იაკობ გოგებაშვილის სახელობის თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ლალი ელანიძე

ყურძნისეული წარმოშობის ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI“ ტექნოლოგია

05.18.07 - ალკოჰოლიანი და უალკოჰოლო პროდუქტების წარმოების ტექნოლოგია

სასურსათო ტექნოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის

მ ა ც ნ ე

თელავი, 2013

ნაშრომი შესრულებულია იაკობ გოგებაშვილის სახელობის თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტსა და საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის მევენახეობის, მეღვინეობის და მებაღეობის ინსტიტუტში

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: - მარინე ბეჟუაშვილი
ტექნიკურ მეცნიერებათა დოქტორი

ოფიციალური შემფასებლები - რამაზ გახოკიძე
ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი
- მარიამ ხოსიტაშვილი
ტექნიკურ მეცნიერებათა დოქტორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2013 წლის 25.06. 12 საათზე საქართველოს იაკობ გოგებაშვილის სახელობის თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტში სადისერტაციო საბჭოს სხდომაზე, ქ. თელავი, უნივერსიტეტის ქუჩა № 1

მაცნე დაიგზავნა 24.05.2013

სადისერტაციო საბჭოს
სწავლული მდივანი,
ქიმიის მეც. კანდიდატი --------------------------- მზია ღაღოლიშვილი

სადისერტაციო ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა. მეცნიერულმა კვლევებმა ცხადყო, რომ ბოლო წლების განმავლობაში შეინიშნება დედამიწის მოსახლეობის ჯანმრთელობის მდგომარეობის გაუარესება. ამ პრობლემას უკავშირებენ რიგ ფაქტორებს: ადამიანის ორგანიზმის სასიცოცხლოდ აუცილებელი ნივთიერებების დეფიციტი, ეკოლოგიური პრობლემა, კვების პროდუქტების მოდერნიზაცია, ნუტრიენტების დეფიციტი, სტრესი და სხვა. ამ ყველაფერს ემატება ის, რომ ქიმიკატების ინტენსიურმა გამოყენებამ, ნიადაგის გამოფიტვამ და გენურმა ინჟინერიამ მკვეთრად შეამცირა მცენარეებში მიკრონუტრიენტების რაოდენობა და თითქმის უკვე 100 წელია ადამიანები იბადებიან ამ ნივთიერებების მუდმივი და მყარი დეფიციტით. საჭიროა აღინიშნოს, რომ თანამედროვე ცხოვრების რიტმმა მნიშვნელოვნად შეცვალა ადამიანის კვების სტრუქტურა, გაიზარდა მაკრონუტრიენტების (ცხიმების, ქოლესტერინის, ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავების, მარტივი შაქრების), რაფინირებული საკვები პროდუქტების მოხმარების წილი და შემცირდა სასარგებლო მიკრონუტრიენტების (საკვები ბოჭკოები, ვიტამინები, მიკროელემენტები, უჯერი ცხიმოვანი მჟავები და სხვ.) რაოდენობა კვების რაციონში.

ადამიანის ორგანიზმში, თითოეული უჯრედი ყოველდღე საჭიროებს 600-დან 650-მდე სხვადასხვა სახის საკვებ ნივთიერებებს- ნუტრიენტებს, რომელთა უმრავლესობა შეუცვლელია და ადამიანის ორგანიზმში სინთეზირებას არ განიცდის. ადამიანის კვების რაციონში აუცილებელია შედიოდეს დაახლოებით 32 სახეობის სხვადასხვა საკვები პროდუქტი, 15-ზე მეტი ვიტამინი და 20-ზე მეტი მიკროელემენტი, რომლის გარეშეც ადამიანის ორგანიზმს არ შეუძლია არსებობა.

ამ პრობლემის გადასაჭრელად საუკეთესო გამოსავალი აღმოჩნდა 1927 წელს შექმნილი ნატურალური ინგრედიენტებისგან დაბალანსებული პროდუქტი, რომელმაც ოფიციალურად დაიმკვიდრა ტერმინი „ბიოლოგიურად აქტიური დანამატი" (ინგ.food supplements), შემდგომში ბად-ი.

თანამედროვე პირობებში ადამიანის ჯანმრთელობა 10%-ით დამოკიდებულია მემკვიდრეობაზე, 15%-სამედიცინო ჩარევაზე, ხოლო 70%-ეკოლოგიურ ფაქტორებზე, კვებაზე და ცხოვრების წესზე. შექმნილ სიტუაციაში მსოფლიოს წამყვანი მეცნიერები, პრობლემის გადაჭრის ეფექტურ გზად მიიჩნევენ სწორედ ბადე-ბის ფართოდ დანერგვას, რომელსაც სრულად შეუძლია დააკმაყოფილოს ადამიანის ორგანიზმის მოთხოვნა შეუცვლელი ნივთიერებებით.

ბად-ების გამოყენება, რომელთა მნიშვნელობა უდაოდ დიდია, განაპირობებს: 1. ადამიანისთვის აუცილებელი საკვები ნივთიერებების დეფიციტის სწრაფ ლიკვიდაციას; 2. საკვების მაქსიმალურად მორგებას თითოეულ ინდივიდზე; 3. ზრდის ორგანიზმის გამძლეობას არახელსაყრელი პირობების მომართ ორგანიზმის უჯრედების ფერმენტული დაცვის ხარჯზე;

4. აძლიერებს და აჩქარებს არასასურველი ნივთიერებების შებოჭვას და ორგანიზმიდან გამოდევნას.

ყოველთვის უნდა გვახსოვდეს, რომ ბად-ი არ არის წამალი! იგი განეკუთვნება საკვებ პროდუქტებს, რომელიც გამოირჩევა განსაკუთრებული ბიოლოგიური აქტივობით. იგი შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს: 1. კვების კორექციისთვის; 2. დაავადების პროფილაქტიკისთვის; 3. დაავადების სამკურნალოდ.

ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, ახალი, მეცნიერულად დასაბუთებული, ბიოლოგიურად აქტიური დანამატების ტექნოლოგიების შემუშავება წარმოადგენს კვლევის აქტუალურ მიმართულებას.

კვლევის მიზანი. კვლევის მიზანს წარმოადგენდა, ყურძნისეული წარმოშობის ბუნებრივი, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებით მდიდარი, მეცნიერულად დასაბუთებული ბად-ის დამზადების ტექნოლოგიის შემუშავება. ახალი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების იდენტიფიკაცია.

კვლევის ამოცანები.

- საფერავის ყურძნის წვენისგან დამზადებული კონცენტრირებული ტკბილის გამოკვლევა და გამოყენება;
- საფერავის კლერტის, როგორც ყურძნის გადამუშავების ნარჩენის გამოყენება და მასში ახალი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ძიება;
- ვაზის ანასხლავის, როგორც ნარჩენის გამოკვლევა და მისგან ბუნებრივი, სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატის დამზადება;
- საქართველოში გავრცელებული ბეგქონდარას (Thymus serpyllum) არომატწარმომქმნელი კომპონენტების გამოკვლევა და გამოყენება;
- ყურძნისეული წარმოშობის ბიოლოგიურად აქტიური უალკოჰოლო კვებითი დანამატის დამზადების ტექნოლოგიის შემუშავება.

მეცნიერული სიახლე.

- საფერავის ყურძნის წვენში პირველად იდენტიფიცირდა ბიოლოგიურად აქტიური სტილბენოიდური გლუკოზიდები: ტრანს-რეზვერატროლის გლუკოზიდი ტრანს-პიცეიდი (4'5 დიჰიდროქსისტილბენ-3-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი) (პოლიდატინი) და ამასთანავე დაფიქსირდა ε-ვინიფერინის გლუკოზიდის არსებობა;
- საფერავის ყურძნის კლერტიდან იდენტიფიცირებულია ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერება აცეტოვანილონი (პონიცინი) და განსაზღვრულია მისი ბიოლოგიური აქტივობა;
- ბეგქონდარას (Thymus serpyllum) წყალ-სპირტიანი ექსტრაქტიდან იდენტიფიცირებულია: ბიოლოგიურად აქტიური იზოფლავონი - ფორმონონეტინი და ცინაროზიდი (ლუთეოლინის გლუკოპირანოზიდი); განსაზღვრულია მათი ანტიოქსიდანტური აქტივობა;

- ვაზის ერთწლიანი ყლორტიდან მიღებული ბუნებრივი სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატი, სტილბენებთან ერთად შეიცავს ლიგნანს - α-კონიდენდრინს;
- დადგინდა იდენტიფიცირებული ნივთიერებების და ბად-ის ანტიოქსიდანტური აქტივობა მისი ფენოლური ნაერთების შემცველობასთან დამოკიდებულებით.
-

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა.

- შემუშავებულია ყურძნისეული წარმოშობის, ფენოლური ნაერთებით მდიდარი, ბიოლოგიურად აქტიური უალკოჰოლო კვებითი დანამატის (**ბად**) - ის დამზადების ტექნოლოგია.
- დამზადებული **ბად**-ი ფენოლურ ნაერთებს შორის შეიცავს ბიოლოგიურად აქტიურ ტრანს - რეზვერატროლს, ტრანს-პიცეიდს, ε-ვინიფერინს, პონიცინს, α-კონიდენდრინს, ფორმონონეტინს, ცინაროზიდს და სხვ.
- **ბად**-ი წარმოადგენს ანტიოქსიდანტური აქტივობის მატარებელ ფუნქციური დანიშნულების პროდუქტს, რომელიც მიზანშეწონილია სამკურნალო-პროფილაქტიკური გამოყენებისათვის;
- შედგენილია **ბად**-ის „Georgian Vitae rimas XXI" დამზადების ტექნოლოგიური პროცესის სრული ალგორითმი.

აპრობაცია. სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი შედეგები მოხსენებული და განხილულია 2010-2013 წწ, იაკობ გოგებაშვილის სახელობის თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტის აგრარულ მეცნიერებათა ფაკულტეტის სამეცნიერო საბჭოს სხდომებზე.

პუბლიკაცია. სადისერტაციო ნაშრომის ირგვლივ გამოქვეყნებულია 8 სამეცნიერო ნაშრომი, მათ შორის - 1 საერთაშორისო კონფერენციის და 1 თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტის სამეცნიერო კონფერენციის თეზისების სახით; სიახლე დადასტურებულია გამოგონების პატენტით.

სადისერტაციო ნაშრომის სტრუქტურა და მოცულობა. სადისერტაციო ნაშრომი შეიცავს: სადისერტაციო ნაშრომის ზოგად დახასიათებას, ლიტერატურის მიმოხილვას, ექსპერიმენტულ ნაწილს, ტექნოლოგიური პროცესის ალგორითმს, მოსალოდნელ ეკონომიკურ ეფექტს, დასკვნებს, გამოყენებული ლიტერატურის სიას, ტრანსკრიფციას, აბრევიატურების განმარტებას და სადისერტაციო ნაშრომის ირგვლივ გამოქვეყნებული სამეცნიერო შრომების ჩამონათვალს. ნაშრომი განთავსებულია 143 გვერდზე, შეიცავს 10 ცხრილს, 49 ნახაზს, 5 სქემას და 4 სურათს.

II. ექსპერიმენტული ნაწილი

II.1. კვლევის ობიექტები და მეთოდები

ობიექტები. კვლევის ობიექტებად გამოყენებული გვქონდა:

1. საფერავის ყურძნის კონცენტრირებული ტკბილი, რომელიც დამზადებული იყო საწარმოო პირობებში - სამსაფეხურიანი

პირდაპირნაკადული ამაორთქლებელი „EC- 316/3“. („Dellata tofola“, „Fenko“). შ.პ.ს. „გრუზვინპრომი“, ქ. გურჯაანი).

2. საფერავის ყურძნის კლერტისგან დამზადებული წყალ-სპირტიანი ნაყენი. საფერავის ჯიშის ყურძენი აღებული გვქონდა ტექნიკური სიმწიფის პერიოდში 2010-2012 წწ მოსავლიდან მისი ადგილგავრცელების მიხედვით, კერძოდ, ახაშნის (ფაფრის ველი), კარდენახის (ახოები), ქინძმარაულის, წინანდლის და ნაფარეულის ვენახებიდან. საფერავის კლერტის, როგორც ყურძნის გადამუშავების ნარჩენის, წყალ-სპირტიან ნაყენს ვამზადებდით ჰაერზე მშრალი და დაქუცმაცებული ნედლეულისგან წყლიანი ეთანოლით გამოწვლილვის საფუძველზე.

3. ბუნებრივი სტილბენოიდებშემცველი ფენოლური კონცენტრატი. მის დასამზადებლად გამოყენებული გვქონდა ვაზის ერთწლიანი ყლორტი (ანასხლავი). სტილბენოიდების გამოწვლილვის მიზნით ანასხლავს ვაქუცმაცებდით, ვაშრობდით ჰაერზე და ვატარებდით ეთანოლით ექსტრაქციას ცხელ პირობებში. ექსტრაქტის სპეციალური სქემით დამუშავების შედეგად მივიღეთ სტილბენოიდებშემცველი ფენოლური კონცენტრატი, რომელიც გამოვიყენეთ ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის დასამზადებლად.

4. არომატიზატორის დასამზადებლად გამოვიყენეთ აღმოსავლეთ საქართველოში, კერძოდ, თუშეთის დაცულ ტერიტორიებში მოზარდი ბეგქონდარას (THYMUS SERPYLLUM) მიწის ზედა ნაწილების წყალ-სპირტიანი ნაყენი. ნაყენს ვამზადებდით ჰაერზე გამშრალი და დაქუცმაცებული ობიექტიდან ექსტრაქციით წყლიანი ეთანოლის საშუალებით.

5. ჩვენს მიერ შემუშავებული ახალი ტექნოლოგიით დამზადებული ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატი „Georgian Vitae rimas XXI“, რომელიც გამოვიკვლიეთ ორგანოლეპტიკური და ქიმიური მაჩვენებლების მიხედვით, მათ შორის ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების შემცველობაზე.

მეთოდები:

1) მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდი. ჩვენს მიერ იდენტიფიცირებული სტილბენოიდების და სხვ. ფენოლური ნაერთების - აცეტოვანილონის (პონიცინის), α-კონიდენდრინის, ფორმონონეტინის და ცინაროზიდის განსაზღვრას ვატარებდით მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით ნაერთთა ჯგუფებისთვის შესაბამის პირობებში.

ა) სტილბენოიდებისთვის: ქრომატოგრაფი - ”Varian”, სვეტი - Mikrosorb 100 C18, 250X4,6 LXId(მმ); ელუენტი A: 0,025% ტრიფტორძმარმჟავა; ელუენტი B: აცეტონიტრილი (ACN)/A, 80/20. განსაზღვრა ჩატარდა გრადიენტის რეჟიმში: 0-35 wT 20-50%; B35-40 wT 50-100%; 41-46 წთ 100%; 46-48 წთ 100-20%; 48-53 წთ 20%. ტალღის სიგრძე 306 ნმ. ელუენტის მიწოდების სიჩქარე 1 მლ/წთ (გიბელია და სხვ., 2006).

სტილბენოიდების თვისებრივი ანალიზი ჩავატარეთ თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიის მეთოდით სილიკაგელის ფირფიტაზე (Sorbfil, ПТСХ- П-А 10x20), სისტემად გამოვიყენეთ ორგანულ გამხსნელთა ნარევი - ქლოროფორმი : მეთანოლი (80:20) და ქრომატოგრამები გავამჟღავნეთ დიაზოტირებული სულფანილის მჟავით.

ბ) აცეტოვანილონის (პონიცინის), α-კონიდენდრინის, ფორმონონეტინის და ცინაროზიდის განსაზღვრა ჩავატარეთ სითხური ქრომატოგრაფზე “Varian. Prostar”, შემდეგ პირობებში: სვეტი- Supercosil LC-18-DB. 25 smx4,6mm, 5μm. ელუენტი A-0,5%-იანი H_3PO_4 -ის წყალხსნარი; ელუენტი B-50%-იანი აცეტონიტრილი; 0,5%-იანი H_3PO_4; 49,5%-H_2O. ელუენტის მიწოდების სიჩქარე 1მლ/წთ. დეტექტორი - ულტრაიისფერი. თითოეული ნივთიერების რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის ქრომატოგრაფირება ჩატარდა სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე: აცეტოვანილონის - 269 ნმ-ზე, α-კონიდენდრინის - 206 ნმ-ზე, ფორმონონეტინის - 201 ნმ-ზე, ხოლო ცინაროზიდის - 207 ნმ-ზე.

აღნიშნული ნივთიერებები ინდივიდუალური სახით აღებული გვქონდა შესაბამისი კვლევითი ინსტიტუტებიდან: აცეტოვანილონი (პონიცინი) და α-კონიდენდრინი - ლატვიის მეცნიერებათა აკადემიის მერქნის ქიმიის ინსტიტუტიდან (ქ. რიგა); ფორმონონეტინი და ცინაროზიდი - უზბეკეთის მეცნიერებათა აკადემიის მცენარეული ნივთიერებების ქიმიის ინსტიტუტიდან (ქ. ტაშკენტი). აღნიშნული ინდივიდუალური ნივთიერებები გამოვიყენეთ მოწმეების სახით. საკვლევი ობიექტებიდან აღნიშნული ნივთიერებების იდენტიფიკაციის მიზნით მათი ინდივიდუალური სახით გამოყოფა მოვახდინეთ პრეპარატულად, სილიკაგელის გამოყენებით.

კვლევის ობიექტებიდან ინდივიდუალური ნივთიერებების იდენტიფიკაცია ჩავატარეთ ულტრაიისფერი, ინფრაწითელი სპექტრების და ლღობის ტემპერატურის საფუძველზე, შესაბამის მოწმეებთან შედარებით და ასევე გავითვალისწინეთ ქრომატოგრაფიული მაჩვენებლები: ქრომატოგრაფიული ლაქის Rf და გამჟღავნების შემდეგ ლაქის შეფერილობა. ლღობის ტემპერატურა განვსაზღვრეთ ხელსაწყოზე „MEL TEMP 3“. ულტრაიისფერი სპექტრი გადავიღეთ სპექტრომეტრზე „VARIAN “, CARRY 100, ხოლო ინფრაწითელი - „THERMO NICOLET “, AVATAR 370.

ულტრაიისფერ უბანში 200 – 300 ნმ ინტერვალში ინდივიდუალური ნივთიერებების რაოდენობრივი სპექტროფოტომეტრული განსაზღვრები, ასევე მათი საკალიბრო გრაფიკების ასაგებად საჭირო ოპტიკური სიმკვრივეების დადგენა მოვახდინეთ სპექტროფოტომეტრზე „GENESYS 10uv”. რაც შეეხება სპექტროფოტომეტრულ განსაზღვრებს 300ნმ ტალღის სიგრძის ზემოთ, ვატარებდით სპექტროფოტომეტრზე „UNICO".

