

УКРАИНСКАЯ АКАДЕМИЯ АГРАРНЫХ НАУК
Институт винограда и вина "Магарач"

На правах рукописи

АРПЕНТИН Георгий Николаевич

УДК [663.251/252+663.257.9]:613.3(043.3)

**ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ СТОЛОВЫХ ВИН
С ПОВЫШЕННОЙ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТЬЮ И ИХ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА**

*05.18.07. - Технология продуктов брожения, алкогольных
и безалкогольных напитков*

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук**

Ялта - 1994 год

4-2.033
54.162.8



Работа выполнена в Институте виноградарства и виноделия Украины (ИВИ) в Национальном институте агрономических исследований (INRA, Франция, г. Нарбон)

Научные консультанты: доктор технических наук, профессор, Почетный академик Крымской академии наук, Заслуженный деятель науки Украины, Лауреат Государственных премий Украины и Молдовы Г.Г.ВАЛУЙКО;

доктор медицинских наук, профессор В.Н.СЕНИЦКИЙ

Официальные оппоненты: доктор технических наук, Лауреат Государственной премии Украины в области науки и техники А.С.ЛУКАНИН

доктор химических наук, профессор В.Я.ЧИРВА

доктор медицинских наук, профессор Л.А.ГРОМОВ

Ведущая организация: Национальный Аграрный Университет, г.Киев

Защита состоится "27" декабря 1994 года в _____14_____ часов на заседании специализированного совета Д.020.58.02 в Институте винограда и вина "Магарач" (334200, Крым, г.Ялта, ул. Кирова,31)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института винограда и вина "Магарач".

зотреферат диссертации разослан "27 "ноября_1994 года.

Ученый секретарь специализированного совета, кандидат технических наук *И.И.Журавлева* - л.и.Журавлева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Современные представления об особенностях состава и биологического действия вина на организм, являющихся сущностью их пищевой ценности, сформированы на основании фундаментальных исследований, значительный вклад в развитие которых внесли представители основных отечественных школ ученых-виноделов [Дурмишидзе, 1955; Унгуриян, 1961; Нилов, 1967; Преображенский, 1970; Валуйко, 1972; Датунашвили, 1974; Кишковский, 1976; Зинченко, 1978; Бурьян, 1978; Родоупло, 1983]. К их числу относятся работы, посвященные вопросам характеристики химического состава винограда и вина [Нилов, 1967; Валуйко, 1972; Зинченко, 1978; Кишковский, 1988], механизмов протекания физико-химического [Павленко, 1982; Мехузла, 1983; Ежов, 1988; Загоруйко, 1991] и биологического преаращения компонентов вин [Бурьян, 1978; Мартаков, 1985; Козуб, 1986; Кишковская, 1990], а также анализа диетических и пищевых свойств вина [Валуйко, 1990; Шольц, 1990].

Дальнейшие успехи в повышении качества вин и удовлетворении спроса потребителей определяют необходимость наряду с изучением токсикологических [Гаина, 1992; Руссу, 1993; Coker, 1993; Woller, 1993] и социальных аспектов потребления вина [Пятницкая и др., 1983; Наку и др., 1985; Синицкий, 1988; Sarnero, 1988; Richter, 1989], всестороннее расширения и углубления представлений о природе ценных компонентов состава вин и их значение для питания и здоровья человека [Mirouze, 1989; Валуйко, 1990; Masquelier, 1991; Franco, 1991; Bourzeix, 1993].

Органолептические свойства и пищевая ценность продуктов из винограда во многом определяется присутствием биологически ценных соединений, в том числе флаванолов, их олигомерных и полимерных форм (процианидины). Интерес к этой группе веществ определяется широким спектром реакционной способности и активности, а также наличием их в значительных количествах в растительных продуктах; с пищевыми продуктами человек ежедневно потребляет порядка 4 г фенольных соединений различной структуры (около 2000 наименований, из них на долю процианидинов приходится более 1 г).

Вместе с тем, проведенные немногочисленные исследования

флаванолов винограда и вина, в основном, касались мономерных и, частично, димерных форм процианидинов [Бокучава и др., 1970; Валуйко, 1972; Lea и др., 1979; Romeyer и др., 1986; Bourzeix и др., 1986]; большинство работ по установлению функциональных свойств процианидинов и их биологической активности были проведены с использованием смесей процианидинов с другими соответствующими веществами [Masquellier, 1991; Mitjavila и Fernandes, 1991], что затрудняет интерпретацию имеющихся данных. В ряде работ [Lea и др., 1978, 1979; Bourzeix и др., 1986] предприняты попытки проследить особенности превращения процианидинов в процессе приготовления белых, розовых и красных столовых вин. Однако данные этих исследований носят фрагментарный и зачастую противоречивый характер. В связи с этим попытки сделать какие-либо обобщающие выводы о составе процианидинов, их роли в формировании пищевой ценности вин и проявлении биологического действия на организм, оказываются весьма затруднительными.

Основная часть работ по теме диссертации выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ Украинской Академии Аграрных Наук ("Фундаментальные исследования", N- государственной регистрации УА 01003477 Р 1988- 1994 гг.). Исследования является также частью международного сотрудничества с Национальным Институтом Агрономических Исследований (INRA, Франция, 1990-1991) по программе "Вино и здоровье: биология и патология сосудов".

Целью настоящей работы явилась экспериментальное и теоретическое обоснование технологии вин с повышенной пищевой ценностью на основе комплексного изучения технологической роли и медико-биологического значения процианидинов.

Задачи исследования.

- (1) - Разработать комплекс методов получения процианидинов винограда и их количественного определения.
- (2) - Определить структурно-функциональные свойства процианидинов и их роль в технологии вина.
- (3) - Обосновать направление повышения пищевой ценности вин на основе регулирования состава процианидинов.
- (4) - Провести медико-биологическую оценку вин с повышенной пищевой ценностью.

Научная новизна. Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены основные научные положения технологии столовых вин с повышенной пищевой ценностью на базе регулирования состава биологически ценных компонентов. С использованием разработанных и усовершенствованных методов выделения, качественного и количественного анализа, впервые установлена структура процианидинов винограда *V. Vinifera*: трех димеров, четырех тримеров, семи тетрамеров, двух пентамеров и восьми галлированных производных. Впервые в винограде, белых и красных винах количественно определены процианидины В₁ 3-О-галлат, В₂ 3-О-галлат, тример С₁ и тример 2. Результаты исследования дают новые представления о качественном составе и количественном содержании процианидинов в составных частях виноградной грозди. Исследования структурно-функциональных свойств процианидинов позволили выявить ряд закономерностей, имеющих важное значение для выяснения их биологической и технологической роли, а также механизмов их действия. При этом впервые:

- установлены структурные признаки молекулы процианидинов, определяющие их антирадикальную активность, аффинитет к сложным и простым белкам, а также их значение в механизме ферментативного окисления;

- получены сведения о механизмах антиоксидантного действия, заключающиеся в способности процианидинов выступать в качестве "ловушки" свободных радикалов, а также ингибировать ферменты, генерирующие свободные радикалы.

- показано, что ферментативное окисление процианидинов, представляет собой сопряженный процесс с обязательным участием свободных орто-хинонов производных гидроксицианатов монофенолмонооксидазы и кислорода воздуха;

- выявлен регуляторный эффект процианидинов на начальный этап биосинтеза белка;

- установлены закономерности изменения процианидинов в процессе переработки винограда, мацерации мезги, технологических обработок, хранения и созревания лимоматериалов. Показано, что содержание процианидинов в готовом продукте зависит от следующих технологических факторов: объемной доли этилового спирта в бродящей мезге, температуры и продолжи-

тельности мацерации, давления прессования и наличия в незге гребней.

- экспериментально выявлена относительно высокая стабильность олигомеров процианидинов (включая тримеры) красных вин в процессе технологических обработок, хранения и созревания виноматериалов. При этом установлено защитное действие полимеризованных форм процианидинов и антоцианов, комплексов процианидинов с антоцианами.

В ходе медико-биологических исследований впервые обнаружен ряд эффектов вин и компонентов их состава - антиалкогольный, антистрессорный и антилучевой. При этом установлено, что повышение в крови концентрации этанола находится в прямой зависимости от количества содержащегося в вине ацетальдегида.

Практическая значимость. Разработан комплекс методов, обеспечивающий технологию получения препаратов процианидинов из винограда, со степенью чистоты не ниже 97% по основному компоненту и микрометод титрирования процианидинов. Разработан и апробирован метод количественного определения индивидуальных процианидинов винограда и вина. Выявленные структурные признаки, ответственные за биологическую активность процианидинов (антирадикальная активность, регулирование биосинтеза белка, взаимодействие с белковыми веществами) могут быть основой для дальнейшего целенаправленного поиска природных антиоксидантов, антисклеротических и антимикробных веществ, а также в технологии получения кормового и пищевого белка. Дана характеристика качественного и количественного состава процианидинов белых и красных сортов винограда, их распределение по структурным элементам грозди, что позволило выявить сорта, характеризующиеся высоким естественным потенциалом этих веществ. Полученные сведения могут быть использованы в справочных таблицах химического состава пищевых продуктов и в учебных курсах по биохимии и технологии вина. Установлена принципиальная возможность использования виноградных семян в качестве источника промышленного получения процианидинов для пищевой и фармацевтической промышленности, а также для изготовления косметических средств. Выявлены технологические факторы, регулирующие содержание процианидинов в конечной

продукте и их сохранение. Разработаны технологические приемы проведения мацерации мезги, обеспечивающие получение столовых вин с повышенной пищевой ценностью за счет их обогащения процианидинами. Обогащенные вина, полученные в условиях инкорпорирования, характеризуются также улучшенными органолептическими качествами, при этом отмечается хорошо развитый ароматический потенциал и лучшее сохранение окраски в процессе выдержки. Комплексными клинико-экспериментальными исследованиями показана перспектива использования таких типов вин в качестве адаптогенов, а также в лечебно-профилактических диетах с целью выведения из организма инкорпорированных радиоактивных изотопов цезия. Медико-социальный эффект производства вин с повышенной пищевой ценностью заключается в удешевлении организма человека биологически ценными веществами, их использовании для лечения и профилактики депрессивных расстройств при снижении риска алкоголизации населения.

Словные положения, выносимые на защиту:

(1) - Комплекс методов получения, идентификации и количественного определения процианидинов винограда и вина.

(2) - Технологическая роль и биологическое значение процианидинов в процессах ферментативного окисления, взаимодействия с белками и свободными радикалами определяются их структурно-функциональными свойствами.

(3) - Повышение пищевой ценности столовых вин осуществляется путем подбора сортов с высоким естественным потенциалом процианидинов, оптимальными технологическими режимами процесса мацерации мезги и соотношением ее компонентов.

(4) - Вина с повышенной пищевой ценностью, при умеренном потреблении, снижают токсичное действие этанола и обладают антистрессорными и радиопротекторными эффектами на организм.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и получили положительную оценку на заседаниях Ученого совета ИВБВ "Нагарач" (1988-1994 г.г.), V и VI научно-технических конференциях с международным участием по проблемам промышленной переработки винограда (Болгария, 1988, 1990), XV, XVI и XVII международных симпозиумах по фенольным соединениям (Франция, 1990; Португалия, 1992; Испания, 1994), Международной

конференции "Методы исследования растительных флаваноидов" (Франция, 1991), 33-ем съезде ИЮПАК (Венгрия, 1991), II и III международных конференциях "Виноград, вино и здоровье" (Франция, Курсан, 1990, 1992), Международной коллоквиуме по проблеме "Вино и здоровье" (Франция, Экс-ан-Прованс, 1992), 74-ой Генеральной Ассамблее МОВВ (Франция, 1994), Всесоюзных школах молодых ученых и специалистов виноградо-винодельческой отрасли, отразивших научных практических конференциях по проблемам промышленной переработки винограда (Ялта, 1984, 1986; Тбилиси, 1986-1988; Кишинев, 1988; Киев, 1993).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 38 работ, из них 15 - в зарубежных изданиях, получено 3 авторских свидетельства.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из 5 глав, содержащих 290 страниц машинописного текста, 40 рисунков, 62 таблиц, а также введения, заключения, списка литературы и приложения. Библиографический список включает 452 наименования, из них 147 на русском и 315 - на иностранных языках.

