

## КРИТЕРИИ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ ВИНОГРАДА ПО АНТОЦИАНОВОМУ КОМПЛЕКСУ ПЛОДОВ

**Л.А. ДЕЙНЕКА,  
Ю.Ю. ЛИТВИН,  
В.И. ДЕЙНЕКА**

*Белгородский государственный  
университет*

*e-mail: deimeka@bsu.edu.ru*

В работе на основе анализа схем биосинтеза антоцианов предложено несколько критериев для дифференциации сортов и видов винограда по набору антоцианов, накапливающихся в плодах растений. Первый критерий оценивает активность флаванон-3-гидроксидазы (F3H и/или F3'5'H), разделяя все антоцианы на два ряда – дельфинидиновый и цианидиновый. Второй критерий оценивает активность метилтрансфераз, соответствующая степени метилирования антоцианов. Третий критерий учитывает степень ацилирования и четвертый оценивает активность вторичных гликозилтрансфераз, являясь наиболее чувствительным к участию иных (кроме *vinifera*) видов виноградов при выведении сорта.

Ключевые слова: *Vitis* sp., антоцианы плодов, критерии классификации.

Значение винограда как пищевой культуры трудно переоценить, особенно в свете современной тенденции к расширению употребления продуктов богатых важнейшими биологически активными веществами. А плоды винограда относятся к наиболее богатым источникам таких сильнейших антиоксидантов, как проантоцианидины и антоцианы. Эти вещества особенно важны для профилактики и лечения множества основных заболеваний человека в современном мире [1].

Ежегодно возрастающему производству винограда способствуют достижения селекционеров, позволившие расширить на север ареал возделывания этой культуры. Но при этом ужесточаются и требования по качеству продукции. Так, директивами Европейского Союза введено ограничение на импорт в страны ЕС красных виноградных вин, произведенных из винограда, полученного межвидовым скрещиванием или не принадлежащих к виду *Vitis vinifera* [2].

Следовательно, разработка надежных методов классификация виноградов, например, для установления чистосортности красных вин [3], обнаружения фальсификации становится важной аналитической задачей. Данному вопросу в научной литературе уделялось много внимания, однако некоторые выводы оказываются довольно странными, не имеющими реального обоснования. Так удивительно, что по отмеченной выше директиве ЕС регламентируется содержание только мальвидин-3,5-диглюкозида, хотя аналогичные производные других антоцианидинов во многом должны иметь аналогичные свойства.

В настоящей работе предлагаются несколько критериев для оценки качества и свойств винограда по антоциановому комплексу, основанные на известных схемах биосинтеза антоцианов в растениях.

Схема биосинтеза антоцианов [4] включает несколько ключевых моментов. Бесцветный флаванон – нарингенин (II) образуется из желтого 4,2',4',6'-тетрагидрохалкона (I) под действием халконизомеразы (CHI). Затем под действием флаванон-3-гидроксидазы (F3H) II превращается в ключевой флаванол - дигидрокемпферол (III). Другие флаванолы (дигидрокверцетин, IIIa) и (или) (дигидромрицетин, IIIb) могут быть синтезированы под действием двух ферментов (при их наличии) – флавоноид-3'-гидроксилазы (F3'H) и (или) флавоноид-3',5'-дигидроксидазы (F3'5'H). При этом переход IIIa → IIIb осуществим также и под действием F3'5'H.

По крайней мере, три фермента необходимы для превращения бесцветных флаванолов в антоцианы: вначале благодаря дигидрофлаванол-4-редуктазе (DFR) образуются три лейкоантоцианидина: лейкопеларгонидин (IV), лейкоцианидин (IVa) и лейкодельфинидин (IVb). Затем антоцианидин-синтаза (ANS) превращает их в соответствующие антоцианидины (V, Va, Vb), которые настолько неустойчивы, что прак-

тически не встречаются в природе в свободном состоянии. Но достаточно стабильны возникающие при действии 3-глюкозилтрансферазы (*3GT*) 3-глюкозиды (**VI**, **VIa**, **VIb**) трех базовых антоцианидинов: пеларгонидина, Pg, цианидина, Cy, и дельфинидина, Dp.

