

Príspevok k polarografickému stanoveniu polypeptidov vo vínach

Andrej Došoš a Jozef Marcina, Výskumné pracovisko Vinárskych závodov Bratislava-Rača,
Jozef Antušek, SVŠT, Chemickotechnologická fakulta, Bratislava

663.253

Vo vinárskej praxi sa často objavuje požiadavka stanovenia bielkovinných látok vo víne, najmä v súvislosti so zaistením koloidnej stability.

Doteraz používané metódy sú založené na vyzrážaní bielkovín rôznymi činidlami, ako síran sodný a alkohol [1], hydroxid meďnatý [2, 3], kyselina fosfomolybdénová [4], prípadne fosfowolfrámová [5] a stanovení dusíka v zrazeninách podľa *Kjeldala*. Niektoré metódy popisujú stanovenia bielkovín fotometricky, využívajúc farebné reakcie bielkovín a polypeptidov [5, 6, 7]. Iné metódy stanovenia bielkovín využívajú ultrafiltráciu a elektroforézu [8, 9, 10]. Uvedené metódy sú časovo náročné, pričom presnosť stanovenia je ovplyvnená mnohými faktormi, najmä u zrážacích metód.

Nakoľko pre prax sa žiada jednoduchá metodika, ktorá by bola dostatočne presná a rýchla, odskúšali sme k stanoveniu polypeptidov polarografickú metódu.

Podľa našich zistení o polarografickom stanovení bielkovín vo vínach je málo správ. *Heyrovský* a spol. [11] zistili zreteľnú bielkovinnú vlnu v Burgundskom víne, Žernoseckom a Mělnickom rizlingu. V ovocných vínach bola reakcia na bielkoviny negatívna. *De Almeida* [12] stanovil proteidy v Portskom víne.

Polarografické hodnotenie polypeptidov v pive s úspechom použil *Hummel* [13].

Experimentálna časť

Analytické metódy a použitý materiál

Za základ nami aplikovanej metódy slúžila Brdiczkova reakcia, ktorá je na bielkoviny špecifická. Bielkoviny svojimi —SH a —S—S— skupinami v prítomnosti Co^{2+} a Co^{3+} v amoniakálnom prostredí spôsobujú katalyzovanú elektródovú reakciu, pri ktorej sa z roztoku vyvíja vodík. Táto reakcia sa prejavuje na polarografickej krivke charakteristickou dvojnou, ktorej výška a tvar závisí od zloženia roztokov, v ktorých sa bielkovina stanovuje. V roztokoch o stálom zložení je dobre reprodukovateľná a jej výška sa mení s koncentráciou bielkoviny v tvare adsorpčnej izotermy.

Najčastejšie používaný roztok má zloženie 0,001 M CoCl_2 alebo $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, 0,1 M NH_4Cl a 0,1 M NH_3 . Aby sa vylúčil polarografický účinok cystínu a cysteinu je výhodné používať $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. Pre zvýšenie citlivosti sa používajú vyššie koncentrácie NH_3 , čo spôsobuje zvýšenie výšky bielkovinovej vlny. V koncentrácii 1 M NH_3 sa nevyvinie dvojná.

Nami použitá solúcia mala zloženie: 0,001 M $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, 0,1 M NH_4Cl , 1 M NH_3 . Polarografovalo sa pri citlivosti 1/300 s výškou kapiláry $h = 65$ cm, prietokovou rýchlosťou $m \approx 3,45$ mg Hg/s, dobu

kvapky $t = 2,45$ s pri 200 mV/abs., od $-0,8$ V v Novákových nádobkách za prístupu vzduchu.

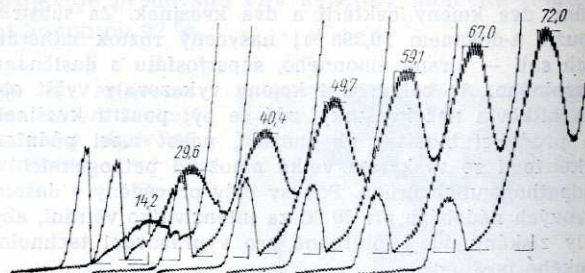
Pre kvantitatívne vyhodnotenie polypeptidov vo vínach sa zrovnávali výšky polarografických vln s výškou vln cystínu, z ktorého sa spravil kalibračný polarogram. Pre zhotovenie kalibračného polarogramu z cystínu sa použila čerstvo pripravená solúcia Co^{2+} . Cystín sa pripravil v 1 M roztoku NH_3 ako 0,01 M roztok. Jeho riedením sa pripravil 0,002 M roztok, z ktorého sa pipetovalo také množstvo, aby sa dosiahli výsledné koncentrácie: $2 \cdot 10^{-6}$, $6 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1,4 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $2,6 \cdot 10^{-5}$, $3,2 \cdot 10^{-5}$ M.