2) **გაზური ქრომატოგრაფიის მეთოდი.** ზეგქონდარას არომატულ ნაყენში არომატწარმომქმნელი კომპონენტების განსაზღვრის მიზნით უპირველეს ყოვლისა ნაყენიდან გამოვყავით პენტან-ეთერიანი ფრაქცია. ნაყენი სრულად გამოვწვლილეთ პენტან-დიეთილეთერის ნარევით (2 : 1). პენტან-ეთერიანი

ფრაქცია დავამუშავეთ თანმიმდევრობით ჯერ წყლით, შემდეგ $NaHCO_3$-ის 2%-იანი ხსნარით. დამუშავებულ ფრაქციას გაუწყლოების მიზნით დავამატეთ უწყლო Na_2SO_4 და დავაყოვნეთ. შემდეგ გავფილტრეთ 17-18^{0}C ტემპერატურაზე და მსუბუქად, იგივე ტრმპერატურაზე ავაორთქლეთ სპეციალურ მინის ჭურჭელში და დაკონცენტრირებული ფრაქცია გავაანალიზეთ გაზური ქრომატოგრაფიის მეთოდით შემდეგ პირობებში: ქრომატოგრაფირებას ვატარებდით ქრომატოგრაფზე "Perkin Elmer. Clarus 500"; სვეტი კაპილარული - "Supelcowax 10"; 60მ x 0,25მმ. გაზმატარებელი - აზოტი. სიჩქარე 1 მლ/წთ.

3) **კატექინების განსაზღვრა.** კატექინების განსაზღვრა ჩავატარეთ ობიექტებიდან წინასწარ გამოწვლილული ეთილაცეტატიანი ფრაქციების გამოყენებით თვისებრივად და რაოდენობრივად. თვისებრივი ანალიზისთვის გამოვიყენეთ ქაღალდის ქრომატოგრაფიის მეთოდი სისტემაში n-ბუთანოლი: ძმარმჟავა : წყალი (4 : 1 :2). ქრომატოგრამებს ვამჟღავნებდით ვანილინის რეაქტივით. რაოდენობრივად კატექინები განვსაზღვრეთ სპექტროფოტომეტრული მეთოდით 500ნმ ტალღის სიგრძეზე. აქვე უნდა აღვნიშნოთ,რომ როგორც კატექინები, ასევე პოლიმერული პროანტოციანიდინები, განისაზღვრა ეთილაცეტატიანი ფრაქციებიდან.

4) **ფენოლმჟავების განსაზღვრა.** ფენოლმჟავების განსაზღვრის მიზნით კლერტის წყალ-სპირტიან ექსტრაქტს მოვაცილეთ სპირტი, შევატუტიანეთ, დავაკონცენტრირეთ მადუღარი წყლის აბაზანაზე, შემდეგ დაკონცენტრირებული მასა კვლავ შევამჟავეთ, გამოვწვლილეთ დიეთილეთერით და ეთერიანი ფრაქცია გავაანალიზეთ თვისებრივად თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიის მეთოდით (Sorbfil, ПТСХ- П-А 10x20). სისტემად გამოვიყენეთ ორგანულ გამხსნელთა ნარევი - ქლოროფორმი : მეთანოლი (90 : 10) და ქრომატოგრამები გავამჟღავნეთ დიაზოტირებული სულფანილის მჟავით.

5) **შაქრების თვისებრივი ანალიზი.** მჟავური ჰიდროლიზის შედეგად წარმოქმნილი შაქრების თვისებრივი ანალიზი ჩავატარეთ ქაღალდის ქრომატოგრაფიის მეთოდით. სისტემად გამოვივენეთ გამხსნელთა ნარევი: ბუთანოლი - ეთილაცეტატი - პროპანოლი - ძმარმჟავა - წყალი (35 : 100 : 62 : 35 : 30). ქრომატოგრამა გავამჟღავნეთ ამონიუმის ქლორიდის და ამონიუმის მოლიბდატის შემჟავებული ნარევით (შკოლნიკი და სხვ., 1960).

6) **ანტირადიკალური აქტივობის განსაზღვრა.** ჩვენს მიერ იდენტიფიცირებული ფენოლური ნივთიერებების და ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის ანტირადიკალური აქტივობა განვსაზღვრეთ ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსული (ეპმრ) მეთოდის გამოყენებით (გარდნერi, 1998).

7) **ელემენტების განსაზღვრა.** მაკროელემენტები - K, Na, Ca, Mg, და ასევე რკინის შემცველობა განისაზღვრა ატომურ-აბსორბციულ სპექტრომეტრზე.

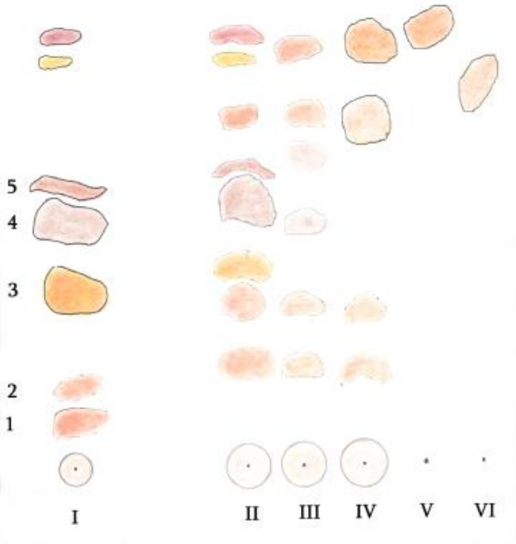
მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიით და გაზური ქრომატოგრაფიით ანალიზები ჩატარდა მევენახეობის, მეღვინეობის და მებაღეობის ინსტიტუტის ცენტრალურ ლაბორატორიაში. ანტირადიკალური აქტივობანი დადგინდა ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტში. ნივთიერებების ულტრაიისფერი, ინფრაწითელი სპექტრების გადაღება, ლღობის ტემპერატურის განსაზღვრა ჩატარდა ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის სამედიცინო პოლიმერული მასალების ინსტიტუტში.

II. 2. ბიოლოგიურად აქტიური სტილბენოიდური გლიკოზიდების გამოკვლევა საფერავის ყურძნის წვენში

იმ ფაქტის გათვალისწინებით, რომ საფერავის ყურძნის წვენი წარმოადგენს ჩვენს მიერ შემუშავებული ტექნოლოგიით დამზადებული ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის ერთ-ერთ ძირითად ინგრედიენტს, ჩავატარეთ ექსპერიმენტი საფერავის ყურძნის წვენში სტილბენოიდური გლიკოზიდების იდენტიფიკაციის მიზნით.

ამისთვის გამოვიყენეთ საფერავის ყურძნის წვენის 2011 წლის მოსავლის რამდენიმე ვარიანტი: ა) ნატურალური ყურძნის წვენი; ბ) იგივე წვენი დაკონცენტრირებული; გ)იგივე წვენის მჟავური ჰიდროლიზატი, დ) წარმოებაში დამზადებული საფერავის ვაკუუმ-ტკბილი. ყურძნის წვენი გამოვწურეთ მექანიკურად, დავწმინდეთ და გამოვწვლილეთ ეთილაცეტატით სამჯერადად ოთახის ტემპერატურაზე. ეთილაცეტატიანი ფრაქციები გავაერთიანეთ და დავაკონცენტრირეთ როტაციულ გადამდენზე 40^0C ტემპერატურაზე. იგივე ყურძნის წვენი ვადუღეთ და დავაკონცენტრირეთ ისე, რომ მოცულობა შემცირდა 3-ჯერ (300 მლ-დან მივიღეთ 100მლ კონცენტრირებული წვენი). მიღებული კონცენტრირებული წვენი გამოვწვლილეთ ეთილაცეტატით. ზემოაღნიშნული პირობების ანალოგიურად, მჟავური ჰიდროლიზატის მისაღებად ავიღეთ იგივე საწყისი ყურძნის წვენი, დავამატეთ კონცენტრირებული HCl, ისე რომ სარეაქციო არეში მჟავის კონცენტრაციამ შეადგინა 10% და ჰიდროლიზი ჩავატარეთ 80^0C ტემპერატურაზე 3 საათის განმავლობაში. პარალელურად, იგივე კონცენტრაციის მჟავით, მჟავური ჰიდროლიზი ჩავატარეთ დუღილის პირობებში. მჟავური ჰიდროლიზატი გავანეიტრალეთ და გამოვწვლილეთ ეთილაცეტატით, დავაკონცენტრირეთ როტაციულ გადამდენზე და გავაანალიზეთ.

მიღებული ყურძნის წვენის ეთილაცეტატიანი ფრაქციები და სტილბენები თვისებრივად გავაანალიზეთ თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიის მეთოდით (Sorbfil, ПТСХ- П-А 10x20; სისტემა - ქლოროფორმი: მეთანოლი, 80:20). ქრომატოგრამები გავამჟღავნეთ დიაზოტირებული სულფანილის მჟავით (ნახ.II.2.1.).



ნახ. II.2.1. საფერავის ყურძნის წვენის ეთილაცეტატიანი ფრაქციების თხელფენოვანი ქრომატოგრამა. სისტემა ქლოროფორმი: მეთანოლი (80:20).
I. ყურძნის წვენი;
II. ყურძნის ტკბილი;
III. ყურძნის დაკონცენტრირებული წვენი;
IV. ყურძნის წვენის მჟავური ჰიდროლიზატი;
V. ტრანს რეზვერატროლი;
VI. ε-ვინიფერინი.
4. არაიდენტიფიცირებული

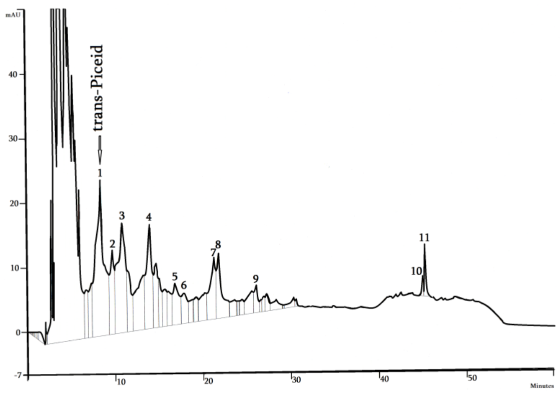
როგორც სითხური ქრომატოგრაფიით ჩანს, მჟავური ჰიდროლიზის შედეგად წარმოიქმნება ახალი ნივთიერებები, რომლებიც წვენში არ არის, წვენის დუღილისას ჩნდებიან მცირე რაოდენობით (პიკი №5, RT-16,757წთ; პიკი №9, RT-26,080 წთ), ხოლო მჟავური ჰიდროლიზისას მათი რაოდენობა შესამჩნევად იზრდება (პიკი №7,RT-16,86 წთ; პიკი№12, RT-26,128 წთ) (ნახ.II.2.2ა,ბ).

ცხრ. II.2.1

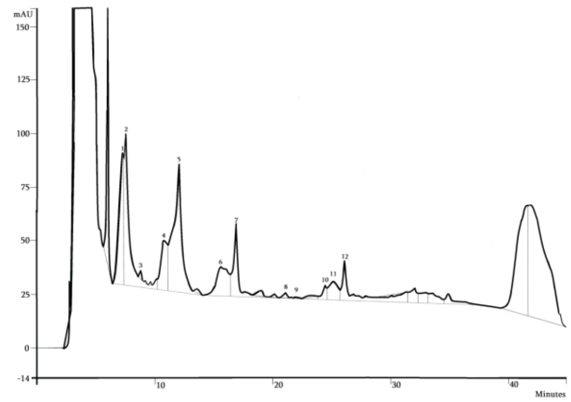
საძიებელი ნივთიერებების ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები

ნივთიერება, N	Rf	ლაქის შეფერვა	გამამჟღავნებელი	სისტემა
1	0.093	მოყავისფერო-ნარინჯისფერი	დიაზოტირებული სულფანილის მჟავა	ქლოროფორმი: მეთანოლი (80:20)
2	0.187	მოყავისფერო-ნარინჯისფერი	დიაზოტირებული სულფანილის მჟავა	ქლოროფორმი: მეთანოლი (80:20)
3	0.26	ყვითელი	დიაზოტირებული სულფანილის მჟავა	ქლოროფორმი: მეთანოლი (80:20)
4	0.39	მოყავისფერო-ნარინჯისფერი	დიაზოტირებული სულფანილის მჟავა	ქლოროფორმი: მეთანოლი (80:20)
5	0.51	ბორდოსფერი	დიაზოტირებული სულფანილის მჟავა	ქლოროფორმი: მეთანოლი (80:20)

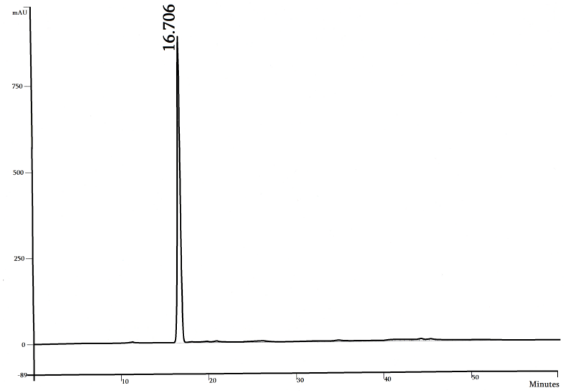
მჟავური ჰიდროლიზის შედეგად წარმოქმნილი ინდივიდუალური ნივთიერებები თავიანთი Rf-ით, ულტრაიისფერ უბანში ნათებით და ულტრაიისფერ სპექტრში შთანთქმის მაქსიმუმით, მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიით, იდენტიფიცირდება როგორც ტრანს-რეზვერატროლი და ε-ვინიფერინი (ნახ.II.2.2.გ,დ)



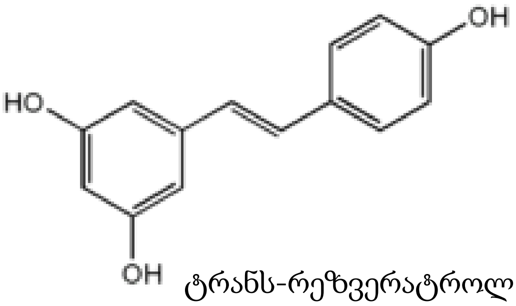
ა



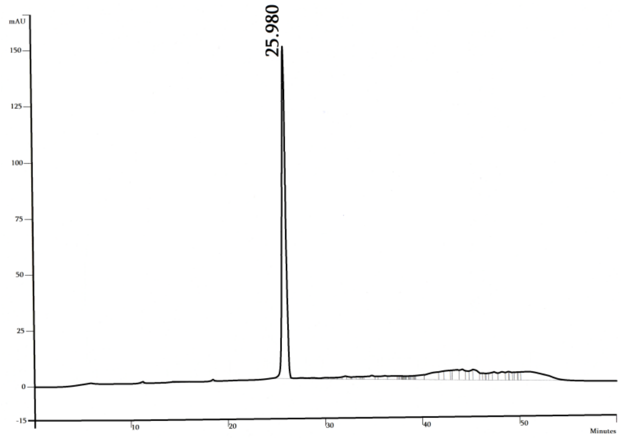
ბ



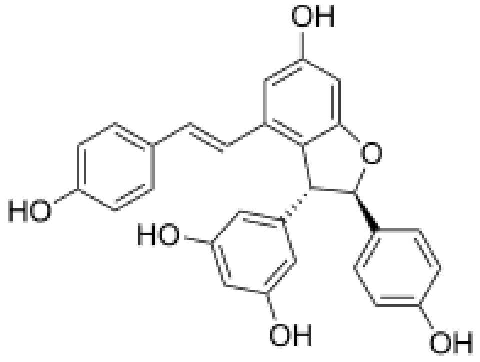
გ



ტრანს-რეზვერატროლ



დ

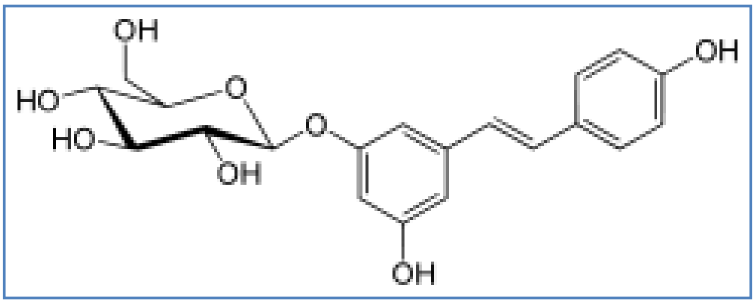


ε -ვინიფერილი

ნახ.II.2.2. საფერავის ყურძნის დაკონცენტრირებული წვენის (ა), მჟავური ჰიდროლიზატის (ბ), ტრანს- რეზვერატროლის (გ) და ε-ვინიფერინის (დ) სითხური ქრომატოგრამა

ჰიდროლიზატებში აგლიკონების ტრანს-რეზვერატროლის და ε-ვინიფერინის, მონოსაქარიდებიდან კი, გლუკოზის არსებობა, მიუთითებს საფერავის ყურძნის წვენში მათი გლუკოზიდური ფორმების- შესაბამისად ტრანს- პიცეიდის და ε-ვინიფერინის გლუკოზიდის შემცველობაზე. საჭიროა აღინიშნოს ის ფაქტი, რომ ყურძნის წვენში ტრანს-რეზვერატროლის რაოდენობა დამოკიდებულია წვენის მიღების ხერხზე, კერძოდ, ყურძნის ნატურალური წვენი ამ ნივთიერებას კვალის სახით შეიცავს. ბუნებრივი ორგანული მჟავების თანაობით დაკონცენტრირებისას განიცდის ნაწილობრივ

ჰიდროლიზს ისე, რომ წარმოქმნილი ტრანს-რეზვერატროლის კონცენტრაცია შეადგენს 0,4მგ/ლ, მჟავური ჰიდროლიზის შედეგად, ტრანს-რეზვერატროლის კონცენტრაცია იმატებს 7,3მგ/ლ- მდე. საფერავის ყურძნის ვაკუუმ-ტკბილში ტრანს-რეზვერატროლის კონცენტრაცია შეადგენს 1,32მგ/ლ, ტკბილის ნაწილობრივი მჟავური ჰიდროლიზის შედეგად იგი იმატებს 3,08მგ/ლ -მდე, ხოლო სრული ჰიდროლიზით - 21,8მგ/ლ-მდე, ყურძნის ტკბილში ε-ვინიფერინის კონცენტრაცია -1,3მგ/ლ, მჟავური ჰიდროლიზის შედეგად გაიზარდა 11,5მლ/გ-მდე. ეს ცვლილება მიუთითებს ყურძნის ტკბილში ε-ვინიფერინის გლიკოზიდური ფორმით არსებობაზე. ნივთიერება 4 (ნახ.II.2.1.) მჟავური ჰიდროლიზით წარმოქმნის ტრანს-რეზვერატროლს. ულტრაიისფერ უბანში ახასიათებს შთანთქმის მაქსიმუმები - 308ნმ და 335ნმ. ეს ნივთიერება იდენტიფიცირდა, როგორც ტრანს-პიცეიდი (4',5-დიჰიდროქსისტილბენ-3-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი) (პოლიდატინი).



პიცეიდი $C_{20}H_{22}O_8$; Mr-390

ტრანს-პიცეიდის მოლეკულაში ტრანს - რეზვერატროლის მასური წილის და ჰიდროლიზის შედეგად წარმოქმნილი ტრანს-რეზვერატროლის რაოდენობის გათვალისწინებით, საფერავის ყურძნიდან მექანიკურად მიღებული ნატურალური წვენი ტრანს-პიცეიდს შეიცავს 12,4 მგ/ლ კონცენტრაციით. წარმოებაში დამზადებული საფერავის ვაკუუმ-ტკბილში კი - 35,4 მგ/ლ, სხვაობა განპირობებულია ყურძნის გამოწნეხვით და წვენის კონცენტრირებით.