Все многообразие природных антоцианов обусловлено дальнейшими превращениями под действием соответствующих ферментов. Особое внимание следует обратить на метил-трансферазы, превращающие цианидиновые производные в пеонидиновые, Pn, а дельфинидиновые – в петунидиновые, Pt, и далее в мальвидиновые, Mv.

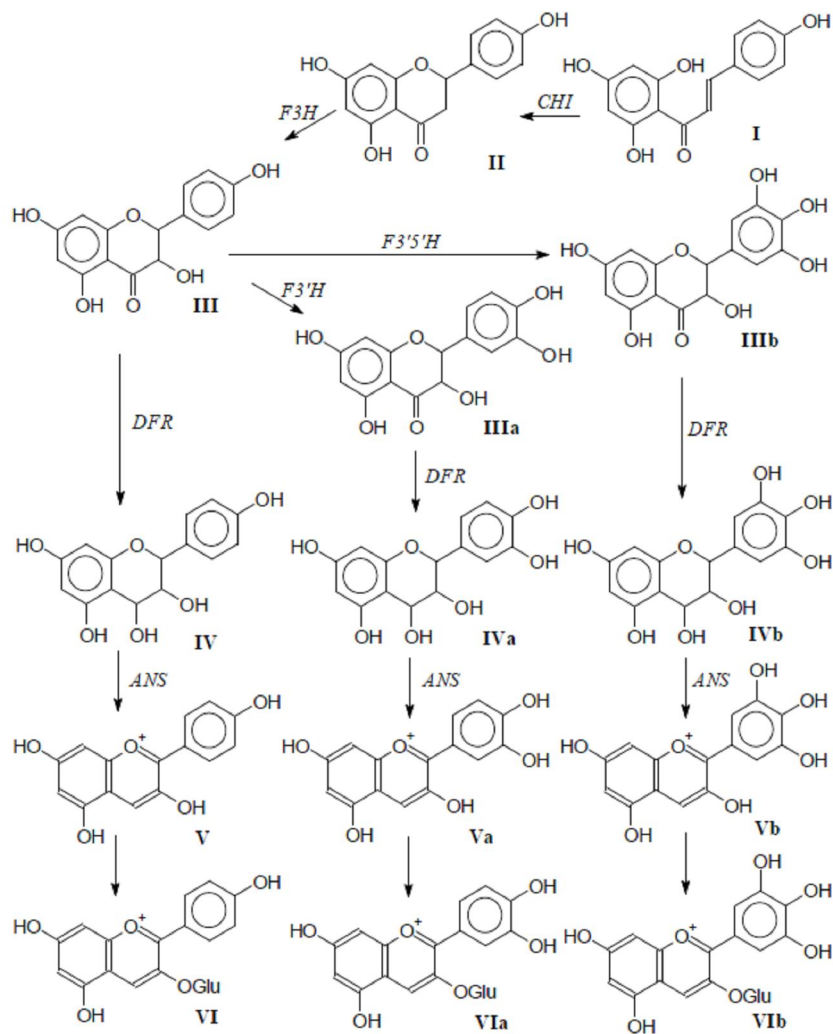


Схема 1. Биосинтез антоцианов

Известно, что при перемещении с юга на север в растениях изменяется направление синтеза и метаболизм многих соединений. Так, в триглицеридах масел семян насыщенные жирные кислоты заменяются ненасыщенными, позволяющими благодаря более низкой температуре кристаллизации раньше (при более низких температурах) начинать цикл развития весной [5]. Поэтому более «северный» (по сравнению с подсолнечником) лен накапливает масло с основной – октадека**три**еновой ( $\alpha$ -линоленовой) кислотой, в то время как у подсолнечника основная кислота октадека**ди**еновая (линолевая) кислота.





