

GASCHROMATOGRAFIESE ANALISE

VIR

GEURSTOWWE IN WYN

-----



Verhandeling ingedien ter verkryging van die graad van MAGISTER  
IN NATUURWETENSKAPPE (CHEMIE) aan die Universiteit van Stel-  
lenbosch.

K.W.O. WENZEL  
Maart 1966.

BEDANKINGS

Graag betuig ek my dank teenoor my promoter, Prof. Dr. M.J. de Vries, vir sy waardevolle hulp en leiding gedurende hierdie ondersoek.

My dank aan Dr. J.A. van Zyl, Mnr. H.J. du Toit en ander amptenare van die N.I.W.W. vir die behartiging van die organoleptiese toetse en vir ander hulp wat hulle op een of ander tyd verleen het.

Aan Mnr. G. Hofmann my dank vir die proeflees.

Ten slotte wil ek ook die Departement van Landbou-Tegniese Dienste bedank vir die verlof om die resultate vir skripsiedoeleindes te gebruik.

-----

I N H O U D

	<u>Bls.</u>
<u>HOOFSTUK I</u>	
Inleiding	1
<u>HOOFSTUK II</u>	
IDENTIFISERING VAN DIE MUSKAATGEURSTOF	
2.1. Inleiding	5
2.2. Eksperimentele werk	
2.2.1. Konsentrering	6
2.2.2. Isolering van die muskaatgeurstof	8
2.2.3. Chemiese toetse vir identifikasie	11
2.2.4. Ultravioletspektroskopie	13
2.2.5. Infrarooispektroskopie	14
2.3. Resultate en gevolgtrekkings	
2.3.1. Ultravioletspektrum	15
2.3.2. Infrarooispektrum	16
2.3.3. Finale identifikasie	18
<u>HOOFSTUK III</u>	
DIE KWANTITATIEWE BEPALING VAN LINALOOL IN WYNE	
3.1. Eksperimenteel	20
3.2. Resultate en bespreking	22

vervolg / ...

HOOFSTUK IVCHEMIESE KOMPONENTE GEVORM GEDURENDE VEROUDERING  
VAN WYN

4.1.	Inleiding	25
4.2.	Eksperimenteel	26
4.3.	Resultate en bespreking	29

HOOFSTUK V

## KARBONIELVERBINDINGE IN WYNE EN WYNDISTILLATE

5.1.	Inleiding	32
5.2.	Eksperimenteel	
5.2.1.	Konsentrering en skeiding van ander komponente	32
5.2.2.	Papierchromatografie	33
5.2.3.	Gaschromatografie	35
5.3.	Resultate en bespreking	38

HOOFSTUK VIVLUGTIGE BESTANDELE GEVORM DEUR BRETTANOMYCES-  
GISTE

6.1.	Inleiding	42
6.2.	Eksperimenteel	43
6.3.	Resultate en bespreking	48

<u>OPSOMMING</u>	52
------------------	----

<u>LITERATUURVERWYSINGS</u>	54
-----------------------------	----

## H O O F S T U K I

### INLEIDING

Een van die belangrikste kwaliteitskenmerke van enige dranksoort is sy geur. By die organoleptiese beoordeling van wyn volgens 'n punteskema word 40 punte aan geur, 10 aan kleur en helderheid en 50 uit 100 aan smaak toegeken<sup>(1)</sup>. As in ag geneem word, dat die vlugtige bestanddele van wyn ook 'n invloed op die smaak daarvan uitoefen<sup>(2)</sup>, is eersgenoemde bestanddele vir meer as die helfte van die kwaliteitsbepalende faktore van wyne verantwoordelik.

Geurstowwe word in die algemeen soos volg ingedeel<sup>(3)</sup>:-

(a) Alifatiese verbindings

In hierdie groep val die gewone aldehiede, ketone esters ens. en hulle kom in baie natuurlike geurstowwe voor.

(b) Aromatiese verbindings

Verbindings van hierdie groep het 'n benseenring in die molekule. Bensaldehyd, 'n bestanddeel van die olie van bitter amandels, en vanilien is twee tipiese voorbeelde.

(c) Terpene / .....

(c) Terpene

Hierdie verbindings is uit isopreeneenhede opgebou en bestaan uit ongeveer 500 verbindings.

In wyn word geurstowwe van aldrie hierdie geurstofgroepe aange-tref, maar substansie van groep (a) maak die oorgrote meerderheid van die wyngeurstowwe uit.

Die geurstowwe in wyne word volgens hul herkoms soos volg inge-deel<sup>(2)</sup>:-

1. Die primêre druifgeurstowwe

Hierdie substansie word in die blare van die wingerdstok ver-vaardig en in die druifkorrel gestoor. Die konsentrasie van hier-die stowwe is tot 'n groot mate van die rypheidsgraad van die druiwe afhanklik. Voorbeelde van hierdie groep is metielantrani-laar in Vitis labrusca-druiwe en butielftalaar in Zinfandel-druiwe.

2. Die sekondêre druifgeurstowwe

Hierdie stowwe ontstaan as gevolg van die inwerking van die gis gedurende alkoholiese gisting, op sekere sogenaamde geurvor-mende stowwe wat in die mos aanwesig is. Dit word gewoonlik aan-geneem dat hierdie geurstowwe sekere eiwitstowwe is.

3. Die geurstowwe / .....

### 3. Die geurstowwe wat by gisting ontstaan

Hierdie groep word gevorm deur die gis en is totaal onafhanklik van die ander geurvormende stowwe. Hul vorming berus dus op die gisras waardeur gisting veroorsaak was. Die meeste geurstowwe behoort tot hierdie groep. Dit is die aldehyede, fuselolies, die hoër vetsuuresters en vry sure.

### 4. Die geurstowwe gevorm tydens veroudering

Hierdie reeks ontstaan uit verskeie bestanddele van die wyn gedurende die verouderingsproses. Dit word algemeen aanvaar dat hierdie stowwe as gevolg van verestering en oksidasie ontstaan.

Omdat al hierdie geurstowwe so 'n belangrike rol by die kwaliteitsbepaling van alkoholiese drankte speel, is dit noodsaaklik dat hul le kwalitatief sowel as kwantitatief bepaal word. Met die chemiese metodes, tot onlangs die enigste metodes by die geurstofbepaling, kon slegs groepe van verbindings byvoorbeeld totale esters, vlugtige sure, hoër alkohole ens., bepaal word. Met moderne fisies-chemiese metodes soos spektrofotometrie, dunlaag-, kolom-, papier- en gaschromatografie kan die afsonderlike komponente van bogenoemde geurstofgroepe bepaal word. Aangesien die geurstowwe in baie lae konsentrasies voorkom en met hierdie metodes slegs

mikrohoeveelhede / .....

mikrohoeveelhede benodig word, is hulle uiters geskik vir hierdie doel. Papierchromatografiese metodes is onder andere deur Ronkainen et. al<sup>(4)</sup>, Venter<sup>(3)</sup> en Bayer (5,56) aangewend om die karboniese en esters te bepaal. Gaschromatografie is besonder geskik vir die kwantitatiewe analise van geurstowwe omdat met hierdie metode baie klein hoeveelhede vinnig en akkuraat bepaal kan word. Baie navorsers het van hierdie tegniek gebruik gemaak vir die bepaling van hoër alkohole (6,7,8) en esters (9-12). Gaschromatografie is ook geskik om suiwer monsters van onbekende substansie uit alkoholiese drankte te verkry, wat dan met behulp van ander metodes soos byvoorbeeld ultraviolet- en infrarooispektroskopie of kernmagnetiese resonansanalise verder bepaal kan word (12, 13, 14).

-----



## H O O F S T U K    I I

### IDENTIFISERING VAN DIE MUSKAATGEURSTOF

#### 2.1. INLEIDING

Gedurende die rywordingsproses produseer die druiwe geurstowwe in verskillende konsentrasies wat aan elke variëteit sy eie aroma gee. Sommige druifsoorte vorm stowwe wat kenmerkend is vir slegs daardie betrokke soort. Power en Chestnut<sup>(15)</sup> het gevind dat slegs die druiwe van Vitis labrusca en die V. labrusca-hibriede metielantranilaat bevat. Die geurstowwe van ander druifsoorte bevat geen stikstofhoudende substansie nie en kan op grond hiervan maklik van die ander spesies onderskei word. Aangesien daar baie onsekerheid omtrent die botaniese oorsprong van sommige druifsoorte bestaan, kan die aanwesigheid al dan nie van metielantranilaat by die klassifikasie van druifsoorte tot hulp wees. Haagen - Smit et. al<sup>(16)</sup> bevind dat die variëteit Zinfandel ongeveer twee mg per liter n-butielftalaat bevat. Hierdie substansie kon in geen ander druifsoort aangetref word nie.

Dit word algemeen aanvaar dat die muskaataroma, op die basis van organoleptiese analise, die mees prominente geurstof is, wat by die Vitis vinifera-variëteite aangetref word. Om hierdie rede het

verskeie / .....

verskeie navorsers al die moste en wyne wat bogenoemde karakter besit, ondersoek. Bayer en Bässler<sup>(13)</sup> het met gaschromatografiese metodes gevind dat muskaatwyne in vergelyking met nie-muskaatwyne besonder baie kaneelsuuresters bevat. Cordonnier<sup>(17)</sup> het met behulp van dunlaagchromatografie vier substansie uit 'n muskaatwyne-ekstrak verkry, wat in kleur en Rf-waarde met dié van limoneen, geraniol, linalool en terpineol ooreenstem. Webb en Kepner<sup>(18)</sup> het mos van 11,000 pond Hanepootdruive na distillasie en ekstraksie ondersoek. Hulle het verskillende esters, alkohole en karboniele geïdentifiseer, maar kon die terpine deur Cordonnier verkry, nie vind nie. In die hoogkokende geurstoffraksie van fuselolie van muskaatrosyntjies het Webb en Kepner<sup>(19)</sup> hoofsaaklik die etielesters van die hoër vetsure asook fenietielasetaat geïdentifiseer en ook hier geen terpine aangetref nie.

Die doel van hierdie ondersoek was om die chemiese substansie of substansie, wat vir die muskaatkarakter verantwoordelik is, te identifiseer.

## 2.2. EKSPERIMENTELE WERK

### 2.2.1. Konsentrering van die geurstowwe

Die geurstowwe van 'n wyn maak slegs ongeveer 0.2% van die totaal uit terwyl dit in die mos nog minder is. Derhalwe moet hulle vir / .....

hulle vir doeleindes van kwalitatiewe en kwantitatiewe analises vooraf van die oormaat water en etanol geskei word. Dit is werkstellig deur die wyn of mos met eter of 'n mengsel van eter en pentaan (2:1) drie keer te ekstaheer<sup>(9)</sup>. Die emulsie wat hier gevorm het, is gebreek deur dit in 'n sentrifuge by 2500 omwentelings per minuut uit te swaai. Die ekstrak is twee keer met water gewas om die meeste etanol te verwyder. Na droging oor watervrye natriumsulfaat is die eter en pentaan versigtig afgedamp. Deur middel van hierdie prosedure is die geurstowwe ongeveer 2000 keer gekonsentreer.

'n Alternatiewe metode van konsentrering wat hier toegepas is, was om die vlugtige geurstowwe met 'n gasstroom af te dryf. 'n Stadige stroom stikstof (250 ml/min) is deur 700 ml wyn gestuur. Laasgenoemde is vooraf met natriumchloried versadig om die konsentrasie van die geurstowwe in die dampfase te verhoog<sup>(21)</sup>. Met 'n spesiale pomp kon die stikstof in 'n geslote kringloop deur die wyn geborrel word sodat geen geurstowwe verlore geraak het nie. Die geurstowwe is in 'n glasspiraal by  $-80^{\circ}\text{C}$  (droë ys en etanol) uitgevries en met vier ml eter uitgespoel. Laasgenoemde is vervolgens twee maal met vier ml water gewas om die meeste etanol te verwyder. Die eter is daarna afgedamp, totdat 'n gewenste mate van konsentrering bereik is. Die voordeel van hierdie metode is

dat slegs die / .....

dat slegs die vlugtige stowwe, wat in die dampfase bo 'n wyn voorkom en dus organolepties waarneembaar is, gekonsentreer word, terwyl met die direkte ekstraksiemethode alle stowwe, wat in eter oplosbaar is, uitgehaal word.

### 2.2.2. Isolering van die muskaatgeurstof

In hierdie ondersoek is vir identifikasiedoeleindes 'n droë Hanepootwyn en 'n Muskadelmos as muskaatgeurstofbron gebruik. Die mos is met 1500 d.p.m. swaweldioksied gepreserveer. Die kontrolewyn was 'n droë Steinwyn. Die gaschromatograaf wat gebruik is, tensy anders vermeld, was 'n Perkin-Elmer, model 116, toegerus met 'n warmtegeleidings- en 'n vlamionisasiedetektor.

Hanepoot- en Steinwyn is volgens bogenoemde ekstraksiemetodes gekonsentreer en gaschromatografies op kolom E en F (TABEL I) ontleed. Die kondisies waaronder die ontledings deurgevoer is, word in TABEL I uiteengesit. 'n Vergelyking van die chromatogramme van die Hanepoot- en Steinwyneksrakte het geen beduidende verskille getoon nie en derhalwe kon geen aanduiding van die muskaatgeurstof verkry word nie.

Ten einde vas te stel of die tipiese muskaatgeurstof wel onder die geskeide substansie voorkom, is met helium as draergas en

'n warmtegeleidingsdetektor/ .....

TABEL IGASCHROMATOGRAFIESE KOLONNE EN KONDISIËS.

Kolom Nr.	Lengte m	Binnedeur-snee mm	Draermateriaal	Stasionêre fase gewig %	Draergas en vloei-spoed	Kolomtemperatuur
A	1	5	Chromosorb W 45-60 maas HMDS-behandel	10% SE-30 (Silicone gum) rubber	Stikstof 100ml/min	80°C
B	1	5	Celite 60-80 maas Suurgewas en DDS <sup>++</sup> behandel	10% Dinonielftalaat	Stikstof 80ml/min	90°C
C	2	5	Celite 60-80 maas Suurgewas en DDS <sup>±</sup> behandel	1.5% Apiezon M 8.5 Diëtieleenglikolsuksinaat	Stikstof 70ml/min	115°C
D	1	5	Celite 60-80 maas Suurgewas en DDS <sup>++</sup> - behandel	10% Dioktielsebasaat	Stikstof 80ml/min	85°C
E	2	5.5	Chromosorb 60-80 maas	20% Apiezon L	Stikstof 80ml/min	150°C
F	2	5.5	Chromosorb W 45-60 maas HMDS - handel	14% Nonielpenoksipoli-oksetileen-etanol	Stikstof 100ml/min	90°C
G	2.6	21	Celite 60-80 maas	1.5% Apiezon M 8.5% Diëtieleenglikolsuksinaat	Helium 450ml/min	130°C

<sup>+</sup>HMDS = HeksametiëldisilasaanDruk van H<sub>2</sub> = 0.8 kg per cm<sup>2</sup><sup>++</sup>DDS = DimetiëldichlorosilaanDruk van N<sub>2</sub> = 1.0 kg per cm<sup>2</sup>

'n warmtegeleidingsdetektor, onder die verdere bogenoemde kondisies gewerk en die afsonderlike geurstowwe opgevang. Die geurstowwe is opgevang deur die uitlaatgasse van die gaschromatografiese skeiding in fraksies deur dun (6 mm deursnee) buisies, wat ongeveer twee ml 96% etanol bevat het, te borrel. 'n Paneel van ervare wynproewers kon organolepties in geeneen van die fraksies enige muskaatgeur waarneem nie.