Объекты и методы исследований. Объектами исследования служили 8 белых и красных сортов винограда *V. Vinifera*, произрастающих на коллекционном участке ПОХ "Магарац", в т.ч. - Алиготе, Ркацители, Шардоне, Рубиновый Магараца, Каберне-Совиньон, Саперави, а также Гренаш белый и Мурведр из коллекции экспериментальной винодельческой станции Пеш-Руж (Груисан, Франция); структурные элементы грозди, виноматериалы и вина. В медико-биологических исследованиях действия вина на организм использовано 1712 беспородных белых крыс-самцов возрастом 8-15 мес. Клинические исследования проведены на 40 больных стационарного лечения в отделении радиационной патологии 25-й городской больницы г. Киева.

Основной арсенал применяемых методов составляли методы органической химии, математические и биологические методы. В процессе выполнения работы применялось: методы экстракции; различные виды хроматографии; электрофореза; ядерного магнитного резонанса; масс-спектрометрии; методы ферментативной кинетики; методы биологического тестирования в моделях *in vitro*; клинические методы; методы химии высокомолекулярных

соединений.

Опыты проводились в лабораторных (микровиноделие), полупроизводственных и клинических условиях. Полученные данные обрабатывались на ЭВМ с использованием метода наименьших квадратов; дисперсионного, корреляционного и регрессионного анализов и проверкой статистических гипотез. Существенность установленных различий параметров проверяли по критериям Стьюдента и Фишера. Проверку гипотезы о согласии выборочного распределения с теоретическим осуществляли по критерию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение и идентификация олигомеров процианидинов винограда

Предлагаемый комплекс включает совокупность методов экстракции суммарного препарата процианидинов, его фракционирование на отдельные формы (по степени полимеризации), разделение фракций на индивидуальные компоненты и оценку степени чистоты полученных соединений.

Экстракция. Предварительно измельченные в атмосфере диоксида углерода семена винограда обрабатывали по следующей схеме: MeOH/H₂O (4:1 об/об) в течение 4 ч при 25°С; MeOH/H₂O (1:1 об/об 4 ч, 25°С), дистиллированная вода (15 ч, -24°С); Me₂CO/H₂O (3:1 об/об, 1 ч, 25°С). Гидроiodуль на всех этапах экстракции составлял 1:1 (масс/об.). Полученные на каждом этапе экстракты объединяли и центрифугировали (17000 г, 10 мин, 10°С). Супернатант упаривали, сухой остаток растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и лиофилизировали. Суммарный препарат процианидинов хранили в герметичной посуде из темного стекла при -24°С.

Фракционирование. Суммарный препарат в виде 50% раствора в MeOH разделяли на колонке (460 x 70 мм в.д.) заполненной Fractogel TSK HW-40(s) (25-40 μm) используя в качестве элюента MeOH и систему для препаративной хроматографии среднего давления FMI (Metering, Inc., США).

В результате фракционирования суммарного препарата получили семь фракций F.I - F.VII флаван 3-олов и процианидинов.

Выход фракций составлял (% масс. суммарного препарата): F.I - 19.7; F.II - 15.8; F.III - 5.6; F.IV - 8.7; F.V - 6.1; F.VI - 4.4; F.VII - 4.2. В ходе регенерации колонки 75% раствором Me_2CO удалялись примеси, составляющего 35.5% от массы суммарного препарата.

Получение препаратов процианидинов. Из каждой фракции выделяли препараты флаван 3-олов и процианидинов с последующей их очисткой с использованием аналитической и препаративной ВЭЖХ на комплексе Gilson (колонка 250 x 41,4 мм Microsorb C 18, 100 Å, 5µm термостатируемой при температуре 30°C). Условия элюирования: скорость потока 40 мл/мин; А (0.25% раствор HCOOH), В (50% раствор MeOH): элюирование проводили в изократическом режиме 5% В в течение 10 мин, линейный градиент от 5 до 50% В, 30 мин, изократический режим 50% В, 10 мин с последующим кондиционированием колонки при стартовых условиях 10 мин.

Компоненты, содержащие более 5% примесей в дальнейшем хроматографировали на колонке (100 x 21.4 мм Microsorb C 18, 100 Å, 3µm) с применением элюента, представляющего раствор MeOH концентрация которого линейно изменялась от 10% до 20% в течение 15 мин.

В результате разделения семи фракций получено 37 препаратов флаван-3-олов и процианидинов.

Для доказательства гомогенности полученных препаратов использовали методы ТСХ на пластинах с силикагелем, ВЭЖХ на нормальной и обращенной фазах со спектральным анализом индивидуальности тестируемого компонента и капиллярный электрофорез. Критериями чистоты полученных препаратов являлись их хроматографическая, электрофоретическая и спектральная однородность. Чистота выделенных препаратов при использовании указанных методов анализа составила не менее 97% по основному компоненту.

В последующем, для идентификации изолированных процианидинов, каждое вещество подвергали ферментативному и полному гидролизу в сильнокислой среде, частичному гидролизу сернистой кислотой в присутствии толуол- α -тиола, а также анализу с использованием методов масс-спектрометрии (МС-БУА), ^1H -ЯМР, капиллярного электрофореза, аналитической ТСХ и ВЭЖХ.

Ферментативный гидролиз (Boukharta, 1988) применяли для установления наличия в структуре процианидинов остатка галловой кислоты.

Полный гидролиз (Portek и др., 1976) и анализ продуктов реакции (антоцианы) с помощью ТСХ на пластинках с целлюлозой MN 300 в системе НОAc-конц. HCl-H₂O (30:3:10) использовали для характеристики степени гидроксирования ядра В процианидина.

Частичный гидролиз в присутствии толуол- α -тиола (реакция тиолиза) применяли для определения состава мономерных единиц олигомера процианидина. Метод использовали для установления структуры тримеров, тетрамеров и пентанеров. С этой целью нами модифицирован классический метод тиолиза (Haslam, 1977) применительно к количеству процианидинов меньше 0.1 мг. При этом контроль кинетики деградации с помощью ВЭЖХ позволил получить информацию относительно структуры промежуточных фрагментов исследуемого процианидина; и, наконец, применение сернистой кислоты, как агента для гидролиза (вместо уксусной кислоты) одновременно предохраняет процианидины от окисления и возможных структурных модификаций (эпимеризации).

ИС-БУА: применяли для определения молекулярной массы процианидинов путем регистрации положительных ионов, образующихся в результате бомбардировки ускоренными атомами ксенона с величиной напряжения 8 кВ.

¹H-ЯМР ацетилированных производных процианидинов использовали для установления типа межфлавановой связи (C₄-C₈ или C₄-C₆), наличия остатка галловой кислоты (сигнал 6.96-7.07 м.д.) и степени гидроксирования кольца А и В (6.0-7.8 м.д.).

ТСХ: значение R_f процианидинов определяли путем их хроматографирования на пластинках с силикагелем (DC Alufolien-Kieselgel 60, 0.2 мм, Merck) в системе растворителей толуол-Ме₂СО-НСО₂Н (3:3:1), используя в качестве проявителя 1% раствор ванилина в концентрированной HCl.

ВЭЖХ и Капиллярный электрофорез использовали для определения величины R_t препаратов процианидинов.

Результаты структурного анализа флаван-3-олов и процианидинов обобщены в табл. 1.

Таблица 1.

Результаты структурного анализа процианидинов

Номер фракции	Компоненты	Ферментативный гидролиз	R _f	R _t , мин		Масс-спектры	
				ВЭЖХ	Капиллярный электрофорез	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
1	2	3	4	5	6	7	8
F. I	Галловая кислота		0,72	16,53	6,22		
	(+)-катехин (к)		0,67	34,92	10,77		
	(+)-галлокатехин		0,65	21,83	11,25		
	(-)-эпигаллокатехин		0,65	48,38	12,54		
	(-)-эпикатехин (Эк)		0,66	61,19	12,79		
F. II	B ₁ [Эк-(4β-8)-К];	-	0,40	30,17	12,05	579	
	B ₂ [Эк-(4β-8)-Эк];	-	0,42	42,99	13,44	579	601
	B ₃ [К-(4α-8)-К];	-	0,41	26,88	11,27	579	601
	B ₄ [К-(4α-8)-Эк];	-	0,42	34,09	11,12	579	601
	B ₇ [Эк-(4β-6)-К];	-	0,53	32,51	13,80	579	601
	B ₅ [Эк-(4β-6)-Эк];	-	0,52	40,52	13,71	579	601
	B ₆ [К-(4α-6)-К];	-	0,47	46,06	11,57	579	601
	B ₈ [К-(4α-6)-Эк];	-	0,47	61,13	11,02	579	601
	эпикатехин-3-О-галлат-(Эк-3-О-галлат)	+	0,60	27,75	12,23	443	-
F. III	тример С ₁ [Эк-(4β-8)-Эк-(4β-8)-Эк]	-	0,25	28,81	11,87	867	889
	тример 2 [Эк-(4β-8)-Эк-(4β-8)-К]	-	0,25	67,20	17,12	-	889
	B ₁ 3-О-галлат	+	0,30	66,10	16,34	731	753
	B ₂ 3-О-галлат	+	0,30	36,29	13,14	731	753

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8
F. IV	тример 4 [Эк-(4β+6)-Эк-(4β+8)-Эк]	-	0,25 36,46	13,26	867	889	
	тример 6 [Эк-(4β+6)-Эк-(4β+8)-К]	-	0,25 36,62	14,21	867	-	
	тример 5 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+6)-Эк]	-	0,27 52,04	13,71	867	-	
	тример 3 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+6)-К]	-	0,27 49,22	12,80	-	889	
	В ₂ 3'-О-галлат	+	0,35 59,00	15,30	731	753	
F. V	тетрамер 1 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк]	-	0,14 24,72	13,04	1156	-	
	тетрамер 2 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-К]	-	0,15 33,11	12,80	1156	-	
	В ₂ 3'-ди-О-галлат	+	0,26 43,96	13,52	-	905	
	В ₄ 3'-О-галлат	+	0,34 45,72	14,37	731	753	
	Тример 2 3'-О-галлат [Эк-(4β+8)-Эк-3'-О-галлат-(4β+8)-К]	+	0,18 27,54	15,01	1019	1041	
F. VI	тетрамер 7 [К-(4β+6)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк]	-	0,12 60,90	16,60	-	1178	
	тетрамер 6 [Эк-(4β+6)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-К]	-	0,12 47,90	16,34	1156	-	
	тетрамер 4 [Эк-(4β+6)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк]	-	0,12 31,52	11,02	1156	1178	
	В ₂ 3'-ди-О-галлат	+	0,24 52,97	12,63	-	905	
	Тример 5 3'-О-галлат [Эк-(4β+8)-Эк-3'-О-галлат-(4β+8)-Эк]	+	0,18 58,43	14,69	1019	1041	
F. VII	тетрамер 5 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк]	-	0,11 48,45	14,33	-	1178	
	тетрамер 3 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-К]	-	0,12 26,16	13,80	-	1178	
	пентамер 1 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк]	-	0,02 22,91	16,85	1445	-	
	пентамер 2 [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-Эк]	-	0,02 34,28	18,25	1445	1467	
	Тетрамер 1 3''-О-галлат [Эк-(4β+8)-Эк-(4β+8)-3'-О-галлат-(4β+8)-Эк]	+	0,08 51,56	17,17	1308	-	

Такии образом, в соответствии с поставленными задачами разработан комплекс методов, обеспечивающий технологию получения препаратов процианидинов из винограда со степенью чистоты не ниже 97% по основному компоненту. Данный комплекс включает экстракцию, фракционирование суммарных препаратов, разделение и оценку степени чистоты процианидинов. Для структурного анализа процианидинов разработан микрометод частичного гидролиза в присутствии нуклеофильного агента. Это позволило впервые установить структуру процианидинов винограда *V. vinifera*: трех димеров, четырех тримеров, семи тетрамеров, двух пентамеров и восьми галлированных производных.

