Научная статья УДК 663.97:543.544.5

DOI: 10.17586/2310-1164-2024-17-2-3-9

«Алкогольная» ферментация табака в дубовых бочках. Часть 1. Массообмен танина и его косвенное количественное определение методом ВЭЖХ

И.В. Моисеев¹, Д.А. Карманов^{1*}, В.В. Лезный¹, Д.В. Бондаренко¹, Г.П. Синчин²

¹Погарская сигаретно-сигарная фабрика, Россия, Погар ²Дербентский коньячный комбинат, Россия, Дербент *denis.karmanov.91@mail.ru

Аннотация. Исследовали количественный переход танина дуба в табачное сырье в процессе его ферментации в дубовых бочках в газо-жидкостной среде коньячного дистиллята. Объектом исследований выступал кубинский сигарный табак сорта НР. Процесс ферментации осуществлялся в течение шести месяцев с периодической (1–2 недели) обработкой внутренней поверхности бочки коньячным дистиллятом с содержанием спирта 70 об.% в количестве 1,5 см³/дм². Для получения данных о массообмене танина разработали методику количественного косвенного определения танина в дубе и табачном сырье методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) через предварительный гидролиз танина до галловой кислоты. Определение галловой кислоты/танина проводилось на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором (УФ) на длине волны 280 нм методом внешнего стандарта. Анализ неферментированного табачного сырья наличие танина не выявил. Массовая доля танина в дубовой клепке составила 0,81%. Показано, что при указанных условиях за шесть месяцев ферментации наблюдается диффузия танина из дубовой клепки в табак в количестве 0,11% от массы табака. При этом наиболее интенсивное насыщение происходит в 1-й, 4-й и 5-й месяцы ферментации.

Ключевые слова: табачное сырье; ферментация; коньячный дистиллят; танин дуба; галловая кислота; высокоэффективная жидкостная хроматография

Original article

"Alcoholic" fermentation of tobacco in oak barrels. Part 1. Tannin mass transfer and its indirect quantitative determination by HPLC

Igor V. Moiseev¹, Denis A. Karmanov^{1*}, Valerii V. Leznyy¹, Dmitriy V. Bondarenko¹, Gregoriy P. Sinchin²

¹Pogar Cigarette & Cigar Factory, Pogar, Russia ²Derbent Brandy Factory, Derbent, Russia *denis.karmanov.91@mail.ru

Abstract. The quantitative transition of oak tannin into raw tobacco during its fermentation in oak barrels in the gas-liquid medium of cognac distillate was studied. The object of research was Cuban cigar tobacco of the HP variety. The fermentation process was carried out for six months with periodic (1–2 weeks) treatment of the inner surface of the barrel with cognac distillate with an alcohol content of 70 vol.% in an amount of 1,5 cm³/dm². To obtain data on tannin mass transfer, we developed a method for the quantitative indirect determination of tannin in oak and tobacco raw materials using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) through preliminary hydrolysis of tannin to gallic acid. The determination of gallic acid/tannin was carried out on a liquid chromatograph with a spectrophotometric detector (UV) at a wavelength of 280 nm using the external standard method. The analysis of unfermented tobacco raw materials did not reveal the presence of tannin. It has been shown that under the specified conditions, during 6 months of fermentation, diffusion of tannin from oak staves into tobacco is observed in an amount of 0,11% by weight of tobacco. The mass fraction of tannin in oak staves was 0,81%. At the same time, the most intense saturation occurs in the 1st, 4th, and 5th months of fermentation.

Keywords: tobacco raw materials; fermentation; cognac distillate; tannin of oak; gallic acid; high-performance liquid chromatography

Введение

Естественная ферментация табачного сырья в значительной степени улучшает качество табачной продукции [1, 2], но когда речь заходит о производстве продукции премиум-класса, естественной ферментации может быть недостаточно. В связи с этим в мировой практике, особенно в технологии производства сигар, имеет место операция дополнительной ферментации в дубовых бочках из-под

выдержанных алкогольных напитков и спиртосодержащих дистиллятов. В процессе «алкогольной» ферментации табак поглощает дополнительные ароматичные вещества, содержащиеся в винных или коньячных бочках.

