

1. ВОВЕД

Производството на вино во Република Македонија има долга и значајна историја. Македонските вина се одликуваат со интензивни ароми кои се резултат на комбинираниот влијание на две клими, медитеранска и континентална. Според климатските карактеристики и класификација на Европската Унија, Република Македонија е поставена како III-C-b, зона за одгледување винова лоза, бидејќи ги исполнува енолошките правила кои се однеусваат на оваа зона (Нацрт-стратегија, 2010-2015, МЗШВ). Во Македонија постои лозарски реон кој географски може да се подели во три региони:

- 1) Вардарска долина или Централниот Регион (Повардарски лозарски реон), која опфаќа околу 83 % од вкупното производство;
- 2) Западен Регион (Пелагониско-Полошкиот лозарски реон), опфаќа 13 % од производството и
- 3) Источниот Регион (Пчињско-Осоговски лозарски реон) кој опфаќа околу 4 % од вкупното производство.

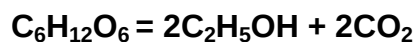
Овие три региони се поделени во 16 подрегиони (виногорја) кои се карактеризираат со различни производствени услови и интензитет на производство. Најголемо е производството на винско грозје и вино во Тиквешкиот Регион кој ги опфаќа сите области погодни за култивација на винско грозје во општините Кавадарци, Неготино и Демир Капија, како и делови од општините Прилеп и Велес. Климатските услови во Тиквешкиот Регион овозможуваат успешно одгледување на различни сорти винско грозје со сите фази на зреење на грозјето. Главни сорти што се одгледуваат во регионот се црвените: вранец, мерлот, каберне совинјон, пинот ноар и кадарка, белите: шардоне, белан, мускат, ризлинг, совинјон бланк, семилон, смедеревка, ркацетели, мускат отонел, темјаника, жилавка и розе - станушина.

Производството на вино во Македонија се одвива во 86 официјално регистрирани винарски визби со вкупен капацитет од 2 165 447 hL. Вкупниот капацитет за наливно вино во шишиња изнесува околу 650 000 hl годишно (Нацрт-стратегија, 2010-2015, МЗШВ).

Денес постои Интернационалната организација за винова лоза и вино (ОИВ) (International Organization of Vine and Wine, OIV) која е невладина организација од научна и техничка природа со признаена компетентност за работата поврзана со винови лози, вина, пијалаци од грозје, десертно грозје, како и други видови производи од грозје. Паралелно на тоа, донесен е и Правилник за методи на анализа за утврдување на хемискиот состав на вината кој го применува Република Македонија и кој е во согласност со Регулативите и правилата на OIV. Со овој Правилник се пропишани 44 методи на анализа за утврдување на хемискиот состав на вината. Методите се детално опишани за да може лесно да се применат во лабораторија (Ivanova, 2013).

1.1. Производство на вино

Виното е производ што се добива со алкохолна ферментација на шеќерите присутни во грозјето кои во текот на ферментација се разградуваат под дејството на квасецот и при тоа се добива алкохол (етанол) и јаглерод диоксид. Процесот на алкохолна ферментација може да се прикаже со следнава хемиска равенка на реакција:



Производството на вино вклучува неколку постапки: берба на грозјето, гмечење и дробење на грозјето (одделување на дршките од зрната), додавање на SO_2 , пресување, ферментација, мацерација (најчесто се применува за црвени вина), бистрење, стабилизација, зреење и полнење на виното во соодветна амбалажа.

Одредување на вистинското време за берба на грозје, структурата, состојбата и квалитетот се врши врз основа на изгледот, вкусот и анализите

(содржина на шеќер, киселини, вкупни полифеноли) на зрната и гроздовите. Со цел да се зачува свежината, овошната арома и вкусот на грозјето, најдобро е бербата да се изведува рано наутро, кога температурите се ниски. Бербата може да се изведува рачно или машински. Одредувањето на степенот на зрелост зависи од тоа каков стил на вино сакаме да произведиме.

По пристигнување на грозјето во винарската визба се пристапува кон негово гмечење и одвојување на цврстите делови од гроздот (дршките). За да се спречи оксидација на гроздовата ширата, а понекогаш и да се одложи ферментацијата, се додава сулфур диоксид. Обично се додава во форма на калиум матабисулфит. Во зависност од состојбата на грозјето, количината на додаден сулфур диоксид може да варира од 0,3 mg/L за здраво грозје, до 70 mg/L за грозје со поголем процент на гниење или со околу 5 - 10 g/hL SO₂ (Ivanova, 2013).

Ензими се додаваат при гмечење на грозјето (како на пр. еглюканази) со цел разградување на клеточните ѕидови на лушпите и липидниот слој на семките, за екстракција на вкупни полифеноли и ароми. Вината направени од презрело грозје заразено со мувла *Botrytis cinerea* тешко се бистрат и филтрираат поради високата концентрација на добиениот глукан од *Botrytis*. Ако се избере да се работи со пектинолитички ензим во прав, треба ензимот претходно да се раствори во ладна дестилирана вода (1 : 10) пред да се додаде во виното. Течните ензими може да се додадат директно во виното според упатствата од производителот, или со претходно разредување со ладна дестилирана вода. Пектинолитичките ензими се додаваат во различно време пред и по ферментацијата, со цел да настане цепење на пектинот. Од организмите што произведуваат комерцијални пектолитички ензими, особено се карактеризираат габите од некои сорти *Aspergillus niger*, одгледувани со контролирана ферментација (Arnstrup, 1979).

Алкохолната ферментација започнува веднаш по гмечењето на грозјето, при што шеќерите што ги има во гроздовиот сок преминуваат во алкохол и се добиваат јаглерод диоксид и топлина како би-продукти. Прв е квасецот кој ја започнува алкохолната ферментација, којшто го има во лушпата од грозјето, но за контролирана ферментација се додаваат одбрани квасци и тоа најчесто од видот

Saccharomyces cerevisiae. *Saccharomyces cerevisiae* е доминантен квасец поради неговата поголема отпорност на висока концентрација на етанол (Флота, 1993; Флота и Херд, 1993). Успехот на алкохолната ферментација зависи од одржување на размножувањето на одржлив квасец во доволни нивоа, сè додека целосно да ферментираат шеќерите (Bisson, 1999; Замора, 2004). Во текот на алкохолната ферментација се додава соодветна минерализирана храна за квасците за да се подобри работата и размножувањето на квасецот (во форма на диамониум фосфат и азот).

Мацерација е периодот на контакт помеѓу цврстите делови од грозјето (лушки и семки) и гроздовиот сок. Во текот на мацерацијата се ослободуваат или екстрахираат најмногу фенолни соединенија, антоцијани и танини, а тие се одговорни за бојата во црвените вина и општо за структурата на виното. Количествата и односот на овие соединенија е променлив, зависно од составот на грозјето и неговата зрелост. Според квалитетот на грозјето, неговата зрелост, потеклото, како и типот на вино што ќе биде произведено, развојот на мацерациските процеси може да се опише на следниве начини: кратка, долга, карбонска, термомацерација, претферментациска ладна и долга мацерација комбинирани со ферментација. По алкохолната ферментација, кај црвените вина се случува втората микробиолошка трансформација или јаболково-млечна (малолактичка) ферментација. За време на малолактичната ферментација со бактериите на млечна киселина, содржината на јаболкова киселина се намалува поради нејзината конверзија во млечна киселина, чијашто концентрација се зголемува. Малолактиката се применува кај црвените вина и најчесто се случува по природен пат (Zoecklein et al., 1995).

По завршената ферментација следува постапка на преточување на виното, односно отстранување на грубите честички во неговиот состав кои можат да доведат до заматеност. Првото преточување се изведува по завршување на тивката ферментација, обично во ноември или декември. Второто преточување се изведува во февруари или март, со претходно додавање на сулфур диоксид, како дополнителна заштита од оксидација.

За бистрење на вината се користат средства кои може да се поделат на органски и минерални, или растворливи и нерастворливи. Средствата од органско потекло се: желатин, танин, белка од јајце, безмасно млеко, ензимски препарати, и др., а во минерални спаѓаат бентонит, каолин и др. Пред полнење во шишиња, вината се филтрираат за да се елиминираат микробиолошки појави предизвикани од остатоци од квасци и бактерии, иако некои винари избегнуват да ги филтрираат со цел да постигнат маркетиншки ефект.

Виното зрее одреден период пред да биде наполнето во шише или соодветна амбалажа. Периодот на зреење или стареење на виното е од неколку дена (пр. Божоле - младо вино), 18 месеци, па и подолг временски период кој се применува за врвните црвени вина. Виното може да зрее во иноксни, бетонски цистерни или во дабови буриња.

1.2. Хемиски состав на вино

Виното е комплексна и хетерогена смеса која содржи голем број соединенија, како што се: јаглехидрати, ароматични соединенија, органски киселини, алкохоли, полифеноли, протеини и минерали (Ivanova, 2013).

Доминантна компонента во виното и грозјето е *водата* која е присутна од 70 до 90 %. Водата е важна компонента за одвивање на голем број хемиски реакции во текот на растењето на грозјето, ферментацијата на гроздовиот сок и зреењето на виното.

Алкохолот (етил алкохол или етанол, C_2H_5OH) во виното потекнува од шеќерите (глюкоза и фруктоза) што ферментираат под дејство на квасецот во текот на алкохолна ферментација. Главните фактори што влијаат врз образувањето на алкохол се содржината на шеќер, температурата на ферментација и квасецот. Етанолот може да биде присутен во виното од 8 до 20 %. При стандардни услови на ферментација, содржината на формиран алкохол е 14 - 15 %, а повисоките концентрации може да потекнуваат од дополнително додаден шеќер во текот на ферментацијата, или дополнително додаден етанол. При повисоки содржини, алкохолот предизвикува чувство на пецкање, горење.

Етанолот го зголемува интензитетот на битерност, но ја намалува астригентноста на танините. Во текот на зреењето на виното, етанолот се врзува со органските киселини, образувајќи естри (Ivanova, 2013).

Сепак, алкохолната ферментација е многу посложена постапка. Во исто време со оваа севкупна реакција продолжуваат да се одвиваат многу други биохемиски, хемиски и физичко-хемиски процеси. Покрај етанол, други соединенија што се произведуваат во текот на алкохолната ферментација се: виши алкохоли, естри, глицерол, *сукцинска* киселина, диацетил, ацетоин и 2,3-бутандиол. Без производство на овие други супстанции, виното не би имало органолептички карактеристични својства (Moreno-Arribas et al., 2005).

Шеќерите се јаглехидрати што се разликуваат по функционалната група, која може да биде алдехидна или кето-група. Пектини, глуми, скроб, хемицелулоза и целулоза се простите шеќери и тие може да се врзуваат меѓу себе и да градат полимери. Шеќерите образуваат глукозиди со секундарните метаболити, како лактони и антоцијани. Јаглехидратите се поделени во три групи: моносахариди (глукоза, фруктоза, со хемиска формула $C_6H_{12}O_6$), дисахариди (пр. сахароза, $C_{12}H_{22}O_{11}$) и полисахариди (пр. скроб, целулоза, пектини, глумани, декстрини). Основните моносахариди што се присутни во грозјето се глукозата и фруктозата кои обично се наречени редуцирачки шеќери. Гликолизата е процес кој се состои од интрацелуларна трансформација на гликоза (и фруктоза) во пируват (Ivanova, 2013).

Содржината на шеќери во грозјето зависи од сортата, зрелоста, здравствената состојба на грозјето и условите на одгледување. Сортите на *Vitis vinifera* акумулираат околу 20 % шеќери и уште повеќе за време на фазата на зреење, додека сортите од *Vitis labrusca* и *Vitis rotundifolia*, многу ретко го постигнуваат ова ниво на шеќери. Односот на гликоза/фруктоза се намалува од 0,95 првично до 0,25 на крај на ферментацијата. Сахарозата се акумулира во листовите од лозите во текот на фотосинтезата, но при трансферот во гроздовите, таа хидролизира, при што се формираат есенцијалните шеќери, глукоза и фруктоза. Сахарозата сама за себе не ферментира, но е потребно присуство на ензимот инвертаза кој ја разградува сахарозата до глукоза и фруктоза. Сувите

вина содржат резидуален шеќер чија содржина е помала од 1,5 g/L. Во оваа концентрација, која е ниска, сладост на виното не се осеќа (Ivanova, 2013).

Аромата во виното е термин што се користи за да се опише мирисот на виното и претставува баланс помеѓу стотина испарливи соединенија (Ivanova, 2013). Секоја сорта на грозје придонесува за специфична арома на виното која ја одликува неговата сортна единственост. Ароматичните соединенија во гроздот во најголем дел се сместени во лушпата, додека во внатрешниот, месестиот дел од зрното ги има помалку. Овие соединенија се најдени и во листот на виновата лоза. Сите промени на аромите што настануваат во текот на зреењето на грозјето и во текот на чувањето на виното влијаат врз комплексноста на ароматичниот профил на вината. Различни параметри влијаат врз присуството и составот на ароми во грозјето, како што се: карактеристиките на сортата, светлината, температурата, почвата, климатските услови, степенот на зрелост, техниките на култивација и техниките кои се применуваат за производство на вино, како што се: гмечење, температура на ферментација, мацерација, вид на квасецот, SO₂, деалкохолизација на вино и суперкритична екстракција (Ivanova, 2013). Ароматичните соединенија од грозјето преминуваат во ширата, а со тоа и во виното, каде што учествуваат во образувањето на неговото буке.

Различни групи ароматични соединенија во грозје и вино се идентификувани, како што се алкохоли, естри, алдехиди, лактони, терпени и феноли. Дури и при ниски концентрации, овие соединенија влијаат врз аромата. Од сите тие, алкохолите и естрите се главните компоненти што се присутни во највисоки концентрации во виното. Естрите имаат овошни ароми и значително влијаат врз мирисот на виното. Монотерпените имаат цветна арома (пр. линалол е карактеристичен за мускатните сорти грозје). Како резултат на присуството на пиразини, особено, присуството на соединението 2-метокси-3-изобутилпиразин, сортите каберне совинјон и совинјон бланк, како и други слични сорти, се карактеризираат со мирис на пиперка. Постои можност мирисот на црна рибизла кај вина од сортата каберне совинјон да потекнува од 4-меркапто-4-метил-пентан-2-он. Зачинскиот карактер на вината од сортата траминец потекнува од 4-винилгвајакол. Мускатните сорти кои имаат карактеристична арома, богати се со

монотерпенски алкохоли и C13-норизопреноиди. Во текот на ферментацијата, како споредни продукти може да се формираат ароматичните соединенија, како што е 2-фенилетанол кој се добива од компонентите на грозјето како резултат на метаболизмот на квасецот. Слично се случува и со изоамил ацетатот кој се добива од квасецот и е доминантна ароматична компонента во сортата пинотаж (Ivanova, 2013).

Друга голема група на соединенија која придонесува за сензорските карактеристики на виното, бојата, аромата и трпкавоста, како и за разликите помеѓу црвените и белите вина, се *фенолните соединенија* кои се присутни главно во семките и лушпата на грозјето (Cheynier, 2005). Поради нивните антиоксидативни, антимикробни, антивирусни и антиканцерогени карактеристики, фенолите се особено важни за човековото здравје (Jakson, 2000). Вината и грозјето содржат голем број полифенолни соединенија кои се класифицирани во две главни групи: флавоноиди и нефлавоноиди, коишто играат главна улога во енологијата (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Во групата на флавоноиди спаѓаат антоцијани, флаван-3-оли, флавоноли и дихидрофлавоноли, додека групата од нефлавоноиди се состои од фенолни киселини и нивни деривати (хидроксibenзоеви и хидроксициементни киселини) и стилбени (ресвератрол). Антоцијаните се црвени компоненти одговорни за бојата на црвеното грозје и црвеното вино. Лоцирани се во лушките од грозјето, со исклучок на сортите „бојадисери“ кои содржат антоцијани и во пулпата. Антоцијаните идентификувани во вино и лушпи од грозје од сортите *Vitis vinifera* L. се базираат на 5 главни антоцијанидини: делфинидин, цијанидин, петунидин, пеонидин и малвидин. Најзастапени антоцијани се 3-О-моноглукозидите, а исто така во грозјето и виното се присутни и 3-О-ацетилглукозиди, 3-О-кумароилглукозиди и 3-О-кафеоилглукозиди. Малвидин е главниот антоцијанидин во црвените сорти грозје. За време на ферментацијата, мономерните антоцијани во вината се подложни на реакции и сврзувања, со што се формираат разни антоцианин-дериватизирани пигменти, коишто се од екстремно суштинско значење за стабилноста на бојата. Како резултат на тоа, иако концентрацијата на мономерните антоцијани во црвените вина постојано опаѓа, црвените вина сè уште ја задржуваат црвената

боја. Во текот на винификацијата и зреењето на виното, антоцијаните се модифицираат и формираат стабилни C4-супституирани пигменти при реакции со деривати на винил феноли и пирогроздова киселина. Голем број олигомерни пигменти се формираат при реакции на кондензација со ацеталдехид или при директни реакции на антоцијаните со флаваноли (Ivanova, 2013).

Флаван-3-олите се присутни во семките од грозје, и тие се изомери на катехин и епикатехин. Постојат четири структурни изомери поради асиметричните јаглериоди C₂ и C₃. Флаванолите од грозјето, кои најчесто се нарекуваат флаван-3-оли, хидроксилирани се во позиција 3 и се сретнуваат како мономери во грозјето, се (+)-катахин и (-)-епикатахин. Во помали концентрации се присутни (+)-галокатахин, (-)-епигалокатахин и (-)-епикатахин-3-O-галат. Галокатахин, исто така е детектиран во сортите *Vitis Vinifera*, како и катахин-3-O-галат и галокатахин-3-O-галат. Флаван-3-ол мономерите се слабо горчливи и се полимеризираат во форма на процијанидини и кондензирани танини во виното, но не се класирани како танини, затоа што не ги таложат протеините. Флаванол олигомерите и полимерите се нарекуваат кондензирани танини или проантоцијанидини (танини). Проантоцијанидините се полимерни синџири од катехин, со молекуларна маса од 500 до 3 000 g/mol, кои се способни за вкрстено врзување на протеините.

Проантоцијанидините се исто така познати како олигомерни проантоцијанидини, леукоантоцијанидини, кондензирани танини или танини. Танините се состојат од повеќекратни флаван-3-ол (или флаван-3,4-диол) мономери (од 2 до 60 мономери) поврзани заедно, типично преку C4 до C8-врските и помалку преку C4 до C6-врските. Својствата на проантоцијаните зависат од нивната структура. Така, флаван-3-олите со мала молекулска маса се одговорни за битерноста (горчливоста) на вината, додека полимерните флаван-3-оли во голема мера влијаат врз астригеноста (трпкавоста). Катехин, епикатехин, епикатехин галат и епигалокатехин ги содржат главните единици на танините од лушпа, а катехинот е основна единица. Во кисела средина, проантоцијанидините можат да се деполаризираат ослободувајќи терминални субединици, флаван-3-оли и екстензионални субединици, електрофилни флаван-3-ол интермедиери (Ivanova, 2013).

Хидролизираните танини уште се нарекуваат галотанини (хидролизираат до гална киселина) и *елаготанини* (хидролизираат до елагова киселина). Овие танини не се присутни во грозјето и се разградуваат до шеќери и фенолни киселини. Тие во виното потекнуваат од дабовите буриња каде што се чува виното, при што од дрвото се естрахираат елаготанините со кои е богат дабот. Присуство на елаговата киселина во виното е показател дека се работи за „барик“ вино, односно за вино кое е зреено во дабово буре (Ivanova, 2013).

Главни нефлавоноиди во грозје и вино кои содржат еден ароматичен прстен се деривати на *хидроксициметни* и *хидроксибензоеви киселини*. Хидроксибензоеви киселини кои се карактеризираат со C6-C1 структура се: гална киселина, *p*-хидроксибензоева киселина, протокатехинска киселина, салицилна киселина, сиригитинска киселина и ванилна киселина. Во грозје тие се главно присутни во форма на естри и глукозиди (Ivanova, 2013).