2. Метод определения содержания процианидинов в биологических средах.

Принцип метода заключается в очистке суммарной фракции процианидинов исследуемого образца, разделение ее на компоненты и их количественное определение.

Очистку суммарной фракции процианидинов проводили на колонке, заполненной полиамидом TLC 6, используя в качестве элюентов последовательно следующие растворы: $5 \cdot 10^{-4}$ М фосфатного буфера, pH=7.0 (80 мл); смеси MeCN/H₂O (30:70 об/об, 50 мл) и Me₂CO/H₂O (75:25 об/об, 50 мл). Первые 130 мл элюата отбрасывали, как не одержащие процианидины. Последующие 50 мл элюата, содержащие суммарную фракцию процианидинов, упаривали, сухой остаток растворяли в 0.5-1.0 мл 50% раствора MeOH. Для количественного определения процианидинов использовали метод капиллярного электрофореза (Thompson, 1972) модифицированный нами применительно к объекту исследования. Модификация метода состояла в использовании капилляра (50 см x 50 Дм), 0.1М фосфатно-боратного буферного раствора, pH=7.0, содержащего 50мМ ДДС-Na и условий анализа (напряжение 50 кВ, температура $25 \pm 0.5^{\circ}$ С). Контроль за процессом разделения осуществляли измерением оптической плотности при длинах волн 280 нм и 313 нм.

Одновременное детектирование процесса разделения компонентов при длинах волн 280 нм и 313 нм показало, что фенол-

карбоновые кислоты удаляются из анализируемой смеси на стадии промывки хроматографической колонки фосфатным буфером.

Опыты, проведенные на модельных растворах, содержащих исследуемые компоненты в концентрациях 100 мг/дл^3 , а также на вине свидетельствуют о том, что использование в опытах смеси $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ в качестве элюента позволяет разделить мономерные формы (Рис. 1б), тогда как смесь ацетон/вода способствует десорбции с полиамида суммарной фракции процианидинов (Рис. 1а).

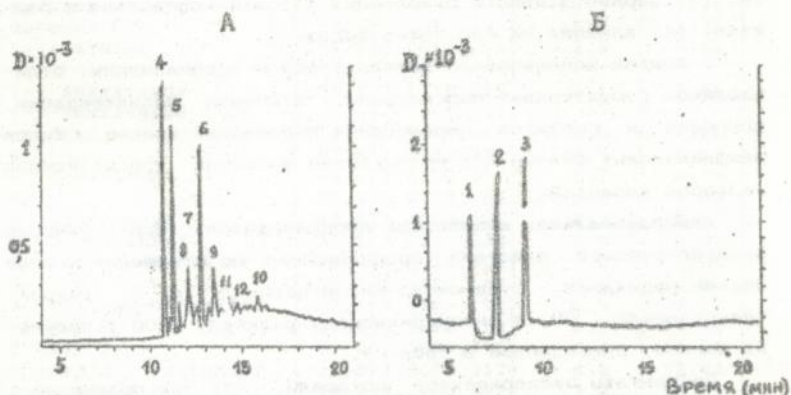


Рис. 1. Хроматограмма элюатов $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (Б) и $\text{MeCO}/\text{H}_2\text{O}$ (А).
 Обозначения: 1 - галловая кислота; 2 - (+)-катехин; 3 - (-)-эпикатехин; 4 - B_1 ; 5 - B_2 ; 6 - B_3 ; 7 - B_4 ; 8 - тример C_1 ; 9 - тример 2; 10 - B_1 3-О-галлат; 11 - B_2 3-О-галлат; 12 - B_2 3'-О-галлат.

Разделение мономеров и олигомеров было подтверждено также путем анализа элюатов методом ТСХ на пластинках с силикагелем.

В процессе последующего разделения и количественного определения процианидинов в суммарной фракции установлено, что выход тестируемых веществ при экстракции составляет не менее 94%. Рассчитаны метрологические характеристики метода: коэффициент вариации (W) - не более 6%, коэффициенты корреляции функции отклика в линейном динамическом интервале - 0.999, чувствительность метода в зависимости от компонента от 0.6

до 3.0 мг/дм³. Модификация метода сокращает время проведения анализа до 20 мин (продолжительность существующих методов ВЭЖХ порядка 140 мин).

3. Свойства процианидинов, их технологическая роль и биологическое значение.

С целью выяснения технологической роли и биологической активности идентифицированных процианидинов проведены исследования следующих их свойств: (1) антирадикальной активности; (2) ферментативного окисления; (3) взаимодействия с белками; (4) влияния на биосинтез белка.

В опытах использовали флаван-3-олы и процианидины, отличающиеся структурными параметрами: степенью полимеризации, природой, и порядком чередования мономерных единиц, типом межфлавановых связей и этерификацией молекулы процианидинов галловой кислотой.

Антирадикальная активность процианидинов. При изучении инактивирующего действия процианидинов по отношению к свободным радикалам - супероксид анион радикалу ($O_2^{\cdot -}$), гидроксил-радикалу ($\cdot OH$) и липоперекисному радикалу ($ROO\cdot$) получены данные, приведенные в табл. 2.

Результаты экспериментов показали, что по сравнению с классическими антиоксидантами (аскорбиновая кислота, трилокс, этанол, моннитол, бутилокситолуол, витамин Е), тестируемые процианидины являются эффективными ингибиторами $O_2^{\cdot -}$ ($IC_{50} = 10 \cdot 100 \mu M$), $\cdot OH$ ($IC_{50} = 10 \mu M$) и $ROO\cdot$ ($IC_{50} = 1 \cdot 100 \mu M$). Причем, инактивация $O_2^{\cdot -}$ процианидинами является pH-зависимой, существенно увеличиваясь в щелочной среде.

Способность процианидинов инактивировать свободные радикалы зависит от степени этерификации ($O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$, $ROO\cdot$), положение остатка галловой кислоты в молекуле процианидинов ($O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$), типа межфлавановой связи ($O_2^{\cdot -}$), природы мономерной единицы ($\cdot OH$) и степени полимеризации ($ROO\cdot$, $O_2^{\cdot -}$).

Сопоставление изменений начальных скоростей потребления ($V_1 O_2$) под влиянием процианидинов, подтвердило наличие их ингибирующего действия на активность O_2 , отмеченной в литературе для других классов фенольных веществ (Monboisse, и

Таблица 2.

Антирадикальная активность процианидинов

Тестируемые вещества	$O_2^{\cdot -}$ IC ₅₀ (μM)	·OH K ₀₁ *10 ⁻⁹ (M ⁰¹ *C ⁻¹)	ROO [·]	
			K ₁ *10 ⁻⁴ (M ¹ *C ⁻¹)	n
Аскорбиновая кислота	81,3	-	-	-
Тролокс	125,6	-	-	-
Этанол	-	1,20±0,079	-	-
Манитол	-	1,15±0,105	-	-
Бутилокситолуол	-	-	56,3	1,26
Витамин Е	-	-	10,2	1,75
(+)-Катехин	116,2	2,88±0,185	2,8	3,66
(-)-эпикатехин	250,0	3,17±0,239	3,1	3,48
(-)-эпикатехин-3-О-галлат	74,3	1,56±0,087	4,5	4,15
V ₁ 3-О-галлат	97,5	1,80±0,090	6,0	8,52
V ₂	68,0	2,01±0,317	6,7	8,75
V ₂ 3-О-галлат	95,3	1,41±0,152	5,7	8,70
V ₂ 3-О-галлат	62,8	2,40±0,201	6,2	8,93
V ₂ 3,3'-ди-О-галлат	30,1	3,59±0,238	6,8	9,15
V ₅	20,4	4,56±0,332	7,2	9,68
V ₅ 3,3'-ди-О-галлат	109,5	1,44±0,149	5,5	8,06
Тример С ₁	77,4	2,95±0,176	6,8	9,52
Тример 2	39,4	2,26±0,123	8,3	11,22
Тример 2 3'-О-галлат	67,8	2,78±0,155	8,4	11,85
Тетрамер 3	15,5	3,95±0,217	8,8	12,03
Тетрамер 1	49,2	2,18±0,122	7,8	10,89
Тетрамер 1 3"-О-галлат	35,4	2,58±0,150	8,9	13,51
Тетрамер 2	10,4	4,01±0,117	9,7	13,95
Тетрамер 3	32,9	2,92±0,168	9,3	13,68
Пентамер 1	40,2	2,85±0,176	8,5	13,29
Пентамер 2	48,6	2,88±0,143	9,4	15,12
Пентамер 2	42,3	3,01±0,242	9,5	15,88

др., 1983; Tio и др., 1985; Roba K и Gzydlewski, 1985).

В целом, оценивая полученные результаты, можно прийти к заключению, что процианидины обладают способностью эффективно ингибировать ·OH и ROO[·]. Это свойство процианидинов может проявляться в организме человека, контролируя соответствующие звенья цепи свободно-радикального окисления.

Относительно способности процианидинов инактивировать O₂^{·-}, результаты свидетельствуют о том, что антирадикальный эффект лимитируется физиологическими значениями pH; не исключено, что процианидины и их производные могут проявлять

антирадикальную активность в определенных компартментах клеточной структуры.

Результаты исследований дополняют сведения о механизмах антиоксидантного действия процианидинов: кроме хелатирования металлов переменной валентности (Porter, 1980) и проявления восстановительных эффектов по отношению к легкоокисляемым субстратам (Deby, 1984) нами выявлена способность процианидинов ингибировать ферменты, генерирующие $O_2^{\cdot -}$, а также выступать в качестве "ловушки" свободных радикалов.

Принимая во внимание полученные результаты, процианидины винограда могут иметь важное практическое значение при их использовании в качестве лечебно-профилактических препаратов при множестве острых и хронических патологий, патогенез которых включает окислительную деградацию мембранных структур клеток (воспаление, аллергия, лучевое поражение, алкоголизм, стресс, атеросклероз и др.), а также в геронтологии и гериатрии.

Ферментативное окисление процианидинов. Изучение процессов окисления в сусле и вине [Датунашвили и др., 1974; Миндадзе, 1976; Simpson, 1982, Валуйко и др., 1982; Sapis и др., 1983; Romeyer и др., 1985; Moutounet и др., 1990] не позволило прийти к однозначным выводам о роли фенольных веществ, как предшественников продуктов, вызывающих покоричнение и помутнение вин.

Проведенные исследования показали, что в отличие от мономеров, процианидины не являются прямым субстратом для МФМО. Добавление каftarовой кислоты к бинарной смеси "процианидин + МФМО" приводило к достоверному снижению концентрации процианидинов (в среднем на 82%), при этом содержание каftarовой кислоты уменьшалось на 36.5% против 74% в опыте "каftarовая кислота + МФМО".

Полученные данные дополняют классические представления о механизме участия фенольных веществ в процессах покоричневения суслу и вина. Результаты позволили экспериментально подтвердить, что ферментативное окисление процианидинов происходит по механизму сопряженного окисления с участием каftarовой кислоты, являющейся прямым субстратом для МФМО винограда; в результате функционирования цикла сопряженного

окисления наблюдается "экономия" кафтаровой кислоты, за счет частичного восстановления ее о-хинонов.

Анализ кинетики ферментативного окисления свидетельствует, что исследуемые соединения характеризуются практически одинаковой скоростью окисления: природа мономерной единицы, тип межфлавановой связи и степень полимеризации процианидинов не оказывает значимого влияния на скорость ферментативного окисления процианидинов. Вместе с тем, можно выделить два типа ферментативного окисления галлированных (1) и негаллированных (2) форм процианидинов, отличительной особенностью которых является различие в концентрации свободных о-хинонов кафтаровой кислоты. Причиной этого явления могут быть: (1) высокая скорость сопряженного окисления галлированных производных; (2) быстрое включение о-хинонов кафтаровой кислоты в продукты конденсации. Исследование скоростей окисления галлированных и негаллированных процианидинов показало их идентичность (Рис. 2).