სტილბენოიდების ბიოლოგიური აქტივობა დადგენილია სხვადასხვა მიმართულებით, კერძოდ ისინი ამჟღავნებენ ანტიოქსიდანტურ (პივერი და სხვ., 2003; ჩანგი და სხვ., 1992) ანტიბაქტერიულ (ზავარესკო და სხვ., 2008), ანტივირუსულ (ორსინი და სხვ., 1997) და სხვა აქტივობებს. ამ აქტიურობის გამო სამკურნალო-პროფილაქტიკურ ზემოქმედებას ახდენენ გულ-სისხლძარღვთა, იშემიური, სიმსივნური და სხვა დაავადებების მიმართ (იანგი და სხვ., 1997; სზმიტკო და სხვ., 2005; კლატსკი და სხვ., 1997; ბალესტრიერი და სხვ., 2008).

ამგვარად, ჩატარებული კვლევების შედეგად, საფერავის ყურძნის წვენში პირველად იქნა იდენტიფიცირებული ტრანს-რეზვერატროლის გლუკოზიდი პიცეიდი (4',5-დიჰიდროქსისტილბენ-3-O-β-D -გლუკოპირანოზიდი) და ε-ვინიფერინის გლუკოზიდი. აღნიშნული სტილბენოიდების შემცველობა

დადებითი მახასიათებელია, როგორც საფერავის ყურძნის წვენისთვის, ასევე ბიოლოგიურად აქტიური დანამატისთვის - „Georgian Vitae rimas XXI", მათი სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღირებულების თვალსაზრისით (ბეჟუაშვილი და სხვ. 2013).

II. 3. საფერავის კლერტის წყალ-სპირტიანი ექსტრაქტიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერების - აცეტოვანილონის (პონიცინის) იდენტიფიკაცია

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა, გამოგვეკვლია საფერავის კლერტის, როგორც ყურძნის გადამუშავების ნარჩენის, ფენოლური ნივთიერებები, შემდგომში ფენოლური ნაერთებით მდიდარი კლერტის ექსტრაქტის მიღების თვალსაზრისით. ამ მიზნით გამოვიყენეთ კახეთში, სხვადასხვა მიკრორაიონში გავრცელებული საფერავის კლერტი (ტექნიკური სიმწიფის პერიოდში, ყურძნის გადამუშავების შედეგად დარჩენილი). საფერავის ადგილგავრცელების მიხედვით შევარჩიეთ: ახაშნის (ფაფრის ველი), კარდენახის (ახოები), ქინძმარაულის, წინანდლის და ნაფარეულის ვენახებიდან.

საფერავის კლერტი გავაშრეთ ჰაერზე 15-20% ტენიანობის შემცველობამდე, დავაქუცმაცეთ 0,1-0,5 მმ ზომით და ჩავატარეთ ამომწურავი ექსტრაქცია 80%-იანი ეთილის სპირტით (ექსტრაქცია ჩავატარეთ საფეხურებრივად, თითოეული საფეხურის ხანგრძლივობა შეადგენდა 30 წთ, 80^0 C ტემპერატურაზე). მიღებული ექსტრაქტი გამოვიკვლიეთ ფენოლური ნაერთების შემცველობაზე. კერძოდ, განვსაზღვრეთ საერთო ფენოლური ნივთიერებები, პროანტოციანიდინები (ოლიგომერული და პოლიმერული) და კატექინები.

როგორც ცხრილი II.3.1.-ის მონაცემები გვიჩვენებს, განსაზღვრულ ფენოლურ ნაერთთა შორის დომინანტია პოლიმერული პროანტოციანიდინები, რომლებიც თითქმის ერთნაირი კონცენტრაციით გვხდება კარდენახის და ახაშნის საფერავის კლერტში, მაგრამ ამავე დროს აღემატება ქინძმარაულის, ნაფარეულის და წინანდლის საფერავის კლერტში პროანტოციანიდინების შემცველობას.

ცხრილი II.3.1

ფენოლურ ნაერთთა შემცველობა საფერავის კლერტში, % მ.მ.მ.

№	ადგილგავრცელების სახელწოდება	საერთო ფენოლები	ოლიგომერული პროანტოციანიდინები	პოლიმერული პროანტოციანიდინები	კატექინები
1	ახაშენი	12,9	3,7	7,0	1,5
2	კარდენახი	13,3	3,9	7,5	1,3
3	ქინძმარაული	12,6	3,2	7,2	1,0
4	წინანდალი	12,5	3,5	7,0	1,2
5	ნაფარეული	12,5	3,6	7,1	0,9

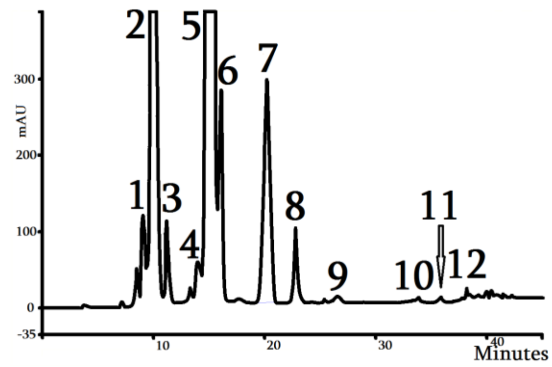
გავაგრძელეთ, რა კლერტის წყალ-სპირტიანი ექსტრაქტის ფენოლური ნაერთების გამოკვლევა, შევისწავლეთ მასში შემავალი ფენოლმჟავების და ფენოლალდეჰიდების თვისებრივი შედგენილობა. რისთვისაც ექსტრაქტი წინასწარ დავამუშავეთ სპეციალური სქემის მიხედვით.

საფერავის კლერტის ნაყენებში ფენოლმჟავები წარმოდგენილია ვანილინის, იასამნის, პროტოკატექის, გალის, პარა-კუმარის, ყავის და ფერულის მჟავების სახით. ასევე დაფიქსირდა 4-ოქსიბენზალდეჰიდი. ფენოლმჟავებს შორის ჭარბობს იასამნის მჟავა. ფენოლმჟავების შედგენილობის მიხედვით თვისებრივად საკვლევი ობიექტები ერთმანეთისგან არ განსხვავდებიან. საყურადღებოა ერთი ფაქტი, რომელსაც ჩვენ ყურადღება მივაქციეთ, რომ ქრომატოგრამაზე გამჟღავნდა ერთი უცნობი ნივთიერება მოწითალო-ნარინჯისფერი ლაქის სახით, რომელიც არ შეესაბამებოდა არც ერთ ფენოლმჟავას და მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ რომ ჩაგვეტარებინა იმ უცნობი ნივთიერების იდენტიფიცირება.

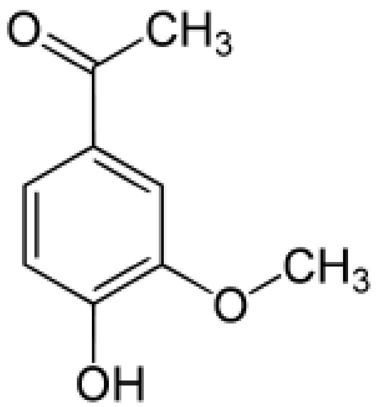
სამიებელი ნაერთი გამოვყავით პრეპარატულად მინის ფირფიტაზე დატანილი სპეციალური სილიკაგელის გამოყენებით. მისი იდენტიფიკაციის მიზნით შევადარეთ ინდივიდუალურ ნივთიერებებს - აცეტოვანილონს (პონიცინს) და აცეტოსირინგონს. აცეტოსირინგონი საკვლევ ობიექტში არ დაფიქსირდა. ქრომატოგრაფიული მონაცემების მიხედვით Rf-0,93 და ლაქის ფერით, სამიებელი ნაერთი შეესაბამებოდა აცეტოვანილონს (პონიცინს), მაგრამ სრული იდენტიფიცირების მიზნით ჩავატარეთ მისი ულტრაიისფერი და ინფრაწითელი სპექტროსკოპია და ლღობის ტემპერატურის განსაზღვრა.

სპექტრალური მახასიათებლები შემდეგია: ულტრაიისფერი სპექტრი (დიეთილეთერში) λ max (ნმ) -228; 269 ; 303. ინფრაწითელი სპექტრი (სმ $^{-1}$) – 3293 (OH-ფენოლური); 1658 (C =O კარბონილური ჯგუფი); 1573 (არომატული ბირთვი C = ბმასთან ერთად); 1511 (არომატული ბირთვის ჩონჩხის რხევები); 1450 (C-H ბმა მეთოქსილის ჯგუფში); 1357(ფენოლური OH); 1288 (C-O-C მეთოქსილიდან); 1187 (მეთოქსილის ჯგუფი- OCH_3).

სამიებელი ნაერთი ლღვება 114-115^{O}C-ზე. სპექტრალური მონაცემების, სპექტროფოტომეტრზე ნაჩვენები ოპტიკური სიმკვრივეების და სხვა მაჩვენებლების მიხედვით სამიებელი ნივთიერება სრულ შესაბამისობაში აღმოჩნდა შესადარებელ აცეტოვანილონთან, რის საფუძველზეც იგი იდენტიფიცირდა როგორც აცეტოვანილონი ანუ პონიცინი. იდენტიფიცირებული ნივთიერება კარგად იხსნება სპირტში, აცეტონში, წყალ-სპირტიან ხსნარში, ცუდად ხსნადია ცივ წყალში.



ნახ.II.3.1 საფერავი კლერტის წყალ-სპირტიანი ნაყენის დეითილეთერიანი ფრაქციის სითხური ქრომატოგრამა. 7-აცეტოვანილონი



აცეტოვანილონი(პონიცინი) $C_9H_{10}O_3$

აცეტოვანილონის კონცენტრაცია შეადგენს - 5,2მგ/ლ. აცეტოვანილონის შემცველობა საფერავის წყალ-სპირტიან ექსტრაქტებში მოცემულია ცხრილში II.3.2.

ცხრილი II.3.2

აცეტოვანილონის (პონიცინის) შემცველობა საფერავის კლერტის წყალ-სპირტიან ექსტრაქტებში (მგ/ლ)

საფერავის ადგილგავრცელების დასახელება	კონცენტრაცია, მგ/ლ
ახაშენი	5,2
კარდენახი	4,7
ქინძმარაული	4,0
ნაფარეული	3,7
წინანდლი	4,5

ექსპერიმენტულად დადგინდა, რომ კლერტის წყალ-სპირტიან ნაყენებში პონიცინის შემცველობა მერყეობს 3.7-5.2 მგ/ლ ინტერვალში. მაქსიმალური რაოდენობა დაფიქსირდა ახაშნის საფერავის კლერტის ნაყენში.

დავადგინეთ ჩვენს მიერ გამოყოფილი აცეტოვანილონის (პინიცინის) ანტირადიკალური აქტივობა (ეპმრ) მეთოდით, რომელმაც შეადგინა 33%. საფერავის კლერტის ფენოლური ნაერთებიდან პირველად იდენტიფიცირდა დაბალმოლეკულური, ბილოგიურად აქტიური ნივთიერება აცეტოვანილონი (პონიცინი) (ელანიძე და სხვ., 2013).

II.4. სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატის გამოკვლევა

იმ ფაქტის გათვალისწინებით, რომ ბუნებრივი სტილბენოიდებით მდიდარია ვაზის ერთწლიანი ყლორტი (ანასხლავი) და აღნიშნულ სტილბენოიდებს ნაკლებად, ან არ შეიცავს ყურძნის კლერტი, რომელსაც ჩვენ ვიყენებთ მიზნობრივი პროდუქტის დასამზადებლად, მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ, რომ მიგვეღო სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატი,

გამოგვეკვლია მისი შედგენილობა და გამოგვეყენებინა ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის დამზადების ტექნოლოგიაში. ამ მიზნით გამოვიყენეთ ვაზის ერთწლიანი ყლორტი (ანასხლავი), დავაქუცმაცეთ, გავაშრეთ ჰაერზე და ჩავატარეთ ექსტრაქცია 96%-იანი ეთილის სპირტით 80-90 C ტემპერატურაზე უკუმაცივრის გამოყენებით. ცხელ ექსტრაქციას ვატარებდით საფეხურებრივად. სრული ექსტრაქციის შემდეგ ექსტრაქტები გავაერთიანეთ, დავაკონცენტრირეთ ვაკუუმ-ამაორთქლებელზე და შემდეგ, სპეციალური ტექნოლოგიური ეტაპების განხორციელების შედეგად, გამოვყავით მისგან სტილბენოიდებშემცველი ფრაქცია.

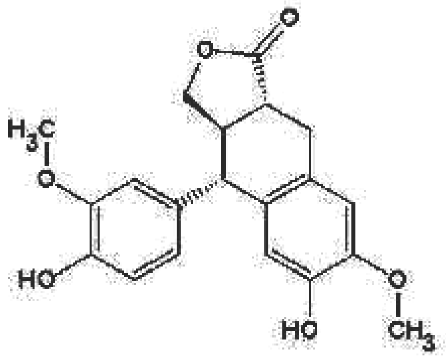
თვისებრივად მასში ლოკალიზებულია რიგი სტილბენოიდები: ტრანს-რეზვერატროლი, ε-ვინიფერინი, ტეტრამერული სტილბენები და ასევე არაიდენტიფიცირებული სტილბენოიდური ნაერთები.ანასხლავიდან დამზადებული სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატის შედგენილობაში სტილბენების გარდა დაფიქსირდა პოლიმერული პროანტოციანიდინების და კატექინების გარკვეული რაოდენობა (ცხრ.II. 4. 1.)

ცხრილი II. 4.1.

ანასხლავიდან მიღებული სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატის ფიზიკურ-ქიმიური მაჩვენებლები

მაჩვენებლის დასახელება	ნორმა
ფერი	მოყავისფრო
გამჭვირვალობა	გაუმჭვირვალე, შესქელებული სითხე
გემო	მთრიმლავი, მწკლარტე
საერთო ფენოლები, გ/ლ	12,0-14,0
ტრანს-რეზვერატროლი, მგ/ლ	650-750
ε-ვინიფერონი, მგ/ლ	300-350
კატექინები, მგ/ლ	130-150
პროანტოციანიდინები, გ/ლ	8,5-9,7

თხელფენოვან ქრომატოგრამაზე სტილბენოიდებთან ერთად დაფიქსირდა უცნობი ნივთიერება და გადავწყვიტეთ მისი იდენტიფიკაცია. იგი გამოვყავით სუფთა სახით პრეპარატული ქრომატოგრაფიის მეთოდით. ულტრაიისფერი სპექტრი: (EtOH), λmax 206 ნმ და 284 ნმ; ინფრაწითელი სპექტრი: (ვაზელინში) (სმ$^{-1}$), 3401 (OH ფენოლური), 2923, 1758, 1511, 1457. საძიებელი ნაერთი ლღვება 247-248^{0} C ტემპერატურაზე.



აკონიდენდრინი $C_{20}H_{20}O_6$ Mr-356

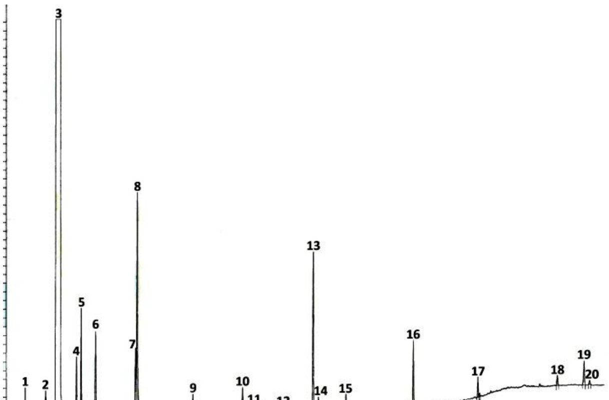
შევადარეთ, რა საძიებელი ნივთიერების და ინდივიდუალური α-კონიდენდრინის სპექტრალური, სფექტროფოტომეტრული და ქრომატოგრაფიული მონაცემები, ისინი აღმოჩნდა ერთმანეთის იდენტური. ბიოლოგიურად აქტიური სტილბენოიდების გვერდით α-კონიდენდრინის არსებობა დადებითი ფაქტია მისი შემდგომი გამოყენების თვალსაზრისით.

ჩვენს მიერ იდენტიფიცირებული α-კონიდენდრინის ანტირადიკალური აქტივობა (ეპმრ) მეთოდით შეადგენს 35%-ს (ელანიძე და სხვ., 2012).

II.5. მცენარეული არომატიზატორის მიღება და გამოკვლევა

სხვადასხვა მცენარეული ნედლეული გამოირჩევა თავისებური დამახასიათებელი არომატწარმომქმნელი ნივთიერებების შემცველობით. აღნიშნული ნივთიერებები, რომლებიც ცნობილია ეთერზეთების სახელწოდებით, ძირითადად წარმოდგენილია ეთერების, ტერპენული ნაერთების, სპირტების და სხვ. სახით. ეთერზეთები ფართოდ გამოიყენება კვების პროდუქტების ტექნოლოგიაში სპეციფიკური არომატის შესაძენად. არომატულ მცენარეებს შორის ერთ-ერთი გამორჩეული ადგილი უჭირავს ბეგქონდარას **(THYMUS SERPYLLUM).** ყოველივე ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, მიზნად დავისახეთ გამოგვეკვლია და გამოგვეყენებინა ბეგქონდარას არომატწარმომქმნელი ნივთიერებები, შემდგომში წყალ-სპირტიანი ნაყენის სახით.

ამ მიზნით ავიღეთ თუშეთის დაცულ ტერიტორიებში გავრცელებული ბეგქონდარას მიწისზედა ნაწილები, გავაშრეთ ჰაერზე, დავაქუცმაცეთ და დავამზადეთ წყალ-სპირტიანი ნაყენი 40%-იანი ეთილის სპირტის გამოყენებით. არომატწარმომქმნელი კომპონენტები გამოვწვლილეთ პენტან-ეთერიანი (2:1) ნარევით და გავაანალიზეთ გაზური ქრომატოგრაფიის მეთოდით.



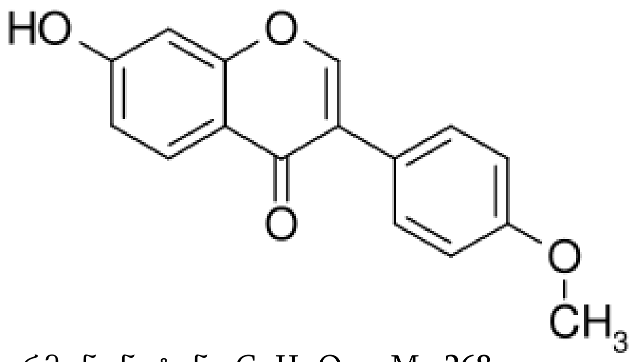
ნახ. II.5.1. ბეგქონდარას წყალ-სპირტიანი ნაყენის არომატწარმომქმნელი ნივთიერებების გაზური ქრომატოგრამა; 3 - α-პინენი; 6 - მირცენი; 7 - ლიმონენი; 9 - ტერპინოლენი; 12 - ლინალოოლი; 13 - კარვაკროლი;14 - თიმოლი; 15 - ციტრონელონი.