Die vermoede het dus ontstaan dat die muskaatgeurstof òf by die hoë kolomtemperatuur ontbind, òf so hoogkokend is dat dit op die kolom agterbly. Om hierdie rede is korter kolomme met minder stasionêre fase berei (A, B, C en D, TABEL I). Met hierdie kolomme is die retensietye van hoogkokende stowwe by lae kolomtemperatuur nog relatief kort. 'n Verdere voordeel van hierdie kolomme is dat die verlies en ontbinding van stasionêre fase laag is en sodoende minder besmetting van fraksies plaasvind, wat die organoleptiese beoordeling kan bemoeilik.

Na gaschromatografiese skeiding van die ekstrak van Hanepootwyn met kolom A en onder die kondisies soos in TABEL I aangegee, gevolg deur opvang van die fraksies in etanol, kon in 'n fraksie waar 'n klein piek met retensietyd 425 sekondes op die chromatogram verskyn het, duidelik die muskaatgeur waargeneem word. Op

kolom B en C / .....



kolom B en C was die retensietye met die kondisies soos gebruik (TABEL I), van die muskaatgeurpiek 40.80 en 13.00 minute onderskeidelik.

### 2.2.3. Chemiese toetse vir identifikasie

Chemiese toetse is op die ekstrak voor gaschromatografiese analise uitgevoer om te probeer bepaal watter funksionele groepe die substans bevat.

By die gewone chemiese metode vir die bepaling van die totale ester-konsentrasie in wyn word van die versepingsproses met oormaat natriumhidroksied gebruik gemaak<sup>(22)</sup>. Om vas te stel of die substans 'n ester is, is 700 ml Hanepootwyn stoomgedistilleer en 600 ml distillaat is opgevang. Van hierdie distillaat is 300 ml direk geëkstraheer en die gekonsentreerde ekstrak gaschromatografies op kolom B geanaliseer. Ten einde die esters in die oorblywende 300 ml distillaat voor ekstrasie en gaschromatografiese analise te verseep, is 'n oormaat (70 ml. 0.12 N) bytsoda daarby gevoeg en vir 90 minute met 'n terugvloei-koeler gekook. Die vergelyking van hierdie twee chromatogramme het getoon dat die esterpieke, iso-amielasetaat, etielheksoaat en etieloktoaat as gevolg van verseping kleiner geword het. Hierteenoor het die grootte van die nie-esterpieke, iso-amielalkohol, heksanol ens., sowel as die muskaatgeurpiek / .....

die muskaatgeurpiek onveranderd gebly. Dit bewys dat die muskaatgeurstof geen suur- en estergroep bevat nie.

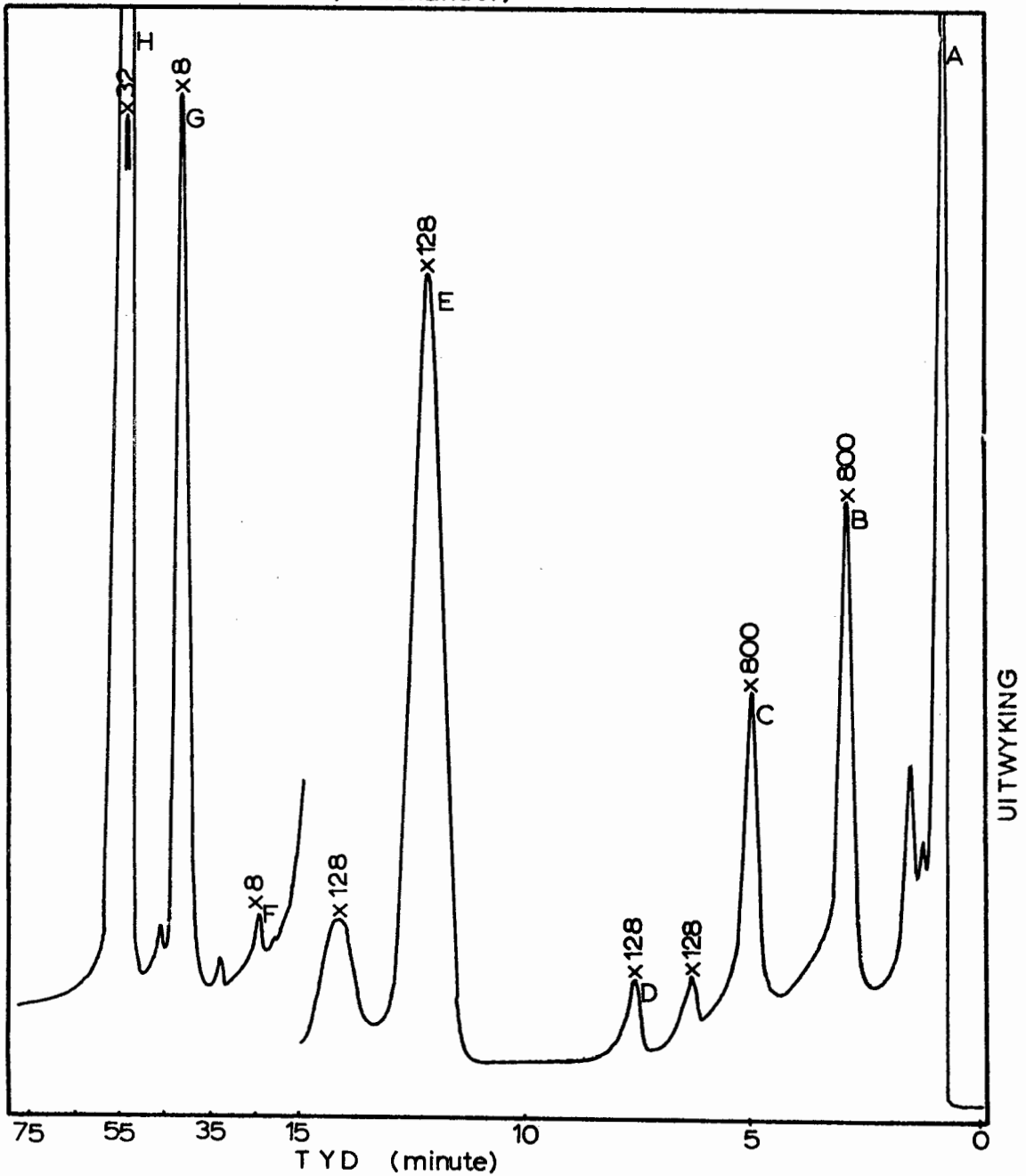
Vervolgens is getoets of die muskaatgeurstof 'n karbonielgroep bevat. 'n Gewysigde metode, soos aangewend deur Piha et. al<sup>(23)</sup> vir die bepaling van karboniele in alkohol afkomstig van gisting van stysel, is toegepas. By 300 ml Hanepootwyn is 'n oplossing van 0.7 gm 2,4-dinitrofenielhidrasien per 50 ml 6 N swawelsuur gevoeg en oornag laat staan. By 300 ml kontrolewyn is slegs 50 ml 6 N swawelsuur gevoeg. Die geurstowwe in die bogenoemde monsters is met behulp van 'n stikstofstroom (2.2.1.) gekonsentreer. Vergelyking van die chromatogramme van hierdie twee konsentrate het getoon dat die grootte van die muskaatgeurstofpeke relatief dieselfde bly. Die verbinding bevat dus geen karbonielgroep nie.

Vir die identifikasie van alkohole in geraniumolie het Suffis en Dean<sup>(24)</sup> 'n ekstraksiemetode met propyleenglikol aangewend. 'n Effens gewysigde metode is gebruik om vas te stel of die muskaatgeurstof 'n alkoholgroep bevat al dan nie. Die ekstrak van 600 ml Hanepootwyn is na 40 ml ingedamp en in vier gelyke fraksies (I, II, III en IV) van tien ml elk verdeel. Fraksie I het geen behandeling ontvang nie terwyl fraksie II met tien ml, fraksie III met twee maal tien ml en fraksie IV met drie maal tien ml

1,2-propaan- / .....

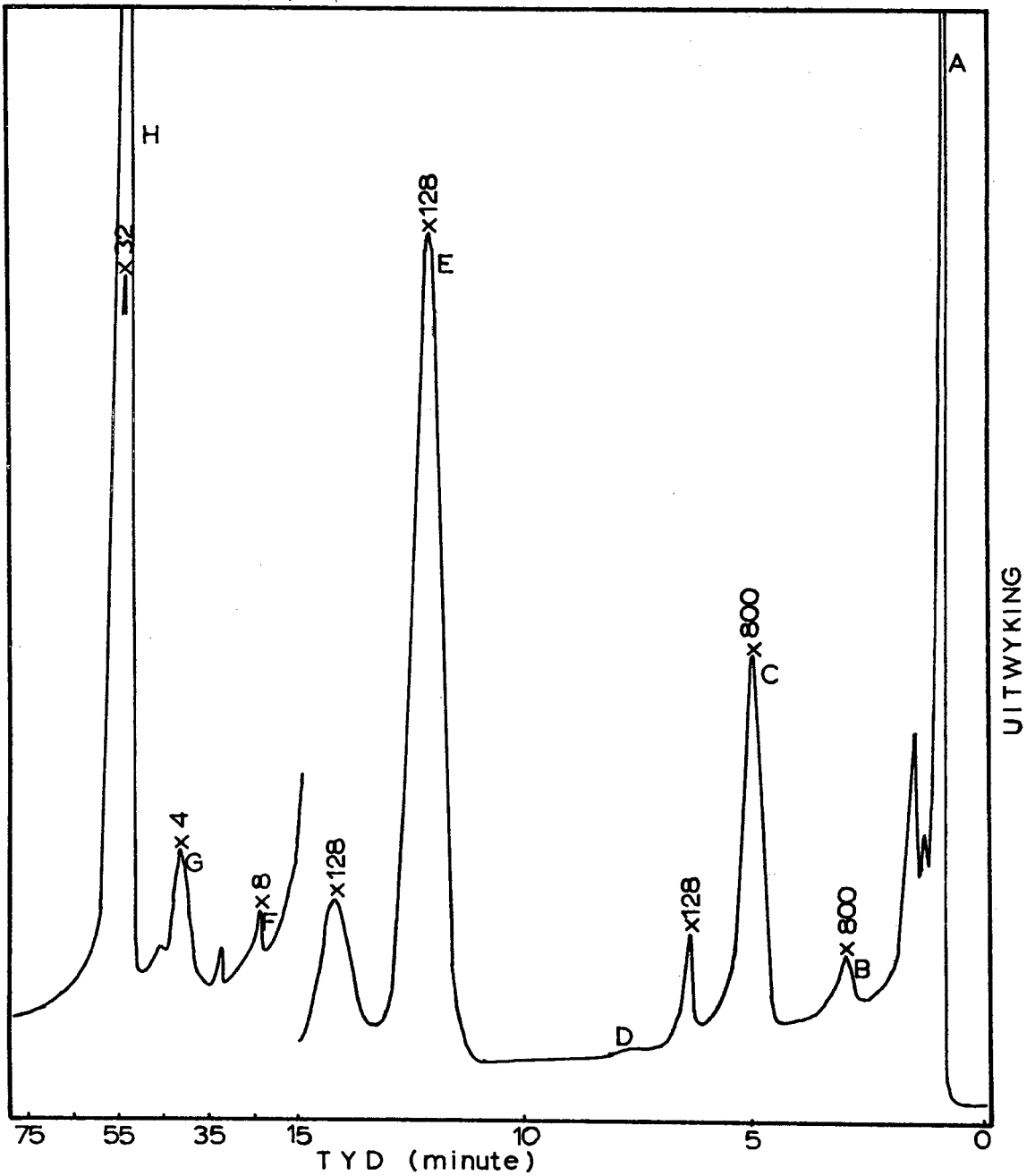


FIGI CHROMATOGRAM VAN 'N HANEPOOTWYNEKSTRAK  
(onbehandel)



- A. Oplosmiddel (eter en pentaan)
- B. i-Amielalkohol
- C. i-Amielasetaat
- D. Heksanol
- E. Etilheksoaat
- G. Muskaatgeurstof
- H. Etiloktoaat
- F. Etilheptoaat

FIGII CHROMATOGRAM VAN 'N HANEPOOTWYN  
(met 12-propaandiol behandel)



- A. Oplosmiddel (eter en pentaan)
- B. i-Amielalkohol
- C. i-Amielasetaat
- D. Heksanol
- E. Etielheksoaat
- F. Etielheptoaat
- G. Muskaatgeurstof
- H: Etieloktoaat

1,2-propaandiol geëkstraheer is. Daarna is al die fraksies twee maal met tien ml water geëkstraheer om die grootste gedeelte 1,2-propaandiol te verwyder. Na droging oor natriumsulfaat is al die fraksies ingedamp en gaschromatografies op kolom B ontleed. Die grootte van die alkoholpeke (iso-amielalkohol en heksanol) sowel as dië van die muskaatgeurstof het in vergelyking met die nie-alkoholpeke (iso-amielasetaat, etielheksoat en etieloktoaat) van fraksie I na fraksie IV sterk afgeneem (FIG. I en II). Hierdie resultaat dui daarop dat die verbinding 'n alkoholgroep bevat.

Ter bevestiging van bostaande bevinding is die ekstrak met 3,5-dinitrobensoielchloried behandel<sup>(25)</sup>. Die gekonsentreerde ekstrak (twee ml) van 500 ml Hanepootwyn is vir twee uur met 120 mg 3,5-dinitrobensoielchloried met 'n terugvloeiakoeler gekook en vervolgens tot 60 ml ingedamp. 'n Monster van tien  $\mu$ l van laasgenoemde is vir die gaschromatografiese analise op kolom B gebruik. Soos voorheen het die muskaatgeurstofpiek sowel as die alkoholpeke in vergelyking met die peke van die kontrolewyn (nie behandel nie) in grootte afgeneem.