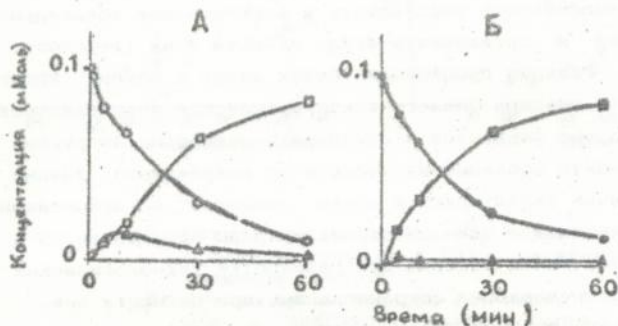


Рис. 2. (А). - Кинетика окисления процианидина В₂ (○) и образование его о-хинонов (▲), продуктов конденсации (○) присутствии кафтаровой кислоты (0.1 м.Моль) и МФМО винограда.
(Б). - Кинетика окисления процианидина В₂ (○) и образование его о-хинонов (▲) и 3'-О-галлат (●) и образование его о-хинонов (▲), продуктов конденсации (▲) в присутствии кафтаровой кислоты (0.1 м.Моль) и МФМО винограда.

Увеличение концентрации о-хинонов процианидина В₂ по от-

ношению к концентрации о-хинонов В₂-3'-О-галлата, а также более высокое содержание последнего в продуктах конденсации в начальный период инкубации (30 мин) подтверждает гипотезу о преимущественном включении их в конечные продукты реакции ферментативного окисления процианидинов. Возможной причиной тому является увеличение образования полимеров галлированных процианидинов или их кополимеров с кафтаровой кислотой. Более высокая реакционная способность галлированных процианидинов в этом процессе вероятно связана с гидроксильными группами галловой кислоты. Однако, к исходу реакции происходит выравнивание отличий между окислением галлированных и негаллированных производных процианидинов.

Такии образом, полученные данные свидетельствуют, что в реальных условиях переработки винограда и получения вина, окисление процианидинов представляет собой сопряженный процесс с участием свободных о-хинонов производных гидрооксицианатов, МФО и кислорода.

Взаимодействие процианидинов с белковыми веществами. Свойство процианидинов взаимодействовать с белками определяет их способность участвовать в формировании коллоидных помутнений и органолептических качеств вина (терпкость, горечь). Реакция процианидин-белок лежит в основе проявления широкого спектра биологической активности процианидинов: ингибирование ферментов и связывание некоторых вирусных белков, защита кровеносных сосудов от повреждений. Знание количественных характеристик этого свойства и закономерностей его изменения в зависимости от природы процианидинов и белка позволяет найти решения при разработке технологических приемов, обеспечивающих сохранение пищевой ценности вин.

Оценку взаимодействия между процианидинами и белками проводили путем измерения потери исследуемого вещества во времени с помощью ВЭЖХ. Метод используется нами впервые при исследовании реакции процианидин-белок. Исследования с использованием простых (поли-L-пролин, желатин, казеин) и сложных (кровяная мука, АГБ винограда) белков проведены на модельных растворах, имитирующих вино, а также на красных винах, полученных по различным схемам. Для характеристики аффинитета процианидинов к белкам, богатым пролином (муцин,

коллаген) в качестве моделей применяли Поли-L-пролины с Mw = 6400; 19000; 40000.

Аналитическое обобщение экспериментальных данных, полученных при исследовании реакции процианидин-белок, позволило выявить основополагающую роль в этом взаимодействии числа О-дифенольных групп (Рис. 3 А). Из всех исследуемых простых белков, наибольший аффинитет к процианидинам обладают поли-L-пролины, что связано с высоким содержанием пролина и открытой конформацией молекулы белка; аффинитет поли-L-пролина к процианидинам растет с увеличением молекулярной массы белка, однако зависимость носит нелинейный характер. Аффинитет процианидинов к поли-L-пролину, желатину и казеину достоверно увеличивается с ростом числа остатков галловой кис-

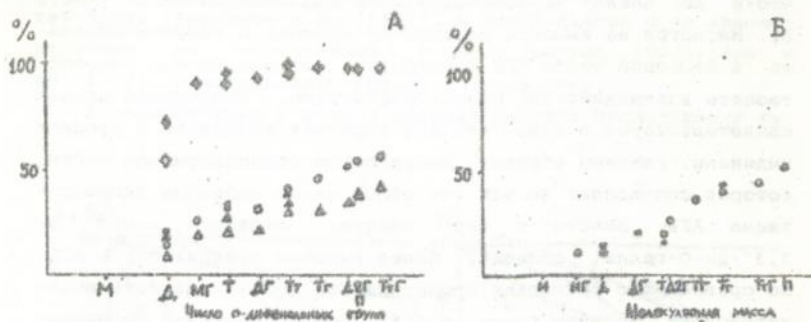


Рис. 3. (А) Потери процианидинов (%) после 8 ч инкубации с поли-L-пролином А (◇), желатином А (△) и казеином (○).

(Б) Потери процианидинов (%) после 8 ч инкубации с арабиногаллактоном-белок винограда (АГБ).

Символы указывают на структурные признаки молекулы процианидина: М - мономер; D_n - димер; Т - тример; Тт - тетрамер; П - пентамер; Г - остаток галловой кислоты. Белые символы - связь С₄-С₆; черные символы - связь С₄-С₆. Каждая точка на графике представляет собой среднее значение, полученных для процианидинов с одинаковыми структурными признаками.

лоты в молекуле процианидина и, в меньшей мере, с увеличением степени полимеризации.

Установлено, что процианидины с C_4 - C_6 связью с большей скоростью взаимодействуют с белками, по сравнению с процианидинами содержащими C_4 - C_8 связи.

Указанными причинами объясняется тот факт, что для полного связывания процианидина, при его концентрации в растворе в 200 мг/дл^3 , необходимо 750 мг казеина или 200 мг желатина. Поэтому на практике при технологических обработках вин для достижения сравнимых результатов оклейки, как правило, применяются более высокие дозы казеина, чем желатина.

Аффинитет процианидинов к сложным белкам существенно увеличивается с ростом степени полимеризации, при этом степень этерификации молекулы процианидина галловой кислотой оказывает меньшее влияние, а тип межфлавановой связи практически не влияет на взаимодействие процианидин-белок (Рис. 3 Б). Несмотря на высокое содержание пролина и гидроксипролина в белковой части АГБ винограда, которые должны способствовать взаимодействию белок-процианидин, полученные данные свидетельствуют о том, что АГБ образует комплексы с процианидинами, главным образом, посредством полисахаридной части, которая составляет до 94% от общей массы молекулы гликопротеина АГБ. Вместе с тем, следует отметить, что B_2 3,3'-ди-О-галлат обладает более высоким аффинитетом к АГБ, по сравнению с тримерами процианидинов. Эффективность взаимодействия процианидинов с АГБ, можно объяснить селективностью полисахаридной части молекулы гликопротеина, которая облегчает прохождение процианидинов через углеводную матрицу к белковой части молекулы АГБ, способствуя таким образом их комплексообразованию. Это положение подтверждается данными Ya и др. (1989), установивших, что различный аффинитет фенольных веществ к полисахаридам зависит от их способности преодолеть поры углеводной матрицы. Полученные результаты дают основание утверждать, что в сусле и вине процианидины реагируют с АГБ, присутствие которого в сусле доказано в работах Зинченко (1978), Ежов (1988), Soulnier и Brillnet (1989).

Выявленные структурные признаки процианидинов, ответственные за взаимодействие с поли-L-пролином позволяет заключить, что определенный вклад в ощущение терпкости и горечи

красных вин при сенсорном анализе, вносят галлированные олигомеры процианидинов с C_4-C_6 связью.

Вероятно, что взаимодействие АГБ с этими веществами в период выдержки и хранения винматериалов лежит в основе снижения терпкости молодых красных вин.

Полученные результаты являются теоретическим обоснованием режимов технологических обработок и созревания вин с целью сохранения их пищевой ценности.

Влияние процианидинов на биосинтез белка. На основании способности полифенолов к реакции с белками, их разнонаправленного влияния на активность ряда ферментов, существует мнение [Запретов, 1992], согласно которому вещества этого ряда выступают в качестве аллостерических эффекторов ферментативных процессов в растениях. В пользу этого предложения имеются сведения о способности флавоноидов влиять на биосинтез белка [Анисимов и др., 1972], а также данные о их взаимодействии на хромосомный аппарат клеток [Мелведева и др., 1972], и митохондрий [Нилте и Jones, 1983].

В соответствии с этим, задачей данного исследования яв-

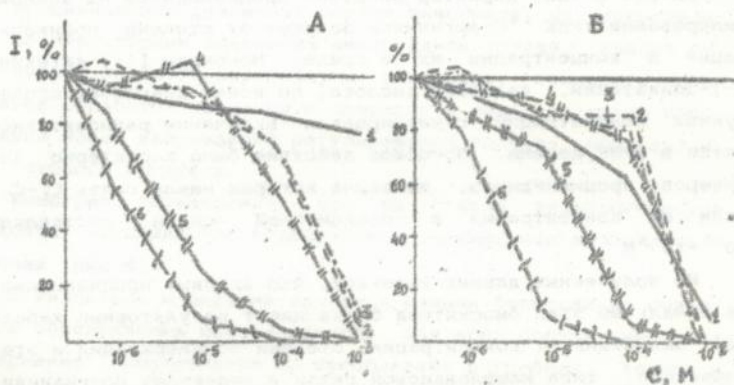


Рис. 4. Ингибирование (%) аминяцилирования тРНК глицином процианидинами.

А - эпикатехин (1), B_2 (2), B_5 (3), тример C_1 (4), тетрамер 1 (5), пентамер 1 (6).

Б - эпикатехин 3-О-галлат (1), B_1 3-О-галлат (2), B_2 3'-О-галлат (3), B_2 3,3'-ди-О-галлат (4), тример 2 3'-О-галлат (5), тетрамер 1 3''-О-галлат (6).

лялось изучение действия катехинов и процианидинов на процесс аминоацилирования тРНК глицином и аргинином представляющий собой начальный этап биосинтеза белка.

На рис. 4 представлены данные о связывании ^{14}C -глицина тРНК печени крыс в присутствии процианидинов в концентрациях (10^{-6} - 10^{-3} М).

Анализ результатов показал, что ингибирующий эффект процианидинов на аминоацилирование тРНК увеличивается с ростом степени их полимеризации. Если тримеры практически полностью подавляли связывание ^{14}C -глицина тРНК в концентрациях 10^{-3} М, то аналогичный эффект наблюдался в присутствии 10^{-4} М пентамеров или галлированных тетрамеров. В меньшей степени ингибирующий эффект связан с этерификацией процианидинов галловой кислотой и практически не обнаружено влияние на этот эффект таких структурных признаков как природа мономерной единицы и тип межфлавановой связи в молекуле процианидина.

Ингибирующий эффект процианидинов в отношении аминоацилирования тРНК аргинином определялся практически теми же структурными признаками молекулы процианидинов.

Вместе с тем, характер действия процианидинов на аминоацилирование тРНК ^{14}C -аргинином зависит от степени полимеризации и концентрации их в среде. Мономеры [(+)-катехин, (-)-эпикатехин, галловая кислота] по всему диапазону исследуемых концентраций стимулировали включение радиоактивной метки в тРНК печени. Подобное действие было характерно для димеров процианидинов, молекула которых имела связь C_4 - C_6 , если их концентрация в реакционной смеси составляла 10^{-5} - 10^{-6} М.

Из полученных данных вытекает, что влияние процианидинов на начальный этап биосинтеза белка имеет регуляторный характер, зависящий от концентрации, степени полимеризации и этерификации, типа межфлавановой связи в молекулах процианидинов.

Учитывая, что в механизме антибактериального действия антибиотиков ключевым моментом является ингибирование биосинтеза белка [Шапвиль и Энни, 1977; Ленинджер, 1988], полученные результаты являются перспективными для получения антимикробных препаратов на основе процианидинов винограда.

Эффект стимулирования биосинтеза белка мономерами и некоторыми процианидинами может представлять интерес в технологии получения кормового, пищевого белка, при использовании их в качестве активаторов роста промышленных микроорганизмов [Oshino и Sato, 1971].