Polarografovaním týchto roztokov sa zhotovil kalibračný polarogram (obr. 1) a jeho meraním kalibračný graf (obr. 2).

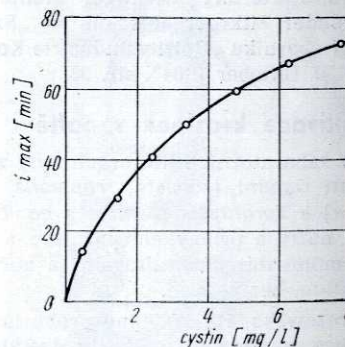
Na vlastnú analýzu sa použili pôvodné neriedené vína v množstve 1 ml do 9 ml solúcie. Popísaná metóda sa aplikovala pri štúdiu:

- účinku bentonitu na zníženie obsahu polypeptidov a
- koloidnej stability naľahčovaného vína.

Ako vzorky sa použili vína I. triedy z úrody 1964, oblasť Bratislava-Rača, odobraté pred prvým stáčaním. Taktiež sa stanovilo množstvo polypeptidov niektorých neľahčovaných vín ročníka 1964 z oblasti Mikulov a Bratislava-Rača, u ktorých sa predpokladala koloidná stabilita. Pre porovnanie sa u stabilizovaných vín prevádzal expresný tepelný test podľa *Malcevovej* [18] a modifikovaný tepelný



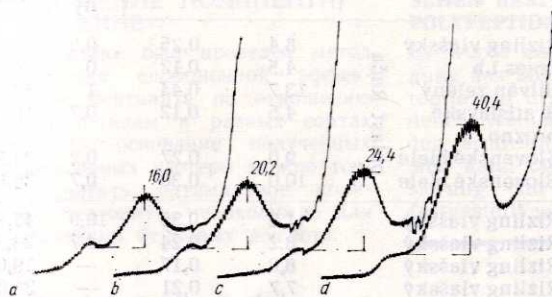
Obr. 1. Kalibračný polarogram



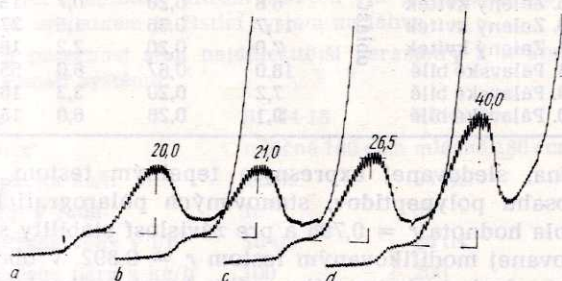
Obr. 2. Kalibračný graf

test s pridaním tanínu [4]. Zákal sa meral nefelometrom.

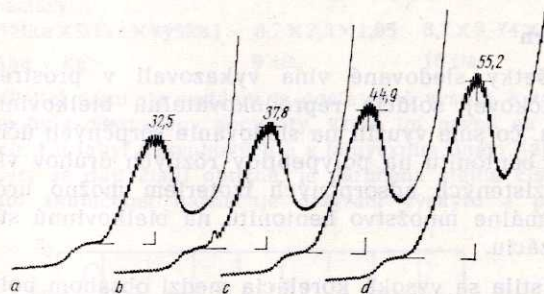
Závislosť medzi koloidnou stabilitou vín, stanovenou tepelnými testami a polypeptidmi, stanovenými polarograficky, sa vyhodnotila určením výberového korelačného koeficientu [20]. Množstvo polypeptidov sa udávalo v mg % cystínu a zníženie účinkom bentonitu v percentách pôvodného obsahu



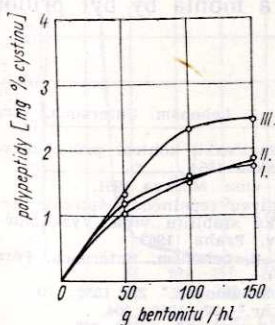
Obr. 3. Adsorpcia polypeptidov na bentonit — Rizling rýnský (vzorka IV. z tabuľky 1)
Krivky: a — 150 g/hl; b — 100 g/hl; c — 50 g/hl; d — pôvodné víno