Дуб, как и любой другой растительный материал, благодаря своей пористой структуре обладает относительно высокой сорбирующей и диффузионной способностью. Однако после многолетней выдержки в спиртосодержащем дистилляте дубовая клепка до определенного предела насыщается жидкостью, вследствие чего процессы диффузии и сорбции в клепке останавливаются. В этих условиях дуб способен только к обратному процессу – десорбции. Таким образом, дубовая клепка, насыщенная спиртосодержащим дистиллятом, является источником вкусоароматических веществ, содержащихся в ее клеточной структуре.

Табачное сырье, закладываемое в бочку на ферментацию, имеет сравнительно невысокую влажность (10–15%). Структура табачного листа более рыхлая по отношению к древовидной структуре дуба. Исходя из этого, очевидно, что между дубовой клепкой и табачным сырьем будет осуществляться массообмен различными веществами до достижения концентрационного равновесия, а именно в направлении из дуба в табак. При этом табачный лист будет интенсивно поглощать как растворенные в дистилляте (танин и т. д.), так и летучие вещества (ароматические альдегиды, спирты и др.). Наибольшая сорбция растворимых в жидкой фазе веществ будет происходить в местах контакта табачного листа с дубовой клепкой, а летучих веществ — в наиболее свободном от табака пространстве бочки, насыщенном парами дистиллята.

С точки зрения вклада во вкусоароматический профиль табачного дыма наибольший интерес из указанных веществ представляет танин. Танин – это сложная смесь из полифенольных соединений, способных связываться с белками, а также гидролизоваться до низкомолекулярных фенолов [3]. При горении табака танин и его ассоциаты с белками разлагаются, образуя множество ароматичных веществ. Ко всему прочему, танин является одним из наилучших антиоксидантов в растительном мире, что может положительно сказаться на хранении сферментированного табачного сырья [4, 5].

Несмотря на то что технология ферментации в дубовых бочках известна достаточно давно, исследования в области диффузионных процессов между дубовой бочкой и табачным сырьем не проводились. В этой связи изучение «алкогольной» ферментации, а точнее количественного перехода танина дуба в табачное сырье во время ферментации, имеет научный и практический интерес, поэтому цель данного исследования — выявление динамики массопереноса танина в табак при его ферментации в дубовой бочке из-под коньячного дистиллята. Для ее достижения необходимо проанализировать имеющиеся современные методы количественного анализа танина в растительном материале и при необходимости разработать собственную методику. Анализ научной литературы выявил, что наиболее распространенными методами анализа полифенолов (танина) являются спектрофотометрический метод Фолина–Чокальтеу [6–8] и методы ВЭЖХ с использованием массспекрометрического или УФ-спекрофотометрического детекторов [9–11].

Методы ВЭЖХ обладают большей точностью, чувствительностью и воспроизводимостью по отношению к методу Фолина—Чокальтеу, однако, как уже указывалось, танин является сложной смесью полифенолов, что затрудняет его непосредственный количественный анализ. В то же время известно, что структура гидролизуемых танинов в большей степени состоит из фрагментов галловой кислоты, которая в свою очередь легко анализируется современными физико-химическими методами, в том числе и методом ВЭЖХ [12—14]. Таким образом, галловая кислота может служить маркером в количественном анализе танина.

Объекты и методы исследований

Объектом изучения стал кубинский (Ремедиос, Республика Куба) сигарный табак воздушной сушки (Dark air-cured, DAC) сорта HP урожая 2021 г. Его увлажняли до 15–16% и закладывали на ферментацию в дубовую бочку из-под виноградного (коньячного) дистиллята 20-летней выдержки. Укладку табака в бочку осуществляли наполовину от ее внутреннего объема, после чего бочку герметично закрывали и размещали в помещении с постоянной температурой 18–20°С и относительной влажностью воздуха 60–80%. На рисунке 1 представлена бочка из-под коньячного дистиллята с заложенным на ферментацию табаком.