4. Обоснование принципиальных направлений повышения пищевой ценности вин на основе регулируемого состава процианидинов

В комплексе проводимых исследований установление закономерностей изменения содержания процианидинов при технологической переработке винограда имеет важное значение для обоснования путей их регулирования и повышения пищевой ценности вин.

В качестве теоретической основы использованы полученные сведения о структуре, технологической роли и биологической активности процианидинов виноградной ягоды. В задачи экспериментов были включены вопросы оценки естественного потенциала процианидинов различных сортов винограда, их распределение по структурным элементам виноградной грозди, анализ существующих способов переработки винограда, технологических приемов обработок хранения и созревания вина, а также обоснование новых направлений регулирования состава процианидинов готового продукта.

Виноград. Установлено, что на стадии технологической зрелости максимальное содержание процианидинов находилось в семенах (рис. 5).

Сорта Ркацители и Шардоне являются самыми богатыми по содержанию определяемых процианидинов. Для всех сортов винограда содержание процианидина V_1 преобладает в гребнях, коже и мякоти, тогда как содержание процианидина V_2 превалирует в семенах винограда; тринеры процианидинов сосредоточены, как правило в гребнях и коже. Во всех исследуемых сортах, независимо от структурного элемента грозди, превалируют негаллированные формы процианидинов.

Не найдено существенных различий содержания процианидин в коже красных сортов (Каберне Совиньон, Губиновый Магарача,

Мурведр и Саперави). Разница содержания процианидинов в этих

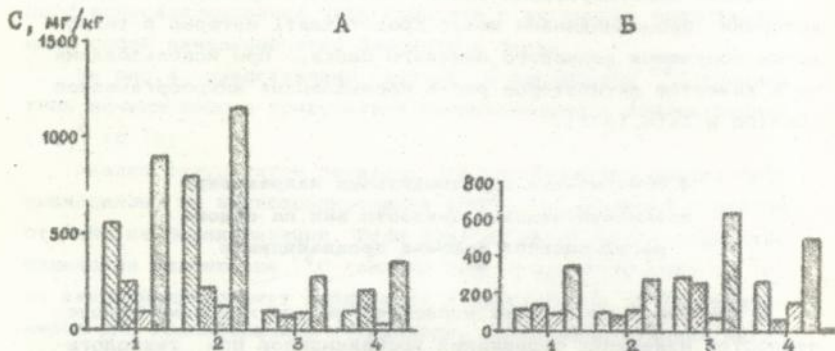


Рис. 5. Содержание процианидинов (мг/кг) в белых и красных сортах винограда.

(А): 1 - Шардоне; 2 - Ркацители; 3 - Гренаш белый; 4 - Алиготе.

(Б): 1 - Каберне Совиньон; 2 - Мурведр; 3 - Рубиновый Магарача; 4 - Саперави.

(▨) - семена; (▩) - гребни; (▧) - кожа; (▦) - мякоть; (▥) - сумма.

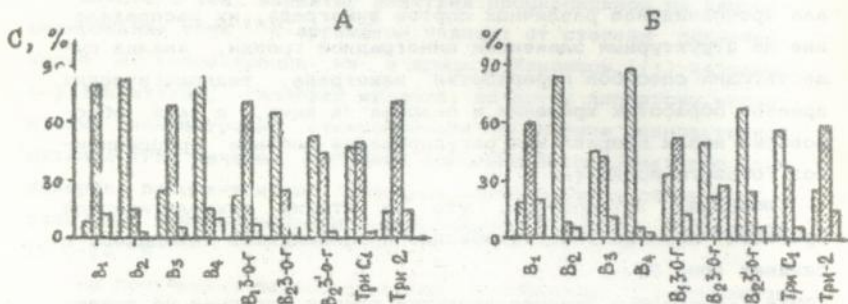


Рис. 6. Распределение процианидинов по структурным элементам виноградной грозди сортов Алиготе (А) и Рубиновый Магарача (Б).

(▨) - семена; (▩) - гребни; (▧) - кожа.

сортах находится на уровне семян и, в меньшей степени, на уровне гребней. В то же время эти сорта отличаются по содержанию процианидинов в семенах и, в меньшей степени, - гребнях (рис. 6.). Наличие существенных количеств процианидинов в се-

менах винограда, являющихся вторичным продуктом виноделия, позволяет рассматривать их как возможный источник получения этих ценных компонентов для пищевой и фармацевтической промышленности, а также для изготовления косметических средств. Полученные результаты о качественном и количественном содержании процианидинов, их локализации по элементам грозди, позволяют учитывать химический состав и свойства исходного сырья в технологии получения вин повышенной пищевой ценности.

Белые вина. Из приведенных результатов (Рис. 7), следует, что контакт суслу с твердыми частями виноградной грозди, способствует интенсивной экстракции процианидинов.

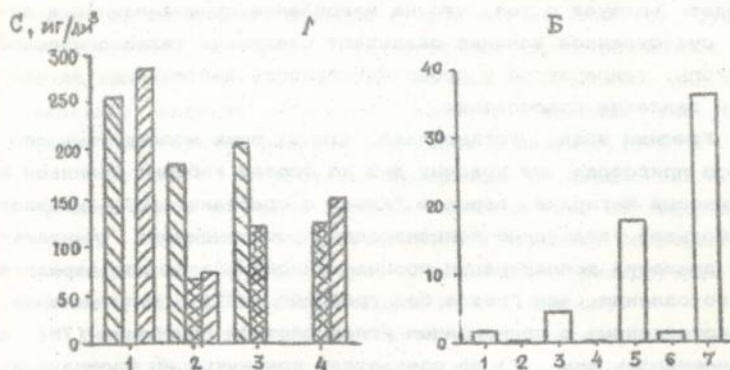


Рис. 7. Влияние способов переработки винограда на содержание процианидинов (мг/л) в красных (А) и белых (Б) винах.

(А) - мезга с гребнями (1); мезга без гребней (2); углекислотная мацерация (3); термовинификация (4); (▨) - Каберне Совиньон; (▩) - Мурведр; (▧) - Рубиновый Магарача;

(Б) - контроль (1); окислительная обработка суслу (2); настаивание на мезге (3); настаивание на мезге + окислительная обработка суслу (4); углекислотная мацерация (5); углекислотная мацерация + окислительная обработка суслу (6); прессовая фракция углекислотной мацерации (7).

Максимальные концентрации найдены в винах, полученных из прессовых фракций после углекислотной мацерации (УМП), затем следуют самотечные фракции после углекислотной мацерации

(УМ) и вина, полученные настаиванием сусла на мезге (НМ). Окислительная обработка сусла (О) вызывает существенные потери всех определяемых процианидинов. Установлено, что с увеличением давления прессования, повышается содержание процианидинов в соответствующих фракциях сусла (самотечные, прессовые); Так, в случае прессования винограда Рислинг рейнский содержание процианидинов возрастает в 25 раз, по сравнению с их уровнем в самотеке; для сортов Шардоне и Совиньон концентрация процианидинов в прессовых фракциях превышает в 100 раз концентрацию этих веществ в сусле-самотеке. Во всех исследуемых белых винах, содержание процианидина В₁ является преобладающим.

Таким образом, анализ способов переработки винограда свидетельствует о том, что на накопление процианидинов в вине существенное влияние оказывают следующие технологические факторы: температура и продолжительность настаивания на мезге и давление прессования.

Красные вина. Установлено, что из всех исследуемых способов приготовления красных вин из сортов Каберне Совиньон и Рубиновый Магараца, вариант "мезга с гребнями" (МГ) вызывает наибольшее увеличение концентрации процианидинов; минимальные значения концентрации процианидинов найдены для варианта приготовления вин "мезга без гребней" (МБГ). Красные вина, приготовленные с применением углекислотной мацерации (УМ) и термовинификации (Т) по показателю концентрации процианидинов занимают промежуточное место между упомянутыми способами МГ и МБГ (Рис. 7).

Оценивая совокупность полученных результатов, следует прийти к заключению о существенном изменении содержания процианидинов в красных винах под действием следующих факторов: температура и продолжительность настаивания, а также содержание этилового спирта в бродящей мезге.

Установлено, что в зависимости от схем обработки молодых красных винс материалов (бентонит, желатин, казеин, кровяная мука, Продукт АК) содержание олигомерных форм процианидинов катехинов практически не снижалось. Параллельно происходят снижение содержания полимерных форм фенольных соединений, а также комплексов процианидинов с ацтоцианами. Все сравниваемое

ные виды обработок удаляют из виноатериала в основном тетрамерные и пентамерные формы процианидинов.

Одним из известных приемов стабилизации красных вин является их нагревание с последующим горячим розливом. Однако влияние этого приема на содержание процианидинов до настоящего времени не исследовано.

В настоящей работе установлено, что обработка по схемам с горячим розливом (нагревание вина до 55-60°С, горячая фильтрация и розлив с ограничением воздуха) способствует увеличению интенсивности окраски красного столового вина при снижении концентрации галлированных форм процианидинов (до 12%) и, в меньшей степени (до 7%), - негаллированных процианидинов. Опытами на модельных системах показано, что увеличение интенсивности окраски в этом случае является функцией концентрации в среде галлированных процианидинов с C₄-C₆ межфлавановой связью. Полученные данные объясняют ранее наблюдаемые явления повышения качества красных вин (вкус и цвет) при горячем розливе [Филиппов и Валуйко, 1972].

В связи с отсутствием информации об изменениях состава процианидинов во время хранения красных вин, исследовали динамику содержания этих соединений в процессе созревания виноатериалов в дубовой таре, металлических резервуарах и бутылках (вариант с пастеризацией и без таковой).

Полученные результаты показали, что несмотря на имеющуюся тенденцию снижения, концентрация процианидинов во время хранения и созревания вин считается относительно высокой. Определением энергии активации и энтальпии скорости реакции процианидин-антоциан установлено, что основная причина снижения содержания процианидинов состоит в участии этих соединений в реакции самоассоциации (self-association) и коагментации. Кроме этого, во время хранения вин без доступа кислорода воздуха возможен спонтанный гидролиз C-C связи процианидинов; образующиеся карбокатионы реагируют с нуклеофильными атомами углерода в положениях C₆ и C₈ других молекул флаванолов, образуя при этом конденсированные танины (желтые пигменты), а в результате реакции с молекулами антоцианов, образуются комплексы типа танин-антоциан.

Совершенство полученных данных по эволюции содержания

процианидинов при технологических обработках, хранении и созревании вин позволили сделать вывод о высокой стабильности процианидинов в составе красного вина, что связано с защитным действием других форм фенольных соединений.

Анализ динамики содержания процианидинов на этапах переработки винограда и получения вин легли в основу технологии красных столовых вин с повышенной пищевой ценностью. Элементами ее являются подбор сортов винограда с высоким естественным потенциалом процианидинов и проведение процесса мацерации по одному из способов, приведенных в табл. 3.

Установлено, что обогащенные процианидинами вина характеризуются улучшенными органолептическими качествами, при этом отмечается хорошо развитый ароматический потенциал, лучшее сохранение окраски и гармоничность вкуса.

Исходя из суточной потребности взрослого человека в процианидинах 100-500 мг [Masquelier, 1989; Bourzeix и др., 1993] для ее удовлетворения требуется 0,1 - 0,3 л обогащенного красного вина (содержание процианидинов 1000 - 1500 мг/л), тогда как для достижения этого же результата требуется не менее 1 л вина, приготовленного по классической технологии (125-540 мг/л). Таким образом, для удовлетворения суточной потребности взрослого человека в процианидинах при использовании вин с повышенной пищевой ценностью, потребляется существенно меньшая доля этилового спирта, чем при применении вин, приготовленных по классической технологии. Доля этилового спирта в этом случае не превышает 30% максимальной дозы гигиенических норм потребления спиртных напитков, которая должна составлять не более 18-20% суточной энергетической потребности организма [Mirouze, 1985; Жюеих, 1985].

Медико-социальный эффект производства вин с повышенными пищевыми свойствами заключается, с одной стороны в удовлетворении организма человека биологически-активными веществами, с другой стороны - снижении риска алкоголизации населения. Апробация предлагаемых технологических принципов красных вин с повышенными пищевыми свойствами осуществлена в ходе производственных испытаний в ПОХ "Магарач" (пос. Виліно, Крым). Получены опытные партии красных столовых вин для проведения медико-биологических исследований.