В соответствии со схемой 1 с учетом последующей конверсии можно выделить ветвь «цианидиновую» - в кольце В имеется две ОН-группы, одна из которых метилируется метилтрансферазой (*Mt*) и ветвь «дельфинидиновую» - в кольце В имеется три ОН-группы, две из которых могут быть последовательно метилированы:

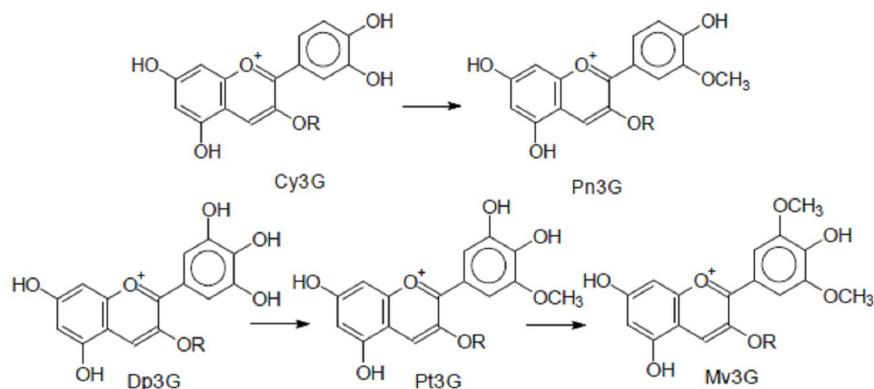


Схема 2. Метилирование антоцианов

Поэтому **1-й критерий** – доля вклада дельфинидинового ряда (или цианидинового). Этот параметр рассчитывается по формуле:

$$K_p^{Dp} = \frac{n(Dp) + n(Pt) + n(Mv)}{n(Dp) + n(Pt) + n(Mv) + n(Cy) + n(Pn)}$$

где  $n(i)$  – число моль производных соответствующих антоцианидинов. Очевидно, что вклад цианидинового ряда связан с указанным простым соотношением:

$$K_p^{Dp} + K_p^{Cy} = 1.$$

Второй критерий должен учитывать степень метилирования, поскольку он учитывает степень активности (или наследования) метилтрансфераз.

Для введения такого критерия следует учитывать, что в цианидиновом ряду метилируется только одна ОН-группа, а в дельфинидиновом ряду – две. Отметим, что по данным работы [4], преобразование цианидиновых компонент в петунидиновые и дельфинидиновых в петунидиновые могут катализироваться одним и тем же ферментом, хотя переходы от дельфинидиновых производных к петунидиновым и далее – к мальвидиновым осуществляются и другим ферментом.

**2-й критерий** может быть рассчитан по формуле:

$$K_p^{Ome} = \frac{n(Pt) + 2 \cdot n(Mv) + n(Pn)}{2 \cdot [n(Dp) + n(Pt) + n(Mv)] + n(Cy) + n(Pn)}$$

То, что гидроксильная группа в положении 4 кольца В не метилируется в реальных образцах природных антоцианов может свидетельствовать о том, что во внутриклеточном пространстве существуют таутомерные равновесия, приводящие к образованию хиноидных структур. Эти структуры включают образование сопряженной с не-предельными связями кетогруппы именно в положении 4' (соединение II, схема 3). По той же причине в подавляющем большинстве природных антоцианов в положении 7 также находится незамещенная ОН-группа, см. соединение (I). Аналогично, становится понятным, почему в положении 5 заместители (в том числе и углеводные радикалы) встречаются реже, чем в положении 3 (известны антоцианы, содержащие углеводные фрагменты в положении 3, в положениях 3 и 5, но нет природных производных с гликозилированием только в положении 5).

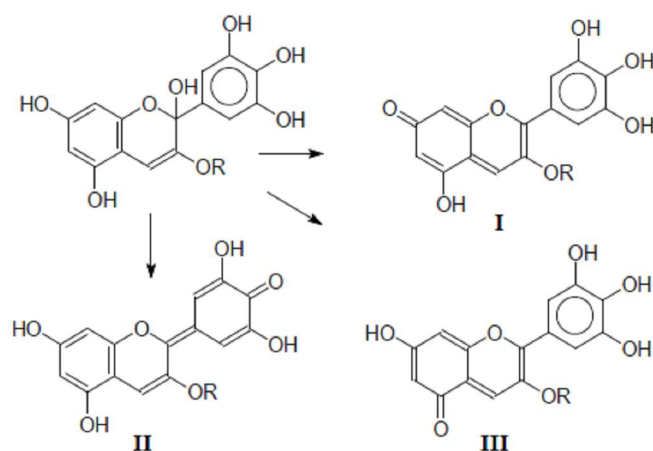


Схема 3. Равновесия с участием хиноидных структур

Кроме 3-гликозидов антоцианидинов в антоциановом комплексе плодов *Vitis vinifera* встречаются продукты ацилирования *n*-кумаровой и уксусной кислотами. Тогда можно ввести **3-й критерий**, учитывающий степень ацилирования:

$$Kp^{OAcyl} = \frac{\sum n(i - Acyl)}{\sum n(i)}$$

который может быть разделен по типу ацилирования (по типу кислот).