ბეგქონდარას წყალ-სპირტიანი ნაყენი შეიცავს სხვადასხვა არომატწარმომქმნელ ნივთიერებებს: α-პინენის, მირცენის, ლიმონენის, ტერპინოლენის, ლინალოოლის, კარვაკროლის, თიმოლის, ციტრონელონის და სხვათა სახით, რომელთა შორის დომინანტია α-პინენი (ნახ.II.5.1.). აღნიშნული ნაერთების გამო ბეგქონდარას წყალ-სპირტიანი ნაყენი ხასიათდება სპეციფიკური ძლიერი არომატით. ვინაიდან, ბეგქონდარას წყალ-სპირტიანი ნაყენი მივიჩნიეთ მიზნიბრივი პროდუქტის - ბიოლოგიურად აქტიური

კვებითი დანამატის ტექნოლოგიაში გამოსაყენებლად, ამიტომ გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა მისი ფენოლური ნაერთების შედგენილობა.

თხელფენოვანი ქრომატოგრამის მონაცემებმა გამოავლინა უცნობი ნივთიერება, რომელიც ხასიათდება Rf-0,8 და გამჟღავნების შედეგად გვაძლევს ინტენსიური ყვითელი ფერის ლაქას. აღნიშნული ნივთიერება არ შეესაბამებოდა არც ერთ ფენოლმჟავას, არც ლიგნანს, არც ფენოლალდეჰიდებს, მაგრამ იზოფლავონ ფორმონონეტინთან ქრომატოგრაფიული შედარების შედეგად გამოვლინდა მათი მსგავსება (Rf და ლაქის შეფერილობის მიხედვით).

ქრომატოგრაფიული მონაცემების გარდა, საძიებელი ნივთიერება გამოვყავით სუფთა სახით პრეპარატულად, ჩავუტარეთ სპექტრალური ანალიზები. მიღებული მონაცემების და ინდივიდუალური ფორმონონეტინის შედარების საფუძველზე, ისინი აღმოჩნდა ერთმანეთის იდენტური და ჩვენს მიერ პრეპარატულად გამოყოფილი ნაერთი იდენტიფიცირდა როგორც ფორმონონეტინი.



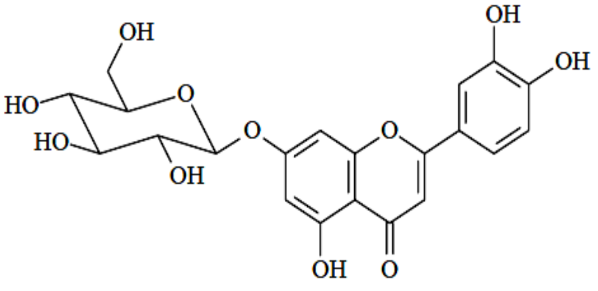
ფორმონონეტინი $C_{16}H_{12}O_4$ Mr-268

ფორმონონეტინის კონცენტრაციამ ბეგქონდარას წყალ-სპირტიან ექსტრაქტში შეადგინა 0,5მგ/ლ.

ბეგქონდარას წყალ-სპირტიანი ექსტრაქტიდან გამოყოფილი ეთილაცეტატიანი ფრაქციის გაანალიზების შედეგად დადგინდა ფლავონოიდების - რუთინის, კვერცეტინის, ლუთეოლინის და დაბალი Rf-ის მქონე უცნობი ნივთიერების შემცველობა. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ იგივე ეთილაცეტატიანი ფრაქციის ქრომატოგრამა, რომელიც გამჟღავნებულია ვანილინის რეაქტივით, იძლევა (+) კატექინის, (-) ეპიკატექინის და გალოკატექინის შესაბამის ინტენსიურ ვარდისფერ ლაქებს.

გადავწყვიტეთ გამოგვეკვლია ფლავონოიდური ბუნების უცნობი ნივთიერება. ამ მიზნით იგი გამოვყავით პრეპარატულად, გადავიღეთ მისი ულტრაიისფერი, ინფრაწითელი სპექტრები, განვსაზღვრეთ ლღობის ტემპერატურა და ჩავუტარეთ მჟავური ჰიდროლიზი 4 N HCl-ით. ჰიდროლიზატი გამოვწვლილეთ ეთილ-აცეტატით. ქრომატოგრაფირების შედეგად ჰიდროლიზატიდან გამოწვლილული ნივთიერება აღმოჩნდა ლუთეოლინი, რაც სრულ შესაბამისობაშია ინდივიდუალური ცინაროზიდის ჰიდროლიზატიდან გამოწვლილულ ნივთიერებასთან.

გარდა ჰიდროლიზის შედეგებისა, სპექტრალური მონაცემებითაც დადგინდა საძიებელი ნივთიერების და ინდივიდუალური ცინაროზიდის იდენტურობა. საძიებელი ნივთიერების ლღობის ტემპერატურა შეადგენს 240-242°C.



ცინაროზიდი $C_{21}H_{20}O_{11}$ Mr-286

ცინაროზიდის კონცენტრაციამ ბეგქონდარას წყალ-სპირტიან ნაყენში შეადგინა 2,7 მგ/ლ. ჩვენი მონაცემებით ფორმონონეტინის და ცინაროზიდის ანტირადიკალური აქტივობა (ეპმრ) მეთოდით შეადგენს შესაბამისად 21 და 54%-ს (ელანიძე და სხვ., 2013).

II. 6. ბიოლოგიურად აქტიური დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI" დამზადების ტექნოლოგიის შემუშავება

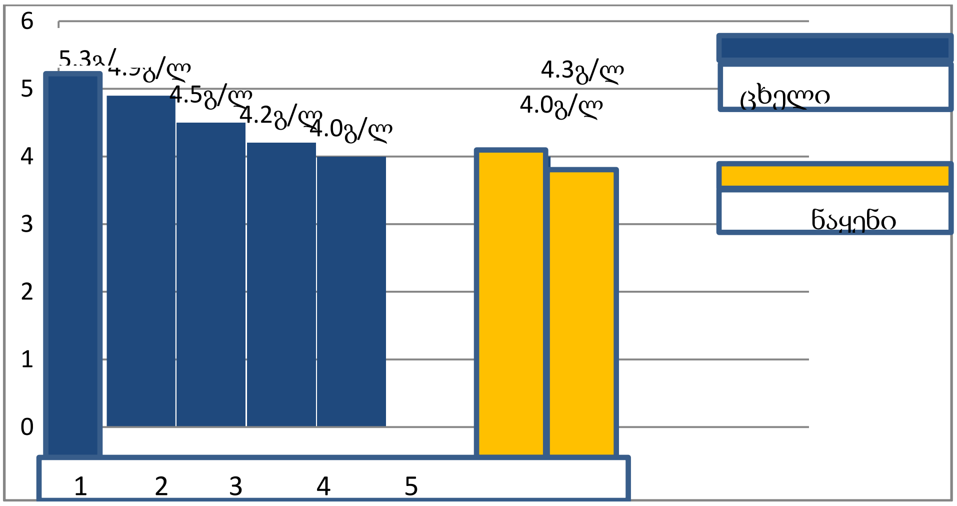
როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, კვლევის მიზანს წარმოადგენდა მეცნიერულად დასაბუთებული ყურძნისეული წარმოშობის ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის დამზადების რაციონალური ტექნოლოგიის შემუშავება. ამ მიზნით, პირველ რიგში ტექნოლოგიისთვის მოაზრებულ ინგრედიენტებში ცნობილი ფენოლური ნაერთების გვერდით, გამოვავლინეთ ახალი ბიოლოგიურად აქტიური ბუნებრივი ფენოლური ნაერთები. კერძოდ, საფერავის ყურძნის კლერტში აღმოჩნდა აცეტოვანილონი (პონიცინი), საფერავის ყურძნის ტკბილში - ტრანს-რეზვერატროლის გლუკოზიდი ტრანს-პიცეიდი (პოლიდატინი) და ε-ვინიფერინის გლუკოზიდი, ასევე ვაზის სტილბენოიდებშემცველ კონცენტრატში ტრანს-რეზვერატროლთან, ε-ვინიფერინთან, ტეტრამერულ სტილბენებთან და სხვ. სტილბენოიდებთან ერთად დაფიქსირდა ლიგნანი α-კონიდენდრინი. ბეგქონდარას არომატულ ექსტრაქტში გამოვლინდა ბიოლოგიურად აქტიური იზოფლავონი ფორმონონეტინი და ლუთეოლინის გლუკოზიდი- ცინაროზიდი.

ყოველივე ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, მიზნად დავისახეთ ტექნოლოგიურ პროცესებში იდენტიფიცირებული ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების მაქსიმალური რაოდენობით შენარჩუნება. უპირველეს ყოვლისა, ექსპერიმენტი ჩავატარეთ საფერავის ყურძნის კლერტიდან ფენოლურ ნაერთთა მიღების ოპტიმალური რეჟიმების შერჩევის მიზნით.

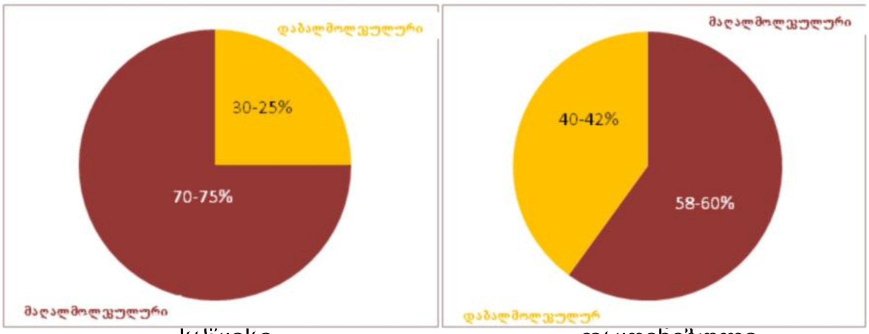
ამ თვალსაზრისით გადავწყვიტეთ დაგვედგინა კახეთის სხვადასხვა რაიონებში გავრცელებული საფერავის ყურძნის კლერტში ფენოლური ნაერთების შემცველობა და მათი ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები. ამ მიზნით ავიღეთ ახაშნის (ფაფრის ველი), კარდენახის (ახოები), ქინძმარაულის, ნაფარეულის და წინანდლის ადგილგავრცელების საფერავის კლერტი, ტექნიკური სიმწიფის პერიოდში (როგორც ყურძნის გადამუშავების ნარჩენი). ექსტრაქციის ხარისხზე დავადგინეთ ისეთი ფაქტორების გავლენა, როგორიც არის ნედლეულის დაქუცმაცების ხარისხი, ეთანოლის კონცენტრაცია და ექსტრაქციის დროის ხანგრძლივობა.

საფერავის კლერტის ფენოლური ნაერთებით მდიდარი წყალ-სპირტიანი ნაყენის მისაღებად ოპტიმალურ პარამეტრებად გამოვლინდა კლერტის დაქუცმაცების ხარისხი - 0,1-0,5 მმ ზომით, ეთანოლის კონცენტრაცია - 40% და დაყოვნების დროის სანგრძლივობა 14 დღე.

იმისთვის, რომ შეგვერჩია ბიოლოგიურად აქტიური დანამატის დასამზადებლად რომელი ექსტრაქტი იყო ვარგისიანი - ოთახის ტემპერატურაზე დაყენებული ნაყენი, თუ ცხელ პირობებში მიღებული ექსტრაქტი. ამისთვის ჩავატარეთ მათი შედარებითი შესწავლა ოთახის ტემპერატურაზე ერთთვიანი ფორმირება-დაყოვნების პერიოდში. როდესაც მათში პერიოდულად ვსაზღვრავდით ხსნად ფენოლურ ნივთიერებებს, აღმოჩნდა, რომ ცხელ პირობებში მიღებული კლერტის წყალ-სპირტიან ექსტრაქტში ფენოლური ნივთიერებები მცირდება მნიშვნელოვანი რაოდენობით. ეს შემცირება, როგორც ნახ. II. 6. 1 (ა) გვიჩვენებს, იწყება დაყოვნებიდან ერთი კვირის შემდეგ და ერთი თვის განმავლობაში ცხელი ექსტრაქციის მეთოდით მიღებულ წყალ-სპირტიან ექსტრაქტში ხსნადი ფენოლური ნაერთების კონცენტრაცია დაახლოებით უტოლდება კლერტის წყალ-სპირტიან ნაყენში არსებულ ფენოლური ნაერთების კონცენტრაციას.



ნახ. II.6. 1(ა). საფერავის კლერტის ფენოლურ ნაერთთა რაოდენობრივი ცვალებადობა ერთთვიანი დაყოვნების პერიოდში. 1) საწყისი; 2) 7 დღე-ღამე; 3) 14 დღე-ღამე; 4) 21დღე-ღამე; 5) 30 დღე-ღამე. 6) საწყისი; 7) 30 დღე-ღამე.



საწყისი დაყოვნებული

ნახ. II.6.1(ბ). საფერავის კლერტის ფენოლურ ნაერთთა შედგენილობის ცვალებადობა ერთთვიანი დაყოვნების პერიოდში

ამასთანვე, ექსპერიმენტმა დაადასტურა, რომ ფენოლურ ნაერთთა რაოდენობრივი კლება ძირითადად განპირობებულია პოლიმერული პროანტოციანიდინების რაოდენობრივი კლებით, ანუ ფენოლურ ნაერთთა შემცირება ცხელი ექსტრაქციით მიღებულ ექსტრაქტში განპირობებულია ოთახის ტემპერატურაზე პოლიმერული პროანტოციანიდინების გამოლექვით (ნახ. II.6 . 1 ზ). კერძოდ, ცხელ პირობებში დამზადებულ საწყის ექსტრაქტში პოლიფენოლების და დაბალმოლეკულური ფენოლური ნაერთების განაწილება შეადგენდა 70-75% და 25-30%. ერთთვიანი დაყოვნების შედეგად ეს განაწილება შეიცვალა შემდეგნაირად: 58-60% და 40-42%. ყოველივე ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ, რომ ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის დასამზადებლად გამოგვეყენებინა საფერავის კლერტის 40 მოც.%-იანი წყალ-სპირტიანი ნაყენი.

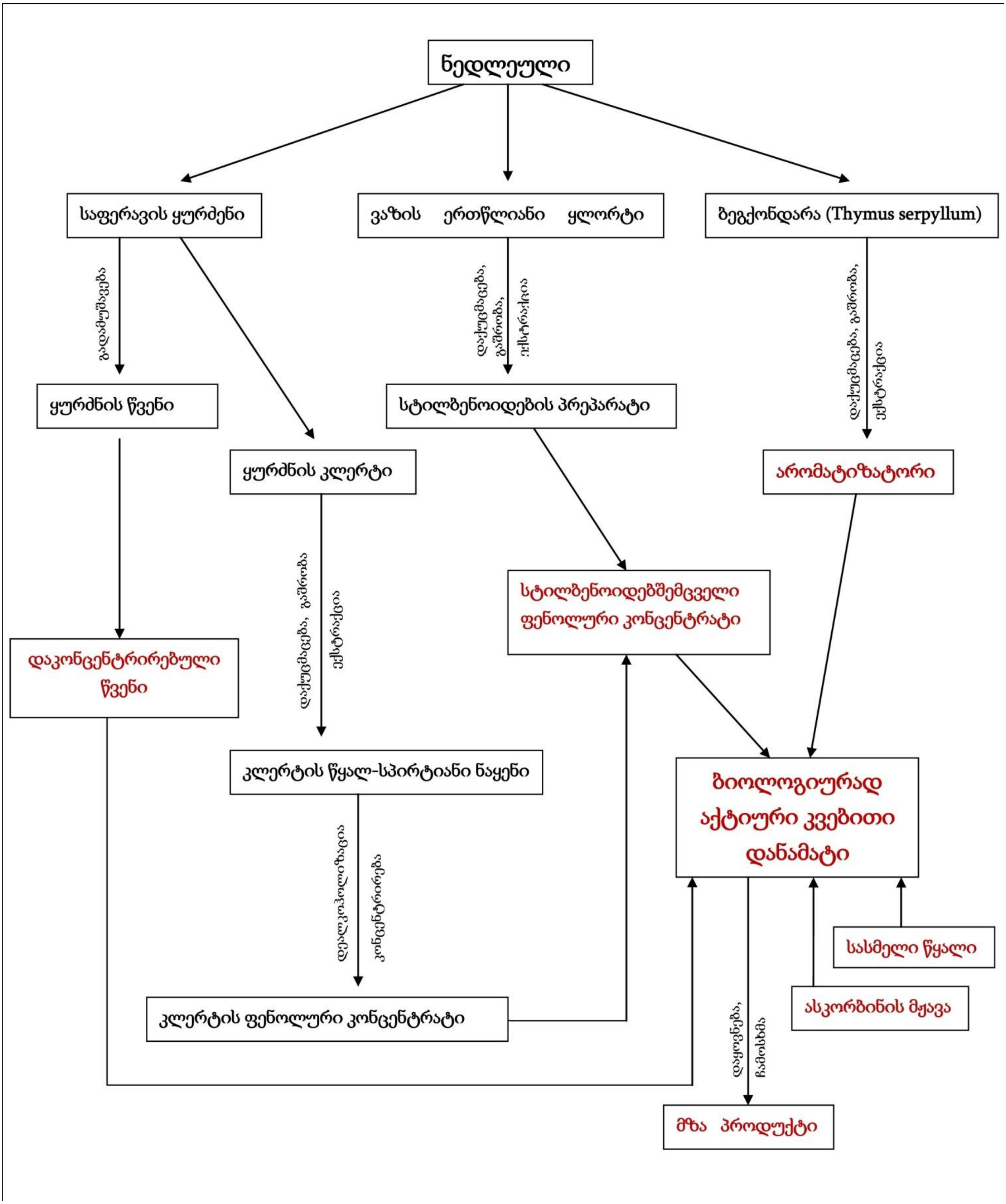
ტექნოლოგიის შემუშავებისას მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ კლერტის წყალ-სპირტიანი ნაყენის და სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატის არა ცალ-ცალკე, არამედ ერთი მთლიანი ფენოლური კონცენტრატის სახით გამოყენება ბად-ის ტექნოლოგიაში. საექსპერიმენტო ბად-ები დავამზადეთ რამდენიმე ვარიანტის მიხედვით, რომელსაც ვაანალიზებდით ორგანოლეპტიკურად და ქიმიური მაჩვენებების საფუძველზე. შევარჩიეთ ოპტიმალური ვარიანტი და ჩამოვაყალიბეთ ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის ტქენოლოგიის სქემა (სქემა II.6. 1.).

შემუშავებული სქემის მიხედვით ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI" დამზადების ტქენოლოგია ჩამოყალიბდება შემდეგნაირად:

იღებენ საფერავის ყურძენს, გადაამუშავებენ, ყურძნის წვენს აკონცენტრირებენ სამსაფეხურიან პირდაპირნაკადულ ამაორთქლებელზე „EC-316/3" და ღებულობენ დაკონცენტრირებულ ყურძნის ტკბილს, რომელსაც ინახავენ სპეციალურ ასეპტიკურ ბალიშებში.

კლერტს აშრობენ ჰაერზე, აქუცმაცებენ 0,1-0,5 მმ ზომაზე, უტარებენ ექსტრაქციას 40% ეთილის სპირტით ოთახის ტემპერატურაზე დაყოვნებით 2 კვირის განმავლობაში და ღებულობენ წყალ-სპირტიან ნაყენს, რომელსაც აკონცენტრირებენ როტაციულ გადამდენზე და ღებულობენ კლერტის ფენოლური ნაერთების კონცენტრატს. კონცენტრატს ათავსებენ ჰერმეტულად დახურულ, მუქ მინის ჭურჭელში და ინახავენ მაცივარში.