Таблица 3.

Способы регулирования содержания
процианидинов в красных винах.

С п о с о б ы	Формы фенольных веществ, мг/дм ³			Дегуста- ционная оценка, баллах
	Общие фено- льные в-ва	Антоцианы	Катехины и проциан	
Брожение на мезге без гребней (кон- троль)	2830	440	418	7,31
Мацерация сброжен- ной мезги и вино- материала с конт- ролируемой темпе- ратурой (ММКТ)	2901	446	646	7,37
Терномацерация мезги (ТММ)	3626	518	1044	7,71
Окончательная тер- номацерация мезги (ОТМ)	3871	541	1409	7,72
Длительная мацера- ция мезги и вино- материала (ДММ)	3265	455	878	7,40
Добавление свежих семян	5872	602	3098	7,65
Добавление зрелых гребней	5660	524	2006	7,58

5. Медико-биологическая оценка столовых вин.

Задачами проводимых медико-биологических исследований являлись токсикологическая оценка вин, их влияние на биохимические механизмы эмоционального стресса и выведение радиоактивных веществ из организма.

Токсикологическая оценка вина. Проведенные в сравнительном аспекте исследования в острых опытах на животных с однократным введением водного раствора EtOH и красного вина с одинаковым количеством EtOH показали, что EtOH в составе вина всасывается медленнее, но его повышенный уровень в крови

удерживается дольше, вызывает значительно меньшее (3 раза) повышение содержания АцА, что связано с меньшей индукцией активности АДГ. Вероятно относительно невысокая индукция активности АДГ определяется ингибирующим влиянием компонентов, содержащихся в вине. Результаты исследований позволяют высказать предположение, что повышение функциональной активности катехоламиновой системы (НА, А, С) в условиях проведенных экспериментов вызывается не EtOH, а основным продуктом метаболического превращения - АцА.

Для изучения влияния вина на алкогольную зависимость, предварительно, путем тестирования, проведен отбор животных с предрасположенностью к алкоголизму. При проведении тестирования животных помещали в индивидуальные клетки при одинаковой освещенности с предоставлением свободного доступа к 15% раствору EtOH, воде и сухой пище. По данным 10-дневного наблюдения среднесуточного потребления EtOH каждым животным, была отобрана группа крыс, потребляющих EtOH не менее 2 мл/кг в сутки. В дальнейшем, на ПЭ крысах, после месячной алкоголизации, изучалось влияние на алкогольную зависимость вина и водного раствора EtOH. Потребление водного раствора EtOH (контрольные животные) или вина (опытные животные) осуществлялось в течение 10 дней.

Установлено, что замена потребляемого животными водного раствора EtOH виноградным вином приводит к резкому снижению содержания EtOH и исчезновению АцА, что объясняется значительным повышением (выше нормы) активности АДГ и АлДГ. Остается высокой и функциональная активность МЭОС. Следовательно, снижение содержания в крови EtOH и исчезновение АцА объясняется значительным усилением, под влиянием вина, обменного превращения EtOH. Показано, что потребление вина животными приводит к снижению содержания в крови А и нормализации содержания НА, С. В гипоталамусе происходит значительное повышение НА (в 3 раза по сравнению с состоянием алкогольной зависимости), не достигающее, однако уровня нормы. В тканях среднего мозга и новой коры под влиянием вина нормализуется содержание НА и С. Таким образом вино способствует усилению синтеза катехоламинов и нормализует обмен серотонина. Установлено, что при замене водного раствора EtOH вином содержа-

ние пирувата в печени снижается, хотя и превышает норму на 42%, нормализуется содержание мочевины и оксалоацетата, что свидетельствует о повышении окислительной функции трикарбонного цикла.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что компоненты, входящие в состав виноградного вина, в значительной степени снижают токсическое воздействие EtOH и, особенно АцА на центральную нервную систему и весь организм животных. Об этом свидетельствует более медленное всасывание EtOH, значительно меньшее содержание в крови АцА и более слабая реакция катехоламинной системы, играющей важную роль при воздействии на него токсических и других патологических факторов. Установлено также, что вино при употреблении животными вызывает процесс нормализации биохимических процессов, являясь ингибирующим фактором в механизме алкогольной мотивации.

Опыты по влиянию отдельных компонентов вин на метаболизм EtOH проводили с использованием 10% водного раствора EtOH, в который добавляли: сернистый ангидрид в концентрации, соответствующей его концентрации в вине - 100 мг/дм³ (опыт 1); янтарную кислоту - 500 мг/дм³ (опыт 2) и суммарный препарат процианидинов - 100 мг/дм³ (опыт 3). Влияние АцА на обменное превращение EtOH проводили с использованием вин типа херес различной степени зрелости, содержание АцА в которых находилось в следующих пределах: (4) - херес под пленкой (190 мг%); (5) - хересный виноматериал (4 мг%); (6) - херес выдержанный (170 мг%). Установлено, что:

- содержание EtOH в крови животных первой группы не отличается от контрольной, содержание же АцА снижается. Полученные данные объясняются известным фактом, что серусодержащие соединения (унитол, метабисульфит натрия и др.) проявляют специфическую активность как антитоксиканты при интоксикации АцА (Езриелев, 1968, 1975);

- янтарная кислота также не влияет на содержание EtOH и активностей АДГ и АЛДГ; в то же время отмечается тенденция к увеличению содержания АцА в крови животных;

- суммарный препарат процианидинов вызывал увеличение содержания АцА в крови, которое коррелировало со снижением

активности АДГ;

- значительное повышение в крови концентрации EtOH в первые минуты после приема хереса определяется количеством содержащегося в нем АцА, а не этилового спирта - чем больше АцА, тем больше повышается в крови уровень EtOH. Характерным является быстрое и более выраженное повышение АДГ после введения хереса (по сравнению с водным раствором EtOH).

Таким образом токсикологическая оценка виноградных вин и анализ влияния отдельных компонентов состава вин на метаболизм EtOH свидетельствует о значительно меньшей токсичности виноградного вина по сравнению с водным раствором EtOH. Вместе с тем токсическое действие вин типа херес, обусловленное повышенным содержанием АцА накладывает ограничение на количество его потребления (в качестве аперитива). Кроме этого, актуальной задачей технологии вина типа Херес является разработка приемов снижения содержания АцА в готовой продукции.

Влияние вин на биохимические механизмы эмоционального стресса. Экспериментальные исследования проведены на двух моделях стресса: 1-я - создавались условия угрозы утопления белых крыс; 2-я - воздействие на животных звукового раздражителя силой 80 дБ в течение 30 сек. Экспериментальные животные перед воздействием стрессирующих факторов получали 10% раствор этанола, натуральное вино или 10 мг сукцината натрия на 1 г массы животного в виде водного, спиртового (на 10% раствор этанола) или винного раствора. Дозу раствора этанола и вина животным задавали из расчета 1 г абсолютного алкоголя на 1 кг массы животного.

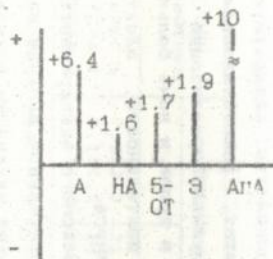
В результате исследований установлено (рис.8), что при обеих моделях стресса раствор этилового спирта и натуральное вино изменяют уровни катехоламинов и серотонина крови в сторону нормализации.

При этом более выражен эффект купирования стресса, если животные получали натуральное вино. Важно отметить, что на фоне нормализации содержания адреналина и норадреналина в крови животных, существенно ниже концентрация в крови этанола (в 5-6 раз) и ацетальдегида.

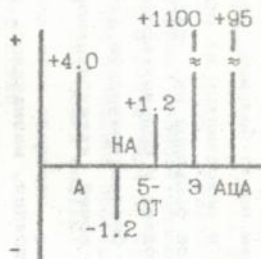
Сочетанное действие сукцината натрия с раствором этило-

I-я модель стресса

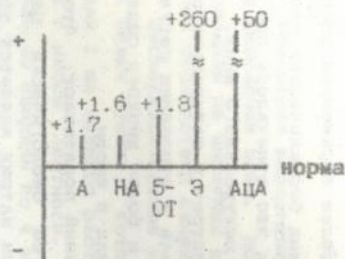
Стрессированные животные



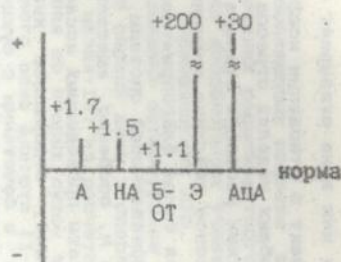
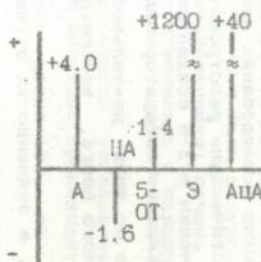
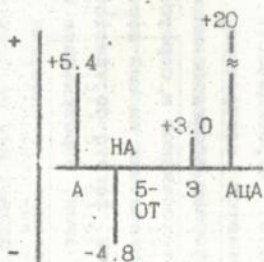
Стрессированные животные + раствор этанола



Стрессированные животные + красное вино



II-я модель стресса



Примечание: " + " - достоверное увеличение; " - " - достоверное уменьшение
 Рис.8 Сравнительный анализ действия этилового спирта и вина на биохимические механизмы эмоционального стресса .

вого спирта или вина оказывает еще более выраженный нормализующий эффект в отношении исследуемых биохимических показателей при обеих моделях стресса, чем это отмечалось при введении животным раствора этанола или натурального вина. Причем комплексное действие сукцината натрия и натурального вина является более благоприятным, как в отношении регуляции симпатикоадреналиновой системы, так и более низкого содержания этанола и, особенно, ацетальдегида в крови.

Результаты проведенных исследований показывают, что натуральное вино, содержащее множество биологически ценных компонентов в сочетании с сукцинатом натрия является эффективным регулятором биохимических механизмов эмоционального стресса и, при этом значительно ослабляет токсическое влияние алкоголя на организмы.

Клинические исследования проведены на 40 больных, страдающих невротическими расстройствами и находящихся на стационарном лечении в 3-й психиатрической больнице им. Павлова (г. Киев). Клинико-лабораторными методами у больных исследовали высшую и низшую деятельность, биоэлектрическую активность головного мозга, экскрецию с мочой катехоламинов и серотонина.

Больными, в зависимости от их состояния, назначалось вино в количестве 100-200 мл три раза в день до еды в течение 10 дней.

В результате исследований установлено, что у больных, принимающих вино, улучшается общее самочувствие, отмечается исчезновение депрессивных состояний, а также таких симптомов как тревожность, агрессивность, беспокойство, раздражительность, улучшается настроение, аппетит, восстанавливается сон. Лабораторные исследования обнаружили нормализацию содержания катехоламинов и серотонина в крови и моче больных. Улучшались показатели высшей нервной деятельности, электроэнцефалографии, вегето-сосудистого тонуса.

Таким образом, в результате комплексного экспериментального исследования установлено положительное влияние натуральных виноградных вин на биохимические механизмы психоэмоциональных расстройств. Существенным моментом этого влияния является ослабление токсического действия этанола на орга-

низм.

Ускорение выведения радиоактивных веществ из организма под действием вина. Исследования радиозащитного эффекта вин проводили на животных и людях-добровольцах участниках ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС.

Экспериментальные исследования осуществляли на беспородных белых крысах, которым в первый день эксперимента *per os* ввели 1 мл водного раствора цезия-137 из расчета 40 кБк на 100 г массы животного. Начиная со вторых суток ежедневно перорально вводили по 4 мл белого вина Алиготе (1-я группа) и красного вина "Рубиновый Магарача" (2-я группа). Регистрацию радиоактивности животных проводили при помощи γ -спектрометра АМА-02Ф1. Через 1,7,14 суток после введения цезия-137 забивали по 15-17 животных из каждой группы. Органами для исследования распределения радионуклидов были желудок, кишечник, кости, мышцы, селезенка: надпочечники: печень и почки. Регистрация радиоактивности производилась с помощью низкофонового α - β -счетчика NR-610.

