

STANISŁAW KALISZ

WYKORZYSTANIE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH Z TARCZYCY BAJKALSKIEJ (*SCUTELLARIA BAJKALENSIS*) W STABILIZACJI WIN ARONIOWYCH

Streszczenie

Naturalne barwniki antocyjanowe mogą być stosowane zamiennie z barwnikami syntetycznymi, jednak odznaczają się stosunkowo małą stabilnością. W moszczach i winach aroniowych antocyjany odgrywają istotną rolę w kształtowaniu ich jakości, w tym szczególnie barwy.

Zastosowanie metody chromatografii cieczowej pozwala na precyzyjne badanie ilościowego i jakościowego składu antocyjanów. Metoda ta umożliwia dokładną analizę przemian antocyjanów w produkcji moszczy i win oraz badanie efektów dodawania stabilizatorów barwy. W pracy badano możliwość stabilizacji czerwonej barwy moszczy i win aroniowych przez dodatek flawonów tarczycy bajkalskiej, zawierającej glikozydy skutelaryny i bajkaleiny.

Wstęp

Podstawowe wyróżniki jakościowe moszczy i win aroniowych wiążą się z zawartością w ich składzie barwników antocyjanowych. Zidentyfikowano cztery antocyjany: cyjanidyno-3-galaktozyd, cyjanidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-arabinozyd i cyjanidyno-3-ksylozyd [3, 6, 7]. Pod wpływem czynników fizycznych, chemicznych i biochemicznych ulegają one różnorodnym przemianom prowadzącym do utraty czerwonej barwy i brunatnieniu oraz zmianom przyczyniającym się do powstawania zmeńnień i osadów [5, 8, 9, 10, 11, 12, 13], co prowadzi do obniżenia aktywności biologicznej i jakości produktów.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa pozwala precyzyjnie określać ilościowy i jakościowy skład antocyjanów. Umożliwia też śledzenie przemian zachodzących podczas produkcji moszczy i win aroniowych. Metoda ta pozwala badać efekt dodatku stabilizatora na barwę.

Dodatek naturalnych stabilizatorów polifenolowych utrwała czerwoną barwę win oraz przeciwdziała niekorzystnym zmianom antocyjanów zachodzących pod wpływem enzymów, temperatury, dostępu tlenu i światła [5, 8, 9, 10, 12, 13]. Tworzenie kompleksów pomiędzy antocyjanami i innymi związkami fenolowymi zwiększają ich stabilność i intensywność barwy. Efekt stabilizacji polega na tworzeniu warstwowego kompleksu przez wiązanie wodorowe, co osłania cząsteczkę antocyjanu przed nukleofilową addycją i chroni przed utratą barwy [12].

W pracy podjęto próbę ustalenia najodpowiedniejszego momentu dodania stabilizatora w produkcji win aroniowych i określenia trwałości ich czerwonej barwy przez dodatek naturalnych stabilizatorów polifenolowych.

Materiały i metody badań

Przedmiotem badań były moszcze, nastawy, wytrawne wina aroniowe o zawartości alkoholu 10% objętościowych i kwasowości 5 g/dm³ po 42 dniowej fermentacji i 90 dniowym leżakowaniu w butelkach z jasnego i ciemnego szkła. Surowcem były owoce aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa*) pozyskane z plantacji prywatnej z Ząbkowic Śląskich. Owoce zostały zebrane w stanie pełnej dojrzałości, spełniały wymagania jakościowe normy BN-88/9136-14 [1].

W ramach prowadzonych doświadczeń wykonano sześć wariantów, różniących się sposobem przygotowania miazgi oraz momentem dodania stabilizatora. Zastosowaną substancją stabilizującą był preparat flawonów, ekstrahowany metanolem z korzenia tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria bajcalensis*) i wysuszony liofilizacyjnie, przygotowany w Katedrze Technologii Przetwórstwa Owoców i Warzyw Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

Warianty doświadczeń stanowiły:

- próbki z owoców aronii nie rozparzanej: kontrolna (W1) bez dodatku stabilizatora i z dodatkiem stabilizatora przy rozmrażaniu (W5);
- próbki z owoców aronii rozparzanej: kontrolna (W2) bez dodatku stabilizatora, z dodatkiem stabilizatora do nastawu (W3), przy rozmrażaniu (W4) i do wina po fermentacji (W6).