ვაზის ერთწლიანი ყლორტს (ანასხლავს) აქუცმაცებენ, აშრობენ ჰაერზე, უტარებენ ექსტრაქციას 96%-იანი სპირტით და შემდეგ სპეციალური ტექნოლოგიური ეტაპების განხორციელების შედეგად გამოყოფენ სტილბენოიდებშემცველ პრეპარატს. სტილბენოიდებშემცველ პრეპარატს ურევენ კლერტის ფენოლური ნაერთების კონცენტრატში და ღებულობენ ბუნებრივ სტილბენოიდებშემცველ ფენოლურ კონცენტრატს.



სქემა II.6.1. ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian V itae rimas XXI“ დამზადების ტექნოლოგიური სქემა

იღებენ თუშეთის დაცული ტერიტორიებიდან ეკოლოგიურად სუფთა ბეგქონდარას (**THYMUS SERPYLLUM**) მიწისზედა ნაწილებს, აშრობენ ჰაერზე ჩრდილში, აქუცმაცებენ და ამზადებენ 40% წყალ-სპირტიან ნაყენს - არომატიზატორს.

ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის კუპაჟს ამზადებენ შემდეგნაირად: იღებენ საფერავის დაკონცენტრირებულ ტკბილს (არანაკლებ 65 ბრიქსი), ანზავებენ ორჯერ სასმელი წყლით, ანჯღრევენ ინტენსიურად და უმატებენ სტილბენოიდებშემცველ ფენოლურ კონცენტრატს 5 მლ/ლ რაოდენობით, მცენარეულ არომატიზატორს 30 მლ/ლ რაოდენობით და ასკორბინის მჟავას 50 მგ/ლ კონცენტრაციით. საკუპაჟე ნარევს ანჯღრევენ ისევ ინტენსიურად, გადააქვთ ჰერმეტულად დახურულ ჭურჭელში და აყოვნებენ ბნელ, მშრალ ადგილზე 3 დღე-ღამის განმავლობაში 10-12^0 C ტემპერატურაზე. შემდეგ ჩამოასხამენ 150-300 მლ მოცულობის მუქ, სხივგაუმტარ სპეციალურ ჭურჭელში და ახდენენ მის რეალიზაციას.

ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატი ინახება გახსნიდან ერთი თვის განმავლობაში +5^0 C ტემპერატურის ფარგლებში (მაცივარში).

ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI" უნდა აკმაყოფილებდეს ცხრ. II. 6. 1. მოცემულ მაჩვენებლებს.

ცხრილი II.6.1.

ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI" ორგანოლეპტიკური მაჩვენებლები

მაჩვენებლების დასახელება	ნორმა
გარეგნული სახე	ბლანტი, სიროფისმაგვარი სითხე
ფერი	მოწითალო-ყავისფერი
გამჭვირვალეობა	გაუმჭვირვალე სითხე
გემო და არომატი	სპეციფიკური

ცხრილი II. 6.1. გაგრძელება

ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI“ ქიმიური მაჩვენებლები

მაჩვენებლების დასახელება	რაოდენობა
ექსტრაქტული ნივთიერებები, გ/ლ	330-343
საერთო ფენოლური ნაერთები, გ/ლ	10-13
პროანტიციანიდინები, გ/ლ	8-11
სტილბენოიდები, მგ/ლ ტრანს-რეზვერატროლი ტრანს-პიცეიდი ε-ვინიფერინი ტეტრამერული სტილბენი	 30-35 16,0-17,5 18-23 5-7
კატექინები, მგ/ლ მათ შორის: (+)კატექინი (-)ეპიკატექინი (±)გალოკატექინი (-)ეპიგალოკატექინი	700-900 + + + +
საღებავი ნივთიერებები	1,995
ფერის ინტენსივობა (D_{420}+ D_{520} +D_{620}) K= D_{420}/D_{520}	29,85 1,216
ფენოლმჟავები და ფენოლალდეგიდები მათ შორის: კონიფერილის ალდეჰიდი 4-ოქსიბენზალდეჰიდი პარა -კუმარის მჟავა ფერულის მჟავა ვანილინის მჟავა 4-ოქსიბენზოის მჟავა იასამნის მჟავა ყავის მჟავა პროტოკატეხის მჟავა გალის მჟავა	 + + + + + + + + + +
სხვა ფენოლური ნივთიერებები აცეტოვანილონი (პონიცინი), მგ/ლ α-კონიდენდრინი, მგ/ლ	 2-7 5-8
ელემენტები, მგ/ლ K Na Ca Mg Fe	 1008 287,2 54,2 70,8 1,65
ასკორბინის მჟავა (ვიტამინი C) არანაკლებ მგ/ლ	50
ანტირადიკალური აქტივობა, %, არანაკლებ	130

ყოველივე ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, ბად-ის ტექნოლოგიურ ინსტრუქციაში აუცილებელია გათვალისწინებული იქნეს შენახვის პირობები. კერძოდ, ბად-ი უნდა შეინახოს გაუმჭვირვალე, მუქ, ჰერმეტულად დახურულ ჭურჭელში $+5^0$ C ტემპერატურაზე 6 თვის განმავლობაში, ხოლო გახსნილ მდგომარეობაში მომხმარებელმა ბად-ი უნდა მიიღოს გახსნიდან 1 თვის განმავლობაში (ბეჟუაშვილი, ელანიძე, 2013).

II. 7. ტექნოლოგიური პროცესის ალგორითმი

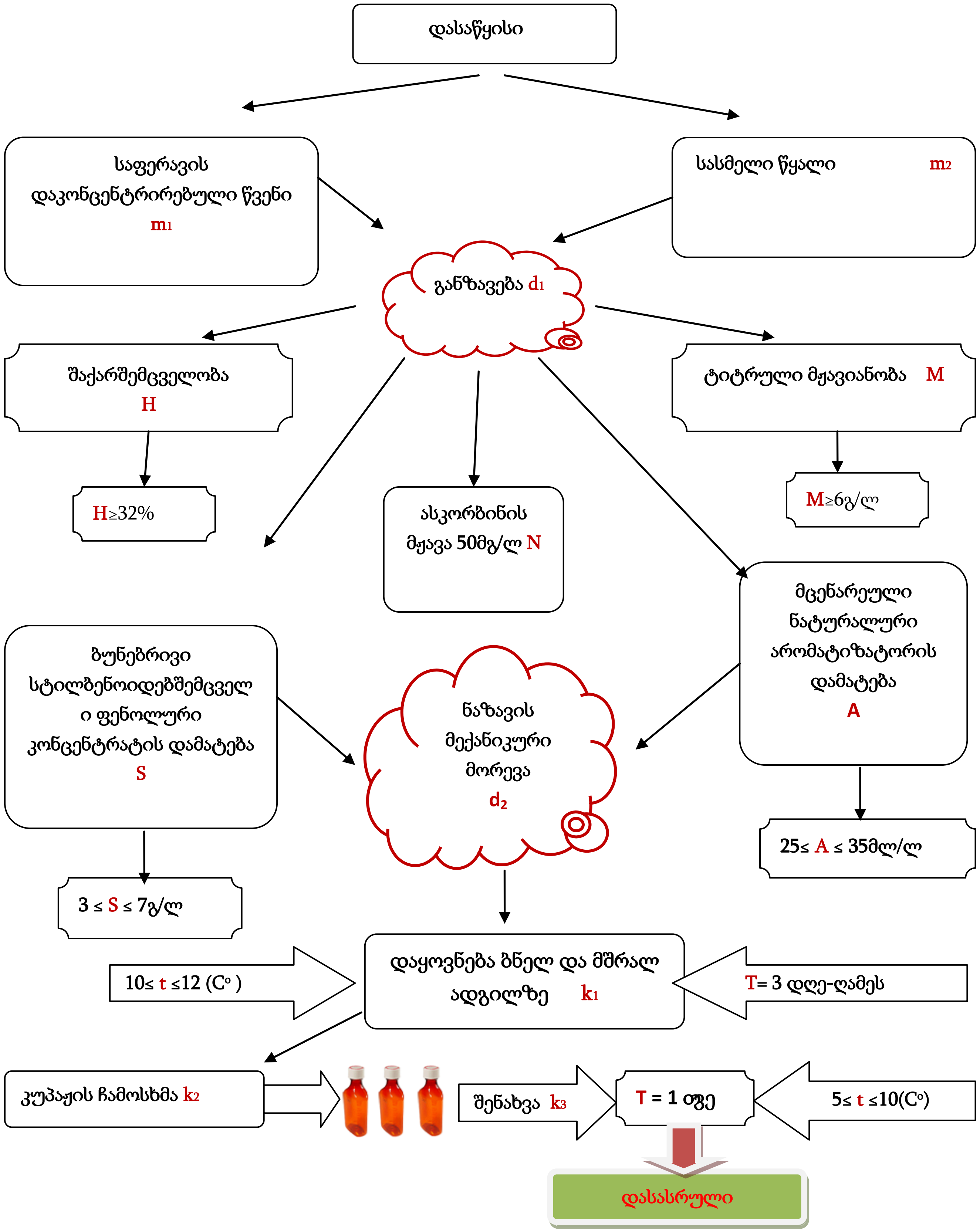
ალგორითმი ობიექტზე მიმდინარე ტექნოლოგიური პროცესების, თუ სხვადასხვა სახის ოპერაციების განხორციელების ცალკეული წესების, მოქმედებებისა და გარკვეული ბიჯების ერთობლიობაა, რომელიც გამოიყენება ნებისმიერ სფეროში.

ჩვენს სადისერტაციო ნაშრომში დასმული ამოცანა - ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI“ დამზადების ტექნოლოგიური პროცესი, როგორც მისი შინაარსიდან ჩანს, შეიცავს გარკვეული სირთულის მოქმედებათა ერთობლიობას. აქედან გამომდინარე, ვფიქრობთ, ამ შემთხვევაში ალგორითმის შედგენის საჭიროება მნიშვნელოვანია. პირველ რიგში, ალგორითმი დახმარებას გაუწევს კონკრეტულ მომხმარებელს, ხოლო მეორეს მხრივ, აღნიშნული ტექნოლოგის ალგორითმის კომპიუტერული ცოდნის ბაზა (მოთავსებული კომპიუტერულ მეხსიერებაში), საშუალებას მისცემს ნებისმიერ დაინტერესებულ პირს (ტექნოლოგს) ისარგებლოს წარმოდგენილი მონაცემებით და შეძლოს დამოუკიდებლად აწარმოოს პროდუქტი.

იმისათვის, რომ მოვახდინოთ აღნიშნული ტექნოლოგიური პროცესის განზოგადება და მისი შემდგომი კომპიუტერული რეალიზება, საჭიროა ამ პროცესის ფორმალიზებული აღწერა, რისთვისაც შემოგვაქვს შემდეგი აღნიშვნები:

m1 - საფერავის ყურძნის დაკონცენტრირებული წვენი; m2 - სასმელი წყალი; S -ბუნებრივი სტილბენოიდებშემცველი ფენოლური კონცენტრატი; A – მცენარეული არომატიზატორი; H- შაქარშემცველობა; M - ტიტრული მჟავიანობა; N- ასკორბინის მჟავა; T - დაყოვნების დრო; t - ტემპერატურა; d1 - განზავება; d2 -ნაზავის მექანიკური მორევა; k1 - დაყოვნება ბნელ და მშრალ ადგილზე; k2 - კუპაჟის ჩამოსხმა; k3 - შენახვა.

მოცემული აღნიშვნების საშუალებით შედგენილია ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI“ დამზადების ტექნოლოგიური პროცესის სრული ალგორითმი (ნახ. II. 7. 1.).



ნახ. II. 7.1. ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI“ დამზადების ტექნოლოგიური პროცესის სრული ალგორითმი

დასკვნები

1. საფერავის ყურძნის წვენში პირველად იდენტიფიცირდა ზოგიერთი სტილბენოიდური გლუკოზიდი: ტრანს-რეზვერატროლის გლუკოზიდი ტრანს-პიცეიდი (4΄,5-დიჰიდროქსისტილბენ-3-O-β-D-გლუკოპირანოზიდი) (პოლიდატინი). ტრანს-პიცეიდის კონცენტრაცია ყურძნის წვენში შეადგენს 12,4 მგ/ლ, ხოლო ვაკუუმ-ტკბილში 35,5 მგ/ლ. საფერავის ყურძნის წვენში დაფიქსირდა ε-ვინიფერინის გლუკოზიდის არსებობაც.
2. საფერავის ყურძნის კლერტში პირველად იდენტიფიცირდა ბიოლოგიურად აქტიური ფენოლური ნივთიერება აცეტოვანილონი (პონიცინი), რომლის კონცენტრაციაც საფერავის კლერტის წყალ-სპირტიან ექსტრაქტში შეადგენს 5,2 მგ/ლ. აცეტოვანილონის ანტიოქსიდანტური აქტივობა შეადგენს 33%.
3. მიღებულია ვაზის ერთწლიანი ყლორტიდან სტილბენოიდებშემცველი კონცენტრატი, რომელიც შეიცავს დიდი რაოდენობით ტრანს-რეზვერატროლს, ε-ვინიფერინს, სტილბენოიდურ ტეტრამერებს. სტილბენოიდებშემცველ კონცენტრატში იდენტიფიცირდა ლიგნანი α-კონიდენდრინი 3,3 მგ/ლ რაოდენობით. α-კონიდენდრინის ანტიოქსიდანტური აქტოვობა შეადგენს 35%.
4. თუშეთის დაცულ ტერიტორიებში მოკრეფილი ბეგქონდარას (**THYMUS SERPYLLUM)** მიწისზედა ნაწილების წყალ-სპირტიან ექსტრაქტში განისაზღვრა არომატწარმომქმნელი ნივთიერებები: α-პინენის, მირცენის, ლიმონენის, ტერპინოლენის, ლინალოოლის, კარვაკროლის, თიმოლის, ციტრონელონის და სხვათა სახით, რომელთა შორის დომინანტია α-პინენი. ამავდროულად,არომატიზატორში დაფიქსირდა ბიოლოგიურად აქტიური ფორმონონეტინის და ცინაროზიდის (ლუთეოლინის გლუკოპირანიზიდის) შემცველობა. ფორმონონეტინის ანტიოქსიდანტური აქტივობა შეადგენს 21%, ხოლო ცინაროზიდის - 54%.
5. შემუშავებულია ყურძნისეული წარმოშობის ბიოლოგიურად აქტიური უალკოჰოლო კვებითი დანამატის „Georgian Vitae rimas XXI“ დამზადების ტექნოლოგია, რომელიც ითვალისწინებს საფერავის ყურძნის ვაკუუმ-ტკბილის, სტილბენოიდებშემცველი ფენოლური კონცენტრატის, მცენარეული არომატიზატორის და ასკორბინის მჟავის გამოყენებას.

ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატი „Georgian Vitae rimas XXI“ ხასიათდება მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობით (130%), რომელიც წარმოადგენს სიროფისმაგვარ უალკოჰოლო პროდუქტს. ბად-ის შემადგენელი ნივთიერებების სპექტრი წარმოადგენს საკვებში მრავალი სასიცოცხლო და ფუნქციური დანიშნულების ნივთიერებების და ელემენტების დეფიციტის შევსების საშუალებას. ბად-ი სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღირებულების თვალსაზრისით განეკუთნება ფუნქციური დანიშნულების პროდუქტს.

სადისერტაციო ნაშრომის ირგვლივ გამოქვეყნებული სამეცნიერო შრომების ჩამონათვალი

1. ბეჟუაშვილი მ. გ., ელანიძე ლ. დ., კობაიძე თ. ა., ჯავახიშვილი მ. ლ. - ფუნქციური დანიშნულების ყურძნისეული კვებითი დანამატების წარმოების პერსპექტივები. მეორე საერთაშორისო სამეცნიერო-პრაქტიკული ინტერნეტ-კონფერენციის შრომების კრებული, „ბიოუსაფრთხო კვების პროდუქტთა პრობლემები, ახალი ტექნოლოგიები და ბიზნეს გარემო", ქუთაისი, 2011, გვ. 152-157

2. ელანიძე ლ. - ბიოლოგიურად აქტიური დანამატები და დღევანდელობა. იაკობ გოგებაშვილის სახელობის თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტის პროფესორ-მასწავლებელთა 70-ე სამეცნიერო კონფერენციის თეზისები, თელავი, 30 მაისი, 2012.

3. Эланидзе Л. Д., Бежуашвили М. Г., Окруашвили Д.Ш. Биологически активные стильбеноиды и лигнаны в экстракте обрезков виноградной лозы. Georgian Engineering News, No. 2 (vol. 62), 2012, pp. 115-118

4. Bezhuashvili M.G., Elanidze L.D., Okruasvili D. Sh. Identification of some stilbenoid glucoside from Saperavi grape juice (vitis vinifera L.). Georgian Engineering News, No. 1 (vol. 65), 2013, pp. 158-164

5. Эланидзе Л.Д., Бежуашвили М. Г., Окруашвили Д. Ш. (2013) Исследование химического состава водно-спиртового экстракта чабреца (THYMUS SERPYLLUM). «Пищевая наука и технология». № 1 (22), с. 70-73

6. L. D. Elanidze, M. G. Bezhuashvili , D. Sh. Okruasvili. (2013) Identifikation of acetovanillone (apocynin) from water-ethanol extract of the stem of saperavi vine variety. "Annals of Agrarian Science ", vol. 11, № 2

7. Эланидзе Л.Д., Бежуашвили М. Г., Окруашвили Д. Ш. (2013) Фенольные источники биологически активного пищевого добавка "GEORGIAN VITAE RIMAS XXI". «Пищевая наука и технология». № 2

8. ბეჟუაშვილი მ, ელანიძე ლ. ბიოლოგიურად აქტიური კვებითი დანამატის Georgian Vitae rimas XXI" წარმოების ხერხი. სასარგებლო მოდელის პატენტი, დადებითი გადაწყვეტილება - საიდენტიფიკაციო N: 12450/02. საქართველოს ინტელექტუალური საკუთრების ეროვნული ცენტრი „საქპატენტი". 20

Telavi Iakob Gogebashvili State University

Right granted under copyright

Lali Elanidze

Technology of biological active supplement originated from grape "Georgian Vitae rimas XXI"

05.18.07 - Technology of production of alcoholic and non-alcoholic beverages

B u l l e t i n

of presented thesis for gaining doctor of science degree in food technology

Telavi 2013

Thesis is fulfilled at Telavi I. Gogebashvili State University and Georgian Agrarian University Institute of Viticulture, Enology and Horticulture

Head of scientific research – **Marine Bezhuashvili**

Doctor of Technical Sciens

Official reviewers – **Ramaz Gakhokidze**

Doctor of Chemical Sciens

\- **Mariam Khositashvili**

Doctor of Technical Sciens

Defence of the thesis will take place on 25.06. 2013, 12 at dissertation commission meeting of Georgian Telavi I. Gogebashvili State University, address city Telavi, universitetis st. N.1.

Bulletin was distributed on 24.05. 2013

Dissertation commission
Learned secretary,
Candidate of Chemistry Sciences ---------------------- Mzia Ghagholishvili

Brief overview of the thesis

Actuality of the theme. Scientific studies showed that lately the health condition of the earth population is deteriorating. This problem is associated with several facts, such as: deficiency of vitally important supplements for human body, ecological problems, modernization of food products, nutritional deficit, stress and etc. Intensive usage of chemicals, exhausted soil and genetic engineering greatly decreased the number of micronutrients residing in the plants and it is almost 100 years that human are born with constant and hard deficit of such elements. It could be mentioned that modern lifestyle has greatly changed the structure of nutrition, in the nutrition ratio the usage of macro nutrients (fat, cholesterol, saturated fatty acids, simple sugars), rafinated food products were increased and the number of necessary micro nutrients (food fibers, vitamins, micro elements, non-saturated fatty acids and etc.) were decreased.