#### 2.2.4. Ultravioletspektroskopie

Vir verdere identifikasie van die substans is 'n ultravioletspektrum daarvan geneem. Daar is gevind dat die muskaatgeurstof / .....

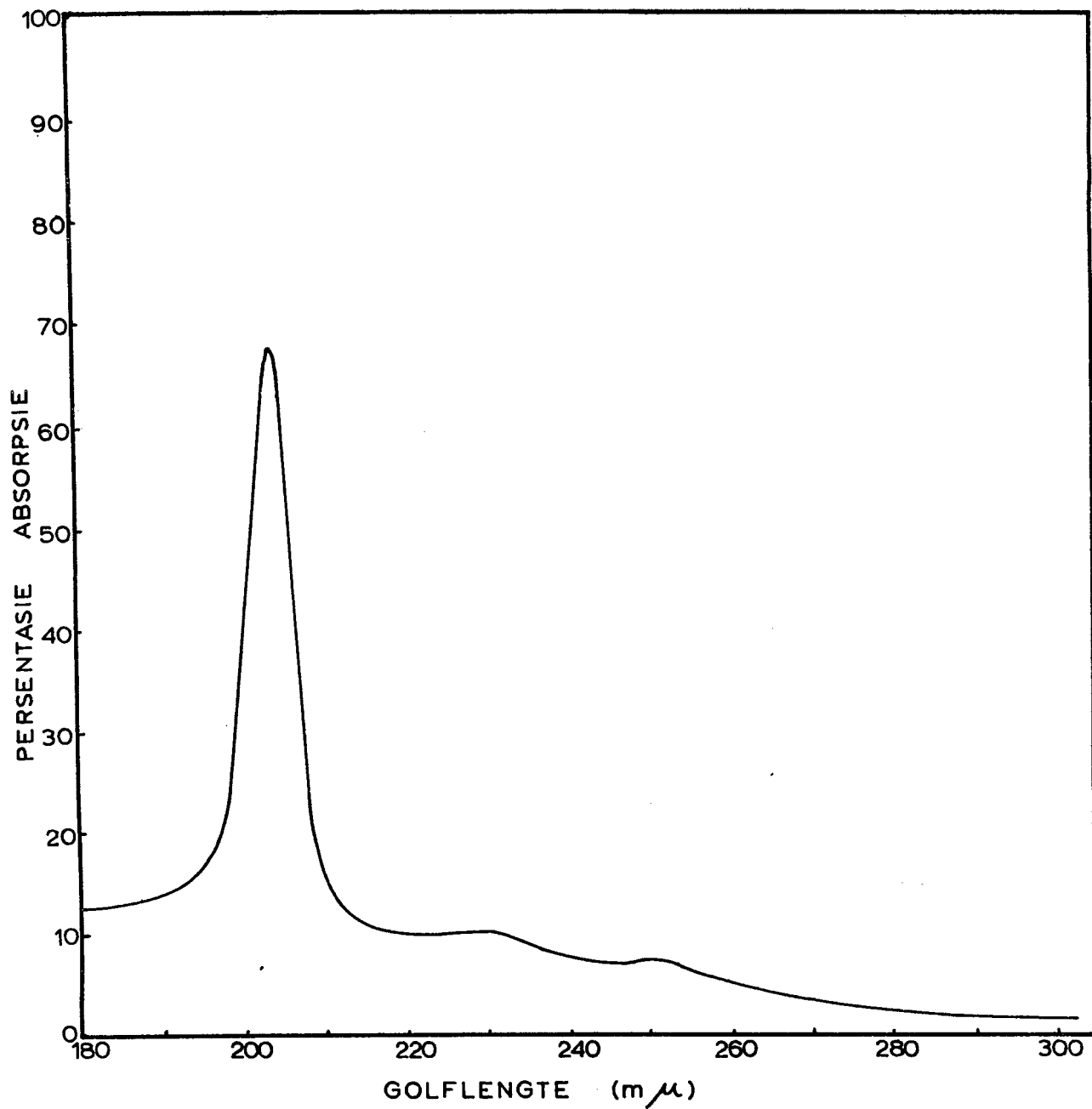
geurstof en etielheptoaat, wat in klein hoeveelhede in die wyn voorkom, dieselfde retensietyd op kolom A gehad het terwyl die muskaatgeurstof op kolomme B en C gedeeltelik deur etieloktoaat en 'n ongeïdentifiseerde substans oorvleuel word. Om dus so 'n suiwer moontlike monster van die betrokke geurstof te verkry, is dit op twee kolomme geskei. Die ekstrak is eers op kolom B geskei en die muskaatgeurstof in 'n U-buis, gevul met fyn silika-dioksied, by  $-80^{\circ}\text{C}$  (droë ys en etanol) opgevang. Die kondensaat is met 'n klein hoeveelheid eter uit die U-buis gewas en die meeste eter is versigtig afgedamp. Die residu is op kolom A ingespuut en by die uitlaat deur skoon etanol geborrel. Die verlies en ontbinding van die stasionêre fase (SE-30) was met hierdie kolom onder die beskrewe werkskondisies uiters gering sodat die etanol nie daarmee besmet is nie. Om die spektroskopiese metings so laag as  $190\text{ m}\mu$  te kon uitvoer, is die etanol vooraf gereinig soos beskryf deur Bladon et. al<sup>(26)</sup>. Die spektrum (FIG. III) is met 'n Zeiss RPQ 20 A spektrofotometer gemeet.

#### 2.2.5. Infrarooispektroskopie

Vir 'n infrarooispektrum moes groter hoeveelhede van die muskaatgeurstof geïsoleer word en derhalwe is van 'n preparatiewe kolom (G, TABEL I) gebruik gemaak. Die muskaatgeurstof is na

gaschromatografiese / .....

FIG III ULTRAVIOLET-ABSORPSIESPEKTRUM VAN DIE MUSKAATGEURSTOF



gaschromatografiese skeiding van die ekstrak met bogenoemde kolom herhaaldelik in 'n wye U-buis wat met silikadioksied gevul was, by  $-80^{\circ}\text{C}$  (droë ys en etanol) opgevang. Die buis is met eter uitgespoel. Die eter is afgedamp en die konsentraat vervolgens op kolom A geskei. Die substans is in 'n klein buisie, waarvan die punt tot 'n kapillêr uitgetrek was, opgevang. Die buis is met droë ys afgekoel. Deur middel van sentrifugering het die kondensaat aan die binnewande van die buis in die kapillêre gedeelte daarvan versamel. Die kapillêr met al die vloeistof daarin is afgesny en die monster kon so maklik gehanteer word. Die geurstof is met chloroform verdun en verskeie spektra met verskillende konsentrasies van die muskaatgeurstof is op 'n Perkin-Elmer infra-rooispektrofotometer, model 21, geneem. Die sensitiwiteit en oplosvermoë was met hierdie instrument egter nie voldoende nie. Die geurstof is derhalwe van die chloroform op kolom A geskei, in koolstoftetrachloried opgelos en 'n spektrum met 'n Beckman IR-7 spektrofotometer geneem (FIG. IV).

### 2.3. Resultate en gevolgrekkings

#### 2.3.1. Ultravioletspektrum

Die spektrum (FIG. III) het 'n sterk absorpsiemaksimum by  $203\text{ m}\mu$  getoon. Hiervan volg dat die verbinding een of meer geïsoleerde dubbelbande besit<sup>(26, 27)</sup>. Die ligabsorpsiemaksima / .....

maksima by hierdie lae golflengte is egter nie die ware maksima nie aangesien verstrooide lig in hierdie golfgebied vinnig met 'n afname in golflengte toeneem. Die waardes van die golflengtes by maksimum absorpsie verskil van apparaat tot apparaat. Bader<sup>(28)</sup> en Bladon<sup>(26)</sup> het byvoorbeeld die maksima van sitronellol op twee verskillende instrumente by 212 en 204  $m\mu$  onderskeidelik verkry.

### 2.3.2. Infrarooispektrum

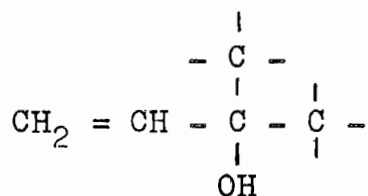
Die hidroksielgroep van alkohole is baie polêr en daarom vorm dit maklik waterstofbande. In oplossing verkeer alkohole dus gewoonlik in verskillende toestande van assosiasie. By baie lae konsentrasies in nie-polêre oplosmiddels is alkohole gewoonlik in 'n monomeriese, ongebonde toestand. Met toenemende konsentrasie vorm al meer enkelbrugdimeer- en polimeerkomplekse.

'n Skerp band wat as gevolg van absorpsie van die vry alkohol, by  $3619\text{ cm}^{-1}$  verskyn, bewys dat die substans 'n tersiêre alkohol is (29, 30). 'n Breë absorpsieband met maksimum by  $3484\text{ cm}^{-1}$  is afkomstig van die absorpsie van die alkohol in die dimeriese vorm. Met verdunning en dus toename van die alkohol in die ongebonde, monomeriese toestand, neem die absorpsieband by  $3484\text{ cm}^{-1}$  in vergelyking met dië by  $3484\text{ cm}^{-1}$  toe. Aangesien geen skerp band tussen  $3200$  en  $3400\text{ cm}^{-1}$  van die polimeriese verbinding verskyn nie,

selfs by die / .....

selys by die hoogste konsentrasie gemeet, lei ons af dat die alkohol slegs in die monomeriese of in die dimeriese toestand in oplossing verkeer. Uit die afwesigheid van die polimeriese vorm volg dat die struktuur van die verbinding sodanig is dat steriese hindering die polimeervorming nie toelaat nie.

Die sterk band by  $926\text{ cm}^{-1}$  met sy oortoon by  $1852\text{ cm}^{-1}$  wat van laer intensiteit is, en sterk bande by  $998\text{ cm}^{-1}$  en  $1648\text{ cm}^{-1}$ , toon dat daar 'n vinielgroep teenwoordig is<sup>(31, 32)</sup>. Gewone vinielverbindinge met 'n struktuur  $\text{R-CH}=\text{CH}_2$  absorbeer by  $995\text{ cm}^{-1}$ ,  $910\text{ cm}^{-1}$  en sy oortoon by  $1820\text{ cm}^{-1}$ . Indien die  $\alpha$ -koolstofatoom by die R-groep egter ten volle gesubstitueer is, skuif die band by  $995\text{ cm}^{-1}$  na  $1005\text{--}995\text{ cm}^{-1}$ . As een van hierdie substituentegter 'n funksionele groep is, skuif die band by  $910\text{ cm}^{-1}$  na  $930\text{--}918\text{ cm}^{-1}$  (29, 33). Aangesien, soos reeds gemeld, die funksionele groep 'n alkohol is, en wel 'n tersiêre, is die gedeeltelike struktuur van die verbinding soos volg:-



Die absorpsieband by  $1717\text{ cm}^{-1}$  kan die vermoede laat ontstaan dat die verbinding 'n karbonielgroep bevat. Die intensiteit van hierdie band het egter van monster tot monster gewissel en aangesien

dit in alle / .....



FIG. IV

INFRAROOISPEKTRUM VAN DIE MUSKAATGEURSTOF

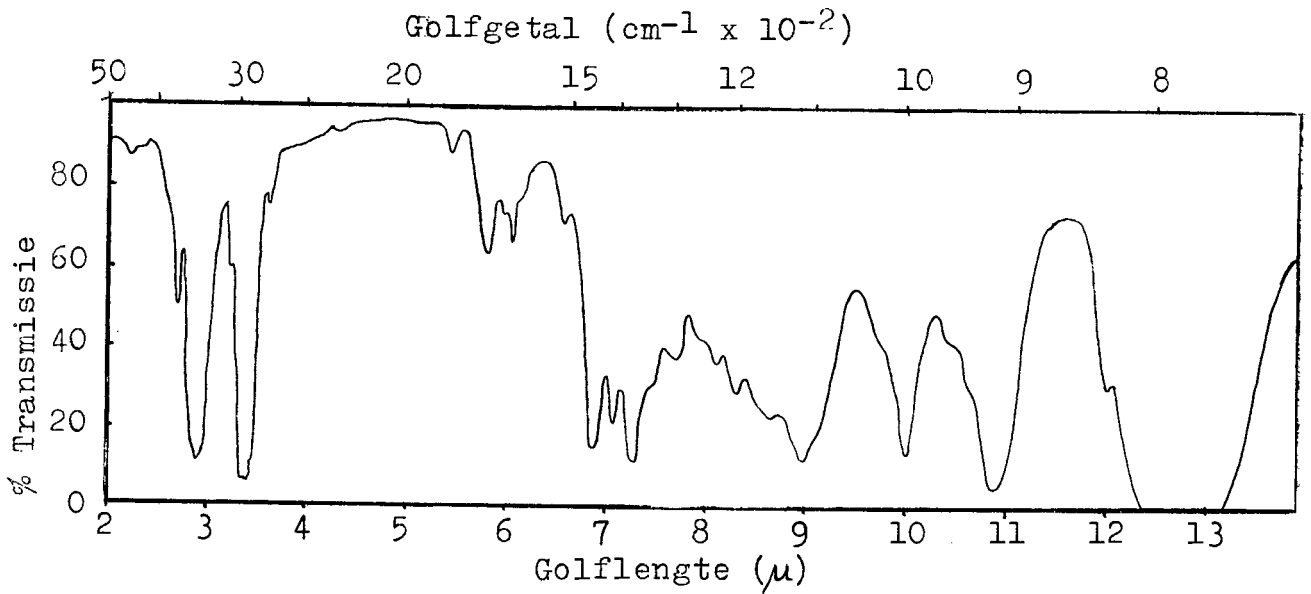
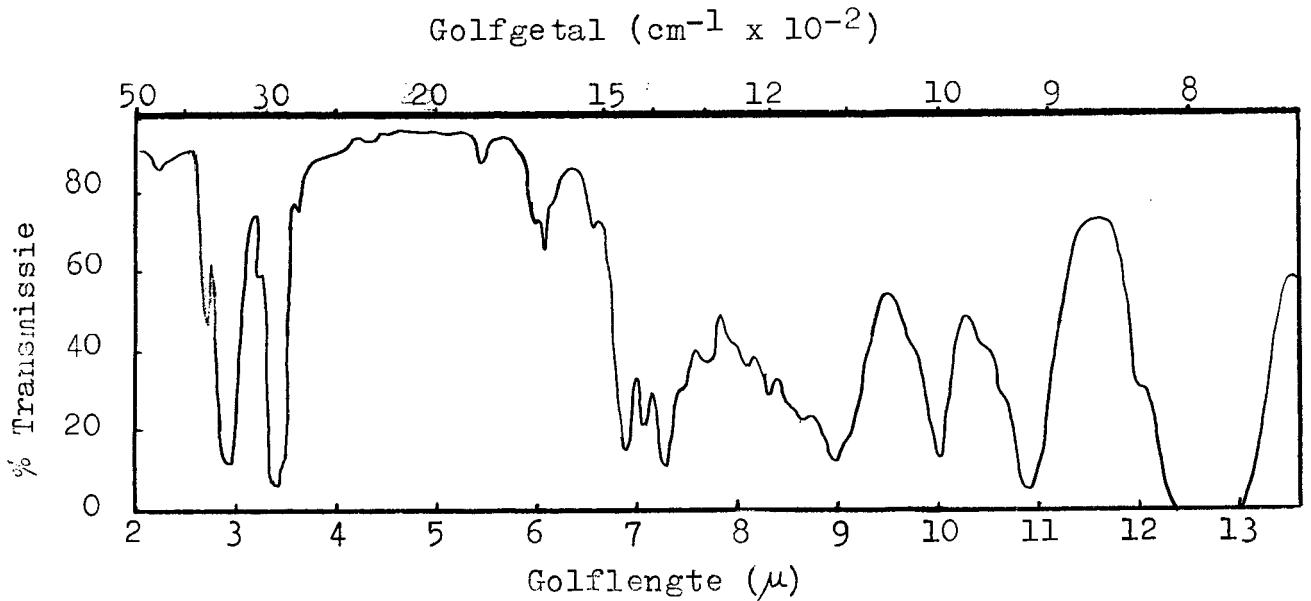


FIG. V

INFRAROOISPEKTRUM VAN LINOLOOL



dit in alle gevalle baie laer as die C-H-absorpsieband by  $2950\text{cm}^{-1}$  was, is hierdie band waarskynlik van 'n onsuiverheid in die monster afkomstig. Van die ander bande teenwoordig kon geen verdere afleidings gemaak word nie.