Рисунок 1 — Внешний вид дубовой коньячной бочки с сигарным табаком Figure 1. An oak cognac barrel with cigar tobacco

Для равномерного контакта табака со стенками бочки два раза в неделю осуществляли секторальное вращение бочки на 60–90°. При этом с периодичностью раз в две недели бочку краткосрочно открывали, табак вынимали, а внутренняя поверхность бочки обрабатывалась слитым из нее 20-летним коньячным дистиллятом с содержанием спирта 70 об.% в количестве 1,5 см³/дм². После этого бочку опять герметично закрывали до следующей итерации обработки. Данные операции повторяли на протяжении всего срока ферментации в течение шести месяцев с отбором проб табака для определения в них массовой доли танина методом ОФ ВЭЖХ.

Методика хроматографического определения танина основана на его полном гидролизе до галловой кислоты, которую в свою очередь, устанавливали методом внешнего стандарта.

В качестве стандартных образцов использовали галловую кислоту (CAS № 149-91-7) квалификации «хч» и дубовый танин (CAS № 1401-55-4) квалификации «фарм». Стандартный раствор галловой кислоты с концентрацией 100 мг/дм³ готовился растворением навески массой 0,10 г в 1 дм³ бидистиллированной воды. Для получения стандартного раствора гидролизата танина с концентрацией 100 мг/дм³ навеску массой 0,10 г растворяли в 50 см³ 6 М соляной кислоты и кипятили с обратным холодильником в течение 17 ч [15]. Далее гидролизат разбавляли бидистиллированной водой до 1 дм³.

Определение галловой кислоты/танина проводили на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, CIIIA) со спектрофотометрическим детектором при длине волны 280 нм в обращенно-фазовом режиме градиентного элюирования. Использовали хроматографическую колонку Thermo Scientific Accalaim $^{\text{TM}}$ 120 C18 (3 µm; 2,1x150 mm). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1% фосфорная кислота в градиентном соотношении (0 мин – 0% ацетонитрила, 2 мин – 10% ацетонитрила, 7 мин – 40% ацетонитрила) со скоростью потока 0,3 см 3 /мин. Температура термостата колонок 30°C. Аликвоту раствора объемом 20 мм 3 вводили с помощью петлевого дозатора.

Хроматографические характеристики стандартного образца галловой кислоты (танина) составили: время удерживания − 5,410 (5,286) мин, интенсивность − 4997 (4654) мЕОП, площадь пика − 322,07 (295,43) мЕОП·мин. Хроматограммы стандартов галловой кислоты и гидролизованного танина представлены на рисунке 2.

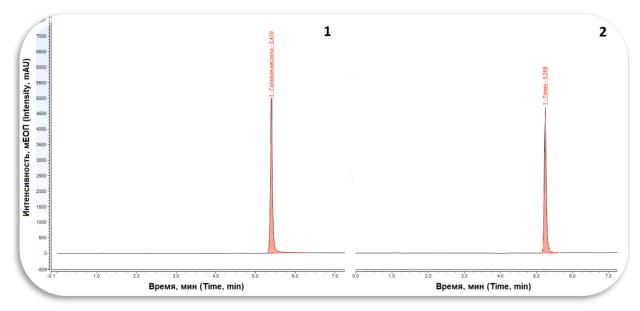


Рисунок 2 — Хроматограммы стандартного образца галловой кислоты (1) и гидролизованного стандартного образца танина (2)

Figure 2. Chromatograms of a standard sample of gallic acid (1) and a hydrolysed standard sample of tannin (2)

Анализ хроматограмм позволяет сделать следующие выводы:

- 1. практически одинаковое время удерживания пиков, их форма и интенсивность указывают на то, что танин гидролизуется до галловой кислоты достаточно качественно;
- 2. отсутствие иных пиков на хроматограмме (2) показывает, что гидролизат танина не содержит мешающих анализу примесей;
- 3. соотношение площадей пиков хроматограмм (1) и (2) показывает, что дубовый танин на 91,7% состоит из остатков галловой кислоты.

Результаты и обсуждение

Для получения достоверных результатов о массопереносе танина предварительно проверяли его наличие в дубовой клепке и табачном сырье. Стружка дубовой клепки и измельченный неферментированный табак в количестве 2,50 г подвергали кислотному гидролизу согласно указанной методике. Хроматограммы гидролизатов представлены на рисунке 3.