На основании проведенных опытов установлено (табл.4), что для обеих опытных групп животных происходит достоверное увеличение скорости выведения цезия-137, по сравнению с контрольной.

Таблица 4.

Динамика выведения цезия-137 у крыс контрольной и экспериментальных групп, (Результаты выражены в % от введенной дозы, $M \pm m$, n=13)

Группы животных	Время от начала эксперимента в сутках				
	1	5	7	12	14
Контроль	7,9 \pm 3,7	31,3 \pm 2,9	-	49,1 \pm 2,5	54,6 \pm 1,6
Группа 1	6,1 \pm 4,2	26,9 \pm 6,7	36,5 \pm 3,5	53,6 \pm 4,	60,7 \pm 3,1
Группа 2	5,6 \pm 4,7	35,0 \pm 7,5	45,1 \pm 10,0	-	66,8 \pm 5,3

Эффект действия красного вина сильнее, чем у белого: животные 2-й группы за 14 дней эксперимента вывели Cs-137 на 22% больше, чем в контроле, а 1-й группы - всего на 11%.

Установлено, что на вторые сутки эксперимента наибольшее

количество цезия-137 содержалось в мышцах, почках, кишечнике, селезенке: несколько меньше в надпочечниках и еще меньше в костях и печени. Оценка распределения цезия-137 в организме крыс на 7-е сутки показала, что по количеству радиоактивного вещества в 1 г ткани органа животных располагается в следующем порядке:

1-я группа: мышцы > печень > кишечник \approx селезенка \approx почки \approx желудок > надпочечники \approx кости.

2-я группа: мышцы > почки > печень \approx желудок \approx кишечник \approx селезенка \approx надпочечники \approx кости.

Анализируя динамику Cs-137 в различных органах крыс установлено, что за 2-7 суток после введения Cs-137 происходит накопление его в мышцах и уменьшается в костях, селезенке, надпочечнике и почках животных как первой, так и второй групп. За этот же период содержание Cs-137 в желудке и кишечнике крыс первой группы практически не изменяется, а в печени даже несколько увеличивается, в то время как у животных второй группы наблюдалось уменьшение Cs-137 в этих органах. В конечном итоге в печени, селезенке, желудке и мышцах крыс второй группы на седьмой день эксперимента содержится меньше Cs-137, чем в соответствующих органах крыс первой группы. Эти факты свидетельствуют о некоторой различии в действиях компонентов красных и белых вин на процессы выведения и перераспределения этого радионуклида. На 14 сутки существенной разницы в содержании Cs-137 в органах крыс контрольной и подопытной групп не наблюдалось, что является косвенным доказательством сбалансированности действий вин на обмен веществ в организме.

Полученные данные легли в основу гипотезы, согласно которой механизм радиозащитного действия вин, вероятно, заключается в стимуляции естественного минерального обмена и физиологических функций (диуреза, желче- и тепловыведения). При этом не исключено присутствие в составе вин соединений, препятствующих всасыванию (или отложению в критических органах) и способствующих ускорению выведения из организма радионуклидов.

Клинические исследования проводили на 40 добровольцах (мужчин) возрастом от 30 до 50 лет, пострадавших в результа-

те аварии на Чернобыльской АЭС и находившихся на стационарном лечении в отделении радиационной патологии 25-й больницы г. Киева. Лечение обследованных больных, подвергшихся постоянно внутреннему облучению инкорпорированными радионуклидами во время работы на ЧАЭС, проводили с включением в рацион питания красного вина "Рубиновый Магарача" - по 200 мл 3 раза в день до еды в течение 21 дня.

Установлено, что содержание Cs-137 и Cs-134 в крови, моче, кале в процессе энотерапии на 8-10 день возрастает, а на 20-21 день достоверно снижается, по сравнению с исходным уровнем. Исследования выведения Cs-137 и Cs-134 из организма показали, что уровень радионуклидов у людей, потребляющих вино снизился более чем в 2 раза, по сравнению с контрольной группой (не принимавших вино) за один и тот же промежуток времени. Следовательно, прием красного вина пациентами способствует ускорению выведения Cs-137 и Cs-134 из организма. Выявленный радиозащитный эффект вина очевидно связан с выходом радионуклидов из "тканевых депо" в жидкие среды организма, благодаря общедетоксицирующему действию вина с последующим их выведением не только с калом, но и с мочой. Если увеличение содержания радионуклидов в кале можно объяснить их прямым связыванием в желудочно-кишечном тракте, то увеличение их содержания в моче свидетельствует об опосредованных механизмах выведения за счет улучшения функционального состояния естественно детоксицирующих систем, в частности печени и почек.

Таким образом, результаты исследования позволяют заключить, что виноградное вино способствует ускорению выведения радионуклидов из организма человека и может быть рекомендовано в диетическом питании людей, с целью выведения инкорпорированных радиоактивных изотопов цезия.

ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

1. На основе изучения структурно-функциональных свойств и установления роли процианидинов в формировании качества вина, исследования особенностей их превращения в процессе

переработки винограда и проведения медико-биологической оценки вин осуществлен вклад в развитие перспективного научного направления создания обоснованной технологии вин с повышенной пищевой ценностью.

2. Впервые на базе разработки комплекса методов получения препаратов процианидинов и усовершенствования методов их структурного анализа идентифицировано в винограде *V. Vitis* 24 соединения: трех димеров, четырех тримеров, семь тетрамеров, двух пентамеров и восьми галлированных производных.
3. Методами биологического тестирования и моделирования исследована реакционная способность процианидинов в процессах ферментативного окисления, взаимодействия с белками и их антирадикальная активность. При этом впервые установлено, что:
 - аффинитет процианидинов к истинным белкам пропорционален числу орто-дифенольных групп, увеличивается с ростом степени этерификации, и, в меньшей мере, зависит от степени полимеризации и количества связей C_4-C_6 в молекуле процианидина;
 - аффинитет процианидинов к сложным белкам (арабиногалактан - белок винограда) в основном зависит от молекулярной массы процианидина;
 - регуляторный эффект процианидинов на начальный этап биосинтеза белка определяется их концентрацией в среде. Эффект активации находится в обратной зависимости от степени полимеризации процианидинов; ингибирование биосинтеза белка усиливается с увеличением степени полимеризации и их этерификации галловой кислотой;
 - антирадикальная активность процианидинов зависит от степени этерификации (для $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, ROO^{\cdot}), положения остатка галловой кислоты (положение 3' более эффективно для инактивации $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$), типа межфлавановой связи (связь C_4-C_8 более эффективна, чем C_4-C_6 для инактивации $O_2^{\cdot-}$) и, в меньшей степени, - от природы мономерной единицы [$\cdot OH$, (+)-катехин более эффективный чем (-)-эпикатехин] и степень полимеризации (для ROO^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$).

- ферментативное окисление процианидинов, независимо от их структуры, представляет собой сопряженный процесс с обязательным участием свободных орто-хинонов производных гидрооксидцианиатов, ММО и кислорода воздуха.

Выявленные закономерности и новые сведения о реакционной способности процианидинов расширили представления о их биологической активности и технологической роли, а также позволили рассматривать показатель содержания процианидинов в качестве объективного критерия, характеризующего пищевую ценность вина.

4. Установлено, что технологический запас процианидинов, представляющих преимущественно их негаллированные формы, по количественному составу зависят от сорта винограда. Их содержание по структурным элементам грозди распределено следующим образом (в порядке убывания): семена + гребни + кожица + мякоть. Следовательно, для приготовления вин с повышенной пищевой ценностью должны использоваться сорта винограда с высоким содержанием процианидинов, а вторичное сырье и отходы производства (семена, гребни) являются перспективными источниками этих ценных компонентов.
5. Анализом динамики процианидинов в системе виноград-сусло-вино установлено, что основные технологические факторы, оказывающие влияние на переход и сохранение процианидинов в готовом продукте являются: для белых вин - давление прессования, температура и продолжительность настаивания на мезге; для красных вин - объемная доля этилового спирта в бродящей мезге, температура и продолжительность мацерации, а также наличие в мезге гребней. Относительно высокая стабильность олигомеров процианидинов (включая тримеры) красных вин в процессе технологических обработок, хранения и созревания виноматериалов обеспечивается защитным действием полимеризованных форм процианидинов и антоцианов, а также комплексов процианидинов с антоцианами.
6. Обоснована технология получения столовых вин с повышенной пищевой ценностью, элементами которой являются подбор сортов винограда с высоким естественным потенциалом

процианидинов и проведение процесса нацерации мезги во время или после спиртового брожения. Установлены оптимальные технологические режимы процесса нацерации мезги (температура, время, объемная доля спирта, доза SO_2 , насосовая доля гребней и семян), обеспечивающие повышение содержания процианидинов в столовых винах.

7. На основании медико-биологических исследований установлено, что вина обладают антиалкогольными, антистрессорными и радиозащитными действиями. При этом показано, что антиалкогольный и антистрессорный эффекты определяются замедленным всасыванием этанола, значительно меньшим содержанием в крови ацетальдегида, ослаблением реакции симпато-адреналиновой системы и алкогольной мотивации. Наблюдается же эффекты положительно коррелировали с содержанием в вине процианидинов, янтарной кислоты, сернистого ангидрида, и отрицательно - с содержанием уксусного альдегида (вина типа Херес). Радиозащитное действие вин более выражено у красных вин и связано с хелатированием радионуклидов в желудочно-кишечном тракте, усилением диуреза, естественного минерального обмена и желчевыделения.
8. Определены перспективные направления совершенствования технологических процессов в отрасли и медико-биологических исследований вин: создание оригинальных марок напитков, концентратов и вин, их использование в качестве адаптогенов и радиопротекторов; получение лечебно-профилактических препаратов антиоксидантного, антисклеротического и антимикробного действия на основе процианидинов; повышение гигиенических свойств вин (типа Херес) путем снижения содержания ацетальдегида; использование вторичных продуктов виноделия с целью получения препаратов процианидинов для пищевой и фармацевтической промышленности, а также для изготовления косметических средств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статья в периодических изданиях.

1. Арпентин Г.Н., Валуйко Г.Г., Карпов С.С. Влияние способов переработки винограда на качество винона материалов для игристых вин. // Садоводство и виноградарство Молдавии.

1986. - №8 - с. 34-36.

2. Арпентин Г.Н. Разработка интенсивных способов извлечения и осветления виноградного сока: Автореф. дис. канд. техн. наук. - Ялта, 1987. - 25 с.

3. Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н., Калдаре И.Г. Интенсивные способы извлечения и осветления виноградного сока. // Тр. 5 научно-техн. конф. с междунар. уч. "Переработка винограда - настоящее и будущее" - Варна (НРБ). - 1988. - с. 20-21.

4. Валуйко Г.Г., Тихонов В.П., Виноградов В.А., Арпентин Г.Н. Непрерывное осветление виноградного сусла с использованием сетчатых фильтров и сепараторов. // Тр. ВНИИВИП "Магарач". - Ялта. - 1988. - с. 28-46.

5. Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н., Калдаре И.Г. Интенсивни методи за извличане и избистряне на гроздов сок // Лозарство и винарство. - 1988. - №4. - с. 31-34.

6. Калдаре И.Г., Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н., Белоусов А.И. Интенсификация сепарирования виноградного сусла // Пищевая промышленность. - 1989. - №3. - с. 42-44.

7. Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н., Незальзов И.Д. Технологические аспекты приготовления диетических, низкокалорийных виноградных вин // Виноградарство и виноделие СССР. - 1990. - Вып. 5. - с. 37-40.

8. Арпентин Г.Н. Функциональные свойства на пептиде и тяхната роля в обезпечаване качеството на вината // Тр. 6 научно-техн. конф. с междунар. уч. "Новое в производстве виноградных вин". - Варна (НРБ). - 1990. - с. 32-38.

9. Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н., Боечко И.Д., Лютов А.И. Виноградное вино как система антиалкогольных веществ // Виноградарство и виноделие СССР. - 1990. - №5. - с. 32-36.