Porcje owoców do przygotowywania poszczególnych nastawów rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 50°C przez 30 minut. W próbkach wariantu 4 i 5 podczas rozmrażania do owoców dodano po 0,75 g stabilizatora – preparatu tarczycy bajkalskiej zawierającej glikozydy skutelaryny i bajkaleiny, rozpuszczonego w 10 ml 0,1% węgla wapnia.

Owoce rozdrobniono hemogenizatorem zanurzeniowym. Próbki surowca do wariantu 2, 3, 4, 6 rozparzono w łaźni wodnej utrzymując przez 5 minut temperaturę miazgi 80°C. Następnie próbki schłodzono zimną wodą do 65°C.

Przygotowaną miazgę tłoczono w laboratoryjnej prasie hydraulicznej "Zodiak" o nacisku tłoka do 5000 kg.

Z bilansu ekstraktu i kwasowości obliczono ilości cukru, moszczu i wody potrzebne do otrzymania nastawów.

Do każdego nastawu dodano po 0,38 g pożywki fosforanu amonu. Do wszystkich prób, oprócz wariantu 3 dodano po 0,19 cm³ kwaśnego siarczynu sodowego, celem ograniczenia rozwoju niepożądanego mikroflory. W przygotowaniu matki drożdżowej, rozcieńczono koncentrat jabłkowy do ekstraktu 20%, dodano fosforanu dwu amonowego i spasteryzowano. Po ochłodzeniu zaszczerpiono czystą kulturę drożdży rasy Madera. Namnażanie drożdży prowadzono w cieplarni w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Fermentację nastawów zaszczerpionych drożdżami rasy Madera przeprowadzono w kolbach szklanych w cieplarni w temperaturze 22°C.

Po 42 dniach fermentacji wino zlanano z osadu. Do wina nr 6 dodano 0,41 g stabilizatora. Wszystkie próbki podzielono na dwie części rozlewając je do butelek o pojemności 0,33 l z jasnego i ciemnego (brązowego) szkła. Butelki zakorkowano i pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 90 dni celem leżakowania.

Oznaczenie zawartości antocyjanów metodą chromatografii cieczowej

Oznaczenia prowadzono za pomocą chromatografu cieczowego firmy Waters, składającego się z detektora (Waters 486 Tunable Absorbance Detector) i systemu mieszania odczynników (Waters 600 E Multisolvent Delivery System). Chromatograf współpracował z komputerowym programem zbierania danych: Star Chromatography Workstation Firmy Varian. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChrospher® 100 RP-18, (5 µ, 4,6×220 mm), firmy Merck Labs z przedkolumną tej samej firmy.

Tabela 1

Gradient stosowany przy oznaczaniu antocyjanów.

Experimental conditions used in the determination of anthocyanins.