Галната киселина е присутна во највисоки концентрации во виното. Таа потекнува од грозјето, но може да се формира и со хидролиза на хидролизирачките и кондензираните танини, т.н. естри на гална киселина флаван-3-оли.

Хидроксициметните киселини кои се присутни во вино се: кафена киселина, *p*-кумарна киселина, ферулна киселина и синапинска киселина. Овие соединенија можат да бидат присутни во *cis*- и *trans*-форми, но *trans*-формите се постабилни и затоа нивното присуство во виното е доминантно. Во виното, хидроксициметните киселини постојат во грозјето како естри на винската киселина, но ги има во мали концентрации во нивните слободни форми поради ензимски киселини хидролизираат за време на винификацијата, и главно се предоминантни, а можат да бидат врзани и со шеќери, различни алкохоли и други органски киселини. Иако хидроксициметните киселини се главни феноли што се присутни под нивниот сензорски праг во вината. Од дериватите на хидроксициметните киселини, најчесто се сретнуваат: кафеоилвинска (кафтарна) киселина (која е присутна во повеќе од 50 % од вкупната содржина хидроксициметните киселини), кумароилвинска (кутарна) киселина и феруоилвинска (фертална) киселина. Кафтарната и кутарната киселина се најзастапени во виното и тие се високо

оксидирачки компоненти кои предизвикуваат потемнување на белата шира. Големи се количините од хидроксициметни киселини во слободниот проток од сокот, бидејќи тие се главни феноли што се присутни во месото од зрното. Во лушпата се присутни во помали количини (Ivanova, 2013).

Стилбените нефлавоноиди што во грозјето можат да се биосинтетизираат во виновата лоза како одбрамбен систем од фунгална инфекција, најчесто Botrytis cinerea и од UV-радијацијата. Во текот на винификацијата, стилбените преминуваат во виното во многу мали концентрации. Најзначајниот и најчесто проучуваниот стилбен е *trans*-ресвератрол(3,5,4-трихидроксистилен) (Ivanova, 2013).

Минералните материји се присутни во грозјето и виното, како и нивната содржина зависи од климатските услови и средината каде што се одгледува грозјето, технолошките постапки, енолошките средства и други препарати што се користат при производството на вино, како и примена на средствата за заштита на лозовите насади од штетници. На пример, високи содржини на сулфур може да потекнуваат од фунгициди. Тешките метали, како што се олово (Pb), жива (Hg), кадмиум (Cd) и селен (Se) се токсични елементи. Железото (Fe) и бакарот (Cu), доколку се присутни во концентрации над дозволените се непожелни метали бидејќи катализирале реакции на оксидација, а со тоа можело да дојде до заматување на виното и промена на вкусот (Ivanova, 2013).

Органските киселини, исто така, се многу важни соединенија бидејќи влијаат врз pH, како и на микробиолошката и биохемиската стабилност на вината, особено во белото вино (Castiñeira et al., 2002; Esteves et al., 2004). Составот на органските киселини во виното зависи од голем број фактори, како што се сортата, степенот на зрелост на грозјето, условите на лозовите насади (клима, почва), технологија за производство на вино, условите на ферментација и стареењето на виното. Освен тоа, и постапките пред ферментација, како што се додавање на SO₂, квасец, малолактичка ферментација и сл., влијаат врз содржината на киселини во виното.

Киселоста е една од најважните фактори на виното. Влијае врз микробиолошката стабилност, јаболково–млечната ферментација, врз неговата боја и стапката на зреење, тартаратната и протеинската стабилност и, пред сè,

врз неговата перцепција во односот на баласираниот вкус. Киселоста во виното произлегува од два извора: киселини кои се развиваат во грозјето и кои се носат во виното и киселини кои се создаваат во текот на процесот на производство на вино. Органските кисели заедно со другите киселини се групираат во категории на „неиспарлива киселост“ и „испарлива киселост“, со што збирот претставува „вкупна киселост“.

Како такви винската, јаболковата, лимонската и килибарната го сочинуваат збирот на *неиспарливи (фиксиран) киселини*, додека оцетната, пропинската, бутерната и сулфурестата киселина ја сочинува групата на *испарливи киселини* во виното. pH се дефинира како негативен логаритам од концентрацијата на водородните (хидрониум) јони во раствор.

Повеќето бактерии не растат при пониски вредности на pH, што значи дека виното е постабилно и има поголем потенцијал за складирање и стареење (Tašev et al., 2016). За време на стареењето на виното, киселините се вклучени во реакции на естерификација, кои пак, влијаат врз развојот на саканиот вински букет. Затоа, содржината на органски киселини треба да се следи за време на процесот на винификација, почнувајќи од сок од грозје и мацерација, продолжувајќи до алкохолните ферментации и процесот на стабилизација на виното.

Секоја киселина во виното различно придонесува за вкупната киселост на виното: прво, со нејзината концентрација и второ, со нејзината вредност на дисоцијација (изразена со pK_a). Предвид треба да се земе и ефектот на алкални метали (калиум и натриум) во виното кои формираат соли со слабите органски киселини. Овие алкални метални јони се силни бази и нивниот ефект врз рамнотежата на дисоцијацијата е многу силен. Тие го менуваат износот на протони при титрација (кога се определува киселоста) и, исто така, pH-вредноста. Во вистинско вино другите кисели имаат пониска pK_a од винската киселина, и исто така, катјоните од калиум и од натриум ја контролираат концентрацијата на протонот, подигнувајќи ја pH-вредноста на виното на карактеристичните вредности од 3,0 до 4,0.

1.3. Органски киселини кои потекнуваат од грозјето

Главните органски киселини во гроздовиот сок се винска, јаболна и лимонска киселина, додека за време на алкохолната ферментација се формираат млечна, килибарна и оцетна киселина. Содржината на киселини во грозјето се движи од 8 до 13 g/L, додека во виното, содржината на киселини е помеѓу 5,5 до 8,5 g/L, во зависност од сортата и климатските услови во текот на годината. Киселините ја одредуваат вредноста на pH, а најпогодна вредност на pH за белите вина е 3,1 - 3,4, додека за црвените 3,3 - 3,6 (Ivanova, 2013).

Винската киселина е доминантна компонента од групата на органски киселини во грозјето и виното, и преку неа најчесто се изразува вкупната киселост на вината и грозјето. Во зелено грозје, содржината на винска киселина може да достигне 15 g/L, но во текот на зреењето на грозјето таа се намалува и достигнува вредност до 6 g/L или 2 - 3 g/L, зависно од областа во која се одгледува и климатските услови. Повеќе од 90 % од вкупната киселост на вината ја сочинуваат винската, заедно со јаболковата киселина. Содржината на јаболковата киселина се намалува во текот на јаболково-млечната ферментација (малолактичка ферментација) бидејќи од неа се формира млечната киселина (чија содржина се зголемува) под дејство на јаболково-млечни бактерии. Лимонската киселина, исто така е присутна во грозјето и во виното, влијае врз киселоста на вината и е важна компонента во биохемиските и метаболичките процеси (на пример, Кребсовиот циклус). Таа се забавува квасниот раст, но не го блокира. Трулото грозје содржи значително повеќе лимонска киселина која заедно со глюконската киселина се создаваат со метаболизмот на габата *Botrytis cinerea* (Johanides et. al., 1976). Килибарната киселина е како нуспроизвод на метаболизацијата на азот, преку квасни клетки за време на ферментацијата. Околу 1 g/L се произведува за време на примарната ферментација. Ова соединение е непожелно на високи нивоа поради неговиот горчлив и солени вкус. Друга важна киселина што е присутна во мали концентрации во грозјето и виното и која учествува во бројни реакции е шикимската киселина. Содржината на шикимската киселина во вино се движи во граници од 10 до 150 mg/L. Се смета дека преку содржината на шикимската

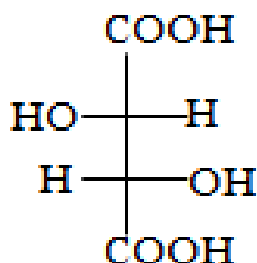
киселина може да се утврди потеклото на виното, како на црвените така и на белите, за разлика од содржината на антоцијаните која е карактеристична за утврдување на автентичност само на црвени вина (Ivanova, 2013).

1.3.1. Винска (тартаратна) киселина

Винската киселина е најзастапена органска киселина во сите делови на зеленото и зрелото грозје. Не е многу распространета во природата, а се појавува исклучително во плодовите на лозата, па затоа претставува клучна киселина во ширата и виното. Во зеленото грозје, концентрацијата на винската киселина може да достигне до 15 g/L, но во текот на зреењето на грозјето нејзината содржина се намалува, достигнувајќи вредност до 6 g/L или 2 - 3 g/L во зависност од температурата на која биле изложени гроздовите, климатските услови и областа на одгледување (Gayon et al., 2006 и Ivanova, 2013). Винската киселина е присутна во форма на калиумова сол која влијае врз вкупната киселост на виното. Во текот на зреењето на вината, содржината на винска киселина се намалува како резултат на таложење во форма на тартаратни и битартаратни соли, како кристали кои пак, слабо дисоцираат при pH на виното. Најзастапени тартарати во виното се калиум битартарат и калциум тартарат. При пониски температури се таложат во вид на кристали. Кај комерцијалите вина не е дозволено присуство на кристали на дното од шишето. Затоа се применува стабилизација на виното и следење на стабилноста. За да се спречи формирање на талог од калиум битартарат, во виното се додава 50 - 100 mg/L метавинска (метартаратна) киселина, карбоксил метил целулоза, прочистен јаболков пектин или танин, полисахариди, монопротеини. Калциум тартаратот е 10 пати понерастворлив од калиум тартаратот (Ivanova, 2013). Постои опасност од формирање на талози од калциум тартарат, ако неговата содржина е повисока од 60 mg/L во црвени вина и 80 mg/L во бели вина. Причини поради кои може да дојде до зголемено таложење на калциум тартарат се зголемена вредност на pH, додавање на калциумов бентонит за третирање на ширата и виното, додавање на калциум карбонат за

деацидификација (процес во кој се додава шеќер во неферментиран гроздов сок чија цел е да се зголеми содржината на алкохол (Ivanova, 2013).

Структурната формула на винската киселина којашто се наоѓа во грозјето и виното е прикажана на сл.1.



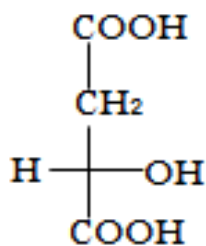
Слика 1. (+)-Структурна формула на винска киселина

Figure 1. (+)-Structural formula of tartaric acid

1.3.2. Јаболоква киселина

Јаболоквата киселина се сретнува во сите овошни плодови. Таа особено изобилува во зеленото јаболко поради што и го добила името. Присутна е во рабарбара (зелено растение со крупни листови и зелено-црвени стебла), во бела и црвена рибизла, исто така и во грозјето (Gayon et al., 2006; Ivanova, 2013). Таа се смета за клучна киселина во енологијата, а која е особено важна во периодот на зреењето на грозјето и при производството на вино. Сензорно, се идентификува со „зелен“ и „хербален“ мирис кој одговара на зелениот вкус на стебленцата и дршките (Ivanova, 2013). Нејзината содржина во зелено грозје, непосредно пред созревањето и промената на бојата, може да достигне и до 25 g/L. По зреењето и промената на бојата на грозјето, во наредните две недели содржината на јаболковата киселина драстично се намалува на половина. Тоа е последица на растење на гроздовите и согорување. Шира добиена од грозје од реони со пониска температура содржи од 4 до 6,5 g/L јаболкова киселина, а додека шира од истата сорта на грозје, но одгледувана во реони со повисоки температури, има 1-2 g/L јаболкова киселина (Gayon et al., 2006; Ivanova, 2013). Тоа значи дека содржината

на јаболкова киселина значително зависи од темературата и изложеноста на гроздовите на сонце. Јаболковата киселина е лесно растворлива во вода и алкохол, а во ширата се јавува во вид на соли наречени малати, од кои позначајни се: солите на калиум, калциум и магнезиум. Преку грозјето и ширата, јаболковата киселина поминува во виното како врзана или слободна и нејзината содржина изнесува 0,01 - 6 g/L. На сл. 2 е прикажана структурната формула на јаболковата киселина (Ivanova, 2013).



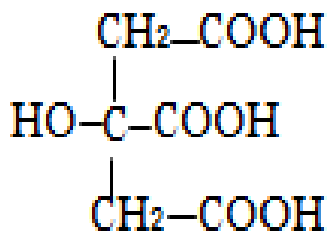
Слика 2. L-(-)-Структурна формула на јаболковата киселина

Figure 2. L-(-)-Structural formula of malic acid

1.3.3. Лимонска киселина

Во природата, лимонската киселина е многу распространета, а најмногу е застапена во лимонот. Таа е особено значајна во биохемиските и метаболичките процеси (Крепсов циклус) (Gayon et al., 2006; Ivanova, 2013). Во ширата, лимонската киселина не го блокира делувањето на квасците, но има способност да го забави нивното растење (Kalathenos et al., 1995; Gayon et al., 2006). Цитратите се соли на лимонската киселина. Во шира и вино, лимонската киселина се наоѓа во мали концентрации, кои се движат во граница од 0,5 до 1 g/L. Лимонската киселина има способност лесно да се растворува во вода и алкохол, но потешко во етер. Оваа киселина се применува за зголемување на киселоста, зајакнување на вкупните киселини и за намалување на бакарот и железото во виното. Лимонската киселина може да се додава најмногу до 0,5 g/L. Нејзината концентрација во виното, според законските прописи не смее да биде повеќе од 1

g/L (Ivanova, 2013). На сл. 3 е прикажана структурната формула на лимонската киселина.



Слика 3. Структурна формула на лимонска киселина

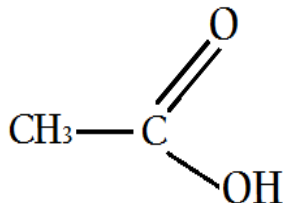
Figure 3. Structural formula of citric acid

1.4. Органски киселини кои се формираат во текот на алкохолната ферментација

За време на алкохолната ферментација се формираат млечна, килибарна и оцетна киселина и мали количини на други киселини. Оцетната киселина (CH_3COOH) е најзастапената компонента, преку која се изразува вкупната испарлива киселост на виното, а се формира како продукт на метаболизмот на квасецот и бактериите, или при хемиска хидролиза на хемицелулозата во текот на зреење на виното во дабови буриња. Но, освен оцетната киселина, врз испарливата киселост во виното влијаат и други испарливи киселини, како што се мравска, бутанска и пропанска киселина, кои имаат карактеристичен мирис. Оцетната киселина има мирис на оцет, пропанската киселина има карактеристичен мирис на маст/масло, бутанската киселина има мирис на путер, додека киселините со C6 до C10 атоми (пр. со C6 – капронска киселина) имаат козји мирис (Ivanova, 2013).

1.4.1. Оцетна киселина

Оцетната киселина е главна испарлива органска киселина во виното. Нејзиното присуство во виното се должи на ферментацијата на квасецот, како резултат на споредна реакција на оксидација на ацетилаледихот и работата на патогените микроорганизми, но и на температурата, разложувањето на шеќерот во ширата и присуството на кислород (Ivanova, 2013). Пожелна концентрација на оцетната киселина во виното е околу 300 mg/L. Оцетната киселина влијание врз целокупната промена на составот и вкус на виното. Затоа нејзините максимални количини не треба да се осетат при сензорна анализа (мирис и вкус). Позитивно за оваа киселина е што се продуцира најзначајниот естер во виното, етил ацетат, при реакција на етанол и оцетна киселина. Концентрацијата на етил ацетат во вината обично се движи во граници од 50 до 100 mg/L. Но, непријатен мирис на ацетон се создава при концентрации на етил ацетат повисоки од 150 mg/L. Присуството на оцетна киселина се забележува повеќе кај црвените вина поради големиот контакт со воздухот, за разлика од белите вина. Постои и можност за формирање на оцетна киселина и во старо вино зреено во дабови буриња. На сл. 4 е прикажана структурната формула на оцетната киселина (Ivanova, 2013).

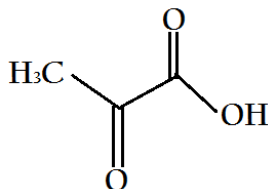


Слика 4. Структурна формула на оцетна киселина

Figure 4. Structural formula of acetic acid

1.4.2. Пирогроздова киселина

Пирогроздовата киселина е интермедиарен производ што настанува во текот на алкохолната ферментација. Таа е органска киселина и е наједноставен претставник на алфа-кето киселините. Може да се добие од глюкоза преку процес на гликолиза, да се претвори назад во јаглехидрати (како глюкоза) преку процес на глуконеогенеза, или во масни киселини преку ацетил коензим А (Ivanova, 2013). При ензимска декарбоксилација на пирогроздова киселина во присуство на тиамин пирофосфат (ТПП) или витамин В1, во текот на алкохолната ферментација било утврдено формирање на етанал, кој потоа се редуцирал во етанол (Ivanova, 2013). По пат на ензимска, микробна и хемиска оксидација на пирогроздовата киселина се формира оцетна киселина. На сл. 5 е прикажана структурната формула на пирогроздовара.



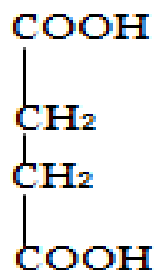
Слика 5. Структурна форма на пирогроздова киселина

Figure 5. Structural forma of pyruvic acid

1.4.3. Килибарна киселина

Килибарната киселина се создава во текот на алкохолната ферментација, под дејство на квасецот. Таа учествува во Крепсовиот циклус и метаболизмот на липидите, а се создава во сите живи организми (Ivanova, 2013). Во помала мера е утвредено и нејзино формирање со оксидација и дезаминација, односно преку деградација на глутаминска киселина. Килибарната киселина е цврста кристална материја, бело обоена и е средно растворлива во вода и алкохол. Предизвикува зголемено лачење на плунка (саливација) и се карактеризира со интензивно горчлив, соленикав вкус кој влијае врз аромата на виното и винскиот карактер. Во

виното е присутна со концентрации од околу 1 g/L. На сл. 6 е прикажана структурната формула на килибарната киселина.

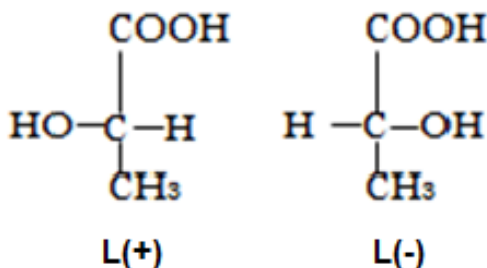


Слика 6. Структурна формула на килибарана киселина

Figure 6. Structural formula of succinic acid

1.4.4. Млечна киселина

Млечната киселина е органска киселина која придонесува за целокупната киселост на виното. Според физичките својства, таа е густа и безбојна сирупеста течност, растворлива во вода и алкохол. Во мали концентрации, млечната киселина се формира во текот на алкохолната ферментација, но поголем дел се формира во текот на јаболково-млечната ферментација, како последица на биолошкото разложување на јаболковата киселина во млечна киселина и CO₂. Нејзината содржина во вината се движи во граница од 0,5 до 2,5 g/L (Ivanova, 2013). На слика 7 е прикажана структурната формула на L(+) и L(-) млечната киселина.



Слика 7. Структурна формула на L(+) и L(-) млечна киселина

Figure 7. Structural formula of L(+) and L(-) lactic acid

1.5. Неоргански киселини присутни во форма на неоргански анјони

Во ширата и виното се присутни неоргански анјони, кои се реалативно растворливи соли. Тоа се сулфати, фосфати, нитрати, хлориди, бромиди, јодиди, флуориди присутни во многу ниски концентрации (Ivanova, 2013).