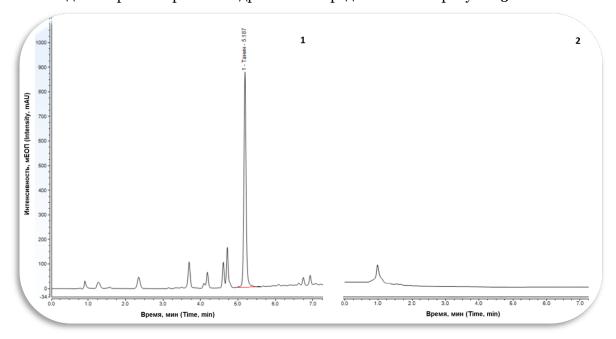


Рисунок 3 – Хроматограммы гидролизатов дуба (1) и табака (2) Figure 3. Chromatograms of oak (1) and tobacco (2) hydrolysates

Площадь пика на хроматограмме (1) составила 60,01 мЕОП·мин, что соответствует массовой доле танина в дубовой клепке равной 0,81%.

Хроматография гидролизата табака (хроматограмма 2) показала полное отсутствие дубового танина в неферментированном табачном сырье. Полученные данные позволили провести анализ ферментированных образцов без каких-либо поправок на изначальное содержание фенольных соединений в табаке.

Анализ образцов ферментированного табачного сырья выявил диффузию танина из дубовой клепки в табачное сырье, динамика которой представлена на рисунке 4.

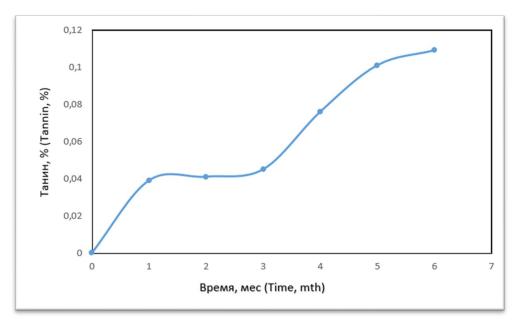


Рисунок 4 – Динамика количественного изменения танина в табаке Figure 4. Dynamics of quantitative changes in tannin in tobacco

Рисунок 4 показывает, что в условиях эксперимента за шесть месяцев ферментации наблюдается диффузия танина из дубовой клепки в табак в количестве 0,11% от массы табака. При этом наиболее интенсивное насыщение происходит в 1-й, 4-й и 5-й месяцы ферментации.

Полученные результаты могут быть интерпретированы следующим образом. В первый месяц ферментации из внешних слоев дубовой клепки в табачное сырье происходит интенсивная диффузия танина до достижения концентрационного равновесия. Далее интенсивность массопереноса танина существенно снижается (2 и 3 месяц) поскольку в этот период происходит диффузия из внутренних слоев дубовой клепки к прилегающим к табаку истощенным внешним слоям. В четвертый и пятый месяцы процесс массопереноса танина из дуба в табак значительно возрастает и к шестому месяцу снова уменьшается, вероятно, по аналогичным причинам.

Заключение

Полученные результаты относятся только к исследуемому сигарному табачному сырью. Массоперенос танина в иное табачное сырье будет зависеть как от его ботанических особенностей (сортотип, почвенно-климатические условия географической зоны выращивания), так и от специфики послеуборочной обработки табака (тип сушки и первичной ферментации, особенности региональной культуры табаководства). Однако общая динамика массопереноса танина в процессе «алкогольной» ферментации должна сохраняться вне зависимости от используемого табачного сырья.

Полученные данные могут быть использованы как в табачной промышленности при производстве сигар, сигарилл, трубочного табака и других нишевых табачных изделий, так и алкогольной индустрии для разработки и вывода на потребительский рынок взаимодополняющих структурных продуктов – табачных изделий в наборе с алкогольным напитком.

Дальнейшие исследования будут продолжены в сфере изучения количественных изменений основных полифенолов табака, таких как хлорогеновая кислота, в процессе «алкогольной» ферментации.

