%-os vizes formaldehid oldat deszt. vízzel 100 ml-re felhígítva). A mintákon nitrogén gázt buborékoltatunk át és bedugaszoljuk. Fehér szőlőfajtáknál 24 óra (kékfajtáknál 72 óra) alatt a reakció szobahőmérsékleten teljesen végbemegy. Ezután a kémcső tartalmát 0,45 μ pórusú membránszűrőn átszűrjük. Ezt az oldatot használjuk fel a Nem Flavonoid Fenolanyagok meghatározásához [D].

A Nem Tannin Flavonoidok mennyiségét [E], úgy kapjuk meg, ha a [C] mennyiségből levonjuk a [D] mennyiséget.

$$[C] - [D] = [E]$$

Az eredeti szőlőlé mintából meghatározzuk az összes fenolanyagtartalmat [A].

A fenolanyag-tartalmat mind az eredeti mintából, mind a frakcióból azonos kolorimetrikus módszerrel lehet meghatározni a következő módon:

100 ml-es mérőlombikba legalább 60 ml (mindig egyforma mennyiségű) deszt. vizet mérünk. Hozzáadunk 1 ml mintát (kék-fajtáknál tízszeres hígítás után). Ehhez adunk 5 ml Folin-Ciocalteu reagenst [13] és jól elkeverjük. Ezután, minimum 30 másodperc múlva, de maximum 8 percen belül hozzáadunk 15 ml 20%-os Na_2CO_3 oldatot és elkeverjük. A lombikot deszt. vízzel jelig töltjük. Hasonló módon készítjük a vakpróbát is. Két óra múlva a mintákat a vakkal szemben spektrofotométeren 765 nm hullámhosszon lemérjük.

Az eredményeket galluszsavval készített (0 – 1000 mg/l) standard görbéből olvashatjuk le. Mivel ebben a tartományban érvényes a Lambert-Beer törvény, a lineáris összefüggés tangensét vagy annak százszorosát felhasználva („e" = = speciális extinkciós koefficiens, amely 100 mg/l galluszsavoldatnak felel meg) az alábbi képlettel számíthatjuk ki a koncentrációt:

$$c = \frac{E}{e} 100$$

c = koncentráció [mg/l]
E = extinkció
e = speciális extinkciós koefficiens.

III. A frakcionálási módszer hatásosságának ellenőrzése

A frakcionálási módszer hatásosságát vékonyréteg-kromatográfiával lehet ellenőrizni. Több kutató tapasztalatát [3, 8, 9, 11, 16] és az adott lehetőségeket figyelembe véve, a következőképpen jártam el:

50 ml szőlőlevet ill. annak megfelelő frakciók pH-ját 3,5-re állítottam be. Velük egyenlő térfogatú, vízzel telített etilacetáttal kétszer extraháltam. A szerves fázist egybegyűjtve 0,5 térfogat NaCl-dal telített vízzel mostam és 20C°-on vákuum alatt 5 ml-re pároltam be. Ezekből 250 μl-t felvittem a 0,5 mm vastagságú cellulóz-szilikagél (MN 300 – G_{f254}) lemezekre.

5:4:1 térfogat-arányú toluol:etilformiát:hangyasav oldószerkeverékben futtattam és Folin-Ciocalteu – Na_2CO_3-tal hívtam elő. A frakcionálási módszer

hatásossága ezzel a munkamenettel nagyon jónak bizonyult. Ezt mutatja az 1. és 2. ábra is, bár az ott használt minták monomer-flavonoid anyagtartalma igen alacsony volt.

Az ábrákon használt jelölések:

m a must extraktumai
ch a cinchonin kicsapásból származó oldat extraktumai
F a formaldehid kicsapásból származó oldat extraktumai

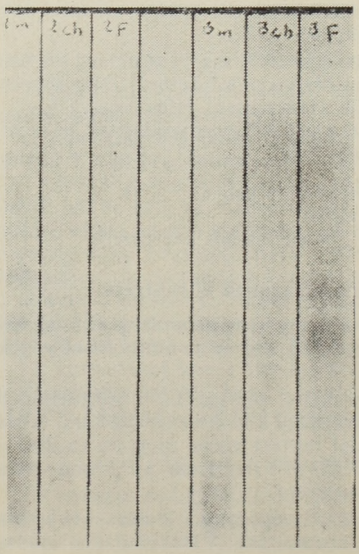
IV. A fenolanyagok meghatározási módszerét zavaró tényezők kiküszöbölése