1.5.1. Сулфурна киселина

За синтеза на сулфурна киселина во винската индустрија се користи сулфур диоксидот, кој е безбоен гас, предизвикува тежок, непријатен јак мирис. Со оксидација на сулфур се добива сулфурна киселина. Сулфур диоксид, особено оној што е растворливиот во вода, со водородот создава неколку форми: молекулски SO_2 , бисулфит или хидрогенсулфит (HSO_3^-) и сулфит (SO_3^{2-}) (Ivanova, 2013). Бисулфитите и сулфитите во виното се во форма на соли. Врзана форма е кога овие форми се комбинираат со соединенија како феноли, ацеталдехи и шеќер. Во виното се присутни ниски концентрации на сулфати, од 100 до 400 mg/L, кои се изразени во K_2SO_4 . Во текот на зреењето на виното, концентрациите на сулфати се зголемувале поради повторни сулфурирања и оксидација на SO_2 (Ivanova, 2013).

Главни сулфурни соединенија присутни во грозјето и виното се неорганските сулфити. Најголем дел од овие соединенија потекнуваат од SO_2 , кој поради своето антиоксидантно и антимикробно дејство се додава во виното. Главните органски сулфурни соединенија се аминокиселините, цистеин и неговиот дериват метионин, трипептиди (глутатион) кои содржат цистеин и протеини кои содржат цистеин и метионин.

Виното содржи ниски концентрации на сулфати 100 - 400 mg/L изразени во K_2SO_4 . Во одредени случаи, силно сулфурани слатки вина можат да содржат и до 2 g/L сулфати (и повеќе), по неколку години зреење на вината во буриња.

Во виното најчесто присутна испарлива сулфурна компонента е сулфуроводород (H_2S), која има непријатен мирис на расипано јајце. Во текот на ферментацијата може да се формира, со редукција на елементарниот сулфур од

страна на квасецот или при метаболизмот на аминокиселините кои содржат сулфур, како што е цистеин.

Сулфур диоксидот се користи како конзерванс во домаќинството и за заштита од оксидација, спречување на појава на бактерии и микробиолошко расипување на вината.

1.5.2. Фосфорна киселина

Фосфорна киселина (H_3PO_4) е безбојна кристална супстанција, лесно растворлива во вода. Таа е трибазна киселина и гради три вида анјони и тоа дихидрогенфосфатен анјон (H_2PO_4^-), хидрогенфосфатен анјон (HPO_4^{2-}) и фосфатен анјон (PO_4^{3-}).

Фосфатите се природно присутни во виното во органска и неорганска форма. Белите вина содржат фосфорна киселина во концентрација од 70 до 500 mg/L, а црвените вина од 150 mg/L до 1 g/L (Ivanova, 2013). Варијациите во содржината можат да настанат како послединца на додавање диамониум фосфат во ширата, со цел да се подобри и забрза алкохолната ферментација. Но, подобро е да се користи амониум сулфат бидејќи фосфорните јони предизвикуваат заматување на виното од формиран железно фосфат, кој се таложи.

Во виното сите нитрати (NO_3^-) се растворливи и се присутни во траги. Присуство на хлориди во виното лесно може да се предвиди (само хлоридите на олово, сребро и жива се нерастворливи). Концентрација на хлориди во вино е помала 50 mg/L. Во вина произведени од грозје одгледувано блиску до море, содржината на хлориди е помала 1 g/L. При финализација на вино се додава NaCl во одредени случаи, особено кога се користат белки од јајца.

1.6. Капиларна електрофореза (СЕ)

Природата на матрикот на примерокот за анализа, како што се неговиот состав, структурата и физичките својства на компонентите што се содржат во матрикот на примерокот за анализа, многу често влијаат врз изборот на метод за анализа на даден аналит. Доколку постојат повеќе алтернативни методи за мерење на дадено својство на примерок за анализата, тогаш изборот на даден метод ќе зависи од тоа кој од горенаведените критериуми е најважен. Така на пример, многу често се избира метод што дава најточни податоци, а при некои анализи се избира и најбрзиот метод.

Во Р Македонија, до сега е објавена само една студија за анализа на органски киселини со примена на реверзнофазна високоефикасна течна хроматографија (RP-HPLC) (Tasev et al., 2016), што не е доволна за да се добијат целосни и генерални заклучоци за квалитетот на виното. Затоа, потребни се понатамошни студии, со примена на брзи и прецизни методи, кои воедно ќе овозможат да се добијат подетални податоци за составот на органските киселини во македонските вина.

Денес, методите на капиларна електрофореза сè повеќе се имплементираат поради индивидуалните предности што ги овозможува, а тоа се: коректното време на анализа, високата ефикасност на сепарација и намалената потрошувачка на реагенси. Капиларната електрофореза, исто така, дозволува да се анализира широк спектар соединенија со ниско ниво на концентрација, каде што ќе биде применета само минималена припрема на примероците.

Во последните неколку години, за определување на органските киселини во грозје и вино сè повеќе се применува капиларна електрофореза (СЕ) поврзана со УВ-детекција (Castiñeira et al., 2000; Saavedra et al., 2003; Mato et al. 2007, Peres et al., 2009 and Liu et al., 2017), бидејќи е утврдено дека овозможува брза анализа и ефикасно прикажување на соединенијата во аналитите. Капиларната електрофореза најчесто се користи со УВ-детекција, во директно и индиректно зрачење. Ултравioletова (УВ) детекција со директно зрачење се применува ако соединенијата од виното се апсорбираат во УВ-спектарот или се

модифицирани да се појавуваат во хромофорите. Исто така, можеме да го користиме и индиректниот режим, во случај кога соединенијата на виното не се апсорбираат во УВ-подрачјето, како во случај кога детектираме катјони, киселински шеќери и органски киселини.

Како најчесто употребувани детектори во истажувањата се потврдени ултравиолетовите (УВ) и ултравиолетово–видливите (УВ-Вис) детектори, кои може да бидат со фиксна бранова должина (најчесто 254 nm), со променлива бранова должина и со низа од диоди (diode-array detector, DAD, ДАД). Детекторот со низа од диоди овозможува континуирано следење на УВ-спектарот (УВ-Вис) на сè што излегува од колоната. Со ова е дадена можност за идентификација на компонентите од примерокот, колку што е дозволено во границата на УВ-спектарот (УВ-Вис). Овој детектор може да биде употребен за „гледање“ на хроматограмот на различни бранови должини, т.е. секоја од компонентите може да се определи според брановата должина на која покажува максимална апсорпција (Ivanova, 2013).

Исто така, денес се претставени и методите со кондуктометриски спроводлив детектор (CD) поврзан со капиларна електрофореза, коишто во минатото биле комбинирани со ултравиолетово–видливи (УВ-Вис) детектори. За детекција на компоненти од смеса, денес најчесто имаат примена и бесконтактните детектори на спроводливост (Kubáň et al., 2005). Кондуктометрискиот детектор се покажа многу ефикасен во детектирањето на вински органски киселини. Во врска со важните биолошки пептиди, амини, протеини и витамини кои се присутни во виното во ниво на траги, ласерсерската индуцирана флуоресценција денес е потврдена како моќен детектор (Coelho et al., 2016).

Како најмоќни и најосетливи детектори кои се применуваат за идентификација и проучување на структурата на соединенија, особено на нови и сложени соединенија што се формираат при зреење на виното, претставуваат масените детектори. Масените детектори особено се погодни за идентификација на супстанции преку детекција на нивните маси. Принципот на работа на масениот детектор е јонизација на молекулите што влегуваат во масениот

спектрометар и нивна фрагментација, при што се добиваат фрагменти – јони, кои се детектирани од детекторот. Масениот спектрометар широко се примена во различни области, како што се: храна и пијалаци, животна средина, лекови, пожари, идентификација на непознати примероци, криминалистика, неговата можност е да детектира целосно („full scan“). Тој ги скенира сите пикови во спектарот, детектира и селектира избрани јони („selective ion monitoring“-SIM) и гледа само селектирани јони на специфични супстанции. Со целосното скенирање со масениот детектор („full scan“) се овозможува собирање на податоци во целиот опсег на маси (најчесто од 50 до 400 m/z) и се користи за определување на непознати супстанции во примерокот (Ivanova, 2013).

Во последниве години се зголемува интересот за употреба на електророспреј-јонизациона-масна спектрометрија (ESI-MS), како самостојна техника или како аналитички техника на одвојување применета со капиларната електрофореза (CE), со цел целосно да се анализира и проучи широк спектар соединенија во сложени матрици на примероци од храна (Simo et al., 2005).

Аналитичкиот инструмент капиларна електрофореза беше одбран да биде применет за изработка на овој труд, бидејќи од претходните истражувања во минатото имавме сознанија дека обезбедува висока резолуција како брза и едноставна техника, троши многу малку реагенси и примероци, а бара минимална подготовка на примерокот, дури и во сложени матрици. Со тоа заклучивме дека при анализа на примероците од виното, со примена на капиларна електрофореза и нејзините предности, постои можност да ги замениме вообичаените сепаративни техники како што е гасната хроматографија која се користи за испарливи соединенија, или течната хроматографија која се применува за анализа на флавоноиди и неиспарливи соединенија. Доколку се продлабочиме во истражувањата и сознанијата, капиларната електрофореза дава можност за одвојувањето на изомери во случај на шеќери и стилбени. Во поедниве децении, со примена на капиларната електрофореза, најмногу истражувани и најпрецизно се квантифицирани флавоноидите и нефлавоноидните полифеноли (Coelho et al., 2016).

Виното е суптилна матрица поради неговиот директен киселински и етанолан состав. Ниската вредност на pH бара употреба на алкален пуфер за да се олесни миграцијата на силните органски киселини и фенолните состојки. Присуството на етанол директно влијае врз вискозноста на електролитот во капиларата од електрофорезата и ги модифицира електроозмотичните соединенија на виното, кои ја олеснуваат миграцијата, а со тоа се подобрува и растворливоста на анализот (Coelho et al., 2016).

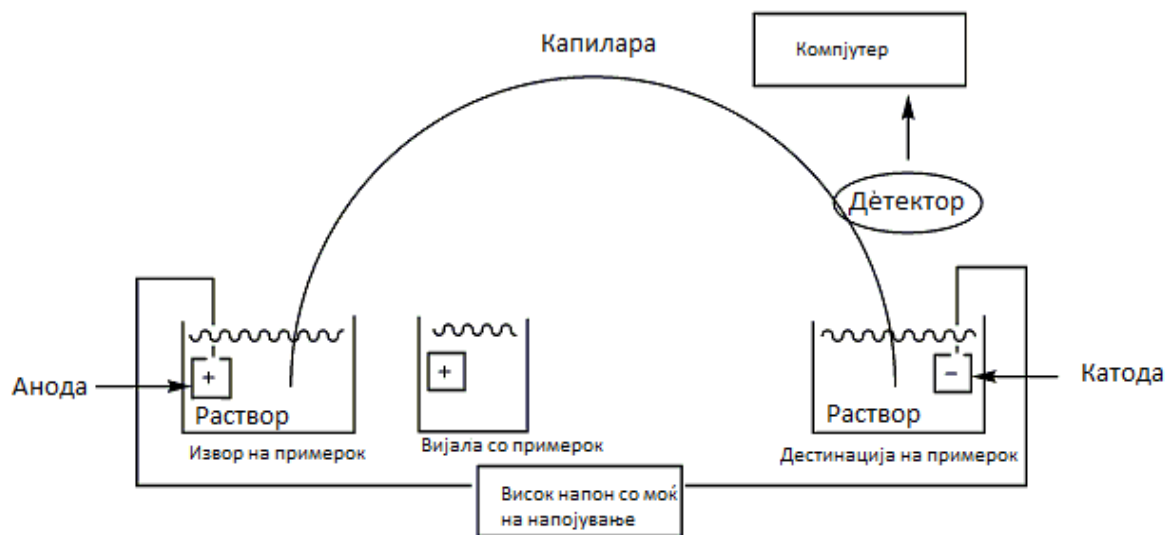
Но, со цел да се овозможи одделување на анјонските соединенија за кратко време, потребна е обратна насока на електроосмотичен проток (EOF) и примена на соодветна резолуција. Предноста на капиларната електрофореза (CE) како аналитичка техника е тоа што има можност целосно да се приспособи на тенденцијата на примена на минијатуризацијата и електрофореза со примена на микрочип (MCE), односно техники, коишто денес претставуваат голем потенцијал за примена во анализата на различни компоненти и соединенија во виното (Gomez et al., 2016). Заклучно до денес, објавена е само една статија во која била примената електрофореза со микрочип (MCE) за одредувањата на малите неоргански и органски анјони во бели и црвени вина, како и примена на техниките на изотахофореза (Masár et al., 2001) и зоната на електрофореза (Masár et al., 2005).

Капиларна електрофореза (CE) е метод за разделување на компоненти од соединенија заснована врз различната брзина на миграција на наелектризирани честички во еднонасочно поле. Од своето основање во 80-тите години, капиларната електрофореза е добро воспоставена техника на сепарација (Tavares, et al., 2003). Капиларната електрофореза е аналитичка техника која опфаќа фамилија техники со посебни механизми за сепарација и селективности (Tavares, 1997). Таа се одликува со висока ефикасност, резолуција, голема брзина, целосна автоматизација и разновидност на инјекција (Landers, 1997). Покрај досегашните технолошки достигнувања, многу истражувања се насочени кон демонстрирање на можностите на капиларната електрофореза (CE) за рутински апликации.

Како прецизна аналитичка техника, капиларната електрофореза се применува за одвојување анјони врз основа на нивната електрофилна подвижност и примена на одреден напон. Електрофилната подвижност зависи од полнењето на молекулата, вискозитетот и радиусот на атомот. Стапката на движење на честичката е правопропорционална со применетото електрично поле, односно, колку е поголема јачината на полето, толку е побрза мобилноста. Според тоа, досегашните истражувања покажале дека ако два јона се со иста големина, оној со поголем полнеж ќе се движи побрзо. Капиларната електрофореза денес многу се применува затоа што дава брзи резултати и овозможува разделување со висока резолуција. Таа е корисна техника бидејќи располага со голем опсег на методи за детекција (Li, 1992). Пред капиларната електрофореза, во истражувањата наоѓала применета гел-електрофорезата на порозен полуцврст гел. Но, развојот на овој метод се движел бавно бидејќи недостасувало искуство. Напорите за примена на капиларната електрофореза (CE) започнале уште во доцните 1800-ти, со електрофореза на микроколичини на примерок, чија сепарација се вршела во капиларна цевка заедно со автоматизација. Со тоа започнале првите почетоци на примена на капиларната електрофореза во научните истражувањата. Во 1930 година, Arnes Tiselius првпат ја покажал способноста за примена на електрофореза, во експеримент во кој била утврдена поделбата на серумски протеините во слободни раствори (Petersen & Mohammad, 2001) и добил Нобелова награда за хемија во 1984 година. Неговата работа била незабележана до појавата на Хјертен кој ја вовел употребата на капиларите во 1960-тите. Користењето на капиларата во електрофорезата решило некои вообичаени проблеми во традиционалната електрофореза. На пример, тенките димензии на капиларите значително го зголемиле соодносот на површината и волуменот, со што се елиминирало прегревањето со високи напони.

Капиларна електрофореза (CE) е најефикасна техника на сепарација достапна за анализа на големи и мали молекули, неоргански катјони, анјони, аминокиселини, пептиди, протеини, нуклеински киселини, нуклеотиди, полинуклеотиди, катехоламини, лекови, витамини, јаглехидрати и биохемиски (макро) молекули кои можат да се наелектризираат (Xu, 1996).

На сл. 8 е прикажан системот на капиларна електрофореза кој се состои од високонапонско напојување, систем за воведување на примероци, капиларна цевка, детектор и излезен уред. Некои инструменти вклучуваат уред за контрола на температурата за да обезбедат повторливи резултати. Ова е затоа што одвојувањето на примерокот зависи од електрофилната подвижност и вискозитетот на растворите, којшто се намалува со покачување на температурата на колоната (Camilleri, 1997). Секоја страна на електродата е поврзана со високонапонско напојување. Електродите помагаат да се предизвика електрично поле за да се иницира миграција на примерокот од анодата до катодата преку капиларната цевка. Капиларната цевка е направена од фузиран силикат и понекогаш е обложена со полиимид. На катодниот крај на капиларата се поврзува и фотомултипликаторска цевка која овозможува изградба на масен спектар, обезбедувајќи информации за масата за полнење на односот на јонските видови (Camilleri, 1997). Основната инструментална поставеност се состои од високонапонско напојување, капиларен споен силикон (SiO_2), два резервоара за раствор, две електроди и детектор на колона (Ху, 1996).



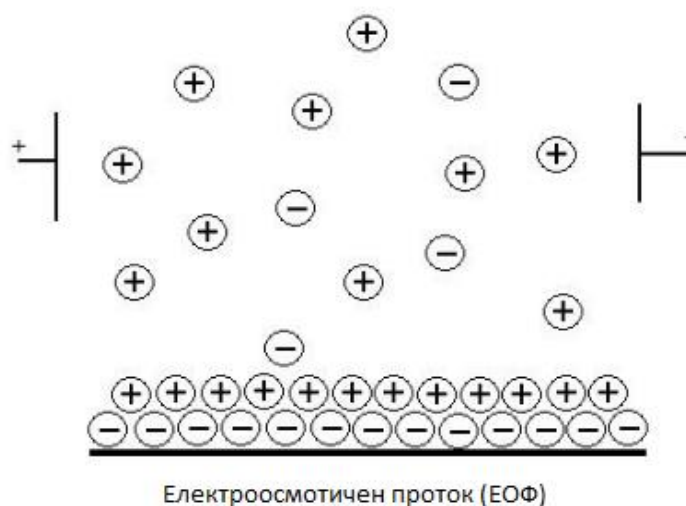
Слика 8. Капиларна електрофореза со високонапонско напојување и систем за воведување на примероци, капиларна цевка, детектор, излезен уред, уред за контрола на температурата, електроди

Figure 8. Capillary electrophoresis with high voltage power supply and sample introduction system, capillary tube, detector, output device, temperature control device, electrodes

Капиларната колона е клучен елемент на капиларно електрофорезетичкото одвојување. Флуидизираниот силициум е најчесто користен материјал за изработка на колоните, иако повеќето капилари се направени од тефлонско и боросиликатно стакло. Широката употреба на фузираниот силициум се должи на неговите внатрешни својства кои вклучуваат транспарентност во широк спектар на електромагнетниот спектар и висока топлинска спроводливост. Флуоресцентниот силициум исто така лесно се применува за изработка на капилари со дијаметри од неколку микрометри. Многу истражувања ја опишуваат ковалентната приврзаност на силани со неутрални или хидрофилни субституенти на внатрешниот ѕид на капиларот, со цел да се намали електроосмотичниот проток и да се спречи адсорпцијата на анализот. Внатрешната обложеност во капиларата исто така има тенденција да ја стабилизираат вредноста на pH (Xu, 1996).

Во капиларната електрофореза, од особена важност е електрофоретичка мобилност, со која јонот се подложува на сила што е еднаква на производот од нето-полнежот и јачината на електричното поле. Таа исто така се случува и со силата на влечење што е еднаква на производот, односно коефициентот на триење на триење и брзината (Li, 1992). Истовремено, од брзината на електроосмотичниот проток (EOF) зависи и брзината на миграцијата на јони во капиларната електрофореза. Електроосмотичниот проток се применува како пумпа во мобилната фаза, а неговата работа започнува и е предизвикана со примена на висок напон со капиларен капак што го исполнува електролитот (Altria, 1995). Анализите мигрираат зависно од полнежот, но ги носи и електроосмотичкиот проток. Сите аналити заедно се движат, но со различна брзина се разделуваат. Електроосмотичниот проток се јавува кога пуферот што поминува низ силика капиларите има pH димезионална величина поголема од 3, а групите на SiOH губат протон за да станат SiO₂-јони. Капиларниот ѕид има негативен полнеж, кој развива двоен слој на катјони што се привлечени кон него.

