

Д. Л. ПЕТРОСЯН

канд. техн. наук

УЧАСТИЕ АМИНОКИСЛОТ В РЕАКЦИЯХ ОКИСЛЕНИЯ И ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ ПРИ СОЗРЕВАНИИ КОНЬЯЧНОГО СПИРТА

Важное значение азотистых соединений при изготовлении вина не вызывает сомнений. Изучению процессов превращения азотистых веществ при формировании и созревании вина в образовании аромата чая посвящено ряд исследований (1, 2, 3).

В течение долголетней выдержки коньячного спирта в бочках азотистые соединения древесины частично переходят в коньячный спирт и претерпевают ряд изменений. Азотистые соединения, в частности свободные аминокислоты, играют важную роль в процессах созревания коньяка. Они способны образовать высшие и ароматические спирты, альдегиды переходящие в дальнейшем в ацетали и эфиры. Аминокислоты с углеводами могут образовать также меланоидины, фурфурол и оксиметилфурфурол.

Для правильного суждения о роли азотистых соединений в процессах созревания коньячного спирта необходимо было проследить за изменениями индивидуальных соединений, в частности аминокислот, в спиртовой среде и определить продукты, образующиеся при реакциях, происходящих между отдельными аминокислотами и компонентами дубовой древесины.

В настоящей работе изложены результаты опытов по выдержке отдельных аминокислот (гликокол, глутаминовая

кислота и фенилаланин), полифенолов и танина в спиртовой среде.

По образованию в спирте альдегидов, ацеталей перекисей и эфиров можно получить некоторое представление о реакциях превращения аминокислот в условиях выдержки коньячного спирта в дубовых бочках или в других аналогичных случаях.

Образование альдегидов и ацеталей

Окислительными реакциями обусловлен прирост альдегидов в коньячном спирте при его выдержке в бочках, часть которых превращаются в ацетали. Последние являются одним из основных компонентов коньячного спирта.

А. И. Опарин (4), М. А. Бокучава и В. Р. Попов (3) показали, что в результате окислительного дезаминирования аминокислот хлорогеновой кислотой, а также хинонами получаются альдегиды, аммиак и углекислота. При окислении аминокислот перекисью водорода также образуются альдегиды аммиак и углекислота (5). Аналогичный распад аминокислот происходит в присутствии ортохинонов, причем дегидрирование их происходит за счет хиноидных групп. Поскольку коньячный спирт содержит аминокислоты необходимо было выяснить их участие в реакциях окисления и дезаминирования, в результате чего образуются карбонильные соединения.

Для выяснения сущности этих процессов и определения роли отдельных аминокислот ставились опыты в следующих вариантах: танин, галловая кислота в количестве 1 г каждого, с аминокислотами, фенилаланин и глутаминовую кислоту по 80 мг в 200 мл 65% об. водно-спиртовом растворе выдерживали в термокамере при 30° в течение 120 дней.

Альдегиды и ацетали определяли иодометрическим методом Г. Г. Агабальянца. Результаты анализа приведены в табл. 1.

Данные таблицы показывают, что танин, галловая кислота и аминокислоты при совместной выдержке способствуют образованию альдегидов и ацеталей. Суммарное количество альдегидов в вариантах с аминокислотами 1,5—3 раза больше по сравнению с вариантами без участия аминокислот. При

Варианты опыта	Альдегиды мг/л	Ацетальдегиды мг/л	Сумма альдегидов мг/л
Фенилаланин+танин	105,2	197,1	178,2
Фенилаланин+галловая кислота	131,5	191,5	202,9
Глутаминовая кислота+танин	71,4	174,7	136,5
Глутаминовая кислота+галловая кислота	79,8	103,0	118,2
Танин	29,6	115,3	72,3
Галловая кислота	66,4	78,4	87,7
Фенилаланин	15,2	11,2	19,4
Глутаминовая кислота	12,9	19,0	20,0
Спирт (контроль)	8,4	5,6	10,5

этом количество альдегидов в свободном виде и перешедших в ацетали значительно больше в присутствии фенилаланина, чем с глутаминовой кислотой. Новообразование карбонильных соединений замечается в опытах с аминокислотами и простейшими полифенолами.