In the human body each cell needs from 600 to 650 different type of food substances - nutrients, which are irreplaceable and are not synthesized in the human organism. For about 32 different type of food products, more than 15 vitamins and more than 20 microelements should be included in the human nutrition ratio, without them the human organism could not survive.

The best solution for this problem was the creation of balanced product containing natural ingredients, which was known under the term "biological active supplement" (in English food supplements), so called BAFS.

Human health depends on genes for about 10 %, on medical intervention for 15 % and on ecological factors, nutrition and lifestyle for 70%. In the existed situation the leading scientist believe that the most effective solution of the problem is to produce BASF, which could fully satisfy the demand of the organism with irreplaceable substances.

Usage of the BASF, which is doubtless important product, causes the following: 1. Makes quick liquidation of the deficit of necessary food substances for human; 2. Adjusts the food upon the individual needs; 3. Increases the strength of durability against the unfavorable conditions, due to cell fermentative defense; 4. Increases and intensifies unnecessary substance binding and their discharge from the organism.

We should always remember that BASF is not a medicine! It belongs to food products, which is characterized by special biological activity. It could be used as: 1. Nutrition correction; 2. Disease prevention; 3. disease treatment.

Due to before mentioned, newly scientifically proven technology of biological active supplements is an actual direction that should be studied.

Goal of the research. The goal of the research was to establish technology of natural biologically active food supplements originated from the grapes - BASF and identification of new biological active food supplements.

Research tasks:

- Research and usage of concentrated juice made from Saperavi grape variety;
- Usage of Saperavi vine stem as grape processing leftover and studying new biological active substance;
- Study of the leftover after vine trimming and making natural stilben concentration from them;

- Usage and research of aroma forming and phenolic components of thymus serpyllum spread in Georgia;
- Maintaning the technology of making non-alcoholic biologically active food supplement originated from grape.

Scientific novelty

- The existence of biologically active stilbenoid glucosides: trans-resveratrol glucoside trans piceid (4'5 dihydroxy - stilben - 3 - O - β - D - glucopyranoside) (polydatine) and also ε-viniferin glucoside were identified;
- Biological active substance acetovanillone (apocynin) was identified from saperavi grape stem and its biological activity was determined;
- From water-ethanol extract of thymus serpyllum: biological active isoflavone - formononetin and cynaroside (luteonile glucopyranoside) were identified; also their antioxidant activity was determined;
- Natural stilben concentrate is made from one year vine sprout, besides stilbens it contains lignan - α- conidedrin;
- Antioxidant activity towards the phenolic content of BAFS was determined;

Practical importance of the thesis

- Technology of making biological active food supplement (BAFS) rich with active natural phenolic compounds originated from grapes was established;
- BASF among the phenolic compounds contains the following biological active trans-resveratrol, trans-piceid, ε - viniferin, apocynin, α - conidedrin, formononetine, cynaroside and etc.;
- BASF belongs by its functionality to the product which is characterized by antioxidant activity, which has curative-prophylactic value;
- Based on mathematical modeling BASF "Georgian Vitae rimas XXI" was projected due to informative-analytical database.

Approbation. Result of the thesis are reviewed and presented at 2010-2013 year scientific council meetings of Telavi I. Gogebashvili State University faculty of agriculture sciences.

Publication. Round the thesis 8 works were published, among them one was published at International Conference,another was published as scientific conference thesis of Telavi state University; Novelty is confirmed by invention patent.

Structure and volume of the thesis. Thesis consists of: brief overview of the thesis, literature overview, experimental part, results, list of literature used, transcription, abbreviation, definition of abbreviation and enclosure. The page number of thesis is ..., contains ... tables, ... charts.

II. Experimental part

II.I. Research methods and objects

Objects. For research objects we used:

1) **Concentrated juice of Saperavi grape** - which was produced at the enterprise using - three-stage direct streaming evaporator "EC 316/3". ("Della tofola", "Fenko"). LTD "Gruzvinprom", Town Gurjaani.

2. **Water-ethanol solution made from Saperavi vine stem**. We have selected Saperavi 2010-2012 vintage grapes during their technical ripeness, due to its appellation zone, particularly from Akhasheni (papris veli), Kardenakhi (Akhoebi), Kindzmarauli, Tsinandali and Napareuli vineyards. We made water-ethanol solution of Saperavi stem as leftover after grape processing. It was dried at the air, then granulated. Water-ethanol extraction methods were used.
3. **Natural phenolic concentrate containing stilbens**. We used one-year vine sprout (vine trimming leftover). We have granulated the vine sprout to extract the stilbens, dried them at the air and made extraction via ethanol under the heat. Due to special scheme of extraction we got the phenolic concentrate containing the stilbens, which we used to produce biologically active food supplement.
4. As aromatization we used the water-ethanol solution of upper part of thymus serpyllum picked in east Georgia, particularly fromreserved areas of Tusheti. We used granulated and air-dried object for the solution using water ethanol extraction method.
5. Biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI" which we produced via new technology was studied organoleptically, due to chemical characteristics and also according to the content of biologically active substances.

Methods:
1) **High-performance liquid chromatography method**. We determined the identified stilbenoids and phenolic compounds - acetovanillone (apocynin), α - conidedrin, formononetine and cynaroside via high performance liquid chromatography method under the conditions relevant for specific substances.
a) For stilbenoids we used: chromatography - "Varian", column - Mikrosorb 100 C18, 250X4, 6 LXId (mm); eluent A: 0,025% triftor acid; eluent B: acetonitrile (ACN)/A, 80/20. Identification was carried under the gradient regime: 0-35 wT 20-50%, B35-40 wT 50-100%; 41-46 minutes 100%; 46-48 minutes 100-20%; 48-53 minutes 20%. Length of the wave was 306 nanometer. Eluent transition speed was 1 ml/min (Gibelia and others 2006).
We used thin layer chromatography method for conducting the qualitative analysis of stilbenoids on silicagel plate (Sorbfil, ПТСХ- П-А 10x20). Organic solvent mixture - chloroform : methanol (80:20) were used for system and chromatograms were developed by diazotized sulfanilic acid.
b) Determination of acetovanilone (ponicinin), α-conidedrin, formononetin and cynaroside was conducted via liquid chromatography "Varian. Prostar", using the following conditions:
column - Supercosil Lc-18-DB. 25 smx4,6mm, 5μm. Eluent A-0,5% H_3PO_4 - water solution; eluent B-50% acetonitrile; 0,5% H_3PO_4; 49,5%- H_2O. Speed of eluent transition 1ml/min., detector - ultraviolet. Quantative chromatography of each substance was conducted at different wave length:acetovanillone - 269 nm, α - conidedrin - 206 nm, formononetin - 201 nm, and cynaroside - 207 nm.

The before mentioned substances were selected individually from the relevant research institutes: acetovanillone (apocynin) and α-conidedrin - from Latvian state institute of wood chemistry (City - Riga); formononetin and cynaroside - from the Institute of chemistry of Plant Substances of the Academy of Sciences of Uzbekistan (city Tashkent). We used these substances as testifiers. In order to identify the research

objects from the substances we have extracted them individually via preparation using silicagel.

Identification of individual substances from the research objects was conducted based on ultraviolet, infrared specters and melting temperature, compared with relevant witness substances and also we have considered chromatography indication: chromatography spot Rf and color after revealing the spot. Melting temperature was determined using the tool "MEL TEMP 3". Ultraviolet specter was done via spectometer "VARIAN", CARRY 100, and infrared "THERMO NICOLET", AVATAR 370.

Quantitative spectrophotometric determination at ultraviolet part within 200 - 300 nm interval of individual substances and optical density for building their caliber diagrams was done using spectrophotometer "GENESYS 10uv". As for spectrophotometric determinations above 300 nm wavelength we used spectrophotometer "UNICO".

2) **Method of Gas chromatography**. To determine the components of aroma formation in the aromatic mixture of Thymus Serpyllum first we have isolated pentane-ether fraction. We have fully extracted pentane-diethyl ether mixture (2:1). We processed pentane ether fraction first with water, then with 2% $NaHCO_3$ solution. To dehydrate the processed fraction we added non-watery Na_2SO_4 and left for some period. Afterwards we filtered it at 17-18^{0}C temperatures and under the same temperature evaporated it in a special glass vessel. The concentration was analysed via gas chromatography method under the following conditions: the chromatography was carried at "Perkin Elmer. Clarus 500"; capillary column - "Supelcowax 10"; 60mx0,25mm. Nitrogen carrier. Speed 1ml/min.

3) **Identification of catechins**. We used ethylacetate fractions extracted in advance to carry both qualitative and quantitavie determination of catechins. As for qualitative analysis we used papare chromatography method n-buthanol : acetic acid : water (4: 1: 2). Chromatograms were developed by vanillin reagent. Methods of spectophotometer at 500 nm was used to conduct quantitave analysis of catechins. Both catechins and polymeric proanthocyanidins were determiend from ethyl acetate fractions.

4) **Determination of phenolic acids**. We have extracted the ehanol from water-ethanol solution of vine stem, added alkaline, concentrated at the boiling water bath, afterwards we have added alkaline to the concentrated mass, extracted with diethyl ether fraction and analysed it via thin layer chromatography method (Sorbfil, ПТСХ- П-А 10x20). As system we used organic solvent - chloroform : methanol (90: 10) and developed the chromatograms by diazotized sulfanilic acid.

5) **Qualitative analysis of carbohydrates**. We have done the qualitative analysis of carbohydrates produced via acid hydrolysis using paper chromatography method. As system we used mixture of solvents: buthanol - ethyl acetate - propanol - acetic acid - water (35 : 100 : 62 : 35 : 30). We have developed the chromatograms using ammonium chloride and alkali mixture of ammonium molibdate (Shkolnik and etc., 1960).

6) **Determination of antiradical activity**. We have determined antiradical activity of phenolic compounds identified by us and biologically active food supplement using electro paramagnetic resonannce (EPR) method (Gardner, 1998).

7) **Determination of elements**. Macro elements - K, Na, Ca, Mg and iron content was examined by atomic-absorbent spectometer.

Analysis were done via high perfomance liquid chromatography at the central laboratory of the Institute of Viticulture, Enology and Horticulture. Antiradical activities were

determined at Iv. Javakhishvili State University. Ultraviolet, infrared specters and melting temperature of subtsances were determined at the institute of medical polymers and materialsof Iv. Javakhishvili state University.

II. 2. Research of biologically active stilbenoid glucosides found in Saperavi grape juice

Due to the fact that Saperavi grape juice is regarded as the main ingredient of biologically active food supplement produced via technology elaborated by us, we have carried experiment to identify stilbenoid glucoside found in Saperavi grape juice.

We used different versions of Saperavi grape juice harvested in 2011: a) natural grape juice; b) the same juice but concentrated; c) acid hydrolisate of the same juice; d) vacuum juice of Saperavi produced at enterprise. We have extracted grape juice mechanically, filtered and distilled by ethyl acetate three times at room temperature. The ethyl acetate fractions were combined and concentrated at rotary distiller at temperature of 40^0C.

We have boiled and concentrated the same grape juice, so that the volume was decreased three times (we received 100 ml of concentrated juice from 300ml). We have extracted the given juice using ethyl acetate. Initial grape juice for acid hydrolisate has undergone the before mentioned conditions, afterwards we added concentrated HCL, so that acid concentration in the reaction area was 10% and hydrolysis was conducted at the temperature of 80^0C during 3 hours.

Accordingly using the same concentration acid hydrolysis was conducted during boiling. Hydrolisates were extracted and neutralized via ethyl acetate, after this we concentrated them at rotary distiller and analyzed them.

The qualitative analysis of ethyl acetate fraction was conducted via thin layer chromatography (Sorbfil, ПТСХ- П-А 10x20; system – chloroform: methanol, 80:20). Chromatograms were developed by diazotized sulfanyl acid

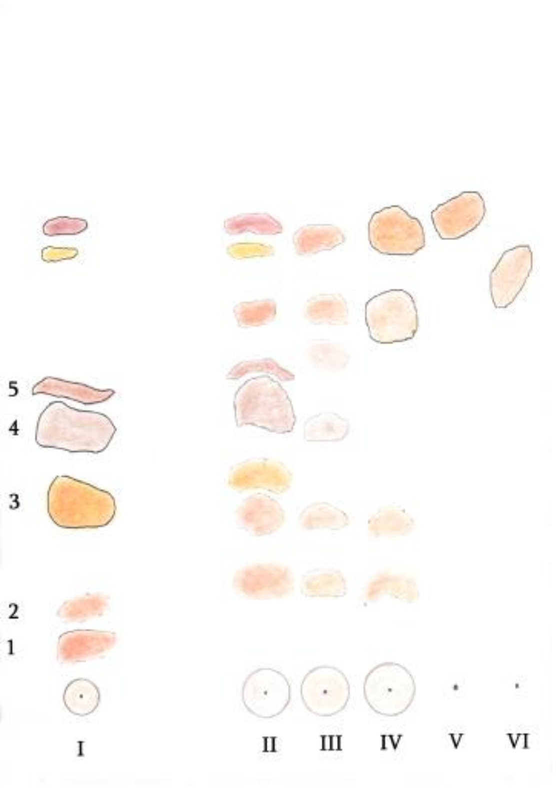


Figure II.2.1. thin layer chromatography of ethyl acetate fractions of Saperavi grape juice. system chloroform : Methanol (80 : 20). I. grape juice; II. grape must; III. concentrated grape juice; IV. acid hydrolisate of grape juice; V. trans-resveratrol; VI. ε -viniferin; 4. non identified substance.

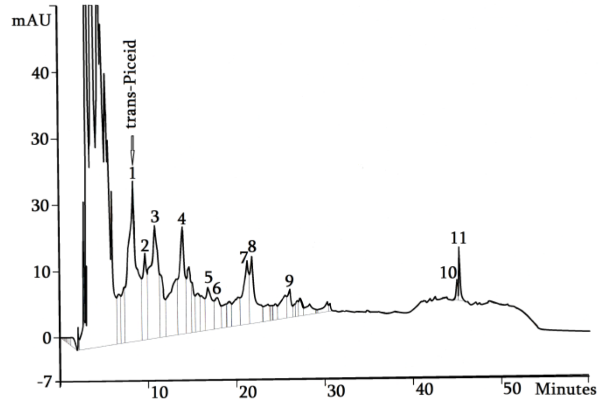
New substances are developed due to acid hydrolysis, which are not presented in the juice, during juice fermentation they appear with little quantity (pick N.5, RT-16, 757min; pick N.9, RT - 26,080 min), but due to acid hydrolysis they are increased greatly (pick N.7, RT - 16,86 min; pick N.12, RT - 26,128 min) (figure II.2.2a,b)

Table II.2.1.

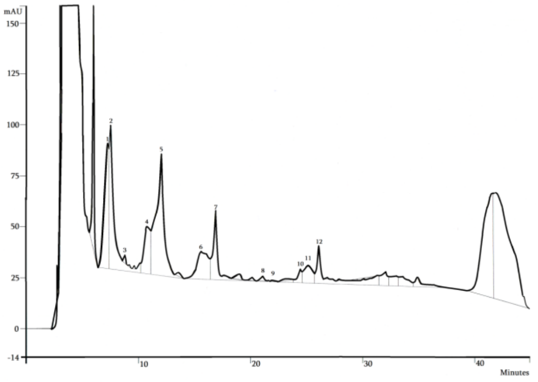
Chromatography characteristics of research substances

Substance, N	Rf	Spot color	Revealing Reagent	System
1	0.093	Brownish-orange	Diazotized sulphanilic acid	Chloroform: Methanol (80:20)
2	0.187	Brownish-orange	Diazotized sulphanilic acid	Chloroform: Methanol (80:20)
3	0.26	Yellow	Diazotized sulphanilic acid	Chloroform: Methanol (80:20)
4	0.39	Brownish-orange	Diazotized sulphanilic acid	Chloroform: Methanol (80:20)
5	0.51	Bordeaux	Diazotized sulphanilic acid	Chloroform: Methanol (80:20)

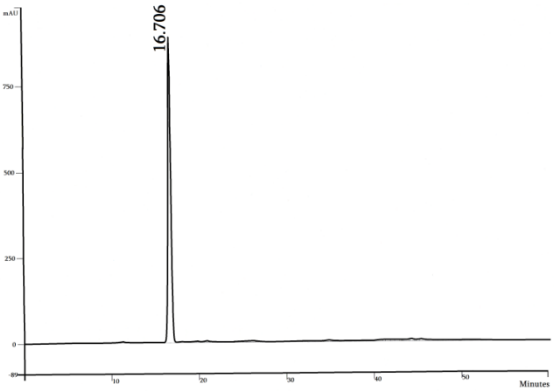
Individual substances with Rf produced via acid hydrolysis, by ultra violet illumination and by maximum absorption in ultra violet spectrum is identified as trans-resveratrol and ε -viniferin using high performance chromatography (Figure II.2.2.c,d) .



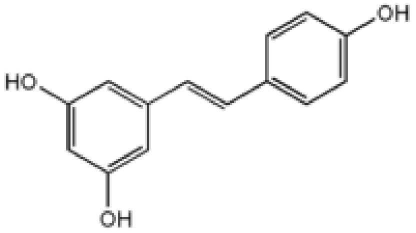
a



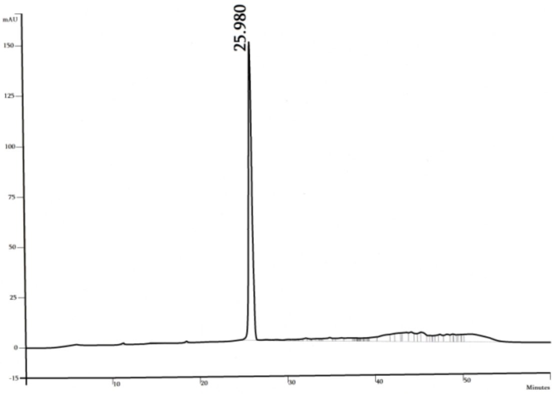
b



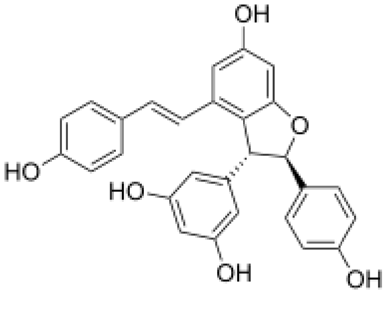
c



Trans-resveratrol



d

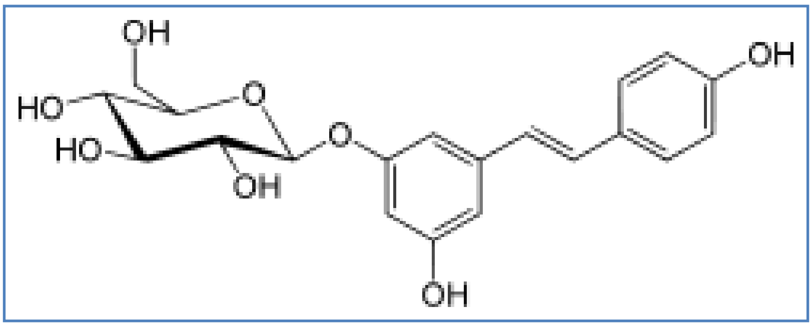


ε-viniferin

Figure II.2.2. a) concentrated Saperavi grape juice, b) acid hydrolisate, c) trans-resveratrol d) ε - viniferin liquid chromatography of concentrated Saperavi grape juice

Existence of aglicones, trans-resveratrol and ε-viniferin among hydrolysates and glucose among monosaccharides indicate that Saperavi grape juice contains forms of glucosides - accordingly trans-piceid and glucoside of ε -viniferin. It could be noted that the amount of trans-resveratrol in grape juice depends on the method of juice production. Namely the natural grape juice has only the sign of that substance. The same juice, with natural organic acids partly undergoes the hydrolysis during concentration, so that newly created concentration of trans-resveratrol is 0,4 mg/l. But as a result of acid hydrolysis concentration of trans-resveratrol is increased up to 7,3 mg/l. Concentration of trans-resveratrol in Saperavi grape vacuum juice is 1,32 mg/l, due to half acid hydrolysis it is increased up to 3,08 mg/l, and by full hydrolysis becomes 21,8 mg/l. Concentration of ε -viniferin in grape juice is 1,32 mg/l, due to acid hydrolysis it was increased up to 11,25 mg/l. This change indicates that ε-viniferin in grape juice is presented by glycoside form.