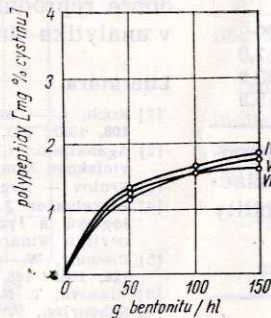
Obr. 4. Adsorpcia polypeptidov na bentonit — Burgundské biele (vzorka VI. z tabuľky 1)
Krivky: a — 150 g/hl; b — 100 g/hl; c — 50 g/hl; d — pôvodné víno



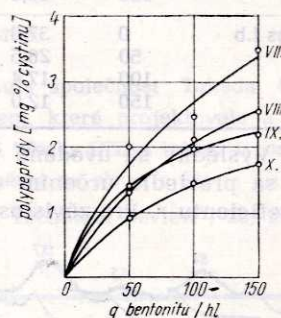
Obr. 5. Adsorpcia polypeptidov na bentonit — Tramín (vzorka VIII. z tabuľky 1)
Krivky: a — 150 g/hl; b — 100 g/hl; c — 50 g/hl; d — pôvodné víno



Obr. 6. Adsorpcčné izotermy bentonitu (označenie vzoriek podľa tabuľky 1)



Obr. 7. Adsorpcčné izotermy bentonitu (označenie vzoriek podľa tabuľky 1)



Obr. 8. Adsorpcčné izotermy bentonitu (označenie vzoriek podľa tabuľky 1)

cystínu. Overila sa reprodukovateľnosť polarografickej metódy stanovenia polypeptidov vo vínach. Smerodatná odchylka $S = 0,0148$ poukazuje na dobrú reprodukovateľnosť metódy [21].

a) Sledovanie vplyvu bentonitu na zníženie obsahu polypeptidov

Zákaly spôsobené vyzrážaním nestabilných látok z vín, sú tvorené v prevažnej miere látkami bielkovinnej a polypeptidickej povahy. Zvyšok sú triesloviny, polysacharidy, minerálne a farebné látky [14, 15].

Pretože k stabilizácii voči bielkovinným zákalom sa používajú hlinky typu bentonit, využila sa Brdičkova reakcia na sledovanie ich adsorpčných účinkov. K 100 ml vína sa pridávala 5% suspenzia vo vode tak, aby výsledná koncentrácia bola 50, 100, 150 g/hl vína. Filtrát sa pipetoval do Brdičkovej solúcie a polarografoval. Niektoré polarogramy sú na obr. 3, 4, 5.

Výšky vln sa premerali a vyhodnotili pomocou kalibračného grafu. Výsledky sú uvedené v tabuľke 1. Zo zisteného obsahu polypeptidov sa zostrojili adsorpčné izotermy (obr. 6, 7, 8).

Obsah polypeptidov v pôvodných vínach, vyjadrený ako cystín, pohyboval sa v rozmedzí 2 až 4 mg %. Najvyššie hodnoty vykazovala odroda Tramín.

Z priebehu adsorpčných izoteriem možno usudzovať na množstvo bentonitu potrebného ku koloidnej stabilizácii vína. Doterajšie spôsoby určenia dávok bentonitu rôznymi testami [16, 17, 18] sú zdĺhavé a ich reprodukovateľnosť závisí od viacerých faktorov. Naproti tomu polarografická metóda je dobre reprodukovateľná a jej doba stanovenia je závislá viac-menej len od rutiny pracovníka.

Sorpčné účinky bentonitu na polypeptidy vína, sledované polarograficky, sú podľa našich zistení vyčerpané za dobu 7 až 10 minút (podľa doterajších znalostí až 50 minút [19]). Táto skutočnosť vedie k možnosti rýchleho určenia priebehu adsorpčnej izotermy, a tým aj príslušnej dávky bentonitu pre ošetrenie toho ktorého vína.

b) Závislosť koloidnej stability naflašovaného vína od obsahu polypeptidov sledovaných polarograficky