Водно-спиртовой раствор аминокислот (фенилаланин, глутаминовая кислота и гликокол по 50 мг) и полифенолов (пирокатехин, пирогаллол и резорцин по 200 мг) выдерживали в термокамере при 30° в течение 40 и 55 дней и определяли альдегиды и ацетали (табл. 2). Результаты анализа показывают, что накопление суммарного альдегида с участием аминокислот наблюдается в опытах с пирокатехином и пирогаллолом, а с резорцином образование альдегидов и ацеталей происходит медленно. Это объясняется реакционной способностью ОН групп и от их расположения в бензольном кольце.

При окислении кислородом воздуха полифенолы переходят в хиноны, которые способствуют в дальнейшем окислению самого спирта, дезаминированию аминокислот с образованием карбонильных соединений.

При совместной выдержке фенилаланина с танином, галловой кислотой, полифенолами в растворе появляется аро-

Варианты опыта	Альдегиды мг/л	Ацетали мг/л	Сумма альдегидов мг/л
40 дней			
Пирокатехин	12,1	113,7	54,4
Пирокатехин+глутаминовая кислота	32,8	95,7	69,4
Пирокатехин+гликокол	8,7	210,6	87,2
Пирогаллол	27,5	46,5	44,8
Пирогаллол+глутаминовая кислота	38,7	91,8	73,7
Пирогаллол+гликокол	19,9	146,7	74,7
Резорцин	7,6	18,1	14,3
Резорцин+глутаминовая кислота	9,6	16,6	15,9
Резорцин+гликокол	13,5	23,3	22,2
Спирт (контроль)	7,5	18,7	14,4

55 дней

Пирокатехин	24,6	205,2	101,4
Пирокатехин+фенилаланин	29,8	250,2	123,2
Пирогаллол	63,1	199,9	137,6
Пирогаллол+фенилаланин	65,6	298,5	176,9
Резорцин	14,7	31,9	26,6
Резорцин+фенилаланин	20,9	31,9	32,8
Фенилаланин	14,9	18,7	21,9
Спирт (контроль)	7,2	23,3	15,9

мат розы. С помощью бумажной хроматографии в этих вариантах установлено наличие фенилэтилового спирта и фенилацетальдегида, в вариантах глутаминовой кислоты с танином и полифенолами обнаружена кетоглутаровая кислота.

При выдержке α -аланина с полифенолами и танином образуется пировиноградная кислота. Вышеперечисленные карбонильные соединения, являющиеся продуктами дезаминирования аминокислот, были найдены также в старых коньячных спиртах (6, 7). Это указывает на большое значение азотистых веществ в созревании коньячного спирта. Влияние аминокислот на окислительные процессы видно также из сле-

дующих опытов. Фенилаланин и глутаминовая кислота по 50 мг, валин 200 мг с полифенолами (200 мг) и танином (1 г) в 65 %/об. водно-спиртовой среде выдерживалось продолжительное время. В конце опыта все образцы были оттитрованы 0,1N раствором KMnO_4 (табл. 3).

Таблица 5

Варианты	Пирогаллол + фенилаланин	Пирогаллол	Галловая к-та + фенилаланин	Галловая к-та	Резорцин + фенилаланин	Резорцин	Галловая к-та + глутаминовая к-та	Галловая к-та	Резорцин + глутаминовая к-та	Резорцин	Танин + валин	Танин	Танин + валин	Танин
Расход $\text{O}_2/\text{1г}$ KMnO_4 в мл на 10 мл образца	3,57	4,60	4,55	7,85	0,60	0,70	4,03	5,30	0,80	0,87	19,13	22,35	19,23	22,13

Как видно из таблицы, в присутствии аминокислот расход KMnO_4 был меньше.

Это свидетельствует об их активном участии в процессах окисления кислородом воздуха. В основе образования продуктов окисления вероятно лежит реакция окислительного дезаминирования аминокислот ортохиноном, образующемся при окислении как дубильных веществ, так и полифенолов.

Н. М. Сисакяном и др. (8) было показано, что между коэффициентом экстинкции и качеством коньяка существует определенная зависимость—чем выше коэффициент экстинкции при длине волны 275—280 мкм, тем лучше качество коньяка.

Спектрофотометрические данные показали, что во всех образцах, где участвует аминокислота, наблюдается увеличение коэффициента экстинкции и имеет место сдвиг максимума поглощения света в сторону длинных волн. Несмотря на то, что сдвиги эти не столь резки, но все же они свидетельствуют о качественных переменах, которые происходят в результате дезаминирования аминокислот (табл. 4).