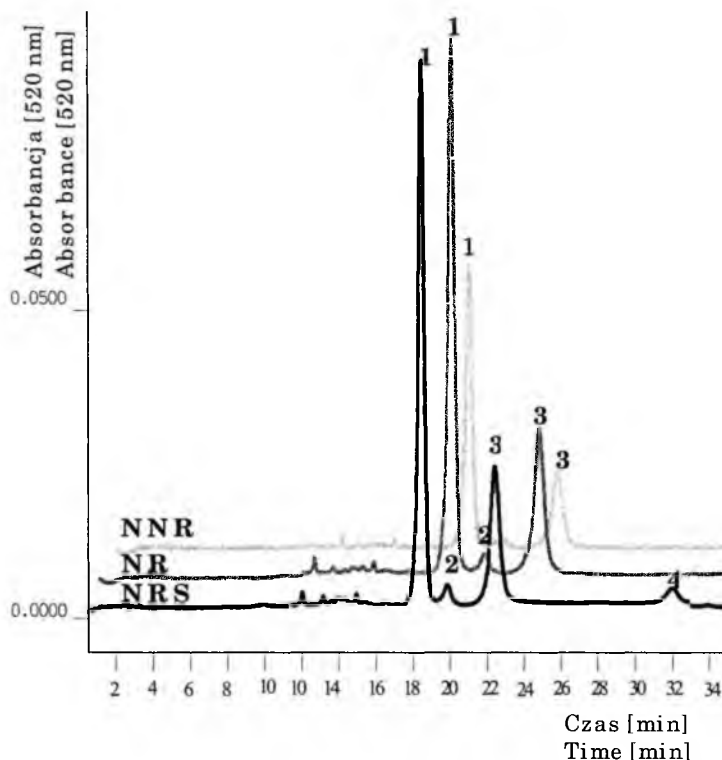
Czas / Time (min.)	Odczynnik A / Reagent A (%)	Odczynnik B / Reagent B (%)
0	0	100
7	15	85
22	15	85
30	20	80
35	25	75
40	35	65

Antocyjany oznaczano stosując 80% roztwór acetonitrylu w 4,5% kwasie mrówkowym (odczynnik A) i 4,5% kwas mrówkowy (odczynnik B), przy długości fali 520 nm i przepływie 1 cm³/min. Zastosowano gradient przedstawiony w tabeli 1.

Wyniki i dyskusja wyników

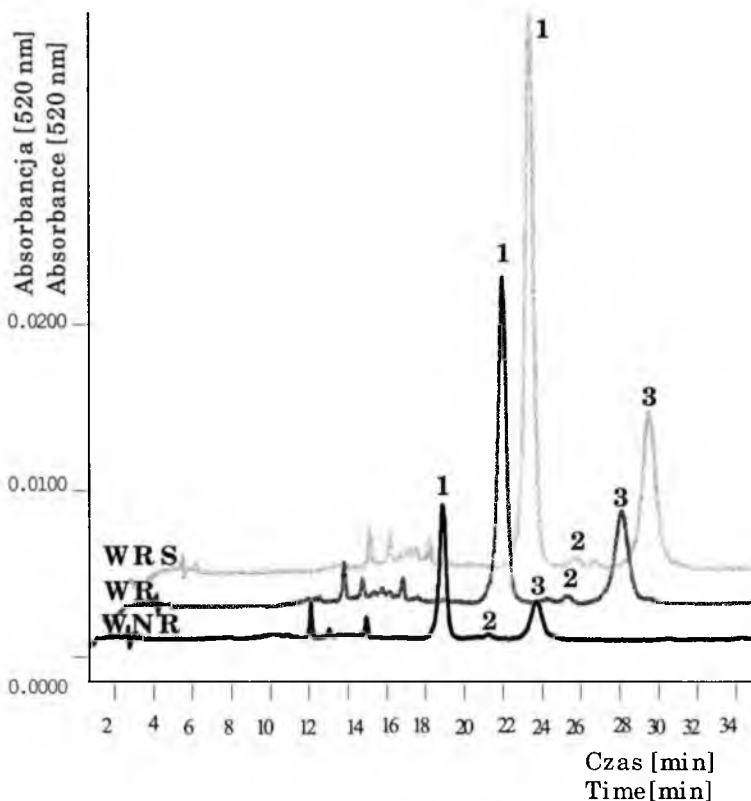
Tłoczenie miazgi po uprzedniej obróbce termicznej pozwoliło na lepszą ekstrakcję barwników antocyjanowych. Zawartość antocyjanów w próbkach rozparzanych, była o ponad 65% wyższa niż w próbkach tłoczonych na zimno.