### 2.3.3. Finale identifikasie

Deur retensietye van versadigde reguitkettingalkohol met dië van die muskaatgeurstof te vergelyk, is afgelei dat die verbinding nege of tien koolstofatome moet bevat. Die intense geur van die stof, selfs by baie lae konsentrasies, het die vermoede laat ontstaan dat dit 'n terpeen en wel 'n terpeenalkohol moet wees. Dit stem ook ooreen met die isopreenstruktuur van 'n gedeelte van die verbinding soos dit van die infrarooispektrum afgelei is.

Van die terpeenalkohole wat gaschromatografies op kolom B getoets is, het linalool (3,7-dimetiel-okta-1,6-diëen-3-ol) dieselfde retensietyd as die muskaatgeurstof gehad. Hierdie resultaat is ook op kolomme A, E en D verkry. Die ultravioletspektra van linalool en die muskaatgeurstof is identies indien gemeet by ongeveer dieselfde konsentrasie (hoogte van absorpsiepiek). Beide het 'n absorpsiemaksimum by  $203\text{ m}\mu$ . Indien die konsentrasie verhoog word,

skuit die / .....

skuif die maksimum na 'n langer golflengte. By die vergelyking van die infrarooispektra van die muskaatgeurstof (FIG. IV) met dië van linalool (Sadtlar Standard Spectra, Midget Edition 1959, FIG. V) kon slegs 'n klein verskil waargeneem word. Op die Sadtlerspektrum het geen band by  $1717\text{ cm}^{-1}$  verskyn nie, maar soos reeds genoem, kan dit waarskynlik aan 'n onsuiverheid in die geïsoleerde muskaatgeurstofmonster toegeskryf word. Nadat linalool gaschromatografies gereinig was, is organoleptiese ooreenstemming met die muskaatgeurstof deur verskeie wynproewers verkry. Bepalings wat uitgevoer is op wyne en moste afkomstig van druiwe van die muskaatvariëteite Hanepoot, Muskadel en Frontignac, het aangetoon dat in aldrie linalool aanwesig is, terwyl die nie-muskaatvariëteit Stein geen linalool bevat nie.

Geraniol en limoneen, wat deur Cordonnier<sup>(17)</sup> in muskaatwyne gevind is, kon nie geïdentifiseer word nie. Daar is vasgestel dat  $\alpha$ -terpineol in klein hoeveelhede in wyne aanwesig is. Organoleptiese toetse het egter getoon dat die geur van hierdie substans geen ooreenstemming met die muskaatgeur toon nie. Hiermee is bewys gelewer dat die muskaataroma van bogenoemde drie druifsoorte deur dieselfde substans, naamlik linalool teweeggebring word.

## H O O F S T U K III

### DIE KWANTITATIEWE BEPALING VAN LINALOOL IN WYNE

#### 3.1. Eksperimenteel

Om noukeurige kwantitatiewe bepalings van linalool uit te voer, moet die substans heeltemal geskei van ander pieke op die chromatogram verskyn. Op die kolomme wat vir die identifikasie van linalool gebruik is, en waar isotermies gewerk is, kon geen volledige skeidings op 'n enkele kolom verkry word nie. Goeie skeidings is egter met behulp van 'n Beckman GC4 gaschromatograaf, waar die temperatuur geprogrammeer kan word, verkry (FIG. VI). Die volgende kolom is gebruik.

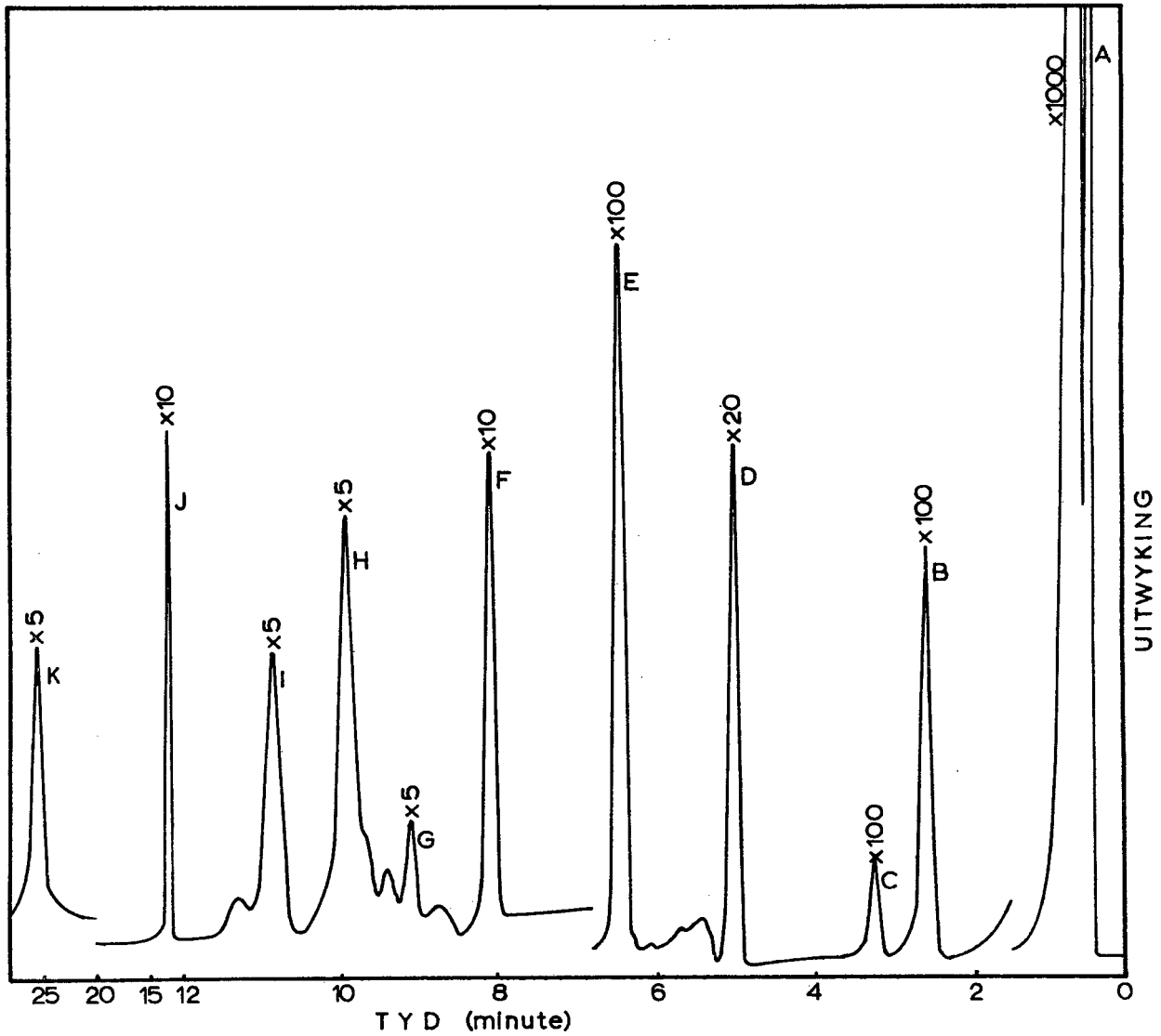
Kolom: 2m (lengte) x 1.2 mm (binnedeursnee)  
20% Poli-etileenglikol 1500 op Celite 60-80 maas  
Begintemperatuur: 50°C  
Temperatuur van inspuitblok : 180°C  
Programmering : Gelyktydig met inspuiting is teen 15°C per min. tot 150°C geprogrammeer.  
Draergas : Helium  
Vloeispoed van draergas : 20 ml per min.

'n Gewysigde / .....

'n Gewysigde prosedure, soos beskryf deur Wagener<sup>(10)</sup>, is vir die bepaling van linalool aangewend. 'n Stamoplossing van (0.04 mg per ml) linalool in 96% etanol is berei. Die linalool is vooraf fraksioneel gedistilleer en gaschromatografies vir suiwerheid getoets. By vier 150 ml-porsies van 'n muskaatwyn is van die linalooloplossing in toenemende hoeveelhede, naamlik 0, 1, 2 en 4 ml, gevoeg. Om die alkoholkonsentrasie in alle monsters konstant te hou, is die verskil met 96% etanol aangevul. Elke monster is agtereenvolgens met 70 ml en twee maal 40 ml eter-pentaaan-mengsel (2:1) geëkstraheer. 'n Piek met 'n lang onsimmetriese rugkant wat die linaloolpiek oorvleuel en die analise daarvan bemoeilik het, is as *i*-valeriaansuur geïdentifiseer (6.3.) Ten einde die sure en etanol uit die gekombineerde eter-pentaaan-ekstrakte te verwyder, is laasgenoemde met 120 ml verdunde natriumbikarbonaatoplossing of 0.1 N bytsoda geëkstraheer en daarna met 120 ml water gewas. Die oplossings is oornag met 10 g watervrye natriumsulfaat gedroog en tot ongeveer 50 ml ingedamp. Van hierdie konsentraat is 8  $\mu$ l in duplikaat gechromatografeer.

As interne standaard kan 'n stof gebruik word wat in die wyn self voorkom. Hierdeur word eksperimentele foute wat deur die byvoeging van 'n standaard gemaak word, uitgeskakel. In hierdie ondersoek is heksanol, en indien droë wyn geanaliseer is, ook etieloktoaat, vir hierdie / .....

FIG VII CHROMATOGRAM VAN DIE EKSTRAK VAN N MUSKADELJERIPICO



- A. Oplosmiddel (eter en pentaan)
- B. Etielasetaat
- C. Etanol
- D. i-Butanol
- E. i-Pentanol
- F. n-Heksanol
- G. Etieloktoaat
- H. Onbekende substans
- I. Lindlool
- J. Diëtielsuksinaat
- K. Fenieletielalkohol

toaat, vir hierdie doel gebruik. Aangesien skerp pieke verkry is met programmering, sou die relatiewe fout by die meet van die piekbreedte by halfhoogte groot gewees het. Om hierdie rede is die algemene metode van oppervlaktemeting, naamlik die produk van hoogte en breedte by halfhoogte, nie toegepas nie. By 'n ander meetmetode word van die produk van piekhoogte en retensietyd gebruik gemaak. Aangesien in hierdie ondersoek in alle gevalle onder identiese kondisies gewerk is, was die retensietye op alle chromatogramme konstant en kon slegs die piekhoogtes vergelyk word. Die verhouding van die linaloolpiekhoogte teenoor die piekhoogte van die interne standaard is bereken, en 'n grafiek van hierdie verhouding teenoor die hoeveelhede linalool by elke monster gevoeg, is opgestel (FIG. VII en VIII). Die konsentrasie linalool in die wyn kan direk op die absissa afgelees word. Dit is die afstand tussen die punt by zero byvoeging en die snypunt wat die kurwe met die absissa maak.