Внатрешниот катјонски слој е стационарден, додека надворешниот слој е слободен и се движи по капиларот. Применетото електрично поле предизвикува движење на слободните катјони кон катодата, создавајќи моќен проток. Бидејќи електрофоретичката подвижност е поголема од електроосмотичниот проток, катјоните ќе се одделат и негативно наелектризираните честички, кои се природно привлечени од позитивно наелектризираната анода, ќе се придвижат. Електроосмотичниот проток (EOF) најдобро функционира со голем потенцијал помеѓу катјонските слоеви, при поголем дифузен слој на катјони за повлекување на повеќе молекули кон катодата, низкиот отпор од околниот раствор и тампон со pH од 9, така што сите SiOH-групи се јонизирани (Li, 1992).



Слика 9. Електроосмотичен проток поради примена на напон

Figure 9. Electroosmotic flow due to applied voltage

Една од главните предности на капиларната електрофореза е нејзината способност да инјектира екстремно мали количини на примерок. Типичните волумени на инјектирање се движат од пико- до наноносители. Постојат две најчесто користени методи за инјектирање во капиларната електрофореза (CE): хидродинамичен и електрокинетички метод. Хидродинамичката инјекција се постигнува со примена на разликата на притисокот помеѓу двата краја на капиларата (Xu, 1996).

1.6.1. Капиларни методи на електросепарација

Денес постојат шест вида капиларна електросепарација кои се применуваат во научните сфери за здобивање на нови индивидуални и автентични научни резултати, а тоа се:

1. Капиларна зонска електрофореза (CZE),
2. Капиларна гел-електрофореза (CGE),
3. Мицеларна електрокинетичка капиларна хроматографија (МЕКС),
4. Капиларна електрохроматографија (СЕС),
5. Капиларноизоелектрично фокусирање (CIEF) и
6. Капиларна изотахофореза (CITP).

Сите шест вида капиларна електросепарација можат да бидат класифицирани во континуирани и дисконтинуирани системи. Постојаниот систем има во позадина електролити кои позадинско дејствуваат во текот на работата на капиларите. Па затоа, според примената на електролитот во капиларната електрофореза имаме кинетички состав (константен состав на електролит) и процеси на постојан состав (различни електролити). Дисконтинуираниот систем го одржува примерокот во различни зони на разделување, со примена на два различни електролита (Weston & Brown, 1997). Секоја од овие техники користи висок напон за да постигнат високоефикасни одвојувања (Ху, 1996).

➤ **Капиларна гел-електрофореза (CGE)**

Капиларната гел-електрофореза е техника каде што капиларата е наполнета со гел, а раздвојувањето зависи не само од односот маса/полнеж на јонот, туку и од големината на јоните. Како гел се користат полиетилен оксид, полиакрил амид, декстран или агароза. Гел се користи затоа што ја минимизира дифузијата на растворената супстанција која предизвикува ширење на зоните за сепарација и детекција. Гелот спречува сидовите на капиларите да ја апсорбираат

растворената супстанција и го ограничуваат преносот на топлина со забавување на молекулите. Со зголемување на концентрацијата на гелот се зголемува и резолуцијата, но се зголемува времетраењето на анализата. Предноста на оваа техника е во тоа што присуството на гелот го неутрализира електроосмотскиот проток (Li, 1992).

Капиларната гел-електрофореза, потенцијално се применува за одвојување на големи биолошки молекули, како што е протеините. Карактеристично за капиларната гел-електрофореза е тоа што ги одделува молекулите според нивната големина во неконвективен медиум. Полимерната мрежа во внатрешноста на капиларата се применува како молекуларно сито, во кое помалите молекули мигрираат побрзо од поголемите. Таа ја намалува стапката на дифузија на растворената супстанција, како и адсорпцијата на растворениот раствор до капиларниот ѕид, притоа потиснувајќи го електросомосткиот проток. Овие карактеристики ја зголемуваат ефикасноста, така што се дозволува употреба на пократка колона. Со вкрстените полимери, резолуцијата на капиларата лесно може да се оптимизира за даден опсег на молекуларни тежини со промена на вкупната концентрација на мономер и степен на вкрстено поврзување (Ху, 1996).

➤ **Мицеларна електрокинетска капиларна хроматографија (МЕКС)**

Мицеларна електрокинетска капиларна хроматографија е техника при која супстанциите се раздвојуваат врз основа на различните распределби помеѓу две фази, мобилна и стационарна. При тоа, во капиларата се внесува активната супстанција, во концентрација доволна да доведе до заемно здружување на молекулите и до формирање на мицели. Внатрешноста на мицелите е хидрофобна и со оваа техника може да се раздвојуваат и ненаелектризирани честички. Мицелите во капиларата претставуваат матрица низ која се движат честичките.

Јоните не се распределуваат помеѓу растворот и внатрешноста на честицата, па нивното раздвојување зависи само од брзината на движење. Ненаелектризираните честички се раздвојуваат во склад со распределбата помеѓу растворот и внатрешноста на мицелата, а тоа зависи од хидрофобноста на молекулите. Хидрофобните молекули го поминуваат поголемиот дел од своето време во мицелата, додека хидрофилните молекули мигрираат побрзо преку растворувачот. Кога мицелите не се присутни, неутралните молекули мигрираат со електроосмотскиот проток. Присуството на мицели резултира со време на задржување до местото каде што растворот има малку мицелска интеракција и време на задржување каде што растворот има силна мицелска интеракција. Неутралните молекули се одделуваат во време помеѓу различните две фази на интеракција. Фактори кои влијаат врз електроотротиот проток во мицеларната електрокинетичка хроматографија (МЕКС) се: рН, концентрација на површински активни супстанции, адитиви и полимерни премази на капиларниот сид (Li, 1992).

➤ **Капиларна зонска електрофореза (CZE)**

Капиларна зонска електрофореза е класична електрофореза при што раздвојувањето е одредено со брзините на движење на јоните од анодата кон катодата во склад со односот маса/полнеж (m/z). Сепарацијата се базира на разликите во подвижноста во електрофорезата, која е насочена пропорционално со полнежот на молекулата, и обратнопропорционална со вискозноста на растворувачот и радиусот на атомот. Брзината на движење на јонот е правопрпорционална на подвижноста во внатрешниот систем во електрофорезата и големината на електричното поле (Li, 1992).

Капиларна зонска електрофореза (CZE) е наједноставната форма на класична капиларна електрофореза (CE). Неутралните молекули не можат да се одвојат затоа што мигрираат со брзината на електроосмотскиот проток. Капиларите со фузиран силикат имаат групи силаноли кои се активираат во електролитот. Негативно наелектризираните SiO-јони ги привлекуваат позитивно

наелектризирани катјони кои формираат два слоја, стационарен и дифузен-катјонски слој. Во присуство на применето електрично поле, дифузниот слој мигрира кон негативно наелектризираната катода, создавајќи електрофоретски проток. Анјоните во растворот се привлечени од позитивно наелектризираната анода. Електроосмотската брзина може да се приспособи со менување на pH, вискозноста на растворувачот, јонската јачина, напонот и диелектричната константа (Li, 1992).

2. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

До денес, резултати за органски и неоргански киселини и нивни анјони во грозје и вино се објавени во престижни научни трудови во кои главно се применувале хроматографски техники, и тоа: високоефикасна течна хроматографија (HPLC), гасна хроматографија (GC), или јонска хроматографија (IC). Покрај овие вискоефикасни сепарирачки техники, во последниве неколку години сè поголем интерес разбудува капиларната електрофореза поврзана со UV-Vis детекторот (CE-UV-Vis) или со масниот детектор (CE-MS) со време на прелетување (CE-QTOF-MS) за анализа на киселини. Капиларната електрофореза поврзана со кондуктометриски детектор (CD) исто така претставува високо софистицирана техника која овозможува висока осетливост, точност и селективност при определување на мали молекули, како што се органските киселини. Во литературата досега не постојат податоци за примена на техниката CE-CD за анализи на алфа хидроксилни (органски киселини) и неоргански киселини во македонски вина.

Затоа, целта на овој магистерски труд е:

- Да се разработи и оптимизира сепаратиоционен метод со примена на капиларна електрофореза (CE) поврзан со кондуктометриски детектор (CD) за анализа на алфа хидроксилни киселини во форма на органски анјони (тартарат, малат, малонат, пируват, сукцинат, ацетат, цитрат и лактат), како и неорганските киселини во форма на неорганските анјони (хлорид, сулфат, оксалат и фосфат) во црвени вина од Македонија.
- Да се валидира CE-CD методот со определување на валидационите параметри: линеарност, граница на детекција (LOD), граница на квантификација (LOQ), принос, повторливост и репродукцибилност.
- Да се определи профилот на органски и неоргански киселини на вина од сортите вранец, мерло и каберне совинјон, од различни географски области, со цел да се провери дали постои влијание на географското потекло на грозјето и сортата на грозје врз содржината на органски и неоргански киселини.

3. МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

3.1. Хемикалии и стандарди

Натриумовите соли сулфат и ацетат, водород фосфат, литиум лактат и киселините оксална, винска, јаболкова, млечна, пирогроздова, сукцинска и лимонска беа набавени од Sigma-Aldrich (Братислава, Словачка). Сите основни стандардни беа подготвени со концентрација од 1 mmol/L, освен ацетат 10 mmol/L и лактат 5 mmol/L.

За подготовка на растворите за електролити се користеа 4-морфолинетансулфонска киселина (MEC), бис-трис (Bis-Tris) и бис-трис пропан (Bis-Tris propane) и сите беа со BioXtra квалитет (www.sigmaaldrich.com). Циклодекстрините беа добиени од Cyclolab (Будимпешта, Унгарија). Метилхидроксиетилцелулоза (MHEC) 30000 (Serva, Хајделберг, Германија) со вискозност од 30 Pa (2 % (w/v)) во вода при 20 °C, прочистена на мешан јонски разменувач на јони Amberlite MB-1 (Мерк, Дармштат, Германија), беше искористена како супресор на електроосомотичкиот проток (ЕОФ) и додадена во растворите на електролитите. За подготовка на растворите за електролите и примероците од вино беа користени деминерализирани вина добиени со дејонизација на водата во уред за дејонизација (Millipore, Molsheim, Франција).

3.2. Грозје

Грозјето од од сортите *V. vinifera* L. ранец, каберне совинјон и мерло беше одгледувано во винскиот Тиквешкиот Регион (Република Македонија) и беше собрано во септември/октомври 2015 година, со оптимална технолошка зрелост: 18, 20 и 26 °Brix, соодветно (нивоата помеѓу 18 и 26 °Brix се пожелни како објективни критериуми за проценка на оптималната зрелост на грозјето). Грозјето од сортата ранец беше собрано од 16 до 26 годишни лозови насади со површина од 30 ha, додека грозјето мерло и каберне совинјон беше собирано од лозови

насади од 15 и 26 хектари, и 17 и 26 годишни лозја, соодветно. Растојанието меѓу редовите изнесуваше 1,5 m, а растојанието помеѓу лозите беше 1,0 m. Грозјето рачно беше берено, рано наутро и редено во пластични гајби, а потоа грозјето е однесено во винарската визба на обработка.

3.3. Вино за анализа

Во овој магистерски труд беа произведени и анализирани вкупно 17 црвени вина од сортите вранец, каберне овињон и мерло, кои потекнуваат од четири географски области во Република Македонија: Демир Капија, Кавадарци, Неготино и Велес.

Набраното грозје (6 000 kg) од секоја сорта и од секоја винска област беше транспортирано до винарската визба Тиквеш (Кавадарци, Р Македонија), каде што секоја сорта на грозјето беше обработувана одделно. По преработката на грозјето со механичка дробилка/дестимер (селективна винарска фабрика, Пеленц, Перти - Франција), секоја гроздова каша беше собирана во танк за ферментација (7 t). Веднаш потоа, кашата беше третирана со сулфур диоксид (40 mg/L) во форма на 5 % сулфуреста киселина. Потоа, во сите танкови за ферментација беше додаван комерцијален пектилитичен ензим (3 g/100 kg) (Vinozym Vintage, FCE, Lamothe Abiet, Франција), со цел да се добие поголема стабилност на бојата, тело, како и поголема екстракција на полифеноли и арома. По три часа, вината беа инокулирани со комерцијален квасец *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin ICV D80, Lallemand, Франција). Пред апликација, квасецот беше рехидратиран во вода (20 g/hL, на 35 °C × 15 min), проследено со додавање на хранливи материи (кои содржат стероли, полинезаситени масни киселини, витамини и минерали) во доза од 45 g/hL (Go-ferm protect, Lallemand, Франција) за подобрување и преживување на квасецот, особено во услови на ферментација. Гроздовата каша од секој танк беше мацерирана 10 - 12 дена, а во тој период течноста беше потопувана со цврстите делови три пати на ден, во серии.

По периодот на мацерација, виното беше одделено од цврстите делови со механичко притискање, по што следуваше стабилизација на виното во иноксни танкови (7 000 L) на 4 °C, во период од три недели. По тој период, вината беа повторно преточени и третирали со сулфур диоксид (30 - 40 mg/L). Вториот преток беше направен по три месеци. Потоа, вината беа полнети во соодветни шишиња, складирани во подрум на температура од 1 до 8 °C и се чуваа 5 месеци пред анализата.

3.4. Основни хемиски анализи на вино

Со цел да се утврди општиот хемиски состав на вината беа користени официјални методи за анализа на вина (OIV 2016) и беа определени следниве параметри: алкохол (OIVMA-AS312-01 A), сув екстракт (OIV-MA-AS2-03B), специфична густина (OIV-MA-AS2-01 A), вкупна киселост (OIV-MA-AS313-01), испарлива киселост (OIV-MA-AS313-02), вкупен SO₂ и слободен SO₂ (Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014).

3.5. Анализа со капиларна електрофореза со кондуктометриски детектор (CE-CD)

Разделувањето со капиларната електрофореза (CE) беше извршено со целосно автоматизиран кондуктометриско-електрофоретски анализатор EA 202A (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Словачка), опремен со капиларна цевка (300 µm i.d.) изработена од флориран етилен-пропилен кополимер, блок за вбригување од полиметилметакрилат, со должина од 3 mm (500 µm i.d.) и Thriatlon автосемплер (Spark Holland, Emmen, Холандија). Детекторот со кондуктометриска спроводливост (Villa Labeco) беше поврзан со електродите за детекција кои беа поставени на крајот на капиларите (ефективна должина од 90 mm) за следење на разделувањето со капиларна електрофореза (CE). За време на разделувањето, струјата на проток беше 120 µA.

Позадинскиот електролит (BGE) користен за разделување на анализите беше составен од 35 mmol/L MES, 6 mmol/L Bis-Tris propane, 3,4 mmol/L Bis-Tris и 0,1% (w/V) MHEC, pH = 6,0, со додавање на различни концентрации на α -CD (0 и 20 mmol/L) и β -CD (0 и 10 mmol/L). Пред започнување и по завршување на анализите, деловите од инструментот, вклучувајќи ги единиците за сепарација и за чување на електролите, инјекторот и спроводните цевчиња низ кои протекуваа примероците, беа миени со дејонизирана вода, со помош на вградени перисталтички пумпи. Помеѓу анализите, миењето беше вршено со позадинскиот електролит (BGE) во релативно краток време (околу 1 min).

3.6. Параметри за калибрација и валидација

За квантитативни цели беа конструирани калибрациски криви на стандардните раствори од анализираните органски киселини во шест концентрациони точки. Опсегот на концентрацијата ($\mu\text{mol/L}$) за сите анализирани киселини е прикажан во табела 2. Секоја калибрациска точка е средна вредност од три мерења.

Според оптимизираниите услови на разделување, развиениот метод беше валидиран со определување на следниве параметри: линеарност, граница на детекција (LOD) и граница на квантификација (LOQ), прецизност и точност.

3.7. Статистичка анализа

Статистичката анализа на податоците вклучува пресметување на: средна вредност, минимална вредност, максимална вредност, стандардна девијација и релативна стандардна девијација. Статистичката анализа беше извршена со примена на софтверот STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc., САД). Дополнително беше извршена карактеристична векторска анализа (КВА) со цел да се провери дали има групирање на примероците од вина, согласно содржината на органски

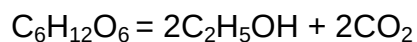
киселни, сортата или винскиот регион, користејќи го софверот XLSTAT Software, верзија 7.5.2 (Addinsoft, Париз, Франција).

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Основни хемиски параметри на вината

Основни хемиски параметри што се важни за квалитетот на виното се: алкохол, екстракт, вкупна и испарлива киселост, рН, редуцирачки шеќри, слободен и вкупен SO₂. Овие параметри беа определени во црвените вина од сортите вранец, каберне совинјон и мерло, кои беа предмет на истражување на оваа магистерски труд. Резултатите за основните хемиски параметри на вината се прикажани во табела 1.

Според содржината на шеќер во грозјето/ширата, може приближно да се пресмета содржината на алкохол што очекуваме да се создаде во текот на ферментацијата. Така, од шира со 180 g/L шеќер треба да се добие вино со околу 10 % етанол (V/V). Од добиените резултати беше заклучено дека содржината на алкохол во анализираните примероци од вино имаат слична вредност и се движи во граници од 12,07 (за вино вранец-K-4) до 15,29 % (за вино мерло-H-2). Всушност, виното мерло-H-2 има најмногу алкохол бидејќи ширата од ова вино беше најбогата со јаглехидрати (26,7 °Brix). Имено, алкохолот се добива со алкохолна ферментација на шеќерите од грозјето, во присуство на квасец, при што се добива етанол и јаглерод диоксид. Реакцијата на алкохолна ферментација може да се прикаже со следнава хемиска равенка:



Органските киселини (винска, јаболкова, лимонска, килибарна и млечна), како и одреден број нивни соли, обично се групираат во „неиспарлива киселост“ и „испарлива киселост“, а нивниот збир претставува „вкупна киселост“, односно со висока содржина на алкохол). Вкупната киселост на виното е претставена како сума на слаби органски киселини, главно винска, јаболкова, млечна, лимонска и килибарана киселина. Вкупната киселост на шира или вино ги вклучува сите видови на киселини, како форфорна киселина, органски киселини (погоре

опишани), како и аминокиселини чишто влијанија врз вкупната киселост сè уште не е добро позната. Од сите киселини, винската киселина е доминантна компонента во шира и вино, присутна во форма на калиумова сол и затоа вкупната киселост се изразува во еквиваленти на винска киселина. Генерално, сите анализирани вина содржеа слична вредност на вкупни киселини (средна вредност 5,35 g/L), доволно висока за да се обезбеди микробиолошка стабилност на вината и да се обезбеди доволно свежина. При тоа, најниска содржина на вкупни киселини е добиена за виното каберне совинјон-В-1 (4,74 g/L), додека виното мерло-ДК-1 има највисока киселост (6,58 g/L). При тоа, вредноста на рН кај анализираниите вина беше во граници од 3,55 до 3,81. Овие вредности се очекувани и вообичаени за црвените вина, кои овозможуваат хемиска и микробиолошка стабилност на вината.

Испарливата киселост на виното е многу значаен физичко-хемиски параметар кој треба да се следи во текот на процесот на производство на виното. Зголемена испарлива киселост на виното негативно влијае врз неговите органолептички карактеристики, како и врз неговиот квалитет во целост. Оваа појава е поврзана со формирање на оцетна киселина во релативно висока концентрација, како и формирање на други карбоксилни киселини во текот на ферментацијата. Во однос на испарливата киселост, сите вина од ова истражување содржат мала количина на испарливи киселини (од 0,37 до 0,58 g/L), што значи дека вината биле добро заштитени од оксидација со SO_2 . Оцетната киселина беше присутна во секое вино, концентрација која обезбедува пријатност на вината. Доколу е присутна во повисока содржина (> 1 g/L), тогаш таа ќе влијае врз негативно на вкусот и мирисот на вината, односно на квалитетот на вината, и ќе се осеќа мирис на оцет.