Obróbka cieplna [10, 13] przez wyparcie powietrza zapobiega niekorzystnemu działaniu tlenu, jak również powoduje zniszczenie mikroflory powierzchniowej oraz unieczynnienie enzymów natywnych, minimalizując ich niekorzystny wpływ na stabilność soków i win.



Rys. 1. Chromatogramy (HPLC) antocyjanów w nastawie z aronii nie rozparzanej (NNR) oraz rozparzanej bez stabilizatora (NR) i z dodatkiem stabilizatora (NRS): 1 - Cyjanidyno-3-galaktozyd, 2 - Cyjanidyno-3-glukozyd, 3 - Cyjanidyno-3-arabinozyd, 4 - Cyjanidyno-3-ksylozyd.

Fig. 1. Chromatogram (HPLC) of anthocyanins in chokeberry must produced from no heated (NNR) and heated pulp without stabilizer (NR) and with addition of stabilizer (NRS): 1 - Cyanidin-3-galactoside, 2 - Cyanidin-3-glucoside, 3 - Cyanidin-3-arabinoside, 4 - Cyanidin-3-xyloside.

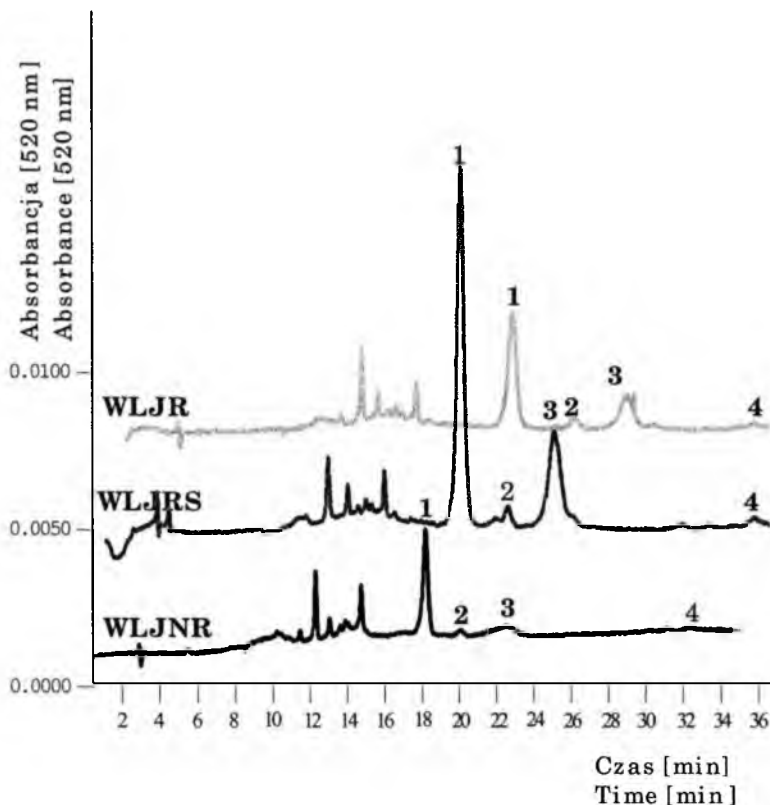


Rys. 2 Chromatogramy (HPLC) antocyjanów w młodym winie z aronii nie rozparzanej (WNR) oraz rozparzanej bez stabilizatora (WR) i z dodatkiem stabilizatora (WRS): 1 – Cyjanidyno-3-galaktozyd, 2 – Cyjanidyno-3-glukozyd, 3 – Cyjanidyno-3-arabinozyd, 4 – Cyjanidyno-3-ksylozyd.

Fig. 2. Chromatograma (HPLC) of anthocyanins in young wine from no heated (WNR) and heated chokeberry pulp without stabilizer (WR) and with addition of stabilizer (WRS): 1 – Cyanidin-3-galactoside, 2 – Cyanidin-3-glucoside, 3 – Cyanidin-3-arabinoside, 4 – Cyanidin-3-xyloside.