### 3.2. Resultate en bespreking

Van FIGURE VII en VIII blyk dat beide heksanol en etiel-oktoaat as interne standaarde gebruik kan word, aangesien vir al twee interne standaarde reguitlyne verkry word. Binne die perke van eksperimentele foute was die waardes vir die linaloolkonsentrasie ook in albei gevalle identies. Indien, soos in hierdie

FIG. VII KALIBRASIEKURWE VIR LINALOOL IN HANEPootWYN  
(HEKSANOL AS INTERNE STANDAARD)

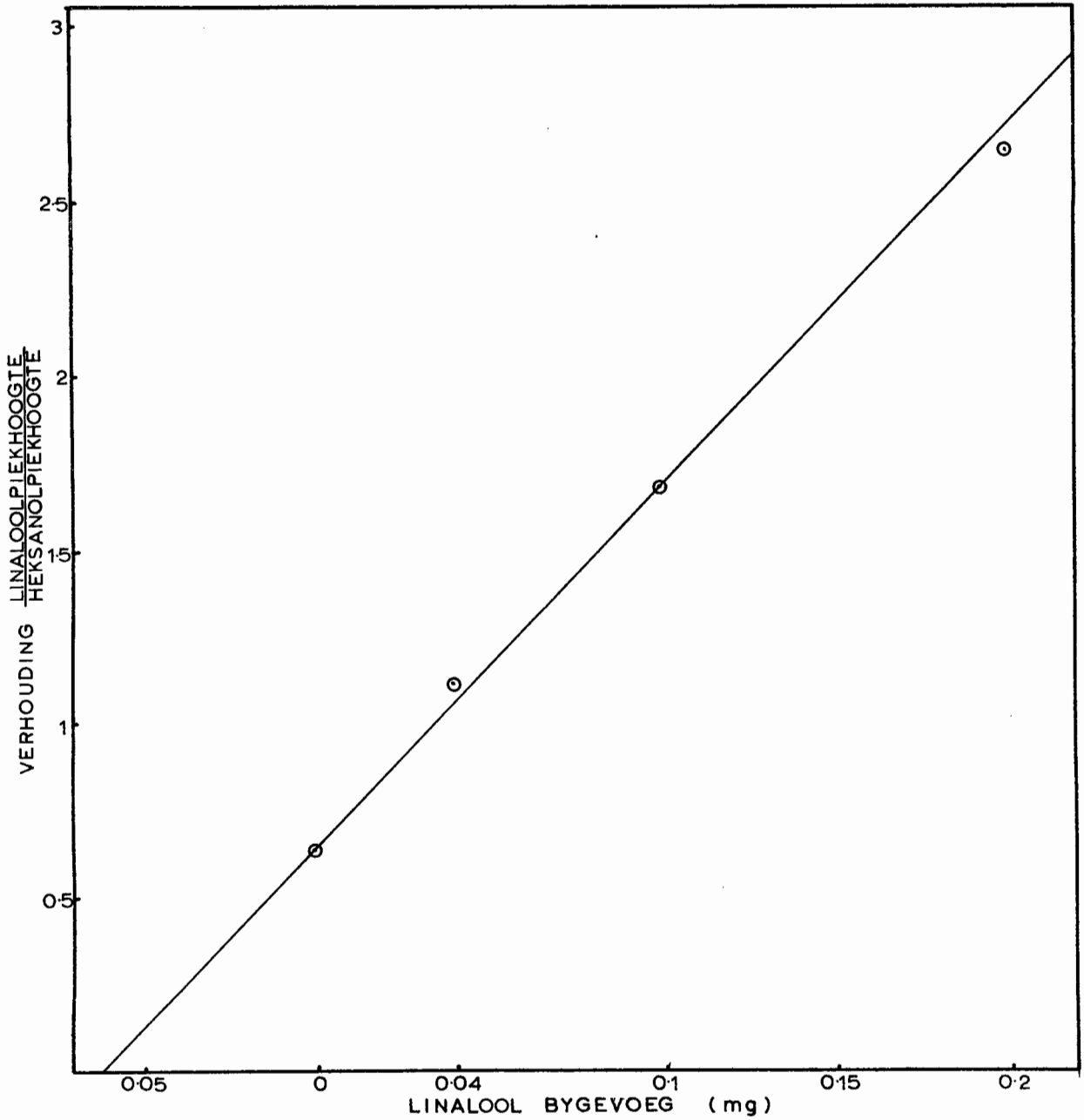
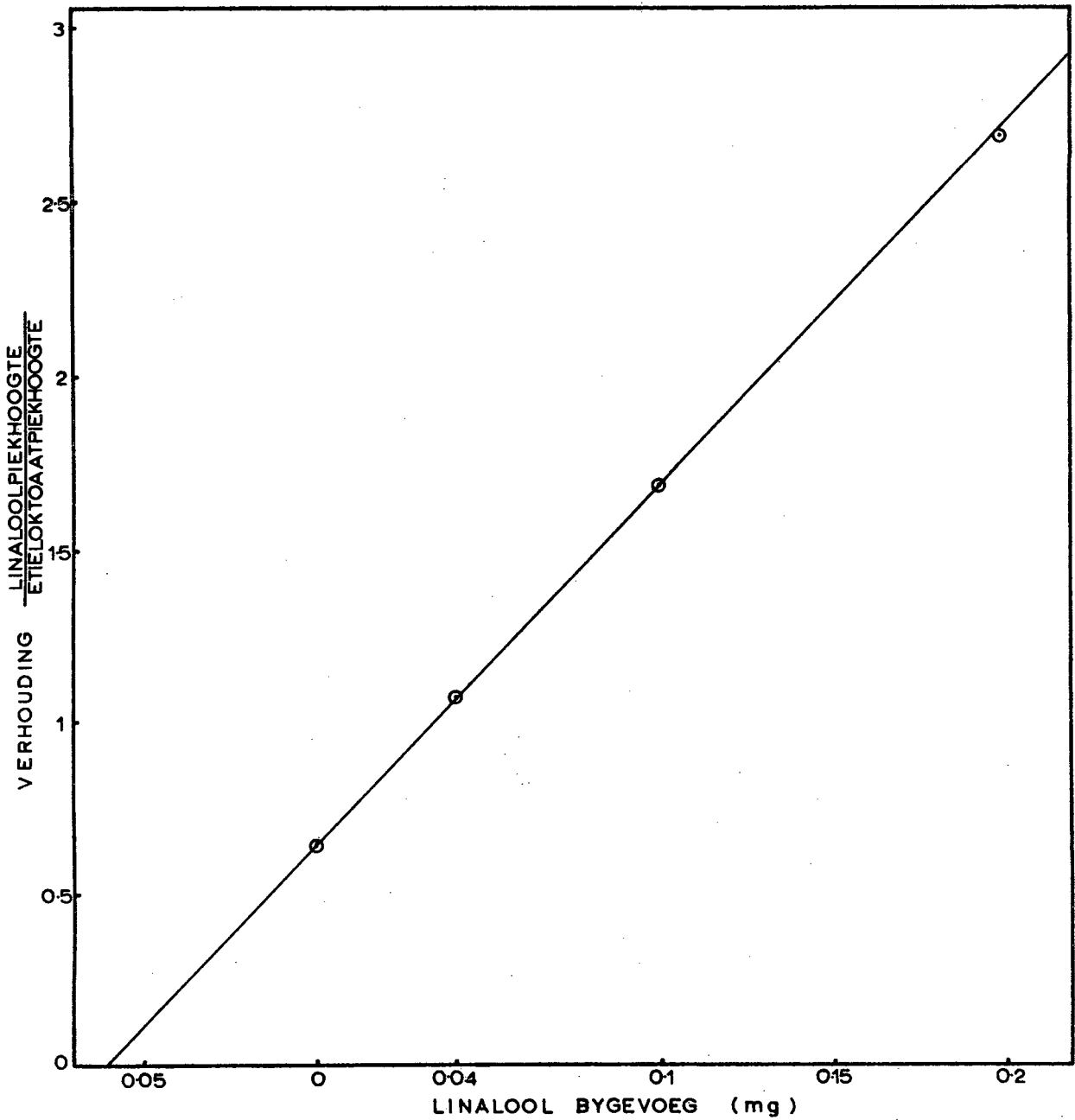




FIG.VIII KALIBRASIEKURWE VIR LINALOOL IN HANEPootWYN  
(ETIELOKTOAAT AS INTERNE STANDAARD)



ondersoek, 150 ml-porsies wyn vir ekstraksie gebruik word, kan met hierdie metode tot 0.01 mg per liter linalool kwantitatief bepaal word. Die fout by sulke lae konsentrasies is ongeveer 5%. Die linaloolkonsentrasies van ses wyne wat hier ondersoek is, het tussen 0.12 mg per liter en 0.52 mg per liter gewissel.

Dit is algemeen bekend dat, uit 'n organoleptiese oogpunt beskou, muskaatwyne met veroudering geleidelik hul muskaatkarakter verloor. Dit het die vermoede laat ontstaan dat die linaloolkonsentrasie met veroudering van die wyn afneem, moontlik weens 'n verestering wat kan intree. Om meer kennis hieroor in te win, is die linaloolkonsentrasie in vier Muskadeljeripicos, wat verskillende tydperke van veroudering ondergaan het, bepaal. Die vier proefmonsters is in dieselfde distrik geoes en het dieselfde behandeling tydens die bereidings- en verouderingsproses ontvang.

TABEL II.

Linaloolkonsentrasies in jeripicos op verskillende stadia van veroudering

Oesjaar van jeripico	Konsentrasie linalool mg/l
1965	0.18
1962	0.23
1959	0.22
1930	0.12

Uit TABEL II is dit duidelik dat, alhoewel die oudste wyn die laagste linaloolkonsentrasie besit, geen direkte afleiding omtrent 'n afname van linalool met veroudering gemaak kan word nie, aangesien die 1965-wyn 'n laer linaloolgehalte as die 1962- en 1959-wyne het. Dit is 'n bekende feit dat die rypheidsgraad van die druiwe en klimaatstoestande 'n belangrike faktor by die geurstofkonsentrasie van druiwe is<sup>(1)</sup>. Dit wil voorkom asof bogenoemde of ander faktore die linaloolkonsentrasies van wyne van verskillende jaargange tot so 'n mate beïnvloed, dat geen eweredige afname daarvan (TABEL II) waargeneem kon word nie. Die toename van sommige ander boeketstowwe tydens veroudering (Hoofst. IV) kan moontlik ook die muskaatkarakter onderdruk en dit dus organolepties minder waarneembaar maak. Om hierdie probleem van die afname van die linaloolkonsentrasie op te los, behoort dus slegs een muskaatwyn op verskillende stadia van veroudering ondersoek te word.

-----

## H O O F S T U K   I V

### CHEMIESE KOMPONENTE GEVORM GEDURENDE DIE VEROUDERING VAN

#### WYN

#### 4.1. INLEIDING

Baie navorsers het reeds die chemiese veranderinge wat tydens veroudering van wyne en brandewyne plaasvind, ondersoek. Dit word algemeen erken dat die vernaamste veranderinge toegeskryf kan word aan oksidasie- en veresteringsprosesse<sup>(1)</sup>. Ronkainen et. al<sup>(4)</sup> het die veranderinge van karbonielverbindings tydens die verouderingsproses van cognac ondersoek. Hulle het vasgestel dat die konsentrasie van furfuraal, i-butieraldehyd en i-valeraldehyd afneem, maar dat dié van asetaldehyd steeds toeneem. Volgens Russiese navorsers<sup>(34)</sup> vind daar gedurende veroudering van brandewyn in houtvate 'n hidrolise van die hemisellulose van die hout plaas, as gevolg waarvan verskillende suikers gevorm word. Hierdie suikers word mettertyd na furfuraal-verbindings geoksideer, wat 'n belangrike invloed op die geur uitoefen. Carles en Lama-zou-Betbeder<sup>(35)</sup> het gevind dat aminosure tydens die veroudering van wyn gedekarboksileer word en die ontbindingsprodukte kan moontlik bydra tot die bouquet van die wyn. Met eksperimente, waar wyn met ultraviolet lig bestraal is om die verouderingsprosesse te verhaas, is 'n toename in die ester-, vlugtige suur- en aldehydkon-sentrasie / .....

sentrasie vasgestel, terwyl die hoër alkoholkonsentrasie 'n afname getoon het<sup>(36)</sup>.

By die gaschromatografiese ondersoek van die invloed van veroudering op die linaloolkonsentrasie van jeripicos (3.2.), is gevind dat met toenemende veroudering daar 'n konsentrasietoename van sommige onbekende substansie plaasvind. In hierdie ondersoek is gepoog om hulle te identifiseer en die toename kwantitatief vas te stel.

#### 4.2. Eksperimenteel

By die ondersoek waar die invloed van veroudering op die linaloolgehalte van muskaatwyne bepaal is, is vier muskadeljeripicos, wat verskillende tydperke van veroudering ondergaan het, gaschromatografies ontleed (3.2.). Op die chromatogramme van die jeripico-ekstrakte na skeiding op kolom M (TABEL III), het twee onbekende pieke met retensietye van 9.3 en 12.0 minute verskyn. Hierdie pieke het met toenemende ouderdom van die wyn in grootte toegeneem. Toetse om vas te stel watter funksionele groepe hierdie twee substansie bevat, is uitgevoer. Dieselfde metodes, soos reeds beskryf (2.2.3.), is aangewend. Die verdwyning van die onbekende pieke na verseping van die wyn, het die bewys gelewer

dat hierdie / .....

TABEL IIIGASCHROMATOGRAFIESE KOLONNE EN KONDISIES.

Kolom Nr.	Lengte m	Binnedeursnee mm	Draermateriaal	Stasionêre fase	Draergas & vloei-spoed	Begin-temp.	Programmering	Temperatuur van inspuitblok
M	2	1.2	Celite 60-80 maas	20% Poliëtileen- glikol 1500	Helium 20/ml/min	50°C	15°C per min tot 150	180°C
N	2	1.2	Celite 60-80 maas	15% Dinoniel- ftalaat	Helium 20/ml/min	50°C	10°C per min tot 150°C	180°C
O	2	1.2	Celite 60-80 maas	20% Apiezon M	Helium 20/ml/min	50°C	15°C per min tot 180°C	180°C

dat hierdie verbindings esters is. Die vergelyking van hierdie esters met suiwer substansie op verskillende kolomme het getoon dat die substansie met 'n retensietyd van 12.0 minute op kolom M, die etielester van barnsteensuur is (TABEL IV). Die ander substansie kon nie geïdentifiseer word nie omdat onvoldoende hoeveelhede monster vir verdere identifikasietoetse beskikbaar was.

De Vries<sup>(11)</sup> het etielpelargonaat as interne standaard vir die bepaling van die hoër vetsuuresters in wyn en brandewyn gebruik. Daar is getoets of hierdie interne standaard ook vir die kwantitatiewe bepaling van diëtielsuksinaat aangewend kan word. By vier 100 ml-porsies 10% etanol is gelyke hoeveelhede van 'n etielpelargonaatoplossing gevoeg en verskillende hoeveelhede van 'n diëtielsuksinaatoplossing. Elke oplossing is met 20 + 10 + 10 ml eter geëkstraheer, die ekstrakte is twee maal met 10 ml water gewas en met natriumsulfaat gedroog. Die oplossings is na ongeveer 0.5 ml ingedamp en op kolom M geanaliseer. Die resultate word in TABEL V aangegee.

Vervolgens is vyf jeripicos, wat verskillende tydperke van veroudering ondergaan het, geanaliseer deur 150 ml van die wyn na toevoeging van 0.2 mg etielpelargonaat met 'n mengsel van eter en pentaan (2:1) te ekstraheer en die ekstrakte op kolom M te analiseer. Die oppervlakte van die pieke van diëtielsuksinaat en die onbekende ester / .....

kende ester (met 'n retensietyd van 9.3 minute) is direk met dié van etielpelargonaat vergelyk (TABEL VI).

#### 4.3. Resultate en bespreking

Soos dit uit TABEL IV blyk, stem die retensietye van diëtielsuksinaat van die wynekstrak en dié van die suiwer substans ooreen.

TABEL IV

Retensietye van suiwer diëtielsuksinaat in vergelyking met dié van diëtielsuksinaat uit wyn verkry

Kolom	Retensietye in minute *	
	Suiwer Diëtielsuksinaat	Diëtielsuksinaat uit wyn
M	9.3	9.3
N	9.53	9.60
O	8.7	8.8

\* Kondisies soos in TABEL III aangegee.