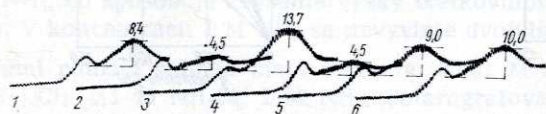
Koloidná stabilita vín, ako bolo spomenuté vyššie, je pripisovaná najmä látkam bielkovinnej povahy. Preto nás pri zisťovaní obsahu polypeptidov v stabilných vínach zaujala možnosť určovania stability na základe stanovenia polypeptidov Brdickovou reakciou. Množstvo polypeptidov stanovené polarograficky (obr. 9) sa porovnávalo s tepelnými

Tabuľka 1

Sledovanie adsorpčných účinkov bentonitu na polypeptidy vín

Označenie	Bentonit (g/hl)	Výška vlny (mm)	Polypeptidy ako cystín (mg %)	Úbytok (%)
I. Müller-Thurgau				
0	35,0	1,92	100	
50	21,6	0,87	45,3	
100	11,1	0,35	18,2	
150	6,0	0,17	8,8	
II. Rizling rýnský				
0	39,4	2,33	100	
50	26,1	1,15	49,4	
100	21,0	0,82	35,2	
150	13,8	0,46	19,7	
III. Rizling rýnský				
0	45,0	2,95	100	
50	30,8	1,52	85,4	
100	15,3	0,52	17,6	
150	12,6	0,42	14,2	
IV. Rizling rýnský				
0	40,4	2,42	100	
50	24,4	1,05	43,4	
100	20,2	0,80	33,1	
150	16,0	0,55	22,7	
V. Burgundské biele				
0	36,9	2,07	100	
50	20,8	0,80	38,7	
100	16,0	0,55	26,7	
150	9,4	0,28	13,5	
VI. Burgundské biele				
0	40,0	2,40	100	
50	26,5	1,18	49,2	
100	21,0	0,82	34,2	
150	20,0	0,78	32,5	
VII. Tramín				
0	54,0	4,10	100	
50	37,8	2,15	52,4	
100	32,5	1,66	40,5	
150	17,0	0,61	14,9	
VIII. Tramín				
0	55,2	4,20	100	
50	44,9	2,92	69,5	
100	37,8	2,13	50,7	
150	32,5	1,66	39,5	
IX. Zmes I.b				
0	41,1	2,51	100	
50	25,3	1,11	44,2	
100	16,0	0,55	21,9	
150	10,5	0,31	12,4	
X. Zmes I.b				
0	37,0	2,07	100	
50	26,5	1,18	57,0	
100	17,4	0,64	30,9	
150	12,0	0,33	15,9	

testami. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2. Vyhodnotenie sa previedlo určením výberového korelačného koeficientu r . Pre závislosť koloidnej stability



Obr. 9. Obsah polypeptidov v naľahovaných vínach (označenie vzoriek podľa tabuľky 2)

Tabuľka 2

Závislosť stability fľašového vína od obsahu polypeptidov

Označenie vína	Výška vlny (mm)	Polypeptidy ako cystín (mg %)	[mV] hodnota testu	
			expresný	modifik.
1. Rizling vlašský	8,4	0,25	0,5	18,0
2. Zmes I.b	4,5	0,12	0	4,9
3. Silván zelený	13,7	0,44	1	47
4. Bratislavské hrozno	4,5	0,12	0,7	10
5. Slovenské biele	9,0	0,27	0,2	28,5
6. Slovenské biele	10,0	0,30	0,7	36,5
7. Rizling vlašský	11,3	0,35	10,9	43,3
8. Rizling vlašský	8,2	0,24	4,7	23,3
9. Rizling vlašský	6,0	0,17	—	19,0
10. Rizling vlašský	7,7	0,21	—	25,0
11. Rizling rýnsky	18,2	0,68	10,8	53,0
12. Rizling rýnsky	20,8	0,76	12,7	55,0
13. Tramín	24,5	1,05	13,9	59,0
14. Zelený kvítek	8,0	0,25	0,2	18,5
15. Zelený kvítek	6,8	0,20	0,7	15,0
16. Zelený kvítek	11,7	0,36	1,5	27,0
17. Zelený kvítek	7,0	0,20	2,2	16,2
18. Pálavské bílé	18,0	0,67	6,0	55,5
19. Pálavské bílé	7,2	0,20	3,3	16,5
20. Pálavské bílé	9,1	0,26	6,0	18,0

vína, sledovanej expresným tepelným testom na obsahu polypeptidov, stanovených polarograficky, bola hodnota $r = 0,796$ a pre závislosť stability sledovanej modifikovaným testom $r = 0,892$. V oboch prípadoch hodnoty výberového korelačného koeficientu sú väčšie ako tabelované hodnoty. Korelácia medzi sledovanými veličinami je významná na $P = 0,05$ hladine významnosti [20].