Badając ochronne działanie dodatku flawonów tarczycy bajkalskiej, zawierającej glikozydy skutelaryny i bajkaleiny, na barwniki antocyjanowe stwierdzono, że zabieg ten pozwala na lepsze zachowanie poziomu antocyjanów. Moment dodania substancji stabilizującej musi jedna nastąpić w możliwie najwcześniejszym stadium procesu przetworowego, zanim nie nastąpią jeszcze znaczne straty antocyjanów.

Wyniki badań z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC, zestawione na rysunkach 1–4, dowodzą, że proces rozparzania pozwala na lepsze wydobycie i zachowanie antocyjanów obecnych w surowcu, a tym samym ich wyższą zawartość w próbce końcowej.



Rys. 3 . Chromatogramy (HPLC) antocyjanów w winie z aronii nie rozparzanej (WLJNR) oraz rozparzanej bez stabilizatora (WLJR) i z dodatkiem stabilizatora (WLJRS) po leżakowaniu w butelce z jasnego szkła: 1 – Cyjanidyno-3-galaktozyd, 2 – Cyjanidyno-3-glukozyd, 3 – Cyjanidyno-3-arabinozyd, 4 – Cyjanidyno-3-ksylozyd.

Fig. 3. Chromatograms (HPLC) of anthocyanins in wine from no heated (WLJNR) and heated chokeberry pulps without stabilizer (WLJR) and with addition of stabilizer (WLJRS) after storage in bright {light} and amber glasses bottle: 1 – Cyanidin-3-galactoside, 2 – Cyanidin-3-glucoside, 3 – Cyanidin-3-arabinoside, 4 – Cyanidin-3-xyloside.

Jak przedstawia chromatogram HPLC antocyjanów z nastawów (rys. 1) próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora zawiera 16,1% więcej antocyjanów niż próbka rozparzana bez stabilizatora oraz o 83,8% więcej niż próbka nierozparzana bez stabilizatora. Dodatek stabilizatora do miazgi w porównaniu do próbek rozparzanych i nierozparzanych bez stabilizatora podczas rozmrażania pozwolił na lepsze zachowanie zawartości wszystkich czterech antocyjanów odpowiednio: cyjanidyno-3-ksylozydu o 26,9 i 19,5%, cyjanidyno-3-glukozydu o 20,1 i 131,3%, cyjanidyno-3-arabinozydu o 18 i 79,2% oraz cyjanidyno-3-galaktozydu o 14,8 i 86,3 %.

Zasadność dodatku stabilizatora szczególnie do próbek rozparzanych potwierdza także chromatogram młodych win po fermentacji, przedstawiony na rys. 2. Antocyjany najlepiej zachowały się w próbce win leżakowanych, otrzymanych z aronii rozparzanej z dodatkiem stabilizatora. Prawdopodobnie wytworzenie kompleksu między cząsteczką antocyjanu, a flawonami tarczycy bajkalskiej chroni cząsteczkę antocyjanu przed nukleofilową addycją dzięki czemu ich zawartość w próbkach z dodatkiem preparatu flawonów tarczycy bajkalskiej jest większa niż w przypadku prób kontrolnych.

W próbce młodego wina z aronii rozparzanej z dodatkiem stabilizatora stwierdzono 2-krotnie więcej antocyjanów niż w próbce rozparzanej bez stabilizatora oraz 5 razy więcej w porównaniu do próbki nie rozparzanej bez stabilizatora. Ilość cyjanidyno-3-glukozydu w porównaniu do próbki kontrolnej rozparzanej i nierozparzanej zmalała odpowiednio 2- i 4-krotnie.

Największy spadek zawartości antocyjanów odnotowano w próbce kontrolnej nie rozparzanej. Zawartość cyjanidyno-3-glukozydu i cyjanidyno-3-arabinozydu zmalała tu ponad 10 i 26 razy, w porównaniu do nastawu.