Volgens TABEL V blyk dit dat goeie persentasieherwinningswaardes met behulp van etielpelargonaat as interne standaard verkry is.

TABEL V / .....



TABEL V

Persentasie herwinnings van diëtielsuksinaat met etielpelargonaat as interne standaard

Mon-ster	Konsentrasie mg per l			
	Etiel-pelargonaat	Diëtielsuksinaat teenwoordig	Diëtielsuksinaat verkry	Persentasie herwinning
1	1.14	0.51	0.49	96.08
2	1.14	1.27	1.20	94.49
3	1.14	2.53	2.44	96.44

TABEL VI toon die konsentrasies van diëtielsuksinaat en van die onbekende ester van jeripico-wyne op verskillende stadia van veroudering.

TABEL VI

Esterkonsentrasies in wyne op verskillende stadia van veroudering

Oesjaar	Esterkonsentrasie mg per l	
	Diëtielsuksinaat	Onbekende ester
1965	0.13	0.07
1962	2.83	0.70
1961	2.33	0.86
1959	2.79	1.05
1930	10.50	5.80

Soos dit uit TABEL VI blyk, is daar 'n eweredige toename in die konsentrasie van die esters met toenemende ouderdom van die wyn, afgesien van die 1962-wyn wat 'n hoër diëtielsuksinaatkonsentrasie as die 1961- en 1959-wyne besit. Dit kan moontlik toegeskryf word aan 'n hoër barnsteensuurkonsentrasie van die mos waaruit die wyn berei is.

Aangesien jeripico-wyne ongeveer 18 volume persent etanol besit, kan geen gisting plaasvind nie. Alle esters wat hier gevorm word, het dus uit sure en alkohole, wat in die wyn teenwoordig is, deur gewone chemiese verestering ontstaan. Dat hierdie proses baie stadig verloop, kan uit TABEL VI afgelei word.

## H O O F S T U K V

### KARBONIELVERBINDINGE IN WYNE EN WYNDISTILLATE

#### 5.1. Inleiding

Karbonielverbindings, veral aldehyede en hul asetale, speel weens hul intensiewe geur 'n belangrike rol by die kwaliteit van alkoholiese drankes<sup>(20, 37, 38)</sup>. Volgens Paul<sup>(37)</sup> is die aldehyede in wyne gewoonlik feitlik geheel en al aan swaweldioksied gebind en hierdie adduk (hidroksiesulfoonsuur of sy sout) is smaak- en reukloos. Indien aldehyede in wyn in die ongebonde vorm aanwesig is, oefen hulle 'n nadelige invloed uit, terwyl in skuimwyne 'n hoë vry aldehyedkonsentrasie bevorderlik vir die tipiese skuimwynkarakter is. Volgens Litschew en Pantaiotow<sup>(38)</sup> wat verskillende karboniele in brandewyn geïdentifiseer het, is die spesifieke aroma en smaak daarvan van die aldehyede afkomstig. In hierdie ondersoek is gepoog om die aldehyede in alkoholiese drankes te identifiseer en hulle kwantitatief te bepaal.

#### 5.2. Eksperimenteel

##### 5.2.1. Skeiding van ander komponente

Aldehyede en ketone kom in alkoholiese drankes in baie lae konsentrasies voor. Voor analise moet hulle eers gekonsentreer

en van ander substansie geskei word. Dit kan bewerkstellig word deur van die karboniese onoplosbare derivate te berei. Piha et. al<sup>(23)</sup> het karboniese in alkohol, afkomstig van die gisting van stysel, as 2,4-dinitrofenielhidrasone (2,4-DNPH) neergeslaan. 'n Gewysigde metode is hier aangewend. Die volgende reagens is vir die neerslaan van die karboniese gebruik: 2.5 g 2,4-dinitrofenielhidrasien (DN) is in 1000 ml 2N soutsuur opgelos, tot kookpunt verhit, weer laat afkoel en die onoplosbare bestanddele is afgefiltreer. Hierdie reagens is in oormaat by die wyn of wyndistillaat gevoeg en na twee tot vier dae is die neerslag met behulp van 'n sinterglasfilter van die oplossing geskei. Die hidrasien wat nie gereageer het nie, is van die neerslag verwyder, deur met 0.5 N soutsuur te was. Vervolgens is die neerslag met water gewas en in 'n dessikator gedroog.

### 5.2.2. Papierchromatografie

Verskeie navorsers het vir die skeiding van 2,4-DNPH papierchromatografiese metodes aangewend<sup>(39-42)</sup>. Die skeiding soos deur Asatoor<sup>(39)</sup> uitgevoer, waar van 'n omgekeerde fase chromatografie gebruik gemaak word, is getoets. Aangesien die 2,4-DNPH van 'n asetaldehyd meer polêr is as die derivate van die aldehyde met 'n langer koolstofketting, sal die R<sub>f</sub>-waarde van eersgenoemde verbinding groter wees. Meer as 95% van die totale karbonielkon- / .....

bonielkonsentrasie van 'n wyn of sy distillaat bestaan egter uit asetaldehyd. Om dus die ander karboniele op die papierchromatogram te kan waarneem, moet die monster wat opgedra word, baie groot wees. As gevolg hiervan bedek die derivaat van asetaldehyd al die ander karbonielerivate, wat in baie laer konsentrasies voorkom. Om hierdie rede is hierdie metode en ander, waar van omgekeerde fase chromatografie gebruik gemaak word, as ongeschik vir hierdie doel bevind.

Van die ander metodes wat getoets is, het 'n gewysigde metode van Horner en Kirmse<sup>(42)</sup> die beste resultate gelewer. Die papier (Whatman Nr.4) is met 'n mengsel van asetoon en dimetielformamied (1:1) geïmpregneer en die meeste asetoon is toegelaat om te verdamp. As mobiele fase is die boonste laag van 'n mengsel van die dimetielformamied en sikloheksaan (1:6) gebruik. Die onderste laag is gebruik om die atmosfeer in die chromatografiekas te versadig. Die chromatogram is vir ses uur by 25°C ontwikkel. Om die kolle meer duidelik sigbaar te maak, is die papier na droging by kamertemperatuur met 'n alkoholiese bytsoda-oplossing bespuit.

Die konsentrasie van die hoër aldehydderivate (drie koolstowwe en meer) was egter te laag om duidelike kolle te verkry. Om die hoër aldehydderivate van die oormaat 2,4-DNPH van asetaldehyd te skei, is die hidrasone in etanol of chloroform gerekristalliseer. / .....

seer. Die hidrasone van die aldehiede, wat in lae konsentrasies teenwoordig is, versamel in die moederloog. Laasgenoemde is gekonsentreer en gechromatografeer.

### 5.2.3. Gaschromatografie

Rall<sup>(43)</sup> het die vlugtige karboniele voor gaschromatografiese analise uit hulle 2,4-DNPH-derivate vrygestel. 'n Gewysigde metode is hier aangewend. Vier gewigsdele  $\alpha$ -ketoglutaarsuur of agt dele ftaalsuur is met een gewigsdeel van die 2,4-DNPH gemeng. 'n Sekere gewig van die mengsel (10-50 mg) is in 'n kapillêre buis, waarvan die geslote end effens vergroot was, gevoeg. Die kapillêr is  $90^\circ$  gebuig en met twee silikoonmembrane lugdig aan die inspuitsblok van die gaschromatograaf verbind. Die gasstroom is deur die kolom gestuur en sodra die instrument ewewig bereik het, is die vergrote end van die kapillêr, waarin die monster was, vir vyf sekondes by  $255^\circ\text{C}$  verhit. Die aldehiede wat as gevolg van die verhoging in temperatuur uit die monster vrygestel word, beland op hierdie wyse direk in die gasstroom van die gaschromatograaf. Die kolom en kondisies wat gebruik is, word in TABEL VII aangegee.

Met verwarming van die mengsel in die kapillêre buis word egter ook water gevorm, wat 'n groot piek met 'n lang onsimmetriese rugkant op / .....

TABEL VII

## GASCHROMATOGRAFIESE. KOLOMME EN KONDISIES VIR SKEIDING VAN KARBONIELE.

Kolom Nr.	Lengte m	Binne-deur-snee mm	Draermateriaal	Stasionêre fase gewig %	Draergas & vloei-spoed	Kolom-Temp.	Temp. van inspuit-blok
H	2	5.5	Chromosorb 60-80 maas	20% Dibensieleter	Helium 50ml/min	75°C	100°C
I	2	5.5	Chromosorb 60-80 maas	20% Apiezon vet	Helium 55ml/min	100°C	150°C
K	5	5	Sterchamol 35-60 maas	15% Trikresiel- fosfaat	Helium 35ml/min	70°C	95°C
L	2	5.5	Chromosorb 60-80 maas	20% Di-n-hek- sieleletieseba- sinaat	Helium 50ml/min	100°C	150°C



kant op die chromatogram lewer. Dit het die analise vir die aldehyede, waarvan die retensietye ooreenstem met dié van water, belemmer. Om die water te verwyder, is kolomme wat water absorbeer voor die skeidingkolom geskakel. Kolomme van een meter lengte, gevul met watervrye gips, silikagel, kalsiumchloried, kalsiumkarbied en magnesiumperchloraat is getoets. 'n Kolom gevul met 20-40 maas kalsiumchloried het die beste resultate gelewer aangesien die adsorpsie van die aldehyede die minste aan hierdie kolom was.

Vir identifikasiedoeleindes is die uitlaatgasse na gaschromatografiese skeiding agtereenvolgens deur klein buisies met 2,4-DN-reagens geborrel. Die neerslag wat gevorm het, is afgofiltreer en verder papierchromatografies geanaliseer (5.2.2.). Die smeltpunte van die hidrasone met behulp van bogenoemde metode verkry, is bepaal asook mengselmeltpunte met die ooreenstemmende karboniëlderivate.

Vir 'n kwantitatiewe bepaling is sintetiese mengsels van die 2,4-DNPH in ongeveer dieselfde verhouding as die ooreenstemmende aldehydekonsentrasies in wyne, berei. Die 2,4-DNPH van n-butieraldehyd, wat nie in wyn voorkom nie, is as interne standaard gebruik. Die persentasie herwinnings met betrekking tot n-butieraldehyd is bereken en word in TABEL XI aangegee.

5.3. Resultate/...



5.3. Resultate en bespreking

Die Rf-waardes van bekende karboniëlderivate is vergelyk met dié verkry van karboniëlderivate afkomstig uit wyne en wyn-distillate. Substansie, waarvan die Rf-waardes ooreenstem met die van aset-, i-butier- en i-valeraldehyd, furfural en moontlik ase-ton, is verkry. Die twee kolle wat van furfuraal verkry is, ver-teenwoordig die cis- en transderivaat van hierdie verbinding. Al hierdie kolle is uitgesny, met etanol geëlueer en die absorpsie-maksima met 'n Zeiss M4Q spektrofotometer bepaal. Die resultate word in TABEL VIII uiteengesit.

TABEL VIII

Die ligabsorpsiemaksima van 2,4-dinitrofenielhidrasone

2,4-DNPH- Derivaat	Absorpsiemaksimum	
	Rein Verbinding	Verbinding uit wyn verkry
Asetaldehyd	355 m $\mu$	355 m $\mu$
i-Butieraldehyd	354 m $\mu$	355 m $\mu$
i-Valeraldehyd	354 m $\mu$	354 m $\mu$
Furfuraal (Cis)	380 m $\mu$	378 m $\mu$
Furfuraal (Trans)	390 m $\mu$	390 m $\mu$

'n Kwantitatiewe / .....

'n Kwantitatiewe papierchromatografiese bepaling van die karboniel-verbinding kon nie uitgevoer word nie, aangesien, soos reeds genoem, die hoër aldehyede in te lae konsentrasies voorkom en die skeidings ook nie voldoende was nie.

Asetaldehyd, i-butieraldehyd en i-valeraldehyd is ook gaschromatografies geïdentifiseer. Die retensietye op verskillende kolomme word in TABEL IX aangetoon.

TABEL IX

Retensietye van aldehyede op verskillende kolomme

Verbinding	Retensietye in minute*							
	Kolom H		Kolom I		Kolom K		Kolom L	
	Suiwer Substans	Substans uit wyn	Suiwer Substans	Substans uit wyn	Suiwer Substans	Substans uit wyn	Suiwer substans	Substans uit wyn
Asetaldehyd	1.90	1.90	1.55	1.55	2.35	2.36	1.45	1.50
i-Butieraldehyd	5.50	5.50	3.90	3.95	5.20	5.25	3.75	3.75
n-Butieraldehyd	8.15	8.20	5.03	5.05	7.65	7.70	4.85	4.85
i-Valeraldehyd	12.90	12.90	7.90	7.95	11.40	11.50	7.15	7.15

\* Kondisies soos in TABEL VII aangegee.

Die smeltpunte / .....

Die smeltpunte van die 2,4-DNPH was laer as in die literatuur<sup>(55)</sup> aangegee . Die mengselmeltpunte met die neerslag van elke fraksie na gaschromatografiese skeiding, het geen verlaging getoon nie (TABEL X).

TABEL X

Smeltpunte en mengselmeltpunte van 2,4-dinitrofenielhidrasone

2,4-DNPH-derivaat	Smeltpunt in literatuur	Smeltpunt van suiwer stof	Smeltpunt van stof uit wyn verkry	Mengsel smeltpunt
i-Butieraldehyd	187° C	180° C	174° C	174° C
i-Valeraldehyd	123° C	117° C	115° C	114° C

Deur middel van gaschromatografie kon ook geen kwantitatiewe bepalinge uitgevoer word nie aangesien geen reproduseerbare herwinningwaardes verkry is nie. Dit blyk duidelik van TABEL XI.

Die hoofrede hiertoe is miskien die adsorpsie van die aldehyde aan die kalsiumchloriedkolom of 'n onvolledige omsetting van die hidrasone na die vry aldehyde.

TABEL XI / .....