Таблица 4

Варианты опыта	Длина волны в мшк	Коэффициент экстинкции
Спирт 65%	257	0,25
Спирт + фенилаланин	260	0,29
Спирт + пирогаллол	275	24,8
Спирт + пирогаллол + фенилаланин	277	36,4
Спирт + галловая кислота	260	44,0
Спирт + галловая кислота фенилаланин	262	46,8

Образование перекисных соединений

Окислительные реакции в коньячной бочке приводят к образованию перекисей как на поверхности бочки, так и в жидкости. Созревание коньячных спиртов зависит от количества перекисных соединений. Чем больше содержание перекисей, тем интенсивнее проходит процесс созревания. В старых коньячных спиртах количество перекисей больше, чем в новых.

Согласно данным Д. М. Михлина (9), при ферментативном окислении аминокислоты образуют перекись водорода, аммиак и кетокислоту.

Образование перекисей наблюдается в опытах, когда аминокислоты выдерживали с компонентами дубовой древесины. В течение 125 дней прирост перекисей в вариантах: «танин + фенилаланин» составляет 31,7%, «лигнин + фенилаланин» — 17,5%, «галловая кислота + фенилаланин» — 45%, по сравнению с вариантами без участия фенилаланина (табл. 5).

Варианты	Фенилаланин			Контроль (без фенилаланина)			α -аланин			Контроль (без α -аланина)		
	танин	лигнин	галловая К-та	танин	лигнин	галловая К-та	танин	лигнин	флорафен	танин	лигнин	флорафен
Перекисное число мг/л	3,37	3,94	4,25	2,78	2,69	2,93	1,34	2,59	2,33	1,42	1,42	1,96

Для более детального изучения окислительных процессов аминокислот были поставлены модельные опыты по следующей схеме: фенилаланин в количестве 50 мг с отдельными полифенолами по 250 мг растворяли в 100 мл 65% об. спирте. Колбы с растворами выдерживали в термокамере при 26° в течение 45 дней. Результаты анализа приведены в таблице 6. Данные таблицы показывают, что фенилаланин способствует образованию перекисей — с полифенолами-прокатехином, пиригаллолом. С резорцином количество перекисей не изменилось.

Аналогичные результаты получены при выдержке глутаминовой кислоты, гликоколя с полифенолами (табл. 7).

Как видно из приведенных данных табл. 6 и 7, выдержка аминокислот с полифенолами, имеющими орто-расположенные гидроксильные группы, приводит к усилению образования перекисей.

Из аминокислот наибольшей активностью обладает фенилаланин, наименьшей — глутаминовая кислота. Новообразование перекисных соединений в присутствии аминокислот дает возможность объяснить пути накопления перекисей в процессе выдержки коньячного спирта.

Таблица 6

Варианты опыта	Кислородное число мг/л	Свободный кислород мг/л	Перекиси (связанный кислород) мг/л
Пирокатехин	21,60	11,60	10,00
Пирокатехин + фенилаланин	24,96	12,28	12,68
Пиригаллол	11,05	7,60	3,45
Пиригаллол + фенилаланин	12,64	8,06	4,58
Галловая кислота	9,98	8,66	1,32
Галловая кислота + фенилаланин	10,84	9,31	1,53
Резорцин	13,38	12,55	0,83
Резорцин + фенилаланин	13,54	12,71	0,83
Фенилаланин	9,78	9,78	нет
Спирт (контроль)	9,29	9,29	нет

Таблица 7

	Срок выдержи в днях	Гликокол			Глутаминовая к-та				Контроль (без аминокислот)			
		пирокатехин	пирогаллол	галловая к-та	пирокатехин	пирогаллол	галловая к-та	резорцин	пирокатехин	пирогаллол	галловая к-та	резорцин
Перекисное число	35	4,23	3,26	0,43	—	—	—	—	4,21	2,85	0,21	0,07
мг/л	180	33,77	7,39	8,11	14,11	5,74	5,74	0,17	13,34	4,92	4,97	0,11

Эфиروобразование

Эфиры играют важную роль в формировании вкусовых качеств коньяка. Количество эфиров в коньячных спиртах изменяется по мере их старения. В процессе выдержки коньячный спирт обогащается кислым эфиром.

В эфиروобразовании могут участвовать также аминокислоты и продукты их дезаминирования.