Наконец, кроме 3-гликозидов в винограде могут встречаться антоцианы с двойным гликозилированием – 3,5-диглюкозиды. Появление этих соединений связывают с другими видами винограда, использованными при гибридизации винограда [6]. Соответствующий (4-й критерий) может быть рассчитан по формуле:

$$Kp^{3,5diG} = \frac{\sum n(3,5diG(i))}{\sum n(i)}$$

По данным, представленным в работе [а5], можно рассчитать два первых критерия, см. табл.3.1.

Таблица 1

Параметры антоциановых комплексов плодов трех сортов винограда (Италия, [7])

Сорт	%Mv*	$Kp^{Dp}$	$Kp^{OMe}$
Brunello	34.3	0.59	0.63
Prugnolo	36.8	0.66	0.63
Chianti	37.2	0.65	0.64
То же	39.2	0.66	0.66

\*%Mv\* – мольная доля мальвидина-3-гликозида в комплексе.

Как видно из представленных данных, при наибольшей доле мальвидин-3-гликозида принадлежность всех сортов к сортам дельфинидинового типа очевидна, хотя доля производных цианидинового ряда лишь примерно вдвое меньше. Отметим, что все три сорта характеризуются примерно одинаковой степенью метилирования (см. 2-й критерий).

В работе [8] приведен более широкий (15 сортов) спектр данных, из которых становится очевидным, почему так часто считается, что мальвидин-3-гликозид является основным антоцианом плодов темных сортов винограда, табл.2. В случае 14 сортов на мальвидин-3-гликозид приходилась наибольшая доля в диапазоне от ~ 32 % до ~ 59





%. И только для одного сорта (Garnacha Tintorera) наибольшей оказалась доля пеонидин-3-глюкозида (40.2 %). При этом степень метилирования антоцианов для всех 15 сортов была существенно выше, чем для сортов, представленных в табл.1. В данном случае возможен также и расчет третьего критерия, причем, строго говоря, можно этот критерий разделить на два – учитывающие ацилирование уксусной или *n*-кумаровой кислотами. Соотношение между ацетатом и *n*-кумаратом  $Mv3G$  также может быть использовано для диагностики и идентификации сорта – чаще преобладают *n*-кумараты, но сорта с обратным распределением также имеются.

Таблица 2

Параметры антоциановых комплексов плодов 15 сортов винограда (Испания, [8])

Сорт	% $Mv3G$	$Kp^{Dp}$	$Kp^{OMe}$	$Kp^{OAcyl}$	$Cu/Ac$
Bobal	58.2	0.71	0.88	0.20	1.53
Cabernet Sauvignon	64.5	0.88	0.80	0.24	4.23
Carifiena	47.8	0.62	0.84	0.13	4.73
Crujidera	74.7	0.91	0.86	0.42	0.33
Garnacha	61.3	0.68	0.93	0.13	8.33
Garnacha Peluda	62.8	0.71	0.92	0.13	3.72
Garnacha Tintorera	41.3	0.46	0.94	0.22	5.05
Graciano	53.4	0.66	0.87	0.19	1.30
Mencia	55.9	0.71	0.85	0.25	0.70
Merlot	60.5	0.83	0.79	0.34	0.56
Monastrell	66.3	0.72	0.94	0.11	4.90
Moristel	68.9	0.83	0.88	0.24	5.20
Ondarrabi Beltza	56.8	0.73	0.84	0.24	1.47
Prieto Picudo	51.0	0.75	0.76	0.24	1.33
Vitadillo	64.7	0.87	0.81	0.28	3.18

При сопоставлении первых двух критериев обнаруживаются следующие тенденции:  
 1) все сорта табл.2 можно разделить условно на три группы по первому критерию:  
 а) группа умеренно дельфинидиновая (с примерно двух-трехкратным преобладанием компонентов дельфинидинового ряда над компонентами цианидинового ряда) и  
 б) группа полностью дельфинидиновая (превышение более чем в 5 раз), рис.1; в плодах только одного сорта винограда обнаруживаются примерно одинаковые количества антоцианов обоих рядов.