TABEL XI

Persentasieherwinningswaardes verkry met n-butieraldehyd as interne standaard

Mon- ster Nr.	Persentasie Herwinning			
	Asetaldehyd	i-Butieraldehyd	n-Butieraldehyd	i-Valeraldehyd
1	101.21	80.23	100	82.80
2	135.65	82.79	100	85.66
3	103.58	66.80	100	87.63
4	97.68	67.08	100	98.71
5	85.17	56.06	100	93.14
6	95.91	65.48	100	94.83
7	64.44	91.29	100	142.52
8	94.37	61.58	100	101.48
9	100.96	64.96	100	96.96

## H O O F S T U K VI

### VLUGTIGE BESTANDDELE GEVORM DEUR BRETTANOMYCES- GISTE

#### 6.1. Inleiding

In die wynbereiding word verskillende gisrasse vir die gisting van druiwemos gebruik. Verskeie navorsers het die invloed wat die verskillende rasse op die kwaliteit van wyn uitoefen, ondersoek<sup>(44, 45)</sup>. Van Zyl et. al<sup>(46)</sup> het die stofwisselprodukte wat deur verskeie gisrasse gevorm word, bepaal. Groot kwantitatiewe verskille in die geurstofkonsentrasies is verkry in media wat deur verskillende gisrasse gegis is.

Brettanomyces was een van die organismes wat deur bogenoemde navorsers<sup>(46)</sup> ondersoek is. Dit is van groot belang vir die wynbedryf aangesien dit die belangrikste troebelveroorsakende organisme in Suid-Afrikaanse wyne is<sup>(47)</sup>. Indien suiwer Brettanomyces-kulture in druiwemos gis, word 'n tipiese geur, wat gedeeltelik ooreenstem met die geur van appels, in die gistingsgasse vrygestel<sup>(47, 48)</sup>. Gaschromatografiese ondersoek het getoon dat in media deur Brettanomyces gegis, twee substansie gevorm word, wat slegs by hierdie gis aangetref word<sup>(46)</sup>. In hierdie ondersoek is gepoog om hierdie substansie te identifiseer en om vas te stel watter stof vir die / .....

vir die tipiese geur verantwoordelik is.

## 6.2. Eksperimenteel

Mos, afkomstig van steendruwe, is vir een uur by 100°C stoomgesteriliseer. By sewe liter van hierdie mos is 200 ml rein Brettanomyces-kulture gevoeg. Gisting het by 24°C plaasgevind. Vier Brettanomyces-spesies is in die ondersoek gebruik, naamlik WE 247, WE 248, W 249 en WE 250, wat in die gisversameling van die N.I.W.W. bewaar word. As kontrole is Sacharomyces cerevisiae var. ellipsoideus (WE 14) gebruik.

Na afloop van die gisting is geskikte hoeveelhede van die wyn met eter geëkstraheer en die ekstrak verder behandel soos reeds beskryf (2.2.1.). Die gaschromatografiese analise, soos deur van Zyl et. al<sup>(46)</sup> beskryf, waar die retensievolumes van die onbekende substansie bepaal is, kon nie herhaal word nie, aangesien die stasionêre fase (poli-etileenglikolsuksinaat) deur hulle aangewend, nie beskikbaar was nie. Gevolglik is van ander kolomme gebruik gemaak en stasionêre fases met ongeveer dieselfde eienskappe as dié van poli-etileenglikolsuksinaat, gekies. Die kolomme en kondisies gebruik hierby, word in TABEL XII aangegee.

Ten einde vas / .....

TABEL XII

## GASCHROMATOGRAFIESE KOLONNE EN KONDISIËS.

Kolom Nr.	Lengte m	Binnedeursnee mm	Draermateriaal	Stasionêre fase gewig persent	Draergas en vloeispoed	Kolomtemperatuur
S	1	5	Celite 60-80 maas Suurgewas en DDS* behandel	10% Diëtieleenglikolsuksinaat	Helium 85ml/min.	120°C
T	1	5	Celite 60-80 maas Suurgewas en DDS* behandel	10% Dinonielftalaat	Helium 80/ml/min	145°C
U	1	5	Celite 60-80 maas Suurgewas en DDS-behandel	10% Dinonielftalaat	Helium 90ml/min	75°C
V	1	5	Celite 60-80 maas Suurgewas en DDS-behandel	10% Diëtieleenglikolsuksinaat	Helium 85ml/min	75°C
W	2	5.5	Chromosorb 40-60 maas	Poli-etileen-glikol 1500	Helium 60ml/min	90°C

\* DDS - Dimetioldichlorosilaan

Ten einde vas te stel watter substans slegs deur Brettanomyces tydens gisting gevorm word, is 'n chromatogram van 'n ekstrak van hierdie wyn met dié van die kontrolewyn (gegis met WE 14) vergelyk. Op die chromatogram afkomstig van die Brettanomyces-wyn het na skeiding op kolomme S en T drie groot pieke verskyn, terwyl hierdie drie stowwe slegs in baie geringe konsentrasie in die kontrolewyn voorgekom het. Aangesien dit die mees opvallende verskil tussen die chromatogramme van die twee wyne was, is gepoog om die drie substansie te identifiseer.

Toetse is uitgevoer om te bepaal watter funksionele groepe die substansie bevat. Dieselfde prosedure is aangewend soos reeds tevore beskryf (2.2.3.). Die verdwyning van die drie pieke op die chromatogram, nadat die ekstrak met verdunde natriumbikarbonaat- of bytsoda-oplossing geëkstraheer is, het bewys gelewer dat die drie substansie karboksielgroepe bevat. Die retensietye van hierdie drie substansie asook van twee ander sure is met dié van bekende sure op kolomme S en T vergelyk (TABEL XIII).

Vir verdere identifikasie is die etielesters van die sure in die ekstrak berei. Die eterekstrak van vier liter Brettanomyces-wyn is met verdunde bytsoda-oplossing geëkstraheer. Om die suiwer soute van die sure te verkry, is die bytsoda-oplossing met eter

teruggeëkstraheer. / .....



teruggeëkstraheer. Om die sure uit die natriumsoute vry te stel, is die oplossing met verdunde swawelsuur aangesuur. Die vry sure is met eter geëkstraheer en na droging van die ekstrak is die eter versigtig afgedamp. By hierdie konsentraat is 'n oormaat absolute etanol en 'n paar druppels gekonsentreerde swawelsuur gevoeg en vir 24 uur onder terugvloei gekook. By die mengsel is 'n klein hoeveelheid eter gevoeg. Om die swawelsuur te verwyder, is die oplossing met water en natriumbikarbonaatoplossing geëkstraheer. Na afdamping van die eter, is die retensietye van die etielesters wat hier gevorm het met suiwer etielesters op kolomme U en V vergelyk (TABEL XIV).

Vir die kwantitatiewe bepaling van die sure is van die prosedure, soos vir die bepaling van linalool (3.1.), gebruik gemaak. Die volgende wysigings is egter aangebring. As interne standaard is n-valeriaansuur gebruik aangesien hierdie substans nie in wyn voorkom nie en op 'n geskikte plek op die chromatogram verskyn. Stamoplossings met konsentrasies van ongeveer agt mg per ml is van n-valeriaansuur, i-valeriaansuur en i-bottersuur berei, terwyl die stamoplossings van heksanoë- en oktanoësuur elk twee mg per liter bevat het. By vier 300 ml-porsies van die wyn is gelyke hoeveelhede n-valeriaansuurooplossing gevoeg (3 ml), terwyl toenemende hoeveelhede, naamlik 0, 1, 2 en 4 ml van elk van die ander stamoplossings / .....

ander stamoplossings daarby gevoeg is. Verder is die oplossings geanaliseer volgens die tegniek wat reeds vroër beskryf is. Gaschromatografiese skeidings is op kolom S uitgevoer. By die oppervlaktemeting van die pieke is van die produk van hoogte en breedte by halfhoogte gebruik gemaak. Die konsentrasie van die sure wat deur die verskillende Brettanomyces-spesies en deur S. cerevisiae (WE 14) gevorm is, is bepaal.

Vervolgens is gepoog om die tipiese geur wat ontstaan wanneer Brettanomyces-giste gebruik word, te identifiseer. Na gaschromatografiese skeiding van die wynekstrak op kolomme W en A (TABEL I) is agtereenvolgende fraksies in etanol opgevang vir organoleptiese beoordeling. In geeneen van die fraksies kon egter die tipiese appelgeur van Brettanomyces waargeneem word nie. Om die geurstowwe, wat saam met die koolsuurgas tydens gisting ontsnap, te versamel, is laasgenoemde met behulp van 'n sinterglassspreier deur 96% etanol geborrel. Die etanol is verdun tot 'n konsentrasie van 30 Vol% en met eter geëkstraheer. Na gaschromatografiese skeiding op kolom A en opvang van die fraksies in etanol, kon in 'n fraksie, waar 'n piek met retensietyd van 4.1 minute op die chromatogram verskyn, die tipiese appelgeur van Brettanomyces waargeneem word. Op kolom W het hierdie substans 'n retensietyd van 9.6 minute gehad. By gebrek aan voldoende hoeveelhede van

van die monster / .....

van die monster kon geen verdere toetse uitgevoer word nie.

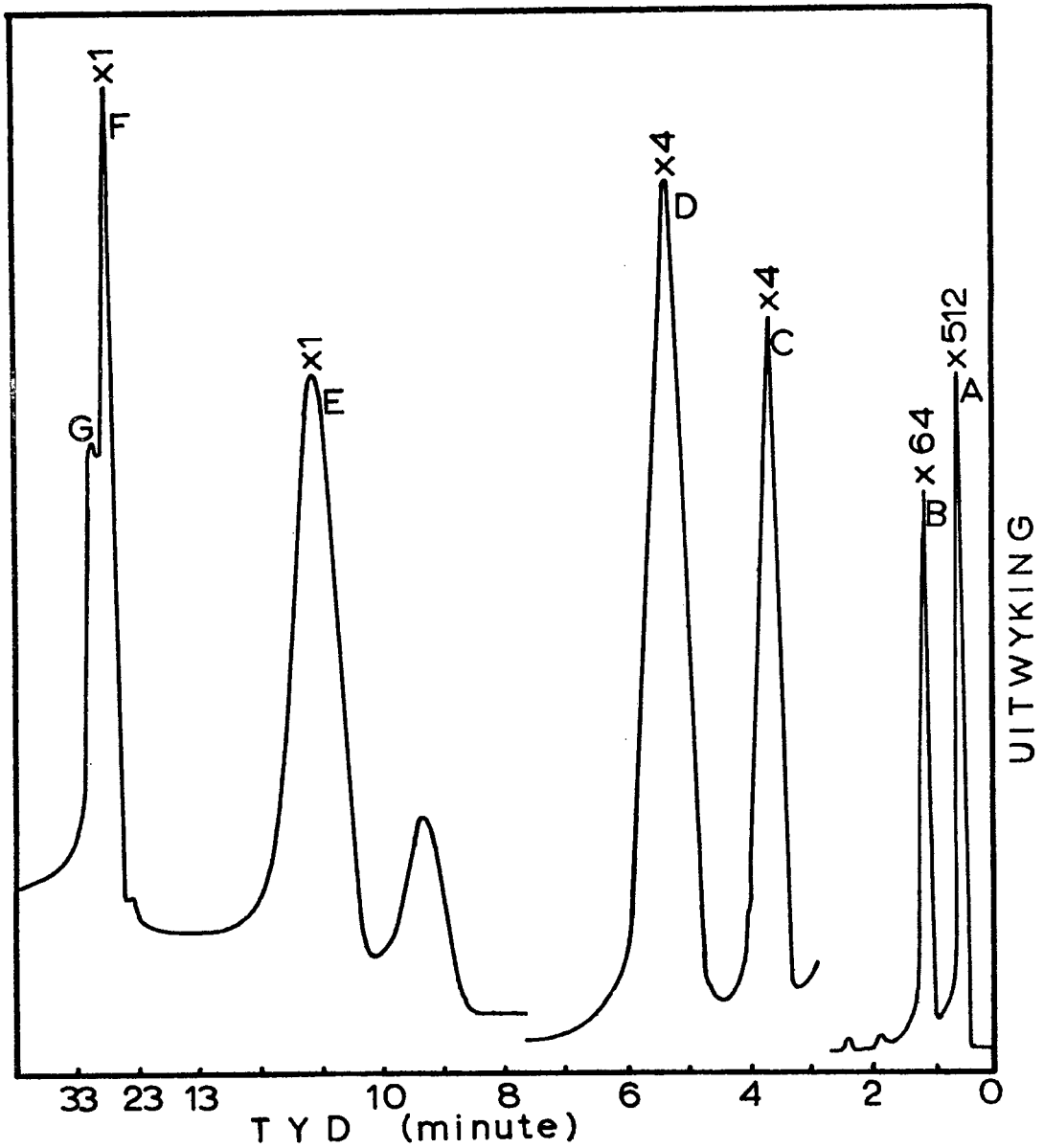
### 6.3. Resultate en bespreking

Verskeie navorsers het sure gaschromatografies geanaliseer maar weens hulle hoë polariteit en hoë kookpunte vooraf die esters daarvan berei (49, 50, 51). Vir direkte gaschromatografiese analise van sure is draermateriale gebruik wat inert was (glaspêrels, teflonpoeier, ens.) en as stasionêre fases is hoogmolekulêre sure of die gebruiklike stowwe gemeng met fosforsuur, gebruik (52, 53). In hierdie ondersoek is die draermateriaal met soutsuur gewas en met dimetieldichlorosilaan behandel terwyl hoogkokende esters as stasionêre fases gebruik is (TABEL XII). Goeie skeidings van die sure en simmetriese pieke is met hierdie kolomme verkry (FIG. IX).

Soos uit TABEL XII blyk, stem die retensietye op kolom S en T van die suiwer sure ooreen met dié van die geëkstraheerde sure. Dieselfde ooreenstemming is vir die etielesters op kolom U en V verkry (TABEL XIV).

TABEL XIII / .....