10. Valouiko G.G., Argentine G.N. Effets radioprotectrice des bioflavonoides du vin et du raisin // Compte rendu, journee internationales d'etudes sur les polyphenols (JIEP): Strasbourg (France). - 1990. - V.15. - P. 103-109.

11. Арпентин Г.Н., Тихонов В.П., Виноградов В.А. Интенсификация суслоотделения с использованием дренажных материалов // Виноградарство и виноделие СССР. - 1990. - №2. - с. 50-54.

12. Незальзов И.Д., Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н. Современные способы и перспективы производства жемчужных вин // Виноградарство и виноделие СССР. - 1991. - №3. - с. 72-76.

13. Argentine G.N., Cheynier V., Bourzeix M., Moutounet M. Affinity of grape seed procyanidins for several proteins // 33rd IUPAC Congress, Boudapest Technology University. - Boudapest (Hungary). - 1991. - P. 184-188.

14. Валуйко Г.Г., Моталкин В.В., Арпентин Г.Н., Гулий М.Ф., Синицкий В.Н. Особенности метаболизма этанола и биогенных аминов у животных при введении виноградного вина "Алиготе" // Виноградарство и виноделие СССР. - 1991. - №5. - с. 51-59.

15. Валуйко Г.Г., Моталкин В.В., Арпентин Г.Н., Гулий М.Ф., Синицкий В.Н. Влияние виноградного красного столового вина на алкогольметаболизирующую систему и содержание биогенных аминов в острой опыте на животных // Виноградарство и виноделие СССР. - 1991. - №6. - с. 60-66.

16. Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н. Биологически или экологически чистое вино // Виноградарство и виноделие СССР. - 1991. - №2. - с. 36-40.

17. Argentine G. Quantitative analysis of catechines and proanthocyanidins in grapes and wines // *Union internationale sur les proanthocyanidols du raisin et du vin*. - Bordeaux (France). - 1991. - P. 8-10.

18. Bourzeix M., Argentine G., Angelov V. Proanthocyanidols: facteurs de sante // *La Vigne*. - 1991. - N.45. - P. 47-48.

19. Арпентин Г.Н., Моравек Т.И., Педан Т.В. Влияние способов осветления на микробиологический состав соков и вин // *Сб. науч. трудов ВНИИВИП "Магарач"*. - Ялта. - 1991. - с. 56-67.

20. Валушко Г., Арпентин Г.Н., Моталкин В.В., Гуляя Н.М. Изучение фосфолипидного состава сердца и мозга крыс с экспериментальным острым алкогольным отравлением // *Виноградарство и виноделие*. - 1992. - N1-2. - с. 67-71.

21. Argentine G., Fernandez Y., Bourzeix M., Mitjavila S. Relation entre la structure d'une serie de proanthocyanidols et leur capacite a pieger le radical superoxyde // *Compte rendu, journee internationales d'etude sur les polyphenols (JIEP): Lisbonne (Portugale)*. - 1992. - V. 16. - P. 103-109.

22. Bourzeix M., Argentine G., Fartzov K., Angnelov V. Isolement quantitatif et purification des molecules de proanthocyanidols par chromatographie preparative // *Compte rendu, journee internationales d'etude sur les polyphenols (JIEP): Lisbonne (Portugale)*. - 1992. - V. 16. - P. 42-47.

23. Valouiko G.G., Argentine G.N. Le vin en tant que systeme de substances anti-alcooliques // *Le progres agricole et viticole*. - 1992. - N.2. - C. 61-66.

24. Argentine G.N. Oxidation of grape procyanidines in model solutions containing trans-caffeoyltartric acid and polyphenol oxidase // *J. Agric. Food Chem.* - 1991. - V.39. - N.6. - P. 1047-1049.

25. Моталкин В.В., Арпентин Г.Н., Агеева Н.М. Влияние расы дрожжей и способа брожения виноградного сусла на образование янтарной кислоты // *Виноградарство и виноделие*. - 1993. - N3-4. - с. 64-68.

26. Арпентин Г.Н., Валушко Г.Г., Жавжарова О.К. Связь структуры дипептидов с их антиоксидантной активностью // *Виноградарство и виноделие*. - 1993. - N1-2. - с. 48-55.

27. Bourzeix M., Argentine G. Obtention et caracterisation de fractions. Utilisation de la chromatographie preparative pour l'obtention de fractions des extraits globaux destinees a l'experimentation biologique // *3-eme Rencontre Internationale "Vigne - Raisin - Vin et Sonte"*. - Coursan (Aude, France). - 1993. - P. 31-43.

28. Арпентин Г.Н., Сабко В.Е. Проантоцианидины - перспективные радиопротекторные вещества // *Тр. 5 научно-практической конференции изобретателей и предпринимателей "Наука и производство - здравоохранению"*. - Киев. - 1993. - т.3. - с. 55-58.

29. Argentine G.N. L'influence protectrice des proanthocyanidols, contre les radiations ionisantes // *Colloque "Vin et Sonte"*. Aix-en-Provence (France). - 1993. - P. 48-55.

30. Argentine G.N., Angelov V., Fartzov K., Bourzeix M., Fernandez Y., Mitjavila S. Isolement quantitatif des molecules de catechines et de proanthocyanidols du raisin et mesu-

re de leur pouvoir piegeur de radicaux libres oxygenes // Compte rendu, journee internationales d'etude sur les polyphenols (JIEP): Palma de Mallorca (Espagne). - 1994. - V. 17. - P. 98-105.

31. Арпентин Г.Н., Валуйко Г.Г., Синицкий В.Н., Стогний Н.А., Харченко Н.К., Меленевский С.В. Сравнительная характеристика влияния виноградного вина и этилового спирта на биохимические механизмы эмоционального стресса // Виноградарство и виноделие. - 1994. - N1. - с. 116-125.

32. Валуйко Г.Г., Арпентин Г.Н., Синицкий В.Н. Медико-биологическая оценка физиологического действия натуральных виноградных вин. Антиалкогольное действие // Виноградарство и виноделие. - 1994. - N1. - с. 78-90.

3. Красноперова А.П., Лебедев Л.А., Арпентин Г.Н., Валуйко Г.Г., Моталкин В.В. Влияние виноградных вин на процесс выведения радионуклидов из организма крыс // Виноградарство и виноделие. - 1994. - N2. - с. 62-65.

34. Арпентин Г.Н., Валуйко Г.Г., Сушкова В.И., Гулий М.Ф. Влияние катехинов и проантоцианидов на начальный этап биосинтеза белка // Украинский биохимический журнал. - 1994 (в печати).

35. Argentine G.N., Valouiko G.G., Sinitski V.N. Effets physiologiques du vin: action antialcoolique, antidepressive et radioprotectrice // Rapport 74-eme Assamblee Generale O.I.V. Commission 2 Oenologie: Paris (France). - 1994. - 17p.

Авторские свидетельства и изобретения.

36. А.с. 1366943 СССР, МКИ³ G 01 N 33/14. Способ определения пептидов в напитках / Г.Г.Валуйко, В.С.Разуваев, Г.Н.Арпентин, З.Ю.Бажаев. - Оpubл. 15.01.88, Бюл. N2 - 9 с.

37. А.с. 1482648 СССР, МКИ³ А 23 L 2/04. Способ извлечения сока из плодов и ягод / Г.Г.Валуйко, Е.И.Евдокинов, Г.Н.Арпентин, А.Н.Ионченков. - Оpubл. 30.05.89, Бюл. N20. - 8 с.

38. А.с. 1761785 СССР, МКИ³ С 12 G 1/02. Способ производства низкокалорийного виноградного вина / Г.Г.Валуйко, Г.Н.Арпентин, И.Д.Незальзов, Т.И.Моравек. - Оpubл. 15.09.92, Бюл. N34. - 6 с.

АННОТАЦИЯ

Арпентин Г.Н. *Основы виноделия столовых вин с повышенной пищевой ценностью и их медико-биологическая оценка*. Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 05.18.07. - "Технология продуктов брожения алкогольных и безалкогольных напитков". Институт винограда и вина "Магарач", Ялта, 1994. Защищается 35 научных работ 3 а.с., которые содержат результаты по обоснованию технологии столовых вин с повышенной пищевой ценностью на основе комплексного изучения процианидинов виноградной ягоды, их роли в технологии переработки винограда и ферментации биологической активности вин. Разработаны и усовершенствованы методы выделения, структурного анализа и количественного определения содержания процианидинов в винограде и вине. Впервые идентифицировано 3 димера, 4 тримера, 7 тетрамеров, 2 пентамера и 8 галлированных производных. Определены основные свойства процианидинов: ингибирование свободных радикалов, участие в ферментативном окислении, в реакции взаимодействия с белковыми веществами. Совокупность полученных результатов позволила установить технологическую роль и биологическое значение процианидинов. Установлены оптимальные технологические режимы, обеспечивающие регулируемое повышение содержания процианидинов в винах. Обоснована технология получения вин с повышенной пищевой ценностью. Осуществлена медико-биологическая оценка вин и особенностей их эффектов на организм человека. Выявлены следующие защитные свойства: антиалкогольное, антистрессорное (адаптагенное) и радиопротекторное действия.

Ключевые слова: виноград; вино; засоби переробки; харчова цінність; проціанідини; окиснення; взаємодія проціанідин-білок; вільні радикали; ідентифікація проціанідинів; визначення проціанідинів; антиалкогольна дія; адаптогени; радіопротектори. {

ANNOTATION

Artpentin G.N. "The technologies basis of the production of the table wines with increased food value and them medical-biological estimation".

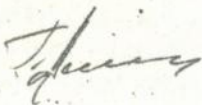
The thesis presented for an academic degree of a doctor of technical sciences, specialiti 05.18.07 - A technology for the production of fermentation products, alcoholic and non-alcoholic drinks.

Institute for Vine and Wine "Magarach". Yalta, 1994.

The defense of the thesis is based on 35 publication and 3 author's certificates concerned with the production athe medical and food value table wine. It has bee worked with the help of the complex study procyanidins of grape and them role in remaking technology of grape to form the biological action of vine. A methodes of separation, structural test and quantitative detrmation of the procyanidines contents in grape and wine has been developed. For the first time has bee found the 3 dimers, 4 trimers, 7 tetramers, 2 pentamers and 8 gallat derivative. Has been determinated the basic properties of procianidines inhibiration free of radicals, participation in the oxidation, in the reaction of the interaction with proteins. The summ of obtained results could give the technological role and biological value of the procyanidins. The suitable technological conditions have been found to provide the regulated increasing in contents of procyanidins in wines. The technology production of wine with increased food value has been substantiated. The medical-biological estimation and actione peculiority of wines on human organism has bee realized. Has been discovered the protection properties of wines such as: antialcohol, antistress (adaptagen) and radioprotection.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ

- А - адреналин
 АСОН - уксусная кислота
 АДГ - алкогольдегидрогеназа
 АлДГ - Альдегиддегидрогеназа
 АцА - ацетальдегид
 ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
 EtOH - этиловый спирт
 КА - катехоламины
 КО - ксантинооксидаза
 MeOH - метиловый спирт
 Me₂CO - ацетон
 MeCN - ацетонитрил
 МС-БУА - масс-спектрометрия с бомбардировкой ускоренными атомами
 МФМО - монофенолоксиогеназа
 МЭОС - микросомальная этанонокисляющая система
 НА - норадреналин
¹H-ЯМР - протонный ядерный магнитный резонанс
 С - серотонин
 ТСХ - тонкослойная хроматография
 тРНЖ - транспортная рибонуклеиновая кислота
 и. д. - иллионная доля; Rt - время удерживания, мин.;
 Кр - константа скорости второго порядка, (M⁻¹*c⁻¹); n -
 стехиометрический коэффициент; Mw - молекулярная масса; Ki -
 константа ингибирования, (M⁻¹*c⁻¹); IC₅₀ - концентрация анти-
 оксиданта, вызывающая 50%-ное ингибирование O₂¹, μM.



Подписно к печати 25.11.94 г. Формат 60×84 1/16
 Объем 2 п. л. Заказ №148 Тираж 100.

Печатная гр. ИВИБ "Магаарач"
 г. Ялта, ул. Кирова 31.