Substance N.4 (Figure II.2.1.) due to acid hydrolysate produces trans-resveratrol. Within the ultra violet area it is characterized by maximum absorption capacity at 308 and 335 nm. This substance was identified as trans-piceid (4,5 - dyhydroxstilben-3-O-β-D-glucopyranoside) (polydatin).



Piceid$C_{20}H_{22}O_8$; Mr-390

Due to the mass portion of trans-resveratrol in trans-piceid molecule and amount of trans-resveratrol produced by hydrolysis, natural juice produced mechanically contains the concentration of trans-piceid up to 12,4 mg/l. Vacuum juice of Saperavi vine variety used in the production industry contains up to 35,4 mg/l, the difference is caused by grape pressing and juice concentration.

Biological activity of stilbenoids is determined towards different directions; particularly they reveal antioxidant (piver and etc., 2003; Chang and etc. 1992), anti bacterial (Bavaresko and etc. 2008), anti virus (Orsin and etc. 1997) and other activities. Due to this activity they have curative-prophylactic influence against heart-vascular, ischemic, cancer and other diseases (Yang and etc, 1997, Szmitko and etc. 2005; Klatsk and etc. 1997; Balestriel and etc. 2008).

As a result of the conducted experiment trans-resveratrol glucoside piceid (4^i,5-dyhydroxystilben-3-O-β-D - glucopiranoside) and ε-viniferin glucoside were identified in Saperavi grape juice. Content of stilbenoid is a positive characteristic for Saperavi grape juice and also for biologically active food supplement - "Georgian Vitae rimas XXI", as it gives them curative-prophylactic value (Bezhuashvili and etc. 2013).

II.3. Identification of Acetovanillone (Apocynin) from water-ethanol extract of the stem of Saperavi vine variety

The research goal was to study the phenolic compounds found in Saperavi vine stem as leftover of grape proccessing and to produce stem extract rich with phenolic compounds. We used Saperavi vine stems spread in different regions of Kakheti (during technical maturation period, leftover after grape processing). According to Saperavi vine appellation zones we selected the following micro-zones: Akhasheni (papris veli), Kardenakhi (Akhoebi), Kindzmarauli, Tsinandali and Napareuli vineyards.

Saperavi vine stem was dried at air up to 15-20% dampness, crushed them up to 0,1 - 0,5 mm size and conducted the extraction via 80% ethanol (we have done the extraction by stages, duration of a single stage was 30 min, at 80 ^{0} C temperature). We studied the phenolic content of the extract. Particularly we determined total phenolic compounds, proantocyanidins (Olygomeric and polymeric) and catechins.

As table II.3.1. data shows that polymeric proantocyanidins dominate other phenolic compounds, which are presented nearly with similar amount in the stems of Kardenakhi and Akhasheni Saperavi vine, but the amount of other phenolic compounds prevails the content of proantocyanidins found in Kindzmarauli, Napareuli and Tsinandali Saperavi vine stems.

TableII.3.1. Content of phenolic compounds in Saperavi vine stem % m.m.m.

№	Name of Appelation zone	Total phenols	Olygomeric proantocyanidins	Polymeric proantocyanidins	Catechins
1	Akhasheni	12,9	3,7	7,0	1,5
2	Kardenakhi	13,3	3,9	7,5	1,3
3	Kindzmarauli	12,6	3,2	7,2	1,0
4	Tsinandali	12,5	3,5	7,0	1,2
5	Napareuli	12,5	3,6	7,1	0,9

We have prolonged the research with water-ethanol extract of phenolic compounds and studied qualitative content of phenolic acids and phenolic aldehydes. Due to this reason we have elaborated the extract via special scheme elaborated in advance.

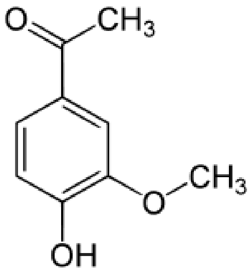
In Saperavi vine stem mixtures the following phenolic acids are found: vanillin, lilac, protocatechic, galis, para-cumaric, caffeic and ferulic acids. Also 4-oxybenzaldehyde was identified. Among phenolic acids dominates lilac acid.

Due to phenolic acid content the research objects have no difference. Our attention was paid towards the unknown substance of redish-orange spot, which did not coincide with any kind of phenolic acid and therefore decided to identify this substance. The research substance was extracted individiually as preparation on the glass plate covered with silicagel. We used individual substances - acetovanillone (apocynin) and acetosyringon as comparision method to identify the substance. Acetosyringon was not identified. According to chromatography data Rf-0,93 and spot color, research object coincided with acetovanillone (apocynin), though to conduct the full identification we have carried ultraviolet and infrared spectroscope analysis and determined the melting temperature.

Spectrum characteristics are the following: ultraviolet spectrum (diethyl ether) λ max (nm)-228; 269 ; 303. Infrared spectrum (cm $^{-1}$) – 3293 (OH-phenolic); 1658 (C =O

carbonic group); 1573 (aromatic nucleus C = together with chain); 1511 (aromatic nucleus chain waving); 1450 (C-H chain methoxyl group); 1357 (phenolic OH); 1288 (C-O-C methoxyl); 1187 (methoxyl group- OCH_3).

Research mixture is melting at 114-115^{O}C. According to the spectrum data and other data indication research substance is totally relevant with compared acetovanillone, based on this it is identified as acetovanillone (apocynin). Identified substance is soluble in the water, acetone, water-ethanol solvent, though poorly soluble in the cold water.



Acetovanillone (apocynin) $C_9H_{10}O_3$

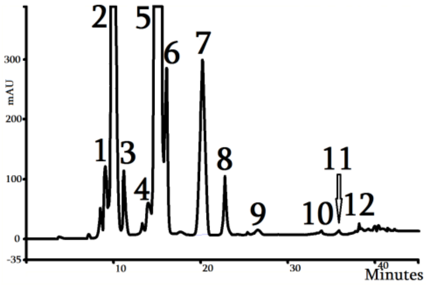


Figure II.3.1. liquid chromatography of water-ethanol diethyl ether mixture of Saperavi vine stem. 7- acetovanillone.

Concentration of acetovanillone is - 5,2 mg/l. Acetovanillone content of water-ethanol extract ofSaperavi is showed in the table II.3.2.

Table II.3.2.

Content of Acetovanillone (Apocynin) in water-ethanol extract of Saperavi vine stem (mg/l)

Name of Saperavi appellation zones	Concentration mg/l
Akhasheni	5,2
Kardenakhi	4,7
Kindzmarauli	4,0
Napareuli	3,7
Tsinandali	4,5

The experiment showed that apocynin content is about 3.7-5.2 mg/l in water-ethanol mixture of Saperavi vine stem. The maximum quantity was determined in Saperavi vine stem mixture of Akhahseni micro zone.

We have determined antiradical activity of extracted acetovanillone (apocynin) via EPMR method, that gave result up to 33%. For the first time among phenolic compounds of Saperavi vine stem low molecular biologically active supplement acetovanillone (apocynin) was identified (Elanidze and etc. 2013).

II. 4. Research of Stilbenoid content concentration

Due to the fact that one year vine trimming leftover is rich with natural stilbenoids and the stem which we use for the production contains little amount or does not contain at all, we decided to study stilbenoid content concentration content and use it for the production of biologically active food supplement. Due to this reason we used one year vine trimming leftover, crushed it, dried at the air and make an extraction via 96% ethyl alcohol at 80-90 ^{0}C temperature using backfridge. We have done extraction by stages.

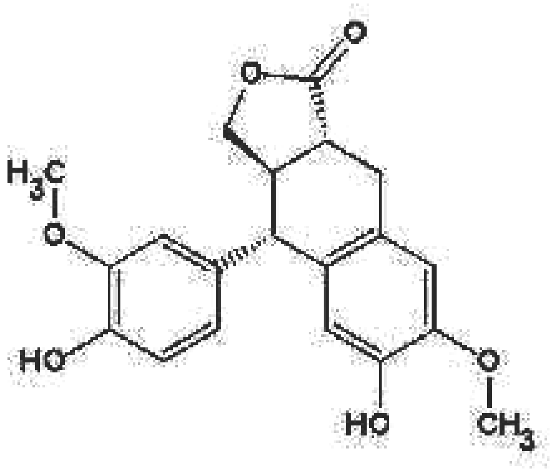
After full extraction we combined extracts, concentrated them at vacuum-evaporator and afterwards as a result of special technological stages extracted stilbenoid fractions.
Qualitatively some stilbenoids such as: trans-resveratrol, ε-viniferin, tetrameric stilbens and also non-identified stilbenoid mixtures are localized there. Except stilbens polymeric proantocyanidins and catechins were identified in vine trimming leftover concentration. (table II.4.1.)

Table II.4.1.

Physicochemical characteristics of concentration containing stilbens received from vine trimming leftover.

Name of indication	**Norm**
Color	Brownish
Transparency	Non-transparent, condensed liquid
Taste	Astringent-tannic
Total phenols gr/l	12,0-14,0
Trans-resveratrol mg/l	650-750
ε-viniferin, mg/l	300-350
Catechins, mg/l	130-150
Proantocyanidins, gr/l	8,5-9,7

Next to the stilbenoids on the thin layer chromatography unknown substance was revealed, therefore we decieded to identify it. We have extracted it via preparation chromatography method. Ultraviolet specter: (EtOH), λmax 206 nm and 284 nm; infrared specter: (Vaseline) (cm^{-1}) , 3401 (OH phenolic), 2923, 1758,1511,1457. Research substance melts at 247-248^{0}C temperature. As we have compared specter, spectophotometer and chromatography data of research substance and individual α -conidedrin, they appeared identical. Existence of α -conidedrin next to the biologically active stilbenoids is a positive fact in the view for its future usage. Antiradical activity of α -conidedrin is identified up to 35% (Elanidze and etc. 2012).



α-conidedrin $C_{20}H_{20}O_6$ Mr-356

II.5. Receiving and research of vegetable aromatizator

Different vegetable materials are characterized tp contain special aroma formation substances. These substances which are known as ether oils are presented mainly as ethers, terpenic compounds, alcohol and etc. Ether oils are used in food production technology to acquire special aroma. Among aromatic plants thymus serpyllum takes special place. Due to the all of the before mentioned we decided to study and use thymus serpyllum aroma forming substances, as water-ethanol mixture type.
For this reason we have selected upper parts of thymus serpyllum spread in Tusheti reserved areas, dried at the air, crushed them and made water-ethanol mixture using 40%

ethyl alcohol. Aroma forming components were extracted using pentane-ether (2:1) mixture and analysed them via gas chromatography method.

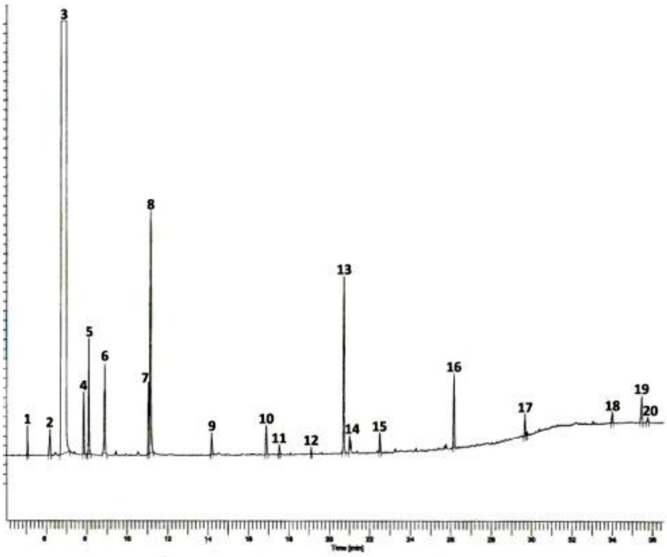
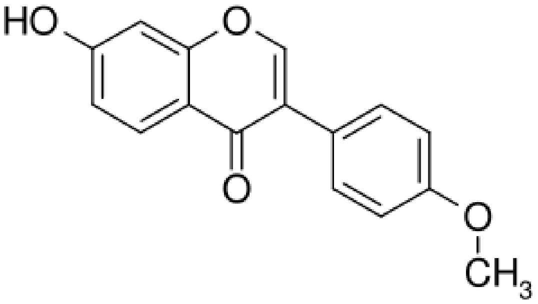


Figure II.5.1. Gas chromatography of aroma forming Thymus Serpyllum water-ethanol mixture substances; 3 - pinen; 6 - myrcen; 7 - limonen; 9 - terpinolen; 12 - linalool; 13 - carvacrol; 14 - timol; 15 - citronella

Water-ethanol mixture of thymus serpyllum contains different aroma forming substances, such as: α -pinen, mircen, limonen, terpinolen, linalool, carvacrol, timol, citronella and with different types, α-pinen is dominant among them (figure II.5.1.). With favour of these substances water-ethanol mixture of thymus serpyllum is characterized by special strong aroma. Because we have chosen water-ethanol mixture as purpose product - to use it in production technology of biologically active food supplement, we decided to study its phenolic compound content.

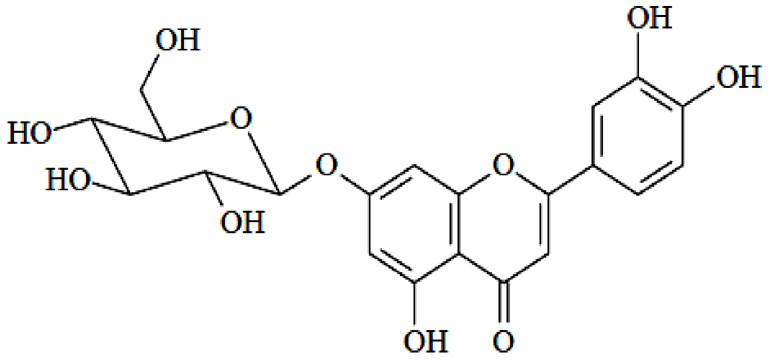
Results of thin layer chromatography revealed unknown substance, which is characterized by Rf0,8 and as a result of development gives us an intensive yellow spot. The mentioned substance does not coincide with any phenolic acid, neither lignan, nor phenolaldehyde, though comparing with izoflavon formononetine due to chromatography comparision the similarty was found (Rf and due to tint of spot). Except data of chromatography research substance was extracted by preparation and spectrum analysis was conducted. Due to the given data and on the basis of individual formononetin comparision, they found to be identical and extracted compound by preparation was identified as formononetin.



Formononetin $C_{16}H_{12}O_4$ Mr-268

Concentration of formononetin of thymus serpyllum in water-ethanol extract was 0,5 mg/l. As a result of water-ethanol extract of thymus serpyllum analysis the content of flavonoids - rutin, quercetin, luteonile and the content of low Rf of unknown subtsance existence was confirmed. It could be also mentioned that chromatogram of ethyl acetate fraction which was revealed using vanillin reagent gives intensive pink spots relevant with(+) catechin, (-) catechin and galocatechin.

We decided to study uknown substance which has flavonoid nature. Due to this we have extracted it via preparation, made its ultraviolet, infrared specters, determined the melting temperature and conducted acid hydrolysis via 4 N HCL. Hydrolisate was extracted via ethyl acetate. Chromatography revealed luteonile extracted from hydrolisate, which is fully relevant with substance extracted from individual cynaroside hydrolisate. It was confirmed that except results of hydrolyses via spectrum data research substance and individual cynaroside were found to be identical. The melting temperature of research substance is 240-242^{0}C.



Cynaroside $C_{21}H_{20}O_{11}$ Mr-286

Concentration of cyanroside in water-ethanol mixture was 2,7 mg/l. Antiradical activity of cynaroside is 21-54% which was revealed via EPMR method.

II. 6. Colloboration of production technology of biologically active supplement "Georgian Vitae rimas XXI"

As we have mentioned before the goal of the research is an elaboration of rational technology of producing biologically active food supplement originated from grape. Due to this reasonnew biologically active natural substances next to the phenolic compounds was revealed by us. Particularly acetovanillone(apocynin) was revealed in the stem of Saperavi vine;trans-resveratrol glucoside trans piceid (polydatin) in Saperavi grape juice - and ε - viniferin glucoside, in the stilbenoid concentrate with trans-resveratrol, ε-viniferin, tetrameric stilben and etc. Besides stilbenoids lignan α-conidedrin were determined. In the aromatic extracts of Thymus serpyllum isoflavone formononetin and luteoyl glucoside - cynaroside were determined.

Due to before mentioned we decided to preserve maximum number of biologically active substances identified during technological processes. First of all we have conducted the experiment to select the optimal regime for receiving phenolic compounds from Saperavi vine stem.

Due to this we decided to establish the content of phenolic compounds and optimal conditions of their extractions found in Saperavi vine stems spread in different regions of Kakheti. For this reason we picked vine stems from Akhasheni (papris veli), Kardenakhi (Akhoebi), Kindzmarauli, Napareuli and Tsinandali appellation zones during their technical maturation phase (grape processing leftover). The factors influencing he extraction quality were: the quality of crushing the raw materials, concentration of ethanol and extraction duration period.

For receiving water-ethanol mixture rich with phenolic compounds of Saperavi vine stem the optimal parameters were the following:the quality of stem crushing - 0,1 -0, 5 mm, ethanol concentration - 40% and delay time period 14 days.

In order to choose which extract will be appropriate mixture made under room temperature for biologically active food supplement production, we have studied them comparatively under room temperature during a month of formation-delay period. After we examined the soluble phenolic compounds time by time the number of phenolic compounds decreased greatly in the water-ethanol extract made from stems under hot conditions. As diagram II. 6. 1 (a) shows this decrease begins after a week of delay and within a month the concentration of soluble phenolic compounds received by hot extraction method in a water-ethanol extract equals the concentration of phenolic compounds existed in the water-ethanol mixture of the stem.