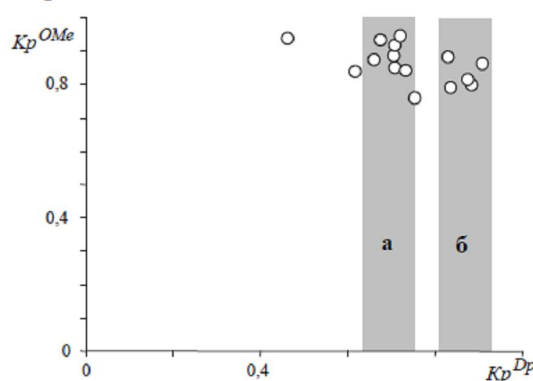


Рис.1. Сопоставление первых двух критериев состава антоцианового комплекса плодов 15 сортов *Vitis vinifera* (Испания)

2) степень ацилирования (глюкозидного радикала в положении 3 антоцианидиновой основы) несколько усиливается при увеличении вклада компонент дельфинидинового ряда, рис.2:

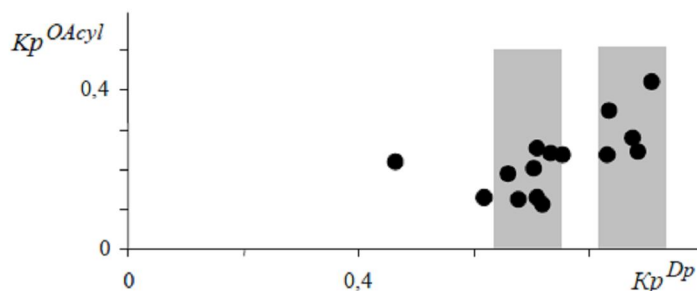


Рис.2. Сопоставление первого и третьего критериев состава антоцианового комплекса плодов 15 сортов *Vitis vinifera* (Испания)

Отметим, что по второму критерию (рис.1) нет серьезных различий в антоциановых комплексах плодов представленных сортов. При увеличении доли производных дельфинидинового ряда степень метилирования если и уменьшается, то незначительно, что может быть рассмотрено как примерно статистическое метилирование гидроксильных групп метилтрансферазой.

Таким образом, для многих сортов *Vitis vinifera* L., культивируемых в Испании, Италии и Франции, более характерны: высокая доля дельфинидиновых компонент и высокая степень метилирования. Но для продвижения винограда на север необходимо получение гибридных сортов, более устойчивых к низким температурам в зимний период, для чего использовали скрещивание *V. vinifera* с другими видами виноградов - американского или восточного происхождения. В этом случае принципиально важным является учет третьего критерия, определяющего долю 3,5-диглюкозидов антоцианидинов (табл.3), из которых в виноматериалах регламентируется почему-то содержание только мальвидин-3,5-диглюкозида. Пренебрежение аналогичными производными остальных четырех антоцианидинов связано, по-видимому, с убеждением в превалировании мальвидин-3-глюкозида в исходном материале при гибридизации, что, строго говоря, не совсем верно. Один из видов винограда, использованным при выведении новых сортов винограда, стал *V. labruska* [9] – вид винограда американского происхождения, придающего «потомкам» большую устойчивость к ряду заболеваний и к более холодным климатическим условиям.

К таким же видам можно отнести и дальневосточные вида винограда, поэтому интерес могут представлять сведения об антоцианах плодов винограда сортов, выведенных в странах Дальнего Востока, например, Японии. И действительно, степень диглюкозирования по данным работы [6] существенна для целого ряда сортов, табл. 3 и табл.4.