Литература

- 1. *Моисеев И.В., Карманов Д.А., Лезный В.В., Кириллов Д.Д.* Исследование количественного изменения никотина в табачном сырье в процессе естественной ферментации под прессом // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2022. № 4. С. 25–30. DOI: 10.17586/2310-1164-2022-15-4-25-30
- 2. *Карманов Д.А., Моисеев И.В., Лезный В.В.* Ферментационные изменения углеводного комплекса табака // Агропромышленные технологии Центральной России. 2024. № 1. С. 36–42. DOI: 10.24888/2541-7835-2024-31-36-42
- 3. Аксенов П.А. Коровин В.В. Химический состав древесины дуба, используемой для производства коньяка и бренди // Лесной вестник. 2009. № 1. С. 5–15.
- 4. Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И. Танины чая и травяных экстрактов: природа, содержание, активность // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. N^0 4. С. 47–51.
- 5. *Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И., Мезенцева О.А., Булгакова М.А.* Влияние ферментации и изменения кислотности среды на состав и антиоксидантную активность водных экстрактов чая // Химия растительного сырья. 2014. № 2. С. 169–175. DOI: 10.14258/jcprm.1402169
- 6. *Струсовская О.Г.* Определение веществ полифенольной структуры в некоторых растениях Соловецкого архипелага // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2012. № 16. С. 128–131.
- 7. *Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В.* Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина–Дениса и реактивом Фолина–Чокальтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 291–299. DOI: 10.14258/jcprm.2021028250
- 8. *Аль-Ясари А.Х., Баракова Н.В., Басковцева А.С., Гунькова П.И., Фан Тхи Хонг Л., Оганесянц Ф.А.* Влияние экстракта зеленого чая на процесс молочнокислого брожения и органолептические показатели ферментированного напитка на основе яблочного сока // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2023. № 4. С. 29–40. DOI: 10.17586/2310-1164-2023-16-4-29-40
- 9. Guillarme D., Casetta C., Bicchi C., Veuthey J.-L. High throughput qualitative analysis polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *Journal of Chromatography A*. 2010, V. 1217, Is. 44, pp. 6882–6890. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.08.060
- 10. Farres-Cebrian M., Sero R., Saurina J., Nunez O. HPLC-UV polyphenolic profiles in the classification of olive oils and other vegetables oils via principal component analysis. *Separations*. 2016, V. 3, Is. 4, article 33. DOI: 10.3390/separations3040033
- 11. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Веденин А.Н., Василевич Н.И. Метод ВЭЖХ для определения природных полифенолов-антиоксидантов // Лаборатория и производство. 2021. № 2. С. 66—76. DOI: 10.32757/2619-0923.2021.2.17.66.76
- 12. Shahrzad S., Bitsch I. Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998, V. 705, Is. 1, pp. 87–95. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00487-8
- 13. *Лубсандоржиева П.Б., Болданова Н.Б., Попов Д.В.* Определение галловой кислоты в многокомпонентных растительных средствах методом ВЭЖХ // Химия растительного сырья. 2013. № 3. С. 173–176. DOI: 10.14258/jcprm.1303173
- 14. Темердашев З.А., Киселева Н.В., Верниковская Н.А., Коробков В.А., Милевская В.В. Сорбционно-хроматографическое определение галловой, кофейной кислот, рутина и эпикатехина в лекарственных растениях // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17, № 2. С. 211–218.
- 15. *Моисеев И.В., Карманов Д.А., Лезный В.В.* Количественные изменения органических карбоновых кислот в табачном сырье в процессе ферментации // Пищевая промышленность. 2023. № 11. С. 18–21. DOI: 10.52653/PPI.2023.11.11.004

References

- 1. Moiseev I.V., Karmanov D.A., Leznyy V.V., Kirillov D.D. Quantitative change of nicotine in tobacco raw materials during natural fermentation under pressure. *Processes and Food Production Equipment*. 2022, no. 4, pp. 25–30. DOI: 10.17586/2310-1164-2022-15-4-25-30. (*In Russian*)
- 2. Karmanov D.A., Moiseev I.V., Leznyy V.V. Fermentation changes in the carbohydrate complex of tobacco. *Agro-Industrial Technologies of Central Russia*. 2024, no. 1, pp. 36–42. DOI: 10.24888/2541-7835-2024-31-36-42. (*In Russian*)
- 3. Aksenov P.A., Korovin V.V. Chemical compound of wood of an oak used for manufacture of cognac and brandy. *Forestry Bulletin.* 2009, no. 1, pp. 5–15. (*In Russian*)
- 4. Ryabinina E.I., Zotova E.E., Ponomareva N.I. The tannins in tea and herbal extracts: the nature, content and activity. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2014, no. 4, pp. 47–51. (*In Russian*)