Jak wynika z chromatogramu zamieszczonego na rys. 3, proces leżakowania powoduje dalszą degradację antocyjanów.

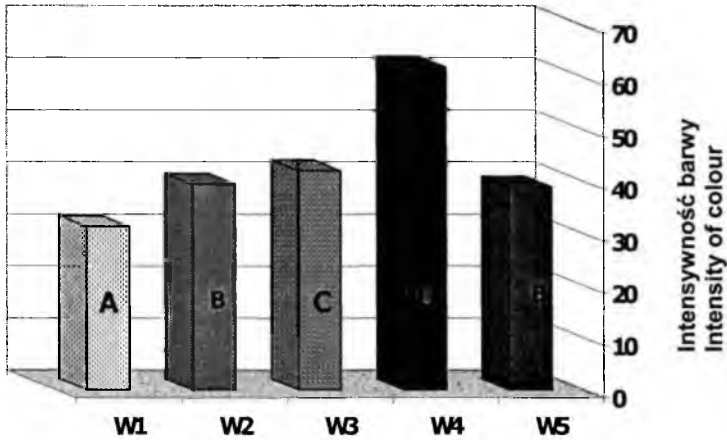
Najbardziej posunięte zmiany antocyjanów stwierdzono w próbce kontrolnej nierozparzanej. Cyjanidyno-3-ksylozyd i cyjanidyno-3-glukozyd występują tu w bardzo niewielkich ilościach. W stosunku do pozostałych antocyjanów stanowią one zaledwie 1,1 i 0,9%. Najlepiej zachował się cyjanidyno-3-galaktozyd, który stanowi 80,7% ogólnej zawartości antocyjanów.

W procesie leżakowania ogólna zawartość antocyjanów maleje 3,4-krotnie. Zawartość cyjanidyno-3-arabinozydu i cyjanidyno-3-galaktozydu maleje 3,5-krotnie natomiast cyjanidyno-3-glukozydu 1,6 krotnie.

Wyniki badań z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej, potwierdzają również zasadność stosowania rozparzania owoców w procesie technologicznym produkcji win aroniowych. Wykazano, że obróbka termiczna pozwala na lepsze wydobycie i zachowanie antocyjanów obecnych w surowcu, a tym samym ich wyższą zawartość w próbce końcowej. Próbki rozparzane, w porównaniu do analogicznych próbek nierozparzanych, zawierają 1,6–3,1 razy więcej antocyjanów, a ich straty podczas procesu fermentacji są 2-krotnie mniejsze.

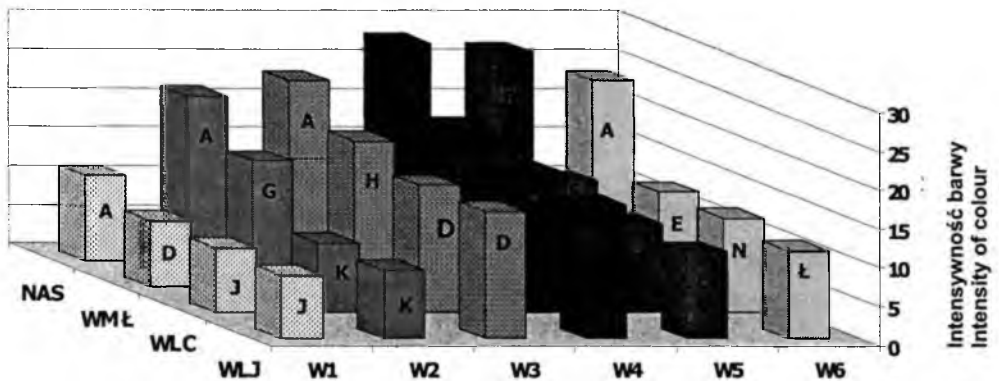
Największą intensywność czerwonej barwy moszczy wykazano w próbce kontrolnej rozparzanej z dodatkiem stabilizatora, a najmniejszą w próbce kontrolnej nie rozparzanej, (rys. 4). Fakt ten potwierdza celowość jak najwcześniejszego dodatku stabilizatora, co istotnie wpływa na intensywność barwy moszczy, szczególnie w przypadku próbek rozparzanych. Wykazano, że próbki otrzymane z aronii nierozparzanej wykazują mniejszą intensywność barwy co jest wynikiem gorszego odzysku barwnika z surowca, jak i postępującej jego degradacji pod wpływem enzymów.