Табела 1. Резултати за основни хемиски параметри

Table 1. Results for basic chemical parameters

Вина	Алкохол (%)	Екстракт	Редуцирачки шеќери (g/L)	Вкупни киселини (g/L)	Испарливи киселини (g/L)	pH	Слободен SO ₂ (mg/L)	Вкупен SO ₂ (mg/L)
Вранец-ДК-1	13,59	58,29	3,4	5,17	0,5	3,75	58	94
Вранец-ДК-2	13,12	47,87	2,6	5,21	0,45	3,8	31	54
Вранец-К-1	13,37	47,77	2,6	5,69	0,45	3,58	43	70
Вранец-К-2	14,48	43,01	2,3	5,45	0,40	3,59	30	65
Вранец-К-3	12,98	38,17	2,1	4,85	0,48	3,64	47	77
Вранец-К-4	12,07	37,67	2,1	5,25	0,43	3,58	27	37
Вранец-Н-1	14,05	43,01	2,6	5,8	0,58	3,6	47	74
Вранец-В-1	14,94	33,97	2,3	5,24	0,56	3,68	31	53
Мерло-ДК-1	14,15	33,66	2,7	6,58	0,43	3,67	29	40
Мерло-Н-1	13,07	32,03	2,2	5,5	0,38	3,6	28	52
Мерло-Н-2	15,29	40,53	6,1	5,24	0,57	3,81	19	100
Мерло-В-1	14,48	39,46	4,9	5,51	0,45	3,64	12	37
Мело-В-2	13,10	32,66	2,2	4,78	0,39	3,72	34	65
Каб. совињ-ДК-1	13,29	25,98	2,4	5,53	0,39	3,56	34	56
Каб. совињ-Н-1	12,82	24,50	2,3	5,39	0,37	3,55	36	69
Каб. совињ-Н-2	13,19	23,00	2,2	4,95	0,56	3,76	30	42
Каб. совињ-В-1	12,67	26,43	5,2	4,74	0,53	3,79	9	34

каберне совињон: каберне совињон

Кратенки на вински реони: ДК: Демир Капија; К: Кавадарци; Н: Неготино, В: Велес.

SO₂ е компонента одговорна за квалитетот на вината, која делува како антиоксидант и ги штити ширата и виното од оксидација. Потребно е SO₂ да се додава во ширата пред да започне алкохолната ферментација. Во ова истражување, содржината на слободен SO₂ во анализираниите вина се движи во граници од 9 до 58 mg/L, што е доволно за вината да бидат заштитени од оксидација. Дополнително, беше анализирана и содржината на вкупен SO₂, која беше во концентracија од 34 до 100 mg/L. Имено, употребата на SO₂ во производството на вино се должи на неговата способност да делува како ефективен антиоксидант и антимикробен агенс, спречувајќи оксидација, има потенцијал за белење на пигменти и се применува за елиминација на непријатни мириси. SO₂ може селективно да делува против дивите квасци, кои доаѓаат од лушпата на зрната или опремата во винарницата, и може да ја прекине нивната активност. Сулфур диоксидот (SO₂) може да се додаде во форма на сол (калиум метабисулфит, K₂S₂O₅, кој се јонизира во кисела средина ослободувајќи гасовит SO₂ или како раствор од сулфуреста киселина (H₂SO₃) (Ivanova, 2013). Во ова истражување беше користен SO₂ во форма на раствор од H₂SO₃.

Од особено значење за производителите на вино е разбирањето на односот помеѓу pH и сулфур диоксидот (SO₂). Ефективноста на антимикробната активност на SO₂, зависи од pH на виното. Колку вредноста на pH е повисока, толку помалку SO₂ ќе биде во корисна слободна форма. Затоа е важно вината да имаат пониска вредност на pH и повисока содржина на вкупни киселини, бидејќи на тој начин се постигнува микробиолошка и хемиска стабилност на вината. Доколку SO₂ се додаде во повисоки содржини во виното, тогаш може да се осети остар мирис на SO₂ кој го надразнува грлото при пробување на виното и генерално, негативно влијае врз квалитетот на виното (Иванова-Петропулос и Митрев, 2014).

Главните јаглехидрати во грозјето и виното се глюкоза и фруктоза, кои обично се именуваат и како „редуцирачки шеќери“. Содржината на шеќери во грозјето зависи од сортата, зрелоста, здравствената состојба на грозјето и условите на одгледување. За време на ферментацијата, содржината на шеќерите се намалува, поради нивното учество во алкохолната ферментација и најчесто се

добиваат суви вина со ниска содржина на шеќери ($< 5 \text{ g/L}$). Во ова истражување беше утврдено дека анализираните црвени вина содржат редуцирачки шеќери во ниска концентрација, од 2,1 до 6,1 g/L, што значи дека алкохолната ферментација се одвивала без прекини и била целосно спроведена, проследена со добивање на алкохол и CO_2 .

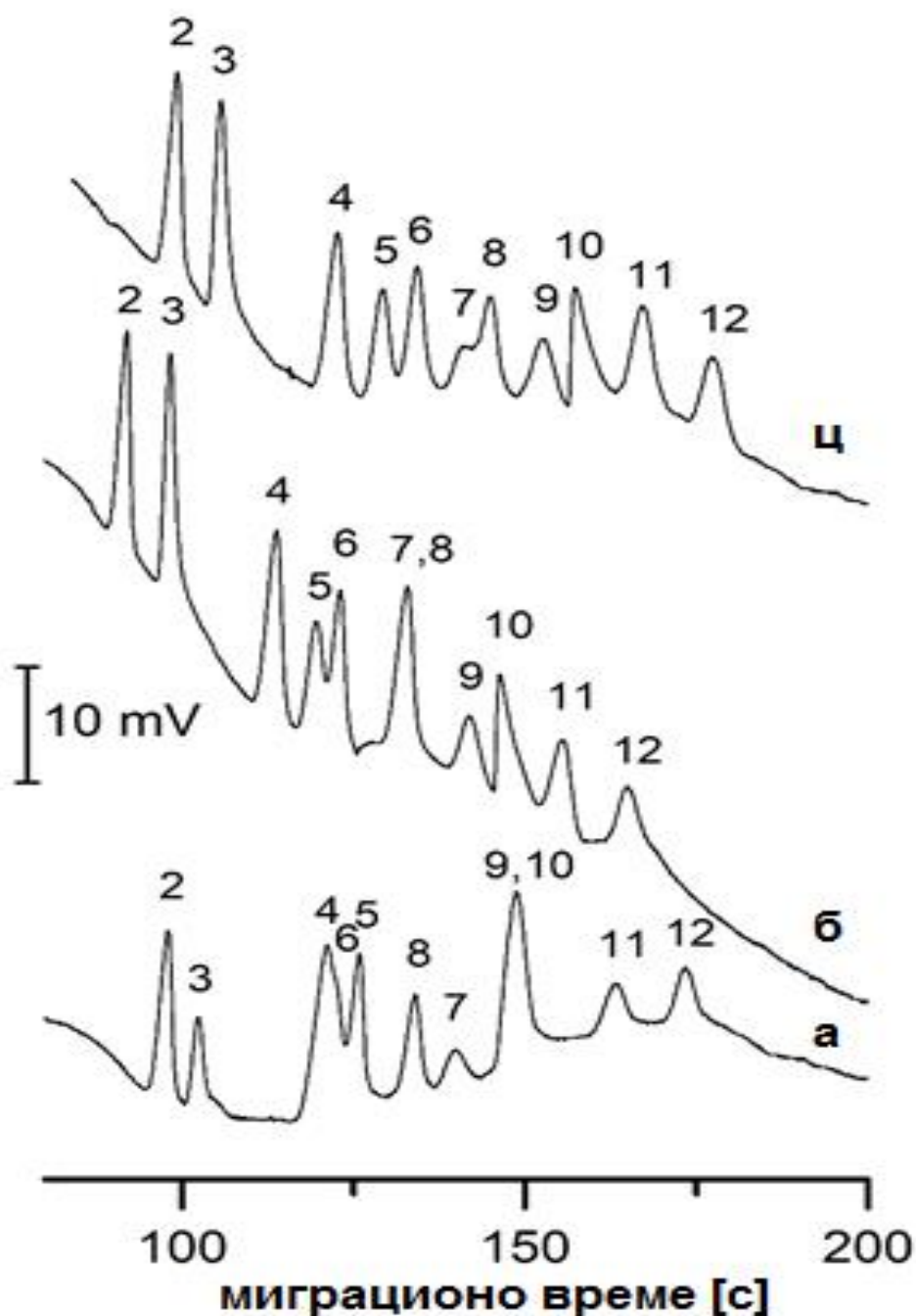
4.2. Анализа на вината со примена на капиларна електрофореза поврзана со кондуктометриски детектор (CE-CD)

Во последниве неколку години, за определување на органските киселини во грозје и вино сè повеќе се применува капиларна електрофореза (CE) поврзана со УВ-детектор, директно и индиректно (Castiñeira et al., 2000; Saavedra et al., 2003; Mato et al. 2007, Peres et al., 2009 and Liu et al., 2017), којашто овозможува брза анализа и ефикасно раздвојување на соединенијата во смеса. Во овој магистерски труд, капиларна електрофореза поврзана со кондуктометриски детектор беше применета за анализа на органски и неоргански киселини во форма на соли во црвени вина од сортите вранец, мерло и каберне совинјон, произведени во винарската визба Тиквеш. Пред да се примени методот за анализа на аналитите во вината беше потребно оптимизација и валидација на методот, а потоа негова примена на реалните примероци од вино.

Оптимизација на условите за CE

Условите за капиларната електрофореза применети во овој магистерски труд беа искористени од истражувањето на Verheggen и соработниците (1998), при што беше употребен релативно голем волумен на примерок во краток интервал (3 mm). Раздвојувањето на анјоните беше спроведено при ниска спроводливост на позадинскиот електролит (BGE), при супресиран електроосмотски проток (EOF). За сепарирање на компоненти со капиларна

электрофореза потребна е ниска спроводливост на позадинскиот електролит, особено кога разделувањето се одвива во широка капилара. На тој начин се зголемува сензитивноста на кондуктометриски детектор. Оптимални услови се постигнуваат кога разделувањето се врши на кратка патека (околу 10 cm) која опфаќа ефективна должина на колоната и дел од инјекторот. Составот на позадинскиот електролит беше избран врз база на претходни истражувања на групата истражувачи од Словачка, предводена од проф. Масар (Masár et al. 2005). При тоа, целосно раздвојување на анализите од интерес во ова истражување беше постигнато со неколку различни механизми обезбедени од компонентите во позадинскиот електролит. На сл. 10 е прикажано раздвојувањето на анјоните на киселини. Во овој контекст треба да се напомене дека позадинскиот електролит содржи два спротивни јона, бис-трис (Bis-Tris) и бис-трис (Bis-Tris) пропан (со единечен и двоен полнеж при pH 6), за модификација на ефективните мобилности на моно и двовалентните киселини според ефектот на јонска сила. Беа користени α - и β -циклодекстрини кои имаат значително влијание врз ефективната мобилност на малонат, сукцинат и цитрат (сл. 10).



Слика 10. Раздвојување на соли на органски и неоргански киселини со капиларна електрофореза. Означување на пикови: 2 - сулфат, 3 - оксалат, 4 - тартарат, 5 - малат, 6 - малонат, 7 - пируват, 8 - сукцинат, 9 - ацетат, 10 - цитрат, 11 - лактат, 12 - фосфат. Пикот на хлорид (1) не е прикажан.

Figure 10. CE separations of organic and inorganic acids under different separating conditions. Peak assignments: 2-sulfate, 3-oxalate, 4-tartrate, 5-malate, 6-malonate, 7-pyruvate, 8-succinate, 9-acetate, 10- citrate, 11-lactate, and 12-phosphate. Chloride (1) is not shown.

4.3. Валидација на методот за определување на органски и неоргански киселини со CE-CD

По извршената оптимизација на условите за анализа, методот беше валидиран. Притоа беа определени следниве валидационивалидни параметри: линеарност, граница на детекција, граница на квантификација, точност, прецизност, повторливост и репродуцибилност.

Линеарност. Линеароста беше тестирана во три дена, во шест концентрациони точки, за сите единаесет анјони. Податоците за линеарност, вклучувајќи наклон, отсечок на регресионата права и коефициент на корелација (R^2) беа пресметани и се прикажани во табела 2.

Линеароста е задоволителна за сите единаесет анјони, а коефициентот на корелација во сите случаи е поголем од 0,99 ($R^2 > 0,99$) и се движи од 0,9915 за фосфат до 0,9994 за малат.

Границата на детекција (*Limit of detection* (LOD)) се определува со равенката $LOD = 3 \times SD/\text{наклон}$, а граница на квантификација (*limit of quantification* (LOQ)) се пресметува со равенката $LOQ = 10 \times SD/\text{наклон}$. Стандардната девијација (SD) се добива од три повторувања на слепа проба. Добиените вредности за LOD и LOQ се движат во граница од 1,5 до 5,7 $\mu\text{mol/L}$ и 4,5 – 17,1 $\mu\text{mol/L}$ соодветно, за сите киселини.

Најниската вредност на границата на детекција е забележана за оксалат и тартарат и таа изнесува 1,5 $\mu\text{mol/L}$ за двата анализа.

Прецизност. Прецизноста е изразена како релативна стандардна девијација (*RSD*). Задоволителни резултати за *RSD* се помали од 20 % за концентрации кои се ниски и помали од 10 % за високи концентрации.

Табела 2. Податоци за линеарна регресија: опсег на определување, коефициенти на кривата на регресија (наклон и отсечок), коефициент на корелација (R^2), граница на детекција (LOD) и граница на квантификација (LOQ)

Table 2. Linear regression data: range of determination, coefficients of the regression curves (slope and intercept), coefficient of determination R^2 , LOD and LOQ

Соли	Опсег ($\mu\text{mol/L}$)	Наклон [mVs.L/ μmol]	Отсечок	R^2	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)
Сульфат	5 - 60	2,62	-0,44	0,9979	1,6	4,8
Оксалат	5 - 50	2,45	0,45	0,9993	1,5	4,5
Тартарат	5 - 150	2,68	-0,29	0,9990	1,5	4,5
Малат	5 - 100	1,64	-2,69	0,9994	1,6	4,8
Малонат	5 - 50	1,74	-3,83	0,9979	1,9	5,7
Пируват	10 - 70	0,68	-1,16	0,9975	2,5	7,5
Сукцинат	5 - 120	1,99	-2,20	0,9976	1,6	4,8
Ацетат	20 - 300	1,11	-8,57	0,9989	5,7	17,1
Цитрат	10 - 60	1,76	-1,62	0,9919	2,1	6,3
Лактат	30 - 150	1,15	-0,82	0,9918	3,7	11,1
Фосфат	20 - 70	1,33	-0,38	0,9915	4,5	13,5

LOD: граница на детекција; LOQ: граница на квантификација

Редоследот на киселини е во согласност со редоследот на миграција прикажан на слика 10.

Во овој магистрски труд, интер- и интрадневната прецизност беа определени со инјектирање на стандарден раствор со ниска концентрација (10 $\mu\text{mol/L}$ за сулфат, оксалат, тартарат, малат, малонат, сукцинат; 20 $\mu\text{mol/L}$ за пируват, цитрат; и 30 $\mu\text{mol/L}$ за лактат, фосфат и ацетат) и висока концентрација (40 $\mu\text{mol/L}$ за сулфат, оксалат, малонат, пируват, сукцинат, цитрат; и 70 $\mu\text{mol/L}$ за тартарат, малат, лактат, фосфат и ацетат). За определување на интрадневната прецизност беа анализирани свежо приготвени раствори, а анализата беше изведена во три повторувања. Вредностите за релативната стандардна девијација (RSD) за секој од анализите беа пониски од 5 % за ниските концентрации и пониски од 3 % за високите концентрации на киселините, со што се потврдува дека предложениот метод е прецизен. Интердневната прецизност беше определена во текот на 3 последователни денови, со три повторувања на растворите.

Точноста беше изразена во однос на релативната грешка на определената концентрација споредена со вистинската (номинална) вредност. Задоволителни резултати за релативната грешка се прифатливи доколку вредноста е помала од 20 % за ниски концентрации и помала од 10 % за високи концентрации.

Во ова истражување, точноста беше проверена со методот на стандарден додаток на реален примерок вино. За таа цел на примерок вино (вранец-Н-1) му беше додаден стандарден раствор во две концентрации (ниска и висока) кој претставува мешавина од сите анализирани киселини. Беа пресметани приносите според следнава равенка:

$$\text{Принос (\%)} = (\text{најдена концентрација во вино} - \text{оригиналната концентрација во виното}) / \text{додадената концентрација} \times 100 \%$$

Добиени се вредности за приносот во граници од 91,6 до 100,3 (табела 4), со што се потврдува точноста на методот и неговата соодветност за определување на избраните анјони во примероците црвено вино.

Табела 3. Прецизност на предложениот метод. Интрадневна и интердневна прецизност

Table 3. Precision of the proposed method. Intra-day and inter-day precision

Соли	Интрадневната прецизност (RSD на површина на пик %, n = 3)		Интер-дневната прецизност (RSD на површина на пик %, n = 9)	
	ниско ниво	високо ниво	ниско ниво	високо ниво
Сулфат	4,8	2,1	5,1	2,8
Оксалат	1,6	2,2	3,6	2,6
Тартарат	0,5	1,1	3,0	1,5
Малат	1,1	0,9	4,3	2,4
Малонат	3,0	1,8	5,8	2,9
Пируват	4,0	2,9	5,0	5,2
Сукцинат	3,5	3,5	4,9	3,9
Ацетат	3,9	0,7	4,7	1,3
Цитрат	3,4	2,8	5,6	5,1
Лактат	4,4	2,2	5,2	4,1
Фосфат	4,8	0,5	5,5	2,8

Табела 4. Стандардни додатоци за проверка на точноста на СЕ-методот за одредување на органски и неоргански киселини во примероците на вино (n = 3)

Table 4. Standard additions for checking the accuracy of the CE method for determination of organic and inorganic acids in wine samples (n=3)

Соли	Концентрација ($\mu\text{mol/L}$)	I. ниво на концентрација			II. ниво на концентрација		
		Додадена ($\mu\text{mol/L}$)	Најдена ($\mu\text{mol/L}$)	Принос (%)	Додадена ($\mu\text{mol/L}$)	Најдена ($\mu\text{mol/L}$)	Принос (%)
Сулфат	9,3	10	19,2	98,5	20	29,3	99,8
Тартарат	109,0	20	128,3	96,4	40	149,1	100,2
Малат	4,3	10	14,2	98,6	20	24,4	100,3
Сукцинат	53,0	10	62,7	96,9	20	72,9	99,4
Ацетат	104,8	20	123,9	95,7	40	144,0	98,1
Цитрат	0	10	9,5	95,1	20	19,5	97,5
Лактат	48,1	10	57,4	93,5	20	67,2	95,7
Фосфат	30,3	10	39,5	91,6	20	50,0	98,3

Примерок на вино-вранец-Н-1

Повторливост и репродуцибилност. „Повторливост на мерење“ и „репродуцибилност на мерење“ претставуваат две екстремни мерки на прецизност што може да се добијат. Повторливоста, од која се очекува да даде најмала варијација во резултатите, претставува мерка за варијабилноста во резултатите кога мерењето се врши од страна на еден аналитичар кој ја користи истата опрема во кратка временска рамка.

Повторливоста на методот беше проверена со анализа на реален примерок црвено вино (вранец) со шест повторувања во еден ден, додека репродуцибилноста беше проверена со анализа на виното во три повторувања во текот на пет последователни дена. Концентрациите на аналитите беа пресметани од нивните соодветни криви на калибрација. При тоа, пресметани беа вредностите на релативната стандардна девијација и тие се движат од 1,1 до 3,5 % за повторливоста, и од 2,9 до 7,5 % за репродуцибилноста (табела 5).