Для выяснения этого вопроса опыты ставились в следующей последовательности. К водноспиртовому раствору (65%) добавляли: танин, лигнин, галловую кислоту и аминокислоты: фенилаланин, глутаминовую кислоту.

Образцы выдерживали в термокамере при 25° 125 и 330 дней. После истечения указанного времени проводилось определение общих эфиров. Результаты анализа приведены в табл. 9.

Из приведенных в таблице данных замечается образование и накопление общих эфиров. Количество общих эфиров с участием аминокислот больше по сравнению с контролем и без участия аминокислот, кроме того в вариантах, где был внесен фенилаланин, общее содержание эфиров больше, чем при глутаминовой кислоте.

На основании полученных данных установлено, что кислород воздуха, растворяясь в коньячном спирте, образует перекисные соединения, последние, являясь активными, окис-

	Срок выдержки в днях	Танин + фенилаланин	Танин + глутаминовая к-та	Танин	Галловая к-та + фенилаланин	Галловая к-та	Лигнин + фенилаланин	Лигнин + глутаминовая к-та	Лигнин	Фенилаланин	Глутаминовая к-та	Спирт (контроль)
Общие	125	19.95	—	16.66	—	—	18.00	—	—	11.01	—	4.51
Эфиры мэкв/л	330	347.10	86.40	34.35	216.90	86.40	86.33	31.40	—	18.02	16.51	8.44

ляют вещества, переходящие из древесины и компоненты коньячного спирта. В присутствии аминокислот ускоряется процесс окисления. Интенсивность процессов окисления скачивается на увеличении перекисного числа, альдегидов, ацеталей и эфиров.

Очевидно в процессе долголетней выдержки аминокислоты принимают активное участие в окислительных реакциях, кроме того, происходит дезаминирование аминокислот с последующим декарбоксилированием, в результате чего образуются альдегиды, высшие и ароматические спирты, которые переходят в дальнейшем в ацетали и эфиры, входящие в состав веществ специфического для коньячного аромата. Окислительное дезаминирование аминокислот обеспечивается ортохинонами коньячного спирта, которые образуются при окислении фенолов кислородом воздуха. Установлена также различная активность аминокислот и полифенолов к реакциям альдегидов ацеталей, перекисей и эфиров.

Из полифенолов в этих реакциях не принимает участия резорцин. Из аминокислот наиболее активным является фенилаланин.

ЛИТЕРАТУРА

- Опарин А. И., Курсанов А. Л., Саенко Н. Ф. и Безингер Э. Н. Биохимия виноделия, Сб. 1, 1947.
Беридзе Г. И., Безингер Э. Н., Сирбиладзе М. Г. и Куваева Е. Б. «Биохимия виноделия», Сб. 4, 1953.

- Бокучава М. А. и Попов В. Р. ДАН СССР, т. ХСІХ, № 1. 1954.
- Опарин А. И. «Экспериментальная биология и медицина», 15, 246, 1927.
- Нилов В. И., Скурихин И. М. Химия виноделия коньячного производства, Москва, 1960.
- Петросян Ц. Л. Вопросы биохимии виноделия, труды конференции по биохимии виноделия, 1960—1961.
- Петросян Ц. Л. Журн. «Виноделие и виноградарство в СССР», 6, 1963.
- Сисакян Н. М., Евстигнеев В. Б. и Егоров И. А. Доклады АН СССР, 79, № 4, 1951.
- Михлин Д. М. Биологическое окисление, Сб. 4, 1953.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ

Процессы созревания коньячных спиртов, коньяков и ряда вин связаны с окислением, протекающим с участием перекисей.

Г. Г. Агабальянц, Е. Л. Миджсян и Ц. Л. Петросян (1) на основе аппарата П. В. Кочерга разработали метод определения перекисей в коньяках и винах. Этот метод позволяет определить перекиси, отвечающие окислительному потенциалу индигокармина, т. е. 0,26 вольт. Исследования перекисей коньячного спирта, проведенные Л. М. Джанполадяном и Ц. Л. Петросян, дали возможность выяснить многие вопросы, связанные с процессами окисления при выдержке коньячных спиртов.

В коньяках и коньячных спиртах, а также винах имеются перекиси с более высоким потенциалом окисления, чем индигокармина. Они могут быть определены полярографическим методом. Этот метод дает возможность при подборе соответствующего фона и различных значений рН определить одни перекиси в присутствии других.