A Folin-Ciocalteu reagensen alapuló kolorimetrikus fenolanyag meghatározási módszerét az alábbi tényezők befolyásolhatják:

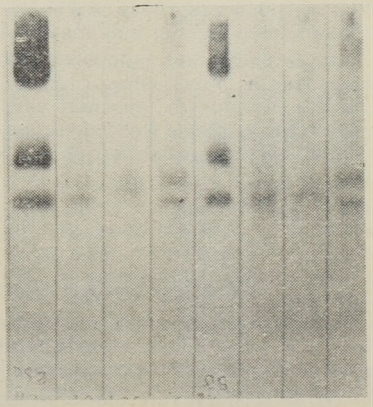
a) Reduktonok (aszkorbinsav, kéndioxid, vas-ionok)
b) Aminosavak (tirozin, és származékai)
c) Cukor, etanol, borkősav

A reduktonok hatását kiküszöbölhetjük, ha azoknak nagyobb mennyiségeit távoltartjuk mintáinktól (Technológia). A szőlőlében előforduló mennyiségek a módszert alig zavarják.

A szőlőlében előforduló, a módszert zavaró aminosavak (b.) koncentrációja is igen alacsony. Etanol a szőlőlében nincs és Singleton szerint [13] a borkősav is annyira felhígul, hogy nem zavar. A cukrok viszont jelentősen befolyásolják a módszert. Singleton 20%-os glükóz hozzáadás esetén 10%-os eltérést említ. Mivel a szőlőlében jelentős mennyiségű cukor van, ezt a tényezőt nem hanyagolhattuk el. Ugyanaz a helyzet a cukortartalmú borok fenolanyag-meghatározásánál is. Ezért a Szőlészeti és Borászati K. I.-ben *Donkó Elza* intézeti munkatárssal olyan vizsgálatokat végeztünk, amelyek erre bővebb felvilágosítást adnak (különböző cukorkoncentrációk esetén is).



1. ábra



2. ábra

Kétféle kísérletsorozatot végeztünk; az egyiket úgy, hogy különböző koncentrációjú galluszsav oldathoz (200, 300, 400, 500 mg/l) annyi 1:1 arányú glükóz:fruktóz oldatot adtunk, hogy az megfeleljen 2,5, 5, 10, 15, 20 és 25% cukrot tartalmazó oldatnak. (A 100 ml-es lombikba 1 ml minta mellett bemértünk 1 ml-t az illető cukoroldatból).

A galluszsav és glükóz-fruktóz keverékkel végzett kísérletsorozat esetén a cukrok az alábbi értékekkel emelték a molibdén-volfrámkék színintenzitását ill. annyit kell levonni a mért értékből, hogy a valódi fenolanyagoknak megfelelő értéket megkapjuk.

cukortartalom %	*levonás %*
1,0 – 2,49	6,80
2,5 – 9,99	13,29
10,0 – 19,99	17,74
20,0 – 25,00	20,66

Ezeket az értékeket nagyon magasaknak találtuk, ezért olyan körülmények között is akartunk kísérleteket végezni, amelyek közelebb vannak a valósághoz, mint a vízben oldott galluszsav. Ezt úgy oldottuk meg, hogy a kísérleteket olyan bormintákon végeztük, amelyek különböző fenolanyag tartalmúak voltak és amellett nem volt bennük cukor. (Az alkohol sem zavar ilyen higítás mellett [13]). A glükóz-fruktóz oldatot úgy adagoltuk, mint az előző sorozatnál.

Ebben az esetben az alábbi eredményeket kaptuk;

cukortartalom %	*levonás %*
1,0 – 2,49	3,0
2,5 – 9,99	6,0
10,0 – 19,99	10,0
20,0 – 25,00	15,0

Ezekből látható, hogy a cukor hatására jobban emelkedik a molibdén-volfrámkék színintenzitása a vizes galluszsav oldatokban, mint a száraz borokban. Mivel a bor konzisztenciája hasonló a szőlőléhez, mi a boroknál mért korrekciókat javasoljuk figyelembe venni a fenolanyagok ezen meghatározási módszerénél.