Идентификацијата на аналитите базирана на миграциските времиња во капиларната електрофореза, бара добри репродуцибилности, па затоа *прецизноста на миграциски времиња* е важна за оценување на севкупните параметри на методот. Пресметани беа релативните стандардни девијации на миграционите миграциските движења на аналитите во моделни раствори и тие се движат во граници од 0,6 % до 1,6 %, со отстапување од 1 до 2 сек. Типично, аналитите со помали ефективни мобилности (повисоки миграциски - времиња) имаат пониски вредности за релативната стандардна девијација (*RSD*). Имајќи го предвид фактот дека резултатите се добиени за разделување на аналити во моделни примероци при шест концентрациони нивоа (користени и за проверка на линеарноста), добиените вредности се повеќе од задоволителни. Исто така, значајно е што просечните миграциски времиња на аналитите во анализираните примероци вина се внатре во интервалот дефиниран *миграциско* време $\pm$ стандардна девијација, пресметано од анализата на моделните примероци. Овој факт покажува дека користените работни услови со елиминираниот електроосмотски проток (EOF) значително ја намалуваат флукуацијата на времето на миграција.

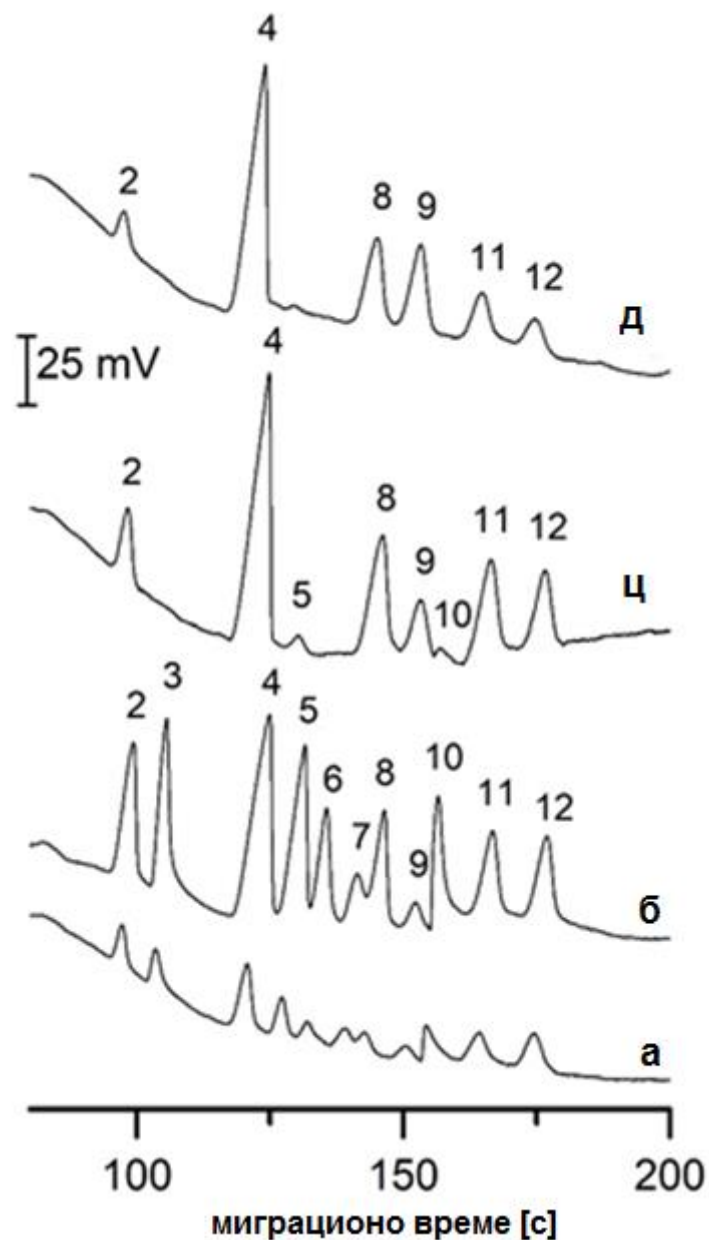
Табела 5. Повторливост и репродукцибилност на методот
Table 5. Repeatability and reproducibility of the method

Соли	Повторливост (6 повторувања)		Репродуктивност (3 повтроувања x 5 дена)	
	Средна		Средна	
	концентрација ($\mu\text{mol/L}$)	<i>RSD</i> (%)	концентрација ($\mu\text{mol/L}$)	<i>RSD</i> (%)
Сулфат	9,36	1,1	9,34	2,9
Тартарат	109,29	2,0	109,41	2,0
Малат	3,66	3,3	3,60	7,5
Сукцинат	53,04	1,8	53,11	2,9
Ацетат	104,74	2,0	104,57	3,2
Лактат	47,96	2,7	47,91	4,7
Фосфат	30,62	3,5	30,85	5,3

Примерок на вино-вранец-Н-1

4.4. Анализа на црвени вина со примена на капиларна електрофореза со кондуктометриски детектор (CE-CD)

За изработка на овој магистарски труд беше применет, оптимизиран и валидиран метод за определување на мали молекули (органиски и неорганиски киселини) во црвени вина со примена на капиларната електрофореза со кондуктометриски детектор (CE-CD) во македонски црвени вина од три сорти, вклучувајќи вранец, мерло и каберне совинјон произведени од грозје одгледувано во различни вински региони: Демир Капија (ДК), Кавадарци (К), Неготино (Н) и Велес (В). За сите аналити во испитаните примероци на вино, пресметано беше просечното миграциско време. Разликата во просечните миграциски времиња на аналитите во моделот од вино и реалениот примерок вино, беше пониска, од стандардната девијација на моделот од вино за сите анјони. На сл. 11 е прикажана поделба на органиски и неорганиски киселини со примена на техника на капиларна електрофореза во модел (а,б) и 100 пати разредени вински примероци (в, г). Концентрацијата на определените органиски киселини во црвените вина е прикажана во табела 6.



Слика 11. CE разделување на органски и неоргански киселини при различни услови на раздвојување (а,б) и 100 пати разредени примероци вино (в, г).

Figure 11. CE separation of organic and inorganic acids under different separation conditions (a, b) and 100 times diluted wine samples (c, d).

Табела 6. Содржината на органски и неоргански киселини (mmol/L) во вина вранец, мерло и кабернет
совињон произведува во различни вински

Table 6. Content of organic and inorganic acids (mmol/L) in Vranec, Merlot and Cabernet Sauvignon wines produces from
different wine regions

Примероци од вина	Сулфат (mmol/L)	Тартарат (mmol/L)	Малат (mmol/L)	Сукцинат (mmol/L)	Ацетат (mmol/L)	Цитрат (mmol/L)	Лактат (mmol/L)	Фосфат (mmol/L)
Вранец-ДК-1	1,5±0,1	13,4±1,0	0,7±0,2	6,2±0,3	11,3±0,6	n.d	9,4±0,7	5,5±1,6
Вранец-ДК-2	1,8±0,1	13,0±0,3	n.d	5,90±0.1	8,8±0,2	n.d	8,7±0,1	3,1±0,2
Вранец-К-1	1,3±0,1	12,2±0,8	0,6±0,1	5,2±0,2	9,1±0,4	n.d	6,8±0,2	5,3±0,4
Вранец-К-2	1,8±0,1	13,5±0,3	0,4±0,1	5,4±0,2	8,2±0,1	n.d	6,1±0,5	3,5±0,1
Вранец-К-3	1,2±0,1	12,5±0,5	0,8±0,1	5,8±0,3	9,9±0,5	n.d	10,0±0,3	2,1±0,2
Вранец-К-4	1,4±0,1	12,8±0,1	0,7±0,1	6,2±0,2	8,4±0,1	n.d	7,6±0,3	2,2±0,3
Вранец-Н-1	1,1±0,1	12,7±0,2	0,5±0,1	6,2±0,1	12,2±0,3	n.d	5,6±0,2	3,5±0,2
Вранец-В-1	1,5±0,1	14,5±0,1	n.d	4,3±0,1	11,0±0,4	n.d	7,0±0,1	4,2±0,3
Мерло-ДК-1	2,7±0,1	10,1±0,1	1,0±0,1	7,3±0,3	8,0±0,2	n.d	9,2±0,5	4,3±0,5
Мерло-Н-1	1,3±0,1	11,8±0,5	1,2±0,1	6,7±0,5	8,5±0.2	n.d	11,5±0,1	3,8±0,7
Мерло-Н-2	4,2±0,1	10,0±0,3	0,6±0,1	5,3±0,1	12,3±0,2	0,4±0,1	6,0±0,6	6,3±0,4
Мерло-В-1	1,4±0,1	11,6±0,4	1,0±0,1	7,0±0,7	8,6±0,3	n.d	9,4±0,2	3,5±0,4
Мерло-В-2	1,2±0,1	11,2±0,3	1,2±0,3	6,9±0,1	8,2±0,4	n.d	11,8±0,1	4,0±0,1
Каб. совињ-ДК-1	2,2±0,1	13,0±0,3	1,0±0,1	7,6±0,1	6,4±0,1	0,6±0,1	11,0±0,1	7,2±0,8
Каб. совињ-Н-1	1,8±0,1	13,3±0,3	1,2±0,1	6,7±0,1	7,9±0,1	n.d	12,8±0,4	2,8±0,1
Каб. совињ-Н-2	2,3±0,1	11,7±0,3	0,8±0,1	5,9±0,2	11,1±0,5	n.d	10,7±0,3	2,6±0,4

Каб. совињ-В-1	1,7±0,1	9,1±0,4	0,5±0,1	6,6±0,3	10,8±0,2	n.d	10,0±0,6	4,8±0,4
Минимум	1,09	9,07	0,43	4,31	6,40	0,00	5,58	2,10
Максимум	4,17	14,48	1,18	7,56	12,30	0,62	12,85	7,25
Средна	1,77	12,09	0,83	6,13	9,45	0,06	9,00	4,03

n.d.: не е пронајден каб. совињ: каберне совињон

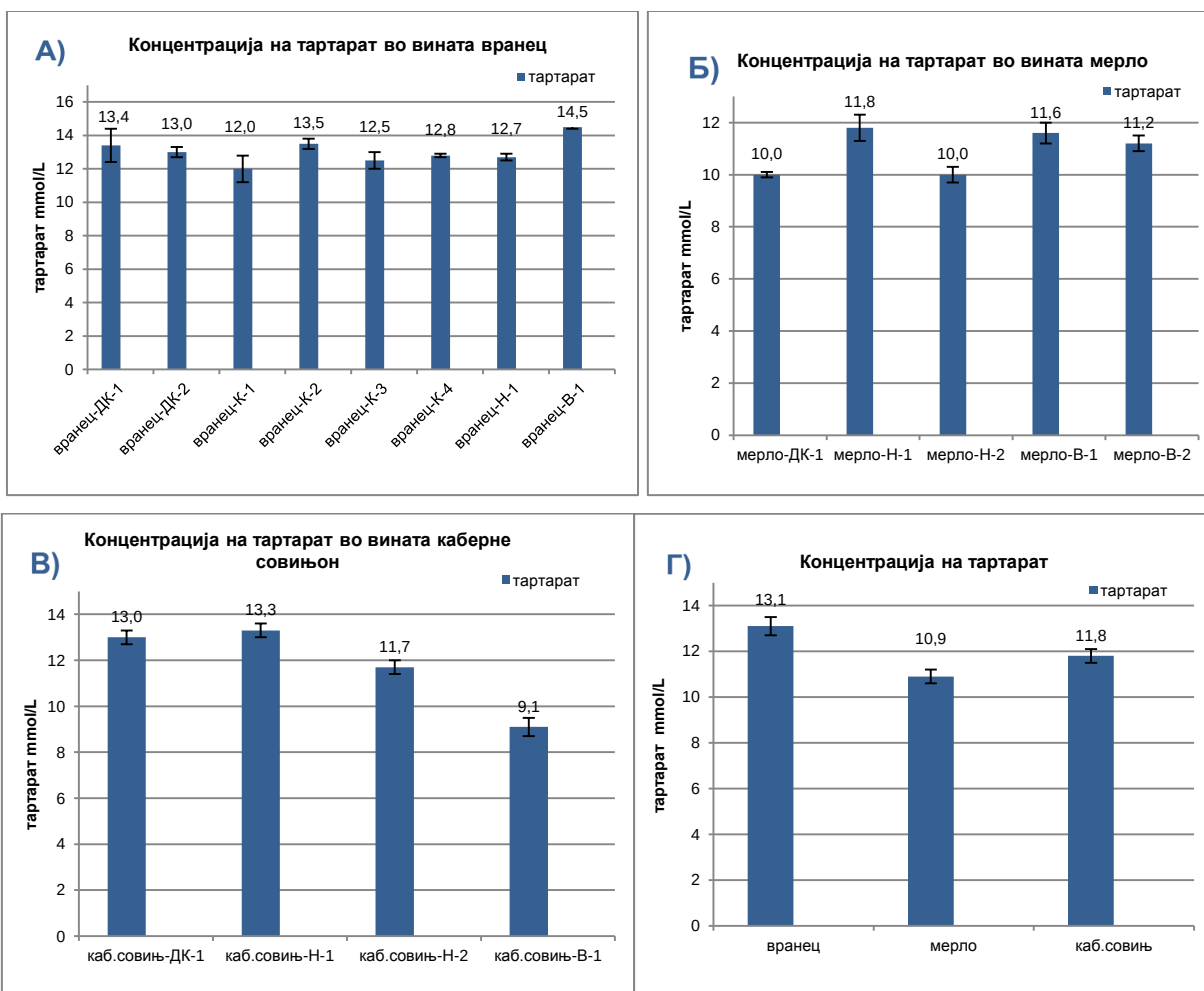
Кратенки на вински региони: ДК: Демир Капија; К: Кавадарци; Н: Неготино, В: Велес

Abbreviations of wine regions: DK: Demir Kapija; K: Kavadarci; N: Negotino, V: Veles

Вкупно беа анализирани 17 црвени вина од сортите вранец, мерло и каберне совинјон кои потекнуваат од винските региони Демир Капија, Кавадарци, Неготино и Велес од Република Македонија. За овие вина беа определени осум соли од органски киселини (оксалат, тартарат, малат, малонат, пируват, сукцинат, ацетат, цитрат и лактат) и два неоргански анјона (сулфат и фосфат).

Во сите вина беа определени солите на следните органски киселини: тартарат, малат, сукцинат и лактат бидејќи тие се природно присутни во вината (само солта малат не беше детектирана во две вина, вранец-В-1 и каберне совинјон-В-1). Цитратни јони беа најдени во две вина, мерло-Н-2 и каберне совинјон-В-1. Од сите соли, тартаратната сол беше присутна во највисока концентрација во вината од сортата вранец, во граници од 12,2 до 14,5 mmol/L. Всушност, винската киселина се синтетизира во грозјето и од таму таа се екстрахира во ширата, односно виното, во текот на мацерацијата. Во текот на ферментацијата и зреењето на виното, концентрацијата на винска киселина се намалува како резултат на формирање на тартаратни соли, главно калиум хидроген тартарат, кој се таложи на дното од танковите и се отстранува од виното со филтрирање. На слика 12 е графички е прикажана содржината на тартаратна сол (mmol/L), во анализираниите вина.

Концентрацијата на јабољкова киселина е најголема на почетокот на алкохолната ферментација, а потоа, во присуство на јабољково-млечна бактерија, таа се конвертира во млечна киселина, во текот на јабољково-млечната ферментација. Во текот на овој процес, содржината на јабољкова киселина се намалува, а содржината на млечна киселина се зголемува во виното (Davis et al. 1988). Во ова истражување, во сите вина беше спроведена јабољково-млечна ферментација и сите вина содржат ниска концентрација на малат, во граници од 0,4 до 1,2 mmol/L, и релативно висока содржина на лактат (опсег: 5,6 - 12,8 mmol/L). Тоа значи дека процесот јабољково-млечната ферментација целосно бил завршен во вината.

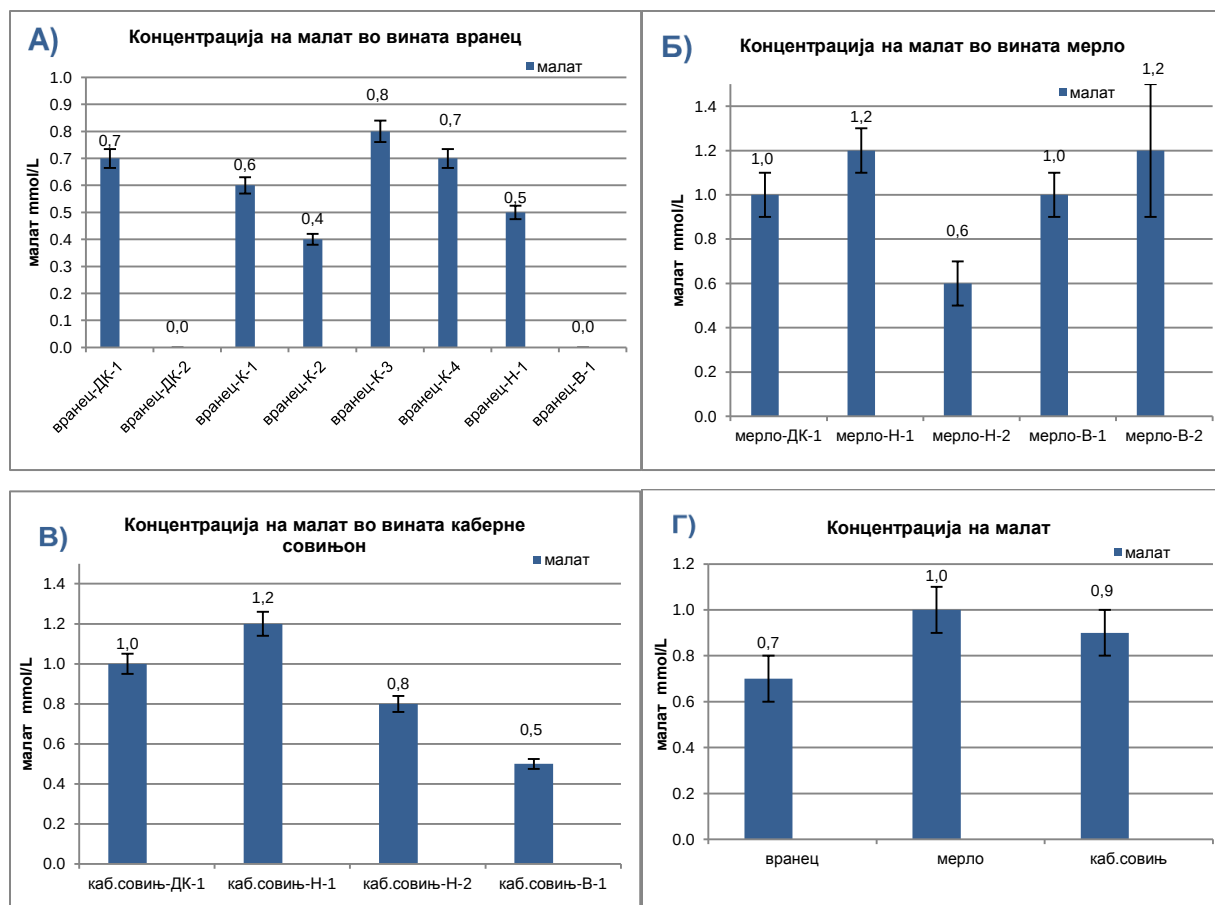


Слика 12. Концентрација на тартаратна сол во вина вранец (А), мерло (Б), каберне совињон (В) од различни области во Р Македонија.