Для определения структуроорганических перекисей полярографическим анализом М. Бернард (2) в качестве фона использовал 0,1N раствор сульфата калия, забуферованным до различных значений рН, и сделал вывод, что все перекиси делятся на два класса: а) перекиси, легко восстанавливающиеся при положительном потенциале, т. е. истинные перекиси; б) перекиси, восстанавливающиеся с большим трудом при потенциалах от минус 0,3 вольт до —1,1 вольт, т. е. гидро-

перекиси. К числу истинных перекисей отнесены: надуксусная, надбензойная кислоты, надбензоат третил-бутила, перекись циклогексана, кумола, пинена, эфира, гексана. А к числу гидроперекисей—перекись дибутила, ацетальдегида и перекись водорода.

Е. А. Кута, Ф. В. Куакебуш (3) изучали полярографические поведения 23-ех органических перекисей на фоне 0,1M раствора хлористого лития в смеси бензол-абсолютный этанол (1:1), изученные перекиси разбиты на 6 групп.

Наши исследования показали, что в спиртоводных растворах форма волны перекиси водорода становится более четкой и с увеличением концентрации спирта потенциал полу волны перекиси водорода сдвигается в более отрицательную сторону (от—1,15 до—1,2 вольта).

В спирто-водных растворах рН от 4 до 6 (из этого предела не выходит рН коньячных спиртов) величина потенциала полуволны перекиси водорода и гидроперекисей меняется от — 1,15 до — 1,2 вольта, следовательно необходимость применения буферных растворов отпадает.

Для определения гидроперекисей в качестве фона подбирали однонормальный спирто-водный раствор хлористого калия или бензол-этанольный (1:2) раствор хлористого лития. Методы отработывались на перекиси водорода.

1. Ход анализа с фоном хлористого калия. В колбу емкостью 50 мл вносят равное количество исследуемого коньячного спирта, 2N водного раствора хлористого калия. 10 мл смеси помещают в электролитическую ячейку и продувают в течение 10 минут водородом или другим инертным газом для удаления растворимого кислорода. Полярографируют в интервале —0,8 до —1,4 вольта. Содержание гидроперекисей в пересчете на перекись водорода определяют по градуировочной кривой, построенной по результатам полярографирования нескольких растворов с различными концентрациями перекиси водорода или методом добавок.

2. Ход анализа с фоном хлористого лития в бензол-этанольной смеси. В колбу емкостью 200 мл отмеряют мерной колбой 50 мл бензола, 100 мл ректификованного спирта (двойной очистки) и прибавляют хлористого лития из расчета 0,2—0,4 мол/л, взбалтывая, растворяют хлористый литий.

В колбу емкостью 25 мл отмеряют пипеткой 10 мл бензол-этанольной смеси и 5 мл испытуемой жидкости — коньячного спирта, смесь переносят в электролитическую ячейку и продувают 20 минут водородом или инертным газом для удаления растворимого кислорода.

Полярографирование производят на ртутном капельном электроде с частотой капания ртути по одной капле через три секунды в интервале от $-0,6$ до $-1,4$ вольт.

Приведем некоторые данные определения гидроперекисей в коньячных спиртах. Коньячный спирт 1960 г. при полярографировании на фоне хлористого калия дает волну при потенциале полуволны $-1,18$ вольт. После добавления перекиси водорода волна увеличилась при том же потенциале.

Количество гидроперекисей в коньячных спиртах возрастает по мере увеличения срока выдержки.

Количественное определение приводится на калибровочной кривой, составленной на основе полярограммы чистых растворов перекиси водорода.

По указанной калибровочной кривой определено количество гидроперекисей в различных коньячных спиртах: в коньячном спирте, выдержанном один год, — $1,7$ мг/л, два года — 2 мг/л, 10 лет — $4,7$ мг/л, 16 лет — $11,1$ мг/л, 59 лет — $23,5$ мг/л; таким образом, чем старше спирт, тем больше в нем перекисей.

Выводы. Нами разработан метод полярографического определения гидроперекисей в коньячных спиртах.

В результате полярографического исследования установлено, что в коньячных спиртах имеются гидроперекиси, потенциал полуволны которых равен $E^{1/2} = -1,15$ — $-1,2$ вольт. Количество гидроперекисей в коньячных спиртах возрастает по мере увеличения срока выдержки.

Разработанные методы определения гидроперекисей могут быть использованы во многих объектах, в частности, для определения перекисей в коньячных спиртах и винах.