Таблица 3

**Параметры антоциановых комплексов гибридных сортов винограда [6]**

Сорт	Номер	$Kp^{Dp}$	$Kp^{OMe}$	$Kp^{OAcyl}$	$Kp^{3,5diG}$
Aki Queen	1	0.38	0.77	0.63	0.24
	2	0.36	0.80	0.65	0.24
Oriental star	1	0.49	0.77	0.09	0
	2	0.50	0.77	0.07	0
Dark Ridge	1	0.72	0.59	0.72	0.60
	2	0.74	0.60	0.73	0.60

Таблица 4





**Параметры антоциановых комплексов  
гибридных сортов винограда [6]**

Сорт	Год	$Kp^{Dp}$	$Kp^{OMe}$	$Kp^{OAcyl}$	$Kp^{3,5diG}$
Yoho	2004	0.26	0.25	0.48	0.31
	2005	0.28	0.25	0.51	0.31
Delaware	2004	0.06	0.50	0.27	0.04
	2005	0.06	0.50	0.27	0.04
Houman	2004	0.75	0.59	0.90	0.57
	2005	0.71	0.64	0.90	0.54
Campbell early	2004	0.61	0.46	0.91	0.72
	2005	0.55	0.42	0.89	0.76
Merlot	2004	0.91	0.82	0.51	0
	2005	0.85	0.83	0.49	0
Kai Noir	2004	0.86	0.82	0.41	0.31
	2005	0.83	0.79	0.41	0.35

Отметим, что эти антоцианы не являются следствием каких-либо климатических особенностей Японии, - европейский сорт Merlot накапливает такие же антоцианы, что и при выращивании в Европе.

#### Выводы

Таким образом, на основании схем биосинтеза предложены четыре основных критерия, позволяющие дифференцировать сорта виноградов с окрашенными плодами по антоциановому составу. Предложенные критерии учитывают активность (или наследование биосинтеза) соответствующих ферментов.

#### Список литературы

1. Lila M.A. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach // J. Biomed. Biotechnol. - 2004. - V.2004. - P.306-313.
2. Сластия Е.А., Жиликова Т.А., Аристова Н.И., Ткачев И.Ф., Пилипенко Д.С. Новый экспресс-метод полуколичественного определения содержания мальвидин-3,5-диглюкозида в винограде и вине // Вісник Харк. нац. універ. Хімія. - 2005. - Вип.13(36), №669. - P. 119-124.
3. Скорбанова Е., Рында П., Кайряк Н. Определение чистосортности красных вин из винограда *Vitis vinifera* // Виноделие и виноградарство. - 2006. - №1. - С. 24-25.
4. Holton T.A., Cornish E.C. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis // Plant Cell. - 1995. - V.7. - P. 1071-1083.
5. Linder C.R. Adaptive evolution of seed oils in plants: Accounting for the biogeographic distribution of saturated and unsaturated fatty acids in seed oils // Amer. Naturalist. - 2000. - V.156, №4. - P. 442-458.
6. Shiraishi M., Yamada M., Mitani N., Ueno T. A rapid determination method for anthocyanin profiling in the grape genetic resources // J. Japan. Soc. Hort. Sci. - 2007. - V.76(1). - P. 28-35.
7. Mattivi F., Scienza A., Failla O., Villa P., Anzani R., Tedesco G., Gianazza E., Righeti P. "Vitis vinifera" - a chemotaxonomic approach: anthocyanins in the skin // Proc. Of the 5<sup>th</sup> International Symposium on grape breeding. Genetic resources, evaluation and screening. 12-16 September 1989. St.Martin/Pfalz. P. 119-133.
8. Garcia-Beneytez E., Revilla E., Cabello F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them // Eur. Food Res. Technol. - 2002. - V.215. - P. 32-37.
9. Yokotsuka K., Nishino N., Singleton V.L. Unusual Koshu Grape Skin Anthocyanins // Am. J. Enol. Vitic. - 1988. - V.39, N4. - P. 288-292.

## CRITERIA FOR GRAPE CLASSIFICATION BY FRUIT ANTHOCYANINS COMPOSITION

**L.A. DEINEKA,  
Y.Y. LITVIN,  
V.I. DEINEKA**

*Белгородский государственный  
университет*

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru*

Four criteria for grape species and varieties classification according to anthocyanin composition of fruits have been proposed. The criteria are based upon anthocyanin biosynthetic pathway. The first criterion implies the definition of flavanone hydroxylases F3'H and/or F3'5'H activity, dividing the varieties on delphinidine and cyanidine types. The second criterion compares methyltransferases activity by determining of methylation degree. The third one takes into account a degree of acylation, while the last one is based upon estimation of glycosyl transferases activity.

Key words: *Vitis* sp., anthocyanins, criteria of classification.

---