Súhrn

Všetky sledované vína vykazovali v prostredí Brdickovej solúcie reprodukovateľnú bielkovinnú vlnu, čo sme využili na sledovanie sorpčných účinkov bentonitu na polypeptidy rôznych druhov vín. Zo zistených adsorpčných izoteriem možno určiť optimálne množstvo bentonitu na bielkovinnú stabilizáciu.

Zistila sa vysoká korelácia medzi obsahom polypeptidov, vyjadrených ako cystín a stabilitou naľahovaných vín sledovanou tepelnými testami. Popísaná metodika je jednoduchá, časovo nenáročná, dobre reprodukovateľná a mohla by byť prínosom v analytike vína.

Literatúra

- [1] Koch, J. — Bretthauer, G.: „Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.“, 106, 1957: 273.
- [2] Agaballanc: Chimiko-technologičeskij kontrol proizvodstva sovietskogo šampanskogo. Moskva 1954.
- [3] Frolov — Bagreev: Chimija vina. Moskva 1951.
- [4] Kuttelvašer Z.: Studium vplyvu tepelného ošetrenia na biologickú a fyzikálno-chemickú stabilitu vína. Výzkumné pracovisko Vinárskych závodov, Praha, 1963.
- [5] Diemair, W. — Maier, G.: „Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.“, 118, 1962: 148.
- [6] Vlasova, T. N.: „Selekc. i Semenovod.“ 27, 1962: 70.
- [7] Scheurlen, P. G.: Klin. Wschr.“ 37, 1959: 304.
- [8] Tomaset: „Ann. Sper. Agr. Roma“, 13, 1959: 385.
- [9] Koch, J. — Swahn, H.: „Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.“ 107, 1958: 20.
- [10] Diemair, W. — Koch, J. — Sajak, E.: „Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.“ 116, 1961: 5.

- [11] Heyrovský — Smolar — Šťastný: Věst. čsl. Akad. zemědel. 6 (1930).
[12] Březina — Zuman: Polarografie v lékařství, biochemii, farmácii, Praha 1952.
[13] Hummel, J.: „Kvasný průmysl“, 7, 1961: 145.
[14] Koch, J. — Geiss, E.: „Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.“ 100 1955: 15.
[15] Kielhofer, E.: „Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.“ 92, 1951: 1.
[16] Koch, J. — Sajak, E.: Wbg. u Keller., 8, 1961: 5.

- [17] Berg, U. W. — Akioshi, M.: „Am. Journ. of En. and Viticult.“, 12, 1961.
[18] Malceva, M. A. — Kravec, Š. Ch.: „Vinodel. i vinograd. SSSR“, č. 5 1963: 11.
[19] Troost G. — Fetter, K.: „Wbg. u Keller.“ 7, 1960: 444.
[20] Nalimov: Primenenije matematičeskoj statistiki pri analize veščestva — Moskva 1960.
[21] Ekschlager: Chyby chemických rozborů — Praha 1961.

Došlo do redakce 10. 3. 1966.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИПЕПТИ- ДОВ В ВИНЕ

На практике был проведен метод определения сорбционной эффективности бентонита по отношению к полипептидам в разных сортах вина. На основании полученных адсорбционных изотерм можно точно рассчитать оптимальное количество бентонита, необходимое для стабилизации белковых веществ.

BEITRAG ZUR POLAROGRAPHI- SCHEN BESTIMMUNG DER POLYPEPTIDE IN WEINEN

Es wurde eine Methode zur Verfolgung des Sorptionseffektes der Bentonite auf die Polypeptide verschiedener Weinsorten ausprobt. Aus den ermittelten Adsorption-Isothermen kann die optimale Bentonitdosierung zur Eiweissstabilisierung festgestellt werden.

POLAROGRAPHIC DETERMINATION OF POLYPEPTIDES IN WINE

The article deals with the results of research work into the sorption effect of bentonite upon the polypeptides present in various sorts of wine. Adsorption isothermal curves permit to determine the optimum amount of bentonite required for protein stabilization.