- 5. Ryabinina E.I., Zotova E.E., Ponomareva N.I., Mezentseva O.A., Bulgakova M.A. The influence of fermentation and change in acidity of medium on the composition and antioxidant activity of aqueous extracts of tea. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2014, no. 2, pp. 169–175. DOI: 10.14258/jcprm.1402169. (*In Russian*)
- 6. Strusovskaya O.G. Determination of polyphenolic compounds in some plants of Solovetsky archipelago. Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya. 2012, no. 16, pp. 128–131. (*In Russian*)
- 7. Nikolaeva T.N., Lapshin P.V., Zagoskina N.V. Method for determining the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin–Denis reagents and Folin–Chocalteu reagents: modification and comparison. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2021, no. 2, pp. 291–299. DOI: 10.14258/jcprm.2021028250. (*In Russian*)
- 8. Al-Yasari A.H., Barakova N.V., Baskovtceva A.S., Gunkova P.I., Phan Thi Hong L., Hovhannisyan P.A. Influence of green tea extract on the lactic acid fermentation process and organoleptic characteristics of fermented beverage based on apple juice. *Processes and Food Production Equipment*. 2023, no. 4, pp. 29–40. DOI: 10.17586/2310-1164-2023-16-4-29-40. (*In Russian*)
- 9. Guillarme D., Casetta C., Bicchi C., Veuthey J.-L. High throughput qualitative analysis polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *Journal of Chromatography A*. 2010, V. 1217, Is. 44, pp. 6882–6890. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.08.060
- 10. Farres-Cebrian M., Sero R., Saurina J., Nunez O. HPLC-UV polyphenolic profiles in the classification of olive oils and other vegetables oils via principal component analysis. *Separations*. 2016, V. 3, Is. 4, article 33. DOI: 10.3390/separations3040033
- 11. Yashin A.Ya., Yashin Ya.I., Vedenin A.N., Vasilevich N.I. HPLC method for determination of natural antioxidant poliphenols. *Laboratoriya i Proizvodstvo*. 2021, no. 2, pp. 66–76. DOI: 10.32757/2619-0923.2021.2.17.66.76 (*In Russian*)
- 12. Shahrzad S., Bitsch I. Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998, V. 705, Is. 1, pp. 87–95. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00487-8
- 13. Lubsandorzhieva P.B., Boldanova N.B., Popov D.V. Determination of gallic acid in multicomponent preparations by HPLC method. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2013, no. 3, pp. 173–176. DOI: 10.14258/jcprm.1303173. (*In Russian*)
- 14. Temerdashev Z.A., Kiseleva N.V., Vernikovskaya N.A., Korobkov V.A., Milevskaya V.V. Sorption-chromatographic determination of gallic, caffeic acids, rutin and (-)-epicatechin in herbs. *Analytics and Control*. 2013, V. 17, no. 2, pp. 211–218. (*In Russian*)
- 15. Moiseev I.V., Karmanov D.A., Leznyy V.V. Quantitative changes of carboxylic acids in tobacco raw materials during fermentation. *Food Industry*. 2023, no. 11, pp. 18–21. DOI: 10.52653/PPI.2023.11.11.004. (*In Russian*)

Информация об авторах

Игорь Викторович Моисеев – д-р техн. наук, президент компании Денис Александрович Карманов – руководитель научно-технической лаборатории Валерий Владимирович Лёзный – заместитель генерального директора по технологии Дмитрий Владленович Бондаренко – председатель совета директоров Григорий Петрович Синчин – заместитель директора

Information about the authors

Igor V. Moiseev, D. Sci. (Eng.), President of the company Denis A. Karmanov, Head of the Scientific and Analytical Laboratory Valerii V. Leznyy, Deputy General Director for Technology Dmitriy V. Bondarenko, Chairman of the Board of Directors Gregoriy P. Sinchin, Deputy Director

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests

Статья поступила в редакцию 18.04.2024 Одобрена после рецензирования 22.05.2024 Принята к публикации 27.05.2024 The article was submitted 18.04.2024 Approved after reviewing 22.05.2024 Accepted for publication 27.05.2024