IRODALOM

[1] *Brugirard A., Tavernier A.:* Ann Technol. Agric., *3*, 311, 1952.
[2] *Bruckner, Gy.:* Szerves Kémia, *2*, 194, 520,1955.
[3] *El-Sayed A. S., Luh, B. S.:* J. of food science, *30*, 1016, 1965.
[4] *Ferenczi, S.:* A szőlő, a must és a bor kémiája, Mez. Kiad., Bp. 1966.
[5] *Harborne, J. B.:* Biochemistry of phenolic compounds, 618 p. Academic Press, New York, 1964.
[6] *Joslyn, M. A., Goldstein, J. L.:* Food Res., *13*, 179, 1964.
[7] *Kramling, T. E., Singleton, V. L.:* Am. J. of Enology and Viticulture, *20*, 86, 1969.
[8] *Miskov, O., Bourzeix, M.:* Industr. alim. agr., 1515, 1970.
[9] *Peri, C., Pompei, C.:* Am. J. of Enology and Viticulture, *22* (2), 55, 1971.
[10] *Peri, C., Pompei, C.:* Phytochemistry, *10*, 2187, 1971.
[11] *Peri, C. et al.:* J. Sci. Fd. Agric., *22*, January 1971.
[12] *Sapis J. C., Ribéreau-Gayon, P.:* Connaissance de la vigne et du vin, *2* (4), 323, 1968.
[13] *Singleton, V. L., Rossi J. A.:* Am. J. of Enol. and Vitic., *16* (3), 154, 1965.
[14] *Singleton, V. L., Esau P.:* Phenolic Substances in grapes and wine and their significance. Academic Press, New York and London, 1969.
[15] *Somers, T. C.:* Phytochemistry, *10*, 2175, 1971.
[16] *Van Sumere, C. F. et al.:* J. Chrom., *20*, 48, 1965.

PHENOLBESTANDTEILE DES TRAUBENSAFTES, EIGENSCHAFTEN UND BESTIMMUNGSMETHODE

E. Phiniotis

Die Phenolsubstanzen im Traubensaft können aufgrund ihrer chemischen Struktur und Eigenschaften in drei Gruppen eingereiht werden:

1. Nichtflavonoide Phenolsubstanzen,
2. Flavonoide ohne Tanningharakter
3. Flavonoide mit Taninncharakter.

Der Verfasser trennte die Gruppen mit einer kombinierten Fraktionierungsmethode und bestimmte sie gesondert. Die Methode wurde mit dünnschichtchromatographischen Verfahren kontrolliert.

Bei verschiedenen Traubensaft-Proben wurde ausser der Trennung auch noch die Bräunung (Messung der Farbintensität bei 425 nm Wellenlänge) gemessen. Er versuchte zwischen den Fraktionen der Phenolsubstanzen und der Bräunung einen Zusammenhang zu finden, doch aufgrund seiner bisherigen Versuche konnten keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden.

Schliesslich bespricht er die die Bestimmung störenden Faktoren und den störenden Einfluss des in verschiedenen Konzentrationen anwesenden Zuckers und teilt zwecks Eliminierung desselben eine Korrektionstabelle mit.

PHENOLIC SUBSTANCES OF GRAPE JUICE, THEIR PROPERTIES AND METHODS OF THEIR DETERMINATION

E. Phiniotis

On the basis of their chemical structure and properties the phenolic substances of grape juice can be classified in three groups: 1. non-flavonoidal phenolic substances, 2. flavonoids of a nature other than tannin, and 3. flavonoids of tannin character. These groups were separated from each other and determined by a combined procedure of fractionation and determination. The reliability of the method was checked by investigations by thin layer chromatography. Besides the separation of phenolic substances also the degree of browning (the colour intensity at the wavelength 425 nm) of various samples of grape juice was measured. It was attempted to find a correlation between the fractions of phenolic substances and browning but on the basis of the experiments carried out thus far no unequivocal conclusions could be drawn. Lastly the factors interfering with the determination and the interfering effect of sugar present in various concentrations are described, and the correction values eliminating these effects are given in a table.