Próbki rozparzane wykazują dużo intensywniejszą barwę niż próbki nierozparzane. Dodatek stabilizatora dodatkowo sprzyja zachowaniu czerwonej barwy, tak iż stonkowo dobrze zachowuje się również po leżakowaniu w butelce z jasnego szkła. Najbardziej niekorzystne zmiany barwy stwierdzono w przypadku próbek bez rozparzania i bez stabilizatora.



Rys 4. Wpływ momentu dodatku stabilizatora i sposobu przygotowania próbek na intensywność barwy moszczy aroniowych.

Fig. 4. The influence of the colour stabilizer addition time in the proces of production of chokeberry juices on the colour intensity of the product.



Rys. 5. Wpływ fermentacji i leżakowania win aroniowych na zmianę intensywności barwy w zależności od sposobu przygotowania próby i momentu dodania stabilizatora.

Fig. 5. Influence of fermentation and storage of chokeberry wines on change in intensity of colour on the time of the production process when the stabilizer was added.

Objaśnienia do rysunków 4–5:

W1 - próbka kontrolna nie rozparzana bez dodatku stabilizatora;

W2 - próbka kontrolna rozparzana bez dodatku stabilizatora;

W3 - próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora do nastawu;

W4 - próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora przy rozmrażaniu;

W5 - próbka nie rozparzana z dodatkiem stabilizatora przy rozmrażaniu;

W6 - próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora do wina po fermentacji;

A, B, C... próbki jednorodnie statystycznie - nie różniące się istotnie zawartością antocyjanów;

NAS - nastaw;

WML - wino młode po 42 dniach fermentacji;

WLC - wino po 90 dniowym leżakowaniu w butelce z ciemnego szkła;

WLJ - wino po 90 dniowym leżakowaniu w butelce z jasnego szkła.

Explanations to figures 4–5:

W1 - control sample - no heated, without addition of stabilizer;

W2 - control sample - heated, without addition of stabilizer;

W3 - heated sample with addition of stabilizer to must;

W4 - heated sample with addition of stabilizer to pulpe;

W5 - no heated sample with addition of stabilizer to pulp;

W6 - heated sample with addition of stabilizer to young wine;

A, B, C... statistically homogeneous samples are insignificantly differing in anthocyanins content

NAS - must;

WML - young wine after 42 days of fermentation;

WLC - wine after 90 days storage in dark glasses bottle;

WLJ - wine after 90 days storage in bright glasses bottle.

Największą intensywność zabarwienia stwierdzono w nastawie próbki wina z aronii rozparzanej z stabilizatorem dodanym do miazgi. W porównaniu do innych próbek intensywność zabarwienia była wyższa o 4,2–154,6% (rys. 5).

Wykazano również, iż w kolejnych etapach produkcji win aroniowych następuje spadek intensywności zabarwienia. W wyniku fermentacji intensywność zabarwienia maleje o 29,4–70,6%, a podczas leżakowania o kolejne 4,6–94,3%.

Badając wpływ barwy opakowania na zmianę intensywności zabarwienia podczas leżakowania win, istotne różnice wykazano jedynie w próbkach rozparzanych z stabilizatorem dodanym do miazgi i wina.

Spadek intensywności zabarwienia jest następstwem przemian zachodzących w winie. Według Gasika [4], na skutek zbyt daleko posuniętej polimeryzacji antocyjanów następuje ich wypadanie z roztworu i wyjaśnienie barwy.