Средна вредност на концентрација на тартаратна сол во различните сорти на вино (Г)

Figure 12. Concentration of tartrate in the wines Vranec (A), Merlo (B), Cabernet Sauvignon (C) from different areas in the Republic of Macedonia. Average concentration of tartrate in different wine varieties (G)

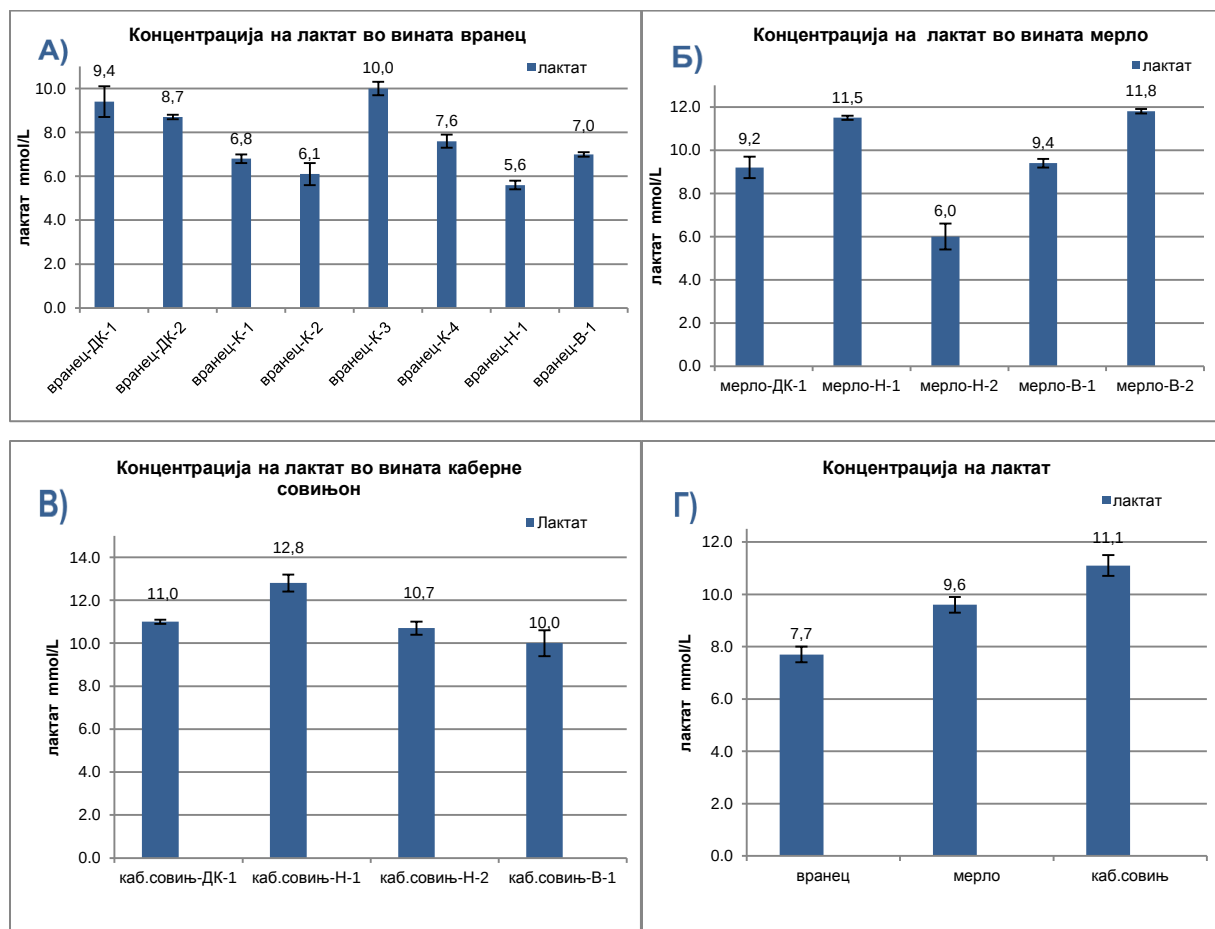
На слика 13 е прикажана содржината на малатна сол (mmol/L) во анализираните вина (вранец, мерло и каберне совињон) произведени од грозје одгледувано во различни вински региони: Демир Капија, Кавадарци, Неготино и Велес.



Слика 13. Концентрација на малатна сол во вина вранец (А), мерло (Б), каберне совињон (В) од различни области во Р Македонија. Средна вредност на концентарација на малатна сол во различните сорти на вино (Г)

Figure 13. Concentration of malate in the wines Vranec (A), Merlo (B), Cabernet Sauvignon (C) from different areas in the Republic of Macedonia. Avarage concentration of malate in different wine varieties (G)

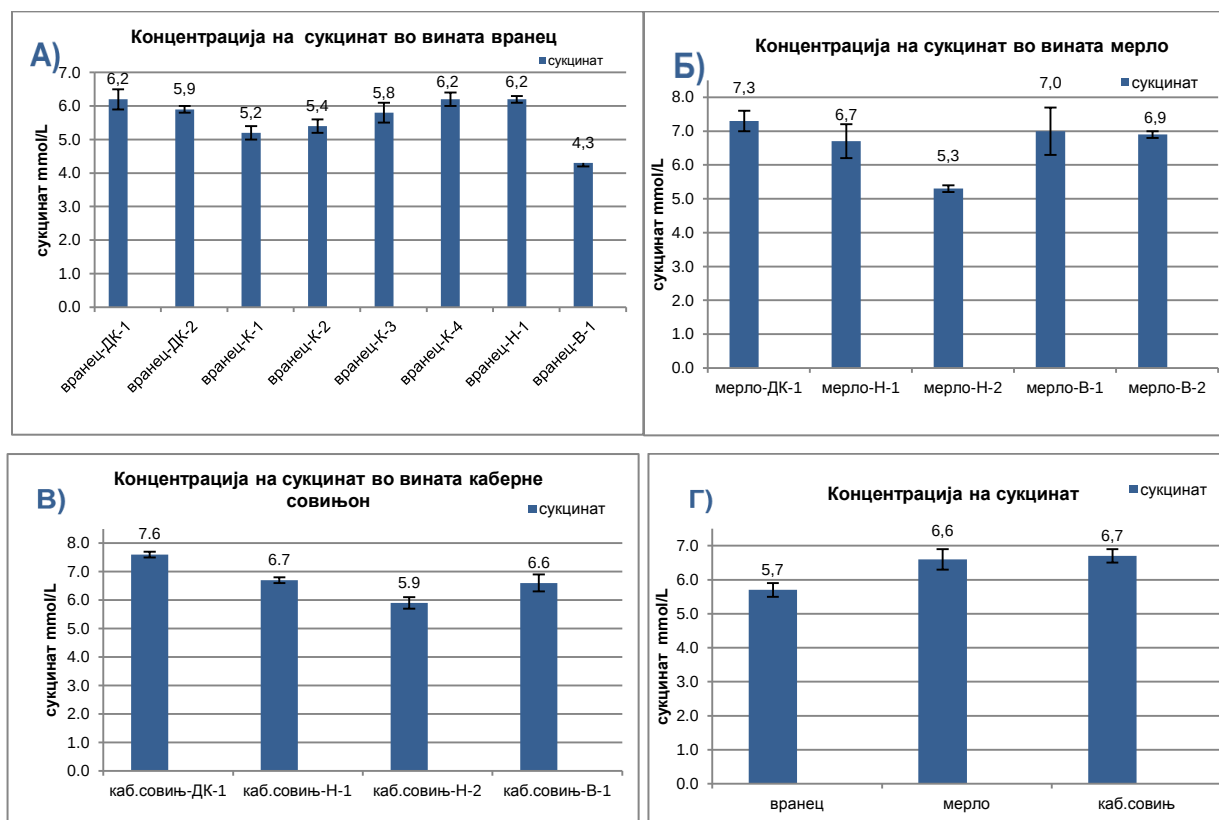
На слика 14 е прикажана содржината на лактат (mmol/L) анализираниите црвени вина, вклучувајќи вранец, мерло и каберне совињон.



Слика 14. Концентрација на лактат во вина вранец (А), мерло (Б), каберне совињон (В) од различни области во Р Македонија. Средна вредност на концентарација на лактат во различни сорти на вино (Г)

Figure 14. Concentration of lcatate in wines Vranec (A), Merlo (B), Cabernet Sauvignon (C) from different areas in the Republic of Macedonia. Avarage concentration of lactate in different wine varieties (G)

Килибарната киселина е продукт на метаболизмот на квасецот во текот на ферментацијата и таа има горчливосолен вкус. Присутна е во сите анализирани вина, во релативно ниска концентрација (опсег: 4,3 до 7,6 mmol/L) и нема влијание врз вкусот на вината. На слика 15 е прикажана содржината на сукцинатна сол (mmol/L) во анализираниите вина вранец, мерло и каберне совињон.

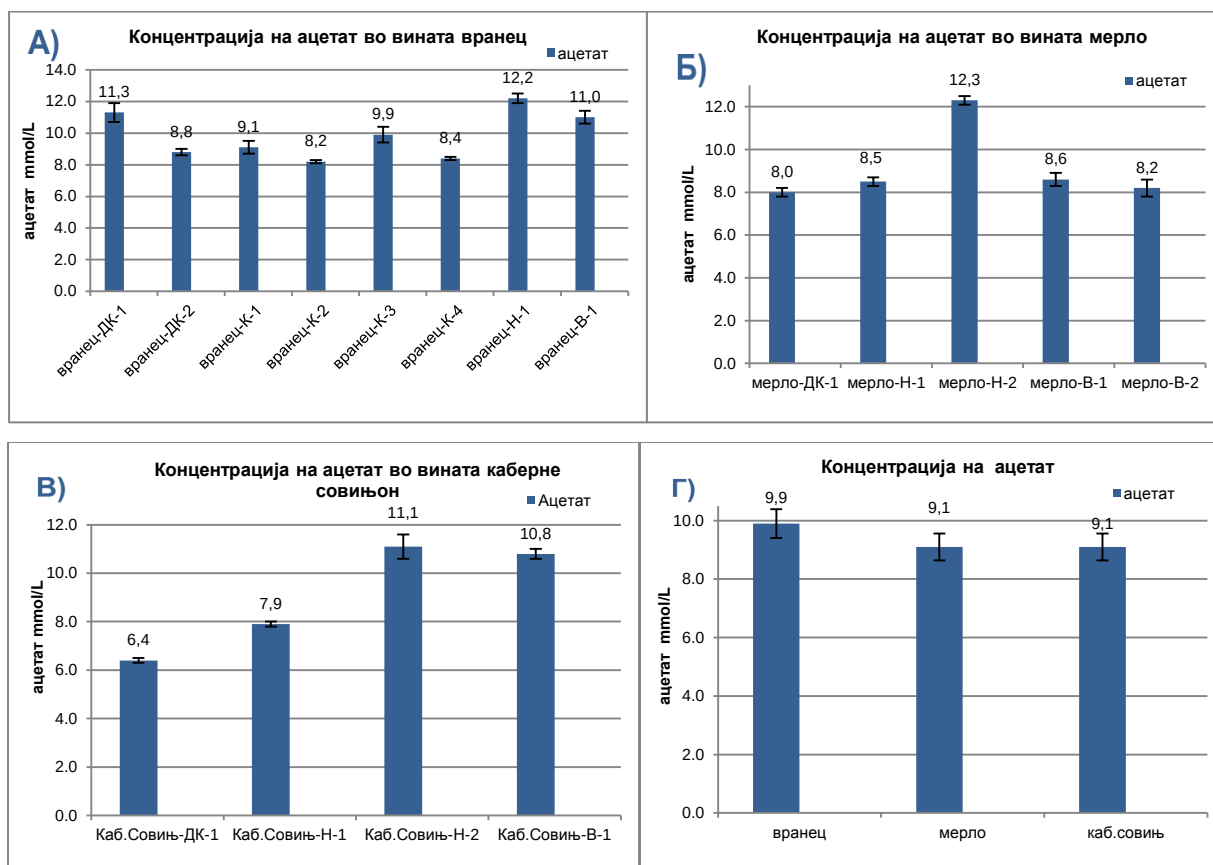


Слика 15. Концентрација на сукцинатна сол во вина вранец (А), мерло (Б), каберне совињон (В) од различни области во Р Македонија. Средна вредност на концентрација на сукцинатна сол во различните сорти на вино (Г)

Figure 15. Concentration of succinate in the wines Vranec (A), Merlo (B), Cabernet Sauvignon (C) from different areas in the Republic of Macedonia. Average concentration of succinate in different wine varieties (G)

Ацетати се солите на оцетната киселина. Пожелна концентрација на оцетна киселина во вино е околу 300 mg/L. Добиените резултати за оцетна киселина во анализираните вина вранец, мерло и каберене совињон се движат во опсег од 6,4 до 13,3 mmol/L. Овие концентрации се реалтивно ниско и не влијаат негативно врз мирисот и вкусот на вината.

На слика 16 е прикажана содржината на ацетат (mmol/L) во анализираните вина од сортите вранец, мерло и каберне совињон.

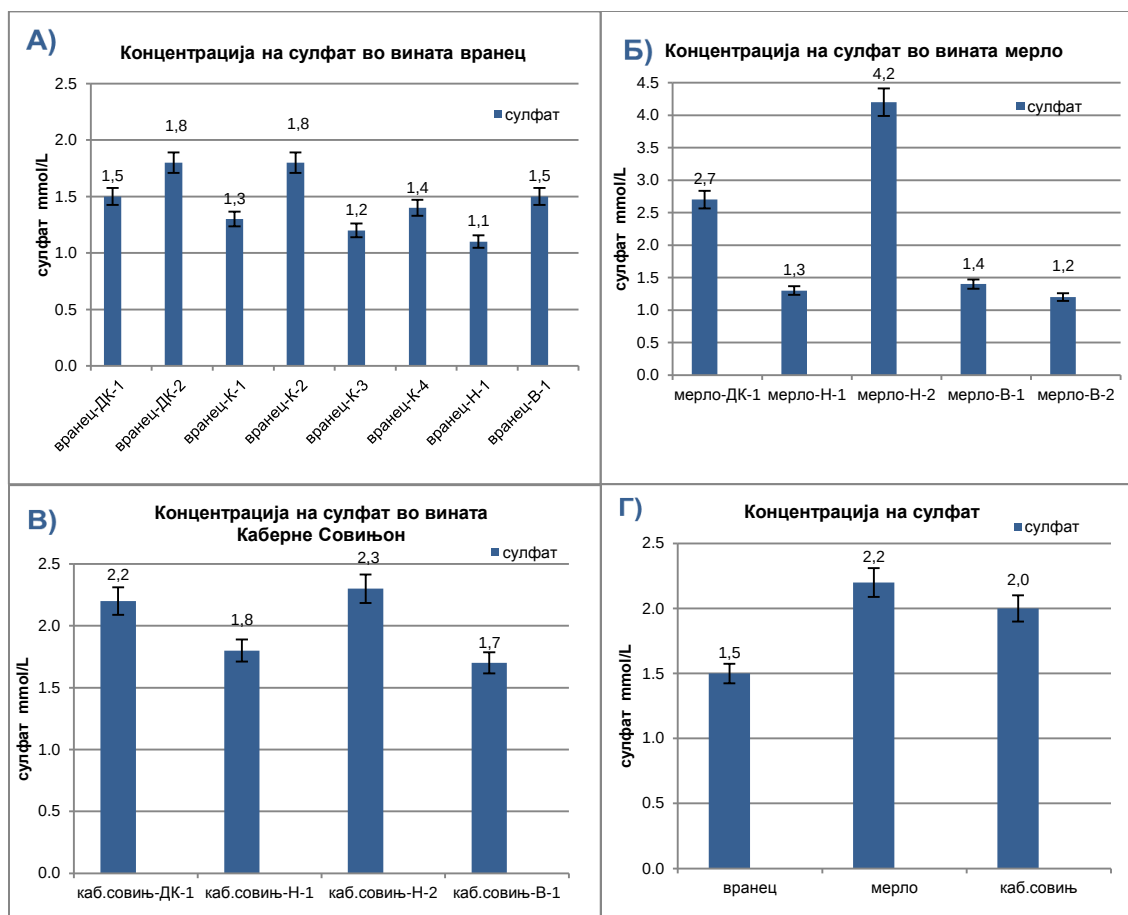


Слика 16. Концентрација на ацетат во вина вранец (А), мерло (Б), каберене совињон (В) од различни области во Р Македонија. Средна вредност на концентарација на ацетат во различни сорти на вино (Г)

Figure 16. Concentration of acetate in the wines Vranec (A), Melo (B), Cabernet Sauvignon (C) from different areas in the Republic of Macedonia. Avarage concentration of acetate in different wine varieties (G)

Цитратите се солите на лимонската киселина. Лимонската киселина се наоѓа во мали концентрации во ширата и виното, и се движат во граница од 0,5 до 1 g/L. Оваа киселина се применува за зголемување на киселоста на виното. Од друга страна, метаболичката патека на цитратот доведува до производство на оцетна киселина, со што ја зголемува испарливата киселост на виното. Концентрација на цитрати беше измерена во две анилизирани вина, и тоа во мерло (мерло-Н-2) и каберне совинјон (каберне совинј.-ДК-1), а во останатите анализирани примероци не беа најдени солите на цитрат, затоа што во текот на нивната ферментација, мацерација, како и по завршувањето на јаболково-млечната ферментација, не беше додадена лимонска киселина.

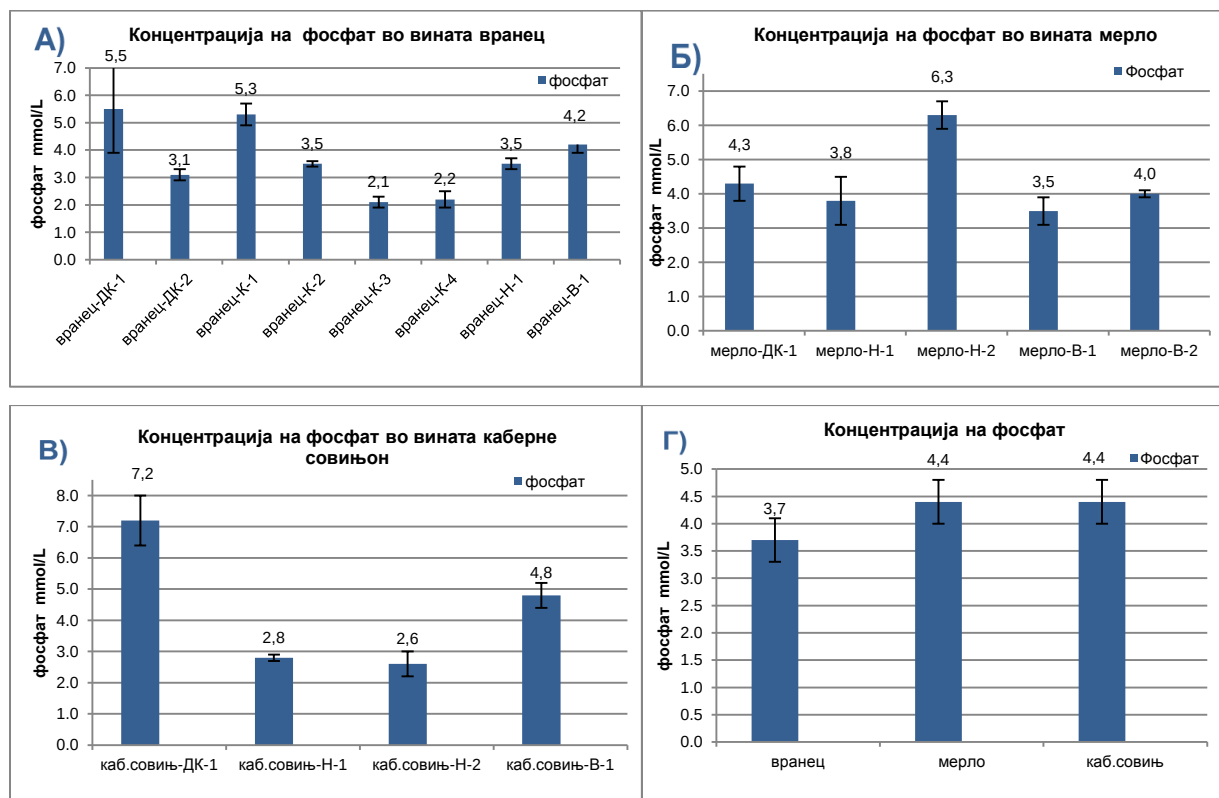
Сулфатите (SO_4^{2-}) и сулфитите (SO_3^{2-}) се сулфурни соединенија кои се добиваат од сулфур диоксид (SO_2), кој се додава во ширата и виното за да се заштити од оксидација. За првпат во ова истражување беа определени содржини на неорганските соли (сулфат и фосфат) во македонски вина. Концентрацијата на двата вида соли, и сулфат и фосфат, се движи во граници од 1,1 до 4,2 и од 2,1 до 7,2 mmol/L, соодветно. На слика 17 е прикажана содржината на сулфат (mmol/L) во анализираниите црвени вина.