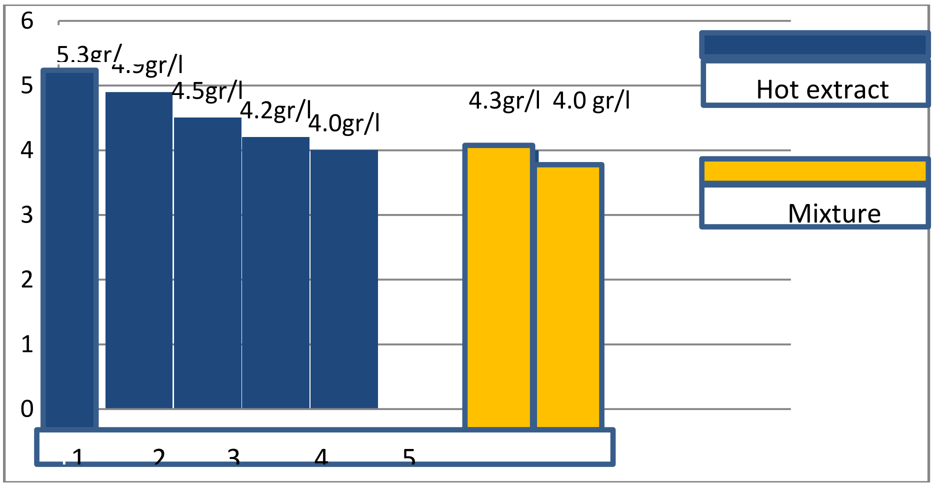
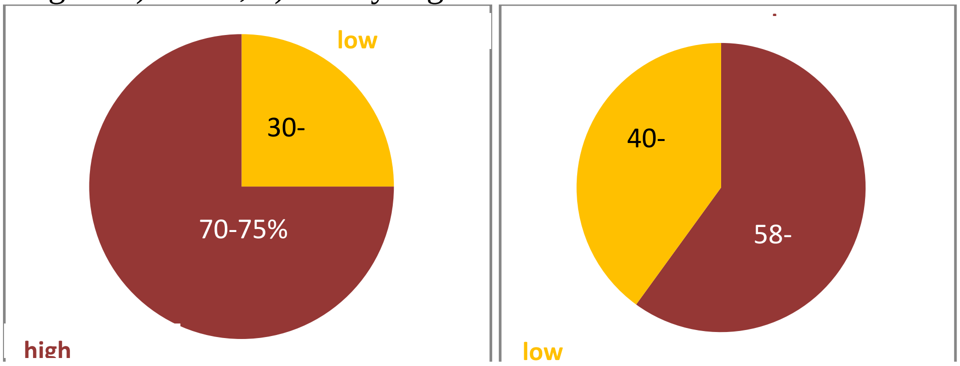


Diagram II.6.1 (a) quantitative change of phenolic compounds of Saperavi vine stem during one month delay 1) initial; 2) 7 day-night; 3) 14 day-night; 4) 21day-night; 5) 30 day-noght. 6) Initial; 7) 30 day-night.



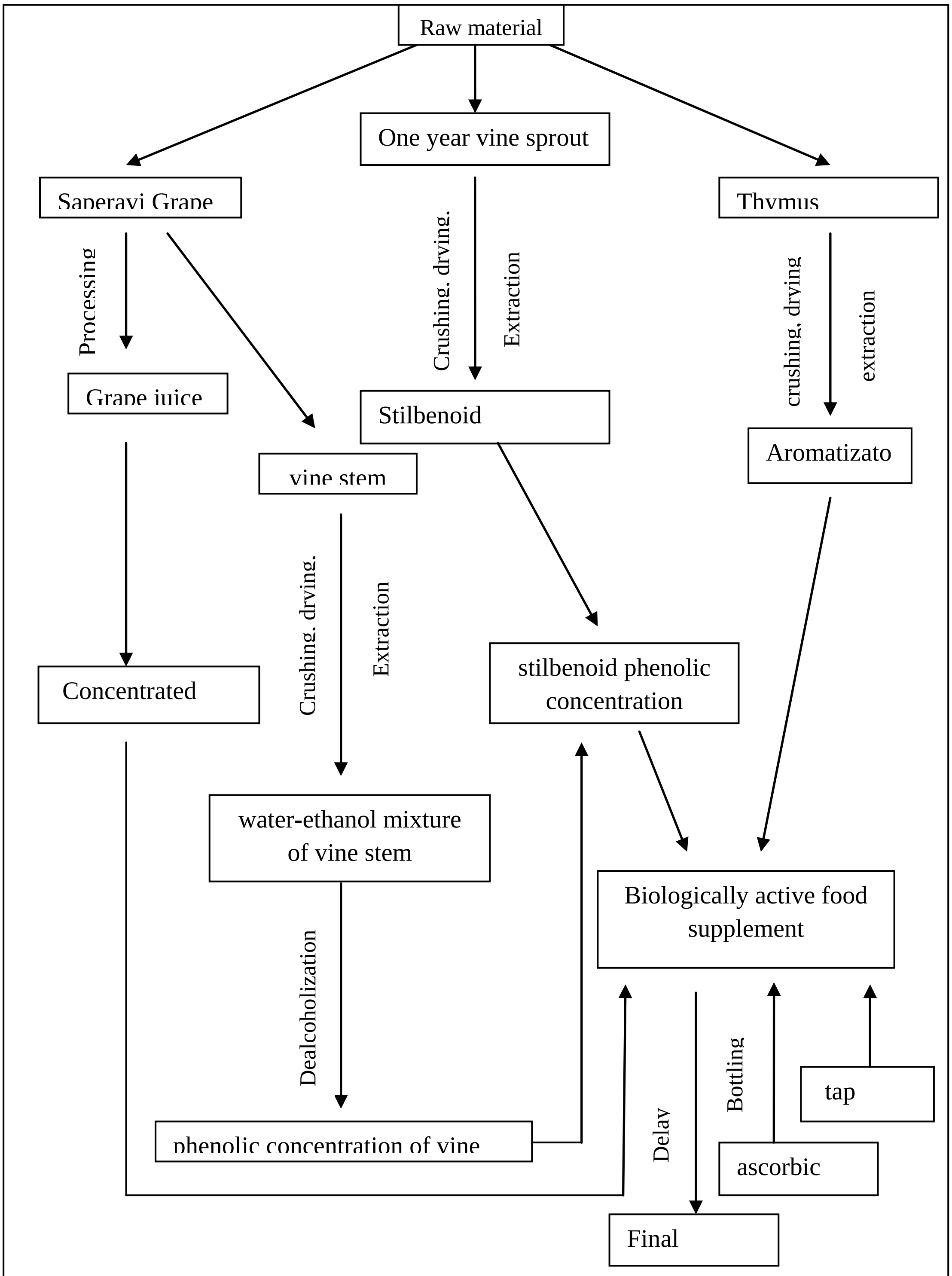
Initial After delay

Diagram II. 1. (b). Change of phenolic compounds of Saperavi vine stem during a month delay

Also the experiments confirmed that the quantitative decrease of phenolic compounds is caused by decrease of the number of polymeric proantocyanidins, meaning that decrease of phenolic compounds in the extract received via hot extraction is caused by sedimentation of proantocyanidins (diagram II. 6. 1 b). Particularly in the initial extract distribution of polyphenols and low molecular phenolic compounds made under hot conditions was 70-75% and 25-30%. Due to a month delay the distribution was changed accordingly: 58-60% and 40-42%. Due to before mentioned we decided to use 40% water-ethanol mixture of Saperavi vine stem to produce biologically active food supplement. During elaboration of production technology we decided to use not only water-ethanol mixture and stilbenoid concentration separately but to use whole phenolic concentrate in BASF technology. We made BASF according to different versions, which was analyzed as organoleptically as well as via chemical characteristics. We have chosen optimal version and developed technological scheme of biologically active food supplement (Scheme II.6.1.). According to the scheme the production

technology of biologically active food supplement "Georgian viate rimas XXI" was developed accordingly:

Saperavi grape is selected, processed, grape juice is concentrated at three stage direct stream evaporator "EC-316/3" and concentrated grape juice is received, which is stored in special aseptic bags;



Scheme II.6.1 Production technology of Biologically active food supplement "Georgian Vitae riams XXI"

Stem is dried at the air, crushed in 0,1-0,5 mm size, extracted by 40% ethyl alcohol at room temperature left for two weeks and water-ethanol mixture is received, which is then concentrated at rotary distiller and as a result concentration of phenolic compounds of stem is produced. Concentration is stored hermetically in closed dark glass vessel and stored at fridge.
One year old vine trimming leftover is crushed, dried at the air, extracted by 96% alcohol and stilbenoid preparation benoids produced as a result of special technological steps is extracted. Stilbenoid preparation is combined with phenolic concentration and natural stilbenoid phenolic concentration is produced.

- Upper parts of thymus serpyllum is picked at Tusheti reserved areas, it is dried at the air under the shade, crushed and 40% water-ethanol mixture - aromatizator is produced;
- Coupage of biologically active food supplement is produced accordingly: concentrated grape juice of Saperavi is taken (not less than 65 brix), then dilluted twice with tap water, shaked intensively and 5ml/l of stilbenoid concentration, 30 ml/l of vegetable aromatizator and 50 mg/l of ascrobic acid is added. Coupage mixture is shaked intensively poured into hermetically closed vessel and left for three days at 10-12^{0}C temperature indark and dry place. Afterwards it is bottled in 150-300 ml dark, non-transparent special vessels and is sent for realization.

The storage time of Biologically active food supplement is a month after opening at +5^{0}C temperature (Stored in fridge).
Biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI" should satisfy the characteristics shown in table II.6.1.

Table II.6.1.

Organoleptic characteristics of biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI"

Name of characteristic	Norm
External view	Dense, syrup type liquid
Color	Reddish-brownish
Transparency	Non transparent liquid
Taste and aroma	Special

Continiued

Table II.6.1.

Chemical characteristics of biologically active food supplement "Georgina Vitae rimas XXI"

Name of characteristics	Number
Extracted substances gr/l	330-343
Total phenolic compounds gr/l	10-13
Proantocyanidins gr/l	8-11
Stilbenoids mg/ lTrans-resveratrol Trans piceid ε-viniferin Tetrameric stilben	 30-35 16,0-17,5 18-23 5-7
Catechins mg/l among them: (+) catechins (-) epicatechin (±)galocatechin (-)epigalocatechin	700-900 + + + +
Color substances	1,995
Color intensivity (D_{420}+ D_{520} +D_{620}) K= D_{420}/D_{520}	29,85 1,216
Phenolic acids and phenolic aldehyde among them are: coniferyl aldehyde 4 - oxybenzo-aldehyde para-cumaric acid ferulic acid vanillic acid 4 - oxybenzoic acid lilac acid caffeic acid protocatechic acid galic acid	 + + + + + + + + + +
other phenolic compounds acetovanillone (apocynin) mg/l α-conidedrin mg/l	 2-7 5-8
Elements mg/l K Na Ca Mg Fe	 1008 287,2 54,2 70,8 1,65
Ascorbic acid (Vitamin C) not less than mg/l	50
Antiradical activity not less than %	130

The storage conditions should be considered in BASF technology. Particularly its should be stored in non-transparent, dark, hermetically closed vessel at +5^{0}C for 6 months, after openingexpiration time of BASF is one month (Bezhuashvili, Elanidze, 2013).

II.7. Algorithm of technological processes

Algorithm is the technological process over a certain object, combination of special rules, activities and steps to fulfill different type of operations, which can be used in any kind of field.

The goal of our thesis - technological process of producing biological active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI", as it is seen from the content contains combination of difficult activities. Because of that we decided to create an algorithm. First of all algorithm should help the certain consumers, secondly the computer knowledge basis of the technology (stored in computer hard disk) should give the opportunity to any interested person (Technologist) to use the given data and produce a product independently.

To generalize the technological process and make realization, formalized description of the process is necessary, because of that we used the following indications:

m1 - Concentrated juice of Saperavi grape; m2 - tap water; S - Phenolic concentration containing natural stilbenoid; A - vegetable aromatizator; H - Sugar content; M - Tartaric acid; N - Ascorbic acid; T - time delayed; t - Temperature; d1 - dilution; d2 - mechanical stirring of mixture; k1 - delay at dark and dry place; k2 - bottling of coupage; k3 - storing.

Full algorithm of production technology of biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI" is shown below (figure II.7.1.).

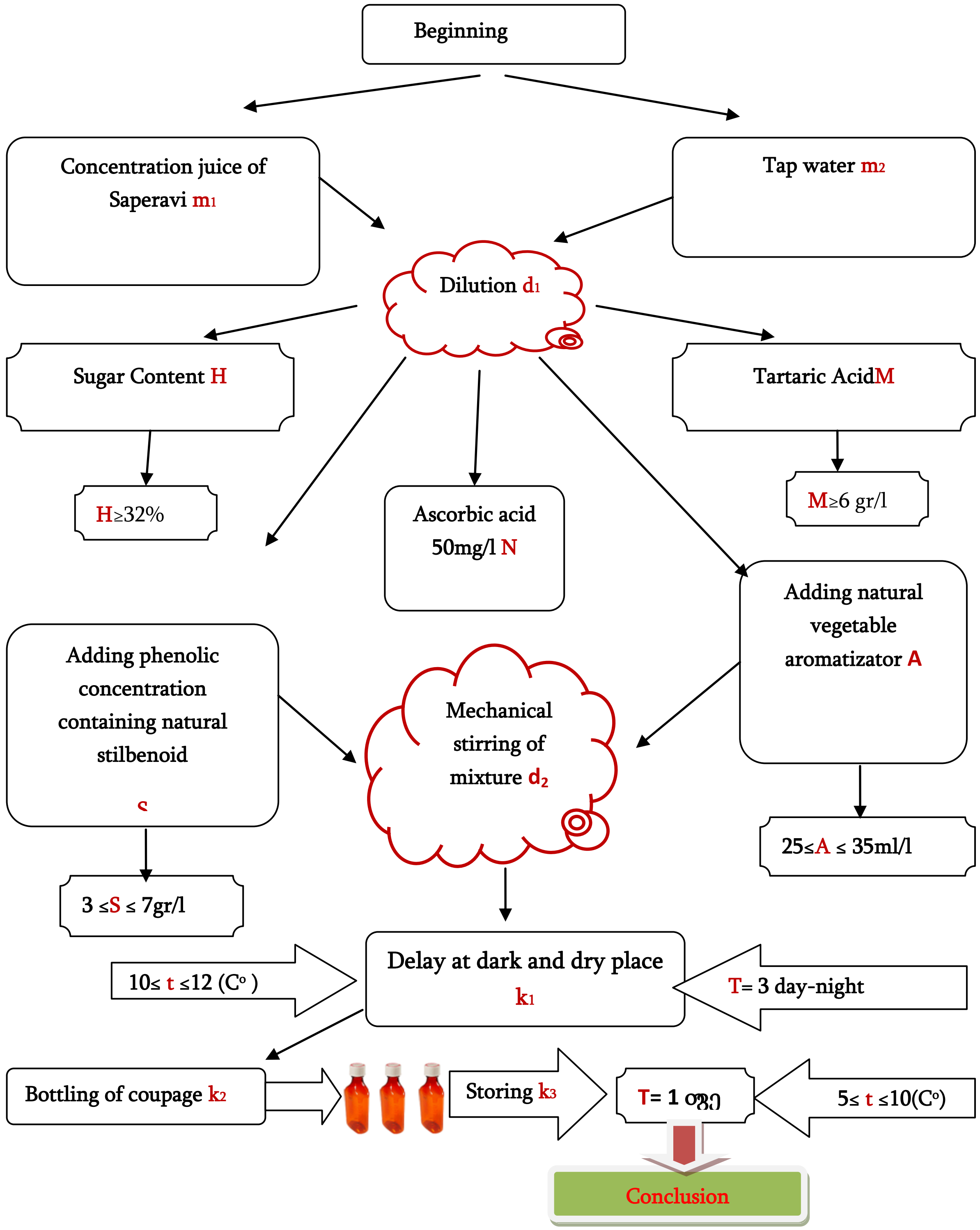


Figure II.7.1. Full algorithm of production technology of Biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI"

Conclusions

1. For the first time in Saperavi vine juice stilbenoid glucoside was identified: trans-resveratrol glucoside trans piceid (4,5 - dyhydro-oxy-stilben-3-O-β-D-glucopyranoside) (polydatin). Trans piceid concentration in Saperavi vine juice is - 12,4 mg/l, but in vacuum-juice is 35,5 mg/l. The existence of ε-viniferin glucoside was also determined in Saperavi vine juice.
2. For the first time biologically active phenolic compound acetovanillone (apocynin) was identified in Saperavi vine stem. The concentration of the substance in water-ethanol extract is 5,2 mg/l. Antioxidant activity of acetovanillone is 33%.
3. Concentration containing stilbens produced from one year vine sprout is created, which contains great amount of trans-resveratrol, ε - viniferin, stilbenoid tetramers. Lignan α-conidedrin with amount of 3,3 mg/l was also identified in stilbenoid concentration. Antioxidant activity of α-conidedrin is 35%.
4. In water-ethanol extract of the upper parts of thymus serpyllum picked in Tusheti reserved areas the following aroma forming substances were identified: α-pinene, myrcen, limonen, terpilon, linalool, carvacrol, timol, citronel and others, α-pinene is dominant among them. Also the content of biologically active formononetin and cynaroside (lutheoline glucopyranoside) was determined in aromotizator. Antioxidant activity of formononetin is 21%, and cynaroside is 54%.
5. The production technology of biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI" was created, which considers to use Saperavi grape vacuum juice, phenolic concentration containing stilbens, vegetable aromatizator and ascrobic acid.

Biologically active food supplement "Geogirna Vitae rimas XXI" is characterized by high antioxidant activity (130%), which is syrup type non-alcoholic drink. The ingerdients of BASF have the opportunity to fill the deficit of food with vital and functional type substances and elements. BASF belongs to functional product for curative-prophylactic value.

List of literature used for thesis

1. Bezhuashvili M.G., Elanidze L.D., Kobaidze T.A., Javakhishvili M.L. - Perspectives of functional food supplements orginated from grape. Collection of thesis of Second International Scientific-Practical Interent Conference "Biologicallly safe food product problems, new technologies and business environment", Kutaisi, 2011, pp. 152-157.
2. Elanidze L. - Biologically active food supplements and today. 70th scientific conference professor-lecturer thesis of Iakob Gogebashvili State University, Telavi, 30 May, 2012.
3. Elanidze L.D., Bezhuashvili M.G., Okruashvili D.SH. Biological active stilbenoids and lignan of vine stem extracts. Georgian Engineering News, No. 2 9vol 62), 2012, pp. 115-118

4. Bezhuashvili M.G., Elanidze L.D., Okruasvili D. Sh. Identification of some stilbenoid glucoside from Saperavi grape juice (vitis vinifera L.). GeorgianEngineeringNews, No. 1 (vol. 65), 2013, pp. 158-164
5. Elanidze L.D., Bezhuashvili M.G., Okruashvili D.Sh. (2013) Research of chemical water-ethanol extract of thymus serpyllum. "Food science and Technology". N.1 (22), pp. 70-73
6. L. D. Elanidze, M. G. Bezhuashvili , D. Sh. Okruasvili. (2013) Identifikation of acetovanillone (apocynin) from water-ethanolextract of the stem of saperavi vine variety. “Annals of Agrarian Science ”, vol. 11, № 2
7. Elanidze L.D., Bezhuashvili M.G., Okruashvili D.Sh. (2013) Phenolic sources of biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI". "Food science and Technology" N.2
8. Bezhuashvili M., Elanidze L. Production methods of biologically active food supplement "Georgian Vitae rimas XXI". Model patent. Positive decision - Identification No. 12450/02. Georgian National Center of Intellectual Property "Sakpatenti". 2013