Wnioski

1. Do produkcji czerwonych win aroniowych korzystnie jest stosować moszcze otrzymane z aronii rozparzanej.

2. Najlepszy efekt stabilizacji czerwonej barwy uzyskuje się dodając stabilizator bezpośrednio do miazgi, podczas rozparzania.
3. Proces fermentacji i leżakowania powoduje obniżenie zawartości antocyjanów 4,9–11,6-krotnie.
4. Leżakowanie win w butelkach z ciemnego szkła, w porównaniu do próbek leżakowanych w butelkach z jasnego szkła, powoduje mniejszą degradację antocyjanów.

LITERATURA

- [1] BN-88/9136-14 Owoce świeże. Aronia czarnoowocowa.
- [2] Ciołkowska-Paluch G.: W obronie aronii. Wiadomości Zielarskie, **10-11**, 1990, 27.
- [3] Czapski J., Bresińska A., Gorączka A., Limanówka-Jacygrad D.: Colour of Chokeberry nectars. Proceedings of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food Colourants and Antioxidants. 1996, s.64-69.
- [4] Gasik A.: Rola związków polifenolowych w tworzeniu cech sensorycznych żywności. Przem. Spoż., **7**, 1983, 352-356.
- [5] Horubała A.: Zmiany barwy soków owocowych w procesie technologicznym ich otrzymywania i przechowywania. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., **8**, 1996, 31-34.
- [6] Oszmiański J., Sapis J.: Anthocyanins in Fruits of Aronia Melanocarpa (Chokeberry). Journal of Food Science, **53**, 4, 1988, 1241-1242.
- [7] Oszmiański J., Claude-Sapis J.: Pochodne kwasów hydroksycynamonowych w owocach aronii melanocarpa elliot. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu. Technologia Żywności V. **184**, 1989, 75-87.
- [8] Oszmiański J.: Próby stabilizacji barwników antocyjanowych owoców borówki kamczackiej (*Lonicera Kamtschatica*). Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Technologia Żywności, VIII, **273**, 1995, 73-82.
- [9] Oszmiański J.: Wpływ dodatku pigwowca na stabilność antocyjanów barwnika aroniowego. Przem. Spoż., **7**, 1992, 182-183.
- [10] Oszmiański J., Sożyński J.: Wpływ warunków otrzymywania oraz przechowywania soku z aronii na związki fenolowe i barwę. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu. Technologia Żywności V., **184**, 1984, 89-100.
- [11] Pizło A., Dobrzańska E.: Stabilność wybranych antocyjanów w wódkach, Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., **6**, 1995, 14-16.
- [12] Sokół-Łętowska A., Oszmiański J., Sożyński J.: Wpływ dodatku aronii na stabilność związków fenolowych i barwę soku z czarnej porzeczki. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu. Technologia Żywności V., **184**, 1991, 89-99.
- [13] Zając B.K., Wilska-Jeszka J.: Antocyjany naturalne barwniki dla przemysłu spożywczego. Cz. II. Otrzymywanie barwników antocyjanowych z wyłtoków owoców czarnej porzeczki. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., **2**, 1992, 20-23.

**UTILIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTED FROM SKULLCAP
(*SCUTELLARIA BAJKALENSIS*) IN CHOKEBERRY WINES STABILIZATION**

S u m m a r y

Natural anthocyanin colorants are alternative to artificial synthetic ones but they are characterized by relatively low stability. Anthocyanins contained in chokeberry juices and wines constitute the high quality and especially perfect colour of these products.

The application of the high-pressure liquid chromatography (HPLC) methods enables the precise determination of qualitative and quantitative composition of the anthocyanin content. The method makes possible the detailed analysis of the transformation of the anthocyanins content during the production process of chokeberry juices and wines and the effects of colour stabilizers addition on them. The possibility of red colour stabilization of chokeberry juice and wine by skullcap flavons *Scutellaria bajcalensis* addition was investigated. ❏