Слика 17. Концентрација на сулфатна сол во вината вранец (А), мерло (Б), каберне совињон (В) од различни области во Р Македонија. Средна вредност на концентарација на сулфатна сол во различни сорти вино (Г).

Figure 17. Concentration of sulphate in the wines Vranec (A), Merlo (B), Cabernet Sauvignon (V) from different areas in the Republic of Macedonia. As well as the difference in the concentration of sulphate per variety of wine (G)

На сл. 18 е прикажана концентрацијата на фосфатни јони во анализираните црвени вина.



Слика 18. Концентрација на фосфат во вина вранец (А), мерло (Б), каберне совињон (В) од различни области во Р Македонија. Средна вредност на концентрација на фосфат во различни сорти на вино (Г).

Figure 18. Concentration of phosphate in the wines Vranec (A), Merlo (B), Cabaret Sauvignon (C) from different areas in the Republic of Macedonia. Average concentration of phosphate in different wine varieties (G)

Фосфатот што е пронајден во анализираните вина може да потекнува од DAP (диамониум фосфат), кој содржи азот и фосфат, а се користи како хранлив супстрат за да се инхибира ослободувањето на H_2S и да се подобри работата на квасецот во текот на ферментацијата.

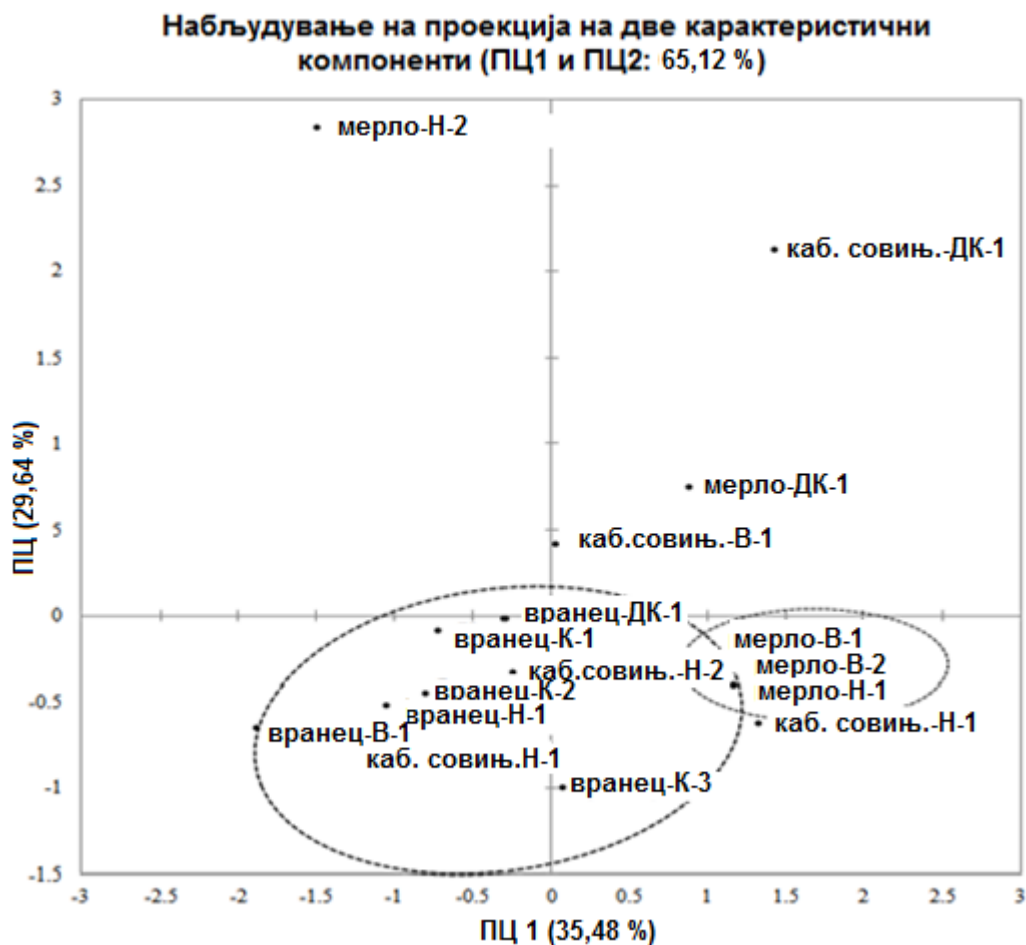
Општо земено, анализираните вина содржат органски киселини во концетрации кои најчесто се сретнуваат во вината, кои се поврзани со сортна карактеристика, а одредено влијание имаат третманите и постапките кои се применуваат во текот на винификацијата. Добиените резултати за органските киселини во македонските вина се во корелација со резултати од претходни студии објавени за македонски вина (Tašev et al. 2016), како и за вина од Словенија и Грција (Falque-Lopez et al., 1996, Zotou et al., 2004), за вина порто (Porto) (Esteves et al., 2004) и за бразилски вина (Peres et al., 2009).

3.1. Карактеристична векторска анализа

Карактеристична векторска анализа (КВА) беше применета на резултатите за индивидуални соли на органски и неоргански киселини, добиени при анализа со капиларна електрофореза (содржината на цитрат не беше земен во оваа анализа бидејќи е детектиран само во две вина). КВА беше применета со цел да се провери дали постои влијание и поврзаност меѓу сортата и винскиот регион во однос на содржината на органски киселини. Првите две карактеристични величини (KB1 и KB2) сочинуваат 66,17 % од вкупната варијанса (25,72 % за KB1 и 40,46 % за KB2), а со тоа се објаснуваат добиените значајни информации во базата на податоци. Проекцијата на овие примероци на виното, на првите две главни компоненти покажа поделба главно во две групи, според сортата (слика 22A): вината вронец беа одвоени од вината мерлот и каберне совинјон, овие две сорти беа групирани во втората група. Вината од сортата вронец, се лоцирани во негативниот дел на КВА1 (само два примерока, вронец-К-3 и вронец-К-4, се лоцирани во близина на нулата), додека вината мерло и две вина од каберне совинјон се лоцирани во позитивниот дел од КВА1 (исклучок биле мерло-Н-2 и каберне совинјон-Н-2). Според тоа, во групата на вина од сортата вронец не беше забележана јасна поделба на вината според географското вино. Слично на тоа, и во групата со вина од сортите мерло и каберне совинјон не беше постигната поделба според географската област.

Главните компоненти одговорни за разликите во составот на киселините на произведените вина беа утврдени и презентирани на дијаграм прикажан на слика 20. Одговорна компонента, по која се одвојуваа вината од сората вранец е тартаратната сол која преовладува во негативниот дел од првата главна компонента, додека малатот и лактататот, како и неорганските соли, сулфат и фосфати, се карактеристични за вината на каберне совињон.

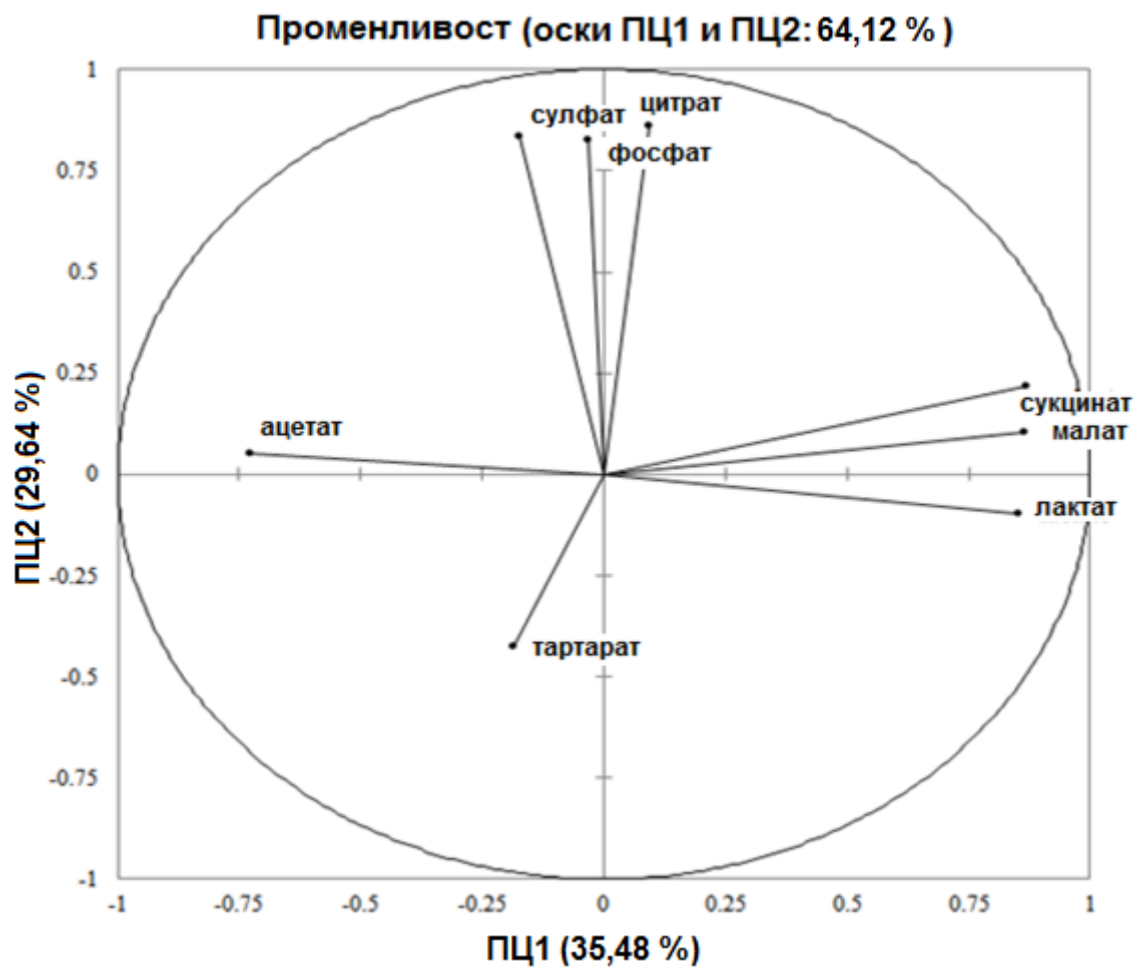
Во принцип на направената поделбата и споредба, групирањето на вината беше постигнато според сортната карактеристика на органски киселини во вината.



Слика 19.

А) Проекција на првите две карактеристични компоненти примероците на виното според првите две карактеристични компоненти

Figure 19. A) Projection of wine samples in the space defined for the two first principal components



Слика 20. Б) Приказ на органските и неорганските киселини одговорни за поделба на вината

Figure 20. B) PCA loadings of organic and inorganic acids in red wine samples

4. ЗАКЛУЧОК

Во овој магистерски труд беше разработен метод за определување на мали молекули (органски и неоргански киселини) во седумнаесет црвени вина, произведени од сортите на грозје вранец, каберне совинјон и мерло, одгледувани на различни области во Република Македонија: Демир Капија, Кавадарци, Неготино и Велес. Во сите анализирани примероци вино беа определени соли на органски киселини, и тоа: оксалат, тартарат, малат, малонат, пируват, сукцинат, ацетат, цитрат и лактат и неорганските анијони: сулфат и фосфат со примена на капиларна електрофореза со кондуктометриски спроводлив детектор (CE-CD).

Методот беше оптимизиран и валидиран. Беа определени следните валидни параметри: линеарност, лимит на детекција и лимит на квантификација (LOD и LOQ), точност, прецизност, повторливост и репродуктивност. Добиените вредности на овие параметри потврдуваат дека методот е соодветен за анализа на органски киселини во виното.

Предложениот метод е погоден за брзо, точно и истовремено определување на органски киселини и неоргански анијони (сулфат и фосфат), кои за првпат беа утврдени во локалните македонски сортни вина. Од добиените основи и напредни резултати беше заклучено дека сите вина содржат органски киселини во соодветни и препорачани нивоа на концентрација, а со тоа вината се заштитени од микробиолошка и хемиска оксидација. Вранец вината содржеа највисока концентрација на винска (тартаратна) киселина, која е параметар што ја одделува и издвојува оваа сорта од другите изучувани.

5. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Castiñeira, A., Peña, R. M., Herrero, C., & García-Martín S. (2000). Simultaneous determination of organic acids in wine samples by capillary electrophoresis and UV detection: Optimization with five different background electrolytes. *Journal of High Resol Chromatogr* 23: 647-652, doi: 10.1002/1521-4168(20001101)23:11<647::AID-JHRC647>3.0.CO;2-Z.
- Castiñeira, A., Peña, R. M., Herrero, C., & García-Martín, S. (2002). Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 319-331. doi: 10.1006/jfca.2002.1056.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S – 229S.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H., & Lee, T.H. (1988). Properties of wine lactic acid bacteria: their potential oenological significance. *American Journal of Enology and Viticulture* 39: 137–142.
- Escobal, A., Gonzalez, J., Iriando, C., & Laborra, C. (1997). Liquid chromatographic determination of organic acids in txakoli from Bikaia. *Food Chemistry* 58: 381–384, doi: [10.1016/S0308-8146\(96\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00032-5).
- Esteves, V.I., Lima, S.S.F., Lima, D.L.D., & Duarte, A.C. (2004). Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Analytica Chimica Acta*.
- Falque-Lopez, E., & Fernández-Gómez, E. (1996). Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol, and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *Journal of Chromatographic Science* 35: 254– 257, doi: [10.1093/chromsci/34.5.254](https://doi.org/10.1093/chromsci/34.5.254).
- Gomez, F.J.V., & Silva, M.F. (2016). Microchip electrophoresis for wine analysis. *Anal Bioanal Chem* 408: 8643-53, doi: 10.1007/s00216-016-9841-0
- Gayon, R. P., Glories, Y., Majuean, A., & Dubourdieu, D.(2006). *Hand book of enology, Volume 2, The chemistry of wine stabilization and treatments*.
- Ivanova-Petropulos, V. (2013). *Sensory and Analytical Evaluation of Wine*. University Goce Delcev", Stip. ISBN 978-608-4708-01-8.137.

- Ivanova, V., Stefova, M., & Chinnici, F. (2010). Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *Journal of the Serbian Chemical Society*. **75**, 45-59.
- Ivanova-Petropulos, V., & Mitrev, S. (2014). *Determination of SO₂ and reducing sugars in Macedonian wines*. Yearbook of Faculty of Agriculture, 12: 7-18. ISSN 1409-987X.
- Jakson, R. (2000). Wine, health, and food. In "Wine Science", ed. Taylor, S., Academic Press, San Diego, pp. 591-607.
- Johanides, V., Korčulanin, A., Marić, V., Divjak, S., & Vlašić, D. (1976). Proizvodnja vina vo *Industrijska mikrobiologija*, Tehnoloski fakultet, Zagreb. 165-176.
- Kalathenos, P., Sutherland, J.P., & Roberts, T.A. (1995). *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 245.
- Kubáň, P., & Hauser, P.C. (2005). Application of an external contactless conductivity detector for the analysis of beverages by microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 3169-78, doi: 10.1002/elps.200500178.
- Kuhn, R., & Hoffstetter-Kuhn, S. (1993). *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*; SpringerVerlag: Berlin.
- Landers, J. P. (1994). *Handbook of Capillary Electrophoresis*; CRC Press: Boca Raton, 1994.
- Landers, J. P. (1997). *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC: New York.
- Leube, J., & Roeckel, O. (1994). *Analytical Chemistry*. 66, 1090.
- Li, S. (1992). *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice, and Applications*. *Journal of Chromatography Library*; Elsevier Science Publishers: The Netherlands; Vol 52.
- Liu, Q., Wang, L., Hu, J., Miao, Y., Wu, Z., & Li, J. (2017). Main Organic Acids in Rice Wine and Beer Determined by Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection Using 2, 4- Dihydroxybenzoic Acid as Chromophore. *Food Analytical Methods*. 10: 111-117. doi: doi.org/10.1007/s12161-016-0559-6.
- Masár, M., Kaniansky, D., Bodor, R., Jöhnck, M., & Stanislawski, B. (2001). Determination of organic acids and inorganic anions in wine by isotachophoresis on a planar chip. *Journal of Chromatography A* 916: 167-74, doi: 10.1016/S0021-9673(00)01094-3.

- Masár, M., Poliaková, K., Danková, M., Kaniansky, D., & Stanislawski, B. (2005). Determination of organic acids in wine by zone electrophoresis on a chip with conductivity detection. *Journal of Separation Science* 28: 905-14, doi: 10.1002/jssc.200500061.
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J.F. (2007). Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry* 102: 104- 112.
- OIV (International organization of vine and wine) (2016) Compendium of international methods of analysis of wines and musts. Paris, France, Vol. 1. Available from: <http://www.oiv.int/public/medias/4231/compendium-2016-en-vol1.pdf>.
- Peres, R.G., Moraes, E.P., Micke, G.A., Tonin, F.G., Tavares, M.F.M., & Rodriguez-Amaya, D.B. (2009). Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control* 20: 548-52, doi: 10.1016/j.foodcont.2008.08.004.
- Petersen, J. R., & Amin, A. M. (2001). *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. New York: Humana P, 2001.
- Regmi, U., Palma, M., & Barroso, C.G. (2012). Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*. 732: 137–144, doi: [10.1016/j.aca.2011.11.009](https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.009).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of enology, Vol.2 : The chemistry of wine and stabilization and treatments*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p.141.
- Saavedra, L., & Barbas, C. (2003). Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines. *Electrophoresis* 24: 2235–2243, doi: 10.1002/elps.200305415.
- Tavares, M. F. M. (1997). Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química nova*, 20(5) 493.

- Tavares, M. F. M., Jager, V. A., da Silva L. C., Moraes P. E., Pereira A. E., de Lima C. E., Fonseca N. F., Tonin G. F., Micke A. M., Santos M. R., de Oliveira A. M., de Moraes L. M., Kampen H. M., & Fujiya M. N. (2003). Applications of capillary electrophoresis to the analysis of compounds of clinical, forensic, cosmetological, environmental, nutritional and pharmaceutical importance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. vol.14 no. 2.
- Tašev, K., Stefova, M., & Ivanova-Petropulos, V. (2016). HPLC method validation and application for organic acid analysis in wine after solid-phase extraction. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 35: 225-233. doi:10.20450/mjcce.2016.1073.
- Tusseau, D., & Benoit, C. (1987). Routine high-performance liquid chromatographic determination of carboxylic acids in wines and champagne. *Journal of Chromatogr* 395: 323-333.
- Weston, A., & Brown, P. (1997). *HPLC & CE: Principles and Practice*; Academic Press: San Diego.
- Xiong, Z., Dong, Y., Zhou, H., Wang, H., & Zhao, Y. (2014). Simultaneous Determination of 16 Organic Acids in Food by Online Enrichment Ion Chromatography–Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* 7: 1908–1916. doi: doi.org/10.1007/s12161-014-9839-1.
- Yan, Z., Xingde, Z., & Weiju, N. (1997). Simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in beer and wine by ion chromatography. *Mikrochim Acta* 127: 189-194, doi: 10.1007/BF0124272.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, C., K., Gump. B, H., & Nury, F., S. (1995) *Wine Analysis and Production*. pg. 78 - 90, 195 - 201, 447.
- Zotou, A., Lokou, Z., Karava, O. (2004). Method Development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 60: 39–44, doi: 10.1365/s10337-004-0330-9.
- Нацрт-стратегија за лозарство и винарство (2010-2015). Министерство за земјоделство, шумарство и водостопанство на Република Македонија.