FIG IX CHROMATOGRAM VAN N BRETTANOMYCES-  
WYNEKSTRAK



- A. Oplosmiddel (eter)
- B. Fuselolie
- C. i-Bottersuur
- D. i-Valeriaansuur
- E. n-Heksanoësuur
- F.  $\beta$ -Fenieletielalkohol
- G. n-Oktanoësuur

TABEL XIII

Retensietye van sure uit wyn geïsoleer

Verbinding	Retensietye in minute *			
	Kolom S		Kolom T	
	Suiwer substans	Substans uit wyn	Suiwer substans	Substans uit wyn
Asynsuur	2.0	1.9	-	-
i-Bottersuur	3.05	2.9	1.2	1.2
i-Valeriaansuur	4.8	4.75	2.0	2.15
Heksanoësuur	10.3	10.25	4.7	4.6
Oktanoësuur	24.6	24.8	14.7	14.9

\* Kondisies soos in TABEL XII aangegee

TABEL XIV

Retensietye van die etielesters van sure uit wyn geïsoleer

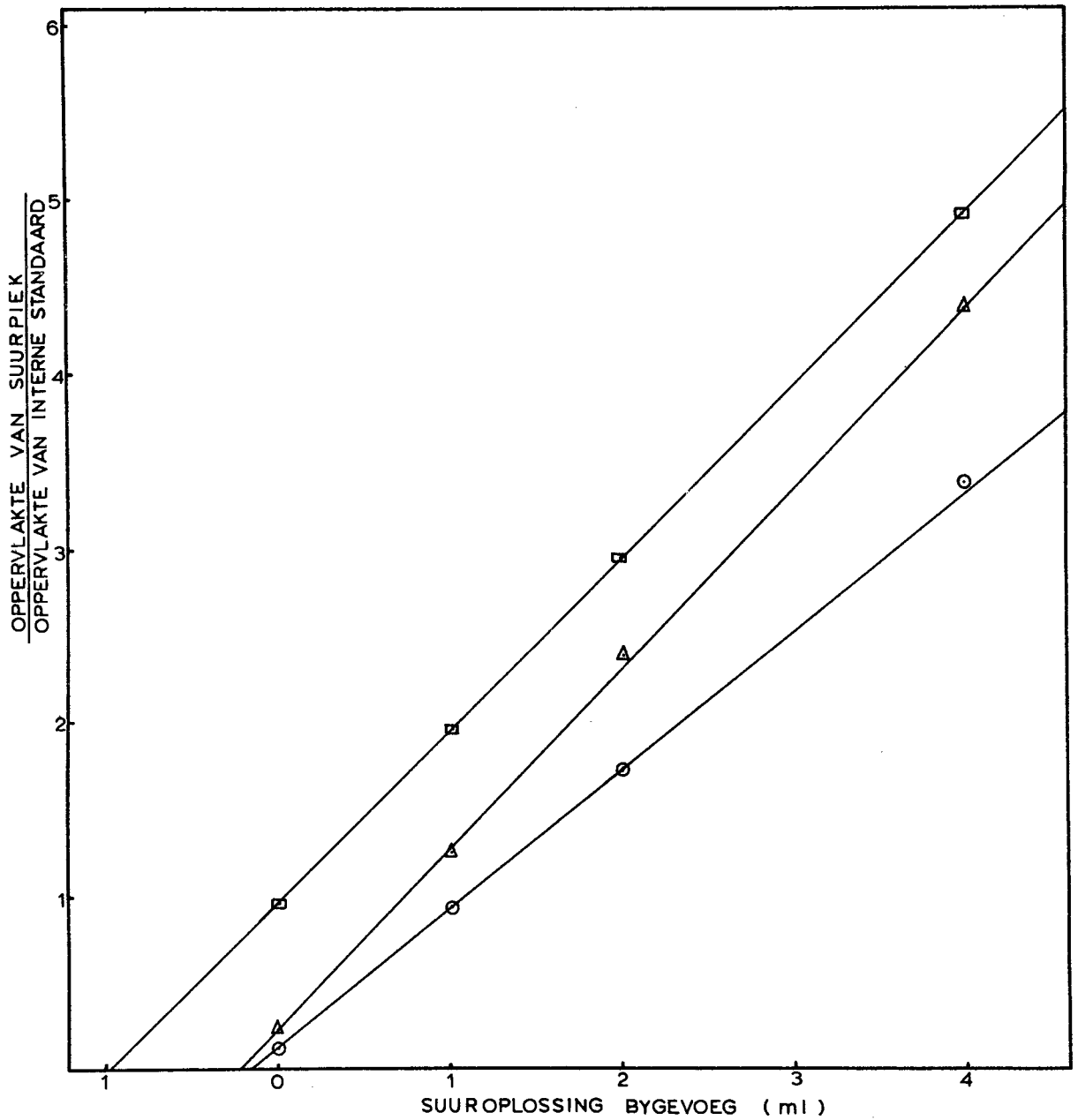
Verbinding	Retensietye in minute *			
	Kolom U		Kolom V	
	Suiwer substans	Suurge-deelte v. stof uit wyn	Suiwer stof	Suurge-deelte v. stof uit wyn
Etielasetaat	1.6	1.6	0.7	0.7
Etiel-i-butiraat	4.05	4.05	0.8	0.8
Etiel-i-vale-riat	9.0	9.0	1.4	1.4
Etielheksoaat	22.4	22.3	3.3	3.3
Etieloktoaat	-	-	9.6	9.7

\* Kondisies soos in TABEL XII aangetoon

Van Zyl et. al<sup>(46)</sup> het geen vry sure in Brettanomyces-wyn vasgestel nie. Die substansie wat hulle nie kon identifiseer nie, was dus heelwaarskynlik een of meer van die sure hier geïdentifiseer. Dit is bekend dat mos deur Brettanomyces gegis, 'n besondere kenmerkende karakter besit, wat volgens Peynaud en Domercq<sup>(54)</sup> op 'n moontlike teenwoordigheid van asetamied teruggevoer kan word. Aangesien i-botterbuur en i-valeriaansuur ook hierdie tipe geur besit, wil dit voorkom asof hulle en nie asetamied nie vir hierdie afwykende geur van die wyn verantwoordelik is.

Goeie resultate is by die kwantitatiewe bepaling van die sure met n-valeriaansuur as interne standaard verkry. Die grafiese voorstelling van die verhouding van die oppervlakte van die suurpiek tot die oppervlakte van die interne standaard teenoor die hoeveelheid suur bygevoeg, is reguit lyne (FIG. X). 'n Direkte vergelyking van die oppervlaktes van die suurpieke met dié van die interne standaard was nie moontlik nie. Dit kan aan die verskillende oplosbaarhede van die onderskeie sure in water en die daarmee gepaardgaande verskille in verdelingskoeffisiënte, toegeskryf word. TABEL XV toon die suurkonsentrasie van moste wat met twee spesies van Brettanomyces gegis is en onderskeidelik die hoogste en laagste suurvorming getoon het, teenoor mos deur S. cerevisiae (WE 14) gegis.

FIG. X KALIBRASIEKURWES VIR SURE



- i-Bottersuur
- △ i-Valeriaansuur
- n-Heksanoësuur

TABEL XV

Konsentrasies suur deur Brettanomyces en S. cerevisiae in  
wyn gevorm

Organisme	Konsentrasie suur mg per l		
	i-Botter- suur	i-Vale- riaan-suur	Heksanoë- suur
<u>Brettanomyces</u> (WE 248)	52.8	32.8	2.75
<u>Brettanomyces</u> (WE 250)	15.4	9.0	12.20
<u>S. cerevisiae</u> (WE 14)	0.4	1.6	4.90

Oktanoësuur kon nie bepaal word nie aangesien hierdie substans deur  $\beta$ -fenieletielalkohol, wat in groot hoeveelhede (ongeveer 20 mg per l) in die wyn voorkom, op die chromatogram oorvleuel word. Hierdie moeilikheid kan miskien oorbrug word indien die sure vooraf van die ander substans in die oplossing geskei word, deur die ekstrak met 'n bikarbonaatoplossing te ekstraheer.



O P S O M M I N G

In hierdie ondersoek is sommige geurstowwe van moste, wyne en wyn-distillate kwalitatief en kwantitatief bepaal. Die substans, wat aan die muskaatdruifsoorte, Hanepoot, Muskadel en Frontignac, hul tipiese karakter verleen, is as linalool (3,7-dimetiel-okta-1,6-diëen-3-ol) geïdentifiseer. Verskillende chemiese en fisies-chemiese metodes soos eliminasietoetse op die ekstrak voor gaschromatografiese analise en ultraviolet- en infrarooispektroskopie, is onder andere vir hierdie doel aangewend. 'n Metode vir die kwantitatiewe bepaling van linalool in wyn is beskryf. Die linaloolkonsentrasies in verskillende wyne het tussen 0.12 en 0.52mg per liter gewissel.

'n Substans, wat met toenemende ouderdom van wyne groot konsentrasietoenames getoon het, is as diëtielsuksinaat geïdentifiseer. 'n Ander ester wat 'n soortgelyke toename getoon het, kon nie geïdentifiseer word nie. Die toename van hierdie esters met toenemende ouderdom van die wyn, is kwantitatief bepaal. Aangesien diëtielsuksinaat 'n baie aangename geur besit, behoort hierdie substans 'n belangrike bydrae tot die veroudering en verbetering in geur tydens die veroudering van wyn te lewer.

Die / .....

Die karbonielverbindings van wyne en wyndistillate is as furfuraal, aset-, i-butier- en i-valeraldehyd geïdentifiseer. Die kwantitatiewe bepaling van bogenoemde substansie het egter nie die gewenste mate van noukeurigheid opgelewer nie.

In meeste wat deur verskeie Brettanomyces-spesies gegis was, kon drie substansie, wat in groot hoeveelhede voorkom, as asyn-, i-botter- en i-valeriaansuur geïdentifiseer word. Die metode vir die kwantitatiewe bepaling van hierdie sure sowel as heksanoësuur, met n-valeriaansuur as interne standaard, het goeie resultate gelewer. Meeste deur Brettanomyces gegis, het, teenoor dié wat deur Saccharomyces cerevisiae gegis is, baie groter i-botter- en i-valeriaansuurkonsentrasies getoon. Die afwykende en maklik herkenbare karakter van Brettanomyces-wyne kan heelwaarskynlik aan die teenwoordigheid van hierdie sure toegeskryf word.

-----

LITERATUURVERWYSINGS

1. Winkler, A.J. (1962).  
General Viticulture, Univ. of California Press.  
Berkeley and Los Angeles.
2. Theron, C.J. en Niehaus, C.J.G. (1948)  
Wynbereiding. Pamflet Nr.191. Staatsdrukker Pretoria.
3. Venter, P.J.  
D.Sc. (Agric.)-Thesis (1958)  
Universiteit van Stellenbosch.
4. Ronkainen, P., Salo, T. en Suomalainen, H.  
Z. Lebensm. Untersuch.- u. Forsch. 117, 281-289 (1962)
5. Bayer, E.  
Vitis 1, 34-41 (1957)
6. Martin, G. en Caggiano, G.  
J. Assoc. Offic.Agr. Chemists 46, 294-297 (1963)
7. Webb, A.D. en Kepner, R.E.  
Amer. J. Enol. Vit. 12, 51-59 (1961)
8. Pfenniger, H.  
Z. Lebensm. Untersuch.- und Forsch. 119, 401-415 (1963)
9. Mecke, R. en de Vries, M.J.  
Z.anal.Chem. 170, 326-332 (1959)
10. Wagener, W.W.D.  
M.Sc.-proefskrif (1965) Univ. v. Stellenbosch.

11. De Vries, M.J.  
S.Afr.J. Agric. Sci. 5, 395-400 (1962).
12. Webb, A.D. en Kepner, R.E.  
Amer. J. Enol. Vitic. 13, 1 (1962).
13. Bayer, E. en Bässler, L.  
Z. Anal. Chem. 181, 418-424 (1961).
14. Matthews, J.S.  
J. Food Sci. 27, 355-362 (1962).
15. Power, F.B. en Chestnut, U.K.  
J.Agric. Res. 23, 47-53 (1923).
16. Haagen-Smit, A.J., Hirose, F.N. en Wang, T.H.  
Food Research 14, 472-480 (1949).
17. Cordonnier, R.  
Ann. Inst. Natl. Recherches Agron., Ser.E, Ann.Technol.  
Agr. 5, 75-110 (1956).
18. Webb, A.D. en Kepner, R.E.  
Food Research 22, 384-395 (1957).
19. Webb, A.D. en Kepner, R.E.  
Amer. J. Enol. Vit. 12, 159-174 (1961).
20. Damm, E. en Kringstad, H.  
J. Inst. Brewing 70, 38-42 (1964).
21. Bassette, R., Ozeris, S. en Whitnah, C.H.  
Anal. Chem. 34, 1540-1543 (1962).
22. Amerine, M.A. (1955)  
Laboratory Procedure for Enology. Davis, California.

23. Piha, P., Kitunen, M., Holmberg, A.M. en Suomalainen, H.  
Z. Lebensm. Untersuch.- und Forsch. 113, 134-143 (1960).
24. Suffis, R. en Dean, D.E.  
Anal. Chem. 34, 480-483 (1962).
25. Waldi, D. (1964)  
Chromatography. E. Merck, Darmstadt.
26. Bladon, P., Henbest, H. en Wood, G.  
J. Chem. Soc. 2737-2744 (1952).
27. Scott, A.E. (1964)  
Interpretation of Ultra Violet Spectra of Natural Products.  
Pergamon Press, London.
28. Bader, H.  
Helv. Chim. Acta 34, 1632-1634 (1951).
29. Bellamy, L.J. (1958)  
The Infra-red Spectra of Complex Molecules. Second Edit.  
Methuen & Co., London.
30. Cole, A.R.H. en Jeffries, P.R.  
J. Chem. Soc. 4391-4397 (1965).
31. Hampton, R.  
Anal. Chem. 21, 923-926 (1949).
32. Kitson, R.  
ibid 20, 1470-1472 (1948).
33. Barnard, D., Bateman, L., Harding, A.J., Koch, H.P.,  
Sheppard, N. en Sutherland, G.B.B.M.  
J. Chem. Soc. 915-925 (1950).

44. Schanderl, H. (1950)  
Handbuch der Kellerwirtschaft.  
II Mikrobiologie des Weines, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
45. Tritton, S.M.  
Proc. Amer. Soc. Enol. 161-166 (1952).
46. Van Zyl, J.A., de Vries, M.J. en Zeeman, A.S.  
S.Afr. J. Agric. Sci. 6, 165-180 (1963).
47. Van Zyl, J.A. (1962)  
Troebelinge in Suid-Afrikaanse droëwyne veroorsaak deur die ontwikkeling van die Brettanomyces-giste. Pamflet Nr. 381, Departement Landbou-Tegniese Dienste, Pretoria.
48. Schanderl, H. en Draczynski, M.  
Deutsche Weinzeitung, Wein und Rebe, 20, 462 (1952).
49. Robb, E.W. en Westbrook, J.J.  
Anal.Chem. 35, 1644-1647 (1963).
50. Metcalfe, L.D. en Schmitz, A.A.  
Anal. Chem. 33, 363-364 (1961).
51. Jamieson, G.R. en Reid, E.H.  
J. Chromatog. 17, 230-237 (1965).
52. Kabot, F.J. en Ettore, L.S.  
J. Gas Chrom. 1(a) 17-18 (1963).
53. Gehrke, C.W. en Lamkin, W.M.  
J.Agr. Food Chem. 9, 85-88 (1961).
54. Peynaud, E. en Domerg, S.  
Arch. f. Mikrobiol. 24, 266-280 (1956).

55. Vogel, A.I. (1951)  
A Textbook of Practical Organic Chemistry.  
Longmans, Green & Co., London.
56. Bayer, E.  
Vitis 1, 93-95 (1957).
-